

Synthese gezielt isotopenmarkierter und strukturell modifizierter Tetrapyrrole

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Simone Ringsdorf

aus Wipperfürth

November 2010

Die vorliegende Arbeit wurde ausgeführt am Max-Planck-Institut für Bioorganische Chemie in Mülheim an der Ruhr unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Gärtner von Oktober 2007 bis November 2010.

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Wolfgang Gärtner

Korreferent: Prof. Dr. Thomas J.J. Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 09.12.2010

Meiner Familie

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. Gärtner für die Möglichkeit als Teil seiner Arbeitsgruppe an diesem interessanten Forschungsgebiet zu arbeiten, sowie für seine hilfreichen Tipps und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens bin ich Herrn Prof. Dr. Th.J.J. Müller sehr dankbar.

Frau Manuela Trinoga danke ich für den exzellenten HPLC-Service sowie die wertvollen Diskussionen über die Ergebnisse der Aufreinigung. Innerhalb kürzester Zeit entwickelte und etablierte sie geeignete Trennverfahren für eine Vielzahl an Produkten, wodurch sie am Erfolg der synthetischen Arbeiten maßgeblich Anteil hatte.

Frau Gül Koç danke ich für die Abtrennung der Methanoladdukte und die Einführung in die HPLC-Methodik.

Herrn Jörg Bitter und Frau Dagmar Merkel danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Ferner danke ich Herrn Werner Joppek sowie allen Mitarbeitern der Abteilung Massenspektrometrie des Max-Planck-Instituts für Kohlenforschung für die hervorragende Messung und Auswertung der Massenspektren.

Frau Kerstin Neurieder danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren und die Unterstützung bei der Versendung chemischer Substanzen.

Mein Dank gilt auch Frau Birgit Deckers für die fachliche Unterstützung bei Problemen mit graphischen Darstellungen.

Frau Dr. Christina Alessandra Hoppe danke ich für die Durchsicht dieser Arbeit und die Hilfe bei den verschiedensten Computerproblemen.

Herrn Sebastian Gandor und Dr. Madina Mansurova danke ich für ihre Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei fachlichen Problemen und für das gute Arbeitsklima.

Frau Inge Heise danke ich für die stete Hilfsbereitschaft und guten Ratschläge bei der präparativen Arbeit und das gute Büroklima.

Frau Jana Riethausen und Frau Sarah Raffelberg sowie allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die gute Gemeinschaft und Hilfsbereitschaft.

Frau Helene Steffen danke ich für die Assemblierung der Chromophore ins Protein und das stets offene Ohr.

Des Weiteren möchte ich allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Instituts danken, die auf unterschiedlichste Art und Weise am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren.

Ich danke meinen Eltern, meinem Bruder und Milan Andreas Muschner für die liebevolle Unterstützung und stete Zuversicht nicht nur während meines Studiums und der Zeit der Promotion.

Inhaltsverzeichnis

1	Theoretische Grundlagen	7
1.1	Photosensoren	7
1.2	Phytochrome	9
1.2.1	Historischer Überblick	9
1.2.2	Aufbau der Phytochrome	11
1.2.3	Der Photozyklus von Phytochromen	16
1.3	Tetrapyrrole	18
1.4	Biosynthese	19
1.5	Chemische Totalsynthese	22
2	Motivation der Arbeit	29
3	Syntheseplanung	31
3.1	Syntheseplanung der verschiedenen Phycocyano-biline und seiner Derivate	31
3.1.1	Allgemeines Synthesekonzept für Phycocyanobilin (PCB) (3)	31
3.1.1.1	Synthese des A-Rings (5)	31
3.1.1.2	Synthese der B/C-Vorstufe (10)	32
3.1.1.3	Synthese des B-Rings (17)	33
3.1.1.4	Synthese des C-Rings (22)	35
3.1.1.5	Kupplung zur AB-Hälfte (23)	35
3.1.1.6	Kupplung zur CD-Hälfte (24)	36
3.1.1.7	Kupplung zum Tetrapyrrol	37
3.1.2	Synthese des ¹⁵ N-markiertem C-Rings (29)	38
3.1.3	Synthese des C-Rings mit ¹³ C-markierter Carbonyl-funktion des Propionsäurerestes (33)	39
3.1.4	Synthese von (5- ¹³ C)-Phycocyanobilin (41)	40
3.1.5	Synthese von (15- ¹³ C)-Phycocyanobilin (48)	41
3.1.6	Isolierung von Phycocyanobilin aus dem Cyanobakterium <i>Spirulina platensis</i>	42
3.1.7	Synthese eines Phycocyanobilindimethylester-3 ¹ -cysteinadduktes (53)	43

3.1.8	Spaltung von ^{15}N -Phycocyanobilin (54)	43
3.2	Synthesepaltung von (10- ^{13}C)-Biliverdin IX α (62)	46
4	Ergebnisse und Diskussion	50
4.1	Synthese der Phycocyanobiline	50
4.1.1	Synthese des A-Rings (5)	50
4.1.2	Synthese der B/C-Vorstufe (10)	52
4.1.2.1	Synthese von 4-Acetoxy-5-nitrohexansäuremethylester (11)	53
4.1.2.2	Synthese von (1- ^{13}C)-4,4-Dimethoxybutyronitril (37) ^[80]	56
4.1.2.3	Synthese von (1- ^{13}C)-4,4-Dimethoxybutansäure (38)	57
4.1.2.4	Synthese des Isocyanoessigsäure- <i>tert</i> -butylesters (16)	57
4.1.2.5	Synthese des ^{15}N -Isocyanoessigsäuremethylesters (31)	58
4.1.2.6	Ringschluss zur B/C-Vorstufe (10)	60
4.1.2.7	Ringschluss zur ^{15}N -markierten B/C-Vorstufe (29)	61
4.1.3	Synthese des B-Rings (17)	61
4.1.4	Synthese des C-Rings	64
4.1.4.1	Unmarkierter C-Ring (22)	64
4.1.4.2	(5- ^{13}C)-C-Ring (49)	65
4.1.4.3	^{15}N -markierter C-Ring (29)	65
4.1.5	Kupplung zur AB-Hälfte (25)	66
4.1.6	Kupplung zur CD-Hälfte	67
4.1.6.1	Unmarkierte CD-Hälfte (24)	67
4.1.6.2	(5- ^{13}C)-CD-Hälfte (50)	69
4.1.6.3	(11- ^{15}N)-CD-Hälfte (72)	70
4.1.7	Kupplung zum Tetrapyrrol	72
4.1.7.1	(5- ^{13}C)-Phycocyanobilin (41)	74
4.1.7.2	(15- ^{13}C)-Phycocyanobilin (48)	74
4.1.8	Isolierung von Phycocyanobilin (3) aus dem Cyanobakterium <i>Spirulina platensis</i>	77
4.1.9	Synthese eines Phycocyanobilindimethylester-3 ¹ -Cysteinadduktes (53)	81
4.1.10	Spaltung von (u- ^{15}N)-PCB (54)	81

4.2	Synthese von (10- ¹³ C)-Biliverdin IX α (62)	82
4.2.1	Oxidation von Bilirubin (66)	82
4.2.2	Veresterung von Biliverdin IX α (66)	83
4.2.3	Spaltung von Biliverdindimethylester (63)	83
4.2.4	Formylierung der AB-Hälfte (67)	85
4.2.5	Kondensation der AB- (67) mit der CD-Hälfte (65)	86
4.2.6	Freisetzung von (10- ¹³ C)-Biliverdin IX α (62)	88
5	Ausblick	91
6	Zusammenfassung	92
7	Summary	94
8	Experimentaltteil	96
8.1	Geräte, Materialien und Methoden	96
8.1.1	NMR-Spektroskopie	96
8.1.2	UV/VIS-Spektroskopie	96
8.1.3	Massenspektrometrie	96
8.1.4	Säulenchromatographie	97
8.1.5	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie	97
8.2	Lösungsmittel und Reagentien	98
8.3	Synthese des Phycocyanobilins	101
8.3.1	Synthese des A-Rings (5)	101
8.3.1.1	Darstellung von (4-Methoxybenzyl)-3-methylpyrrol-2,5-dion (7) ^[64,68]	101
8.3.1.2	Darstellung von (E)-3-Ethyliden-1-(4-methoxybenzyl)-4-methylpyrrolidin-2,5-dion (8) ^[64,68]	103
8.3.1.3	Darstellung von (E)-3-Ethyliden-4-methylpyrrolidin-2,5-dion (9) ^[64,68]	105
8.3.1.4	Darstellung von (E)-3-Ethyliden-4-methyl-2-thiosuccinimid (5) ^[64,68]	107
8.3.2	Synthese der B-/C-Ringvorstufe (10)	109
8.3.2.1	Darstellung von N-Formylglycin- <i>tert</i> -butylester (15) ^[64,70]	109
8.3.2.2	Darstellung von Isocyanoessigsäure- <i>tert</i> -butylester (16) ^[64,70]	111

8.3.2.3	Darstellung von ^{15}N -Glycinmethylesterhydrochlorid (32) ^[78]	113
8.3.2.4	Darstellung von ^{15}N -Formylglycinmethylester (30) ^[79]	114
8.3.2.5	Darstellung von ^{15}N -Isocyanoessigsäuremethylester (31) ^[64,70,76]	116
8.3.2.6	Darstellung von 4-Nitrobutansäuremethylester (12) ^[95]	118
8.3.2.7	Darstellung von 4,4-Dimethoxybutansäuremethylester (13) ^[95]	120
8.3.2.8	Darstellung von 4-Oxobutansäuremethylester (14) ^[95]	122
8.3.2.9	Darstellung von 4-Acetoxy-5-nitrohexansäuremethylester (11) ^[69,70]	124
8.3.2.10	Darstellung von (1- ^{13}C)-4,4-Dimethoxybutannitril (37) ^[80]	126
8.3.2.11	Darstellung von (1- ^{13}C)-4,4-Dimethoxybutansäure (38)	127
8.3.2.12	Darstellung von 3-(2-Methoxycarbonyl-ethyl)-4-methyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-carbonsäure- <i>tert</i> -butylester (10) ^[64]	129
8.3.2.13	Darstellung von ^{15}N -3-(2-Methoxycarbonyl-ethyl)-4-methyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-carbonsäuremethylester (29) ^[64]	131
8.3.3	Synthese des B-Rings	133
8.3.3.1	Darstellung von D-(-)-Weinsäuredibenzylester (19) ^[64]	133
8.3.3.2	Darstellung von Glyoxylsäurebenzylester (18) ^[64]	135
8.3.3.3	Darstellung von 3-(5-((Benzylcarbonyl)-hydroxymethyl)-2-(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)-4-methylpyrrol-3-yl)-propionsäuremethylester (20) ^[64]	137
8.3.3.4	Darstellung von Benzyloxycarbonyl-(5- <i>tert</i> -butoxycarbonyl-4-(2-methoxycarbonyl-ethyl)-3-methylpyrrol-2-yl)-(triphenylphosphonid)-methanid (17) ^[64]	139
8.3.4	Synthese des C-Rings	141
8.3.4.1	Darstellung von (5- ^{13}C)-5-Formyl-3-(2-methoxycarbonyl-ethyl)-4-methyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-carbonsäure- <i>tert</i> -butylester (33) ^[64]	141
8.3.4.2	Darstellung von ^{15}N -Methyl-3-(2-methoxycarbonyl-ethyl)-5-formyl-4-methyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-carbonsäuremethylester (70) ^[64]	143
8.3.5	Synthese der AB-Hälfte	145
8.3.5.1	Darstellung von 3-(5-Benzyloxycarbonyl-9- <i>tert</i> -butoxycarbonyl-2,3-dihydro-2,7-dimethyl-3-ethyliden-dipyrin-1-(10 <i>H</i>)-on-8-yl)-propionsäuremethylester (25) ^[64]	145

8.3.5.2	Darstellung von 9- <i>tert</i> -Butoxycarbonyl-2,3-dihydro-2,7-dimethyl-3-ethyliden-8-(2-methoxycarbonyl)-ethyl-dipyrrin-1-(10 <i>H</i>)-on-5-carbonsäure (23) ^[64]	147
8.3.6	Synthese der CD-Hälfte	149
8.3.6.1	Darstellung von (5- ¹³ C)-2-Ethyl-9-carbonsäure- <i>tert</i> -butylester-8-(2-methoxycarbonyl-ethyl)-3,7-dimethylpyrromethen-1 <i>H</i> -pyrrol (50) ^[64]	149
8.3.6.2	Darstellung von (5-C ¹³)-2-Ethyl-9-formyl-8-(2-methoxycarbonyl-ethyl)-3,7-dimethylpyrromethen-1 <i>H</i> -pyrrol (52) ^[64]	151
8.3.6.3	Darstellung von ¹⁵ N-2-Ethyl-9-carbonsäuremethylester-8-(2-methoxycarbonyl-ethyl)-3,7-dimethylpyrromethen-1 <i>H</i> -pyrrol ^[64,70] (72)	153
8.3.7	Synthese des Tetrapyrrols	155
8.3.7.1	Darstellung von (5- ¹³ C)-Phycocyanobilindimethylester (75) ^[64]	155
8.3.7.2	Darstellung von (15- ¹³ C)-Phycocyanobilindimethylester (51) ^[64]	157
8.3.7.3	Darstellung von (5- ¹³ C)-Phycocyanobilin (41) ^[64]	159
8.3.7.4	Darstellung von (15- ¹³ C)-Phycocyanobilin (48) ^[64]	161
8.4	Spaltung von Phycocyanobilindimethylester (28)	163
8.4.1	Isolierung von Phycocyanobilin (3) aus <i>Spirulina platensis</i>	163
8.4.2	Abtrennung der Methanoladdukte von Phycocyanobilin (73,74) ^[70]	165
8.4.3	Veresterung von Phycocyanobilin (3) ^[59,70]	168
8.4.4	Spaltung von Phycocyanobilindimethylester (28) mittels Thiobarbitursäure ^[63]	170
8.5	Darstellung eines 3 ¹ -Cystein-Phycocyanobilindimethylesteradduktes (53) ^[85]	173
8.6	Synthese von Biliverdin IX α (1)	175
8.6.1	Darstellung von Biliverdin IX α (1) ^[59]	175
8.6.2	Darstellung von Biliverdindimethylester (63) ^[59,70]	177
8.6.3	Spaltung von Biliverdindimethylester (63) mittels Thiobarbitursäure ^[70]	179
8.6.4	Darstellung von (10- ¹³ C)-9-Formyl-3-vinyl-neoxanthobilirubinsäuremethylester (67) ^[70]	182

8.6.5	Darstellung von (10- ¹³ C)-Biliverdindimethylester (68) (Kupplung mittels Phosphorylchlorid) ^[94]	184
8.6.6	Darstellung von (10- ¹³ C)-Biliverdin IX α (62) (Abspaltung der Schutzgruppen) ^[64,70]	186
9	Anhang	188
9.1	Substanzen	188
9.2	Abbildungsverzeichnis	191
9.3	Literaturverzeichnis	202
9.4	Abkürzungsverzeichnis	210

1 Theoretische Grundlagen

1.1 Photosensoren

Licht dient in der Natur nicht nur der Energiegewinnung durch Photosynthese und somit dem Aufbau des größten Teils der Biomasse, sondern auch der Anpassung der Organismen an ihre Umgebung. Dazu absorbieren die Organismen elektromagnetische Strahlung vor allem im Bereich von 350 bis 750 nm (siehe Abb. 1).

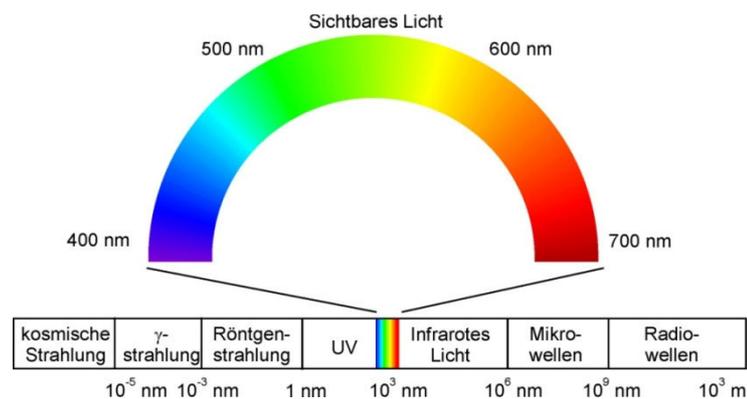


Abb. 1: Einteilung der elektromagnetischen Strahlung

Diese Fähigkeit basiert auf der Entwicklung verschiedener Proteine, sogenannter sensorischer Photorezeptoren, die in Verbindung mit niedermolekularen organischen Verbindungen (Chromophoren; altgriechisch: Farbträger) Licht bestimmter Wellenlängen absorbieren und damit eine Signalkette auslösen, die schließlich eine physiologische Reaktion induziert. Es wurden bisher sechs verschiedene Arten von Photorezeptoren identifiziert^[1]: Rhodopsine, Phytochrome, Cryptochrome, Xanthopsine, „Light-Oxygen-Voltage“-Sensoren (LOVs) und FAD enthaltende Blaublichtsensoren (blue-light sensors using flavin adenine dinucleotide = BLUF). Die einzelnen Photorezeptoren absorbieren durch unterschiedliche prosthetische Gruppen (vgl. Abb. 2) Licht unterschiedlicher Wellenlänge: Rhodopsin (abhängig vom jeweiligen Protein von 350 bis > 600 nm – UV/Blaulicht bis Rotlicht), Phytochrom (z.B. 665 nm in PhyA, überwiegend Rotlicht), Cryptochrom (380 - 440 nm), Xanthopsine (Blaulicht, z.B. 446 nm in *Ectothiorhodospira halophila*), LOV (λ_{\max} = 445 – 450, Blaulicht) und BLUF (Blaulicht)^[2].

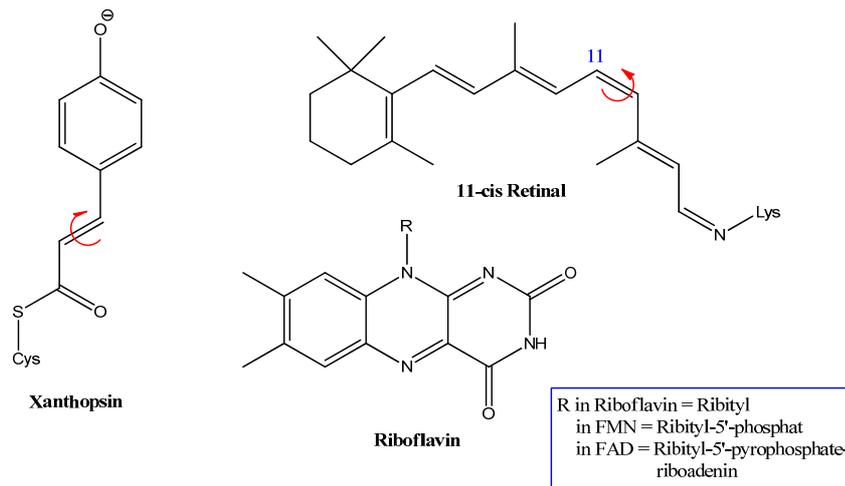


Abb. 2: Prosthetische Gruppen von Photorezeptoren: links Xanthopsin (Chromophor der Xanthopsine), oben rechts 11-cis-Retinal (Chromophor der Wirbeltier-Rhodopsine, durch Absorption eines Photons wird eine cis-trans-Isomerisierung zu all-trans-Retinal induziert; in Bacteriorhodopsin führt die Absorption von Licht hingegen zu einer all-trans-13-cis-Isomerisierung) und unten rechts der Flavingrundkörper (Chromophor der LOVs, Cryptochrome und BLUFs). Die roten Pfeile geben die isomerisierende Doppelbindung an. Die Funktion von Riboflavin basiert nicht auf der Isomerisierung einer Doppelbindung, sondern abhängig vom jeweiligen Photorezeptor entweder auf der Bildung einer kovalenten Bindung (LOV), der Änderung des Wasserstoffbrückennetzwerks (BLUF) oder Elektronentransfer (Cryptochrome)^[1].

Die Absorption eines Lichtquants des sichtbaren Spektrums von 360 (violett) bis 750 nm (rot) mit einer Energie von 335 (violett) bis 160 kJ · mol⁻¹ (rot)^[3] durch den Chromophor führt entweder zur Bildung einer kovalenten Bindung (LOV), Elektronentransfer (Cryptochrom), Protonenumlagerung (BLUF) oder zu der Isomerisierung einer Doppelbindung (Rhodopsine der Wirbeltiere und wirbellosen Tiere, bakterielle Rhodopsine, Phytochrom, Xanthopsin). Allen Photorezeptoren gemeinsam ist der Aufbau des Proteinteils in Domänen, das heißt in Bereiche, die eine spezifische Faltung der Proteinkette besitzen und durch unspezifisch gefaltete Abschnitte miteinander verbunden sind. Sie können in der Zellmembran verankert sein, wie zum Beispiel das Bacteriorhodopsin (eine Protonenpumpe), jedoch sind die meisten Photorezeptoren im Cytosol lokalisiert, wobei die Funktionalität durch eine gute Durchlässigkeit der Zelle für elektromagnetische Strahlung gewährleistet ist. Auch wenn seit der Entdeckung von Rhodopsinen und Phytochromen nahezu 100 Jahre vergangen sind, ist die genaue Funktionsweise auf molekularer Ebene noch unklar und damit Gegenstand intensiver fachübergreifender Forschung. Die Blaulichtsensoren, Xanthopsine, LOVs und BLUFs, konnten erst in jüngerer Zeit identifiziert werden (zum Beispiel Xanthopsin 1985^[4] und Cryptochrom 1993^[2]), obwohl schon Darwin Jr. im Jahre 1880 sich des Vorhandenseins von Blaulichtsensoren bewusst war. Heute ist das Feld der Blaulichtphotorezeptoren, wie auch das der Phytochrome, ein

Forschungsgebiet von hohem Interesse, in dem alle Naturwissenschaften zusammen wirken. Nachdem nun genauere Erkenntnisse über die Funktionsweise von Photorezeptoren gesammelt wurden, kann dieses Wissen in anderen Bereichen Anwendung finden. So wurden erste Versuche beschrieben, in denen Nervenzellen (z.B. von Mäusen) durch in die Membran eingelagerte Channel-Rhodopsine mittels Licht stimuliert werden^[5,6].

1.2 Phytochrome

1.2.1 Historischer Überblick

Zwei verschiedene Pflanzen und Phänomene führten die Wissenschaft Anfang des 20. Jahrhunderts auf die Fährte der Phytochrome. Die beiden US-amerikanischen Wissenschaftler Wightman W. Garner und Harry A. Allard wurden im Jahre 1918 auf das ungewöhnliche Wachstumsverhalten einer Tabakmutante aus Maryland und das dem Wissen der Zeit widersprechende Blühverhalten von Sojabohnen aufmerksam^[7]. Die beiden begannen daraufhin mit der Studie der Faktoren, die das Pflanzenwachstum beeinflussen (zum Beispiel Temperatur, Mineralzufuhr, Lichtintensität oder Belichtungsdauer). Bald konnten sie bis auf die relative Tag- und Nachtlänge alle anderen Umwelteinflüsse ausschließen und nannten die Abhängigkeit der Keimung und Blütenentwicklung von der Belichtungszeit „Photoperiodismus“. 1932 begann die Suche nach dem eigentlichen Ursprung des Phänomens. Nachdem die Biloxy Sojabohne, die eine „rasche“ Reaktion auf Licht zeigt, als geeignete Versuchspflanze ausgewählt worden war, konnte der Mechanismus des Photoperiodismus untersucht werden. Wie Borthwick und Parker herausfanden, lässt sich die Blütenbildung einer Pflanze durch einen einzigen 30-sekündigen Lichtblitz während der Nacht unterdrücken. In früheren Experimenten hatten die beiden zudem schon nachweisen können, dass die Lichtaufnahme an den Blättern der Pflanze stattfindet und nicht wie früher vermutet an der „Keimspitze“. Sie vermuteten, dass die Absorption dabei durch einen in den Blättern befindlichen Rezeptor erfolgt, einem Protein, das ein niedermolekulares organisches Molekül, einen Chromophor, enthält, der für die Aufnahme der Strahlung verantwortlich ist. Aktionsspektren gaben genaueren Aufschluss über die Art des Chromophors: Gelb-rotes und violette Licht konnten als die wirksamsten Wellenlängen identifiziert werden, was zu der Schlussfolgerung führte, dass es sich bei dem Rezeptor nicht um Carotinoide handeln konnte, sondern eher um ein Porphyrin-ähnliches Molekül wie Chlorophyll. Die breite Absorption im gelb-roten Bereich des Spektrums führte weiterhin zu der Annahme, dass der gesuchte Chromophor selbst grün oder blau gefärbt sein müsste. Genauere Untersuchungen

ergaben später, dass insbesondere rotes Licht den Photoperiodismus positiv beeinflusst. Bei der Untersuchung des Keimverhaltens der Pflanzen konnte zudem nachgewiesen werden, dass tiefrotes Licht am Rand des visuellen Spektrums den gegenteiligen Effekt hat. Der Photorezeptor ist also ein optischer Schalter, dessen Mechanismus, wie weitere Versuche zeigten, auch nach 100 Zyklen noch intakt war. Zudem ließ sich deduktiv ermitteln, dass der Chromophor einen hohen Extinktionskoeffizienten besitzen musste, und dass er nur in geringer Konzentration in den Zellen vorlag (Pflanzen, die im Dunkeln gewachsen waren, zeigten keine blaue oder grüne Färbung, aber die typische Absorption von rotem Licht). Die Zerstörung des Mechanismus durch Hitzeeinwirkung gab weiterhin den Hinweis, dass es sich bei dem Rezeptor um ein Protein handeln musste, das einen Farbstoff als prosthetische Gruppe enthält. Warren L. Butler gab 1959 dem Rezeptor den Namen *Phytochrom* (Phyton = griechisch Pflanze, Chromos = griechisch Farbe)^[8].

In den folgenden Jahren begann die Erforschung des Phytochroms mit verschiedenen Methoden/Ansätzen: Der Rezeptor wurden aus verschiedenen Pflanzen isoliert^[9-12], erst in unterschiedlich großen Teilstücken abhängig von der Isolierungsmethodik sowie der Pflanze und dann als vollständiges Protein^[13]. Die optischen Eigenschaften und die Kinetik (Photozyklus) wurden mit den verschiedensten schwingungsspektroskopischen Methoden vermessen und mit theoretischen Berechnungen verglichen. Die Entwicklung molekularbiologischer Methoden ermöglichte dann später die gezielte Veränderung der Proteinsequenz und konnte somit Aufschluss über den Einfluss einzelner Aminosäuren auf die Eigenschaften des Rezeptors und deren Interaktion mit dem Chromophor geben. Genomsequenzierungen ermöglichten die Suche nach Phytochromen oder Phytochrom-ähnlichen Rezeptoren in anderen Organismen als Pflanzen^[14,15]. So konnten neben den „klassischen“ Phytochromen ähnlich denen aus Pflanzen und Cyanobakterien in Bakterien zudem auch phytochrom-ähnliche Rezeptoren („bathy Phytochromes“) identifiziert werden, deren Absorptionsspektren sich deutlich von denen der Pflanzenphytochrome unterscheiden. Interessant dabei ist, dass diese Bakterien zuvor nicht für lichtinduzierte Reaktionen bekannt waren. Die genaue Aufgabe der bakteriellen Phytochrome bleibt zu untersuchen, sowie deren Photocyclyus der sich von dem klassischer Phytochrome durch einen lichtinduzierten P_{fr} - P_r -Übergang unterscheidet. Die Kristallisation eines vollständigen photosensorischen Kerns eines Phytochroms in seinen beiden Zuständen 2007 (bisher nicht im gleichen Phytochrom) gab nun erstmals ein Bild von der Rezeptorstruktur^[16,17]. Auch wenn die genaue Signalübertragung innerhalb des Photorezeptor noch unbekannt ist, liegen schon zahlreiche Ergebnisse in Bezug auf die Weiterleitung des Signals innerhalb der Zelle vor^[18]. Nach mehr als 90 Jahren Forschung zeichnet sich nun folgendes Bild ab:

Phytochrome bilden eine Familie von Rotlicht-Photorezeptoren, die in allen höheren Pflanzen, Bakterien^[19], Cyanobakterien^[20,21], Moosen und Pilzen^[22] vorkommen. Sie agieren als optische Schalter, die durch Belichtung von einem inaktiven Zustand (P_r) in einen aktiven Zustand (P_{fr}) übergehen. In Pflanzen regulieren sie viele morphologische Prozesse, wie Keimung, Blütenbildung und Blattbildung. Bei der prosthetischen Gruppe der Phytochrome handelt es sich um einen Vertreter der Biline, der durch eine Z/E-Photoisomerisierung den Übergang in den aktiven Zustand induziert.

1.2.2 Aufbau der Phytochrome

Die Phytochrome lassen sich, je nachdem aus welchem Organismus sie isoliert wurden, in verschiedene Gruppen einteilen: Pflanzliche Phytochrome (z.B. PhyA), cyanobakterielle Phytochrome (CphPs), bakterielle Phytochrome (BphPs) mit Biliverdin (**1**) als gebundenem Chromophor oder Phytochrome aus Pilzen (Fphs)^[23]. Allen Phytochromen gemeinsam ist das Vorliegen als Dimer in der Zelle und der Aufbau in Domänen (siehe Abb. 3), wobei insbesondere drei Domänen im N-terminalen Teil des Proteins stark konserviert sind. Vom N-Terminus aus betrachtet schließt sich eine GAF-Domäne (cGMP spezifische Phosphodiesterase) an eine PAS-Domäne (PER ARNT SIM; period clock protein, aromatic hydrocarbon receptor nuclear translocator, single minded) an, gefolgt von einer PHY-Domäne (für Phytochrome spezifische Domäne). Diese drei Domänen bilden den eigentlichen photosensorischen Kern des Rezeptors, in dem sich auch die Bindungsstelle (ein Cystein) des Chromophors befindet. In pflanzlichen Phytochromen (Phy) und den Phytochromen der Cyanobakterien (Cph1) befindet sich dieses bindungsbildende Cystein in der GAF-Domäne, wohingegen es in bakteriellen Phytochromen (BphP) und den Phytochromen der Pilze (Fph) in der PAS-Domäne lokalisiert ist. Mit Ausnahme der pflanzlichen Phytochrome, bei denen sich an die PHY-Domäne zwei PAS-Domänen anschließen, folgt in den meisten prokaryotischen Phytochromen auf die PHY-Domäne eine C-terminal gelegene Histidinkinase oder eine der Histidinkinase ähnliche signalübertragende Region. Pflanzliche Phytochrome enthalten zudem der N-terminalen PAS-Domäne vorgelagert eine kurze Sequenz von Aminosäuren, die die Stabilität des P_{fr} -Zustands erhöht^[24].

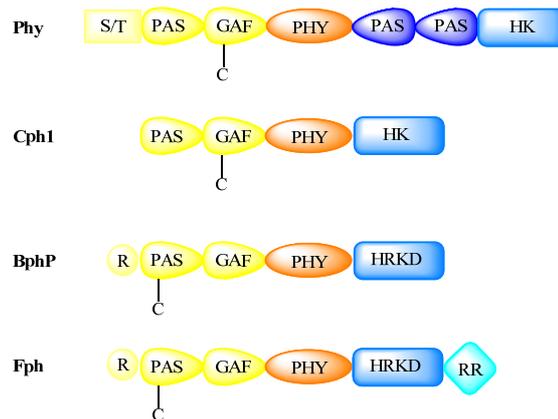


Abb. 3: Strukturdomänen der Phytochrome mit der Bindungsstelle des Chromophors (C). Gelblich: photosensorischer Kern; bläulich: Signaltransduktionsregion

Ein weiterer Unterschied zwischen den verschiedenen Phytochromgruppen besteht in der Art des gebundenen Chromophors: Phytochromobilin (PΦB) **(2)**, Phycocyanobilin (PCB) **(3)** oder Biliverdin IX α (BV) **(1)** (siehe Abb. 4). In pflanzlichen Phytochromen konnte nur Phytochromobilin **(2)** als nativer Chromophor nachgewiesen werden (ausgenommen zwei Algenphytochrome aus *Mougeotia scalaris* und *Mesotaenium caldariorum*, in denen PCB **(3)** als Chromophor nachgewiesen wurde^[25-27]), obwohl in einer einzelnen Pflanze mehrere verschiedene Phytochrome aktiv sind. In *Arabidopsis (A.) thaliana* konnten durch Sequenzvergleiche zum Beispiel fünf unterschiedliche Phytochrome identifiziert werden (PhyA bis PhyE)^[28]. Die Phytochrome von *A. thaliana*^[29] unterscheiden sich neben ihrer Proteinsequenz in ihrer Stabilität gegenüber Licht, was sich in differierenden Mengenverhältnissen zu unterschiedlichen Wachstumsstadien widerspiegelt. In Pflanzen, die unter Lichtausschluss gewachsen sind, findet sich überwiegend die PhyA-Form. Unter Belichtung mit weißem Licht erfolgt der Abbau von PhyA innerhalb von 7 h auf nur noch 4% der ursprünglich vorliegenden Gesamt-Phytochromkonzentration. Das PhyB stellt nach dieser Zeit mit 40% den Hauptanteil der aktiven Phytochromkonzentration^[29].

Phycocyanobilin **(3)** findet sich vor allem in den Phytochromen der Cyanobakterien (zum Beispiel CphA, Cph1 und Cph2), während Biliverdin **(1)** die prosthetische Gruppe der bakteriellen Phytochrome^[24,30] und der Pilze bildet.

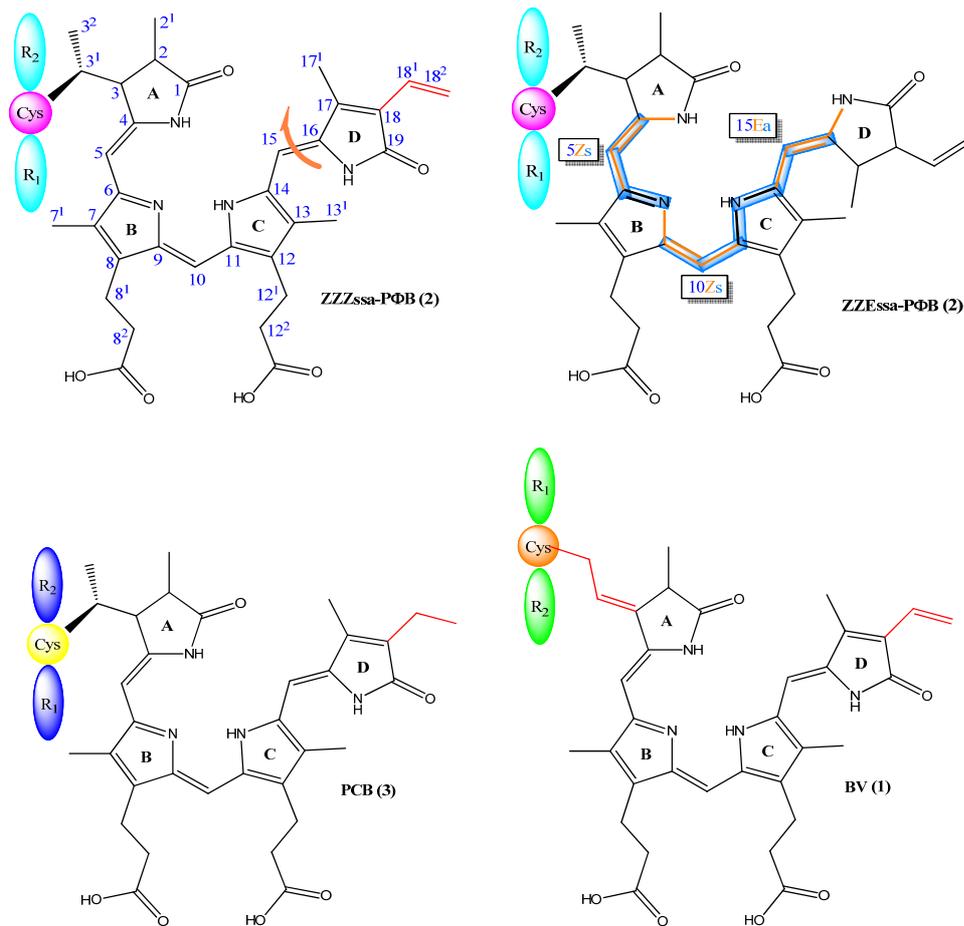


Abb. 4: Chromophore in Phytochromen und die Art ihrer Anbindung an das Protein. Oben: links Phytylchromobilin (PΦB) (2) in ZZZssa-Konformation: die Nummerierung des Kohlenstoffgerüsts ist in blauen Ziffern angegeben; die Position der Z/E-Isomerisierung ist durch einen orangefarbenen Pfeil markiert, rechts Phytylchromobilin in ZZEssa-Konformation (blau unterlegt: Bindungen, die die syn- und anti-Konformation bestimmen, orange eingefärbte Bindungen bestimmen die Z- und E-Konformation). Unten: links Phycocyanobilin (PCB) (3) in ZZZssa-Konformation, rechts Biliverdin IXα (BV) (1) in der ZZZssa-Konformation; die strukturellen Unterschiede an den Ringen A und D sind rot markiert. R₁ und R₂= Proteinrest

Nachdem lange Zeit keine Kristallstruktur eines Phytochroms verfügbar war und somit die Aussagen über die Struktur von Protein und Chromophor nur indirekt über die spektroskopischen Eigenschaften und den Vergleich mit theoretischen Berechnungen ermittelt wurden, gelang 2005 Wagner *et al.* die Kristallisation der chromophorbindenden Domäne (PAS-GAF) des extremophilen Bakteriums *Deinococcus radiodurans* im P_r-Zustand mit einer Auflösung von 1.45 Å^[31]. Das Biliverdin IXα (1) als gebundener Chromophor befindet sich in der dreidimensionalen Struktur gestreckt in einer Tasche, die von der bereits vorhergesagten GAF-Domäne gebildet wird, und nimmt ZZZssa-Konformation ein. Vervollständigt wird die chromophorbindende Domäne durch die ebenfalls korrekt vorhergesagte, N-terminal vor-gelagerte PAS-

Domäne. 2008 folgte dann eine zweite Kristallstruktur veröffentlicht von X. Yang *et al.*^[32]. Die Struktur dieses Phytochroms aus dem photosynthetischen Bakterium *Rhodospseudomonas palustris* (RpBphP3) umfasst, wie die erste Kristallstruktur, die chromophorbundene Domäne aus PAS, GAF und gebundenem Biliverdin IX α (**1**) ohne die PHY-Domäne im P_r-Zustand mit einer Auflösung von 2.2 Å. Der Vergleich der beiden Strukturen zeigt eine große Übereinstimmung der Proteinfaltung insbesondere der GAF-Domäne und der Einbettung des Chromophors. Die PAS-Domänen der beiden Proteine unterscheiden sich in ihrer Tertiärstruktur durch unterschiedlich große Bereiche mit β -Faltblattstruktur und durch unterschiedlich große Bereiche ohne Sekundärstruktur.

Die erste Kristallstruktur eines vollständigen photosensorischen Phytochromkerns, bestehend aus PAS-, GAF- und PHY-Domäne mit Phycocyanobilin (**3**) als gebundenem Chromophor aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Cph1) mit einer Auflösung von 2.5 Å wurde 2008 von L.O. Essen *et al.* veröffentlicht^[17]. Im Gegensatz zu den beiden älteren Kristallstrukturen ist die Teilstruktur des Cph1 zu der Bildung eines stabilen P_{fr}-Zustands fähig, was vermuten lässt, dass die PHY-Domäne zur Stabilisierung dieses Zustands unerlässlich ist. Eine Reihe von Mutationen in der PHY-Domäne, die zum Verlust der stabilen P_{fr}-Form führten, untermauert diese Vermutung^[33].

Auch hier zeigt die Kristallstruktur des Cph1, dass der Chromophor eingebettet in der GAF-Domäne in der ZZZssa-Konfiguration vorliegt. Das Phycocyanobilin (**3**) ist dabei über die 3¹-Position (siehe Abb. 4) der Ethylidengruppe über eine Thioether-Brücke an Cystein 259 gebunden. Die sich an die GAF-Domäne anschließende PHY-Domäne faltet sich teilweise in einer „Zungen-ähnlichen“ Struktur zur Chromophorbindungstasche zurück und isoliert so den Chromophor vom umgebenden Lösungsmittel. Bei genauerer Betrachtung sind der A-, B- und C-Ring des Tetrapyrrols fest in der Proteintasche verankert, insbesondere die mittlere Methin-Brücke zwischen Ring-B und -C (C10) ist durch die Proteinhülle stabilisiert, was durch NMR-Messungen bestätigt wurde. Die weniger starke Fixierung des D-Rings durch das umgebende Protein ist in Übereinstimmung mit der Möglichkeit zur Z/E-Isomerisierung der C15-16-Doppelbindung. Der Vergleich der Tertiärstrukturen der GAF-Domäne mit der PHY-Domäne lässt zudem erkennen, dass es sich bei der PHY-Domäne ebenfalls um eine –strukturell leicht veränderte - GAF-Domäne handelt.

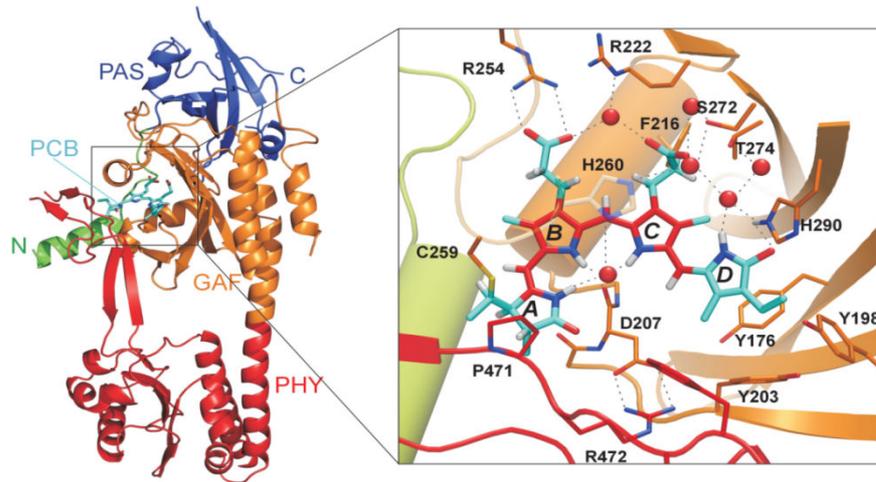


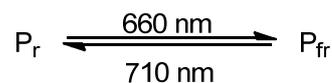
Abb. 5: Kristallstruktur von Cph1 Δ 2 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (PDB: 2VEA). Der N-Terminus ist grün markiert, die PAS-Domäne dunkelblau, die GAF-Domäne orange, der Chromophor ist hellblau dargestellt und der C-Terminus blau. Die Vergrößerung zeigt den Chromophor eingelagert in die PAS-Domäne und nahezu abgeschlossen von dem umgebenden Medium durch die „zungenartig“ zurückgefaltete PHY-Domäne in seiner gestreckten P_r-Form (ZZZssa-Konformation). Das protonierte PCB (**3**) ist über das Kohlenstoffatom 3¹ durch eine Thioetherbindung an das Cystein(C) 259 gebunden. Die Propionsäurereste sind durch Wechselwirkungen mit den Argininresten(R) 254 und 222, Serin(S) 272 und Phenylalanin(F) 216 stabilisiert. Die Stickstoffatome der Ringe A, B und C sind über Wasserstoffbrückenbindungen mit einem Wassermolekül verbunden und darüber ebenfalls mit den Resten Histidin(H) 260 und Asparaginsäure(D) 207. Zu erkennen ist zudem die, im Vergleich zu den drei anderen Ringen, weniger starke Fixierung des D-Rings, wodurch die lichtinduzierte Z/E-Isomerisierung der C15-16-Doppelbindung und die damit verbundene Drehung des D-Rings möglich wird.

Zurzeit existiert nur eine einzige Kristallstruktur, in der der Chromophor im P_{fr}-Zustand vorliegt. Diese Struktur konnte mit einer Auflösung von 2.9 Å bestimmt werden und umfasst die PAS-, GAF- und PHY-Domäne des bakteriellen Phytochroms aus *Pseudomonas aeruginosa* (PaBphP-PCD) mit Biliverdin IX α (**1**) als gebundenem Tetrapyrrol^[16]. Die Faltung der Domänen und die Einlagerung des Chromophors entspricht der des RpBphP3 und des DrCBD. Das Biliverdin (**1**) nimmt wie erwartet die ZZEssa-Konfiguration ein und ist, wie der Chromophor in Cph1, durch eine verlängerte Schleife der PHY-Domäne vom Lösungsmittel isoliert. Eine Besonderheit dieses Proteins ist der instabile P_r-Zustand, der die Kristallisation der P_{fr}-Form begünstigt, da das Protein schneller und leichter in den P_{fr}-Zustand übergeht. Der Rückschluss von den Gegebenheiten des Chromophors mit den ihn umgebenden Aminosäuren im P_{fr}-Zustand des PaBphP-PCD auf den Mechanismus der Z/E-Isomerisierung ist ausgehend von den Gegebenheiten des Chromophors und seiner Proteinhülle im Cph1 dadurch nur bedingt möglich.

Die Kristallstruktur eines vollständigen, funktionsfähigen Phytochroms ist zurzeit noch nicht bekannt. Erst die Kristallisation eines solchen Rezeptors in seinen beiden thermisch stabilen Zuständen verspricht genauere Erkenntnisse über die Z/E-Isomerisierung der C15-16-Doppelbindung und die damit einhergehenden Änderungen in der Proteinstruktur, die die anschließende Signalübertragung induzieren.

1.2.3 Der Photozyklus von Phytochromen

Phytochrome als optische Schalter liegen in zwei thermisch stabilen Zuständen vor: Einem rot absorbierenden Zustand (P_r , red absorbing) mit einem Absorptionsmaximum von $\lambda_{\max} = 665 \text{ nm}$ (PhyA) und einem dunkelrot absorbierenden Zustand (P_{fr} , far red absorbing) mit einem Absorptionsmaximum von $\lambda_{\max} = 730 \text{ nm}$ (PhyA), die durch Anregung mit der entsprechenden Wellenlänge in einander überführt werden können^[34]. Hier sei angemerkt, dass die Absorptionsmaxima abhängig vom jeweiligen Chromophor variieren. Die hier angegebenen Werte gelten für das pflanzliche Phytochrom mit Phytochromobilin (**2**) als Chromophor (siehe auch Abb. 6).



Die Quantenausbeute für beide Reaktionen beträgt etwa $\Phi = 0.15$ ^[35,36]. Da beide Zustände nur geringe Fluoreszenz-Quantenausbeute aufweisen ($\Phi_f > 0.01$), geht der größte Teil der Energie somit als Wärme verloren. Ohne Belichtung liegt das Molekül in der P_r -Form vor, in welcher es auch aus der Biosynthese hervorgeht. Allerdings handelt es sich bei der P_{fr} -Form meist um die biologisch aktive Konfiguration, die bis zu mehreren Tagen unter Lichtausschluss stabil ist.

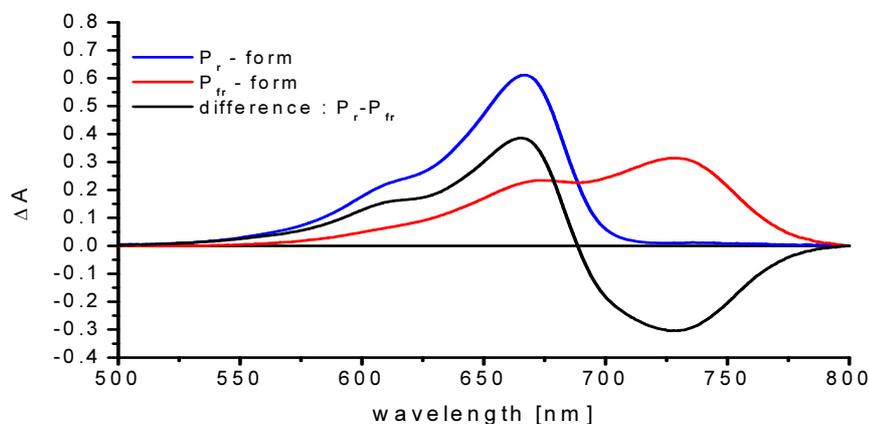


Abb. 6: Absorptionsspektrum von Phytochrom (PΦB) (**2**) im P_r - (blau) und P_{fr} -Zustand (rot) und das daraus resultierende Differenzspektrum (schwarz)

Die Absorptionsspektren der beiden Zustände überlappen zudem stark, was dazu führt, dass die P_r -Form nicht vollständig in die P_{fr} -Form überführt werden kann. Allerdings erlaubt es die stark rotverschobene Absorption der P_{fr} -Form, diese durch Bestrahlung mit der geeigneten Wellenlänge vollständig in die P_r -Form zu überführen.

Der Photozyklus, der die beiden Formen ineinander überführt, wurde sowohl mit der Hilfe der zeitaufgelösten Absorptionsspektroskopie als auch durch Fluoreszenz-, Raman-, Infrarot- und NMR-Spektroskopie gründlich untersucht. Die Fluoreszenzspektroskopie eignet sich dabei insbesondere für die ps- und ns-Prozesse, während die Absorptionsspektroskopie den gesamten Zeitbereich der spektralen Änderung bis hin zu mehreren hundert ms überstreicht. Die schwingungsspektroskopischen Methoden, FTIR und Raman sowie NMR-spektroskopische Untersuchungen können gegenwärtig nur als Tieftemperatur-Methoden angewandt werden, da die Aufsummierung von Messdaten relativ viel Zeit in Anspruch nimmt. Mit diesen Ansätzen wurden verschiedene Phytochrome (zum Beispiel PhyA, Cph1 oder Agp1) gründlich untersucht^[37-41], wobei dem Übergang von P_r nach P_{fr} das größte Interesse galt.

Als Beispiel soll hier der Photozyklus von Cph1 genauer betrachtet werden (vergl. Abb. 7), der dem Photozyklus von PhyA sehr ähnlich ist. Die vollständige Umwandlung (P_r nach P_{fr}) findet nur bei Temperaturen oberhalb von -20°C statt. Entsprechend lässt sich dieser Reaktionsweg, beginnend bei sehr tiefen Temperaturen, in seine Teilschritte zerlegen, indem bei bestimmten Temperaturen stabile Intermediate fixiert und untersucht werden können. Die primäre Photochemie ist selbst bei Temperaturen von -140°C möglich. Die langsame Erwärmung des Phytochroms ausgehend von -196°C ermöglicht somit die Identifizierung und Untersuchung von drei kurzlebigen Intermediaten für die P_r - P_{fr} -Umwandlung und von zwei Intermediaten für die Rückreaktion von P_{fr} zu P_r . Die Belichtung des P_r -Zustands mit Licht einer Wellenlänge von ca. 660 nm induziert (nach der Anregung zu P_r^*) eine Z/E-Isomerisierung der C15-16-Doppelbindung^[41-43]. Die Bildung dieses ersten Intermediats, genannt Lumi-R (bzw. I_{700}), verläuft sowohl bei Raumtemperatur als auch bei Temperaturen von bis zu -140°C innerhalb von 100 ps und zeichnet sich durch eine bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima aus. Bei einer Temperaturerhöhung von -140°C auf -80°C kann ein weiteres Intermediat identifiziert werden, das Meta- R_a -Zustand (meta = altgriechisch nach, wird auch I_{bl} (bl = bleached)) genannt wird^[4]. Dieses Intermediat zeichnet sich durch einen deutlich geringeren Absorptionskoeffizienten aus. Eine weitere Erhöhung der Temperatur auf -20°C führt zu einem weiteren Zwischenprodukt, dem Meta- R_c -Zustand^[37,40,41], der bei mehr als -20°C in die P_{fr} -Form übergeht. Bei Raumtemperatur findet der Übergang von Lumi-R zu Meta- R_a innerhalb von Mikrosekunden statt und die Weiterreaktion zum Meta- R_c innerhalb von Millisekunden. Darauf folgt die Bildung der P_{fr} -Form ebenfalls innerhalb von Millisekunden.

Die Photoreaktion der Rückreaktion von P_{fr} zu P_r verläuft innerhalb von wenigen Picosekunden^[44-47], was die Anwendung schwingungsspektroskopischer und optischer Methoden erheblich erschwert. Zwar ist das Vorhandensein der Intermediate Lumi-F und das darauffolgende Meta-F bekannt, die genauen Eigenschaften wie die Konfiguration oder die Interaktion mit dem Protein müssen noch geklärt werden.

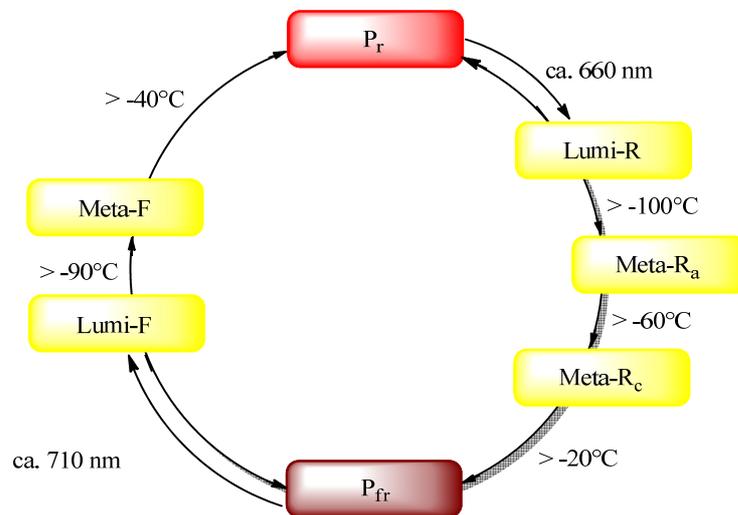


Abb. 7: Photozyklus von Phytochrom (Cph1)

Die bisher vorliegenden Erkenntnisse geben keine Auskunft über die durch den Photozyklus ausgelösten Veränderungen innerhalb der Proteinstruktur. Zudem bedarf die Kinetik der einzelnen Übergänge noch genauerer Klärung (Ordnung der Kinetik, parallele Reaktionswege). In der neueren Literatur wird außerdem die Z/E-Isomerisierung der C15-16-Doppelbindung des D-Rings in Frage gestellt und eine Isomerisierung der Doppelbindung C4-C5 zwischen A- und B-Rings diskutiert^[48].

1.3 Tetrapyrrole

Die Tetrapyrrole sind eine Molekülklasse mit Molekulargewichten um 700 Dalton, die an vielen lebenswichtigen Prozessen aller lebendigen Organismen beteiligt sind. So wird z.B. in Säugetieren und Vögeln Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid vom Hämoglobin, einem cyclischen Tetrapyrrol, gebunden und transportiert. Der Abbau des Hämoglobins durch die Spaltung einer Methinbrücke erfolgt hauptsächlich in der Galle (engl. bile). Das grün-gelbliche Produkt dieser Reaktion, das Biliverdin IX α (**1**), wurde zum Namensgeber der Klasse der offenkettigen Tetrapyrrole, den Bilinen. Störungen des Hämoglobinabbaus äußern sich in Krankheiten wie Gallensteinen oder Gelbsucht bei Neugeborenen. Es wundert daher nicht, dass Biline schon in der Zeit der Pharaonen

bekannt waren (1650 v. Chr.), die schon den Zusammenhang zwischen der Krankheit und dem Gallensekret erkannten^[49]. Die Biline stellen allerdings nicht nur „Abfallprodukte“ des Häm-Metabolismus bei Säugetieren und Vögeln dar, sondern sind wie oben bereits erwähnt in Form von z.B. Phycocyanobilin (**3**) und Phytochromobilin (**2**) Bestandteil der Phytochrome. Das Phycocyanobilin (**3**) (wie auch sein Isomer, das Phycoerythrobilin) dient zudem in den Phycobilisomen von Cyanobakterien und Rotalgen als Bestandteil von Antennenkomplexen. Die Antennenkomplexe absorbieren einfallende Strahlung und leiten die Energie durch strahlungslose Prozesse an ein Reaktionszentrum weiter^[50], das Chlorophyll enthält, und sind somit Bestandteil des Photosystem II der Photosynthese. Bei den Chlorophyllen oder Vitamin-B₁₂ handelt es sich ebenfalls um Tetrapyrrole, allerdings in ihrer cyclischen Form mit einem komplexierten Metallion.

1.4 Biosynthese

Die Biosynthese des Apoproteins und des Chromophors von pflanzlichen Phytochromen erfolgt unabhängig voneinander^[51]. Der Chromophor wird erst in den Chloroplasten gebildet und dann zur Einlagerung zum Apoprotein in das Cytosol transportiert. Die Bildung des Chromophors erfolgt über eine für alle Tetrapyrrole (Chlorophyll, Häm, Biliverdin, Phycocyanobilin) gemeinsame Synthesesequenz. Ausgehend von Glutamat wird enzymatisch δ -Aminolävulinat gebildet. Zwei Moleküle δ -Aminolävulinat werden dann von der Porphobilinogen-Synthase zu Porphobilinogen kondensiert, dem Grundbaustein der Tetrapyrrole^[52].

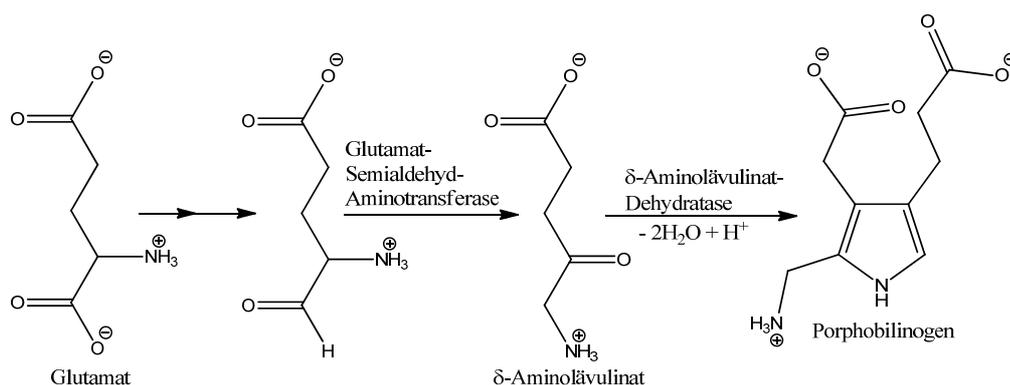


Abb. 8: Synthese von Porphobilinogen in Chloroplasten ausgehend von Glutamat

Das anschließend durch die Porphobilinogen-Desaminase und vier Porphobilinogenmolekülen gebildet Protoporphyrin IX bildet die letzte gemeinsame Vorstufe der biorelevanten Tetrapyrrole^[53]. Durch den Einbau eines Mg^{2+} -Ions

entstehen nach weiterer Umsetzung die Chlorophylle. Die Reaktion von Protoporphyrin IX mit Ferrochelatase unter Einlagerung eines Fe^{2+} -Ions führt zum Protohäm IX, das entweder in die Hämsynthese eingehen kann oder aus dem durch enzymkatalysierte Oxidation Biliverdin IX α (**1**) entsteht.

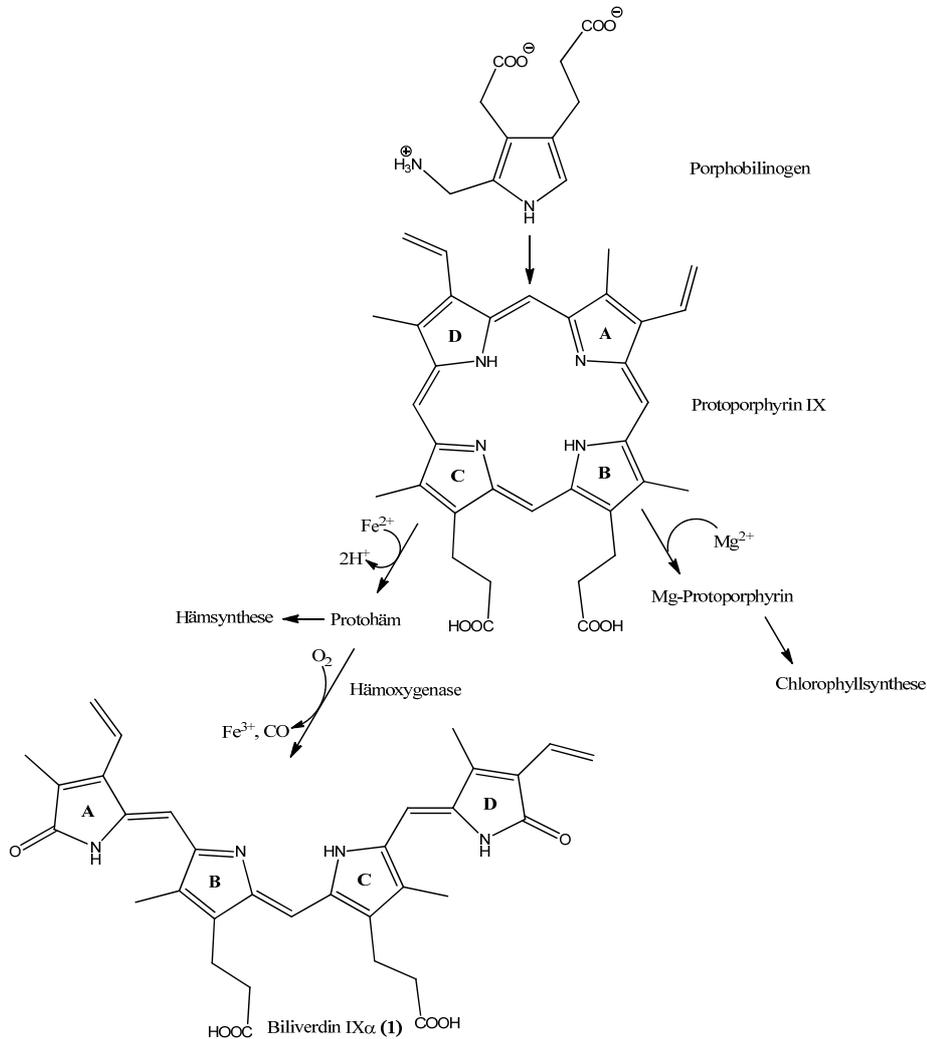


Abb. 9: Reaktionswege für Häm, Biliverdin IX α (**1**) und Chlorophylle ausgehend von Porphobilinogen

Für seine Funktion als Chromophor wird Biliverdin IX α (**1**) abhängig vom jeweiligen Organismus entweder direkt zum Aufbau des entsprechenden Phytochroms oder Antennenkomplexes umgesetzt oder enzymatisch zu Phytochromobilin (P Φ B) (**2**), Phycocyanobilin (PCB) (**3**) oder Phycoerythrin (PEB) weiterverarbeitet. Phytochromobilin (**2**) wird über das (3Z)-Isomer durch Hydrierung von Biliverdin IX α (**1**) mittels Phytochromobilin-Synthase und anschließender enzymatischer Isomerisierung als biologisch aktives (3E)-Isomer synthetisiert. Phycocyanobilin (**3**) und Phycoerythrobilin entstehen auf einem gemeinsamen Weg durch Reduktion der Methindoppelbindung zwischen Ring-C und -D^[51,54,55]. Das 15,16-Dihydrobiliverdin

wird durch Reduktion der 2,3-Doppelbindung des A-Ring zum (3Z)-Isomer des Phycoerythrobilins umgesetzt. Die Reihenfolge der nächsten beiden Schritte ist austauschbar. Entweder erfolgt erst die Z/E-Isomerisierung der Ethylidengruppe des A-Rings zum (3E)-Phycoerythrobilin und dann die elektronische Umlagerung zum (3E)-Phycocyanobilin **(3)**. Oder es erfolgt erst die elektronische Umlagerung der D-Ring Doppelbindungen zum (3Z)-Phycocyanobilin und dann die Umlagerung zum (3E)-Phycocyanobilin **(3)**.

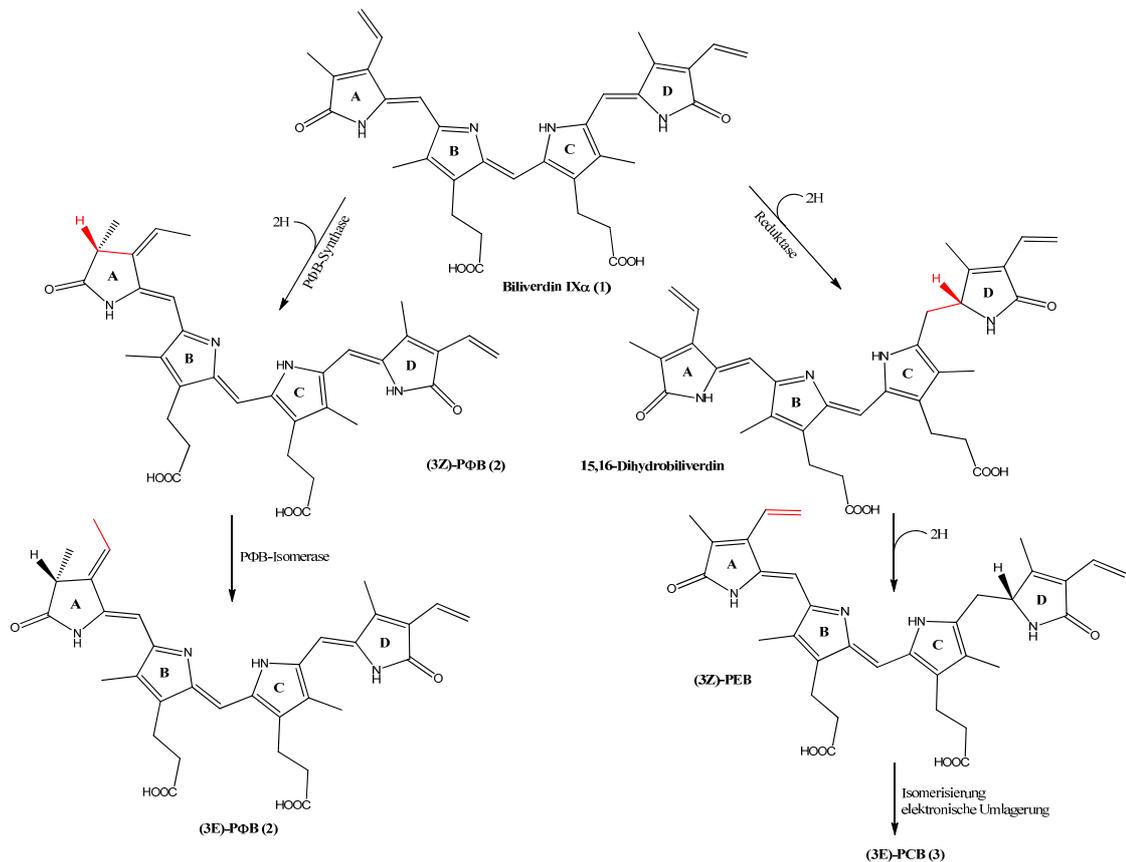


Abb. 10: Biosynthese von PΦB **(2)**, PEB und PCB **(3)** ausgehend von Biliverdin IX α **(1)**

Die Beteiligung von δ -Aminolävulinat und Biliverdin IX α **(1)** an der Biosynthese der Phytochrome konnte 1987 bzw. 1989 von T.D. Elich und J.C. Lagarias durch den Einbau von ^{14}C -markiertem δ -Aminolävulinat und ^{14}C -markiertem Biliverdin IX α in Phytochromobilin einwandfrei nachgewiesen werden^[56,57].

Die Einlagerung des Chromophors und die anschließende Bindung an den Proteinrest erfolgt ohne weitere enzymatische Aktivierung. Ob der Einbau des Chromophors in das vollständig synthetisierte und gefaltete Protein erfolgt oder ob die prosthetische Gruppe schon zu einem früheren Zeitpunkt (z.B. nach der Fertigstellung der PAS- und GAF-Domäne) inkorporiert wird, bleibt noch genauer zu ergründen. Allerdings wird der Chromophor problemlos in das fertige Protein eingebaut, was die Herstellung von

rekombinanten Proteinen und deren Untersuchung erst ermöglicht. Durch gezielte Veränderungen des Chromophors mittels chemischer Totalsynthese und durch molekularbiologische Mutationen der Proteinsequenzen konnten die strukturellen Voraussetzungen für eine Assemblierung des Chromophors eingegrenzt werden. Der genaue kinetische und mechanistische Ablauf dieser Reaktion ist allerdings noch nicht genau bekannt. Erste Versuche mittels „Stopped-flow“ Absorptionsspektroskopie die zeitlichen Abläufe dieser Reaktionssequenz für Cph1 aus *Synechocystis* einzugrenzen und eventuelle Intermediate zu identifizieren, führten zu der Vermutung, dass der Einbau des Chromophors in das Apoprotein mit einer nicht kovalenten Bindung des Chromophors an die Proteinoberfläche beginnt^[58]. Der Chromophor soll dabei eine eher helicale Konformation einnehmen, die der Konformation in Lösung entspricht. Die Ausbildung einer gestreckteren Geometrie innerhalb von 150 bis 200 ms, einhergehend mit einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums ($\lambda_{\text{max}} = 680 \text{ nm}$) und der Protonierung des Chromophors, führt dann zum ersten Intermediat. Dieses Intermediat konnte schon früher mittels Fluoreszenz- und Absorptionsspektroskopie identifiziert werden. Das nach 2.5 bis 5 s folgende zweite Intermediat zeichnet sich durch eine hypsochrome Verschiebung um ca. 25 nm aus, was durch den Verlust der 3¹-Doppelbindung verursacht wird^[58].

1.5 Chemische Totalsynthese

Die Isolierung von Tetrapyrrolen aus Naturstoffen (Phycocyanobilin **(3)** z.B. aus dem Cyanobakterium *Spirulina platensis*) ist oft begleitet von einer langen Suche nach dem passenden Naturstoff und schlechten Ausbeuten. Die Entwicklung der chemischen Totalsynthese ermöglichte nicht nur die Gewinnung der einzelnen Tetrapyrrole in höheren Ausbeuten, sondern auch die genaue Identifizierung der an den biologischen Prozessen beteiligten Chromophore und deren Konformation. Darüber hinaus gibt die gezielte Veränderung der Chromophore zudem Aufschluss über die Interaktion von Chromophor und Protein und über den Photozyklus.

Die Grundbausteine vieler biologisch relevanter Moleküle, wie Phycocyanobilin **(3)**, Biliverdin IX α **(1)**, Chlorophyll und Vitamin-B₁₂, sind Pyrrole. Die Darstellung dieser Bausteine wurde daher gründlich untersucht und eine Vielzahl an Synthesen wurde entwickelt. Drei Forschungsgruppen haben sich insbesondere in Bezug auf die chemische Totalsynthese von offenkettigen Tetrapyrrolen in den letzten 40 Jahren verdient gemacht. Wegweisend waren dabei vor allem die Arbeiten von A. Gossauer *et al.*, der mit seiner Arbeitsgruppe den mittlerweile klassischen Syntheseweg, ausgehend von der Darstellung der einzelnen Ringe mit anschließender Kupplung zur AB- und

CD-Hälfte und letztendlich der zentralen Kupplung der AB- mit der CD-Hälfte, zum fertigen Tetrapyrrol entwickelte^[59].

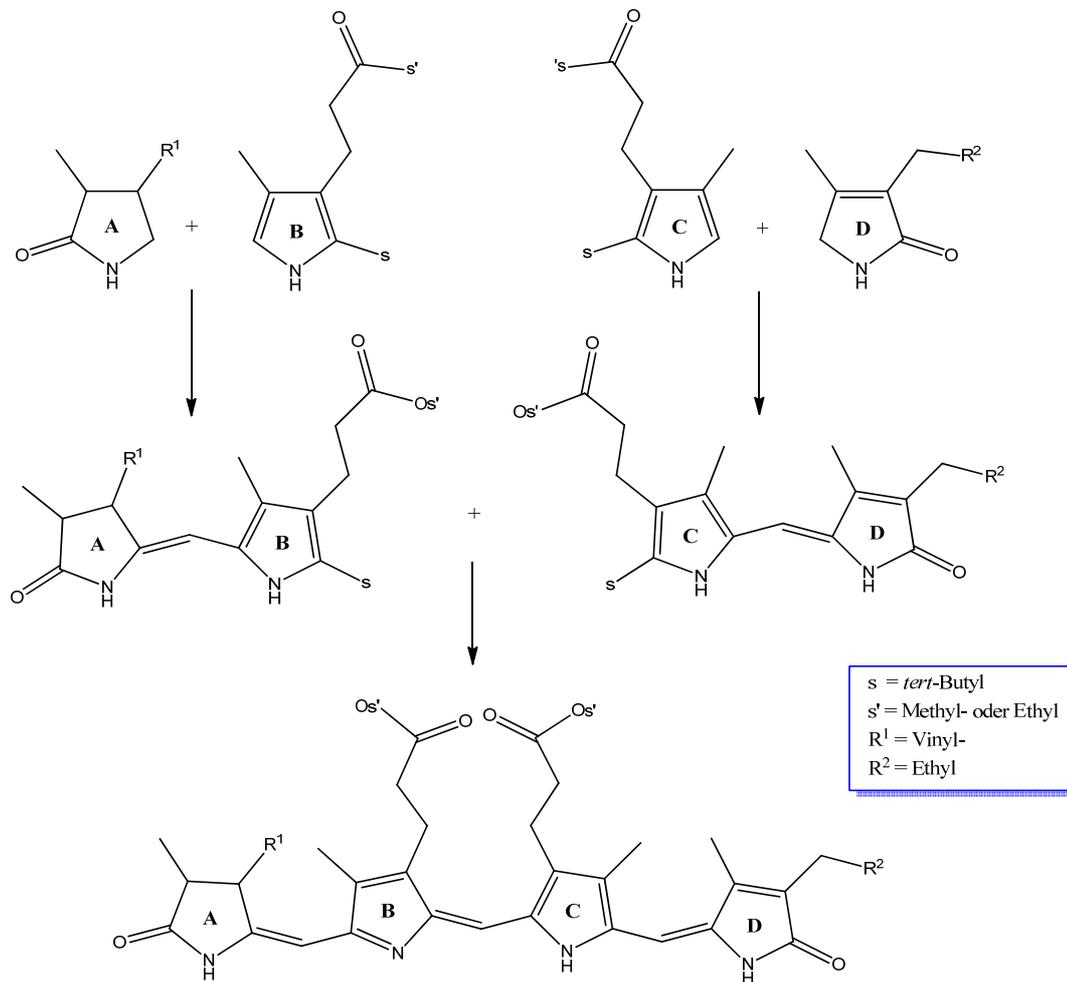


Abb. 11: Schematische Wiedergabe der klassischen Tetrapyrrolsynthese nach Gossauer

Abweichend von dem oben dargestellten Synthesekonzept begann die Gruppe um Jacobi 1984 nach der erfolgreichen Synthese von Saxitoxin, einem in Muscheln und Algen vorkommenden Nervengift, sigmatrope Umlagerungen und die Sonogashira-Kupplung (vergl. Abb. 12) auf Eignung zur Darstellung von Tetrapyrrolen zu untersuchen. Genauere Informationen über die einzelnen Arbeitsschritte gibt der Übersichtsartikel aus dem Jahr 2005^[60].

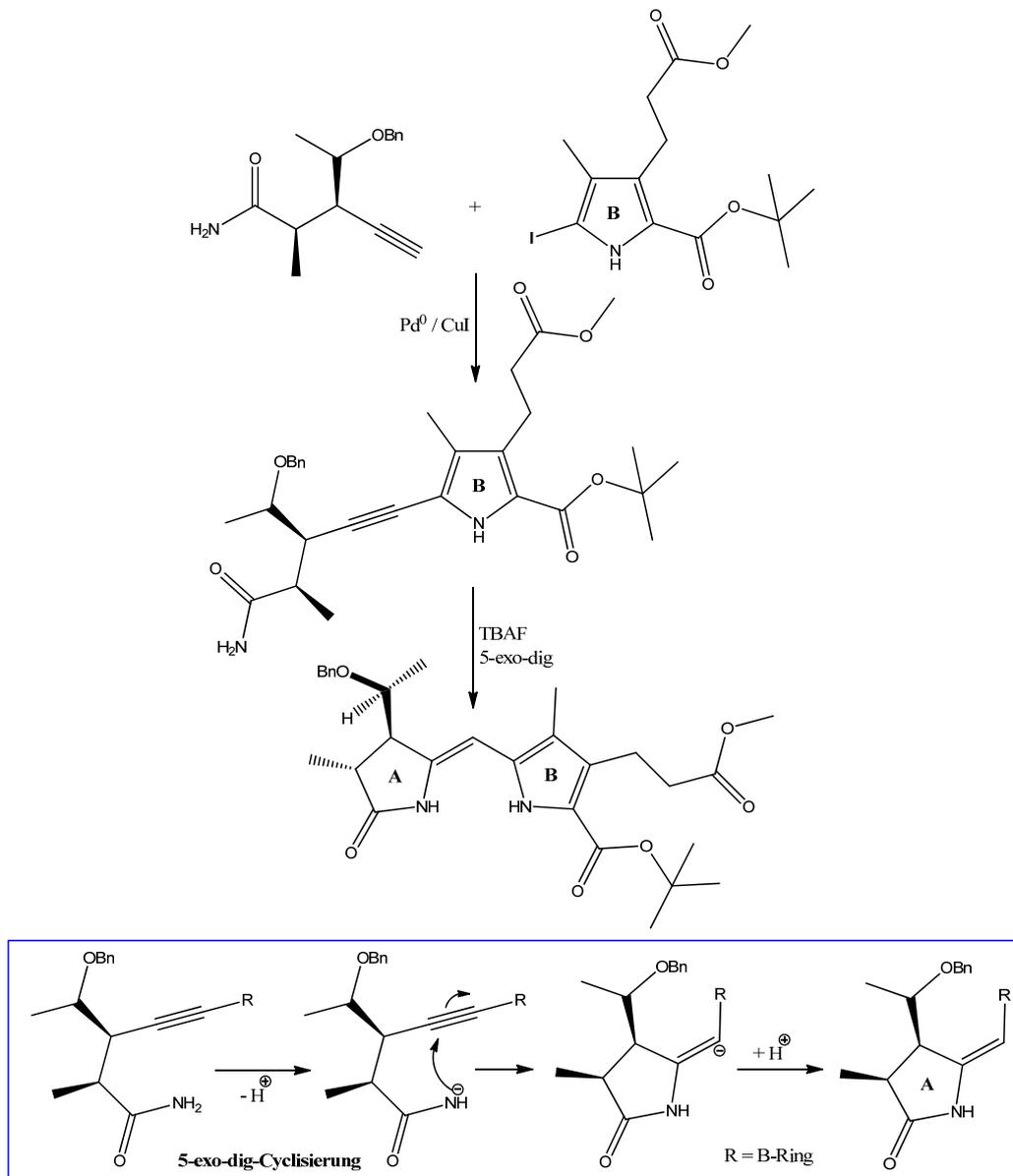


Abb. 12: Synthese der AB-Hälfte nach Jacobi mittels Sonogashira-Kupplung

Die dritte hervorzuhebende Arbeitsgruppe um K. Inomata begann 1981, nach genaueren Untersuchungen der Furansynthese, die dadurch gewonnenen Erfahrungen auf Pyrrole und somit auf die Synthese von Phytochromobilin (2) und Phycocyanobilin (3) anzuwenden (siehe Abb. 13)^[61].

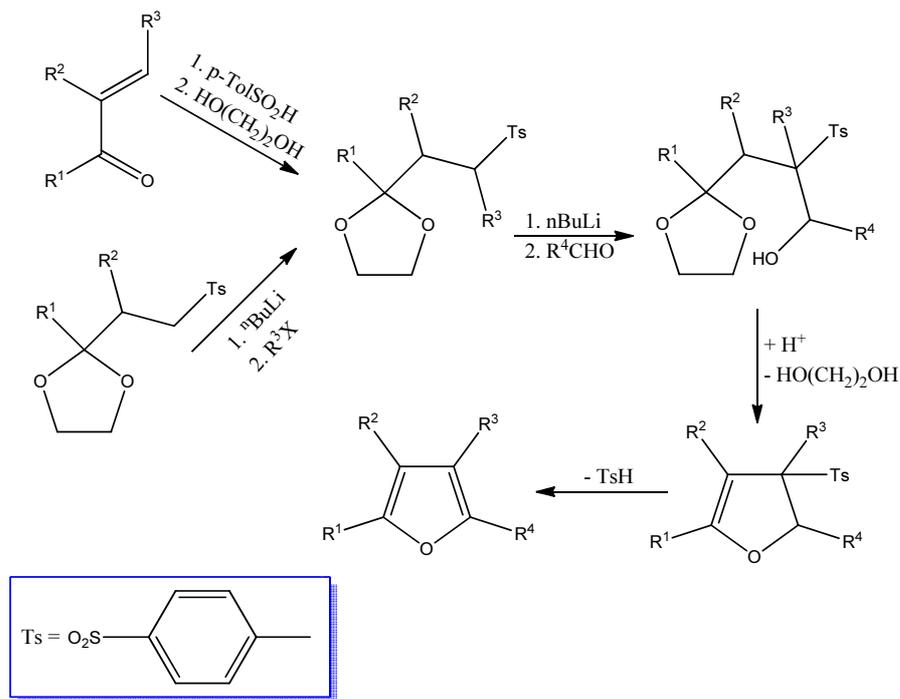


Abb. 13: Syntheseweg von tetrasubstituierten Furanen nach Inomata

Inomata *et al.* folgten dabei dem Vorbild von Gossauer, beginnend mit der Retrosynthese von Phytochromobilin (**2**) und Phycocyanobilin (**3**) und schließlich der separaten Synthese der einzelnen Ringe. So wurden zum Beispiel einige Biline mit vertauschten Substituenten des B- oder C-Rings oder mit veränderten Substituenten des A- oder D-Rings dargestellt. Besonders interessant ist die Synthese von verbrückten Biliverdinen, wie in Abb. 14 dargestellt. Bisher wurden 10 verschiedene Biliverdine hergestellt, in denen entweder die Konfiguration der C15-16-Doppelbindung und der folgenden Einfachbindung durch eine Ethyl- oder Propylbrücke von Ring-C zu Ring-D in der 15Zs, 15Za, 15Es und 15Ea-Konfiguration fixiert sind (siehe Abb. 14), oder die C4-5-Doppelbindung mit der darauf folgenden Einfachbindung durch eine Ethyl- oder Propylbrücke von Ring-A zu Ring-B bzw. beide Doppelbindungen gleichzeitig in spezifischer Konfiguration fixiert sind^[62].

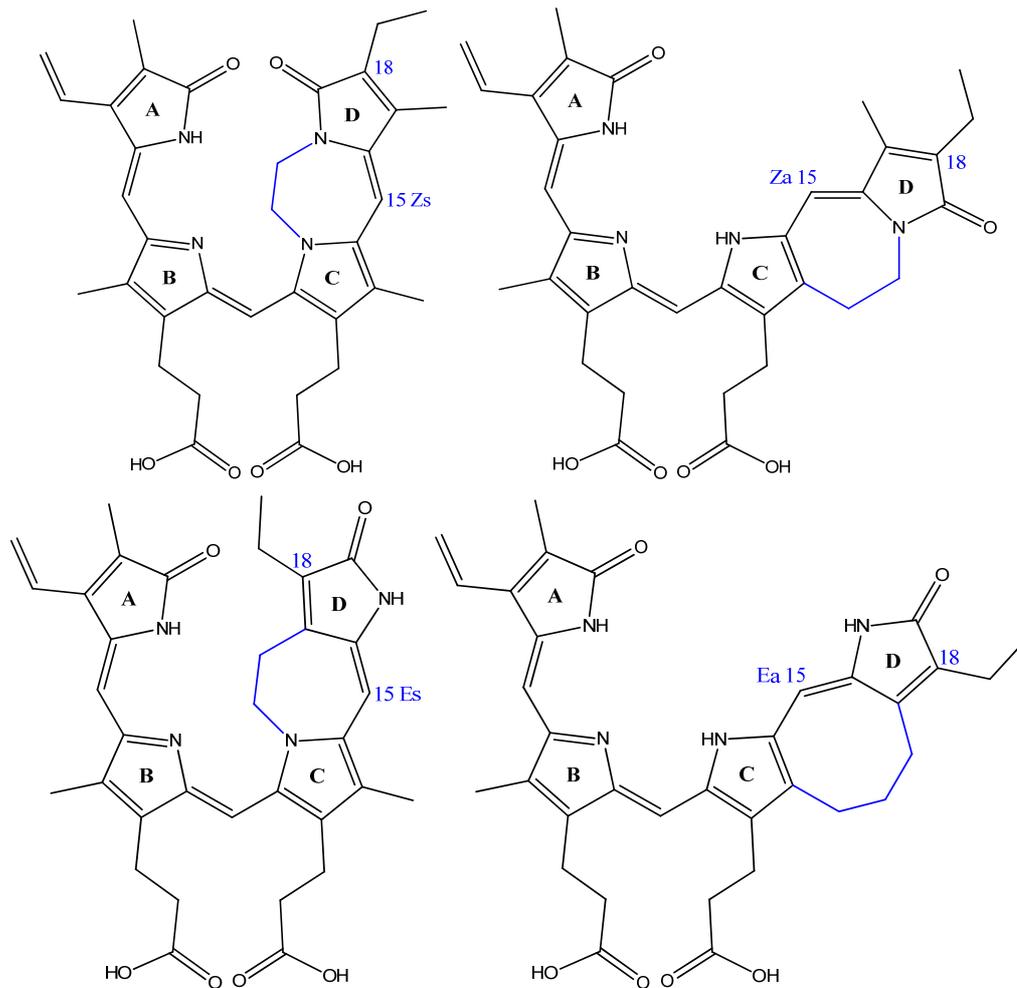


Abb. 14: Sterisch fixierte 18-Ethyl-Biliverdine, oben: links 15Zs-18-Ethylbiliverdin, rechts 15Za-18-Ethylbiliverdin, unten: links 15Es-18-Ethylbiliverdin, rechts 15Ea-18-Ethylbiliverdin nach Inomata^[61]

Diese Chromophore konnten in das Apo-Phytochrom Agp1 von *Agrobacterium* eingebaut werden. Der Vergleich der aufgenommenen Absorptionsspektren mit dem Spektrum des natürlichen Agp1 ergab eine Ähnlichkeit des 15Za-Biliverdins mit der P_r-Form des natürlichen Rezeptors und des 15Ea-Biliveridins mit der P_{fr}-Form des natürlichen Rezeptors. Die Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, dass der Chromophor (Biliverdin IX α) in Agp1 im P_r-Zustand in der ZZZssa-Konformation vorliegt und im P_{fr}-Zustand in der ZZEssa-Konformation.

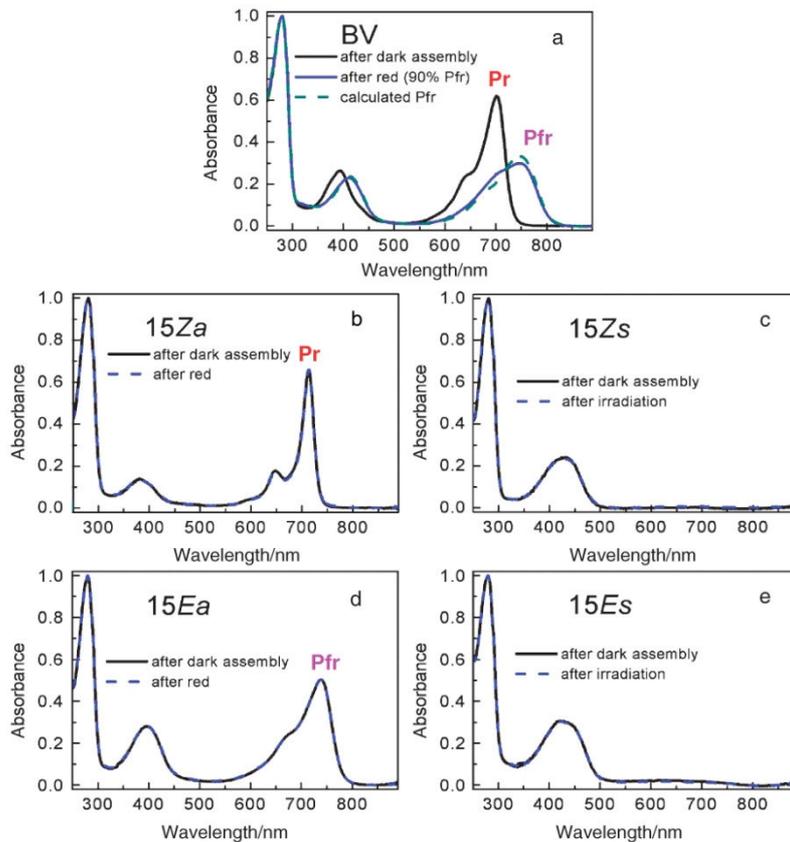


Abb. 15: Absorptionsspektren der überbrückten Biliverdine (15Za; 15Zs; 15Ea; 15Es) und des natürlichen Biliverdin IX α (BV) (**1**) eingebaut in Aqp1. Die schwarzen Kurven geben das Absorptionsspektrum nach der Assemblierung unter Lichtausschluss wieder; die gestrichelten Kurven zeigen die Absorptionsspektren nach der Belichtung mit rotem Licht (BV (**1**), 15Za und 15Ea) bzw. weißem Licht (15Zs und 15Es). (a) zeigt das Spektrum des Aqp1 mit chemisch unverändertem Biliverdin IX α (**1**) wieder. Das Protein unterläuft durch die Belichtung mit rotem Licht den zu erwartenden Photocyclus, was sich in der Änderung der beiden Kurven vor und nach Belichtung äußert. Die jeweiligen Absorptionsmaxima P_r und P_{fr} lassen sich eindeutig voneinander unterscheiden. Die vier sterisch fixierten Chromophore zeigen hingegen keinen Photocyclus. Der Vergleich der Absorptionsmaxima zeigt die größere Ähnlichkeit des 15Za-Spektrum (b) mit dem P_r -Spektrum von a, wohingegen das syn-Isomer (c) nur wenig Ähnlichkeit mit dem P_r -Spektrum zeigt. Das gleiche gilt für den Vergleich von d und e mit dem P_{fr} -Spektrum von a.^[61]

Eine andere interessante Synthesvariante von Inomata *et al.* ist die Darstellung von PCB-Derivaten mit einer photoaktiven Schutzgruppe an Position 17 oder 18 des D-Rings (siehe Abb. 16), die Photoaffinitätsmessungen ermöglichen sollte. Der spätere Einbau in das Protein PhyB aus *Arabidopsis thaliana* schlug allerdings auf Grund der Größe der photolabilen Schutzgruppe (4-[3-(Trifluoromethyl)diaziren-3-yl]phenyl) fehl. Genauere Informationen über die einzelnen Arbeiten finden sich in dem 2008

erschienenen Übersichtsartikel anlässlich der Preisverleihung für kreative Arbeit der Chemischen Gesellschaft von Japan^[61].

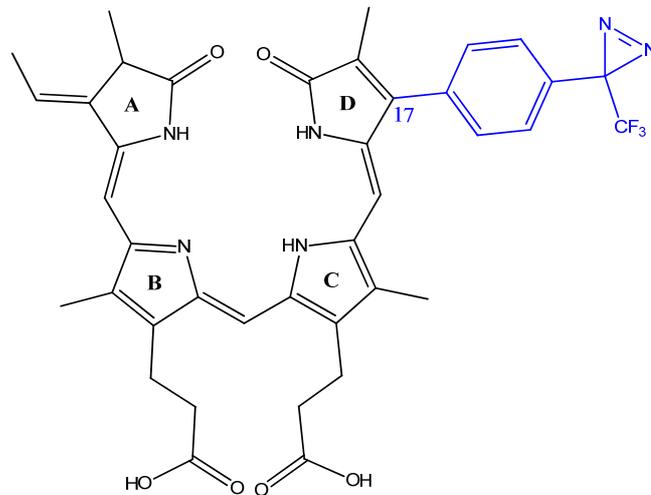


Abb. 16: Phycocyanobilin mit photolabiler Schutzgruppe (in blau) an C17 nach Inomata *et al.*^[61]

In der Arbeitsgruppe von W. Gärtner wurden neben einigen strukturell modifizierten Phycocyanobilin-Derivaten vor allem ¹³C- oder ¹⁵N-markiertes Phycocyanobilin (**3**) und dessen Derivate dargestellt. Die Derivate wurden nicht nur durch den klassischen Reaktionsweg nach Gossauer dargestellt, sondern auch durch Chromophorspaltungen mit Thiobarbitursäure^[63] und anschließendes Kuppeln der so erhaltenen „Hälften“ mit chemisch synthetisierten Dipyrrolen zum Tetrapyrrol. Besonders erwähnt werden sollte noch die Studie über D-Ring-Derivate von C. Bongards, bei der die NH-Funktion des D-Rings durch Sauerstoff, Schwefel oder Kohlenstoff ersetzt wurde^[64]. Diese „PCB-Derivate“ konnten erfolgreich in ein 65 kD schweres Fragment des N-Terminus von PhyA aus *Avena sativa* eingebaut werden. Sie zeigten eine hypsochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima und eine erhöhte Fluoreszenz, was auf ein kürzeres konjugiertes π -System und einen größeren Platzbedarf des D-Rings zurückzuführen ist.

2 Motivation der Arbeit

Auch nach fast 100 Jahren Phytochromforschung existieren immer noch viele „dunkle Flecken“ im Wissen rund um das Phytochrom, und die Entdeckung neuer Phytochrome mit abgewandelten Eigenschaften werfen zudem immer neue Fragen auf nach dem „wie“ und „warum“. So konnte der Mechanismus, der die durch den Chromophor eingefangene Information (rotes Licht) ins Protein überträgt, bisher nur ansatzweise geklärt werden. Als ausschlaggebend für die Signaltransduktion sollten sich dabei die mit der lichtempfindlichen Gruppe in direkter Wechselwirkung stehenden Aminosäurereste der Proteintasche erweisen. Daher sollte mit der Untersuchung dieser Interaktion mit verschiedenen analytischen Methoden fortgefahren werden.

Als problematisch für die Analyse der Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Protein und der Konformation des Chromophors erweist sich dabei die, im Vergleich zum Proteinrest, geringe Größe des Chromophors (die bezüglich des Molekulargewichts nur etwa 1% ausmacht). Schwingungsspektroskopische Methoden, wie FTIR- oder Raman, ergeben dadurch und durch die starke Konjugation des π -Elektronensystems hoch komplexe Spektren. Die Verwendung von spezifisch markierten Chromophoren kann in Verbindung unter Vergleich mit den Spektren unmarkierter Chromophore und simulierter Spektren die Zuordnung der einzelnen Banden ermöglichen. Auf diese Weise lässt sich die Konformation des Chromophors in den beiden stabilen Zuständen und in fixierten Intermediaten bestimmen. Die Wahl der richtigen Simulationsmethode und –parameter erweisen sich dabei als kritische Faktoren. So führten mittels QM (Quantenmechanisch)-Methoden simulierte Spektren unter Vergleich mit Resonanz-Raman-Messungen zu einer ZZZasa-Konformation des Chromophors (PCB) (**3**) im Protein^[65], was im klaren Widerspruch zu den kristallographisch ermittelten Daten (ZZZssa) steht^[66]. Erst durch die Verwendung von QM/MM Hybridmethoden (Quantenmechanisch, Molekularmechanisch) konnten die Ergebnis der Kristallographen nachvollzogen werden.

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Darstellung von Chromophoren mit ^{13}C -markierten Methinbrücken, die eine genauere Zuordnung der Brückensignale ermöglichen soll.

Auch NMR-spektroskopische Methoden können Aufschluss über die Konformation der prosthetischen Gruppe, deren Änderung während des $\text{P}_r\text{-P}_{fr}$ -Übergangs (auch $\text{P}_{fr}\text{-P}_r$) und die Interaktion mit dem Protein geben. Die geringe Chromophorgröße erweist sich für die Interpretation der Spektren durch die geringe Signalstärke auch hier als problematisch. Hinzu kommt die Ähnlichkeit z.B. der Stickstoffe untereinander. Wie in Abb. 17 A zusehen, weisen die Signale der vier Stickstoffatome nur geringe chemische Verschiebung zueinander auf, wobei zwei Stickstoffe zu einem Signal überlagern

($P_r = 160.5$ und 158.1), was an dem Spektrum des P_{fr} -Zustands leicht abzulesen ist. Die Vermutung, dass es sich um die Stickstoffatome des B- und C-Rings handelt, konnte durch die Synthese von $(20-^{15}\text{N})$ -Phycocyanobilin (**3**) widerlegt werden (vgl. Abb. 17 B). Ein Ziel dieser Arbeit ist die Synthese von ^{15}N -markiertem Phycocyanobilinen, die die genaue Zuordnung der einzelnen Signale ermöglichen sollen.

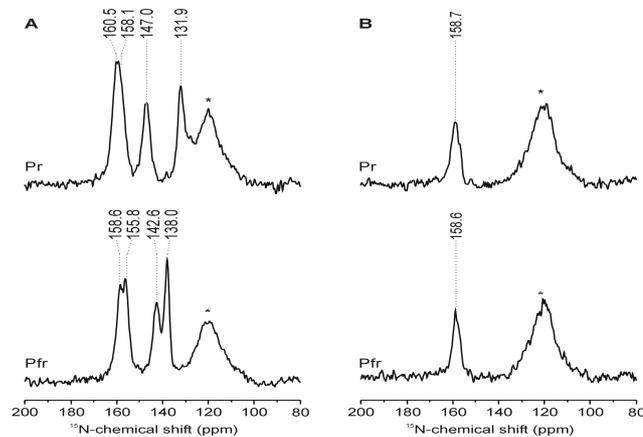


Abb. 17: 1D ^{15}N CP/MAS NMR-Spektren von vollständig ^{13}C - und ^{15}N -markiertem PCB (**3**) (A) und $(21-^{15}\text{N})$ -PCB (**3**) (B) eingebaut in Cph1 Δ 2 im P_{fr} -Zustand. Das Signal der im Proteinrest enthaltenen ^{15}N -Stickstoffatome ist mit einem Stern markiert.^[67]

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Synthese von (12^3-^{13}C) -markiertem PCB (**4**), das zur Weiterentwicklung und Verifizierung eines in der Arbeitsgruppe von J. Matysik postulierten Mechanismus der Chromophor-Proteinhülle-Interaktion während des P_{fr} - P_r -Übergangs (vgl. Abb. 18) beitragen soll.

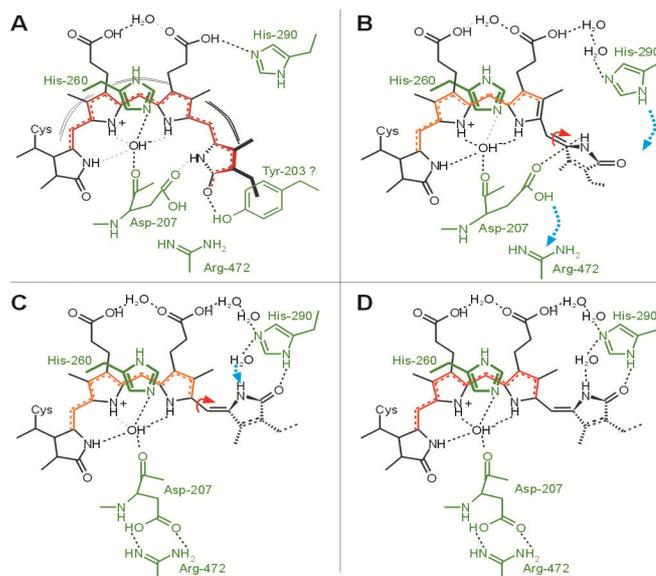


Abb. 18: Darstellung der möglichen Wechselwirkungen zwischen Chromophor (PCB (**3**)) und Proteinhülle (grün) während des P_{fr} - P_r -Übergangs: P_{fr} (A), Lumi-F (B), Meta-F (C) und P_r (D). Das konjugierte π -Elektronen-System ist rot bzw. orange hervorgehoben.^[67]

3 Syntheseplanung

Im Folgenden werden die abgebildeten Moleküle nur schematisch wiedergegeben.

3.1 Syntheseplanung der verschiedenen Phycocyanobiline und seiner Derivate

Phycocyanobilin (**3**) wird in dieser Arbeit auf zwei verschiedenen Wegen gewonnen: Zum einen durch chemische Totalsynthese und zum anderen durch Extraktion aus dem Cyanobakterium *Spirulina platensis*.

3.1.1 Allgemeines Synthesekonzept für Phycocyanobilin (PCB) (**3**)

Zunächst soll hier ein Synthesekonzept für Phycocyanobilin (**3**) vorgestellt werden, das zur Darstellung der markierten Formen des PCBs, entsprechend dem gegebenen Thema dieser Arbeit abgewandelt werden soll. Die Synthese folgt bei allen hier entwickelten Totalsynthesen dem klassischen Konzept von Gossauer^[59,59] (siehe Abb. 11), d.h., der separaten Synthese der einzelnen Ringe mit anschließender Kupplung zu den AB- und CD-Hälften, die dann zum Tetrapyrrol verbunden werden.

3.1.1.1 Synthese des A-Rings (**5**)

Der A-Ring (**5**) wird nach der von Inomata *et al.*^[64,68] entwickelten Methode ausgehend von Citraconsäureanhydrid dargestellt. Wie in Abb. 19 dargestellt, wird durch Reaktion mit 4-Methoxybenzylamin der Stickstoff mit Schutzgruppe an die Position des Anhydridsauerstoffs in den Ring eingeführt. Die fehlende Ethylidengruppe an C3 wird über eine abgewandelte Michael-Addition mit Nitroethan angefügt. Dann wird die Schutzgruppe des Stickstoffs mit Ammonium-Cer(IV)-nitrat (CAN) abgespalten und nach Reaktion mit Lawesson-Reagenz (**6**) kann der fertige A-Ring (3-Ethyl-4-methyl-2-thiosuccinimid (**5**)) zum weiteren Aufbau des Tetrapyrrols verwendet werden.

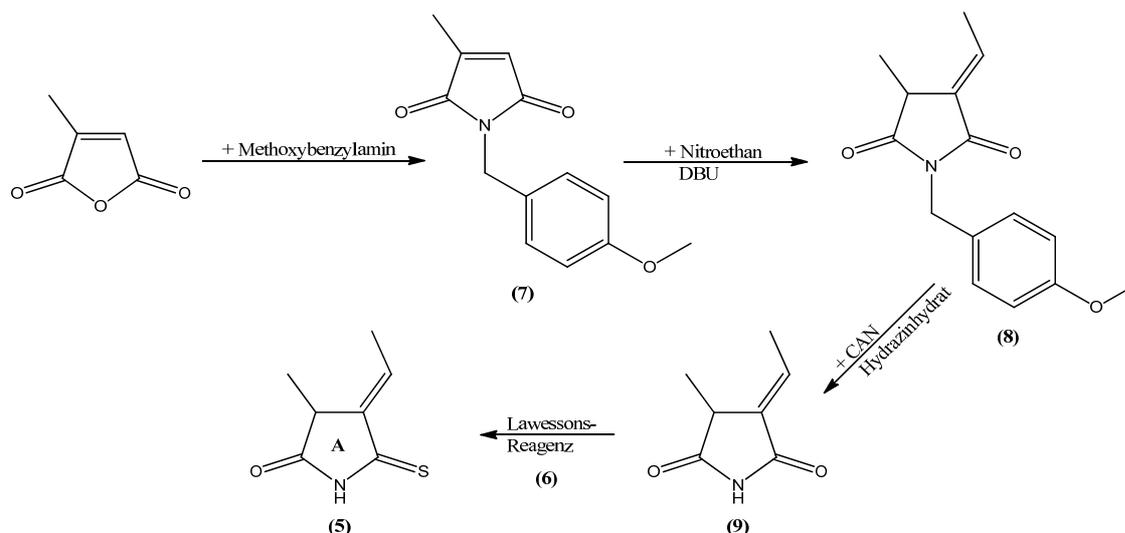


Abb. 19: Synthesekonzep für den A-Ring (3-Ethyliden-4-methyl-2-thiosuccinimid (5)) nach Inomata *et al.*^[64,68].

3.1.1.2 Synthese der B/C-Vorstufe (10)

Das spiegelbildliche Substitutionsmuster des B- und C-Rings von Phycocyanobilin (3) ermöglicht die Synthese der beiden Ringe über eine gemeinsame Vorstufe – 3-(2-Methoxycarbonyl-ethyl)-4-methyl-1*H*-pyrrol (10). Barton *et al.* haben für die Synthese dieses in α -Position unsubstituierte Pyrrol-Derivat einen Weg entwickelt, der von zwei Molekülteilen ausgeht, die getrennt voneinander dargestellt werden, um dann zum gesuchten Molekül zusammengesetzt zu werden^[64,69,70] (siehe Abb. 20).

Bei einer der beiden Molekülhälften handelt es sich um 4-Acetoxy-5-nitrohexansäuremethylester (11). Die Synthese beginnt mit Acrylsäuremethylester. Im ersten Schritt wird durch Reaktion von Acrylsäuremethylester mit Nitromethan 4-Nitrobutansäuremethylester (12) erhalten, der dann mittels abgewandelter Nef-Reaktion zunächst zum Acetal (4,4-Dimethoxybutansäuremethylester (13)) und anschließend durch Einwirkung wässrig-saurer Lösung in den Aldehyd (4-Oxobutansäuremethylester (14)) überführt wird. Der Aldehyd kann nach Addition von Nitroethan mit Essigsäureanhydrid zum ersten Molekülteil umgesetzt werden^[69,70].

Die zweite Molekülhälfte wird aus der Kondensation von Formamid mit Chloressigsäure-*tert*-butylester zu N-Formylglycin-*tert*-butylester (15) mit anschließender Dehydratisierung zum Isocyanoessigsäure-*tert*-butylester (16) gewonnen^[64,70,71].

Beide Molekülhälften werden dann zum α -unsubstituierten Pyrrol-Derivat (10) zusammen gefügt, indem der 4-Acetoxy-5-nitrohexansäuremethylester (11) deprotoniert

wird, der dann nach dem Verlust der Acetoxyschutzgruppe das Isonitril (**16**) nucleophil angreifen kann (vgl. Abb. 20). Unter Abspaltung des Acetoxyrestes mit anschließender Cyclisierung wird dann das 3-(2-Methoxycarbonyl-ethyl)-4-methyl-1*H*-pyrrol (**10**) erhalten, das durch unterschiedliche Funktionalisierung entweder in den B- oder den C-Ring überführt wird.

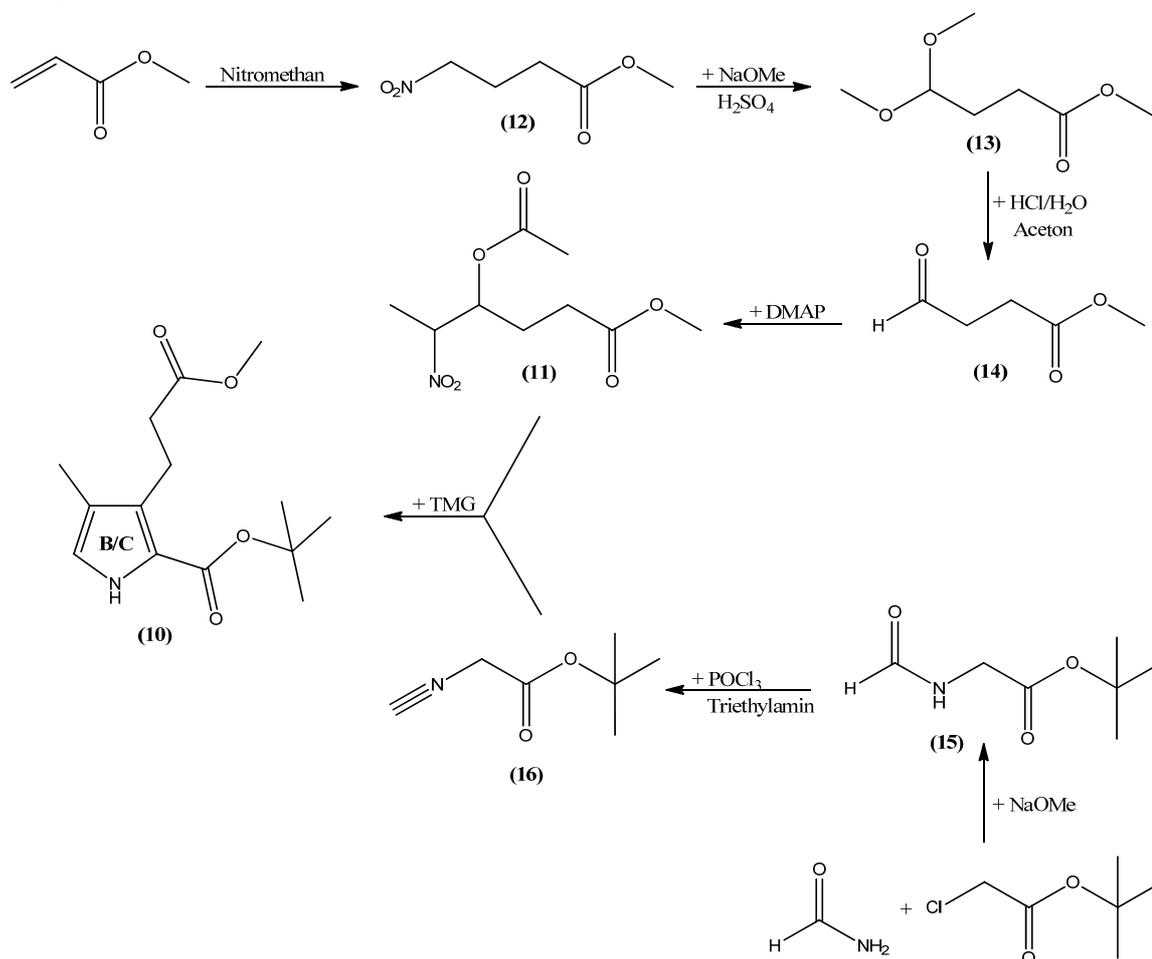


Abb. 20: Synthesekonzept der B/C-Vorstufe (**10**)^[64,69-71]

3.1.1.3 Synthese des B-Rings (**17**)

Die Unterscheidung zwischen B- und C-Ring erfolgt erst bei der Kupplungsreaktion mit einem zweiten Ring, entweder A oder D. Für die Bindungsknüpfung zu den beiden Ringen sind allerdings, abhängig vom entsprechenden Kupplungspartner unterschiedliche Funktionalisierungen nötig. Der B-Ring (**17**) benötigt eine aktive Gruppe, die unter Bildung der Methinbrücke mit der Thioketo-Funktion des A-Rings (**5**) reagieren kann, wofür sich eine Thio-Wittig-Reaktion anbietet. Dazu muss ein Ylid (**17**) mit einer Schutzgruppe dargestellt werden, die gleichzeitig oder vor der Kupplung mit der CD-Hälfte abgespalten werden kann. Bishop *et al.* haben die Synthese des geeigneten Ylids (**17**) entwickelt^[64,72,72]. Als Schutzgruppe wurde der

Glyoxylsäurebenzylester (**18**) gewählt, der sich mittels Hydrierung selektiv abspalten lässt. Der Glyoxylsäurebenzylester (**18**) wird durch Veresterung von D-(-)-Weinsäure und anschließender Spaltung mittels Periodsäure erhalten (vergl. Abb. 21).

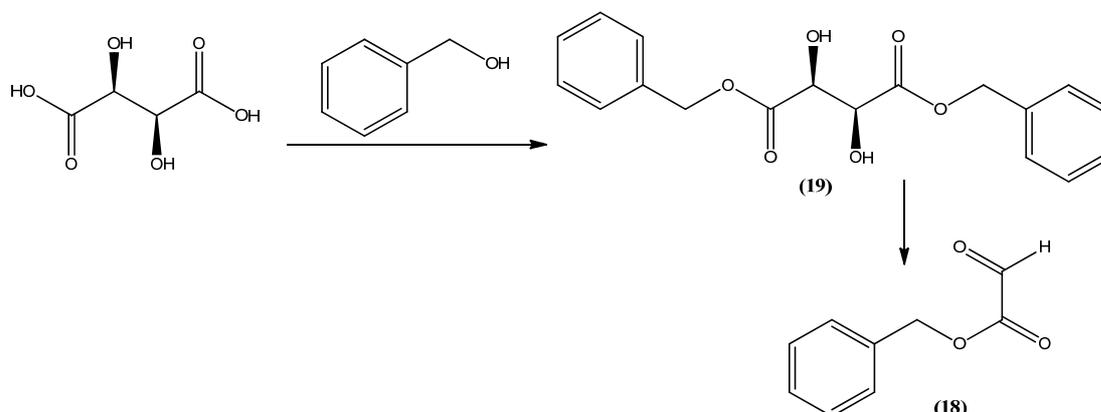


Abb. 21: Synthesekonzept für den Glyoxylsäurebenzylester (**18**) als B-Ring-Schutzgruppe^[64,72]

Nach der elektrophilen aromatischen Substitution des Glyoxylsäurebenzylesters (**18**) an die B/C-Vorstufe (**10**) wird das Hydroxid (**20**) in das für die Thio-Wittig-Reaktion benötigte Ylid (**17**) überführt. Dazu wird die Hydroxy-Gruppe zuerst durch Reaktion mit *N*-Chlorsuccinimid (NCS) zum Chlorid (**21**) umgesetzt und dann mit Triphenylphosphin ins Ylid (**17**) überführt. Der B-Ring (**17**) ist nun zur Kupplung mit dem A-Ring (**5**) geeignet.

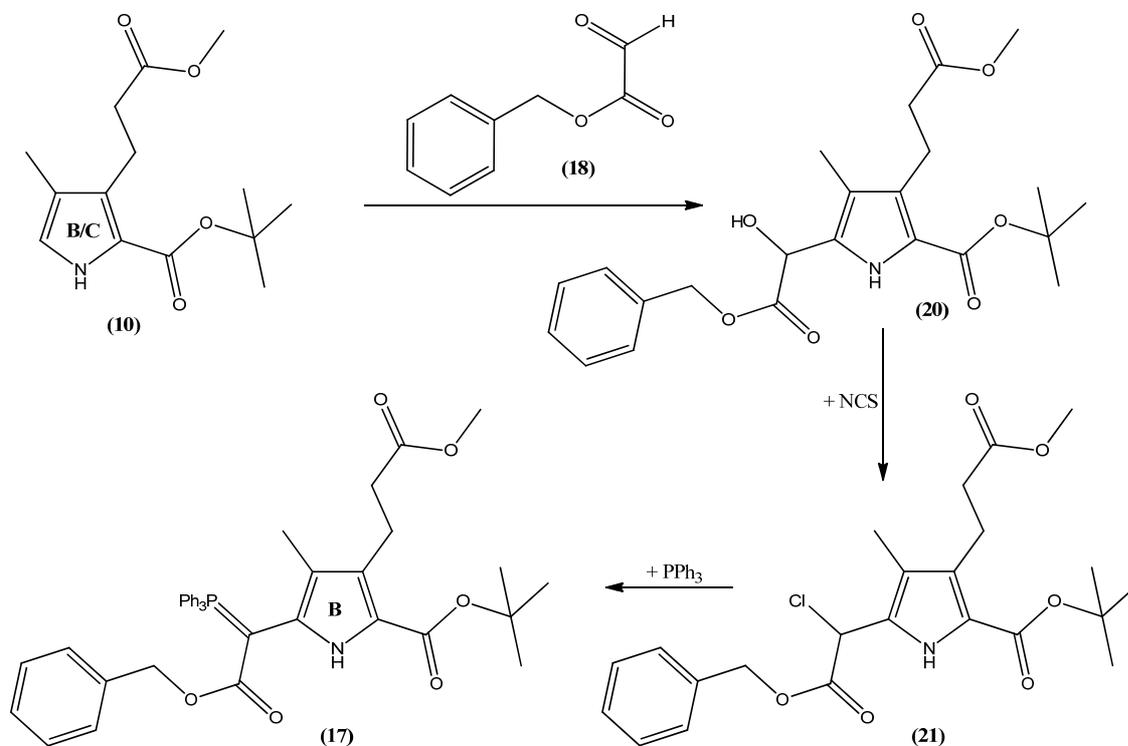


Abb. 22: Funktionalisierung der B/C-Vorstufe (**10**) zum B-Ring (**17**)

3.1.1.4 Synthese des C-Rings (22)

Die Funktionalisierung der B/C-Vorstufe (**10**) zum C-Ring (**22**) erfolgt, wie bei Gossauer *et al.* beschrieben, durch Vielsmeyer-Reaktion an der freien α -Position des Pyrrols^[73].

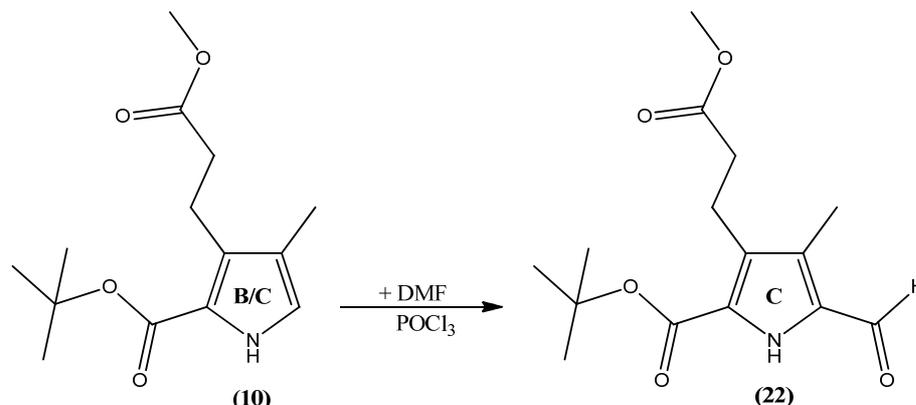


Abb. 23: Darstellung des C-Rings (**22**)^[73]

3.1.1.5 Kupplung zur AB-Hälfte (23)

Die Kupplung des A-Rings (**5**) mit dem B-Ring (**17**) erfolgt, wie bereits erwähnt, über eine Thio-Wittig-Reaktion unter Abspaltung von Triphenylphosphinsulfid^[64,72] (vergl. Abb. 24). Die Thioketofunktion wird eingeführt, um gegenüber der zweiten Carbonylfunktion eine Positionselektion zu gewährleisten.

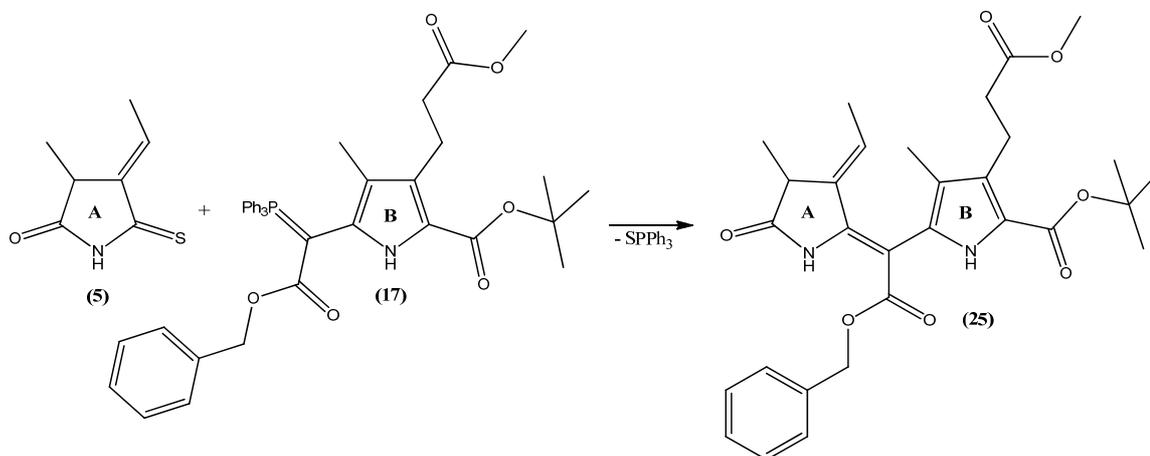


Abb. 24: Kupplung von A- (**5**) und B-Ring (**17**)^[64,72]

Vor der weiteren Umsetzung zum Tetrapyrrol muss die Benzyl-Schutzgruppe an Position C5 noch durch Hydrierung entfernt werden. Die Carbonsäure-Funktion, die nach der Hydrierung an C5 erhalten bleibt, wird bei der Kupplung der AB- (**23**) mit der CD-Hälfte (**24**) mittels TFA entfernt^[64,70,74] (siehe Abb. 25).

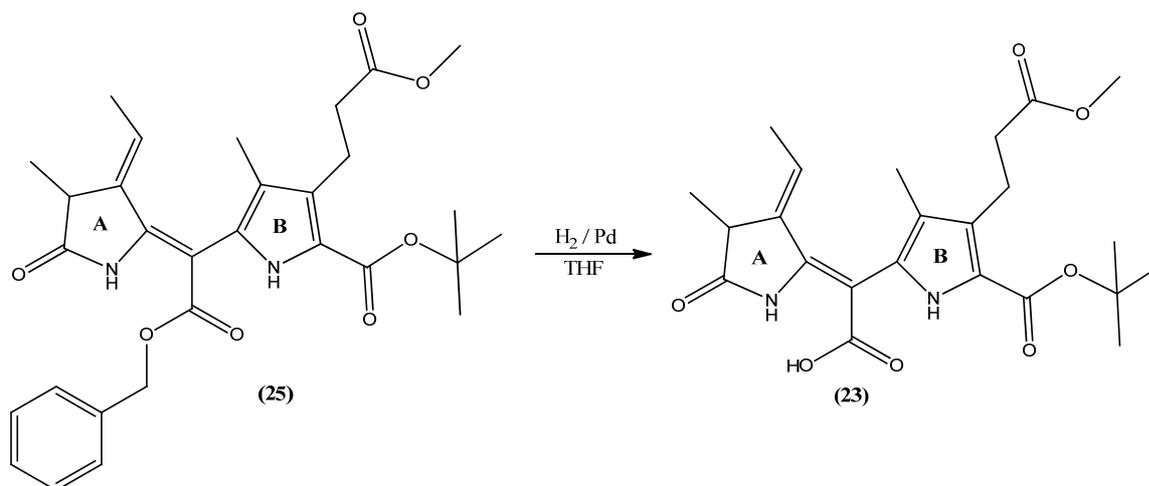


Abb. 25: Abspaltung des Benzylesters^[64,70,74]

3.1.1.6 Kupplung zur CD-Hälfte (24)

Der D-Ring (26) kann mit freier α -Position käuflich erworben werden und wird dann durch basenkatalysierte Knoevenagel-Reaktion mit dem entsprechend derivatisierten C-Ring (22) verbunden^[64,75,76] (siehe Abb. 26).

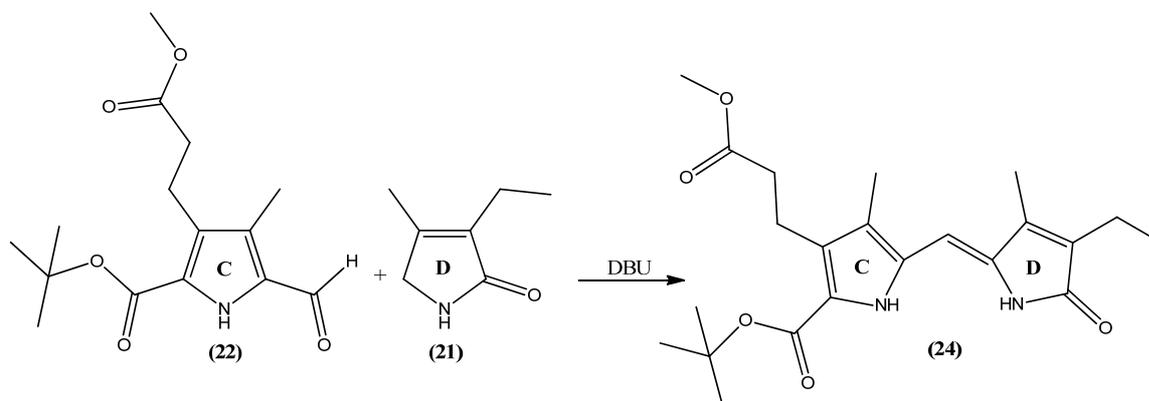


Abb. 26: Kupplung des C-Rings (22) mit dem D-Ring (26)^[64,75,76]

Zur Darstellung des Tetrapyrrols muss nun noch eine der beiden Molekülhälften (AB (23) oder CD (24)) weiter funktionalisiert werden. In diesem Fall wird die CD-Hälfte (24) nach der von Weller und Gossauer entwickelten Methodik^[76,77] durch säurekatalysierte Abspaltung des *tert*-Butylrestes mit anschließender Decarboxylierung mittels Triethylorthoformiat formyliert (siehe Abb. 27).

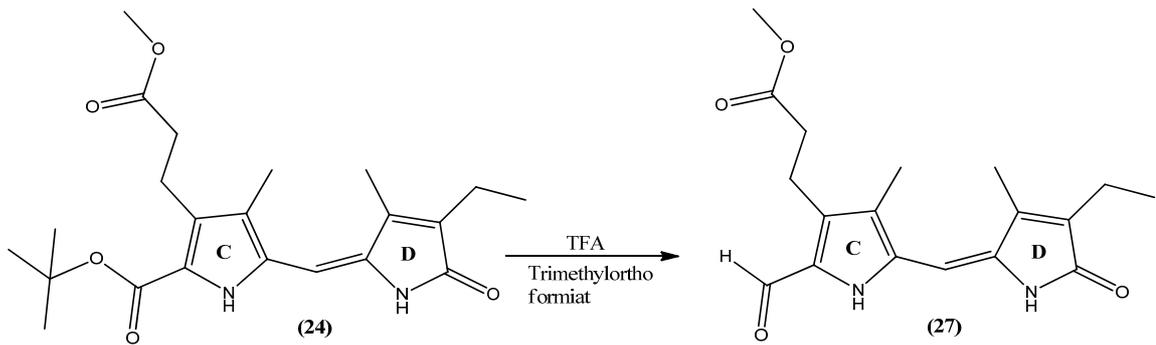


Abb. 27: Formylierung der CD-Hälfte (24)^[76,77]

3.1.1.7 Kupplung zum Tetrapyrrol

Die Kupplung der beiden Molekülhälften zum fertigen Tetrapyrrol erfolgt nach der säurekatalysierten Abspaltung des *tert*-Butylrestes der AB-Hälfte (23) mit anschließender Decarboxylierung an den Positionen C5 und C9 und Kondensation mit der Formylgruppe der CD-Hälfte (27)^[70,76,77] (siehe Abb. 28).

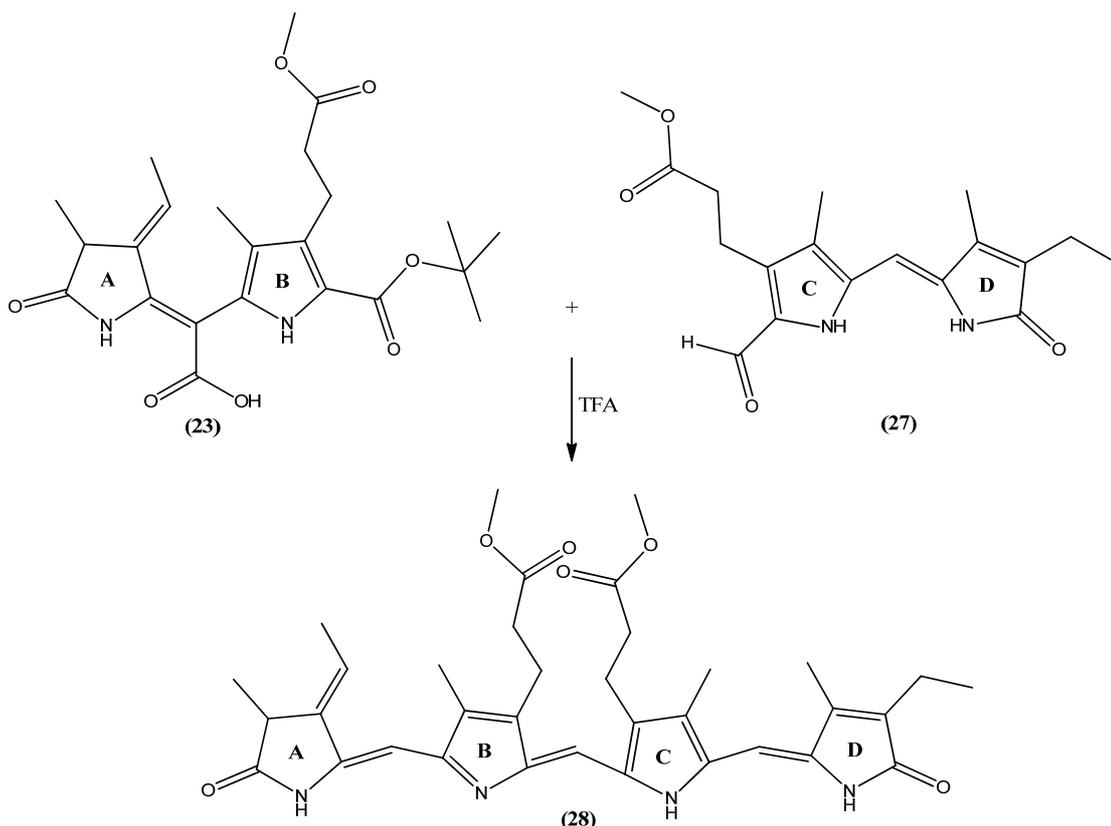


Abb. 28: Kupplung zum Phycocyanobilindimethylester (28)^[70,76,77]

Der später folgende Einbau des Phycocyanobilins (3) in das Protein erfordert die Freisetzung der Disäure aus ihren Methylestern. Daher werden die Methoxyschutzgruppen der Propionsäurereste an saurem Ionenaustauscher abgespalten (Abb. 29) und das Molekül so in die Disäure überführt^[64,70].

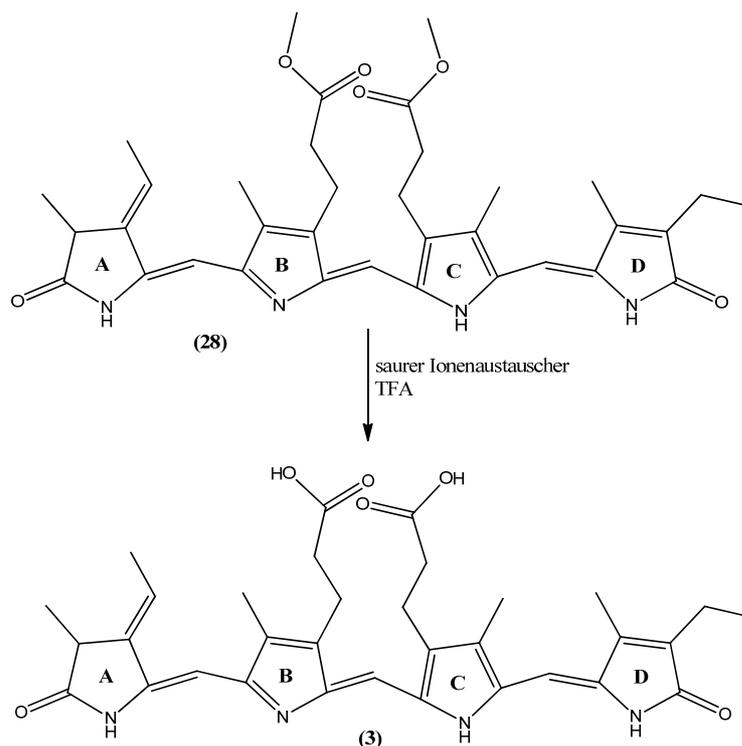


Abb. 29: Freisetzung der Disäure (3)^[64,70]

3.1.2 Synthese des ¹⁵N-markiertem C-Rings (29)

Der ¹⁵N-markierte C-Ring (29) des PCBs (3) wird durch die in der Arbeitsgruppe etablierte Reaktion des Isocyanoessigsäureesters (16) mit 4-Acetoxy-5-nitrohexansäuremethylester (11) synthetisiert. Die kostengünstige Zugänglichkeit des ¹⁵N-markierten Isonitrils erfordert allerdings die Abänderung der allgemein verbreiteten Synthese, ausgehend von Formamid, da dieses in großem Überschuss eingesetzt werden müsste.

Die Synthese des ¹⁵N-markierten C-Rings (29) erfolgt daher ausgehend von Glycin als ¹⁵N-markiertem Baustein. Die Carboxylfunktion des Glycins wird durch Veresterung mittels Sulfurylchlorid und Methanol^[78] vor der weiteren Umsetzung geschützt. Dann wird die Aminogruppe durch Reaktion mit Ameisensäure formyliert^[79]. Der N-Formylglycinmethylester (30) wird durch Dehydratisierung mit Phosphorylchlorid und Triethylamin zum Isocyanoessigsäuremethylester (31) umgesetzt^[64,70,76].

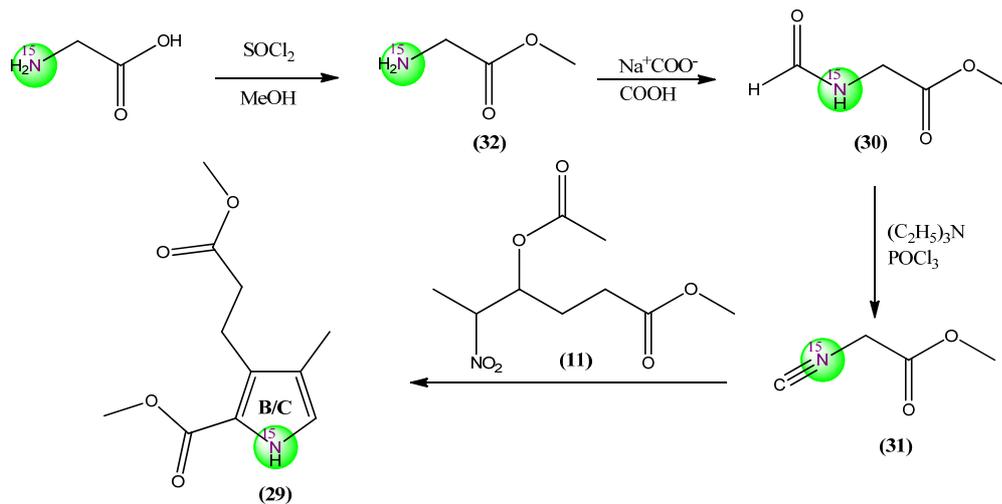


Abb. 30: Synthesekonzept für ^{15}N -markierte B/C-Vorstufe (29)^[64,70,76,78,79]

3.1.3 Synthese des C-Rings mit ^{13}C -markierter Carbonylfunktion des Propionsäurerestes (33)

Auch für die Einführung des ^{13}C -Isotops in die Carbonylfunktion des Propionsäurerestes der B/C-Vorstufe (10) muss von dem in 3.1.1.2 vorgestellten Synthesekonzept abgewichen werden. Als ^{13}C -Baustein dient, wie in Abb. 31 beschrieben, ^{13}C -Natriumcyanid, das mit 3-Brom-1,1-dimethoxypropan nach der Methodik von Gribble *et al.* zum Nitril umgesetzt wird^[80]. Das Nitril wird basisch zur Carbonsäure verseift^[81] und die entstandene Säure mit Methanol zum (1- ^{13}C)-4,4-Dimethoxybutansäuremethylester (34) verestert^[3]. Die weitere Synthese zum 4-Acetoxy-5-nitrohexansäuremethylester (11) und die anschließende Kupplung mit dem Isonitril zur B/C-Vorstufe (35) kann nach dem bewährten Konzept erfolgen, ebenso wie die weitere Synthese zum fertigen Phycocyanobilin (36) (siehe Abb. 31).

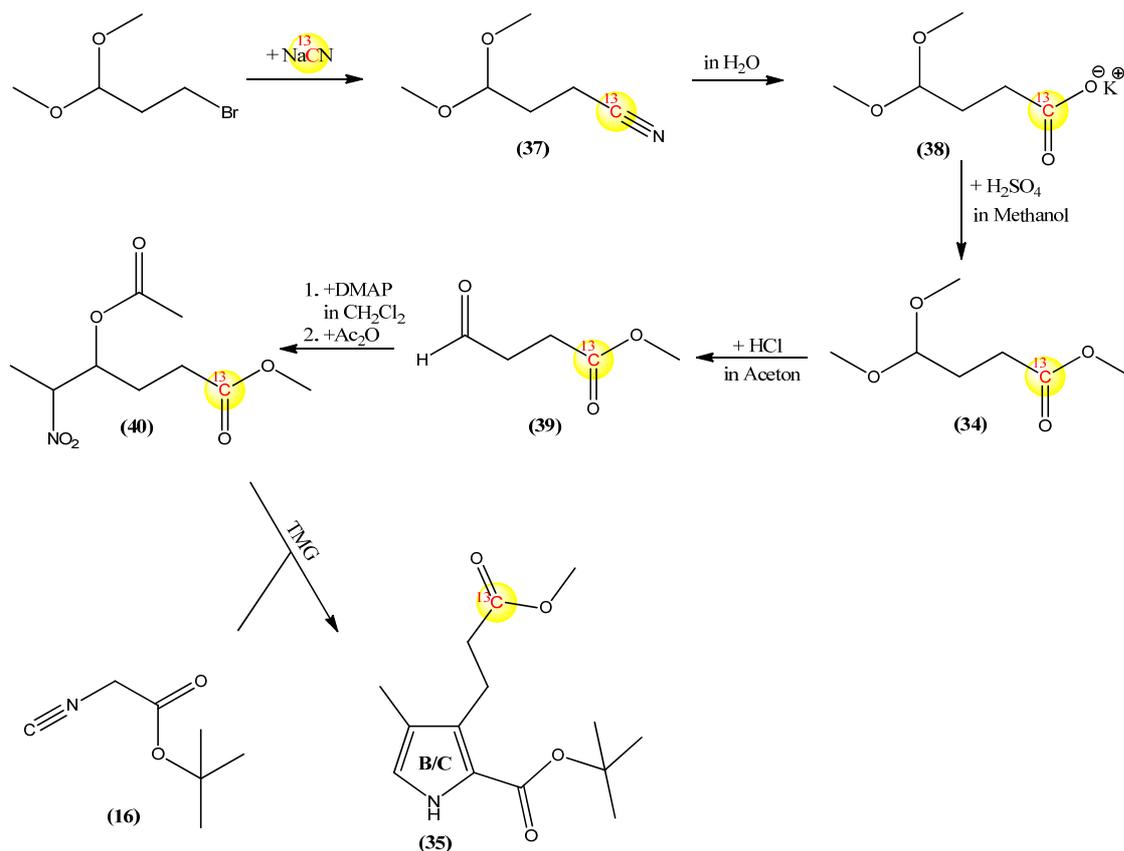


Abb. 31: Synthesekonzept für $(3^3\text{-}^{13}\text{C})\text{-B/C-Vorstufe}$ ^[3,80,81]

3.1.4 Synthese von $(5\text{-}^{13}\text{C})\text{-Phycocyanobilin (41)}$

Die $(5\text{-}^{13}\text{C})$ -markierte AB-Hälfte (42) wurde von C. Bongards nach dem Verfahren von Makhynya *et al.* dargestellt^[82] (siehe Abb. 32). Die ^{13}C -Markierung der Methinbrücke wird bei der Darstellung des B-Rings (43) eingeführt. Wie bereits bei anderen Isotopen-Markierungsreaktionen erwähnt, muss auch hier eine von dem allgemeinen Synthesekonzept abweichende Funktionalisierung der B/C-Vorstufe (10) verwandt werden. ^{13}C -markierte 2-Bromessigsäure wird durch Veresterung mit Benzylalkohol zum Benzylester (44) umgesetzt. Nach dem Austausch von Brom gegen Iod wird der $(2\text{-}^{13}\text{C})$ -Iodessigsäurebenzylester (45) radikalisch an das 3-(2-Methoxycarbonyl)ethyl)-4-methyl-1H-pyrrol (10) gebunden. Anschließend wird das Molekül durch Chlorierung an $\text{C}5^1$ und darauffolgende Reaktion mit Triphenylphosphin zum fertigen B-Ring (43) umgesetzt und damit zur Kupplung mit dem A-Ring (5) vorbereitet. Nach der Entfernung der Benzylschutzgruppe durch Hydrierung ist die $(5\text{-}^{13}\text{C})\text{-AB-Hälfte (42)}$ zur Kupplung mit der CD-Hälfte (27) bereit.

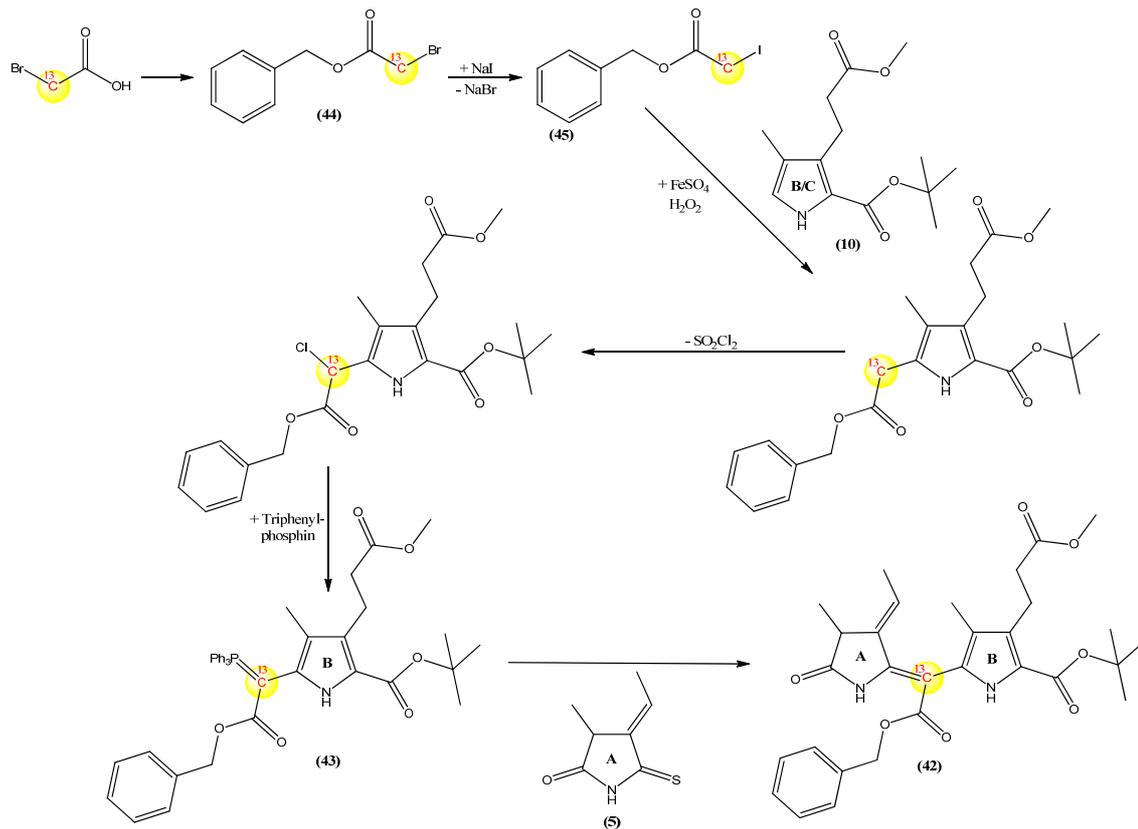


Abb. 32: Syntheseübersicht (5- ^{13}C)-markierte AB-Hälfte (42)^[82]

Die an C5 verbliebene Säuregruppe wird, wie in der allgemeinen Vorschrift beschrieben, während der Kupplung mit der CD-Hälfte (27) entfernt und das Zielmolekül, (5- ^{13}C)-PCB (41), durch Verseifung der Propionsäurereste fertiggestellt.

3.1.5 Synthese von (15- ^{13}C)-Phycocyanobilin (48)

Die Synthese von (15- ^{13}C)-Phycocyanobilin (48) erfolgt bis zur B/C-Vorstufe dem in Abschnitt 3.1.1.2 vorgestellten Syntheseweg (vgl. Abb. 20). Die Funktionalisierung des C-Rings (49) bietet dann eine gute Möglichkeit zur Einführung der ^{13}C -markierten Methinbrücke über N,N-Dimethylformamid- ^{13}C . Die weitere Darstellung des (15- ^{13}C)-Phycocyanobilins (48) kann dann wieder nach dem oben beschriebenen Verfahren erfolgen (siehe Abb. 33)^[82].

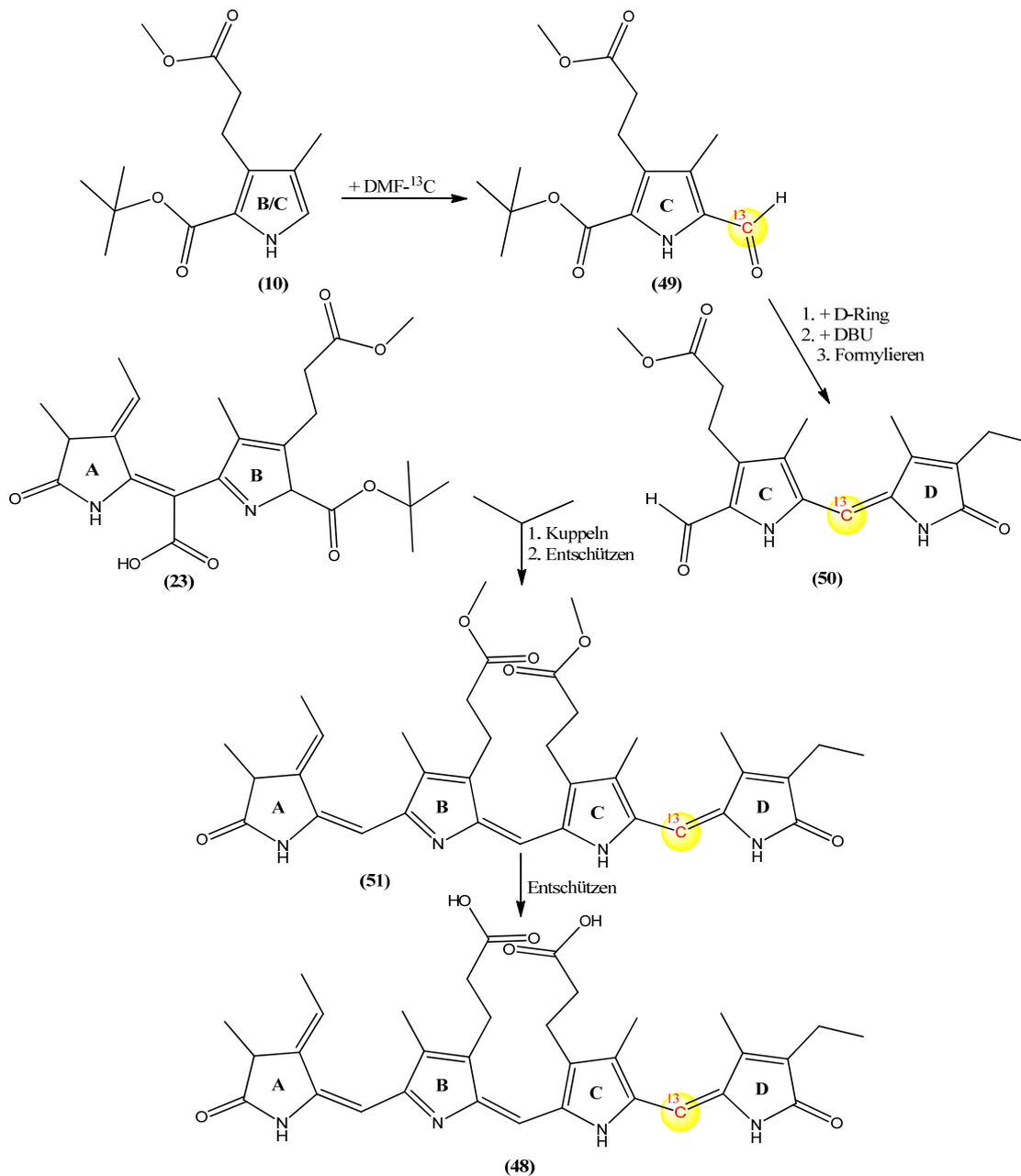


Abb. 33: Kurzübersicht (15-¹³C)-PCB Synthese (48)^[82]

3.1.6 Isolierung von Phycocyanobilin aus dem Cyanobakterium *Spirulina platensis*

Phycocyanobilin (3) wird nach der vorherigen Abtrennung der Chlorophylle und anderer Farbstoffe durch Methanolyse^[83,84] nach dem in der Arbeitsgruppe etablierten Verfahren aus dem Cyanobakterium *Spirulina platensis* gewonnen.

3.1.7 Synthese eines Phycocyanobilindimethylester-3¹-cysteinadduktes (53)

Durch Methanolyse gewonnenes Phycocyanobilin (**3**) wird, wie bei O'Carra beschrieben^[59], säurekatalysiert verestert und dann nach dem Verfahren von Stumpe *et al.* mit N-Acetyl-L-cysteinmethylester zum Cysteinaddukt (**53**) umgesetzt^[85].

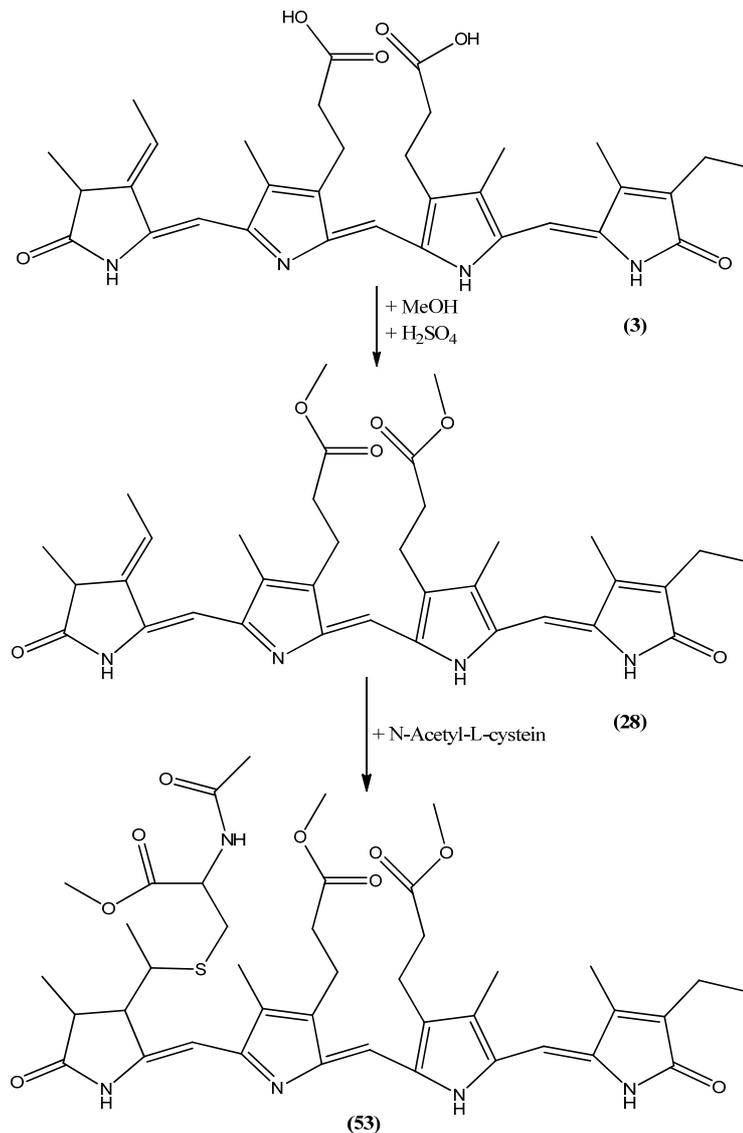


Abb. 34: Synthese des PCBMe₂-Cysteinaddukts (**53**)^[59,85]

3.1.8 Spaltung von ¹⁵N-Phycocyanobilin (54)

Zur Darstellung von (22,23-¹⁵N)-Phycocyanobilin (**55**) wird vollständig ¹⁵N-markiertes Phycocyanobilin (**54**), das durch Anzucht des Cyanobakteriums *Synechocystis* in ¹⁵N-markiertem Medium in der Arbeitsgruppe von J. Hughes (Universität Gießen) gewonnen wurde, zunächst säurekatalysiert zum Dimethylester umgesetzt^[59].

Darauffolgend wird der ^{15}N -Phycocyanobilindimethylester (**56**) nach der von Manitto *et al.* entwickelten Methode durch nucleophilen Angriff von Thiobarbitursäure auf die mittlere Methinbrücke (C10) gespalten^[63] (siehe Abb. 35). Hierbei entsteht neben der gewünschten Spalthälfte die jeweils andere Hälfte als Thiobarbiturat-Addukt, das nicht zurück gewonnen werden kann.

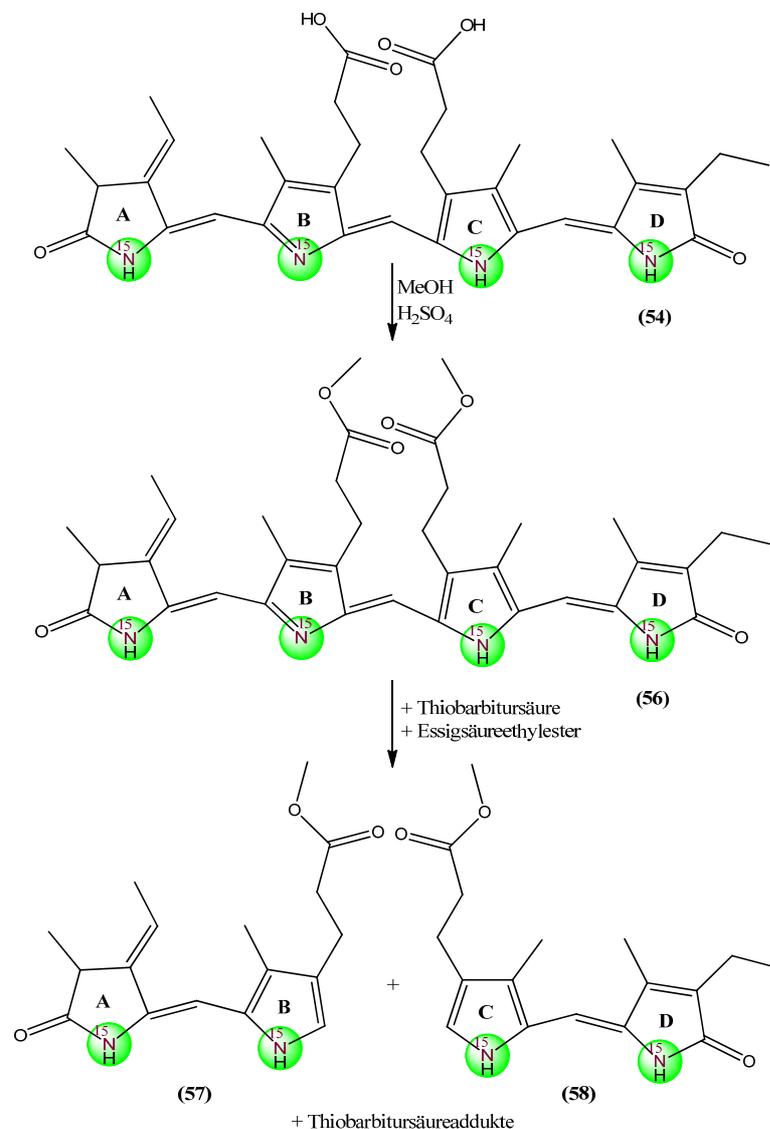


Abb. 35: Spaltung von ^{15}N -Phycocyanobilin (**54**)^[59,63]

Die CD-Hälfte kann nun durch Formylierung mittels Trimethylorthoformiat für die Kupplung mit unmarkierter AB-Hälfte (**61**), die auf dem gleichen Syntheseweg erhalten wurde, aktiviert werden. Die anschließende Kupplung wird durch Phosphorylchlorid induziert. Vor einem eventuellen Einbau ins Protein muss der (22,23- ^{15}N)-Phycocyanobilindimethylester (**59**) wie in 3.1.1 beschrieben geschützt werden.

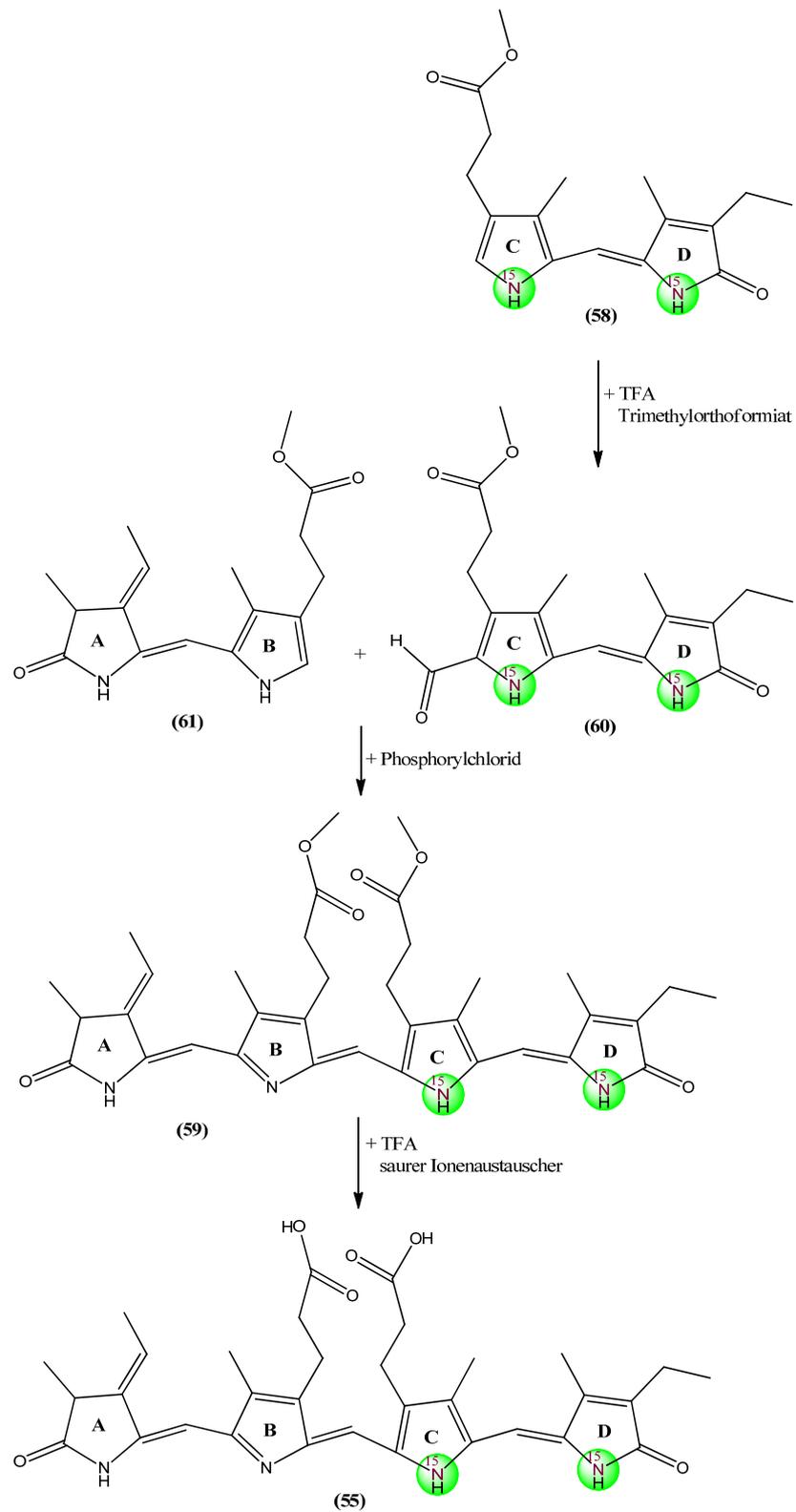


Abb. 36: Synthese von (22,23-¹⁵N)-Phycocyanobilin (55)

3.2 Syntheseplanung von (10-¹³C)-Biliverdin IX α (62)

Bei der Darstellung von (10-¹³C)-Biliverdin IX α (62) wird auf eine Totalsynthese nach dem Modell von Gossauer verzichtet. Die Synthese erfolgt alternativ nach der von Manitto *et al.* entwickelten Methode^[63], die die Fragmentierung von Biliverdindimethylester (63) beinhaltet. Der Syntheseweg lässt sich dadurch erheblich vereinfachen, da durch die Spaltung von Biliverdindimethylester (63) in einer Reaktion sowohl die AB-Hälfte (64) als auch die CD-Hälfte (65) gewonnen werden. Allerdings führt die Reaktion zum Verlust der mittleren C10-Methinbrücke, die entsprechend anschließend als ¹³C-markierte Brückenfunktion wieder eingeführt wird. Biliverdin IX α (1) wird dazu zunächst durch Oxidation von Bilirubin (66) nach der von McDonagh *et al.*^[59] vorgestellten Methode gewonnen (siehe Abb. 37).

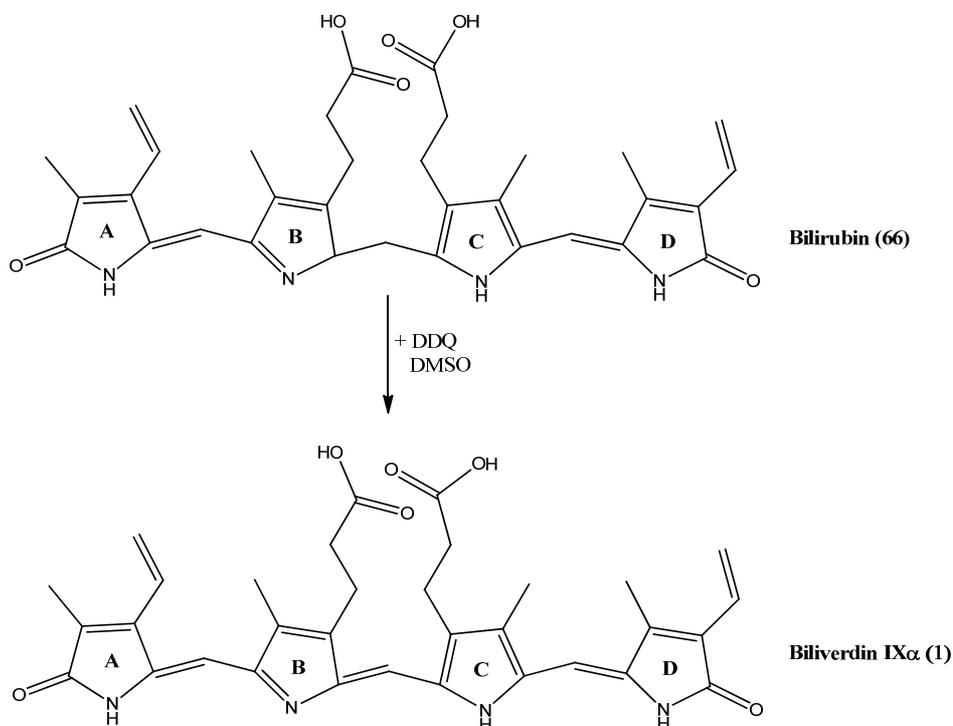


Abb. 37: Darstellung von Biliverdin IX α (1) durch Oxidation von Bilirubin (66)

Bevor Biliverdin IX α (1) gespalten werden kann, müssen die beiden reaktiven Carbonsäuregruppen der Propionsäurereste von Ring B und –C durch säurekatalysierte Veresterung nach O'Carra^[59] geschützt werden (siehe Abb. 38).

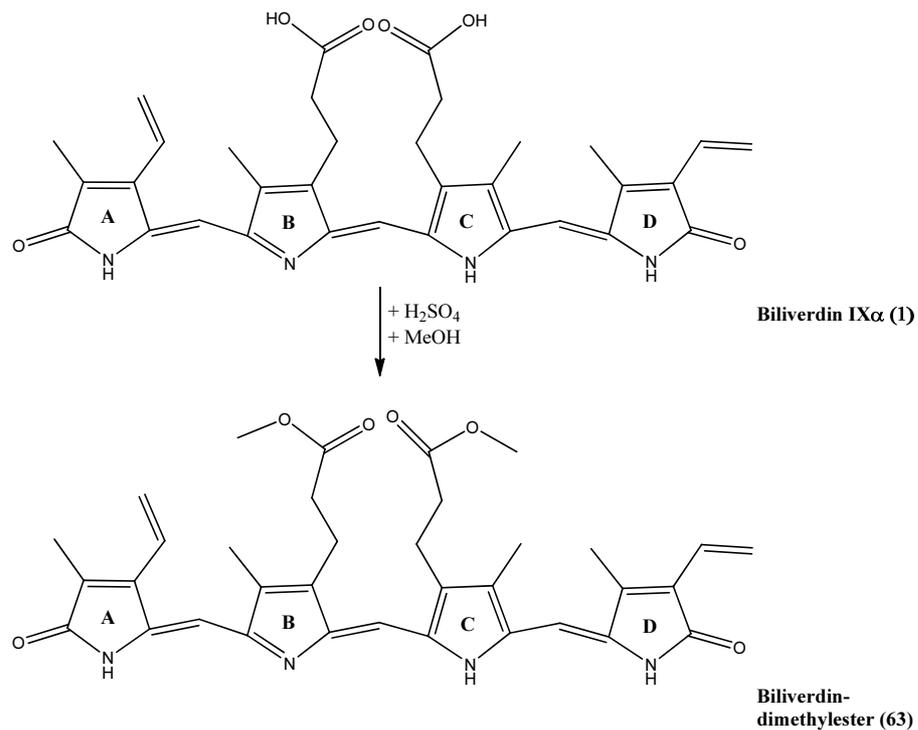


Abb. 38: Veresterung von Biliverdin IX α (**1**)^[63]

Biliverdindimethylester (**63**) wird nun, wie bei Manitto *et al.* beschrieben^[63], durch nucleophilen Angriff von Thiobarbitursäure auf die mittlere Methinbrücke gespalten, wodurch sich, wie bereits erwähnt, der direkte Zugang zu den AB- (**64**) und CD-Hälften (**65**) ergibt (siehe Abb. 39).

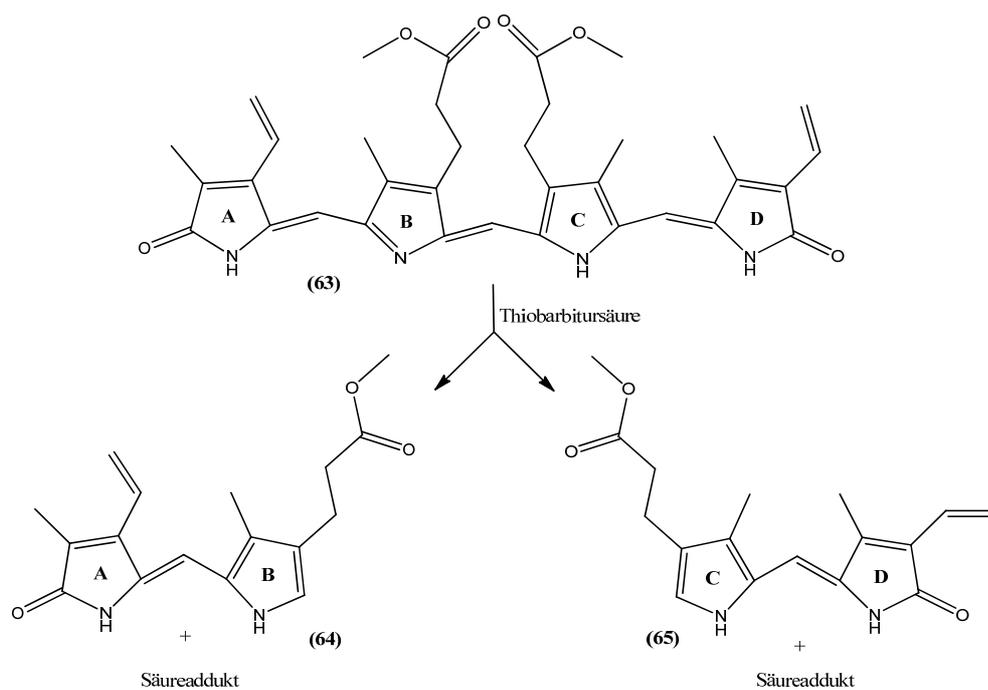


Abb. 39: Spaltung von Biliverdindimethylester (**63**) nach Manitto und Monti^[63]

Der Verlust der Methinbrücke erweist sich für die weitere Synthese des (10-¹³C)-Biliverdin IX α (**62**) als günstig, da mit den erhaltenen Molekülhälften direkt weiter gearbeitet werden kann. Der benötigte ¹³C-Baustein, bei dem es sich um die fehlende Methinbrücke handelt, kann durch Formylierung der AB-Hälfte (**64**) mittels Triethylortho-formiat und Trifluoressigsäure wieder ins Molekül eingebracht werden kann.

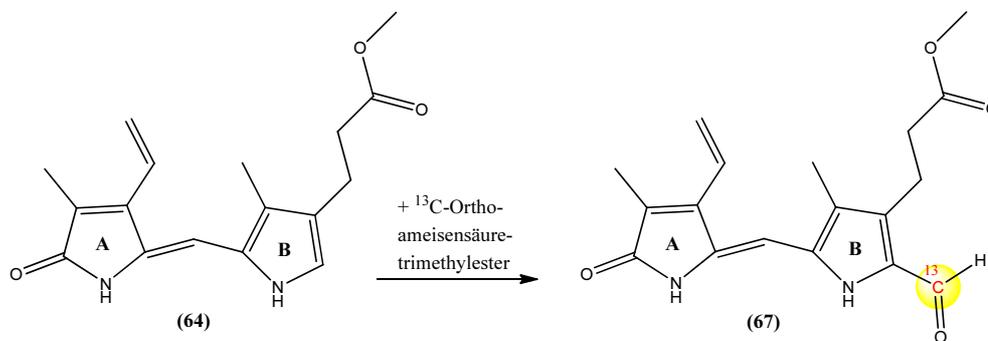


Abb. 40: Formylierung der AB-Hälfte (BV) (**64**) mit ¹³C-Baustein^[70,82]

Die Kupplung der formylierten AB-Hälfte (**67**) mit der CD-Hälfte (**65**) an der freien α -Position der CD-Hälfte (**65**) kann nun durch abgewandelte Vielsmeyer-Reaktion erfolgen.

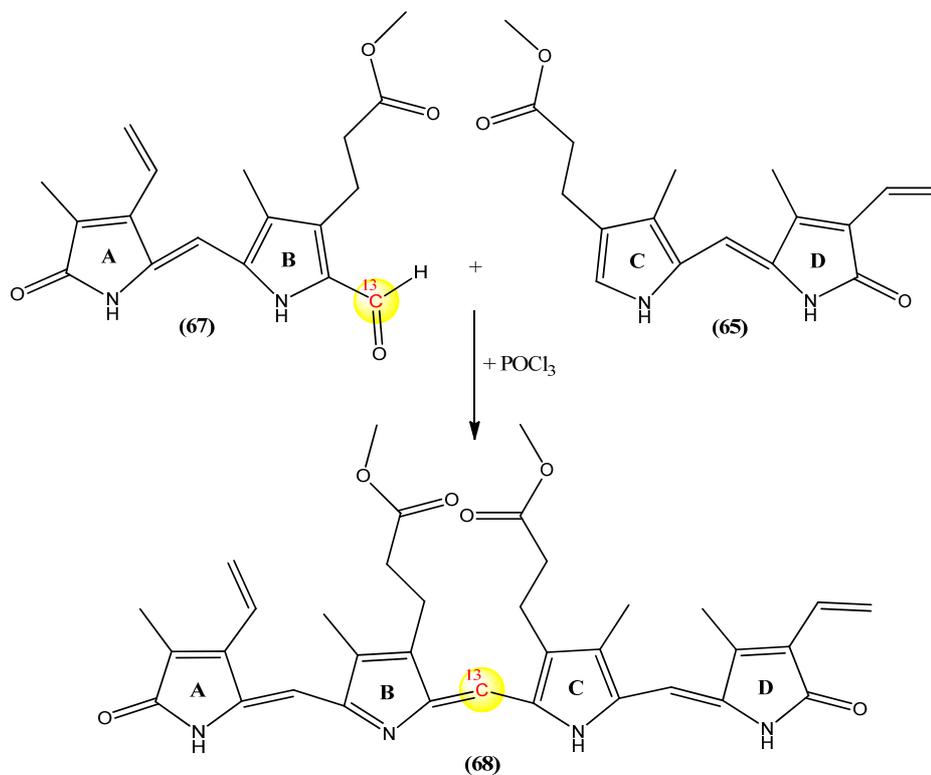


Abb. 41: Kupplung zum (10-¹³C)-Biliverdindimethylester (**68**)

Um das Tetrapyrrol in ein Apoprotein einbauen zu können, werden die beiden Methylesterschutzgruppen der Propionsäurereste, wie bereits oben beschrieben, durch säurekatalysierte Hydrolyse an einem sauren Ionenaustauscherharz entfernt^[64,70] (siehe Abb. 42).

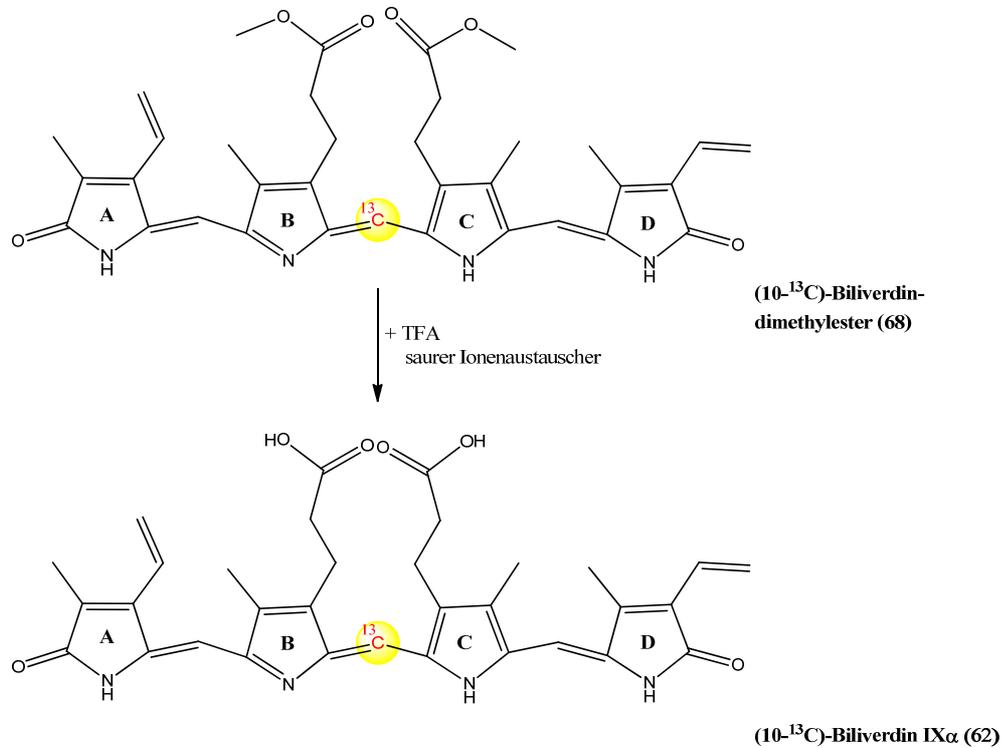


Abb. 42: Acidolyse von (10-¹³C)-Biliverdindimethylester (68)^[70]

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Synthese der Phycocyanobiline

4.1.1 Synthese des A-Rings (5)

Die Synthese des A-Rings (**5**) erfolgt ausgehend von Citraconsäureanhydrid, das nach dem Austausch des Anhydrid-Sauerstoffs gegen Stickstoff schon die passende Pyrrolstruktur besitzt. Der Austausch des Sauerstoff erfolgt durch einen Addition-Eliminierungs-Mechanismus (vgl. Abb. 43) Dazu wird eine der beiden Carbonylgruppen des Anhydrids durch 4-Methoxybenzylamin nucleophil angegriffen, wobei sich der Fünfring öffnet. Der anschließende zweite nucleophile Angriff des 4-Methoxybenzylamins führt zum Ringschluss unter Abspaltung eines Hydroxids und somit zum gewünschten 1-(4-Methoxybenzyl)-3-methylpyrrol-2,5-dion (**7**). Die in der Literatur beschriebene Ausbeute von 100%^[64] konnten ebenfalls erzielt werden, was die Synthese der nachfolgenden Stufen erheblich vereinfacht.

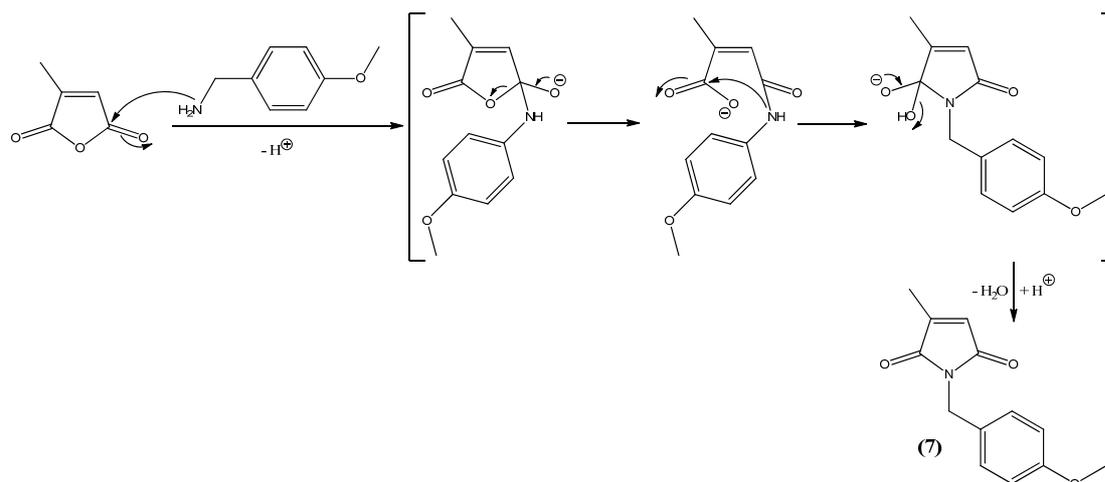


Abb. 43: Additions-Eliminierungs-Mechanismus der 1-(4-Methoxybenzyl)-3-methylpyrrol-2,5-dions (**7**)

Das Substitutionsmuster des späteren A-Rings (**5**) erfordert nun die Einführung der Ethylidengruppe an der unsubstituierten Position C4 der Pyrrolrings. Dazu wird das 1-(4-Methoxybenzyl)-3-methylpyrrol-2,5-dion (**7**) mit Nitroethan umgesetzt. Bei dem Mechanismus dieser Reaktion handelt es sich um die sogenannte Michael-Addition (vgl. Abb. 44). Dabei wird das Nitroethan zuerst von der zugesetzten Base 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en an der α -Position deprotoniert, das freie Elektronenpaar greift dann nucleophil das α,β -ungesättigte 1-(4-Methoxybenzyl)-3-methylpyrrol-2,5-dion (**7**) an der unsubstituierten Position C4 im Ring an. Nach der Abspaltung von salpetriger Säure kann sich die benötigte Doppelbindung zwischen C4 und C4¹

ausbilden. Die Reaktion verläuft nicht enantioselektiv, daher wird als Rohprodukt das E/Z-Isomerengemisch erhalten. Für die weitere Darstellung zum PCB (**3**) ist allerdings nur das E-Isomer des 3-Ethyliden-1-(4-methoxybenzyl)-4-methylpyrrolidin-2,5-dions geeignet (**8**), weshalb das Z-Isomer vor der weiteren Umsetzung mittels HPLC abgetrennt wird. Die Ausbeute konnte durch den Gebrauch der HPLC anstatt der MPLC von 9.1%^[64] auf 20% erhöht werden, allerdings wurde nicht wie in der Literatur beschrieben Kristallisation beobachtet, das Produkt wurde stattdessen in Form eines hoch viskosen Öls erhalten.

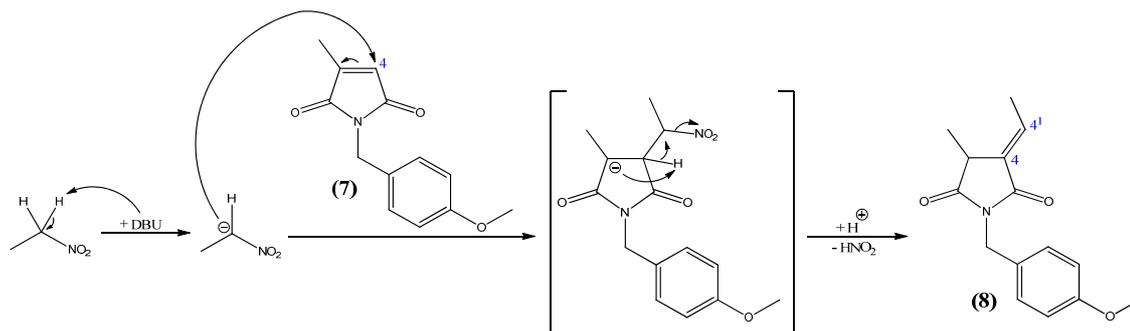


Abb. 44: Mechanismus der Michael-Addition von Nitroethan an 1-(4-Methoxybenzyl)-3-methylpyrrolidin-2,5-dion (**7**)

Die Schutzgruppe des Stickstoffs wird im nächsten Schritt durch Oxidation mit Ammoniumcer(IV)-nitrat (CAN) entfernt (vgl. Abb. 45). Dazu wird Wasser an die Methylengruppe angelagert und unter Ausbildung des Alkohols und gleichzeitiger Reduktion der Ce^{4+} -Ionen zu Ce^{3+} die Schutzgruppe nach Weiterreaktion als 4-Methoxybenzaldehyd abgespalten und der Stickstoff des Pyrrolrings protoniert. Das erhaltene Produkt ((E)-3-Ethyliden-4-methylpyrrolidin-2,5-dion (**9**)) entspricht schon dem Substitutionsmuster des A-Rings (**5**) im PCB (**3**), jedoch muss zur Kupplung mit dem B-Ring (**17**) die Carbonylgruppe an Position C2 in die Thiovariante überführt werden. Die Ausbeuten der Reaktion entsprachen mit 41% den Angaben der Literatur^[64].

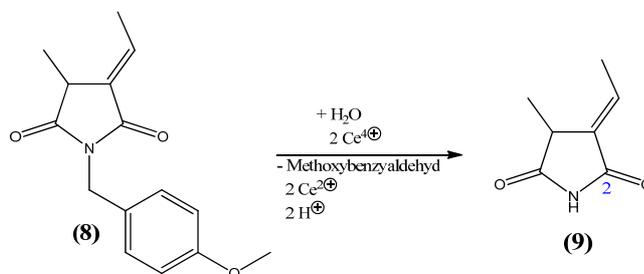


Abb. 45: Mechanismus der Darstellung von (E)-3-Ethyliden-4-methylpyrrolidin-2,5-dions (**9**)

Das (E)-3-Ethyliden-4-methylpyrrolidin-2,5-dion (**9**) wird dazu mit Lawesson-Reagenz (2,2-Bis-(4-methoxy-phenyl)-1,3,2,4-dithiadiphosphetan-2,4-disulfid) (**6**) umgesetzt. Lawesson-Reagenz (**6**) bietet sich für die Reaktion besonders an, da für diese Reaktion ein regioselektiver Angriff an der C2-Carbonylfunktion beobachtet wurde^[61,68]. Das Reagenz liegt in Lösung in einem Gleichgewicht mit zwei hoch reaktiven Dithiophosphin-Yliden vor, der Phosphor des Ylids kann dann elektrophil den Carbonylsauerstoff angreifen, wobei ein Thioxaphosphetan als Zwischenprodukt gebildet wird. In einer Wittig-analogen Reaktion zerfällt anschließend das Zwischenprodukt unter Bildung einer cyclischen Zwischenstufe in das Thioketon und Ylid (**17**)^[3,86-90]. Die Triebkraft des Sauerstoff-Schwefel-Austauschs ist in der höheren Bindungsaffinität des Phosphors zu Sauerstoff als zu Schwefel begründet. Es bildet sich also das thermodynamisch stabilere Produkt (vgl. Abb. 46).

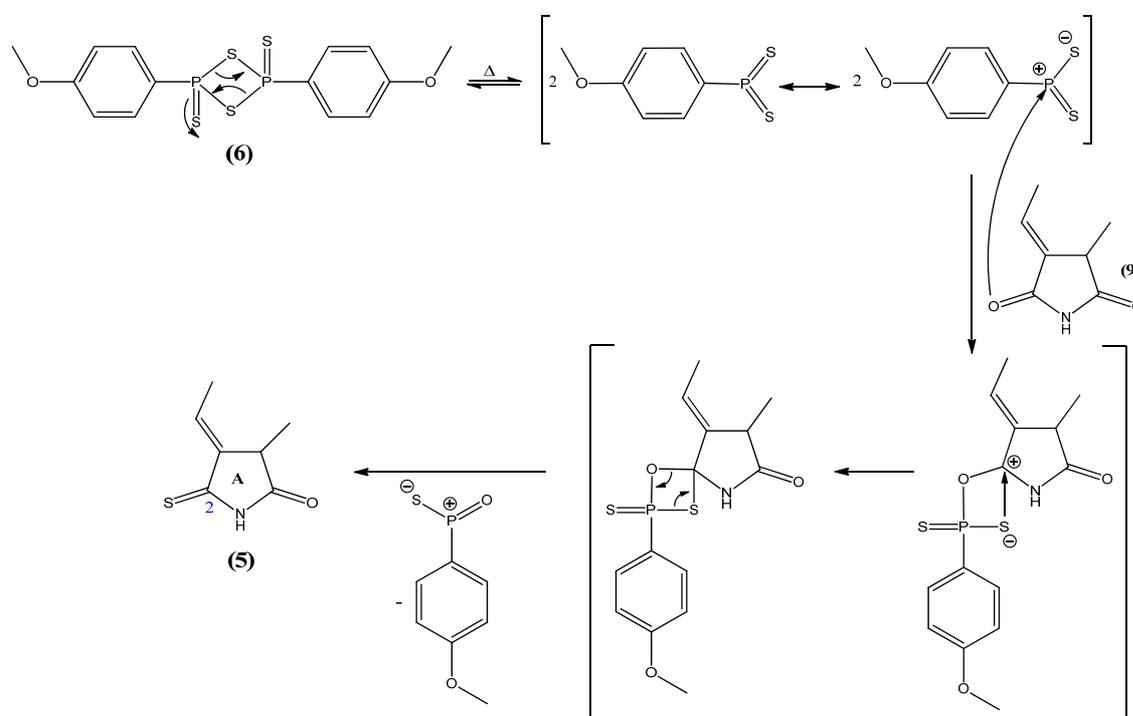


Abb. 46: Mechanismus der Thionylierung der Carbonylfunktion des A-Rings (**5**)^[3]

4.1.2 Synthese der B/C-Vorstufe (**10**)

Die spiegelbildliche Symmetrie der Ringe B und C ermöglicht, wie in Abschnitt 3.1.1.2 beschrieben, die Synthese der beiden Ringe über eine gemeinsame Vorstufe. Diese Vorstufe wird (siehe oben) aus zwei Molekülhälften zusammengesetzt, 4-Acetoxy-5-nitrohexansäuremethylester (**11**) und aus Isocyanoessigsäure-*tert*-butylester (**16**). Zur Einführung der schweren Isotope ¹⁵N- und ¹³C müssen allerdings auch hier die Synthesewege zu den beiden Molekülhälften an den Ausgangsstoff angepasst werden.

4.1.2.1 Synthese von 4-Acetoxy-5-nitrohexansäuremethylester (11)

Die Synthese des 4-Acetoxy-5-nitrohexansäuremethylesters (**11**) erfolgt ausgehend von Acrylsäuremethylester und Nitromethan. Das Nitromethan wird dazu durch eine Base deprotoniert. Das Carbanion greift dann in einer Michael-artigen Reaktion den α,β -ungesättigten Acrylsäuremethylester in γ -Position nucleophil an. Nach der nachfolgenden Reorganisation der π -Elektronen und Protonierung des β -Kohlenstoffatoms wird der gewünschte 4-Nitrobutansäuremethylester (**12**) als Produkt erhalten (vgl. Abb. 47). Zur Abtrennung der nicht umgesetzten Edukte wird das Rohprodukt anschließend im Ölpumpenvakuum destilliert und in guten Ausbeuten von 75% (Lit. 33 %^[76]) isoliert.

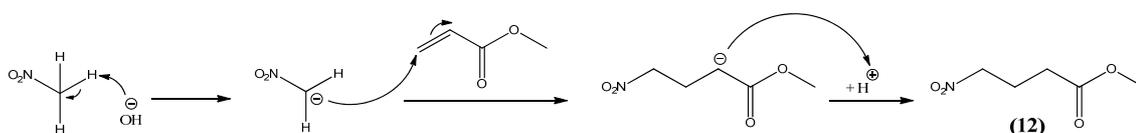


Abb. 47: Mechanismus der Synthese von 4-Nitrobutansäuremethylester (**12**)

Der 4-Nitrobutansäuremethylester (**12**) wird mittels abgewandelter Nef-Reaktion in das Acetal überführt. Dazu wird das α -Kohlenstoffatom mittels Natriummethanolat deprotoniert. Das erhaltene Nitronat wird anschließend an beiden Sauerstoffatomen protoniert und bietet nun die Voraussetzungen für den nucleophilen Angriff von Methanol an das α -Kohlenstoffatom, wo durch sich das Halbacetal bildet. Nach Wasserabspaltung und Abspaltung von Nitrosowasserstoff, wird das mesomeriestabilisierte Carbeniumion von einem zweiten Alkoholmolekül nucleophil angegriffen. Die Deprotonierung des Sauerstoffs ergibt dann schließlich das Acetal (4,4-Dimethoxybutansäuremethylester (**13**)) (vgl. Abb. 48)^[91]. Die Ausbeute beträgt bei dieser Reaktion 60%.

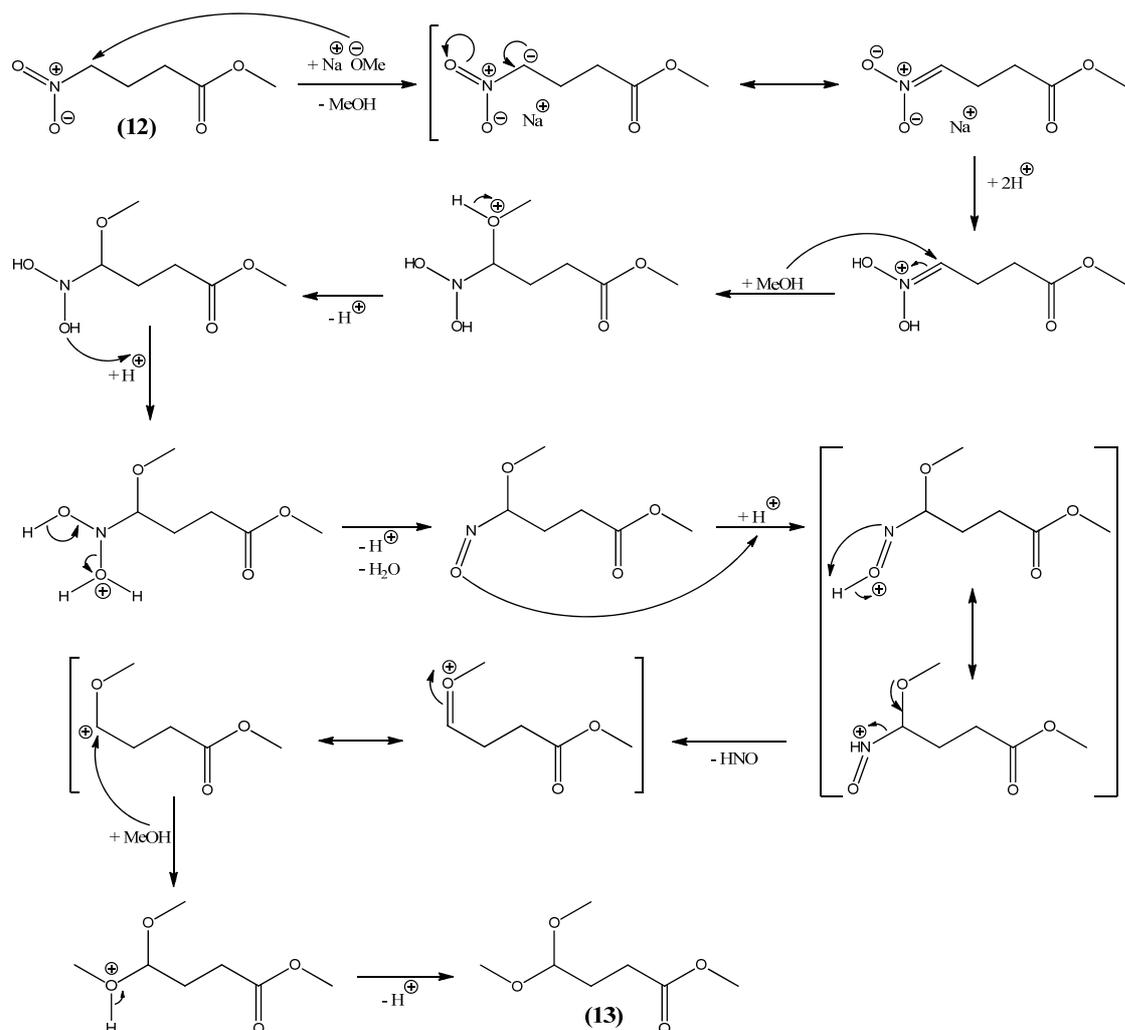


Abb. 48: Mechanismus der abgewandelten Nef-Reaktion zur Synthese des 4,4-Dimethoxybutansäuremethylesters (13)^[91]

Das Kohlenstoffgerüst des 4,4-Dimethoxybutansäuremethylesters (13) muss für die Kupplung mit der zweiten Molekülhälfte um einen C2-Baustein verlängert werden und gleichzeitig für den Ringschluss aktiviert werden. Eine gute Möglichkeit, diese beiden Voraussetzungen gleichzeitig zu erfüllen bietet die sogenannte Henry-Reaktion (bzw. Nitroaldol-Reaktion), bei der zwischen einem Nitroalkan und einem Aldehyd oder Keton basenkatalysiert eine C-C-Bindung geknüpft wird. Dazu wird das Acetal durch Hydrolyse in acetonhaltiger wässrig-saurer Lösung in den Aldehyd überführt (vgl. Abb. 49). Der Aldehyd kann in guten Ausbeuten von 98% dargestellt werden. Allerdings erweist sich die Konzentration der Salzsäure als ausschlaggebend für die Verlagerung des Gleichgewichts zwischen Acetal und Aldehyd. So führen Reaktionen mit um 20% geringerer Salzsäurekonzentration im Vergleich zu den Versuchsbedingungen mit 98% Ausbeute lediglich zu 20% Ausbeute. Ein geringer Umsatz zum Aldehyd erfordert das

Abdestillieren des Eduktes, was zu weiteren Einbußen bezüglich der Ausbeute durch Zersetzungen in der Siedehitze führt.

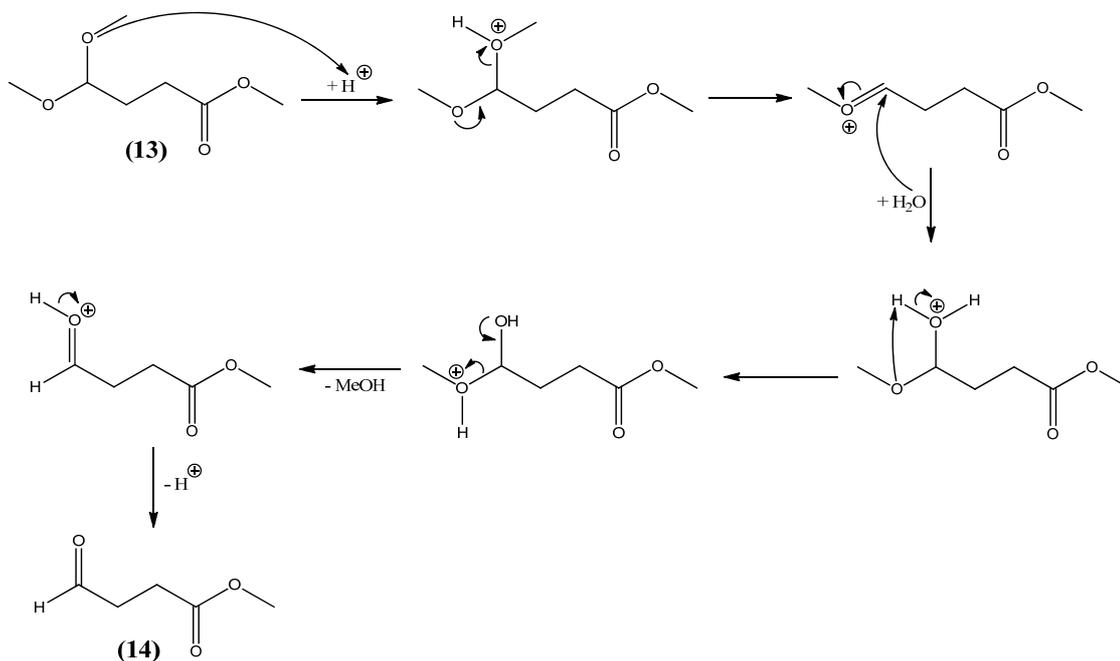


Abb. 49: Mechanismus der Acetalhydrolyse

Für die anschließende Nitroaldol-Reaktion wird Nitroethan an der α -Position durch die Base 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) deprotoniert. Das mesomeriestabilisierte Carbanion kann daraufhin die Carbonylfunktion des Aldehyds nucleophil angreifen und nach Protonierung des Aldehyd-Sauerstoffatoms wird der 4-Hydroxy-5-nitrohexansäuremethylester als Produkt erhalten. Das Produkt wird allerdings nicht isoliert, um unnötige Ausbeuteverluste zu vermeiden, sondern unter Zugabe von Essigsäureanhydrid in einer „Ein-Topf“-Reaktion zum 4-Acetoxy-5-nitrohexansäuremethylester (69) acyliert. Dafür wird die Hydroxyfunktion durch DMAP wieder deprotoniert. Der negativ geladene Sauerstoff greift dann nucleophil das Kohlenstoffatom einer der beiden Carbonylfunktionen des Essigsäureanhydrids an. Unter Abspaltung von Essigsäure wird das Produkt freigesetzt. Die Reaktion verläuft mit mäßigen Ausbeuten von 20% (Lit. 56%), allerdings erfolgt bei der Reinigung des Rohproduktes teilweise Zersetzung auf dem Säulenmaterial. Die Zersetzung kann anhand der Gelbfärbung des Säulenmaterials gut erkannt werden.

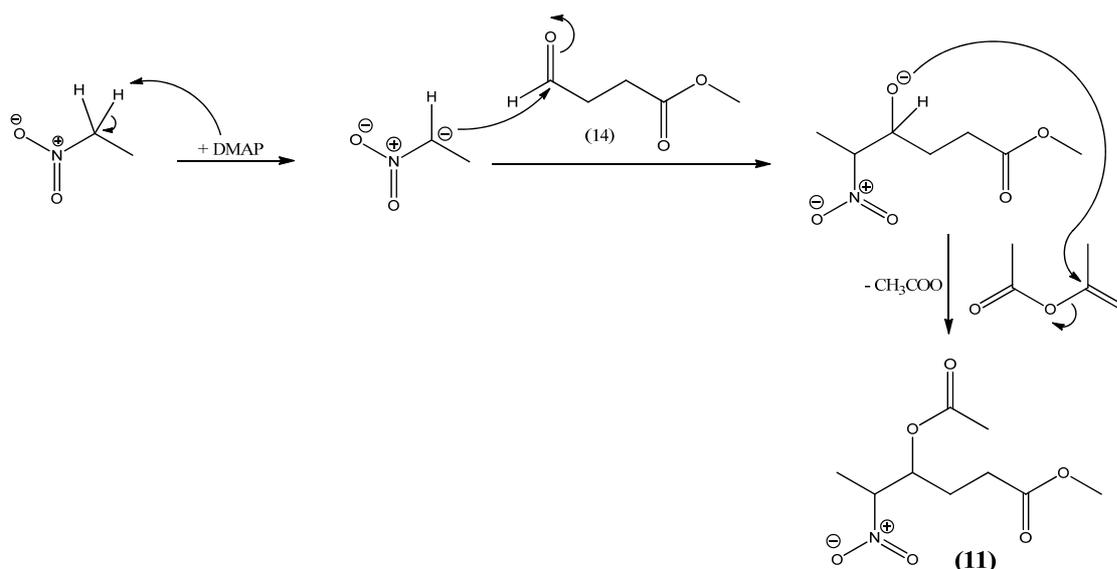


Abb. 50: Mechanismus der Henry-Reaktion zur Synthese des 4-Acetoxy-5-nitrohexensäuremethylesters (11)

4.1.2.2 Synthese von (1- ^{13}C)-4,4-Dimethoxybutyronitril (37)^[80]

Die Darstellung des (^{12}C - ^{13}C)-Phycocyanobilins (36) erfordert die Entwicklung einer im Vergleich zum Syntheseweg der unmarkierten Substanz alternativen Reaktionsfolge. Der neue Reaktionsweg sollte die Synthese verkürzen und sollte Reaktionen beinhalten, die eine möglichst hohe Ausbeute liefern, um Ausbeuteverluste möglichst gering zu halten. Zudem sollte die Ausgangssubstanz mit der geeigneten ^{13}C -Markierung zu einem akzeptablen Preis käuflich zu erwerben sein.

Zu diesem Zweck wurde die in Abschnitt 3.1.3 vorgestellte Reaktionsfolge entwickelt. Der Syntheseweg basiert auf (^{13}C)-Natriumcyanid als ^{13}C -Baustein. Durch Verlängerung des Kohlenstoffgerüsts von 3-Brompropionaldehyddimethylacetal wird (1- ^{13}C)-4,4-Dimethoxybutyronitril (37) dargestellt. Die Reaktion verläuft über einen $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus, in dem das Bromid durch Cyanid ersetzt wird. Die Reaktion verläuft mit 46% Ausbeute bezüglich des eingesetzten ^{13}C -Bausteins und erfüllt somit optimal alle Anforderungen des neuen Synthesewegs.

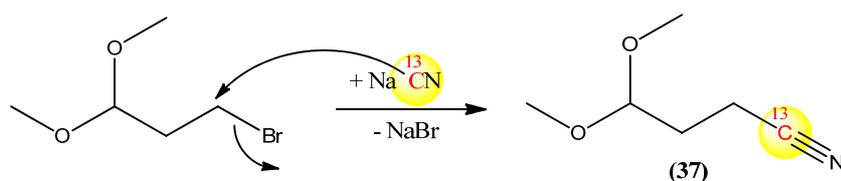


Abb. 51: Mechanismus der Synthese von (1- ^{13}C)-4,4-Dimethoxybutyronitril (37)

4.1.2.3 Synthese von (1-¹³C)-4,4-Dimethoxybutansäure (38)

Im nächsten Schritt wird das (1-¹³C)-4,4-Dimethoxybutyronitril (37) mit Hilfe von Kaliumhydroxid zum Kaliumsalz der Säure verseift. Diese Reaktion verläuft in sehr guter Ausbeute mit 100%. Das (1-¹³C)-4,4-Dimethoxybutansäure (38) wird dann säurekatalysiert zum Methylester umgesetzt. Von dieser Stufe aus kann dem in der Arbeitsgruppe etablierten Syntheseweg für den C-Ring und später für das Tetrapyrrol gefolgt werden. Die Synthese wird hier unterbrochen, weil das Acetal bessere Lagerungseigenschaften verspricht als der Aldehyd.

4.1.2.4 Synthese des Isocyanoessigsäure-*tert*-butylesters (16)

Die Darstellung der zweiten Molekülhälfte der B/C-Vorstufe (10) erfolgt über zwei Stufen: zunächst wird *N*-Formylglycin-*tert*-butylester (15) aus Formamid und Chloressigsäure-*tert*-butylester gewonnen und dann mittels Phosphorylchlorid zum Isocyanoessigsäure-*tert*-butylester (16) dehydratisiert (vgl. Abb. 52). Zur Darstellung des *N*-Formylglycin-*tert*-butylesters (15) wird zunächst das Formamid durch Natriummethanolat deprotoniert. Dann greift der Stickstoff das α -Kohlenstoffatom nucleophil an, wobei Chlorid abgespalten und das erste Produkt erhalten wird. Im nächsten Schritt greift die Carbonylgruppe das Phosphoratom des Phosphorylchlorids nucleophil an und ein Chloridion wird abgespalten. Die entstehende Salzsäure wird durch zugesetztes Triethylamin abgefangen. Nach der Abspaltung von HPO_2Cl_2 wird der Isocyanoessigsäure-*tert*-butylester (16) als Produkt erhalten. Die erfolgreiche Synthese des Produkts äußert sich dabei in einem speziellen für die Isonitrile typischen unangenehmen Geruch. Die Reaktion verlief in guten Ausbeuten von bis zu 95% (Lit. 78%).

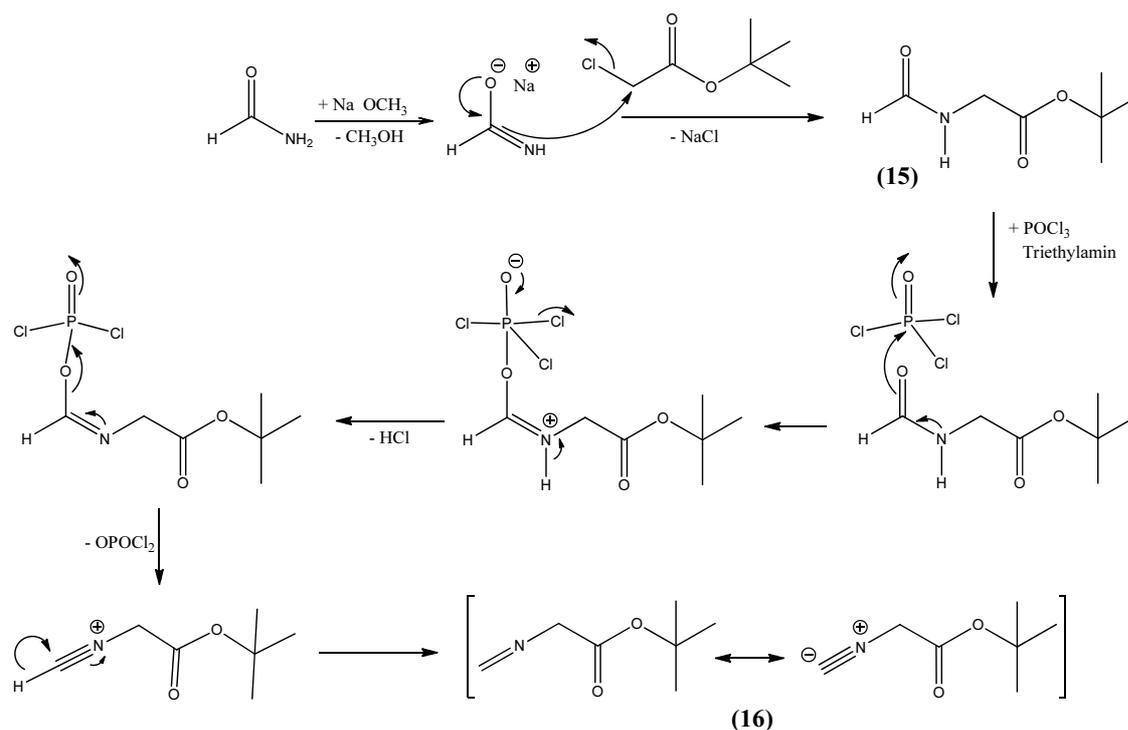


Abb. 52: Mechanismus der Isonitrilsynthese ausgehend von Formamid und Chloressigsäure-*tert*-butylester

4.1.2.5 Synthese des ¹⁵N-Isocyanoessigsäuremethylesters (31)

Der Stickstoff des C-Rings stammt, wie in Kapitel 3.1.1.2 beschrieben, aus dem Isocyanoessigsäure-*tert*-butylester (16), daher musste bei der Syntheseplanung auf eine kostengünstige Zugänglichkeit des Markierungsreagenz geachtet werden.

Formamid kann als primäre Edukt und „Stickstoffquelle“ ¹⁵N-markiert bezogen werden. Allerdings dient es in der verbreiteten Versuchsgestaltung nicht nur als Reagenz, sondern auch als Solvens, was zu erheblichen Kosten beim Einsatz des schweren Isotops führen würde. Versuche die Reaktion mit equimolaren Mengen von Formaldehyd und dem zweiten Reagenz, Chloressigsäure-*tert*-butylester, durchzuführen ergaben nur das Nebenprodukt, bei dem zusätzlich der *tert*-Butylrest durch die bei der Reaktion entstandene Salzsäure abgespalten wurde. Auch eine Variation der Versuchsbedingungen, wie Abänderung der relativen Natriummethanolatkonzentrationen, sehr gute Trocknung des Natriummethanolats und gute Kühlung der eigentlichen Reaktion, erzielten nicht das gewünschte Ergebnis.

Aus diesem Grund wurde ein alternativer Reaktionsweg mit einer anderen Ausgangssubstanz erarbeitet. Zunächst wurde der in der Literatur beschriebene Syntheseweg nach Dawadi^[92] zur Darstellung von (¹⁵N)-3-Cyano-4-methyl-1*H*-pyrrol auf seine Eignung zur Darstellung des ¹⁵N-markierten C-Rings überprüft, allerdings

wurden nicht die in der Literatur erzielten Ausbeuten erlangt, so dass nach einem neuen Darstellungsweg gesucht wurde.

Die neu ausgearbeitete Synthese beginnt mit ^{15}N -markiertem Glycin, das käuflich erworben werden kann. Zur Optimierung der einzelnen Versuche und damit der Ausbeute wird die Versuchsfolge zuerst mit der unmarkierten Substanz ausgeführt.

Die Synthese des ^{15}N -Isocyanoessigsäuremethylester (**31**) beginnt, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, mit der Veresterung von ^{15}N -Glycin. Die Veresterung erfolgt säurekatalysiert durch Sulfurylchlorid. Der Mechanismus der Veresterung ist eine Folge von Gleichgewichtsreaktionen. Nach Protonierung der Carboxyfunktion greift das Sauerstoffatom des Methanols diese nucleophil an. Die anschließende Deprotonierung des Methanols führt zum Orthocarbonsäuremonoester, der nach Protonierung, Wasserabspaltung und Deprotonierung in die Esterfunktion übergeht. Die Umsetzung verläuft quantitativ, weshalb sie sich für die Arbeiten mit ^{15}N -markierten Substanzen besonders eignet.

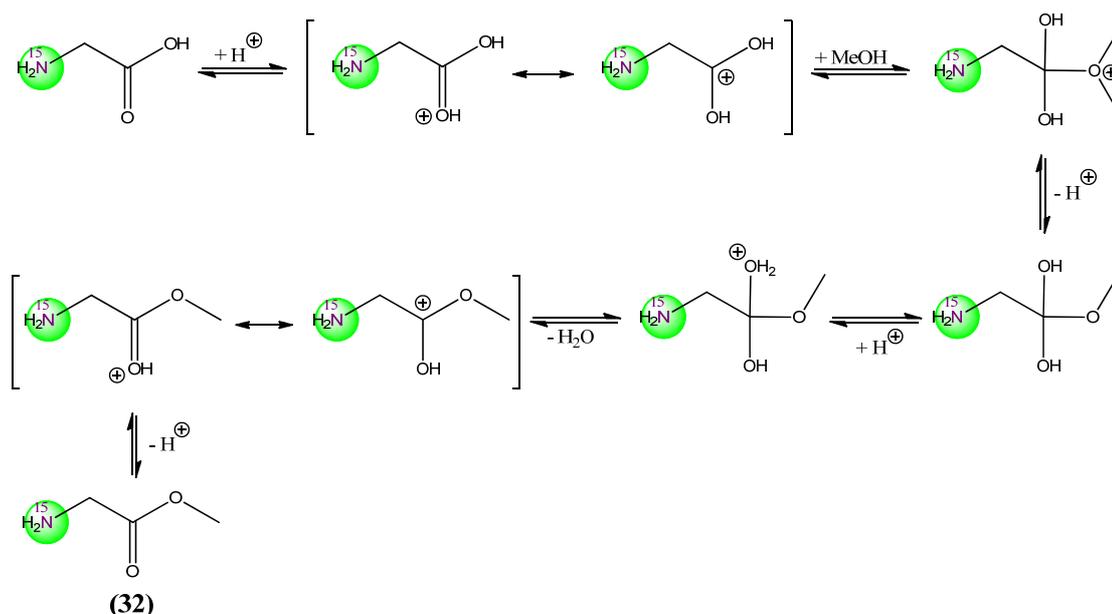


Abb. 53: Mechanismus der Veresterung von ^{15}N -Glycin

Im nächsten Schritt wird die Aminogruppe durch Reaktion mit Ameisensäure formyliert^[79]. Der genaue Mechanismus der Reaktion ist zurzeit noch nicht bekannt. Die Ausbeuten dieser Reaktion waren, wie in der Literatur (86% für den Ethylester^[79]) beschrieben, mit 98% nahezu quantitativ, was für die weitere Umsetzung der ^{15}N -markierten Substanz sehr günstig ist.

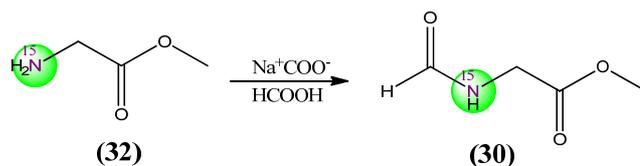


Abb. 54: Formylierung von ^{15}N -Glycinmethylester (32)

4.1.2.6 Ringschluss zur B/C-Vorstufe (10)

Nachdem beide Moleküle nun zur Verfügung stehen, wird der Ringschluss durch die Base 1,1,3,3-Tetramethylguanidin (TMG) induziert. Das TMG deprotoniert die Methylengruppe des Isocyanoessigsäure-*tert*-butylesters (16) und das α -Kohlenstoffatom der Nitrogruppe des 4-Acetoxy-5-nitrohexansäuremethylesters (11), wobei sich durch Austritt der Acetoxygruppe ein Nitroolefin bildet. Daraufhin greift das mesomeriestabilisierte Carbanion das zur Nitrogruppe β -ständige, olefinische Kohlenstoffatom nucleophil an. Das entstandene zur Nitrogruppe α -ständige Carbanion greift anschließend die Isonitrilgruppe am Kohlenstoffatom nucleophil an. Der geschlossene Ring wird protoniert und die Nitrogruppe über einen postulierten E1cB-Mechanismus abgespalten^[69]. Die sigmatrope 1,5-Umlagerung des Protons von C3 zum Stickstoff schließt die Bildung des 3-(2-Methoxycarbonyl-ethyl)-4-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure-*tert*-butylesters (10) ab (vgl. Abb. 55).

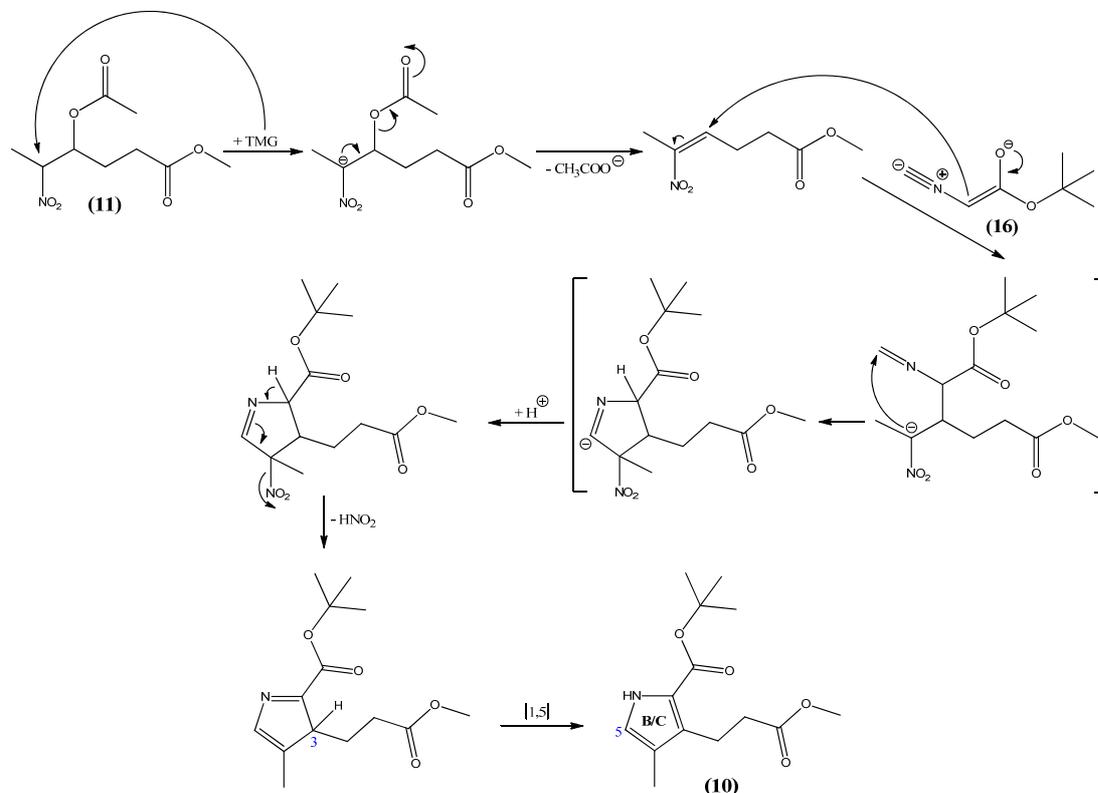


Abb. 55: Mechanismus des Ringschlusses zur B/C-Vorstufe (10)^[69]

Die erfolgreiche Synthese des dreifachsubstituierten Pyrrols ist leicht an dem im Vergleich zu den Vorstufen deutlich unterschiedlichen NMR-Spektren ersichtlich. Die beiden CH₂-Gruppen des entstandenen Propionsäurerestes bleiben auch bei der weiteren Synthese als zwei benachbarte Triplets zwischen 2.5 ppm und 3.0 ppm konserviert. Außerdem ist das neuentstandene Signal bei 8.7 ppm, das vom pyrrolischen Stickstoff resultiert, zusammen mit dem Auftreten eines Dupletts bei 6.6 ppm, das von dem aromatischen Proton der Position C5 herrührt, für die erfolgreiche Synthese des 3-(2-Methoxycarbonylethyl)-4-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure-*tert*-butylesters (**10**) charakteristisch (vgl. Abb. 103). Die von Barton *et al.* beschriebene Ausbeute von 90%^[69] konnte trotz hoher Reinheit der Edukte nicht erreicht werden (56%). Zu beobachten war jedoch ein Rückgang der Ausbeute bei längerem Erwärmen (34°C) der Reaktionslösung unter Entfernung des Lösungsmittels unter Vakuum.

4.1.2.7 Ringschluss zur ¹⁵N-markierten B/C-Vorstufe (29)

Die Umsetzung des ¹⁵N-Formylglycinmethylester (**30**) mit der zweiten Molekülhälfte erfolgt nach dem in Abb. 52 beschriebenen Mechanismus. Durch die ¹⁵N-Markierung des Pyrrolstickstoffs, der die Spinquantenzahl $S = \frac{1}{2}$ besitzt, führt zur Aufspaltung des ¹H-NMR-Signals des Stickstoffs. Die beiden Singulets zeigen eine Aufspaltung von 98 Hz. Im Vergleich zur unmarkierten B/C-Vorstufe (**10**), ist, wie zu erwarten war, das ¹H-NMR-Signal der *tert*-Butylschutzgruppe der *tert*-Butyloxycarbonylgruppe an Position C2 bei 1.5 ppm durch das einer Methoxygruppe bei 3.8 ppm ersetzt. Ansonsten zeigt das ¹H-NMR-Spektrum die für das dreifach substituierte Pyrrol typischen Signale (siehe voriger Abschnitt). Die Ausbeute dieser Reaktion erweist sich mit 55% bezüglich des eingesetzten Isonitrils (**31**) als deutlich höher als für den unmarkierten Ring in der jüngeren Literatur (34%)^[64] beschrieben.

4.1.3 Synthese des B-Rings (17)

Die Darstellung des B-Rings (**17**) erfordert zuerst die Synthese des Glyoxylsäurebenzylesters (**18**) als Schutzgruppe. Der dazu benötigte Weinsäuredibenzylester (**19**) wird durch Veresterung von D-(-)-Weinsäure mit Benzylalkohol mit einer Ausbeute von 98% (Lit. 84%^[64]) gewonnen und dann mittels Periodsäure gespalten. Der Mechanismus der Weinsäuredibenzylester-Spaltung entspricht dem einer 1,2-Diol-Spaltung. Unter Abspaltung von Wasser wird vermutlich ein Fünfring zwischen der Periodsäure und den Hydroxygruppen gebildet, der dann unter Abspaltung von Iodsäure und Spaltung der C-C-Bindung wieder zerfällt. Der

genaue Oxidationsmechanismus ist noch ungeklärt. Als Produkt wird die fertige Schutzgruppe des B-Rings erhalten (vgl. Abb. 56).

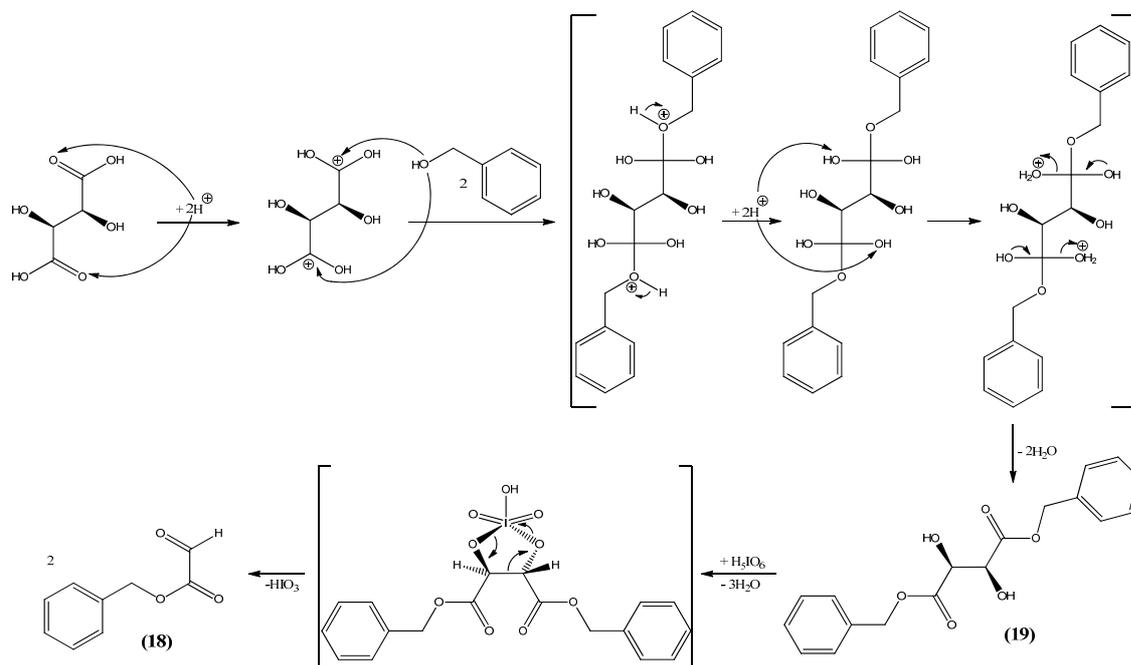


Abb. 56: Mechanismus der Darstellung von Glyoxylsäurebenzylester (**18**) durch Veresterung von D-(-)-Weinsäure und anschließende Spaltung des Esters mittels Periodsäure

Die Funktionalisierung der B/C-Vorstufe kann nun durch Aktivierung des Glyoxylsäurebenzylesters (**18**) erfolgen. Zinkchlorid wird dazu an den Sauerstoff der Carbonylfunktion gebunden, dadurch wird ein elektrophiler Angriff des positiv geladenen Carbonyl-Kohlenstoffatoms auf das aromatische System des Pyrrolrings an Position C5 möglich. Abspaltung von Zinkchlorid und Deprotonierung des Pyrrolrings an Position C4 stellt das aromatische System des Rings wieder her und schließt so die Synthese des 3-[5-((Benzylcarbonyl)hydroximethyl)-2-(*tert*-butoxycarbonyl)-4-methylpyrrol-3-yl]-propion-säuremethylesters (**20**) ab (vgl. Abb. 57).

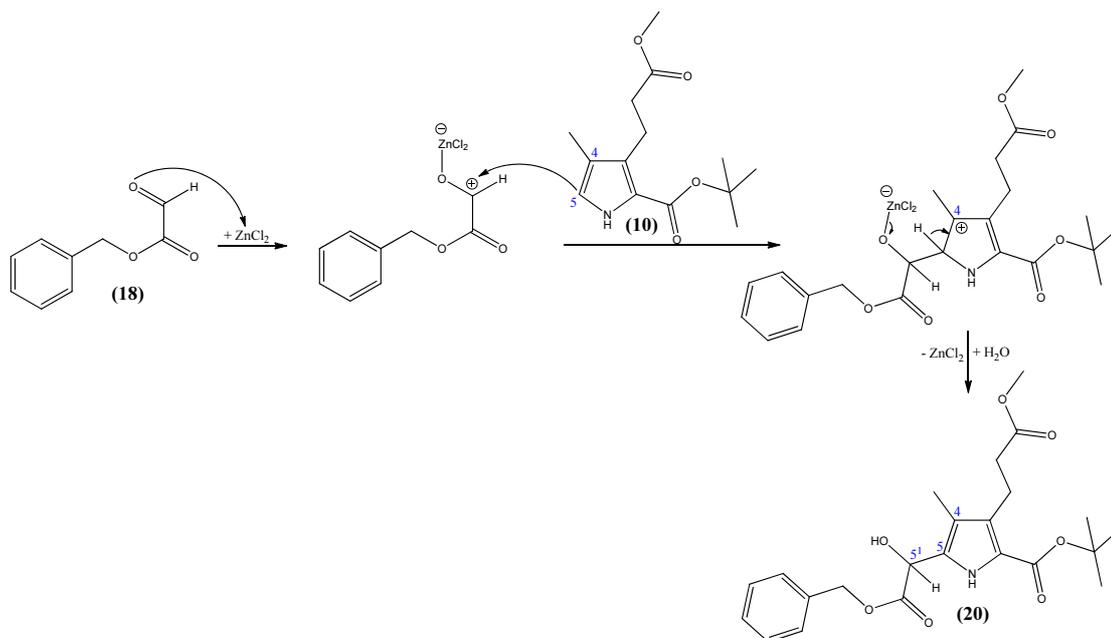


Abb. 57: Mechanismus der elektrophilen aromatischen Substitution (S_EAr) von Glyoxylsäurebenzylester (18) mit der B/C-Vorstufe (10)

Das Entstehen des Produkts äußert sich im ¹H-NMR-Spektrum besonders deutlich im Ausbleiben des Dubletts bei 6.6 ppm der ehemals unsubstituierten α-Position. Zudem erscheint das Signal des Aldehyds der Schutzgruppe nicht mehr im Spektrum, an seiner Stelle tritt ein neues Signal bei 5.1 ppm auf, das durch das 5¹-ständige Proton hervorgerufen wird. Die Hydroxygruppe an 5¹ erzeugt ein breites Signal bei 3.5 ppm, das zumeist vom Signal des Methylesters überlagert wird.

Für die spätere Kupplung zwischen A- und B-Ring muss die Hydroxyfunktion an Position-5¹ in das Ylid (17) überführt werden. Dies geschieht über das 5¹-Chlorid als Zwischenstufe. *N*-Chlorsuccinimid (NCS) bildet im ersten Schritt einen Komplex mit Dimethylsulfid, das Schwefelatom ist dabei an das Stickstoffatom des *N*-Chlorsuccinimids gebunden. Der positiv polarisierte Schwefel kann nun von den π-Elektronen des Hydroxysauerstoffs angegriffen werden, wobei Succinimid abgespalten wird. Der nucleophile Angriff von Chlorid auf das 5¹-Kohlenstoffatom erfolgt unter Abspaltung von Dimethylsulfoxid. Das Chlorid ist in der Literatur als nicht isolierbar beschrieben, daher wird auf die Isolierung des Chlorids verzichtet und es in einer „Ein-Topf“-Reaktion durch nucleophile Substitution mit Triphenylphosphin in das für die anschließende Thio-Wittig-Reaktion erforderliche Ylid (17) überführt (vgl. Abb. 58). Der B-Ring (17) ist nun für die Kupplung mit dem A-Ring (5) aktiviert.

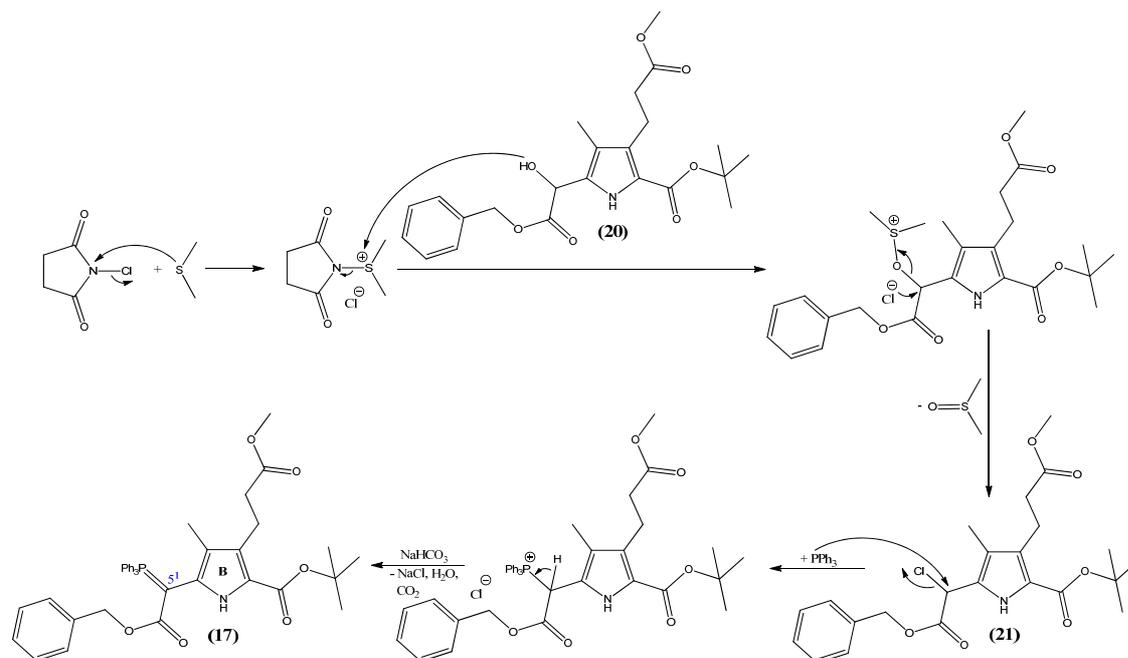


Abb. 58: Mechanismus der Ylid-Darstellung

Das ¹H-NMR-Spektrum des Produktes zeichnet sich durch das intensive Signal der aromatischen Protonen der drei Phenylringe des Phosphors aus. Das Fehlen des Singulets von 5¹ ist ein gutes Indiz für die erfolgreiche Kupplung der beiden Moleküle.

4.1.4 Synthese des C-Rings

4.1.4.1 Unmarkierter C-Ring (22)

Die Funktionalisierung der B/C-Vorstufe (10) zum C-Ring (22) erfordert die Einführung einer Formylgruppe in das α -unsubstituierte Pyrrol, die die spätere Methinbrücke zwischen C- und D-Ring ergibt und zugleich auch die reaktive Gruppe, die den Angriff auf die unsubstituierte Position im D-Ring (26) ermöglicht. Wie bei einer Vilsmeier-Reaktion üblich, wird das Formylierungsreagenz aus der Reaktion von Dimethylformamid und Phosphorylchlorid gewonnen. Das mesomeriestabilisierte Carbenium-Ion greift dann den α -unsubstituierten Pyrrolbaustein elektrophil an. Aus dem Zwischenprodukt wird anschließend durch Hydrolyse der gewünschte Aldehyd und Dimethylaminhydrochlorid freigesetzt (vgl. Abb. 59).

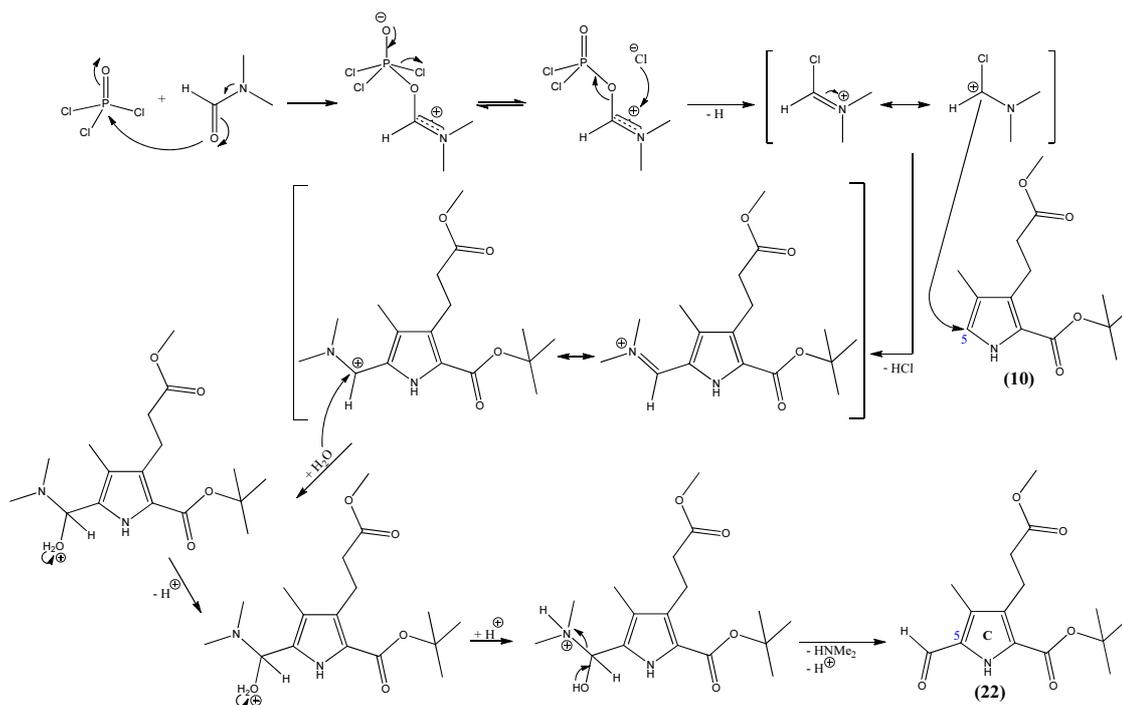


Abb. 59: Mechanismus der Vilsmeier-Reaktion zur Formylierung des C-Rings (22)

Das ¹H-NMR-Spektrum des Produkts zeichnet sich durch das Auftreten des deutlichen Aldehydsignals bei 9.7 ppm und das Verschwinden des Dupletts bei 6.6 ppm des aromatischen Protons von C5 aus.

4.1.4.2 (5-¹³C)-C-Ring (49)

Die Synthese des (5-¹³C)-markierten C-Rings (49) erfolgt nach dem gleichen Mechanismus wie im vorigen Abschnitt beschrieben. Als Formylierungsreagenz und gleichzeitiges Lösungsmittel dient DMSO-(Formyl-¹³C). Das ¹H-NMR-Spektrum unterscheidet sich von dem der unmarkierten Substanz durch die von dem schwereren Isotop hervorgerufene Aufspaltung des Formylsignals. Die Aufspaltung beträgt 157 Hz, was einen typischen Wert für diese Art von Aufspaltung darstellt. Die Reaktion verlief mit sehr guter Ausbeute von 86% im Vergleich zu 68% beschrieben in der Literatur. Die Isotopenmarkierung führte daher nicht zu einer geringeren Stabilität des Produkts.

4.1.4.3 ¹⁵N-markierter C-Ring (29)

Die Synthese des ¹⁵N-markierten C-Rings (29) erfolgt wie im oberen Abschnitt beschrieben. Das ¹H-NMR-Spektrum des Produktes unterscheidet sich von der unmarkierten Substanz lediglich durch die Aufspaltung des NH-Signals um 99.49 Hz

und dem Ersatz des Signals der *tert*-Butylgruppe bei 1.5 ppm durch das der Methoxygruppe bei 3.6 ppm. Im Vergleich zur Synthese der ^{13}C -markierten Substanz konnte die Ausbeute abermals gesteigert werden auf 98%. Auch hier ergaben sich somit keine Nachteile für die Synthese durch die Einführung des schwereren Isotops.

4.1.5 Kupplung zur AB-Hälfte (25)

Die Kupplung des A- (**5**) und B-Rings (**17**) gelingt wie bereits oben beschrieben (vgl. 3.1.1.5) über eine Thio-Wittig-Reaktion. Das negativ polarisierte Kohlenstoffatom greift nucleophil das positiv polarisierbare Kohlenstoffatom der Carbonylfunktion an, wobei sich ein Thio-Betain-ähnliches Intermediat bildet. Der Angriff des negativ polarisierten Schwefelatoms auf den positiv polarisierten Phosphor führt zu einem cyclischen Thiaphosphetan, das zu Triphenylphosphinsulfid und dem Olefin zerfällt (vgl. Abb. 60). Die Triebkraft dieser Reaktion ist die Bildung der starken Phosphor-Schwefel-Bindung. Die AB-Hälfte (**25**) wird mit dem für das spätere PCB (**3**) passenden π -Elektronen-System erhalten.

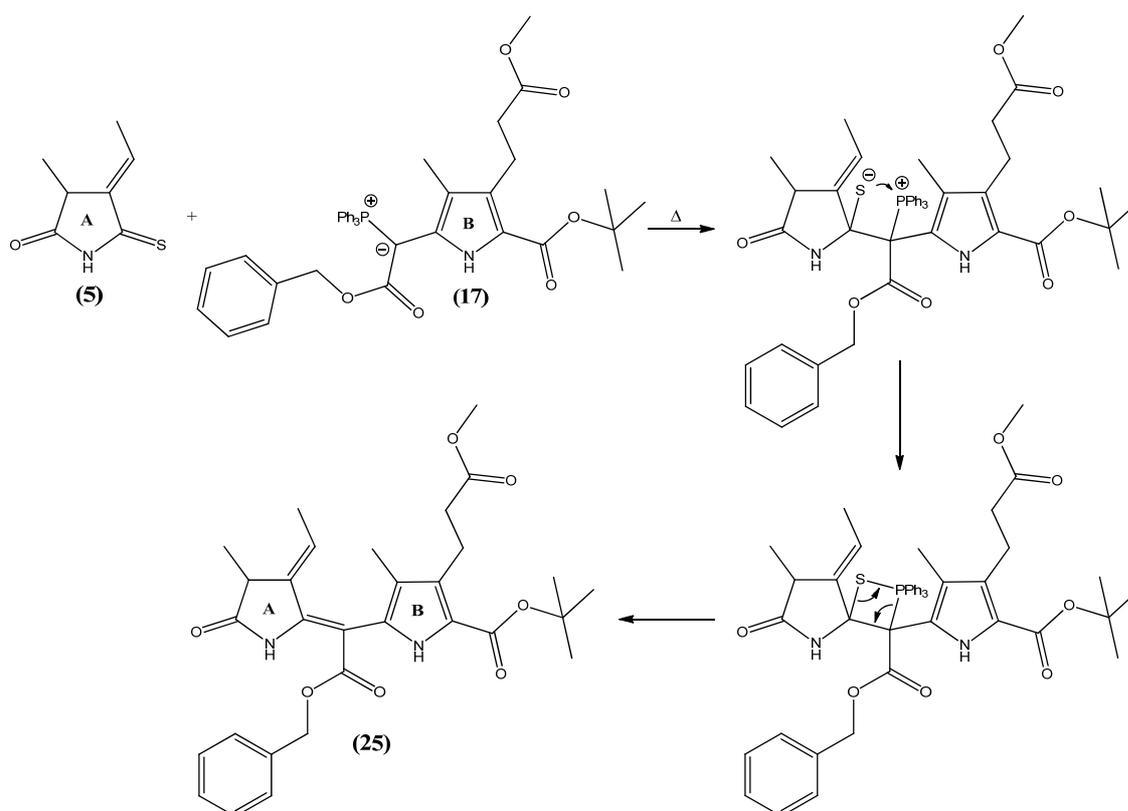


Abb. 60: Mechanismus der Thio-Wittig-Reaktion zur Kupplung der AB-Hälfte (**25**)

Die an der Methin-Brücke nach der Thio-Wittig-Reaktion zurückbleibende Benzylschutzgruppe wird selektiv durch Hydrierung an Palladium auf Aktivkohle in Benzylalkohol und die Carboxygruppe gespalten (vgl. Abb. 61). Die Carboxygruppe dann wird in einem vorgelagerten Schritt bei der Kupplung zum Tetrapyrrol unter Decarboxylierung entfernt. Die Hydrierung der Benzylschutzgruppe verläuft mit mäßigen Ausbeuten von 30% (Lit. 86%). Gründe für den Rückgang der Ausbeute können im eventuellen Vorhandensein von Schwefelresten als Verunreinigung des A-Rings und somit „Vergiftung“ des Katalysators liegen.

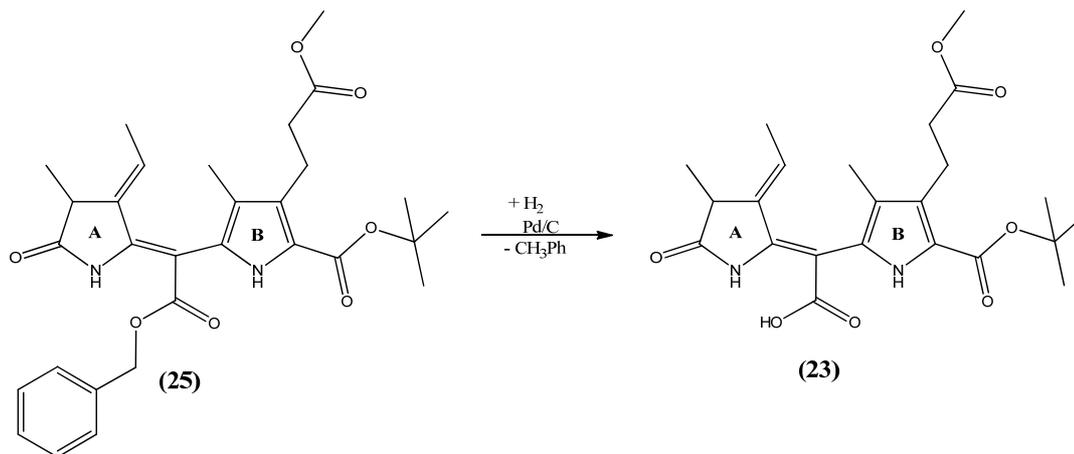


Abb. 61: Entfernung der Benzylesterschutzgruppe durch Hydrierung an Palladium auf Aktivkohle

4.1.6 Kupplung zur CD-Hälfte

4.1.6.1 Unmarkierte CD-Hälfte (24)

Die Kupplung des C-Rings (22) mit dem D-Ring (26) erfolgt über eine Knoevenagel-Reaktion, bei der durch Kondensation zwischen einem Aldehyd und einer aktivierten Methylenverbindung eine C-C-Doppelbindung erzeugt wird. Die Methylenverbindung an Position C-5 des D-Rings (26) wird durch 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) als organische Base deprotoniert. Das Carbanion greift dann nucleophil das Kohlenstoffatom der Carbonylfunktion des Aldehyds unter Bildung eines aldolartigen Zwischenprodukts an. Das Zwischenprodukt zerfällt unter Wasserabspaltung und Ausbildung der gewünschten Doppelbindung (vgl. Abb. 62). Das entstehende Wasser wird durch Zugabe von Molekularsieb aus der Reaktion entfernt. Die Verknüpfung der beiden Pyrrolringe durch die Methin-Brücke führt zu einem konjugierten π -Elektronen-System aus sechs Doppelbindungen, was zu einer intensiven Gelbfärbung des Produktes führt.

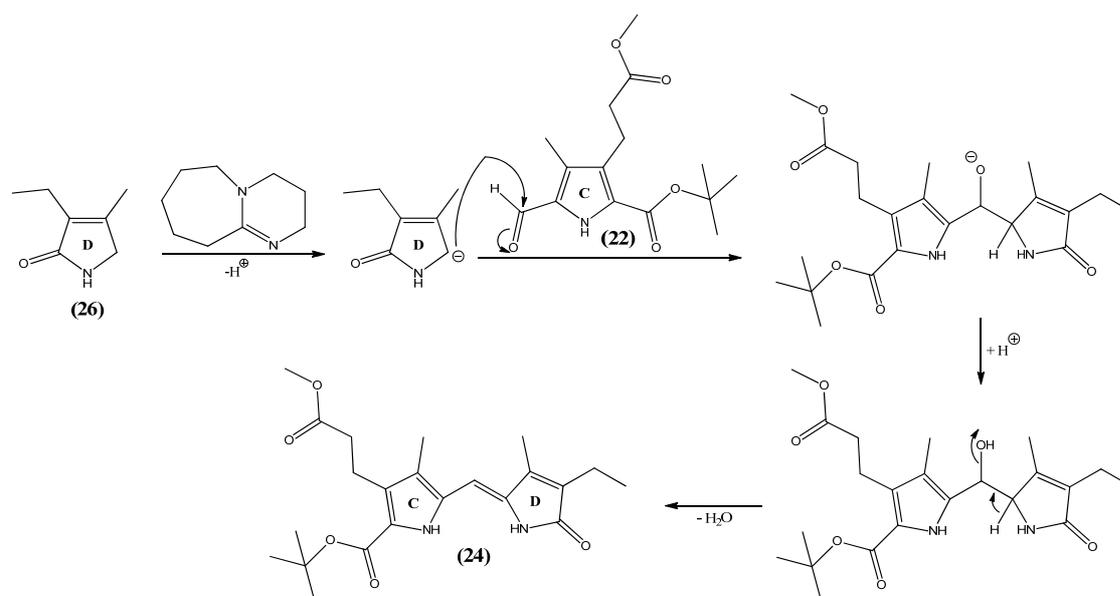


Abb. 62: Mechanismus der Knoevenagel-Reaktion zur Kupplung des C- (22) und D-Rings (26)

Charakteristisch für das ¹H-NMR-Spektrum des Kupplungsprodukt ist das Auftreten eines Singulett bei 5.9 ppm, das durch die neugebildete Methinbrücke verursacht wird, das bei der weiteren Synthese konserviert vorliegt. Die Ausbeute der Reaktion liegt mit 31% unter dem in der Literatur angegebenen Wert (58%)^[76].

Zur Darstellung des Tetrapyrrols muss eine der beiden Molekülhälften weiter funktionalisiert werden. Da sich die *tert*-Butoxycarbonyl-Gruppe für die Kupplung mit der zweiten Molekülhälfte nicht eignet, wird diese durch eine Formylfunktion ausgetauscht. Für die weitere Funktionalisierung wird die CD-Hälfte (24) ausgewählt. Die *tert*-Butylgruppe wird säurekatalysiert mittels Trifluoressigsäure als Isopropen von der Carboxygruppe an Position C9 abgespalten. Dann greift das durch ein vorgelagertes Gleichgewicht unter Abspaltung von Methanol entstandene Carbeniumion den Pyrrolring an der C9-Position in einer elektrophilen aromatischen Substitutionsreaktion an. Decarboxylierung des σ -Komplexes stellt die Aromatizität des Pyrrolrings wieder her. Die weitere Einwirkung von Säure und Wasser auf die Acetalfunktion an Position C9 führt zur Bildung des Aldehyds unter Freisetzung von Methanol (vgl. Abb. 63). Zusätzlich zu dem Zielmolekül lässt sich bei der Reaktion ein unerwünschtes Nebenprodukt isolieren. Es handelt sich dabei um ein Kupplungsprodukt, das durch die Reaktion vom formylierten Produkt mit noch vorhandenem Edukt (nach der Abspaltung des *tert*-Butylrestes) entsteht. Das Nebenprodukt ist durch seine tiefblaue Farbe von dem Zielmolekül zu unterscheiden. Die tiefblaue Farbe ist zudem schon ein Hinweis auf den tetrapyrrolischen Charakter des Moleküls. Charakteristisch für das ¹H-NMR-Spektrum des Produkts ist das Aldehydsignal bei 9.8 ppm und das fehlende Signal der *tert*-Butylgruppe bei 1.5 ppm.

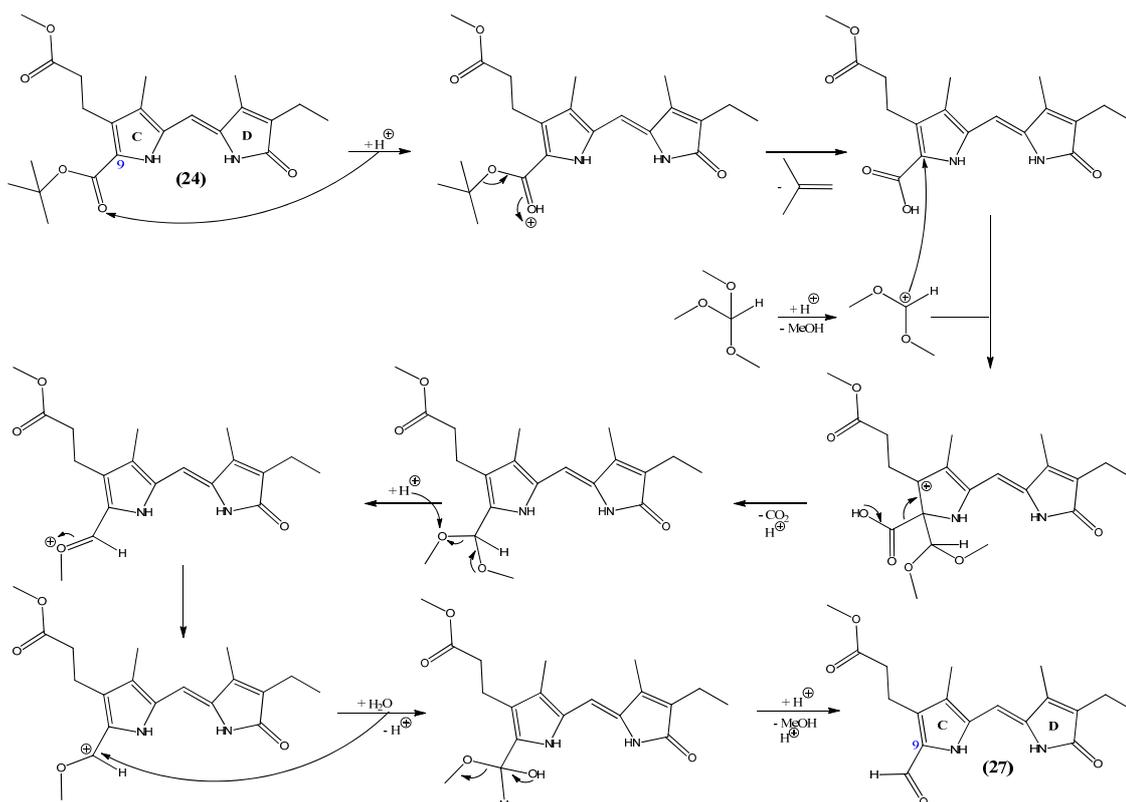


Abb. 63: Mechanismus der Abspaltung der *tert*-Butoxycarbonylschutzgruppe mit anschließender Formylierung der CD-Hälfte (**24**) mittels Trimethylorthoformiat

4.1.6.2 (5-¹³C)-CD-Hälfte (**50**)

Die Darstellung der (5-¹³C)-CD-Hälfte (**50**) verläuft nach dem oben beschriebenen Mechanismus. Im NMR-Spektrum zeigt sich die ¹³C-Markierung durch die Aufspaltung des Singuletts um 157 Hz und dem intensiven Signal im ¹³C-Spektrum bei 95.62 ppm.

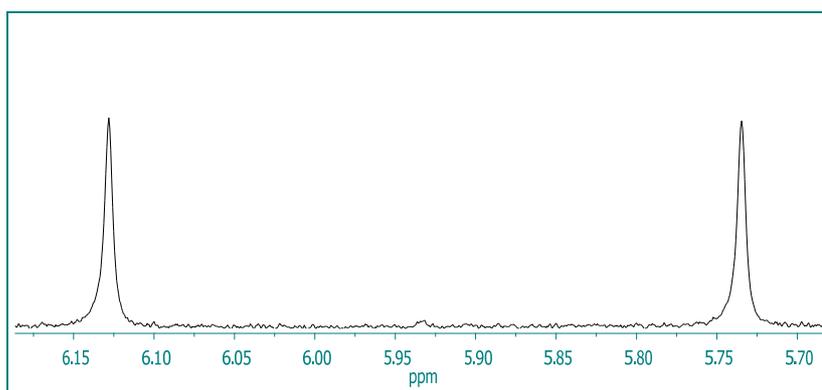


Abb. 64: Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum von 2-Ethyl-9-formyl-8-(2-methoxycarbonylethyl)-3,7-dimethylpyrromethen-1*H*-pyrrol (**50**) in CDCl₃ (400 MHz). Abgebildet ist das durch die ¹³C-Markierung aufgespaltene Signal der Methinbrücke. Das Signal des ¹²C, das sich zwischen den beiden Signalen befinden müsste (ca. 5.93 ppm) fehlt, ein Indiz für die Vollständigkeit der ¹³C-Markierung

Das Ausbleiben des typischen ^1H -Signals der Methinbrücke zeigt zudem, dass das gesamte Produkt ^{13}C -markiert vorliegt. Die Ausbeute von 26% bewegt sich im Rahmen der Ausbeuten der unmarkierter Substanz und lässt daher nicht auf eine, durch die Isotopenmarkierung beeinflusste, geringere Stabilität schließen.

4.1.6.3 (11- ^{15}N)-CD-Hälfte (72)

Die Kupplung des ^{15}N -markierten C-Rings (70) mit dem D-Ring (26) erfolgt wie im Abschnitt 4.1.6.1 beschrieben. Das Produkt wird ebenfalls als gelbgefärbter Feststoff erhalten. Das ^1H -NMR-Spektrum des Produkts unterscheidet sich, wie zu erwarten, von dem der unmarkierten Substanz durch die Aufspaltung des pyrrolischen Signals um $^1J_{\text{NH}} = 97 \text{ Hz}$ (vgl. Abb. 65) und dem Signal der Methoxygruppe bei 3.84 ppm anstelle dem der *tert*-Butylgruppe bei 1.5 ppm.

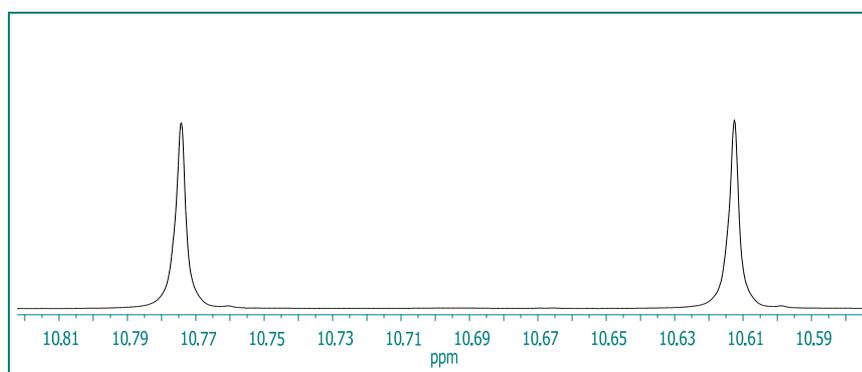


Abb. 65: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von (11- ^{15}N)-2-Ethyl-9-methoxycarbonyl-8-(2-methoxycarbonyl-ethyl)-3,7-dimethylpyrromethen-1*H*-pyrrol (72) in CD_3OD unter Zusatz von 0.1 M Natronlauge. Abgebildet ist die Aufspaltung des pyrrolischen ^{15}NH -Signals um $^1J_{\text{NH}} = 97 \text{ Hz}$.

Das Dipyrrol mit seiner Schutzgruppe an Position C9 erweist sich im Vergleich zu der formylierten Form als stabiler, daher wird die Formylgruppe erst kurz vor der Kupplung zum Tetrapyrrol eingeführt und die CD-Hälfte (72) in seiner Esterform gelagert. Vor der Kupplung zum Tetrapyrrol muss in einem zusätzlichen Schritt die Methoxyschutzgruppe der Carboxygruppe an Position C9 durch Einwirkung von KOH entfernt werden. Die Carboxygruppe wird dann wie bei der unmarkierten Substanz mittels Trifluoressigsäure bei der Formylierung entfernt. Die Zuordnung der ^{13}C -Signale gelingt unter Zuhilfenahme des (^1H -) ^{13}C -HSQC-Spektrums (vgl. Abb. 66). Das (^1H -) ^{15}N -HMBC-Spektrum stellt den Zusammenhang zwischen der ^{15}N -markierten Gruppe und der benachbarten Methinbrücke her (vgl. Abb. 67). Die Ausbeute der Reaktion lag mit 35% im Bereich der unmarkierten Substanz.

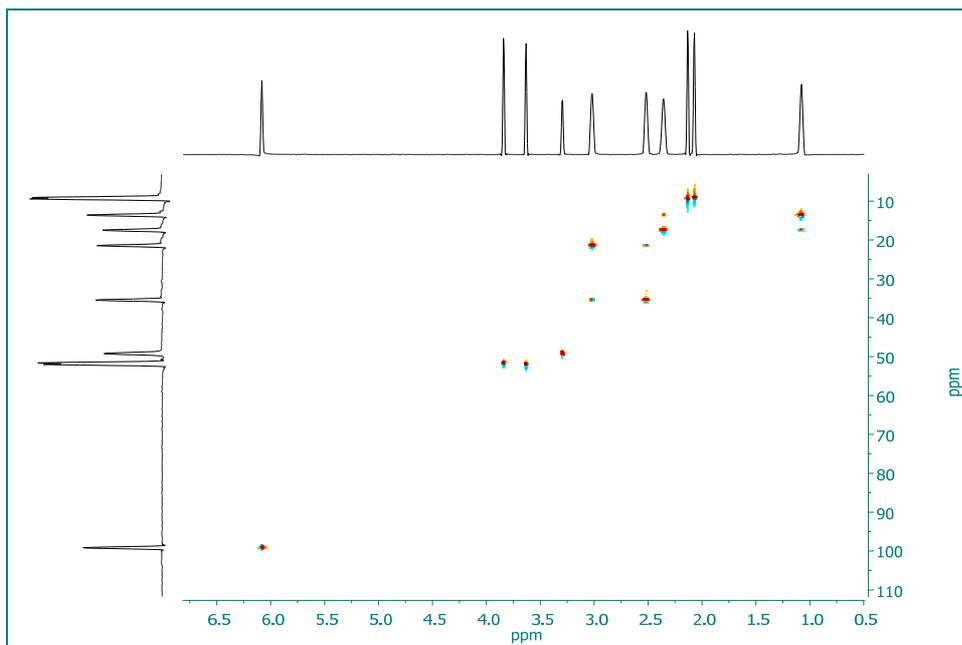


Abb. 66: (^1H -) ^{13}C -HSQC-Spektrum des (11- ^{15}N)-2-Ethyl-9-methoxycarbonyl-8-(2-methoxy-carbonylethyl)-3,7-dimethylpyrromethen-1*H*-pyrrol (**72**) in CD_3OD . Dieses Spektrum wird zur Zuordnung der ^{13}C -Signale verwendet.

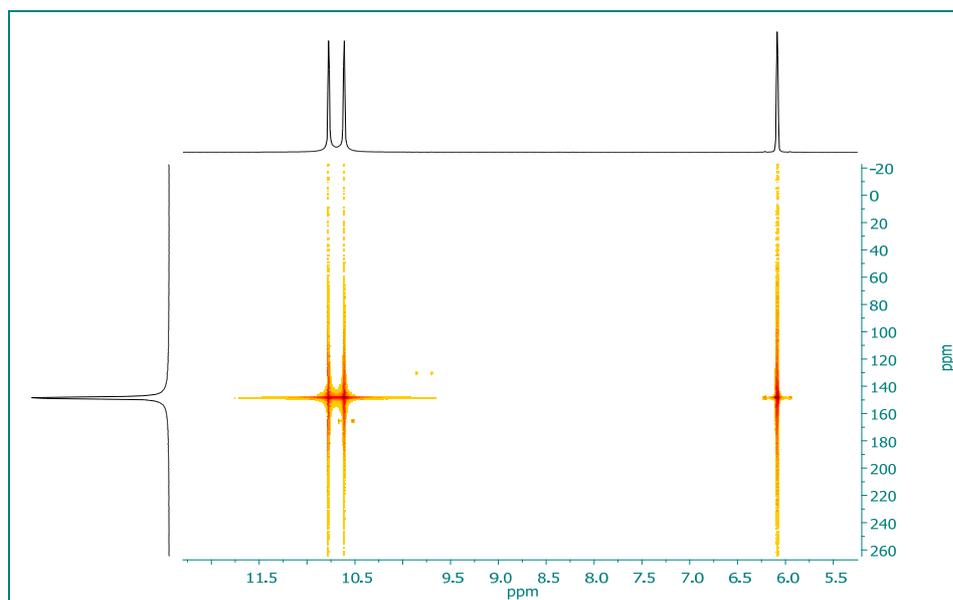


Abb. 67: Das (^1H -) ^{15}N -HMBC-Spektrum von (11- ^{15}N)-2-Ethyl-9-methoxycarbonyl-8-(2-methoxy-carbonylethyl)-3,7-dimethylpyrromethen-1*H*-pyrrol (**72**) in CD_3OD weist die Nachbarschaft der Methingruppe bei 6.1 ppm und der pyrrolischen NH-Gruppe bei 10.6 – 10.8 ppm nach.

4.1.7 Kupplung zum Tetrapyrrol

Nachdem nun beide Molekülhälften das richtige Substitutionsmuster tragen und die CD-Hälfte (**27**) durch die Einführung des Formylrestes die fehlende mittlere Methinbrücke (C10 in PCB) des PCBs (**3**) bereitstellt, können die beiden Hälften zum Tetrapyrrol kondensiert werden.

In einer „Ein-Topf“-Reaktion werden zunächst die beiden Schutzgruppen der Methinbrücke (Carboxy-) und der Position-C9 (*tert*-Butyloxycarbonyl-) durch Einwirkung von Trifluoressigsäure als Isopropen und unter Decarboxylierung abgespalten (vgl. Abb. 68).

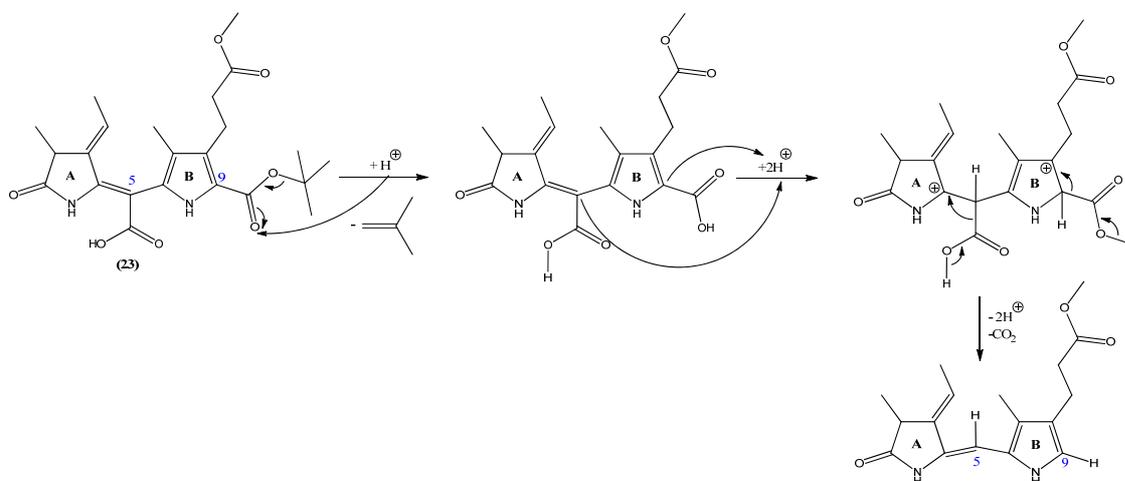


Abb. 68: Abspaltung der *tert*-Butoxycarbonyl- und Carboxy-Schutzgruppe der AB-Hälfte (**23**) vor der Kupplung mit der CD-Hälfte (**27**)

Dann wird durch Zugabe der formylierten CD-Hälfte (**27**) die eigentliche Kupplungsreaktion gestartet. Die Formylgruppe wird dazu zunächst protoniert und dann von der freien α -Position im B-Ring nucleophil angegriffen. Nach der Deprotonierung der Position C9 des B-Rings und Protonierung der Hydroxygruppe wird zunächst die Aromatizität des B-Rings wieder hergestellt. Die folgende Abspaltung von Wasser von der mittleren Methinbrücke und Neuorganisation des π -Bindungssystems innerhalb des B-Rings unter Deprotonierung des Stickstoffatoms führt zum vollständig konjugierten π -Elektronensystem des Tetrapyrrols. Die von den Edukten anfänglich resultierende gelbe Farbe wird daher während der Reaktion durch das Auftreten der blauen Farbe des Produkts verdrängt. Der Farbumschlag erfolgt nach der Zugabe von Methanol. Die genaue Aufgabe des Methanols bei dieser Reaktion ist bis heute nicht geklärt. Allerdings wird von Klahr (1976) ein deutlicher Rückgang der Produktausbeute bei der Synthese von Phycoviolobilindimethylester berichtet, wenn auf die Zugabe von Methanol verzichtet wird. Lindner postuliert in diesem Zusammenhang (2000), dass die

Zugabe von Methanol zu einer Herabsetzung der Protonenkonzentration im Reaktionsmedium führt, die die Abspaltung des zum Stickstoff des B-Rings α -ständigen Protons möglicherweise erleichtert^[70].

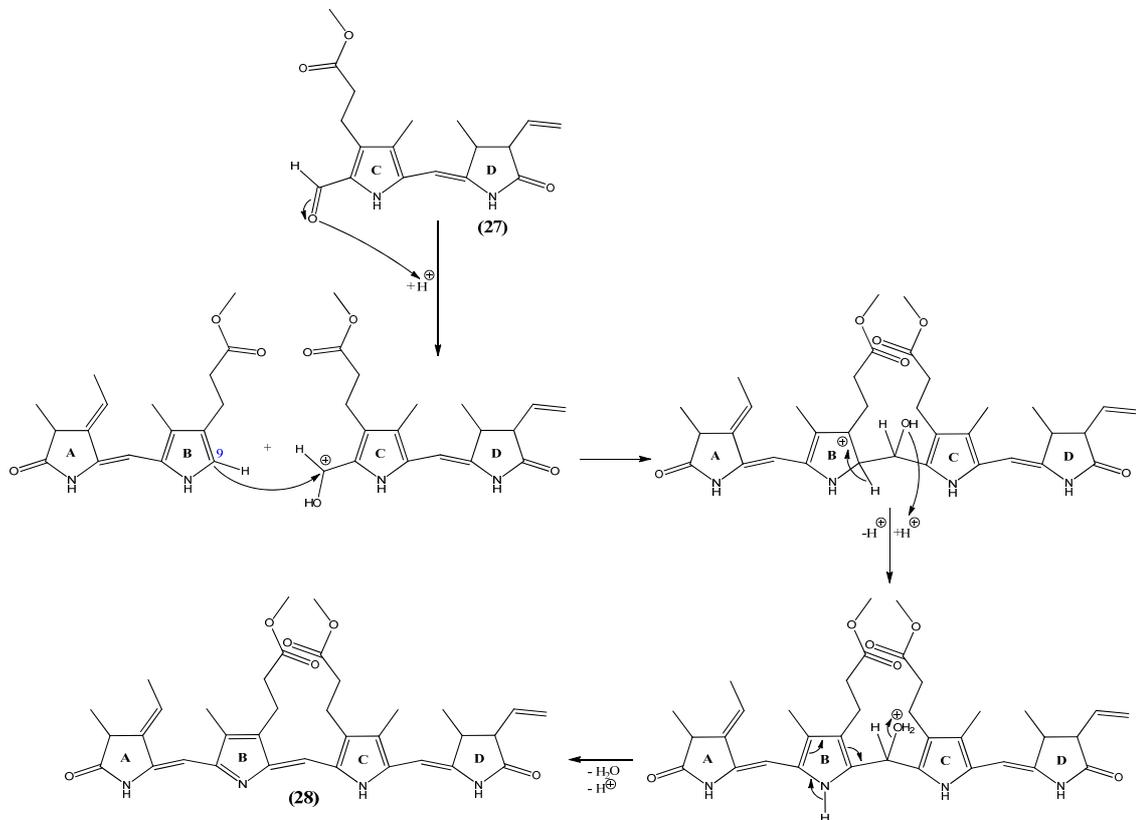


Abb. 69: Mechanismus der säurekatalysierten Kondensation der AB- (**23**) mit der CD-Hälfte (**27**)

Die spätere Assemblierung ins Protein erfordert die Freisetzung der Disäure, da der Diester zwar ins Protein eingebaut wird aber keine Photoisomerisierung zeigt.

Die Abspaltung der Esterfunktionen findet an saurem Ionenaustauscherharz in einem Lösungsmittelgemisch aus Wasser und Trifluoressigsäure statt. Zunächst wird das carbonylische Kohlenstoffatom der Esterfunktion durch die Hydroxyfunktion der Trifluoressigsäure nucleophil angegriffen und das Carbonylsauerstoffatom des Esters protoniert. Der intramolekulare Angriff der Methoxyfunktion auf das Carbonylkohlenstoffatom der Trifluoressigsäure unter Bruch der Etherbindung führt zur Freisetzung der Säure. Als Nebenprodukt kann auch die einfach-entschützte Variante entstehen, weshalb die Reaktion gut dünn-schichtchromatographisch beobachtet werden muss: der Monoester kann durch seine geringere Polarität und damit besseren Laufeigenschaften auf RP-C18-Säulenmaterial einfach unterschieden werden. Die Trennung der Produkte erfolgt mittels präparativer Schichtchromatographie über RPC18-Material (Merck, PSC-Fertigplatten RP-18F_{254S}) getrennt. Die einzelnen R_F

Werte unterscheiden sich mit $R_f = 0.39$ und $R_f = 0.24$ deutlich genug von einander in den unten beschriebenen Lösungsmittelgemisch (siehe Versuchsdurchführung), sodass das Produkt in guter Reinheit erhalten wird.

4.1.7.1 (5- ^{13}C)-Phycocyanobilin (41)

Das ^1H -NMR-Spektrum des (5- ^{13}C)-Phycocyanobilins (**41**) zeigt, wie erwartet, die für das PCB typischen Signale mit Ausnahme der Aufspaltung des Signals der C5-Methinbrücke durch um 158 Hz das schwerere Isotop. Der Chromophor wird für schwingungsspektroskopische Methoden in ein Apoprotein eingebaut.

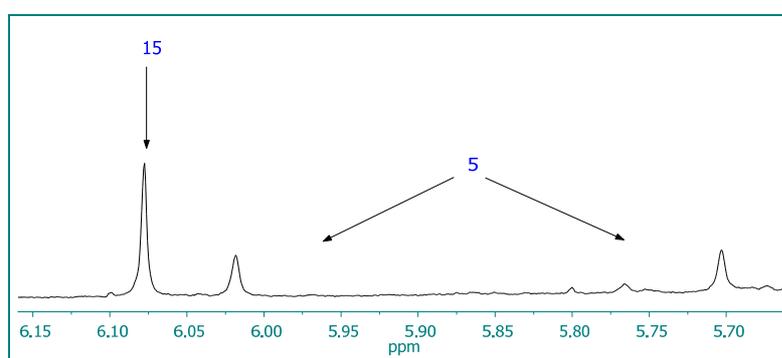


Abb. 70: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von (5- ^{13}C)-Phycocyanobilin (**41**) in Pyridin- d_5 (400 MHz)

4.1.7.2 (15- ^{13}C)-Phycocyanobilin (48)

Das ^1H -NMR-Spektrum unterscheidet sich von der unmarkierten Substanz durch die Aufspaltung des Signals der C15-Methinbrücke durch die Einführung des schwereren Isotops um 158 Hz. Das gänzliche Fehlen des typischen C15-Signals bei 6.2 ppm ist zudem ein Beweis für die Vollständigkeit der Isotopenmarkierung.

Das (15- ^{13}C)-Phycocyanobilin (**48**) wird anschließend zur Anwendung in der Raman-Spektroskopie in das N-terminale 65-kDa-Fragment (Aminosäuren 1–595) des PhyA aus *Avena sativa* (Hafer) assembliert. Die heterologe Expression des Proteins erfolgt nach der von Mozley *et al.*^[93] entwickelten Methode. Das C-terminale Ende des Protein-Fragments ist dabei mit einem Rest aus sechs Histidinen, einem sogenannten „His-tag“, versehen, der die Reinigung mittels Affinitätschromatographie ermöglicht. Das isotopenmarkierte rekombinante Phytochrom zeigt keine Unterschiede in der thermodynamischen Stabilität oder in der Photochemie. Der Wasserstoff-Deuterium-Austausch des pyrrolischen Protons wurde durch Aufkonzentrieren und Resuspendieren des Proteins in Deuteriumoxid-Puffer erzielt.

Die aufgenommenen Ramanspektren wurden mit den Ergebnissen eines QM/MM Hybrid Modells verglichen, das die Schwächen eines früheren Modells ausgleicht. Das frühere Modell vernachlässigte die Interaktion der Proteinhülle mit dem Chromophor und die dabei auftretenden Kräfte die auf den Chromophor und somit auf dessen Schwingungsverhalten. Der Vergleich des simulierten Spektrums ohne Proteinumgebung mit dem gemessenen Spektrums des ins Protein assemblierten Chromophors führte zur irrigen Annahme einer ZZZasa-Konfiguration des Chromophors. Die Schwäche des Modells wurde erst durch die Veröffentlichung der Kristallstrukturen ersichtlich. Daher wurde ein neues Modell entwickelt, das die Einwirkungen der Proteinhülle auf die prosthetische Gruppe berücksichtigt. Dazu wird der Chromophor und mit seiner direkten Proteinumgebung mit Hilfe einer Quantenmechanischemethode berechnet und die entferntere Proteinhülle zusammen mit dem Lösungsmittel über eine empirische (MM) Methode. Daher wurde die Entwicklung dieser Hybridmethode erst nach dem Bekanntwerden der Kristallstrukturen möglich. Die Raman-Spektren wurden von dem 65kDa-Fragment aufgenommen, nach dem kein Unterschied zwischen dem Raman-Spektrum des Volllängenproteins und dem 65kDa-Fragment (nur sensorische Domäne) festgestellt werden konnte. Dann wurden die Spektren mit der Simulation verglichen. Das besondere Augenmerk galt dem Bereich des Spektrums zwischen 1450 und 1700 cm^{-1} . In diesem Bereich liegen die C=C-Streckschwingungen der Methinbrücken und die N-H-Beugeschwingung aus der Ebene des B- und C-Rings. Durch die Isotopenmarkierung der C-15-Methinbrücke wird im simulierten Minimumspektrum das breite Signal bei 1633 cm^{-1} in drei Signale aufgespalten. Die Signale bei 1637 und 1620 cm^{-1} (C=C-Streckschwingung der AB-Methinbrücke und des D-Rings) werden von der ^{13}C -Markierung kaum beeinflusst. Das intensive Signal bei 1632 cm^{-1} hingegen wird um 20 cm^{-1} zum schwächeren Feld hin verschoben und kann somit der CD-Streckschwingung zugeordnet werden. Das experimentell ermittelte Spektrum stimmt mit diesen Beobachtungen in etwa überein. Das intensive Signal der CD-Streckschwingung bei 1637 cm^{-1} ist bei der Messung mit dem ($^{15}\text{-}^{13}\text{C}$)-markierten Chromophor um 19 cm^{-1} verschoben, wohingegen die Signale bei 1644 cm^{-1} keine Verschiebung zeigen. Das Signal bei 1637 cm^{-1} kann somit der CD-Streckschwingung zugeschrieben werden. (unpublizierte Ergebnisse)

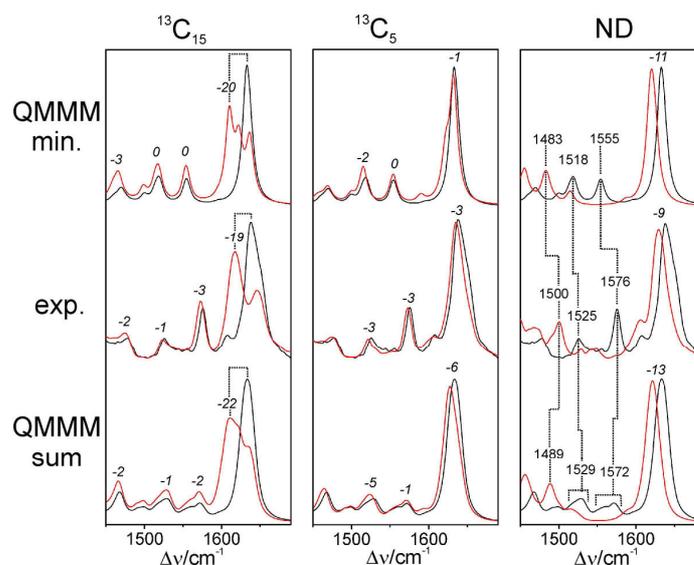


Abb. 71: simulierte Raman- und experimentelle Resonanz-Raman-Spektren von phyA-PCB mit Isotopen-markiertem Chromophor (rot) und mit unmarkiertem phyA-PCB (schwarz) in der P_r-Form. Oben: mittels QMMM-Hybridansatz berechnetes Minimumspektrum. Mitte: experimentell ermitteltes Spektrum. Unten: mittels QMMM-Hybridansatz berechnetes Spektrum der Summe über 25 „snapshots“. Die drei NH-Signale zwischen 1450 und 1575 cm⁻¹ zeigen nur eine geringe Empfindlichkeit gegenüber der ¹³C-Isotopenmarkierung. Das Signal bei 1637 cm⁻¹ spaltet durch die Einführung des schwereren Isotops auf. Das intensive Signal wird im simulierten Spektrum um 20 cm⁻¹ verschoben und im experimentellen Spektrum um 19 cm⁻¹. Das Simulierte Minimumspektrum gibt die Ergebnisse des experimentellen Spektrums gut wieder. Die Aufspaltung der beiden schwächeren Signale bei 1630 cm⁻¹ wird im Experiment nicht beobachtet, dort findet sich in dem Bereich ein bereits Signal, dass durch die Überlagerung der beiden Signale resultiert. Der Vergleich zwischen Simulierten Minimumspektrum mit der Summierung von 25 „snapshots“ zeigt den Verlust der Aussagekraft des summierten Spektrums durch die Verbreiterung der Signale. (noch nicht publiziert)

Ein zweiter Teil des (15-¹³C)-Phycocyanobilins wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Mathies (Berkeley) in Cph1 assembliert und mit Femtosekunden stimulierter Ramanspektroskopie vermessen. Die Messmethode ermöglicht zeitaufgelöste Spektren von ultraschnellen Molekülbewegungen. Neben der durch die Einführung des schwereren Isotops an Position C15 induzierten Aufspaltung des breiten C=C-Streckschwingungssignal der drei Methinbrücken, wird mit dieser Messmethode eine Abhängigkeit der Wasserstoff-Biegeschwingung aus der Ebene (HOOP) von C15 sichtbar. Die Bande lässt sich somit eindeutig zuordnen. Der anschließende Vergleich der HOOP-Signale des P_r- und P_{fr}-Spektrums zeigt, dass die beiden Banden des P_r-Spektrums im P_{fr}-Spektrum nicht mehr aufspalten, sondern nur ein breites Signal ergeben. Dies lässt sich durch die Z/E-Isomerisierung des D-Rings erklären, da das C15-Proton in der E-Konformation weniger sterisch gehindert ist. Die Zuordnung des

HOOP Signals bei 798 cm^{-1} durch den isotypenmarkierten Chromophor ermöglicht so die Bestätigung der Z/E-Isomerisierung des D-Rings, was der von Vierstra *et al.* aufgestellten Behauptung einer Z/E-Isomerisierung des A-Rings^[48] widerspricht.

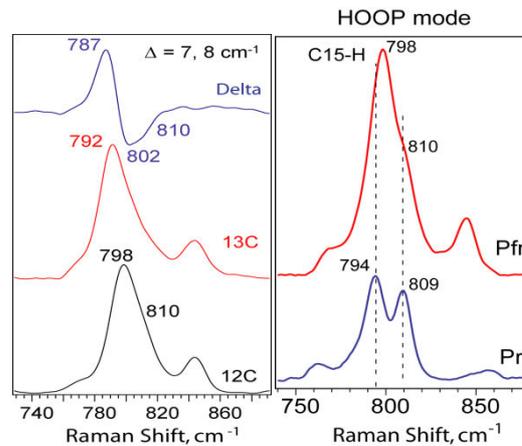


Abb. 72: Ausschnitte aus den FSRS-Spektren von Cph1 mit PCB als Chromophor. Links: Zuordnung des HOOP-Signals anhand der Verschiebung der Bande durch die ($^{15}\text{-}^{13}\text{C}$) Isotopenmarkierung des Chromophors (rot) im Vergleich zum unmarkierten Chromophor (schwarz). Rechts: Vergleich des HOOP-Signals im Spektrum des P_r -Zustands mit dem des P_{fr} -Zustands. Die deutliche Veränderung des Signals nach der Photoreaktion identifiziert den D-Ring als Ort der lichtinduzierten Z/E-Isomerisierung.

4.1.8 Isolierung von Phycocyanobilin (3) aus dem Cyanobakterium *Spirulina platensis*

Die Isolierung des Phycocyanobilins (**3**) aus der Alge *Spirulina platensis* durch Methanolyse wurde nach der in der Arbeitsgruppe etablierten Methode durchgeführt. Dabei werden die Cyanobakterien durch mehrfaches Waschen mit Methanol zunächst von den Chlorophyllen befreit. Die eigentliche Methanolyse erfolgt dann bei erhöhter Temperatur über einen Zeitraum von 18 h. Es erfolgt eine β -Eliminierung an der kovalenten Chromophor-Cystein-Bindung unter Bildung der für das Phycocyanobilin typischen Ethylidengruppe. Als Folgereaktion kann ein nucleophiler Angriff des Methanols auf die Ethylidengruppe stattfinden, was zur Bildung von 3,3¹-Dihydro-3¹-methoxy-phycocyanobilin führt. Die Adduktbildung wird durch erhöhte Temperatur begünstigt, weshalb das Methanol nicht bis zur Siedehitze erwärmt werden darf. Bei einer Lösemittelreaktion von 50°C werden ca. 18% Methanoladdukte (**73**, **74**) gewonnen. Die Nebenprodukte können nach der Veresterung leicht über Mitteldruckchromatographie abgetrennt werden. Da die Methanoladdukte, wenn auch

nichtkovalent, ebenfalls ins Protein einbauen, müssen sie für Assemblierungszwecke auf der Stufe der Disäure entfernt werden. Dies geschieht mittels präparativer HPLC. Aufgrund der besseren Löslichkeit in Kaliumphosphatpuffer und der möglichen Zersetzung auf saurem Medium wird die Trennung an RP-C18-Material durchgeführt. Zur näheren spektroskopischen Untersuchung wurden die Methanoladdukte mittels präparativer Hochdruckchromatographie in guter Reinheit abgetrennt (vgl. Abb. 73, Abb. 74). Dabei eluieren die Methanoladdukte auf dem RP-C18-Material aufgrund der höheren Polarität deutlich vor dem PCB (**3**).

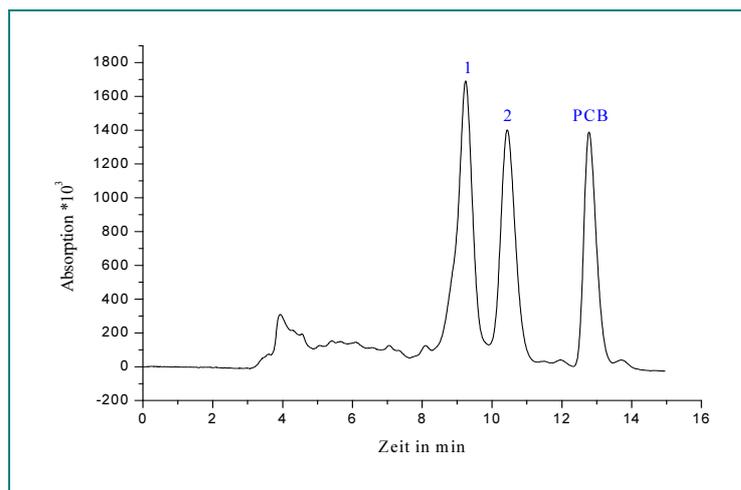


Abb. 73: Elutionsdiagramm der analytischen HPLC der beiden angereicherten Methanoladdukte (**73**, **74**) (in blau) und einem Rest von PCB (**3**) (Chromasil RP-C18; 0.2 M Kaliumphosphatpuffer und Acetonitril (70:30)) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 370$ nm. Die Addukte werden nach der Elutionsreihenfolge nummeriert.

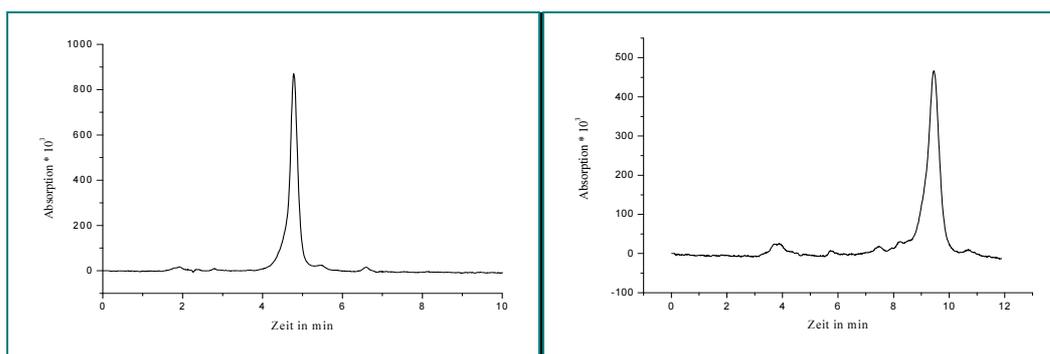


Abb. 74: Links: Elutionsdiagramm der analytischen HPLC vom Methanoladdukt 2 (**74**) nach der präparativen HPLC (Beobachtungswellenlänge $\lambda = 370$ nm). Rechts: Elutionsdiagramm der analytischen HPLC vom Methanoladdukt 1 (**73**) nach der präparativen HPLC ($\lambda = 370$ nm)

Die ¹H-NMR-Spektren des PCBs (**3**) und der beiden Methoxyaddukte (**73**, **74**) unterscheiden sich durch das im Spektrum der Addukte gut sichtbare Signal der

Methoxygruppe bei 3.0 ppm und durch das Fehlen des Ethylidensignals bei 6.3 ppm. Das Ethylidensignal wird durch zwei bei niedrigerem Feld liegenden Signalen ersetzt. So tritt im Bereich von 3.8 ppm ein neues Signal auf, bei dem es sich um das zum niedrigeren Feld hin verschobene Signal des Protons an 3¹ handelt. Das zweite neue Signal liegt im Bereich des Signals der Protonen von 8¹ und 12¹, wobei es von diesem teilweise überlagert wird, und kann dem Proton an 3 zugeordnet werden. Die Lage dieses Signals unterscheidet die beiden Methanoladdukte von einander. Bei dem zuerst eluierenden Methanoladdukt (**73**) liegt das Signal bei 3.05 ppm (vgl. Abb. 75) und beim zweiten bei 3.23 ppm (vgl. Abb. 76). Die Ermittlung der Kopplungskonstanten des Methanoladdukts 1 (**73**) ist durch die schlechte Aufspaltung des Spektrums nicht möglich. Bei den Methanoladdukten könnte es sich um cis-trans-Isomere bezüglich der Substituenten an C2 und C3 handeln, da durch den fünf-Ring keine Drehbarkeit gegeben ist. Aufgrund der größeren Verschiebung der Protonen an C2 und C3 zu einander könnte es sich bei dem Methanoladdukt 2 (**74**) um das trans-Isomer handeln, was für das Methanoladdukt 1 (**73**) zum cis-Isomer führt. Die UV/Vis-Spektren unterscheiden sich nicht von einander, weisen aber im Vergleich zum PCB eine hypsochrome Verschiebung von $\lambda_{\text{max}}(\text{PCB}) = 365 \text{ nm}$ und 617 nm auf 348 nm und 593 nm aufgenommen im Lösungsmittel der HPLC (siehe Versuchsbeschreibung) auf.

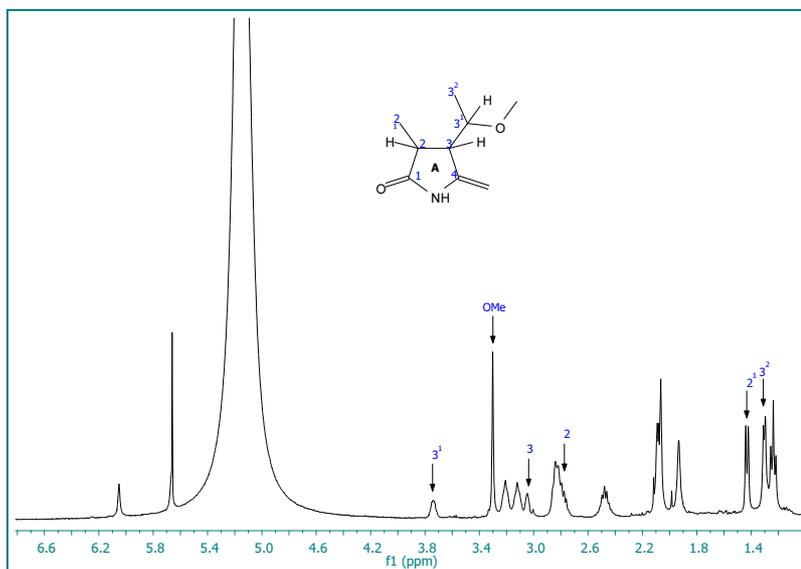


Abb. 75: Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum des PCB-Methanoladdukts 1 (**73**) in Pyridin-d₅ (400 MHz). Die für die Methanoladduktidentifizierung relevanten Positionen des A-Rings sind blau hervorgehoben.

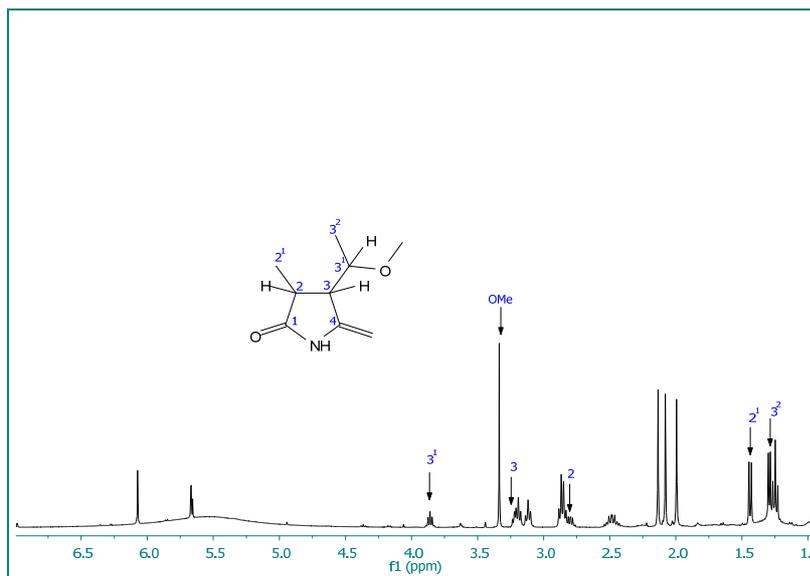


Abb. 76: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum des PCB-Methanoladdukts **2 (74)** in Pyridin- d_5 (400 MHz). Die für die Methanoladduktidentifizierung relevanten Positionen des A-Rings sind blau hervorgehoben.

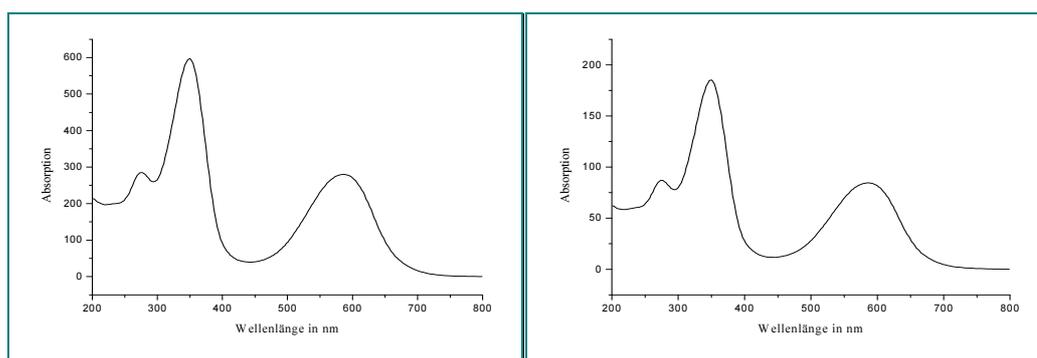


Abb. 77: UV/Vis-Spektren der beiden PCB-Methanoladdukte. Links: Methanoladdukt **1 (73)**; Rechts: Methanoladdukt **2 (74)**

Die besten Ausbeuten von 130 bis 260 mg PCB (**3**) bei der Extraktion aus dem Cyanobakterium konnte bei einer Ansatzgröße von 100 g gefriergetrockneter Cyanobakterien erzielt werden. Eine weitere Vergrößerung des Ansatzes führt nicht, wie eigentlich zu erwarten, zu einer verbesserten Produktausbeute, die schlechte Handhabbarkeit der dabei auftretenden Lösungsmittelmengen und deren anschließende Entfernung führt zur Zersetzung eines Großteils des Produkts, was bei einer Ansatzgröße von 500 g Cyanobakterien nur eine Ausbeute an PCB (**3**) von 113 mg führt. Bei einer Ansatzgröße von 50 g Cyanobakterien konnte eine Ausbeute von 35 bis 63 mg PCB (**3**) erzielt werden, daher scheint der Ansatz mit 100 g Cyanobakterien als optimal.

4.1.9 Synthese eines Phycocyanobilindimethylester-3¹-Cysteinadduktes (53)

Die Synthese des Phycocyanobilindimethylester-3¹-cysteinadduktes (**53**) wird, wie in Abschnitt 3.1.7 beschrieben, durchgeführt. Das Rohprodukt der Extraktion aus *Spirulina platensis* wird ohne Abtrennung der Methanoladdukte in schwefelsaurer-methanolischer Lösung verestert. Das Rohprodukt wird anschließend über Mitteldruckchromatographie (MPLC) gereinigt. Die Abtrennung der Methanoladdukte auf der Stufe des Diesters und nicht auf der Stufe der Disäure bietet sich durch die bessere Löslichkeit der veresterten Tetrapyrrole in organischen Lösungsmitteln an. Die Trennung kann somit über Kieselgel erfolgen, wodurch die Addukte aufgrund ihrer höheren Polarität nach dem Phycocyanobilindimethylester (**28**) eluieren und gut von dem Produkt abgetrennt werden können. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnte der Dimethylester mit einer Ausbeute von 58% erzielt werden. Der Diester wird dann mit *N*-Acetyl-L-Cysteinmethylester umgesetzt. Wie bei der Assemblierung ins Protein verläuft die Bindungsbildung unter Addition des Thiols an die Ethylidendoppelbindung. Die Addition verläuft nicht stereospezifisch, was zur Bildung eines Isomerengemisches führt. Das Isomerengemisch konnte mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Mittel nicht aufgetrennt werden. Zudem erwies sich die Reinigung von dem im Überschuss eingesetzten Cysteinmethylester als schwierig. Das Rohprodukt wurde daher viermal der Säulenchromatographie unterworfen, um das Produkt vom Großteil des überschüssigen Cysteinmethylester abzutrennen. Die im Bereich von 1.7 ppm bis 3.7 ppm dicht zusammenliegenden Signale ergeben ein sehr komplexes Spektrum, das nur schwer ausgewertet werden kann. Zudem liegt das Produkt nicht isomerenrein vor, was das Spektrum abermals verkompliziert.

4.1.10 Spaltung von (u-¹⁵N)-PCB (54)

¹⁵N-markiertes Phycocyanobilin (**54**), das durch Anzucht des Cyanobakteriums *Synechocystis* in ¹⁵N-markiertem Medium in der Arbeitsgruppe von J. Hughes (Universität Gießen) gewonnen wurde, wird wie in Abschnitt 3.1.8 beschrieben, säurekatalysiert zum Dimethylester umgesetzt^[59]. Das ¹H-NMR-Spektrum des Produktes unterscheidet sich von dem der unmarkierten Substanz durch die Aufspaltung des NH-Signals um 46.22 Hz (vgl. Abb. 78). Die Einführung des schwereren Isotops führt weiterhin durch Fernkopplung zur Aufspaltung der Methinbrücken in Multipletts.

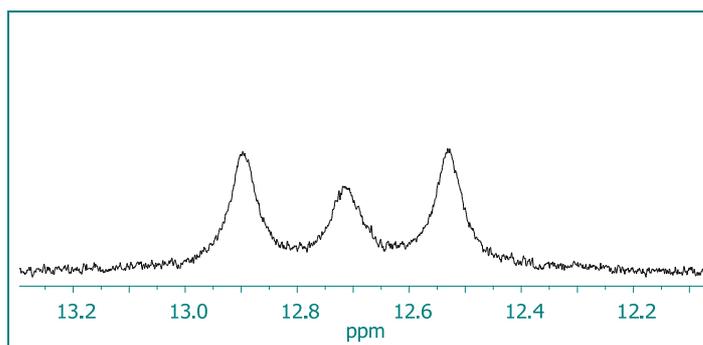


Abb. 78: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von $u\text{-}^{15}\text{N}$ -markiertem PCB (**54**) in Pyridin- d_5 (400 MHz). Aufspaltung des NH-Signals

Die anschließende Spaltung des $u\text{-}^{15}\text{N}$ -Phycocyanobilindimethylesters ($u\text{-}^{15}\text{N}$ -PCBMe₂) (**56**) durch Reaktion mit Thiobarbitursäure verläuft nach dem in Abschnitt 4.2.3 erläuterten Mechanismus (vgl. Abb. 79). Die Spaltung des ($u\text{-}^{15}\text{N}$)-PCBMe₂ konnte erfolgreich nachgewiesen werden, allerdings musste aufgrund der geringen Ausbeute auf die Weiterführung der Synthese des (22,23- ^{15}N)-PCBs (**55**) verzichtet werden.

4.2 Synthese von (10- ^{13}C)-Biliverdin IX α (**62**)

Die Synthese von (10- ^{13}C)-Biliverdin IX α (**62**) erfolgt wie in Kapitel 3.2 beschrieben, nicht durch klassische Totalsynthese oder durch Extraktion aus einem geeigneten Organismus (wie bei Phycocyanobilin (**3**)), sondern durch Spaltung von Biliverdindimethylester (**63**) und anschließendes Wiederaussetzen der beiden Hälften unter Einführung des zentralen Kohlenstoffatoms (C10) in Isotopen-markierter Form.

4.2.1 Oxidation von Bilirubin (**66**)

Die Darstellung von (10- ^{13}C)-Biliverdin IX α (**62**) beginnt mit der Oxidation von Bilirubin (**66**) zu Biliverdin IX α (**1**) mittels 2,3-Dichloro-5,6-dicyanobenzochinon (DDQ) in Dimethylsulfoxid. Zwar kann Biliverdin IX α (**1**) auch käuflich erworben werden, aus Kostengründen wird allerdings darauf verzichtet und auf die Oxidation von Bilirubin (**66**) zurückgegriffen. Der genaue Mechanismus der Oxidation ist noch nicht geklärt, doch wird ein radikalischer Mechanismus vermutet. Die Reaktion verläuft zufriedenstellend mit Ausbeuten von ca. 93%.

4.2.2 Veresterung von Biliverdin IX α (66)

Die Veresterung von Biliverdin IX α (66) zum Dimethylester erfolgt in schwefelsaurer Methanollösung, wie in Kapitel 3.2 bereits beschrieben. Die säurekatalysierte Überführung der Disäure in den Diester führt zu einer höheren Stabilität des Biliverdins und erhöht gleichzeitig die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, was sich für den weiteren Reaktionsweg als ausschlaggebend erweist, da die meisten in der Literatur beschriebenen Reaktionen in organischen Lösungsmitteln durchgeführt wurden und somit auch die Ausbeuteverluste während des Aufarbeitens verringert werden können. Die in der Literatur beschriebene Ausbeute konnte von Lit. 62%^[70] auf 68% gesteigert werden.

4.2.3 Spaltung von Biliverdindimethylester (63)

Die Spaltung von Biliverdindimethylester (63) wird, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, nach dem von Manitto und Monti entwickelten Verfahren^[63] durchgeführt. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass sich auf diesem Weg in nur einer einzigen Reaktion gleichzeitig beide Molekülhälften gewinnen lassen, auch wenn dies nur unter hohem Verlust geschieht, da die als Nebenprodukte entstehenden Addukte nicht wieder in eine für die weitere Synthese verwendbare Form überführt werden können. Thiobarbitursäure wird zunächst in einem vorgelagerten Gleichgewicht an der Methylengruppe deprotoniert. Das Carbanion greift anschließend nucleophil die mittlere Methinbrücke des Biliverdindimethylesters (63) an. Dadurch wird die Konjugation des vom A- bis zum D-Ring reichenden π -Elektronensystems an der Methinbrücke unterbrochen, dies führt zu einem deutlichen Farbumschlag während der Reaktion. Es folgt die spontane Spaltung des Moleküls^[63], die bei Lindner als eine Art „rückläufige“ Michael-Addition beschrieben ist^[70]. Es werden vier Produkte erhalten: Jeweils beide Spalthälften und die jeweils andere Hälfte als Thiobarbitursäureaddukt.

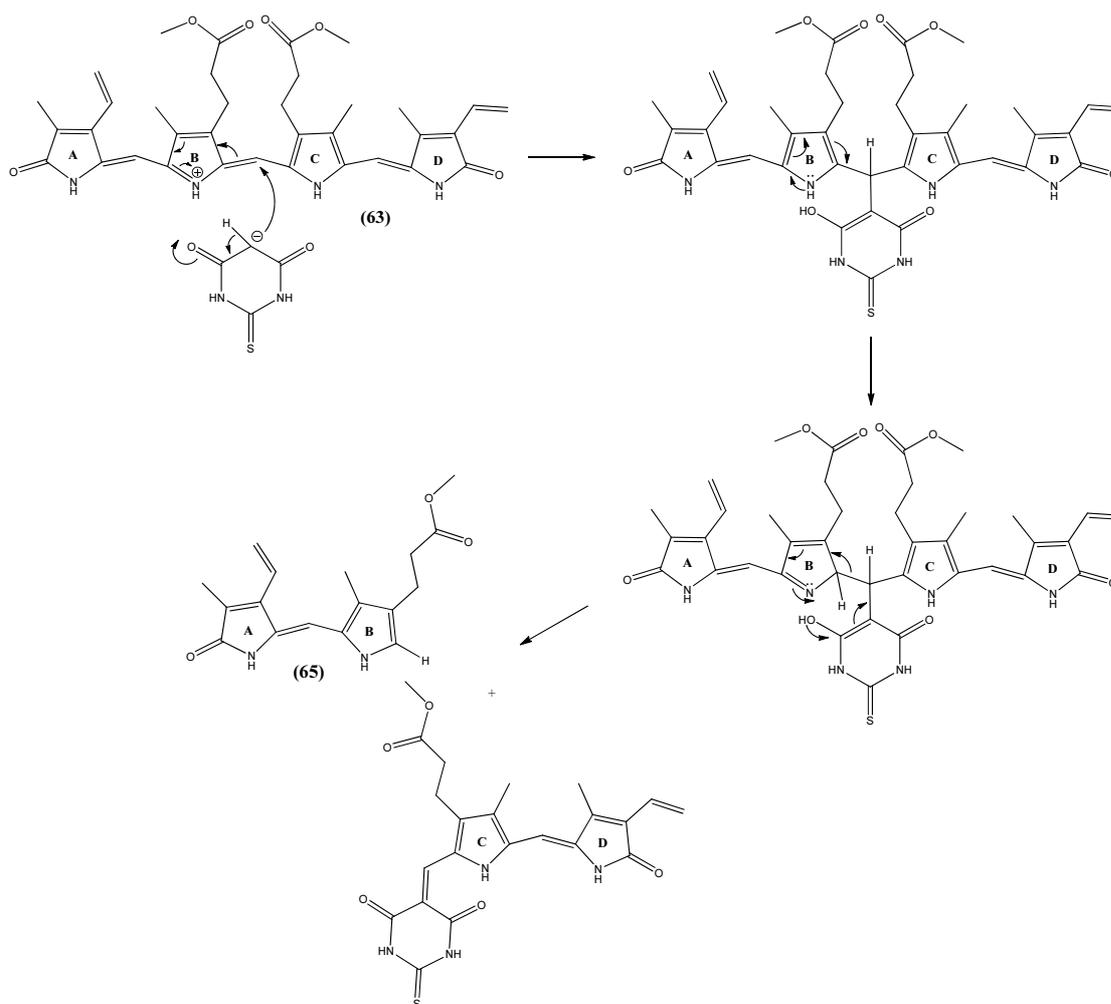


Abb. 79: Mechanismus der Spaltung von Biliverdindimethylester (63) mittels Thiobarbitursäure^[63,70]

Die Thiobarbitursäureaddukte werden mit Hilfe ihrer im Vergleich zu den beiden Spaltprodukten geringen Löslichkeit in n-Hexan als Niederschlag abgetrennt. Die Vollständigkeit der Fällung kann dabei durch einen Farbumschlag von violett nach gelb gut beobachtet werden. Die beiden Spaltprodukte müssen für die weitere Umsetzung von einander getrennt werden, da sich die Substitutionsmuster des A- und D-Rings von einander unterscheiden (Methyl- und Vinylgruppen vertauscht). Dies gelingt in guter Reinheit durch präparative Schichtchromatographie.

Die NMR-Spektren wurden in Pyridin-d₅ aufgenommen, nachdem in CDCl₃ vollständige Zersetzung durch den Farbumschlag von gelb nach braun-schwarz beobachtet werden konnte. Die Zuordnung der ¹³C-Signale und die Identifizierung der beiden Isomere gelangen durch die Kombination von HMBC- und HMQC-Messungen. Ausschlaggebend für die Zuordnung der Isomere war dabei das Signal der Methinbrücke und der Methylgruppe an Position C3, das nur bei dem 2-Vinyl-Isomer auftreten kann (vgl. Abb. 80, Abb. 81).

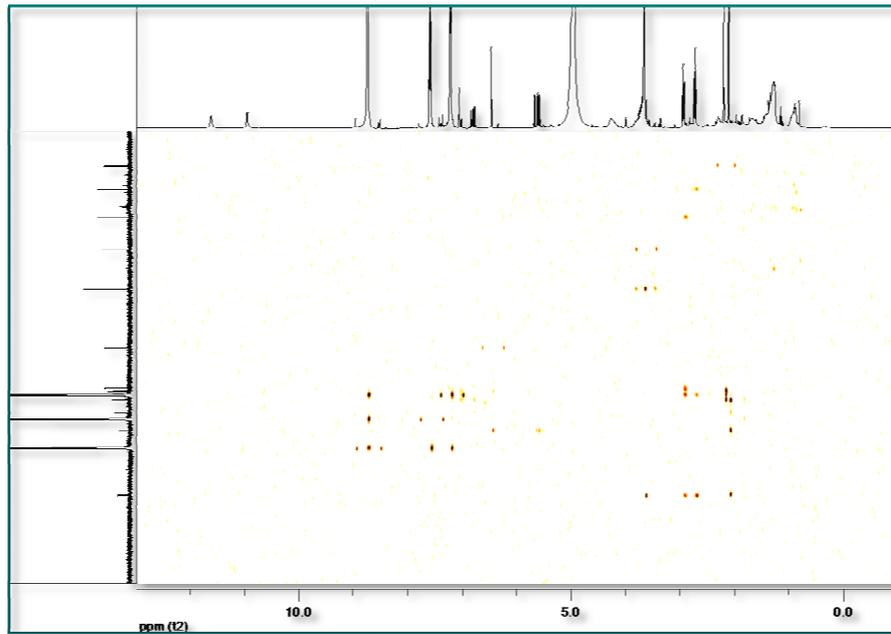


Abb. 80: HMBC-Spektrum des 3-Vinyl-Isomers (**64**) (Pyridin- d_5)

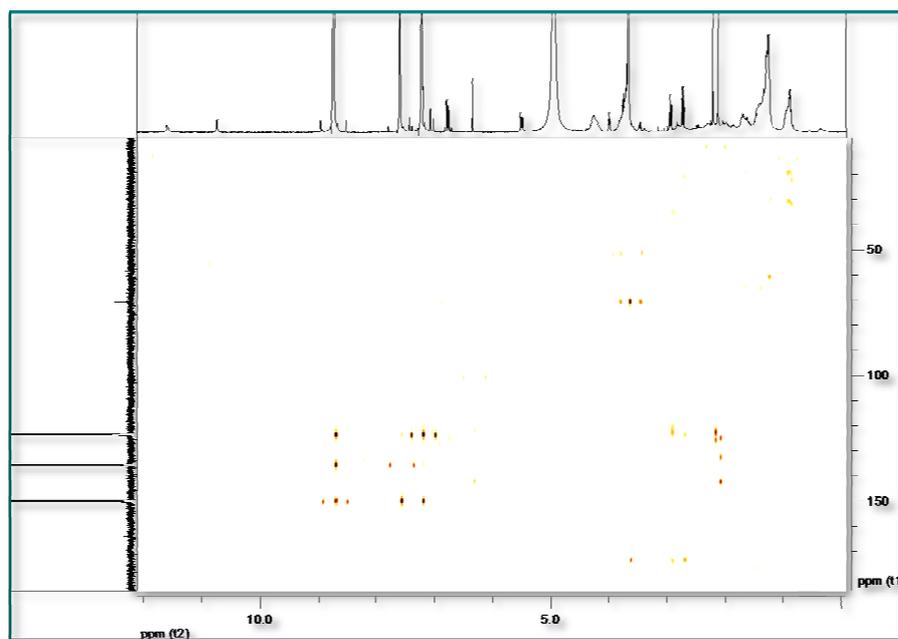


Abb. 81: HMBC-Spektrum des 2-Vinyl-Isomers (**65**) in Pyridin- d_5

4.2.4 Formylierung der AB-Hälfte (**67**)

Bei der Spaltung des Biliverdindimethylesters (**63**) werden beide Molekülhälften als Produkte erhalten. Bevor die beiden Molekülhälften wieder zusammengesetzt werden können, muss eine der beiden Hälften zur Kupplung aktiviert werden. Zugleich muss das spätere Methin-Brücken-Kohlenstoffatom, das bei der Addition von

Thiobarbitursäure zum Bestandteil des Nebenprodukts geworden ist, wieder ins Molekül eingeführt werden. Wie in Kapitel 3.2 beschrieben eignet sich der Verlust des der mittleren Methin-Brücke ausgezeichnet zur Einführung des schweren Isotops ^{13}C als Brückenatom. Beide Molekülhälften erweisen sich als für die Funktionalisierung geeignet. Auf Grund der etwas höheren Ausbeute an AB-Hälfte (**64**) wird diese für die Formylierung mittels Triethylorthoformiat (Formyl- ^{13}C , 99%; Euriso-Top GmbH) ausgewählt. Die Formylierung erfolgt, wie in Kapitel 4.1.6 bei der Funktionalisierung der CD-Hälfte (**27**) des PCBs (**3**) beschrieben, über eine elektrophile aromatische Substitution (vgl. Abb. 82).

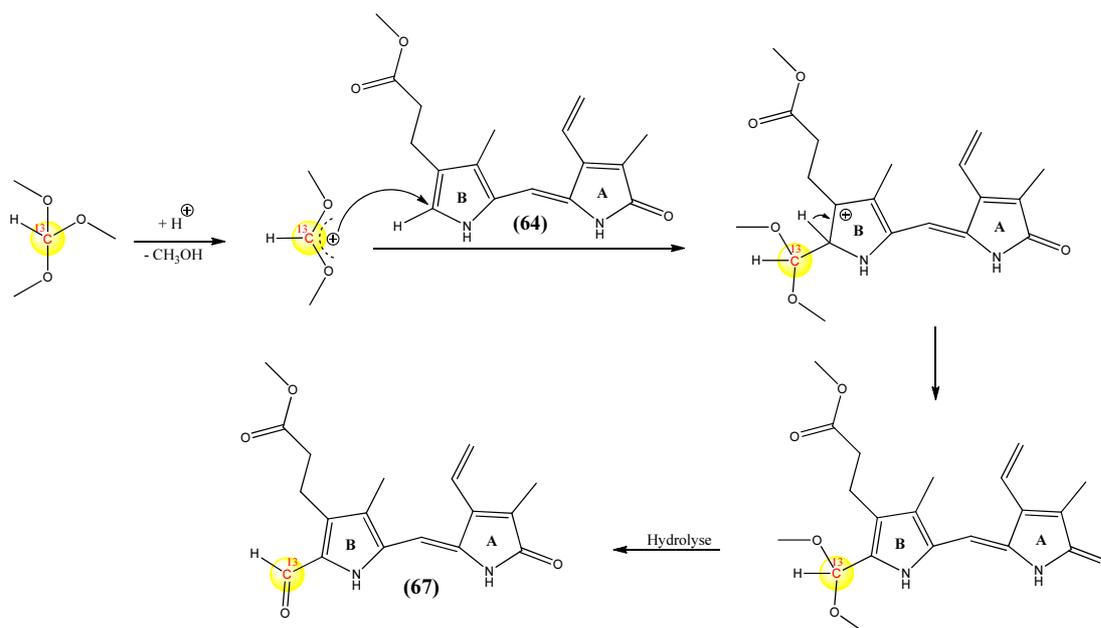


Abb. 82: Formylierung der AB-Hälfte (**64**) von Biliverdin (**1**) mittels Triethylorthoformiat^[70]

Das NMR-Spektrum unterscheidet sich von der unmarkierten Substanz durch die Aufspaltung des Formylsignals um 171.66 Hz. Das Fehlen des typischen Formylsignals bei 9.988 ppm zeigt, dass die Isotopenmarkierung vollständig ist (vgl. Abb. 131).

4.2.5 Kondensation der AB- (**67**) mit der CD-Hälfte (**65**)

Die Kondensation der formylierten AB- (**67**) mit der CD-Hälfte (**63**) des Biliverdins (**1**) erfolgt über einen zum PCB (**3**) differierenden Reaktionsweg. Versuche, die Kupplung unter den für PCB (**3**) in der Arbeitsgruppe etablierten Reaktionsbedingungen durchzuführen, führten zur vollständigen Zersetzung der unformylierten Reaktionskomponente (CD-Hälfte (**63**)), was sich anhand der dünnschichtchromatographischen Kontrollen der Reaktion und des Ausbleibens der typischen

Grünfärbung der Reaktionslösung nachweisen ließ. Schon bei der Aufnahme der NMR-Spektren der Molekülhälften wurde, wie oben beschrieben, die Erfahrung gemacht, dass die beiden Hälften in saurem Medium instabil sind. Daher wurde nach geeigneten Versuchsbedingungen für die Reaktion gesucht.

Zunächst wurde die Reaktion bei -10°C in Toluol durchgeführt und nur mit etwas (0.01%) Trifluoressigsäure angesäuert. Doch auch diese milderen Reaktionsbedingungen führten zur Zersetzung der α -unsubstituierten Molekülhälfte. Nachdem im sauren Medium Zersetzung zu beobachten war, wurde nach einer basenkatalysierten Kondensation gesucht. Pyridin als Reaktionsmedium und Base erwies sich als ungeeignet, da sich auch nach 48-stündigem Rühren bei Raumtemperatur nur die beiden Ausgangssubstanzen wieder isolieren ließen. Die von Inomata angewandte Methode zur Kupplung eines formylierten B/C-Rings (**22**) mit einem nicht aktivierten D-Ring (**26**) mittels DBU erwies sich ebenfalls als nicht praktikabel, da bei der Zugabe von DBU ein Farbumschlag von gelb nach orange auftrat und die α -unsubstituierte Molekülhälfte nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

Eichinger und Falk beschreiben 1987 die Kupplung eines Bipyrrols mit 4-Ethyl-3,5-dimethylpyrrol-2-carbaldehyd mittels Phosphorylchlorid^[94] zum Tripyrrin. Die Reaktionsbedingungen wurden hier für die Kupplung der beiden Molekülhälften insofern abgewandelt, dass beide Edukte erst in Dichlormethan gelöst und auf 0°C abgekühlt wurden und dann erst das Phosphorylchlorid zugegeben wurde. Die Aufarbeitung wurde wie bei der Kupplung mit Trifluoressigsäure durchgeführt. Bei der Zugabe von Phosphorylchlorid bildet sich direkt der Biliverdindimethylester (**63**), was anhand von Dünnschichtchromatographie-Kontrollen durch das Auftreten einer grünen Bande gut zu beobachten ist. Das Phosphorylchlorid greift nach einem der Vilsmeier-Reaktion ähnlichen Mechanismus nucleophil das Carbonylkohlenstoffatom des Aldehyds an. Das Formylierungsreagenz entsteht durch die Substitution von PO_2Cl_2^- gegen Chlorid. Das positivierte Kohlenstoffatom der „Formylgruppe“ greift dann in einer elektrophilen aromatischen Substitution die CD-Hälfte (**65**) an der α -unsubstituierten Position des C-Rings an. Die folgende Hydrolyse liefert unter Abspaltung von Chlorid und Deprotonierung das Kohlenstoffgerüst und das π -Elektronensystem des Biliverdindimethylesters (**63**).

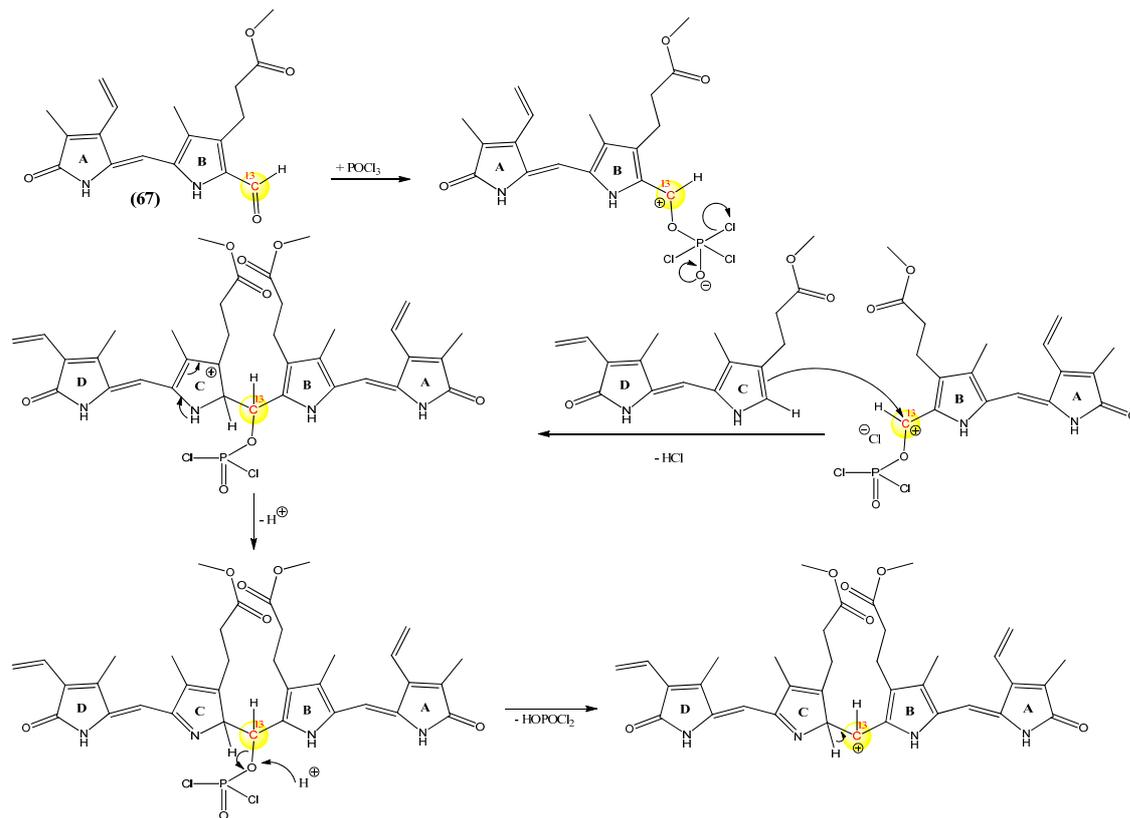


Abb. 83: Kupplung der formylierten AB- (67) mit der CD-Hälfte (65) zum (10-¹³C)Biliverdindimethylester (68)

4.2.6 Freisetzung von (10-¹³C)-Biliverdin IX α (62)

Die Freisetzung der Disäure des Biliverdins (62) wird wie für Phycocyanobilin (3) beschrieben an saurem Ionenaustauscher und Trifluoressigsäure durchgeführt (vgl. Kapitel 4.1.7). Der Chromophor wird dann nach der oben beschriebenen Methodik^[93] in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von P. Hildebrandt (Berlin) in die Apoproteine agp1 und cphB assembliert (vgl. Abb. 84) und mit RR-spektroskopischen Methoden untersucht.

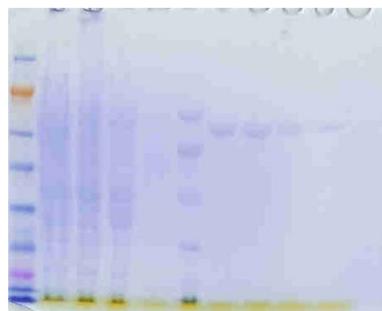


Abb. 84: links: Gelelektrophorese der Holo- und Apoproteine unter Verwendung eines SDS-PAGE-Gels und MOOS SDS-Puffer. Am linken Rand des Gels sind die Signale des Proteinmarkers SDS-PAGE Low Range (Bio-Rad) zusehen.

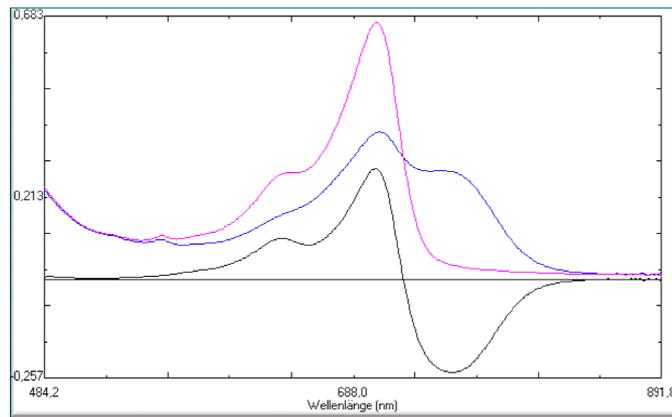


Abb. 85: UV/Vis-Spektrum von $(10\text{-}^{13}\text{C})\text{-BV}$ in Cph1. Blau: Spektrum des P_{fr} -Zustands des Phytochroms, Violett: Spektrum des Pr -Zustands des Phytochroms, Schwarz: Differenzspektrum

Die folgenden Ergebnisse sind noch nicht publiziert. Die RR-Spektren der beiden Phytochrome im P_{r} -Zustand zeigen im Vergleich zu den Spektren ohne Isotopenmarkierten Chromophor eine Aufspaltung des breiten Signals der drei Methinbücken (vgl. Abb. 86). In den RR-Spektren des P_{fr} -Zustands ist hingegen keine Aufspaltung des Signals zu beobachten. Die BC-Bande wird viel mehr durch die Einführung des schwereren Isotops näher zur CD-Bande verschoben, was zu einem schmalen Signal im Vergleich zum unmarkierten Phytochrom führt, insbesondere beim CphB.

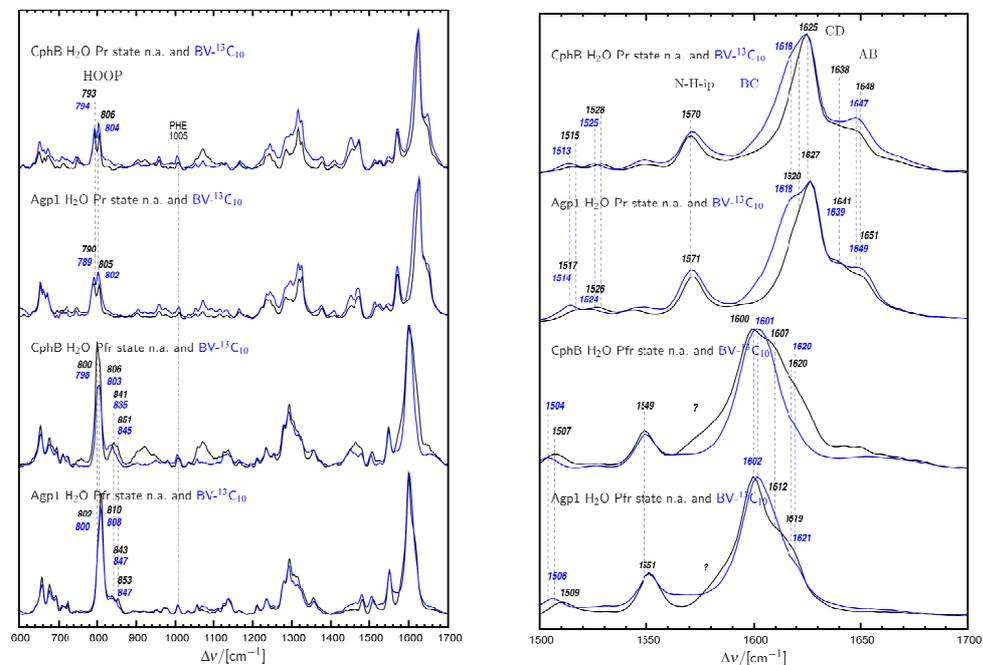


Abb. 86: A: Resonanz-Raman-Spektren von Agp1M15 und CphB im Pr und Pfr -Zustand (H_2O -Spektren, in schwarz und $\text{BV-}^{13}\text{C}_{10}$ in blau). B: Resonanz-Raman-Spektren von Agp1M15 und CphB im Pr und Pfr -Zustand (H_2O -Spektren, n.a. in schwarz und $\text{BV-}^{13}\text{C}_{10}$ in blau). In dieser Darstellung wird nur der ausgeweitete Markerbanden-Bereich gezeigt. (noch nicht publiziert)

Der Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium (vgl. Abb. 87) führt bei beiden Phytochromen im Spektrum des P_r -Zustands zur Verschiebung eines NH-Signals von 1571 cm^{-1} in Agp1 ohne isotopenmarkierten Chromophor (mit Isotopenmarkierung 1570 cm^{-1}) zu 1077 cm^{-1} (1076 cm^{-1}), in einen Bereich in dem sich im Spektrum mit H_2O keine Bande befindet. Die Spektren des P_{fr} -Zustands zeigen die gleiche Verschiebung an, die allerdings um ausgehend von 1551 cm^{-1} beim unmarkierten Chromophor (1550 cm^{-1}) zu 1064 cm^{-1} (1063 cm^{-1}). Die Wasserstoff Biegeschwingung aus der Ebene (HOOP = Hydrogen out of plane) im Bereich von 800 cm^{-1} zeigt keine Abhängigkeit von der Isotopenmarkierung. Das gleiche gilt für das CphB.

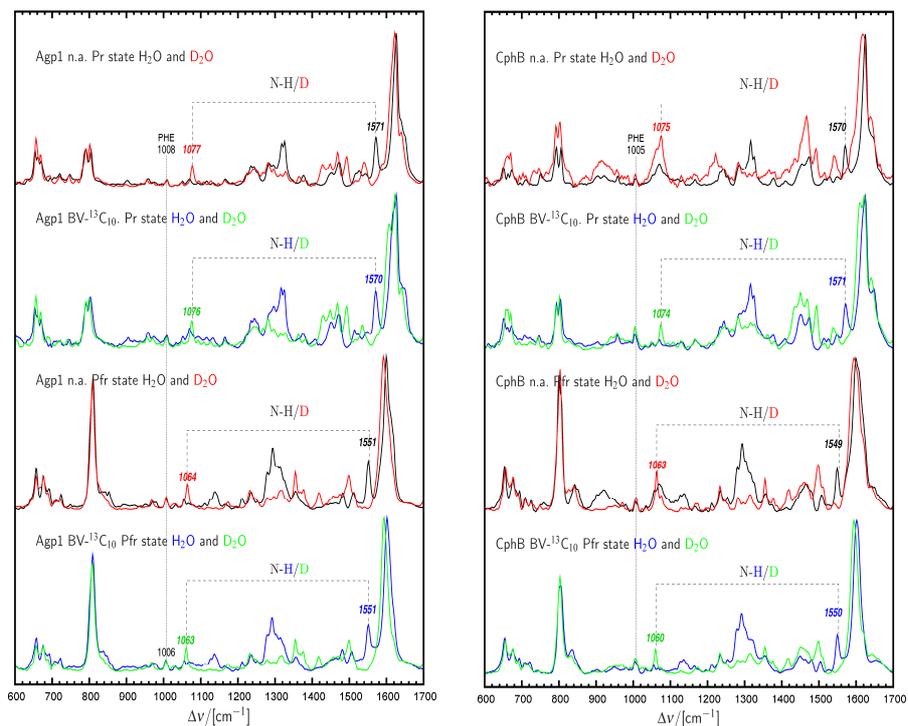


Abb. 87: A: Resonanz-Raman-Spektren Agp1M15 beider thermostabilen Zustände (P_r und P_{fr}) in H_2O und D_2O . B: Resonanz-Raman-Spektren CphB beider thermostabilen Zustände (P_r und P_{fr}) in H_2O und D_2O .

5 Ausblick

Phytochrome bleiben weiterhin ein spannendes Forschungsgebiet. Die genauen Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Proteinhülle sowie der Mechanismus der Signalübertragung, der durch die Photoisomerisierung des Chromophors induziert wird, sind derzeit noch unklar. Daher sollten zunächst die in dieser Arbeit angefertigten PCB-Vorstufen ((10,11- ^{15}N)-CD-Hälfte und (1- ^{13}C)-4,4-Dimethoxybutansäure) den ausgearbeiteten Konzepten entsprechend zu den jeweiligen isotopenmarkierten Phycocyanobilinen umgesetzt und ins Protein assembliert werden, damit die Zuordnung der einzelnen ^{15}NH -Signale in den NMR-Spektren möglich wird und ebenso anhand des (^{12}C - ^{13}C)-PCBs die Zuordnung der Propionsäure-Signale.

Die Synthese von weiteren isotopenmarkierten Chromophoren in Zusammenarbeit mit den verschiedenen spektroskopischen Methoden kann zukünftig zu tieferegreifenden Erkenntnissen der Abläufe während des Photocyclus führen. So würde zum Beispiel die Darstellung eines (^{8}C - ^{13}C)-markierten PCBs eventuelle Änderungen der Wechselwirkung zwischen dem Proteinsäurerest des B-Rings und dem Argininrest (R) 254 der Proteinhülle bei der Photoisomerisierung hervorheben.

Nachdem die mittlere Methinbrücke des Biliverdin IX α in dieser Arbeit die Identifizierung der C10-Methinbrücke im Ramanspektrum ermöglichte, sollten als nächstes die beiden verbleibenden Methinbrücken mit dem schwereren Isotop versehen werden. Damit würde die Zuordnung dieser beiden Signale im Ramanspektrum möglich werden. In Kombination von QM/MM-Hybridmethoden ergäbe sich somit ein Zugang zur genaueren Identifizierung der Konformation des Biliverdin IX α im Protein während der Photoreaktion. Da die Biliverdin-bindenden Phytochrome bisher nur sehr unzureichend spektroskopisch untersucht worden sind.

Die Kombination der verschiedenen spektroskopischen Methoden, unterstützt durch die Synthese von spezifisch isotopenmarkierten Chromophoren und Punktmutationen innerhalb der Proteintasche, sollten in Zukunft zur Klärung des Zusammenhangs zwischen der primären Photoreaktion und der biologisch relevanten Signaltransduktion beitragen.

6 Zusammenfassung

Phytochrome sind eine Familie von Photorezeptoren, die in nahezu alle höheren Pflanzen, Bakterien, Cyanobakterien, Pilzen und Moosen vorkommen. Der Photorezeptor besteht aus einem chromophortragenden Protein, das als optischer Schalter fungiert. Möglich wird dies durch die zwei thermisch stabilen Zuständen, meist P_r (r = red absorbing/ rotes Licht absorbierend) und P_{fr} (fr = far red absorbing/ dunkelrotes Licht absorbierend), in denen der Photorezeptor vorliegt. Die Absorption von rotem Licht führt zur Z/E-Isomerisierung des gebundenen Chromophors, bei dem es sich um ein offenkettiges Tetrapyrrol handelt, das über eine Thioether-Brücke an ein Cystein des Proteins gebunden ist. Bisher konnten drei verschiedene Chromophore in Phytochromen identifiziert werden: Phytochromobilin (PΦB) (**2**), Phycocyanobilin (**3**) und Biliverdin (BV) (**1**). Die lichtinduzierte Isomerisierung des Chromophors erfolgt an der C15-16-Doppelbindung des D-Rings, der dadurch aus der Z- in die E-Konformation übergeht. Die Isomerisierung ist reversibel und wird durch die Absorption von dunkelrotem Licht wieder umgekehrt. In Pflanzen steuert das Phytochrom eine Vielzahl von morphologischen Prozessen, wie die Keimung, Blütenbildung und die circadiane Rhythmik. Die Aufgabe der Phytochrome in anderen Organismen ist noch weitgehend unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl ^{13}C - und ^{15}N -markierte als auch strukturell modifizierte Tetrapyrrole für schwingungsspektroskopische und kernspinresonanzspektroskopische Messungen an Cph1 und PhyA dargestellt. Die Synthese der Tetrapyrrole erfolgte durch Totalsynthese und durch Extraktion aus dem Cyanobakterium *Spirulina platensis* mit anschließender Modifizierung. Die Totalsynthese folgte dem „klassischen“ Syntheseprinzip nach Gossauer, bei dem die Pyrrolringe zunächst einzeln aufgebaut, dann zur AB- und CD-Hälfte zusammengesetzt und schließlich zum Tetrapyrrol kondensiert werden. Zur Darstellung der gezielt isopenmarkierten Chromophore erwies sich der in der Arbeitsgruppe etablierten Reaktionsweg in den meisten Fällen als ungeeignet, sodass abhängig von der jeweiligen Isopenmarkierung und der Isopenquelle neue Synthesekonzepte entwickelt wurden.

Für die Darstellung von (22- ^{15}N)-Phycocyanobilin wurde, soweit bekannt, erstmalig ein Syntheseweg ausgehend von ^{15}N -Glycin entwickelt. Dieser Baustein wurde über drei Stufen zum Isonitril und dann zum C-Ring umgesetzt. Für die Synthese von (12 3 - ^{13}C)-Phycocyanobilin wurde eine Synthesefolge basierend auf (^{13}C)-Natriumcyanid und 3-Brompropionaldehyddimethylacetal entwickelt, die innerhalb von vier Schritten zum 4-Acetoxy-5-nitrohexansäuremethylester und dann zum C-Ring führt.

Es wurden zwei Phycocyanobiline mit jeweils einer ^{13}C -Isotopenmarkierung in den beiden äußeren Methinbrücken (C5 und C15) dargestellt. Als Isotopenquelle diente im Fall des (5- ^{13}C)-PCBs (2- ^{13}C)-2-Bromessigsäure und für das (15- ^{13}C)-PCB N,N-Dimethylformamid-(Carbonyl- ^{13}C). Die Synthese wurde für die spätere Assemblierung ins jeweilige Protein bis zur Freisetzung der Disäure durchgeführt. Die markierten Chromophore wurden in Cph1 und PhyA assembliert und schwingungsspektroskopisch untersucht. Das (15- ^{13}C)-PCB wurde ebenfalls in Kooperation mit den Arbeitsgruppen von P. Hildebrandt und M.A. Mroginski (Berlin) in PhyA und Cph1 assembliert und ermöglichte die Zuordnung des C15-Signals im Ramanspektrum. Zusammen mit simulierten Ramanspektren, die mit einer neuen QM/MM-Hybridmethode berechnet wurden, konnte die kristallographisch ermittelte ZZZssa-Konformation des Chromophors im P_r -Zustand des Photoreceptors und die ZZEssa-Konformation des P_{fr} -Zustands verifiziert werden (noch nicht publiziert). Das (15- ^{13}C)-PCB wurde zudem in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von C. Lagarias (Davies, USA) und R.A. Mathies (Berkeley, USA) ebenfalls in Cph1 assembliert und mit Femtosekunden Ramanspektroskopischen Methoden untersucht. Die Messungen der nichtplanaren Biegeschwingung des Wasserstoffs der CD-Methinbrücke ist ein starkes Indiz für die Z/E-Isomerisierung des D-Rings, was die neu aufgekommene Vermutung der Isomerisierung des A-Rings widerlegt.

Neben den isotopenmarkierten Phycocyanobilinen wurde Phycocyanobilin aus dem Cyanobakterium *Spirulina platensis* isoliert. Die während der Methanolyse zusätzlich entstehenden Methanoladdukte wurden abgetrennt und charakterisiert. Darauf folgende kernspinresonanzspektroskopische Messungen sollten zur genaueren Bestimmung der Methanoladdukte führen. Anschließend wurde das isolierte PCB für kernspinresonanzspektroskopische Messungen zu einem ^3H -Cysteinaddukt umgesetzt. Das isolierte PCB wurde zudem nach der Methode von Manitto und Monti mittels Thiobarbitursäure gespalten und die erhaltenen Spaltheilften charakterisiert.

Als zweiter in den nativen Phytochromen vorkommender Chromophor wurde Biliverdin IX α durch Oxidation von Bilirubin dargestellt. Durch Spaltung des Chromophors und anschließendes Wiederaussetzen unter Einführung einer Isotopenmarkierung in der neu entstehenden Brücke wurde (10- ^{13}C)-Biliverdin IX α synthetisiert. Das (10- ^{13}C)-Biliverdin IX α wurde in Agp1 und CphB assembliert und ebenfalls in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von P. Hildebrandt (Berlin) schwingungsspektroskopischen Methoden unterzogen. Die ^{13}C -Markierung führte zur Aufspaltung des normalerweise breiten Methinbrückensignals und ermöglichte so die Identifizierung des Signals der mittleren Methinbrücke (noch nicht publiziert).

7 Summary

Phytochromes form a class of ubiquitous photoreceptors occurring in higher plants, bacteria, cyanobacteria, fungi and mosses. The photoreceptor is constituted as a Chromophore-bearing protein that acts as an optical switch. Photoswitching occurs between two thermal stable states P_r (red absorbing) and P_{fr} (far red absorbing) of the receptor. Absorption of red light induces a Z/E isomerization of the 15-16 double bond of the bilin chromophore. The chromophore is attached to a cysteine residue of the protein via a thio-ether linkage. Three different types of chromophores have been identified in phytochromes: phytochromobilin (PΦB) **(2)**, phycocyanobilin (PCB) **(3)** and biliverdin (BV) **(1)**. Light induced isomerization takes place at the D-ring 15-16 double bond by which the chromophore is converted from its Z- to the E-conformer. Absorption of far red light reverts the receptor to its P_{fr} -form. In plants phytochromes control a multitude of morphological processes such as germ formation, flowering and the circadian clock. The phytochrome functions in other organisms are still unclear.

In the present work tetrapyrroles have been synthesized carrying ^{13}C and ^{15}N labels. They were employed for vibrational and nuclear magnetic resonance spectroscopy of the Cph1 and PhyA proteins. In addition chromophores with structural modifications have been generated. The tetrapyrroles have been synthesized by a de-novo approach as also via extraction from *Spirulina platensis*. In this case, the obtained PCB was modified at the ethylidene side chain of the A-ring. Total synthesis followed the classical route by Gossauer starting by synthesizing the pyrrole rings separately, then generating the AB- and CD-half of the molecule and finally condensed both parts to form the Tetrapyrrole molecule. The preparation of the specifically labeled chromophores required an alternative route distinct from that one originally established in the workgroup. For that reason new synthetic routes have been developed - depending on the specific labeling requested and the isotope origin.

As far as known (22- ^{15}N)-phycocyanobiline was synthesized for the first time starting with ^{15}N glycine. Within two steps this starting material could be converted to the isonitrile and afterwards composed to form the C-ring. The synthesis of (12 3 - ^{13}C)-phycocyanobilin was performed by beginning with the reaction of (^{13}C)-sodium cyanide with 3-bromo-propionaldehyde dimethylacetal. The reaction pathway yielded 4-acetoxy-5-nitrohexane methylester in four steps. This product could then be converted furthermore to yield ring C.

Furthermore two phycocyanobilins have been synthesized carrying an isotope-labelling in the outer methine bridges (C5 and C15). (2- ^{13}C)-2-Bromo acetic acid was used as isotope source for the (5- ^{13}C)-phycocyanobiline, and for the synthesis of (15- ^{13}C)-

phycocyanobiline dimethylformamide was used. For the auto-assembly with the protein the esters had to be converted into the di-acid. The chromophore was assembled to Cph1 and PhyA which were then subjected to vibrational spectroscopy. The (15-¹³C)-phycocyanobiline was incorporated likewise to PhyA and Cph1 which were then studied in collaboration with the groups of P. Hildebrandt and M.A. Mroginski (Berlin). As a result, it was possible to identify the C15 signal of the RR-spectrum. The combination of experimental RR-spectra with simulated spectra which have been achieved via a new QM/MM hybrid methodology allowed the ZZZssa conformation of the chromophore to be confirmed in the protein pocket (unpublished). Such geometry had been formerly proposed by the crystallography studies. In addition, (15-¹³C)-phycocyanobilin was also assembled to Cph1 and studied by femtosecond stimulated Raman spectroscopy in the groups of C. Lagarias (Davies, USA) and R.A. Mathies (Berkeley, USA). The measurements of the hydrogen out of plane vibrations of the CD Methin-bridge gave crucial evidence for the Z/E isomerization taking place at this position adjacent to the D-ring. These results clearly contradict a recently presentend assumption of a photo-induced isomerization at the A-ring methane-bridge.

Besides the isotopic labeling of phycocyanobiline (**3**), the chromophore was also extracted from *Spirulina platensis*. In addition to the chromophore itself, two by-products have been isolated and characterized. The compounds originate from a nucleophilic attack of the methanol (solvent) at the chromophore ethylidene group ("methanol adducts"). Nuclear magnetic resonance spectroscopy measurements (still to be performed) would then lead to a precise analysis of the methanol adducts. The isolated phycocyanobilin was also converted into a ³¹-cysteine adduct for nuclear magnetic resonance spectroscopy measurements. Also, isolated PCB was cleaved by thiobarbituric acid following the method of Manitto and Monti, giving a ready access to either (left or right) half of PCB. The cleaving products have been characterized.

As biliverdine IX α is serving also as a native phytochrome chromophore, it was synthesized through the oxidation of bilirubin for further studies. After chromophore cleavage and recondensation of both halves, (19-¹³C)-biliverdin IX α could be prepared. The incorporation of the ¹³C source enabled the recondensation and yielded the new C10 methin-bridge. This material (10-¹³C)-biliverdin was assembled to Agp1 and CphB by the group of P. Hildebrandt (Berlin) and analysed by RR-spectroscopy. The isotopic labeling of the C10 methin-bridge resulted in splitting of the usually broad signal for this structural element hence allowing an identification of the signal of the central methin-bridge (unpublished).

8 Experimentalteil

8.1 Geräte, Materialien und Methoden

8.1.1 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden auf Geräten der Firma Bruker aufgenommen: DRX 500 (500 MHz für ^1H -NMR, 126 MHz für ^{13}C -NMR), DRX 400 (400 MHz für ^1H -NMR, 101 MHz für ^{13}C -NMR) und ARX 250 (250 MHz für ^1H -NMR, 63 MHz für ^{13}C -NMR). Die Multiplizität der Signale wird durch die Abkürzungen s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett) und m (Multipllett) angegeben. Bei der Datensoftware handelte es sich um „TopSpin 1.3“ der Firma Bruker. Die Bearbeitung und Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software „MestReNova“ der Firma Mestrelab Research.

8.1.2 UV/VIS-Spektroskopie

Die Aufnahme der UV/VIS-Absorptionsspektren erfolgte auf Geräten der Firma Shimadzu (UV-2401 PC). Die Aufnahme der Daten und die anschließende Konvertierung in ASCII wurden mit der UVPC-Software 3.9 von Shimadzu durchgeführt. Bei den Küvetten handelte es sich um Quarzglas Küvetten (Suprasil[®]) der Firma Hellma mit einer Schichtdicke von 1 cm. Die zur Aufnahme der Spektren verwendeten Lösungsmittel besaßen die Reinheit Uvasol[®].

8.1.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektren der Elektronenstoß-Methode (EI) wurden auf Spektrometern der Firma Finnigan gemessen (MAT 8200, MAT 8400 oder MAT SSQ 7000) mit einer Ionisierungsenergie von 70 eV. Die Massenspektren der Elektronenspray-Methode (ESI) wurden entweder mit einem Quadrupol Spektrometer der Firma Hewlett Packard oder einem Esquire 3000 Spektrometer der Firma Bruker aufgenommen. In den Spektren sind die Massenzahlen in m/z und die relativen Intensitäten der Peaks in % angegeben. Die hochaufgelösten Massenspektren wurden mit einem Finnigan MAT 95 Spektrometer gemessen. Als Auswertung sind sowohl die berechneten als auch die experimentellen Massen angegeben. Bei den isotoopenmarkierten Substanzen wurde teilweise um weitere Ausbeuteverluste zu vermeiden auf die Aufnahme von Massenspektren verzichtet.

8.1.4 Säulenchromatographie

Analytische Dünnschichtchromatogramme wurden entweder auf Kieselgel 60 F₂₅₄ DC-Aluminiumfolien (Schichtdicke 0.25 mm) oder auf Aluminiumoxid 60 F₂₅₄ DC-Fertigplatten von Merck durchgeführt. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

Trennungen mittels Flash-Chromatographie wurden bei maximal 3.1 bar über RediSep[®]-Kieselgel-Kartuschen (Korngröße 35-70 μm) der Firma Teledyne Isco auf einem CombiFlash[®] Companion[®] Chromatographiesystem von Teledyne Isco durchgeführt.

8.1.5 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie

Trennungen mittels präparativer HPLC wurden auf einem Chromatographiesystem bestehend, aus zwei gekoppelten Gradientenpumpen des Typs 305 und 306 der Firma Gilson, einem Detektor SPD-10AV VP der Firma Shimadzu sowie einem Fraktionssammler des Typs 206 der Firma Gilson, durchgeführt. Analytische Mengen wurden mit einem Chromatographiesystem der Firma Shimadzu getrennt, bestehend aus einem Controller des Typs SCL-10A VP, zwei gekoppelten Gradientenpumpen des Typs LC-10AV VP und einem Detektor des Typs SPD-M10 VP. Für beide HPLC-Methoden wurden Säulen des Typs Nucleosil 7-100 (Silica, Korngröße 7 μm) und Cromasil RP-C₁₈ ODS-5-100 (RP-C₁₈, Korngröße 5 μm) verwendet. Die Größe der analytischen Säulen betrug 125 mm • 4.6 mm. Die Größe der präparativen Säulen betrug 250 mm • 21 mm.

8.2 Lösungsmittel und Reagentien

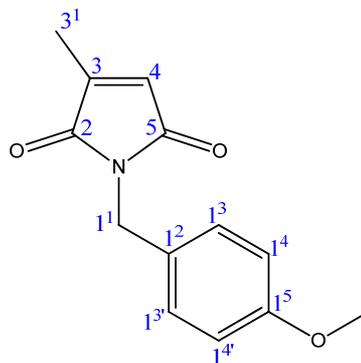
Acetonitril	Baker, mind. 99%
Acrylsäuremethylester	Merck, stabilisiert mit Hydrochinonmonomethylester, z.S.
Ameisensäure	Merck, z.A. 98 – 100%
Ammoniumcer-(IV)-nitrat (CAN)	Merck, z.A.
Benzylalkohol	Merck, z.A.
2-Bromessigsäurebenzylester	Acros,
Chloressigsäure- <i>tert</i> -butylester	Acros, 97%
Chloroform	Merck, p.a.
Chloroform-d ₁	Deutero GmbH, 99,8%
Citraconsäureanhydrid	Alfa Aesar, 98%
Deuteriumoxid	Deutero GmbH, 99,9%
1,8-Diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-en (DBU)	Acros, 98%
Dimethylaminopyridin (DMAP)	Acros, 99%
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, z.A.
Dimethylsulfoxid-d ₆	Deutero GmbH, 99,9%
Eisen-(II)-sulfat Heptahydrat	Riedel-de Häen extra pure
Essigsäure 100%	Merck, z.A.
Essigsäureanhydrid	Merck, z.A.
Formamid	Acros, 99,5% extra pure
¹⁵ N-Glycin	Cambridge Isotope Laboratories
n-Hexan	Roth, ≥ 95% z.S.
Hydrazinhydrat	Sigma-Aldrich
Ionenaustauscher (DOWEX)	Sigma-Aldrich (50WX8 200)
Isooctan	Merck, Uvasol
Kaliumcarbonat	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, z.A.
Kaliumhydroxid	Merck, extra pure
Magnesiumsulfat	Merck, reinst
4-Methoxybenzylamin	Acros, 98%
Natrium	Merck, Stangen
Natriumacetat	Merck, wasserfrei z.A.
Natriumcarbonat	Merck, wasserfrei z.A.
Natriumchlorid	Merck, z.A.
Natriumformiat	Fluka, purum z.A.

Natriumhydrogencarbonat	Acros, 99,5% z.A.
Natriumhydroxid	Merck, reinst
Natriumiodid	Acros, 99
Natriumsulfat	Merck, wasserfrei
Nitroethan	Acros, 98+%
Nitromethan	Merck, z.S.
Phosphorylchlorid	Aldrich, 99%
2-Propanol	Merck, z.A.
Pyridin	Merck, z:A. über KOH getrocknet
Pyridin-d ₅	Deutero GmbH, 99.5%
Salzsäure	Merck, 37% z.A.
Schwefelsäure	Merck, 95 – 97% z.A.
Sulfurylchlorid	Acros, 98,5%
Tetrahydrofuran	Sigma-Aldrich, puriss p.a. stabilized
Tetramethylguanidin	Acros, 99%
Thionylchlorid	Fluka, purum >99%
Toluol	Merck, z.A. über Molekularsieb getrocknet
Toluol-4-sulfonsäuremonohydrat	Merck, z.A.
Triethylamin	Merck, z.S.
Trifluoressigsäure	Acros
Trimethylorthoformiat	Merc, z.S.
Wasserstoffperoxid	Merck, z.A. 30%
(2S)-(3S)-(-)-Weinsäure	Acros, z-S.
Zinkchlorid	Merck, z.A.

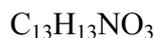
8.3 Synthese des Phycocyanobilins

8.3.1 Synthese des A-Rings (5)

8.3.1.1 Darstellung von (4-Methoxybenzyl)-3-methylpyrrol-2,5-dion (7)^[64,68]



(7)



$$M = 231.25 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Inertgasatmosphäre werden 9.0 ml (98 mmol) Citraconsäureanhydrid in 600 ml Toluol gelöst. Dann werden unter Eiskühlung 13 ml (89.40 mmol) 4-Methoxybenzylamin zugegeben und die Reaktionsmischung wird 19 h zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das zurückbleibende gelbe Öl wird in 100 ml Ethylacetat aufgenommen und fünfmal mit jeweils 100 ml Wasser gewaschen. Anschließend wird zweimal mit jeweils 100 ml einer gesättigten Natriumchloridlösung gewaschen und die organische Phase anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt. Zurück bleibt das Produkt als gelblich kristalliner Feststoff.

Ausbeute = 22.66 g (98.00 mmol; 100%)

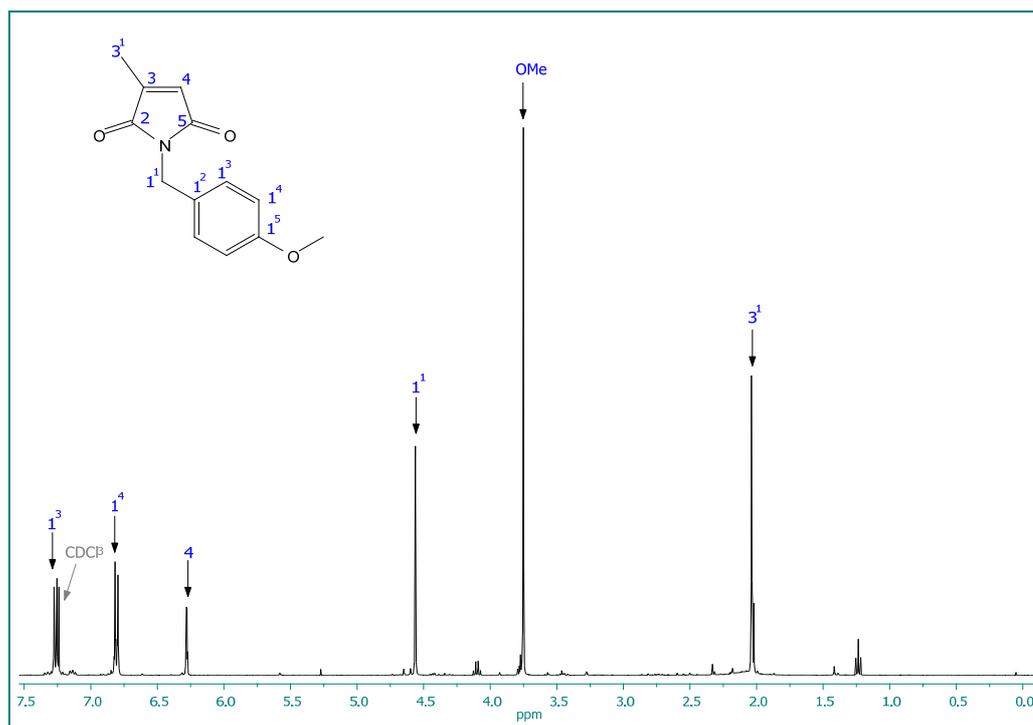


Abb. 88: ^1H -NMR-Spektrum von (4-Methoxybenzyl)-3-methylpyrrol-2,5-dion (**7**) in CDCl_3 (400 MHz)

^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz)

δ (ppm) = 2.04 (d, 3H, $J = 1.88$ Hz, $\text{C}3^1$); 3.75 (s, 3H, OMe); 4.56 (s, 2H, $\text{C}1^1$); 6.28 (d, 1H, C4); 6.81 (m, 2H, $\text{C}1^4$); 7.27 (m, 2H, $\text{C}1^3$)

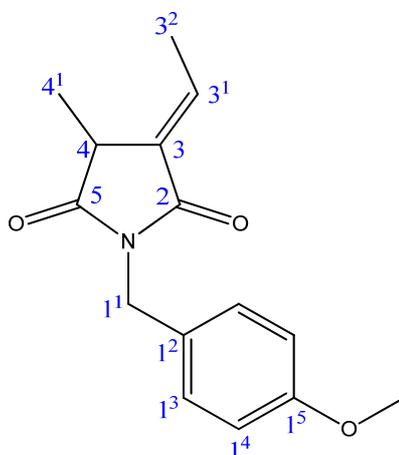
^{13}C -NMR-Spektrum (CDCl_3 , 100 MHz)

δ (ppm) = 10.90 ($\text{C}3^1$); 40.93 ($\text{C}1^1$); 55.21 (OMe); 113.96 ($\text{C}1^4$); 127.34 (C4); 128.73 ($\text{C}1^3$); 129.88 ($\text{C}1^2$); 145.68 (C3); 159.16 ($\text{C}1^5$); 170.51 (C2); 171.52 (C5)

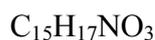
Massenspektrum (EI)

m/z (%) = 231 (100, $[\text{M}]^+$); 203 (6); 188 (34); 174 (4); 160 (5); 134 (20); 121 (21); 108 (40); 77 (11)

8.3.1.2 Darstellung von (E)-3-Ethyliden-1-(4-methoxybenzyl)-4-methyl-pyrrolidin-2,5-dion (8)^[64,68]



(8)



$$M = 259.3 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Inertgasatmosphäre werden 23.88 ml (0.160 mol) 1,8-Diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-en (DBU) in 400 ml (5.595 mol) Nitroethan gelöst und auf 0°C abgekühlt. Dann werden 36.80 g (0.142 mol) (4-Methoxybenzyl)-3-methylpyrrol-2,5-dion (7) zugegeben und die Reaktionsmischung 1 h bei 0°C gerührt. Die gelbe Lösung wird mit 1600 ml Ethylacetat versetzt und viermal mit jeweils 1000 ml destilliertem Wasser gewaschen. Dann wird zweimal mit jeweils 800 ml einer gesättigten Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird chromatographisch über Kiesegel (Merck 60) mit n-Hexan und Ethylacetat (3:1) als Laufmittelgemisch grob vorgereinigt und die Enantiomere anschließend mittels HPLC über RPC18-Material mit Wasser und Acetonitril (1:1) getrennt. Die Hauptmenge des Lösungsmittels wird unter Vakuum entfernt, der verbleibende Rest wird anschließend durch Gefriertrocknung entfernt. Zurück bleibt das Produkt als gelbliches Öl.

Ausbeute = 7.473 g (28.82 mmol; 20%)

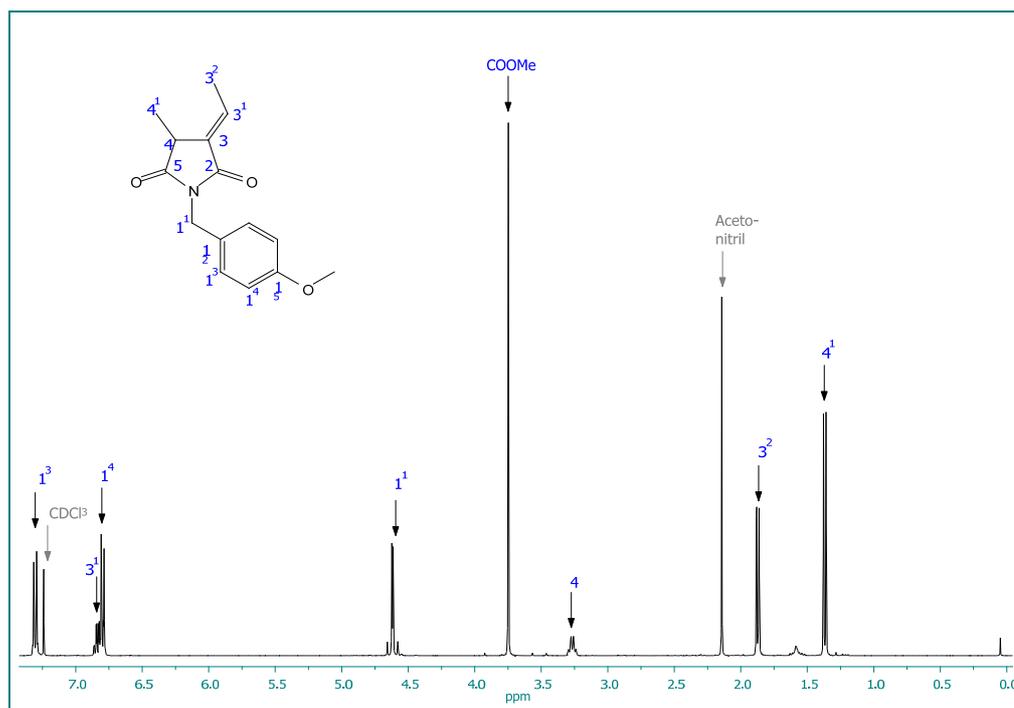


Abb. 89: ^1H -NMR-Spektrum von (E)-3-Ethyliden-1-(4-methoxybenzyl)-4-methylpyrrolidin-2,5-dion (**8**) in CDCl_3 (400 MHz)

^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3 ; 400 MHz)

δ (ppm) = 1.37 (d, 3H, $^3\text{J} = 7.47$ Hz, $\text{C}4^1$); 1.87 (d, 3H, $^3\text{J} = 7.26$ Hz, $\text{C}3^2$); 3.27 (q, 1H, $^3\text{J} = 7.42$ Hz, C4); 3.75 (s, 3H, OMe); 4.62 (d, 2H, $^3\text{J} = 3.68$ Hz, $\text{C}1^1$); 6.80 (d, 2H, $^3\text{J} = 8.73$ Hz, $\text{C}1^4$); 6.39 (dq, 1H, $^3\text{J} = 7.76$ Hz, $^4\text{J} = 2.16$ Hz, $\text{C}3^1$); 7.36 (d, 2H, $^3\text{J} = 8.68$ Hz, $\text{C}1^3$)

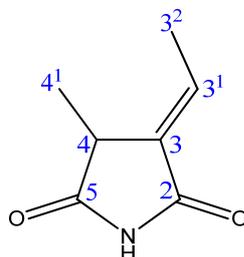
^{13}C -NMR-Spektrum (CDCl_3 , 100 MHz)

δ (ppm) = 14.78 ($\text{C}3^2$); 15.64 ($\text{C}4^1$); 37.36 (C4); 41.62 ($\text{C}1^1$); 55.24 (OMe); 113.93 ($\text{C}1^4$); 128.34 ($\text{C}1^2$); 130.19 ($\text{C}1^3$); 131.99 (C3); 134.23 ($\text{C}3^1$); 159.19 ($\text{C}1^5$); 169.27 (C2); 177.91 (C5)

Massenspektrum (EI)

m/z (%) = 259 (100, $[\text{M}]^+$); 230 (7); 216 (25); 202 (11); 134 (15); 121 (80); 68 (17)

8.3.1.3 Darstellung von (E)-3-Ethyliden-4-methylpyrrolidin-2,5-dion **(9)** ^[64,68]

**(9)**

$$M = 139.15 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

7.473 g (28.64 mmol) (E)-3-Ethyliden-1-(4-methoxybenzyl)-4-methylpyrrolidin-2,5-dion **(8)** werden in 290 ml Acetonitril gelöst und mit 100 ml destilliertem Wasser und 39.66 g (72.34 mmol) Ammoniumcer-(IV)-nitrat (CAN) versetzt. Die Reaktionsmischung wird 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung mit 300 ml Ethylacetat extrahiert und die wässrige Phase danach dreimal mit 75 ml Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und dreimal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 80 ml Methanol aufgenommen und mit 0.57 ml (1.583 mmol) Hydrazinhydrat versetzt. Nach fünfstündigem Rühren wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der gelborangefarbene Rückstand wird in 200 ml Ethylacetat und 200 ml destilliertem Wasser aufgenommen und die Phasen voneinander getrennt. Die wässrige Phase wird dreimal mit 100 ml Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und dreimal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Kieselgel (Merck 60) mit Dichlormethan und Ethylacetat (6:1) als Laufmittelgemisch gereinigt. Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Produkt wird als orangefarbener Feststoff erhalten.

Ausbeute = 1.623 g (11.66 mmol; 41%)

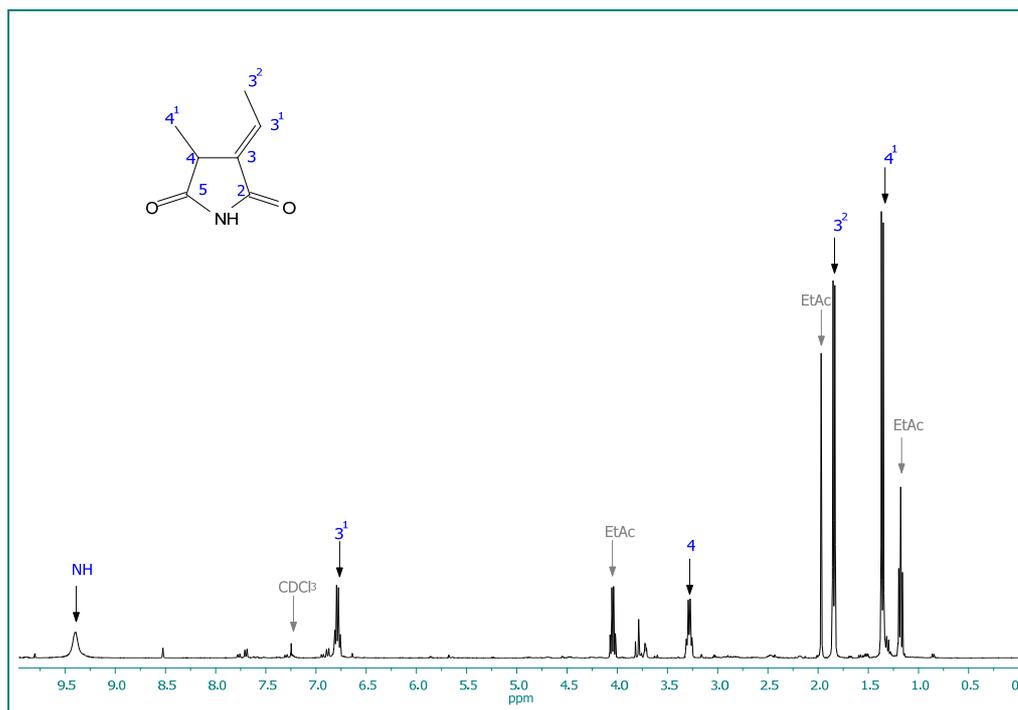


Abb. 90: ^1H -NMR-Spektrum von (E)-3-Ethyliden-4-methylpyrrolidin-2,5-dion (**9**) in CDCl_3 (400 MHz)

^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3 ; 400 MHz)

δ (ppm) = 1.34 (d, 3H, $^3J = 7.36$ Hz, C4^1); 1.83 (d, 3H, $^3J = 7.55$ Hz, C3^2); 3.28 (q, 1H, $^3J = 7.25$ Hz, C4); 6.78 (q, 1H, $^3J = 7.33$ Hz, C3^1); 9.39 (s, breit, NH)

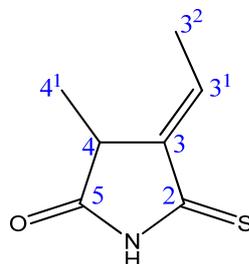
^{13}C -NMR-Spektrum (CDCl_3 ; 100 MHz)

δ (ppm) = 14.53 (C3^2); 15.27 (C4^1); 38.20 (C4); 132.75 (C3); 134.82 (C3^1); 170.07 (C2); 178.96 (C5)

Massenspektrum (GC-EI)

m/z (%) = 139 (17, $[\text{M}]^+$); 96 (100); 67 (68), 53 (30); 39 (21)

8.3.1.4 Darstellung von (E)-3-Ethyliden-4-methyl-2-thiosuccinimid (5)^[64,68]



(5)



$$M = 155.22 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Inertgasatmosphäre werden 4.0 g (9.89 mmol) Lawesson-Reagenz (**6**) in 30 ml 1,4-Dioxan gelöst und zum Rückfluss erhitzt. Dann werden zu der siedenden Lösung 1.623 g (11.66 mmol) (E)-3-Ethyliden-4-methylpyrrolidin-2,5-dion (**9**) gelöst in 9 ml 1,4-Dioxan zu gegeben und die Reaktionsmischung 20 min weiter erhitzt. Die orangerote Lösung wird auf einem Eisbad abgekühlt und der feine, farblose Niederschlag über eine dünne Schicht Celite abfiltriert. Das Filtrat wird unter Vakuum zur Trockene eingeeengt. Das dunkelrot gefärbte ölige Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Kieselgel (Merck 60) zunächst mit Dichlormethan getrennt. Nach dem die Banden nicht mehr wandern, werden sie mit Ethylacetat und n-Hexan (1:3) und abschließend mit reinem Ethylacetat getrennt. Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

Ausbeute = 389 mg (2.566 mmol; 22%)

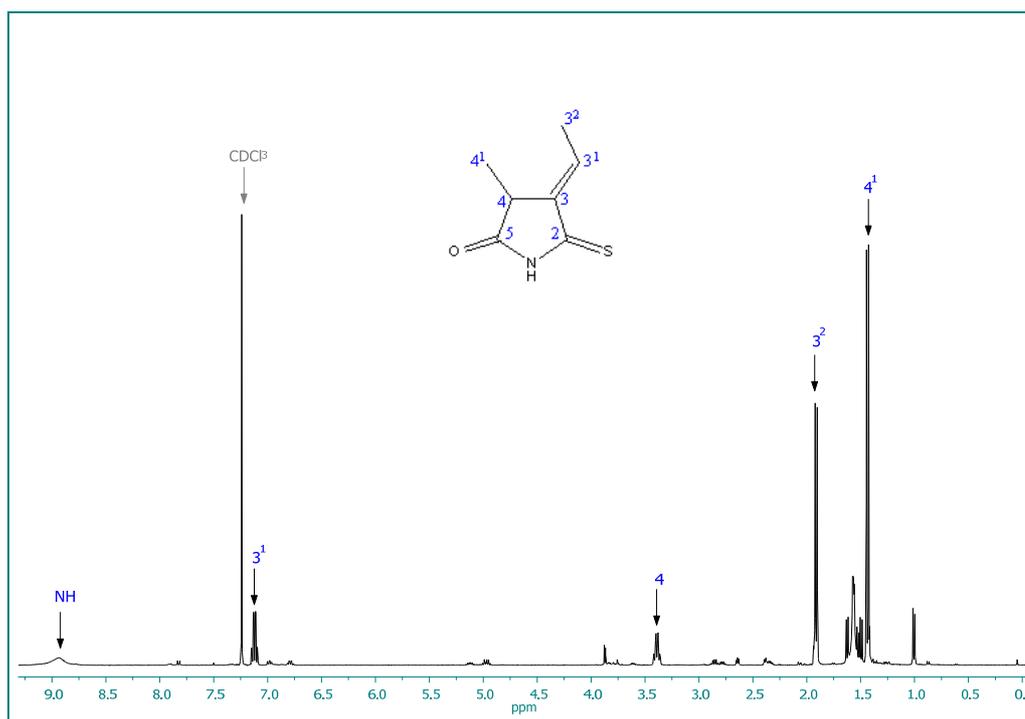


Abb. 91: ¹H-NMR-Spektrum von (E)-3-Ethyliden-4-methyl-2-thiosuccinimid (**5**) in CDCl₃ (400 MHz)

¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃; 400 MHz)

δ (ppm) = 1.44 (d, 3H, ³J = 7.61 Hz, C4¹); 1.91 (d, 3H, ³J = 7.41 Hz, C3²); 3.39 (q, 1H, ³J = 7.51 Hz, C4); 7.12 (q, 1H, ³J = 7.43 Hz, C3¹), 8.98 (s, breit, NH)

¹³C-NMR-Spektrum (CDCl₃; 100 MHz)

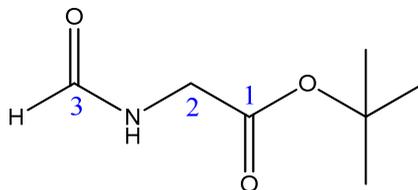
δ (ppm) = 15.56 und 15.57 (C3² und 4¹); 38.44 (C4); 137.75 (C3¹); 139.94 (C3); 179.05 (C5); 200.35 (C2)

Massenspektrum (EI)

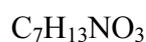
m/z (%) = 155 (100, [M]⁺); 140 (18); 126 (13), 112 (13); 94 (20); 67 (19); 39 (14) ppm

8.3.2 Synthese der B-/C-Ringvorstufe (10)

8.3.2.1 Darstellung von N-Formylglycin-*tert*-butylester (15)^[64,70]



(15)



$$M = 158.18 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Inertgasatmosphäre werden 18 g (0.783 mol) Natrium in 320 ml Methanol gelöst. Dann werden 230 ml (5.77 mol) Formamid zugetropft und das überschüssige Methanol unter Vakuum entfernt. Es werden 100 ml (700 mmol) Chloressigsäure-*tert*-butylester zugegeben, ohne dass sich die Reaktionsmischung merklich erwärmt. Daraufhin wird die Reaktionsmischung 2 h bei 60°C zum Rückfluss erhitzt. Die Mischung wird auf 1000 ml Eiswasser gegeben und fünfmal mit jeweils 200 ml Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Dann wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das orange-braune Rohprodukt wird im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert. Das Produkt wird als farblose Flüssigkeit erhalten.

Siedepunkt (4.2×10^{-2} mbar) = 65-80°C

Ausbeute = 45.47 g (0.286 mol; 41%)

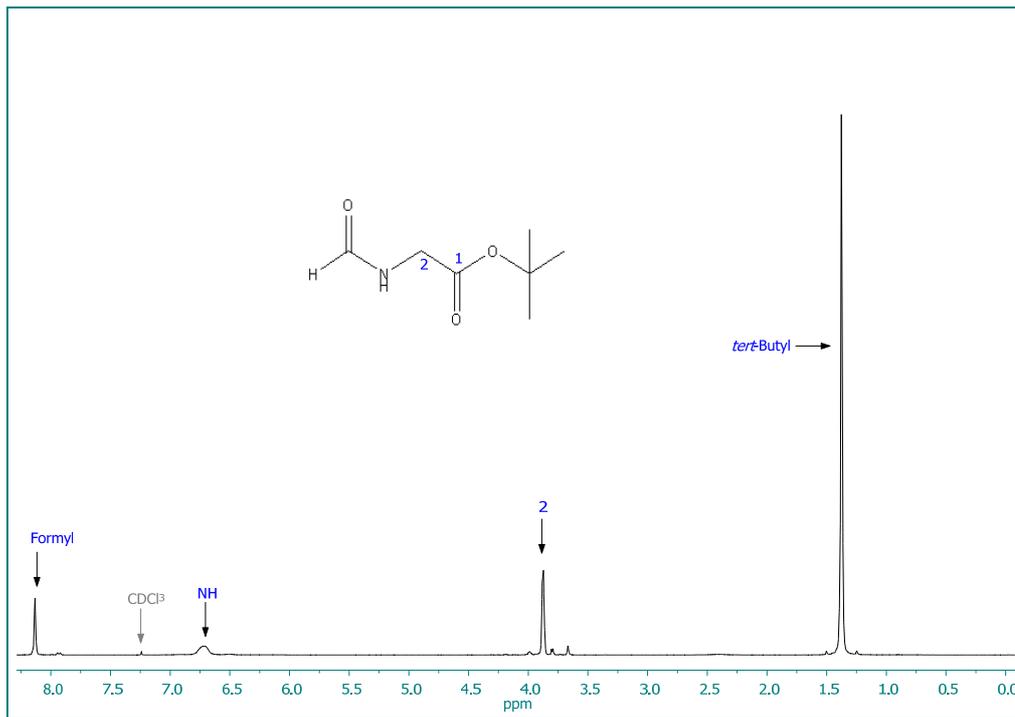


Abb. 92: ¹H-NMR-Spektrum von N-Formylglycin-*tert*-butylester (**15**) in CDCl₃ (500 MHz)

¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃; 500 MHz)

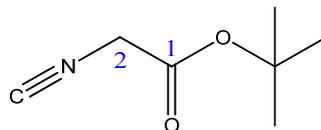
δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, *tert*-Butyl); 3.87 (d, 2H, C2); 6.74 (s, breit, NH); 8.12 (s, 1H, C3)

¹³C-NMR-Spektrum (CDCl₃, 100 MHz)

δ (ppm) = 27.51 (*tert*-Butyl); 40.17 (C2); 81.68 (*tert*-Butyl); 161.37 (C1); 168.26 (Formyl)

Massenspektrum (GC-EI)

m/z (%) = 86 (30); 59 (38); 57 (100); 41 (38); 29 (22)

8.3.2.2 Darstellung von Isocyanoessigsäure-*tert*-butylester (16)^[64,70]**(16)**

$$M = 100.1 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Inertgasatmosphäre werden 41.30 g (0.259 mol) *N*-Formylglycin-*tert*-butylester **(15)** in 400 ml Dichlormethan gelöst und 100 ml (0.721 mol) Triethylamin zugegeben. Dann wird die Lösung auf -10°C abgekühlt und 35 ml (0.383 mol) Phosphoroxychlorid (POCl_3) zugetropft, wobei die Innentemperatur 0°C nicht übersteigt und die Lösung sich von gelb nach orange verfärbt. Anschließend wird die Lösung 2 h bei unter 0°C gerührt. Dann werden 65 g (0.613 mol) Natriumcarbonat in 300 ml destilliertem Wasser gelöst, zur Reaktionsmischung zugefügt und 30 min gerührt. Man fügt dann 400 ml Wasser zu und extrahiert sechsmal mit jeweils 200 ml Dichlormethan. Die organischen Phasen werden vereinigt und dreimal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt und das Rohprodukt anschließend im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert. Das Produkt wird als gelblich-braune Flüssigkeit erhalten.

Siedepunkt (1.2×10^{-2} mbar) = $34 - 38^\circ\text{C}$

Ausbeute = 20.78 g (0.208 mol; 80%)

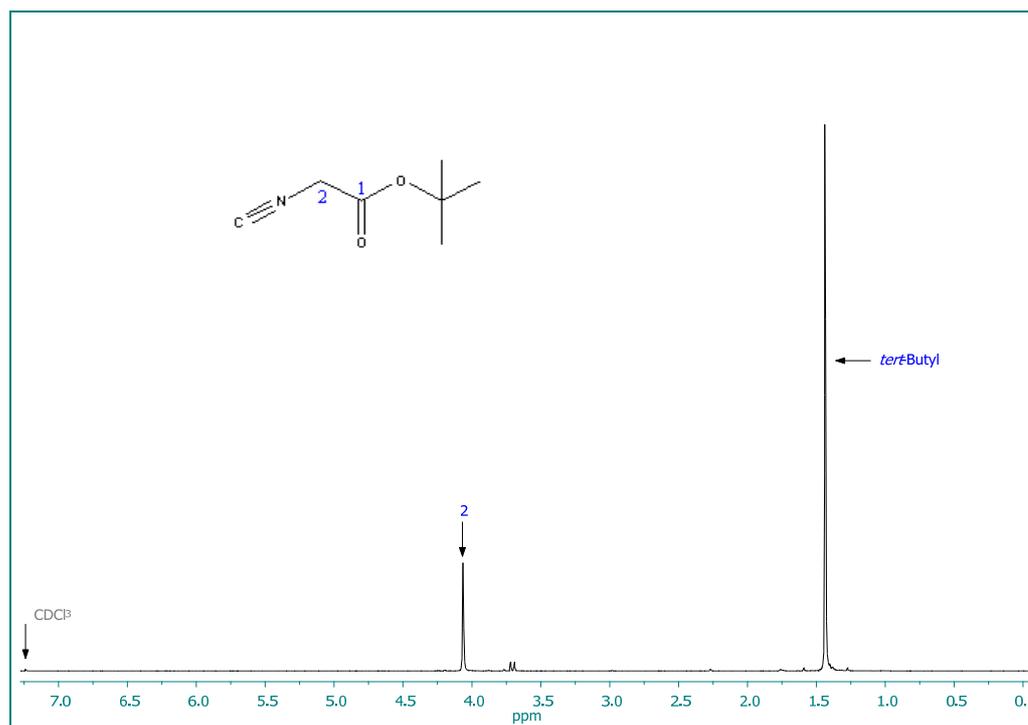


Abb. 93: ^1H -NMR-Spektrum von Isocyanooessigsäure-*tert*-butylester (**16**) in CDCl_3 (400 MHz)

^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3 ; 400 MHz)

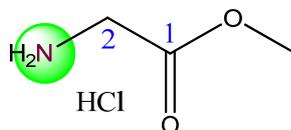
δ (ppm) = 1.45 (s, 9H, *tert*-Butyl); 4.05 (s, 2H, C2)

^{13}C -NMR-Spektrum (CDCl_3 , 100 MHz)

δ (ppm) = 27.68 (*tert*-Butyl); 44.10 (C2); 83.88 (CO); 160.47 (CN); 162.71 (C1)

Massenspektrum (GC-EI)

m/z (%) = 68 (83); 59 (57); 57 (100); 41 (43); 40 (11); 29 (26)

8.3.2.3 Darstellung von ^{15}N -Glycinmethylesterhydrochlorid (32)^[78]


(32)



$$M = 125.55 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Inertgasatmosphäre werden 5 g (66.6 mmol) ^{15}N -Glycin (Cambridge Isotopes, Carbonyl- ^{13}C , 99%) in 92 ml Methanol gelöst und auf -10°C abgekühlt. Dann werden 7.8 ml (107.5 mmol) Thionylchlorid zugetropft, sodass die Innentemperatur 0°C nicht übersteigt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

Ausbeute = 8.36 g (66.6mmol; quantitativ)

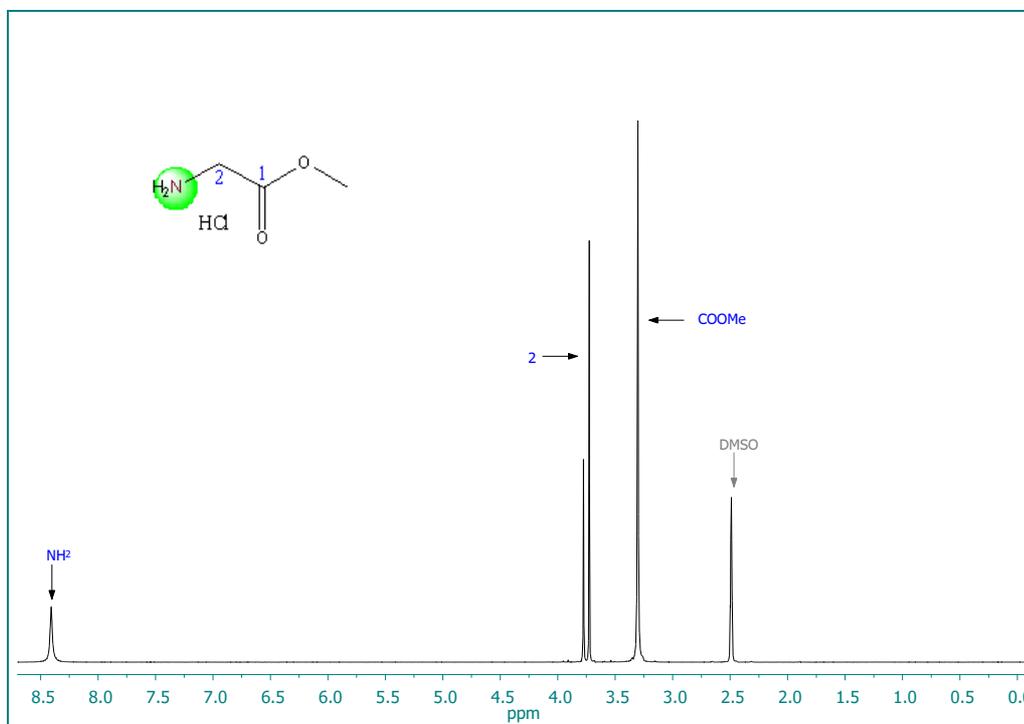


Abb. 94: ^1H -NMR-Spektrum von ^{15}N -Glycinmethylesterhydrochlorid (32) in DMSO (400 MHz)

^1H -NMR-Spektrum (DMSO; 400 MHz)

δ (ppm) = 3.30 (s, 3H, COOMe); 3.73 (s, 2H, C2); 8.41 (s, breit, NH)

^{13}C -NMR-Spektrum (DMSO; 100 MHz)

δ (ppm) = 52.45 (COOMe); 168.02 (CO)

Massenspektrum (GC-EI)

m/z (%) = 89 (M^+ ; 4.87); 30 ($\text{M} - \text{COOMe}$; 100)

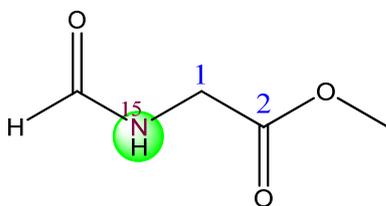
Massenfeinbestimmung

Experimentell bestimmte Masse (m/z) = 89.047597 g/mol

Berechnete Masse = 89.047681 g/mol

Differenz (ppm) = 0.94

8.3.2.4 Darstellung von ^{15}N -Formylglycinmethylester (30)^[79]



(30)



$$M = 117.1 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Inertgasatmosphäre werden 8.36 g (66.6 mmol) ^{15}N -Glycinmethylesterhydrochlorid (32) in 4 ml Ameisensäure aufgeschlämmt. Dann werden 4.5 g (66.17 mmol) Natriumformiat unter Erwärmen in 6 ml Ameisensäure gelöst und zur Estersuspension gegeben. Die Reaktionsmischung wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin werden 20 ml (211.6 mmol) Essigsäureanhydrid zugefügt und die Reaktionsmischung 1 h zum Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel

wird anschließend im Ölpumpenvakuum entfernt. Anschließend werden 50 ml Aceton zugefügt und das ausgefallene Natriumchlorid abfiltriert. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt. Zurück bleibt das gewünschte Produkt als orangefarbenes Öl.

Ausbeute = 7.73 g (66.6 mmol, quantitativ)

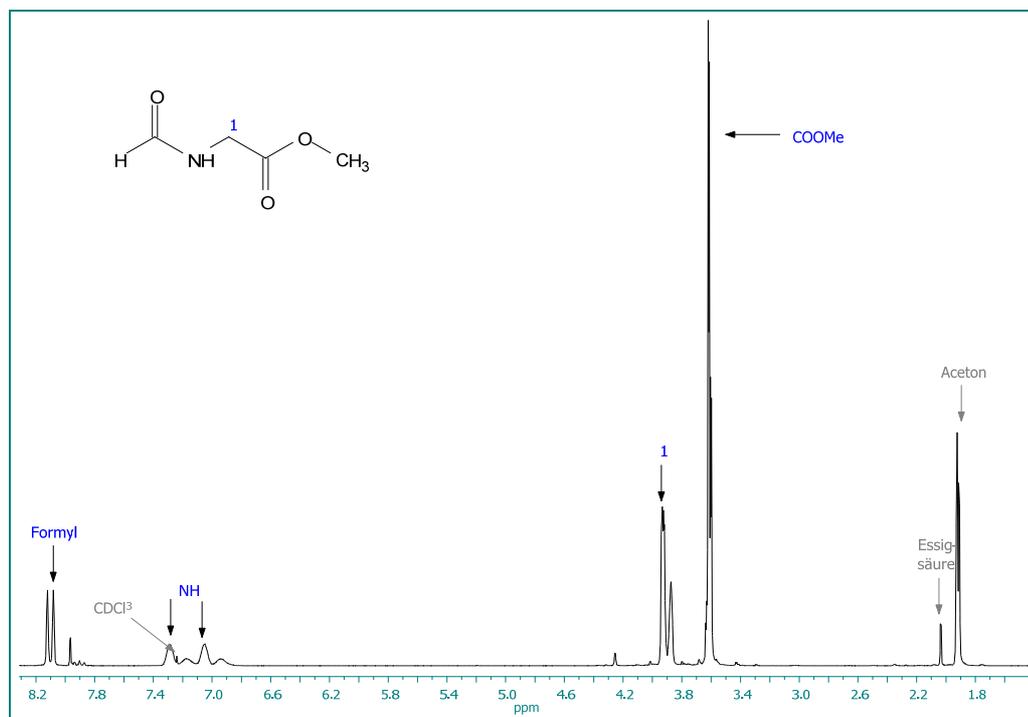


Abb. 95: ¹H-NMR-Spektrum von ¹⁵N-Formylglycinmethylester (30) in CDCl₃ (400 MHz)

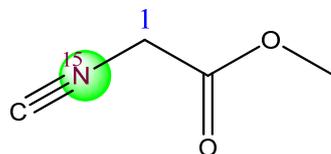
¹H-NMR-Spektrum in CDCl₃ (400 MHz)

δ (ppm) = 3.62 (s, COOMe); 3.93 (d, 2H, ³J = 2.36 Hz, C1); 7.05 und 7.29 (2 x s, breit, ¹J = 94.05 Hz, ¹⁵NH); 8.08 (2 x s, 1H, ²J = 16.29 Hz, Formyl)

¹³C-NMR-Spektrum in CDCl₃ (100 MHz)

δ (ppm) = 39.69 (C-1); 52.31 (OMe); 162.10 und 162.30 (Formyl); 169.96 (COOMe)

8.3.2.5 Darstellung von ^{15}N -Isocyanoessigsäuremethylester (31)^[64,70,76]



(31)



$$M = 100.1 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Inertgasatmosphäre werden 8.61 g (73.53 mmol) ^{15}N -Formylglycinmethylester (30) in 110 ml Dichlormethan gelöst und 20 ml (144.3 mmol) Triethylamin zugefügt. Die bräunliche Lösung wird auf -10°C abgekühlt. Man gibt langsam 6 ml (65.74 mmol) Phosphorylchlorid so zu, dass die Innentemperatur 0°C nicht übersteigt. Dann wird die gelbliche Reaktionsmischung 2 h bei -10°C bis 0°C gerührt. Anschließend werden 11.00 g (103.8 mmol) Natriumcarbonat in 50 ml destillierten Wasser zugefügt und die Lösung 30 min gerührt. Dann werden 100 ml destilliertes Wasser zugefügt und die Reaktionsmischung wird sechsmal mit 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit einer gesättigten Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird anschließend unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird daraufhin im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert.

Siedetemp. = 31°C bei 0.26 mbar

Ausbeute = 3.649 g (36.45 mmol; 55%)

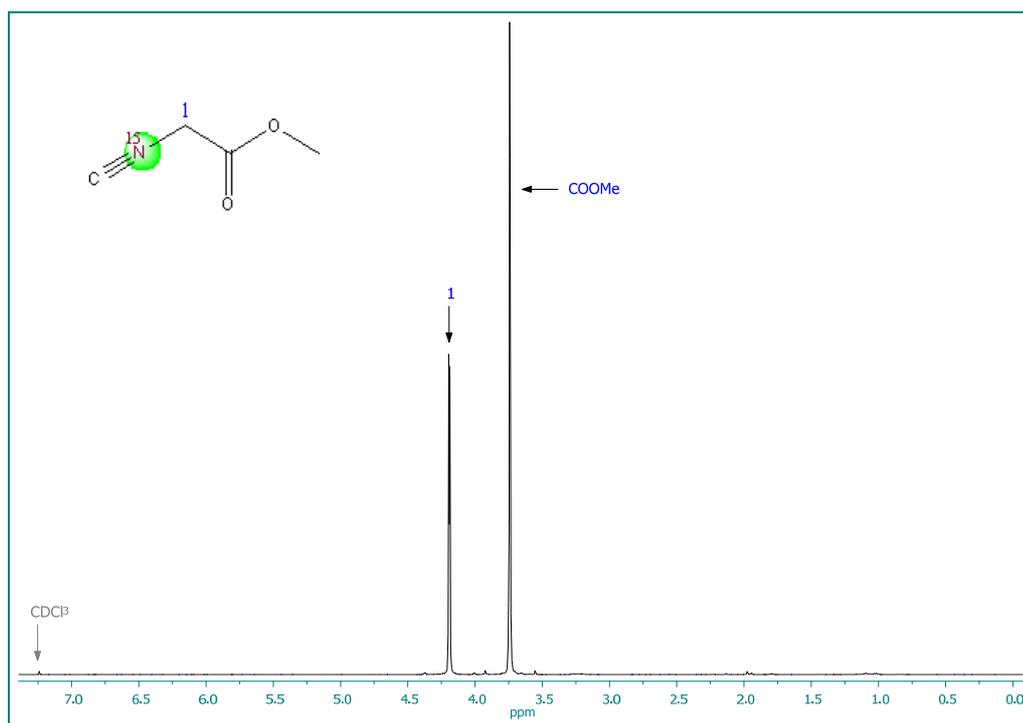


Abb. 96: ^1H -NMR-Spektrum von ^{15}N -Isocyanooessigsäuremethylester (**31**) in CDCl_3 (400 MHz)

^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3 ; 400 MHz)

δ (ppm) = 3.74 (s, 3H, COOMe); 4.19 und 4.20 (2 x s, 2H, $^2J = 3.38$ Hz, C1)

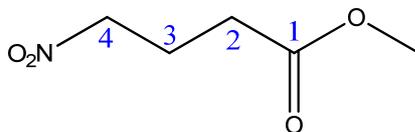
^{13}C -NMR-Spektrum (CDCl_3 ; 100 MHz)

δ (ppm) = 43.05 und 43.19 (2 x s, CH_2); 53.03 (COOMe); 160.83 (CN); 164.31 (CO)

Massenspektrum (GC-EI)

m/z (%) = 68 (24); 59 (100); 54 (42); 42 (7); 40 (30); 28 (13)

8.3.2.6 Darstellung von 4-Nitrobutansäuremethylester (12)^[95]



(12)



$$M = 147.13 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

270 ml (5.043 mol) Nitromethan werden zusammen mit 150 ml (1.655 mol) Acrylsäuremethylester in 300 ml Diethylether gelöst und auf -5°C abgekühlt. Dann werden langsam 45.5 g (0.811 mol) Kaliumhydroxid gelöst in 300 ml destilliertem Wasser zugegeben, sodass die Innentemperatur 0°C nicht übersteigt. Anschließend wird die Reaktionsmischung unter Erwärmen auf Raumtemperatur über Nacht gerührt. Dann werden die Phasen voneinander getrennt und die wässrige Phase viermal mit jeweils 200 ml Diethylether extrahiert. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das dunkelbraune, ölige Rohprodukt wird im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert.

Siedepunkt = $68 - 75^\circ\text{C}$ bei 1.2×10^{-1} mbar

Ausbeute = 79.19 g (0.538 mol; 33%)

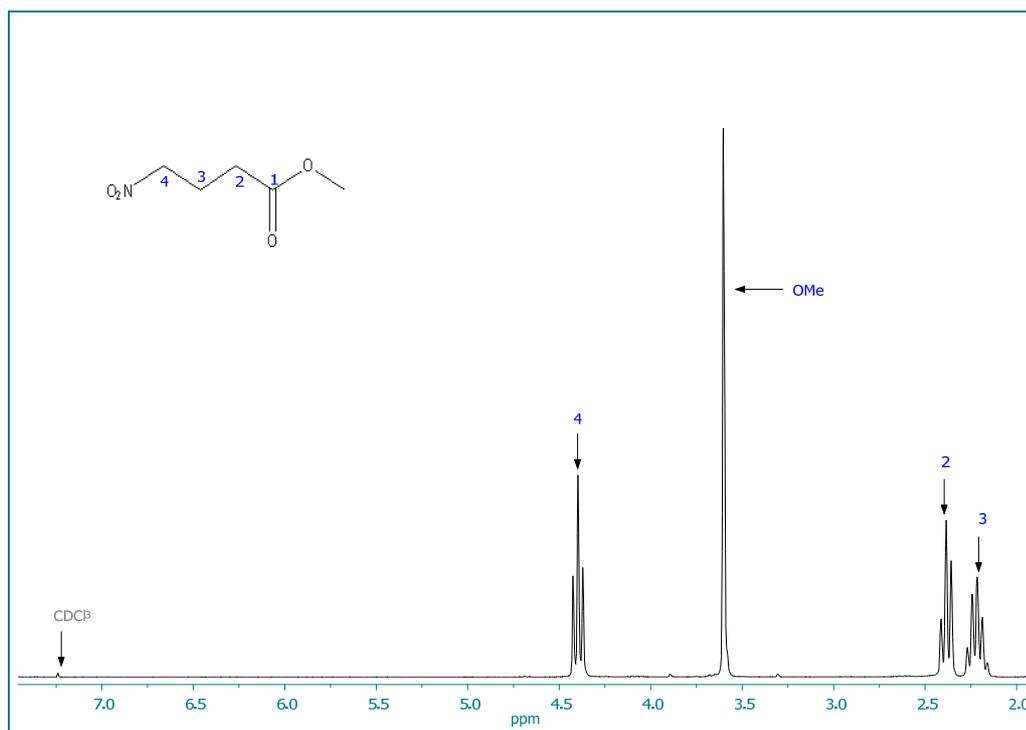


Abb. 97: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 4-Nitrobutansäuremethylester (**12**) in CDCl_3 (500 MHz)

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (CDCl_3 ; 500 MHz)

δ (ppm) = 2.22 (m, 2H, C3); 2.39 (t, 2H, $^3J = 6.87$ Hz, C2); 3.65 (s, 3H, OMe); 4.40 (t, 2H, $^3J = 6.66$ Hz, C4)

$^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (CDCl_3 , 100 MHz)

δ (ppm) = 22.20 (C3); 30.08 (C2); 51.708 (OMe); 74.18 (C4), 172.19 (C1)

Massenspektrum (GC-EI)

m/z (%) = 116 (25); 100 (6); 88 (8); 69 (9); 59 (100); 55 (7); 42 (14); 41 (26); 29 (12)

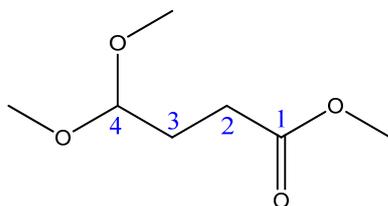
Massenfeinbestimmung

Experimentell bestimmte Masse = 148.060841 g/mol

Berechnete Masse = 148.060986 g/mol

Differenz (ppm) = 0.98

8.3.2.7 Darstellung von 4,4-Dimethoxybutansäuremethylester (13)^[95]



(13)



$$M = 161.18 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Inertgasatmosphäre werden 10.23 g (0.445 mol) Natrium in 154 ml Methanol gelöst. Dann wird eine Lösung aus 54.81 g (0.373 mol) 4-Nitrobutansäuremethylester in 170 ml Methanol zugetropft und die Lösung 30 min gerührt. (Lösung 1)

In der Zwischenzeit werden 260 ml Methanol auf -10°C abgekühlt und 120 ml konzentrierte Schwefelsäure zugetropft. Nachdem die Zugabe beendet ist, wird die Mischung auf -30°C abgekühlt und die Lösung 1 so zugetropft, dass die Innentemperatur -30°C nicht übersteigt. Unter Rühren wird die Reaktionsmischung über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt. Dann werden 1.5 l Eiswasser zugefügt und die Lösung sechsmal mit jeweils 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden viermal mit 100 ml gesättigter Natriumhydroxidlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt.

Ausbeute: 24.3 g (0.151 mol; 46.33%)

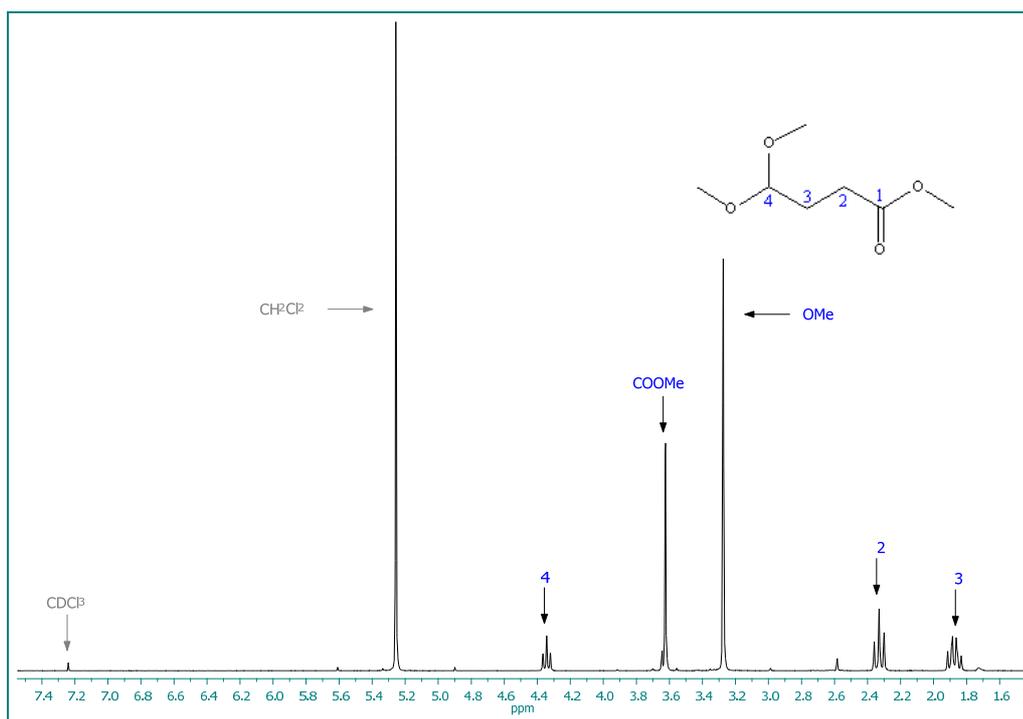


Abb. 98: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 4,4-Dimethoxybutansäuremethylester (**13**) in CDCl_3 (400 MHz)

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (CDCl_3 ; 250 MHz)

δ (ppm) = 1.87 (q, 2H, $^3J = 7.43$ Hz, C3); 2.33 (t, 2H, $^3J = 7.48$ Hz, C2); 3.274 und 3.276 (2 x s, 6H, OMe); 3.62 (s, 3H, OMe); 4.34 (t, 1H, $^3J = 5.59$ Hz, C4)

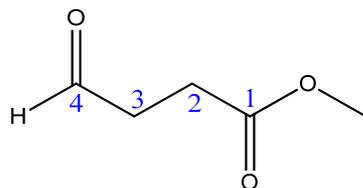
$^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (CDCl_3 ; 100 MHz)

δ (ppm) = 27.812 (C2); 29.039 (C3); 51.536 (OMe); 53.115 (OMe); 103.617 (C4); 173.633 (C1)

Massenspektrum (EI)

m/z (%) = 131 (47); 115 (9); 99 (19); 75 (100); 72 (6); 71 (86); 59 (20), 55 (7); 47 (14); 41 (19), 31 (8); 29 (13); 27 (6)

8.3.2.8 Darstellung von 4-Oxobutansäuremethylester (14)^[95]



(14)



$$M = 116.12 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Inertgasatmosphäre werden 96.64g (0.600 mol) 4,4-Dimethoxybutansäuremethylester in 450 ml Aceton gelöst und bei Raumtemperatur mit einer Mischung aus 800 ml destilliertem Wasser und 23 ml konzentrierter Salzsäure versetzt, sodass die Innentemperatur 28°C nicht übersteigt. Anschließend wird die Lösung 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird einmal mit 150 ml Dichlormethan extrahiert und dann dreimal mit jeweils 150 ml einer Mischung aus Dichlormethan und Aceton (1:1). Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert.

Ausbeute = 13.72 g (0.118 mol; 20%)

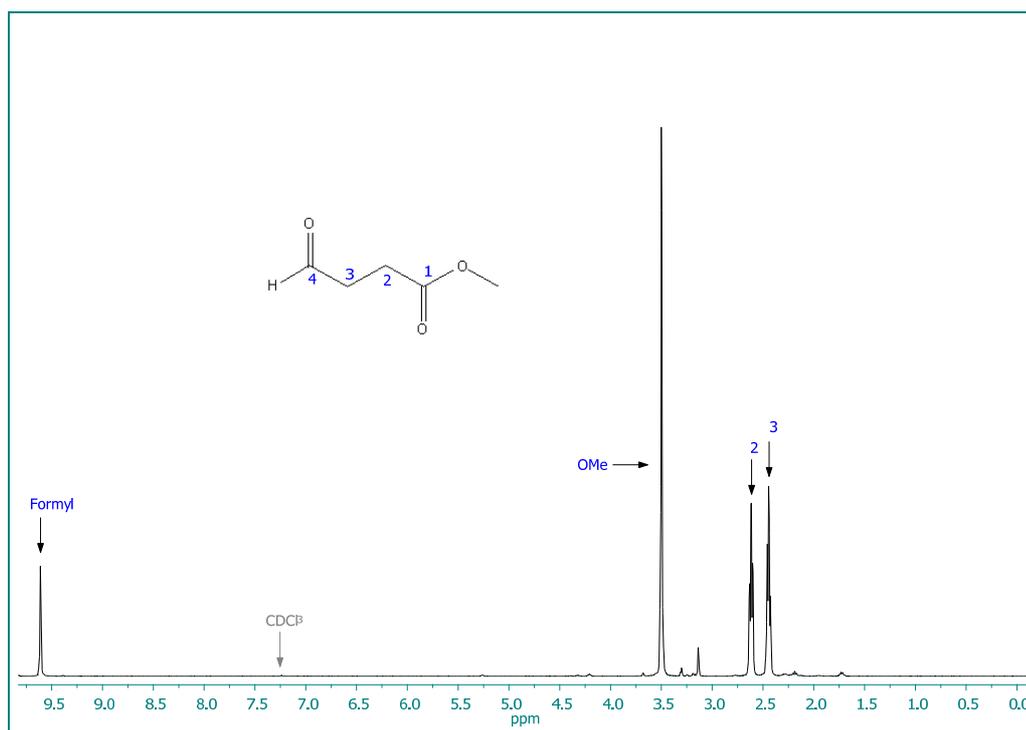


Abb. 99: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 4-Oxobutansäuremethylester (**14**) in CDCl_3 (400 MHz)

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (CDCl_3 ; 250 MHz)

δ (ppm) = 2.56 (m, 2H, C3); 2.74 (m, 2H, C2); 3.62 und 3.63 (2 x s, 3H, OMe); 9.740 (s, 1H, C4)

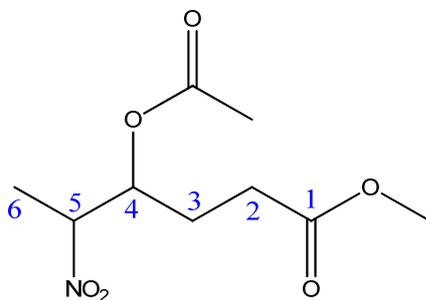
$^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (CDCl_3 ; 100 MHz)

δ (ppm) = 26.23 (C2); 3.18 (OMe); 172.60 (C1); 199.88 (C4)

Massenspektrum (GC-EI)

m/z (%) = 88 (78); 85 (83); 59 (34); 57 (61); 55 (30); 45 (15); 31 (14); 29 (100)

8.3.2.9 Darstellung von 4-Acetoxy-5-nitrohexansäuremethylester (11)^[69,70]



(11)



$$M = 233.22 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Inertgasatmosphäre werden 14.66 g (0.126 mol) 4-Oxobutansäuremethylester (**14**) zusammen mit 3.665 g (0.03 mol) 4-Dimethylaminopyridin in 70 ml Dichlormethan gelöst. Dann werden unter Eiskühlung 48 ml (0.671 mol) Nitroethan zugetropft und die Reaktionsmischung wird 40 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann werden 48 ml (0.508 mol) Essigsäureanhydrid in 90 ml Dichlormethan zugetropft und die Reaktionsmischung 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird Methanol im Überschuss zugefügt und die Lösung mit Kaliumcarbonatlösung (15 g auf 200 ml) neutralisiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Kieselgel (Merck 60) (30 x 10 cm Glassäule) mit n-Pentan und Ethylacetat (5:1) als Laufmittelgemisch aufgetrennt. Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

Ausbeute = 5.293 g (22.70 mmol; 18%)

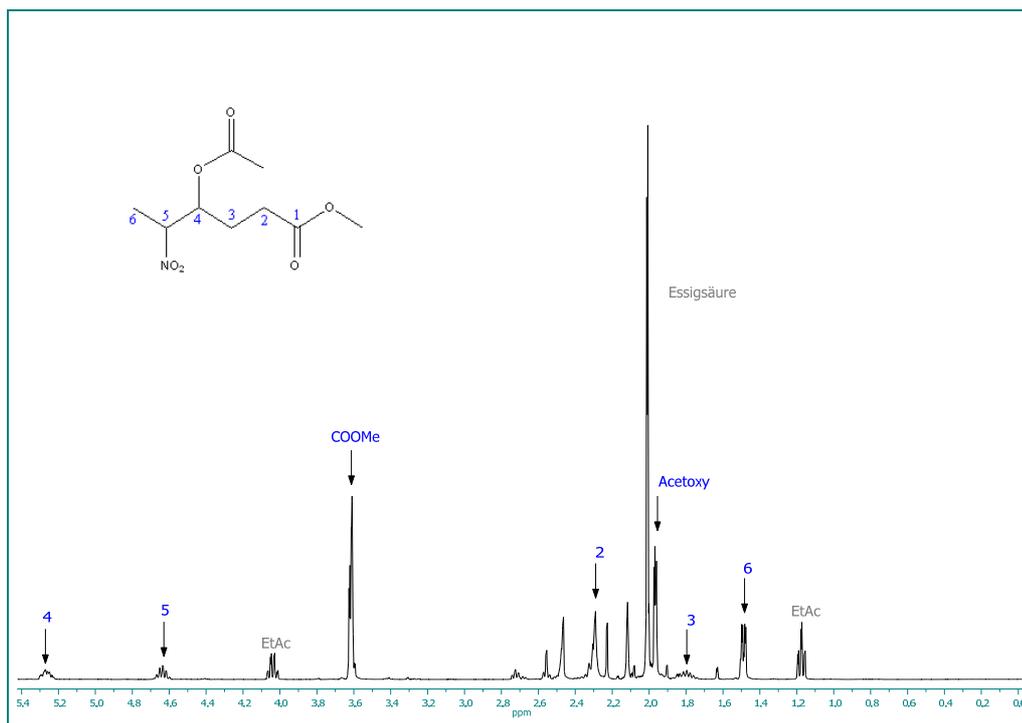


Abb. 100: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 4-Acetoxy-5-nitrohexansäuremethylester (**11**) in CDCl_3 (400 MHz)

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (CDCl_3 ; 400 MHz)

δ (ppm) = 1.53 (d, 3H, $^3J = 6.7$ Hz, 6); 1.73 bis 1.89 (m, 2H, 3); 1.98 (m, 2H, Acetoxy); 2.30 (m, 2H, 2); 3.61 (s, 3H, COOMe); 4.59 bis 4.68 (m, 1H, 5); 5.22 bis 5.32 (m, 1H, 4)

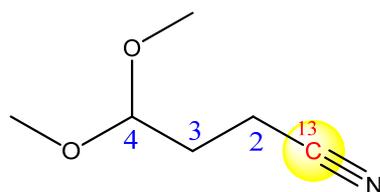
$^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (CDCl_3 ; 100 MHz)

δ (ppm) = 16.28 (C6); 19.88 (Acetoxy); 25.66 (C3); 29.30 (C2); 51.11 (COOMe); 73.13 (C4);

Massenspektrum (EI)

m/z (%) = 145 (8); 113 (21); 85 (15); 55 (9); 43 (100); 41 (6)

8.3.2.10 Darstellung von (1-¹³C)-4,4-Dimethoxybutannitril (37)^[80]



(37)



$$M = 129.16 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Inertgasatmosphäre werden 1 g (19.96 mmol) Natriumcyanid-(¹³C) in 6 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 4.030 g (0.031 mol) 3-Brompropionaldehyddimethylacetal versetzt. Anschließend werden 0.6 ml (4.328 mmol) Triethylamin zur Reaktionsmischung gegeben und die Mischung 2 h zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 12 ml destilliertes Wasser zugefügt und die Lösung dreimal mit jeweils 50 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Dann wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Produkt wird als orange-braune Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute = 1.194 (9.242 mmol; 46%)

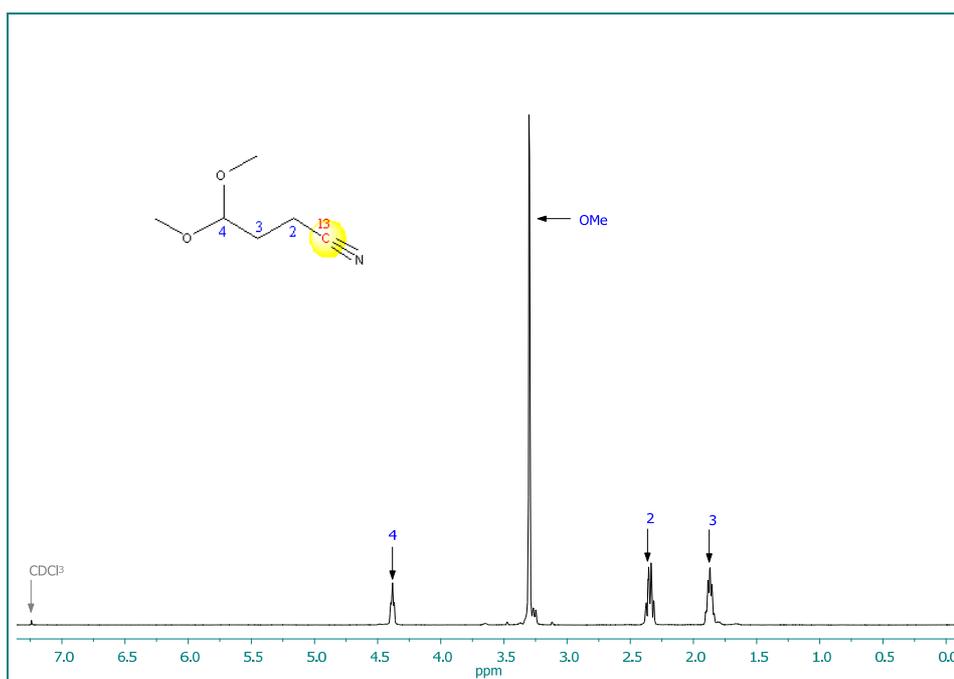


Abb. 101: ¹H-NMR-Spektrum von 4,4-Dimethoxybutannitril-(1-¹³C) (37) in CDCl₃ (400 MHz)

$^1\text{H-NMR-Spektrum (CDCl}_3\text{; 400 MHz)}$

δ (ppm) = 1.86 (m, 2H, C2); 2.33 (m, 2H, C3); 3.27 (s; 6H, OMe); 4.36 (t, 1H, $^3\text{J} = 5.30$ Hz, C4)

$^{13}\text{C-NMR-Spektrum (CDCl}_3\text{; 100 MHz)}$

δ (ppm) = 11.924, 12.375 (C2); 28.345 (C3); 53.566 (2 x OMe); 102,504 (C4); 119.168 (CN)

Massenspektrum (GC-EI)

m/z (%) = 129 (M^+ , 1.5); 99 ($\text{M} - \text{OMe}$, 100); 75 ($\text{M} - 2 \times \text{OMe}$, 75)

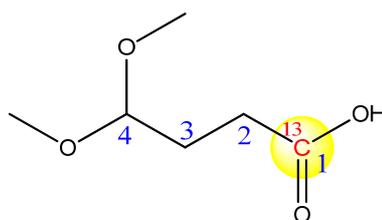
Massenfeinbestimmung

Experimentell bestimmte Masse = 131.09136 g/mol

Berechnete Masse = 131.090159 g/mol

Differenz (ppm) = 0.17

8.3.2.11 Darstellung von (1- ^{13}C)-4,4-Dimethoxybutansäure (38)



(38)



$M = 186.25$ g/mol

Durchführung:

1.194 g (9.242 mmol) 4,4-Dimethoxypropionitril-(1- ^{13}C) (**37**) werden zusammen mit 0.8 g (14.26 mol) Kaliumhydroxid in 8 ml destilliertem Wasser gelöst und 24 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

Ausbeute = 1.72 g (9.242 mmol; 100%)

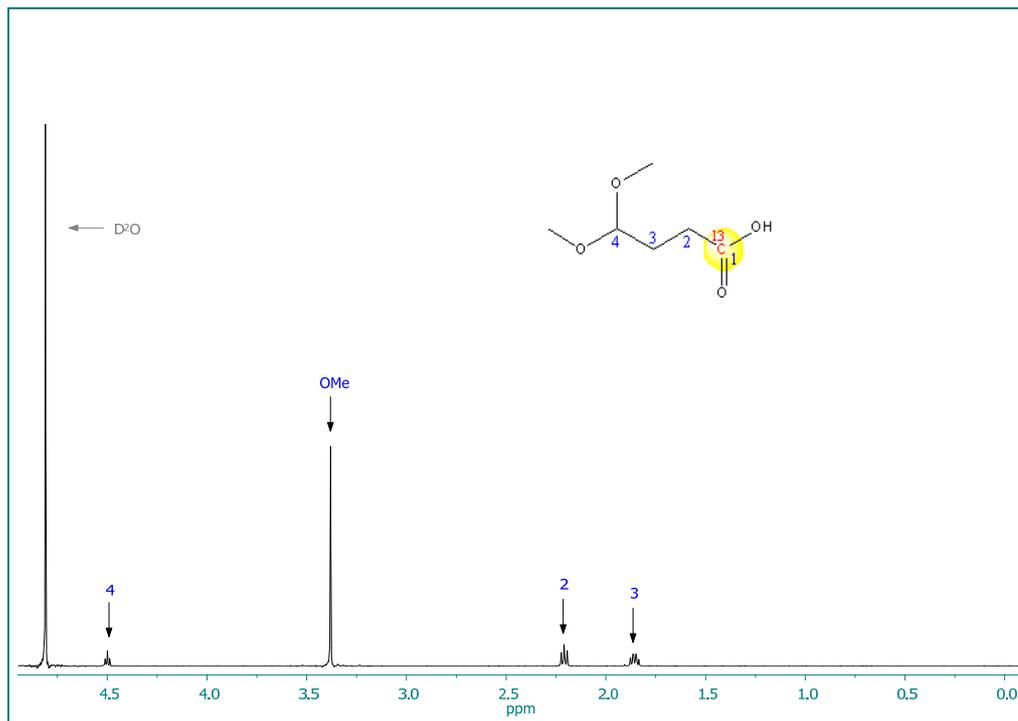


Abb. 102: ¹H-NMR-Spektrum von (1-¹³C)-4,4-Dimethoxybutansäure in D₂O (400 MHz)

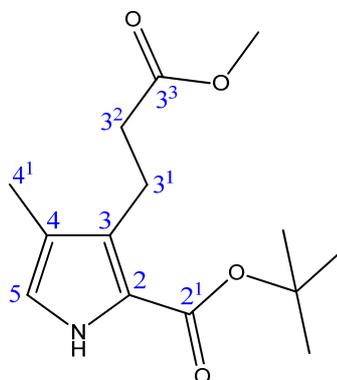
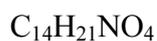
¹H-NMR-Spektrum (D₂O; 400 MHz)

δ (ppm) = 1.83 (m, 2H, C3); 2.18 (t, 2H, ³J = 7.50 Hz, C2); 3.36 (s, 6H, OMe); 4.48 (t, 1H, ³J = 6.23 Hz, C4)

¹³C-NMR-Spektrum (D₂O; 100 MHz)

δ (ppm) = 28.74 (C-2); 31.94 (C-3); 53.19 (OMe); 104.52 (C-4); 181.85 (COOH)

8.3.2.12 Darstellung von 3-(2-Methoxycarbonyl-ethyl)-4-methyl-1H-pyrrol-2-carbonsäure-*tert*-butylester (10)^[64]

**(10)**

$$M = 267.32 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Lichtausschluss und Inertgasatmosphäre werden 9.74 g (41.76 mmol) 4-Acetoxy-5-nitrohexansäuremethylester (**11**) in 70 ml einer Mischung aus Tetrahydrofuran (THF) und 2-Propanol (1:1) gelöst. Dann wird langsam eine Mischung aus 15 ml (0.119 mol) Tetramethylguanidin (TMG) und 6.46 g (64.56 mmol) Isocyanoessigsäure-*tert*-butylester (**16**) in 30 ml einer Tetrahydrofuran/2-Propanol-Gemisches (1:1) zugefügt. Die Reaktionsmischung wird 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Kieselgel (Merck 60) mit Dichlormethan und Diethylether als Laufmittelgemisch gereinigt. Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

Ausbeute = 6.253 g (23.39 mmol; 56%)

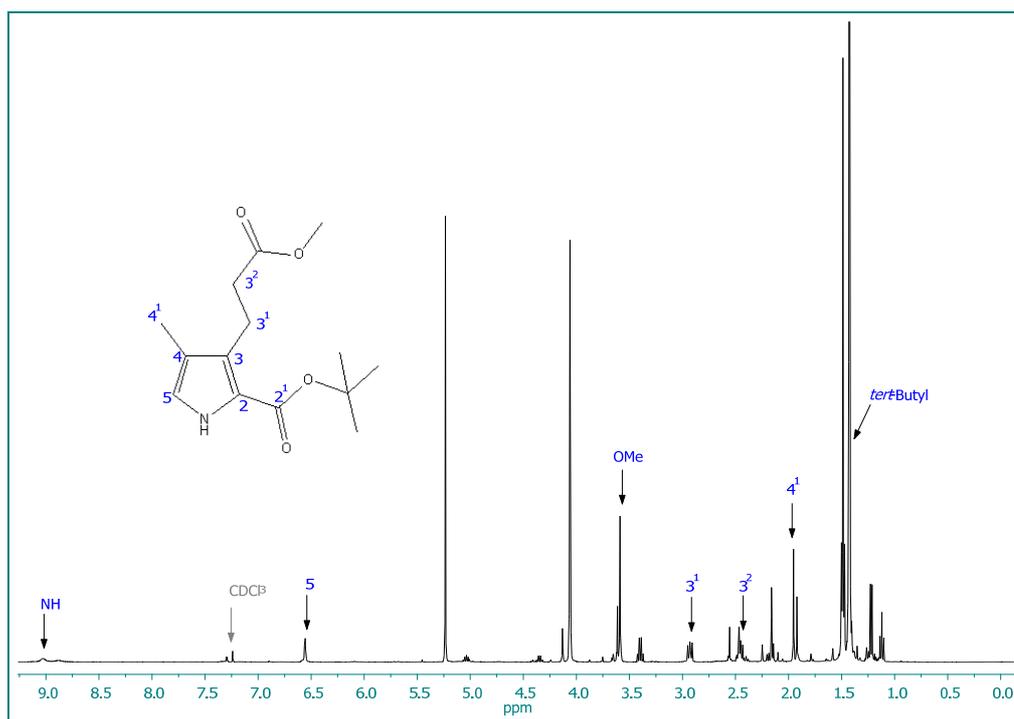


Abb. 103: ^1H -NMR-Spektrum von 3-(2-Methoxycarbonyl-ethyl)-4-methyl-1H-pyrrol-2-carbonsäure-*tert*-butylester (**10**) CDCl_3 (400 MHz)

^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3 ; 400 MHz)

δ (ppm) = 1.54 (s, 9H, *tert*-Butyl); 2.01 (s, 3H, 4¹); 2.52 (t, 2H, $^3J = 8.09$ Hz, 3²); 3.01 (t, 2H, 8.09 Hz, 3¹); 3.65 (s, 3H, COOMe); 6.63 (d, 1H, $^3J = 2.15$ Hz, 5); 8.90 (s, breit, NH)

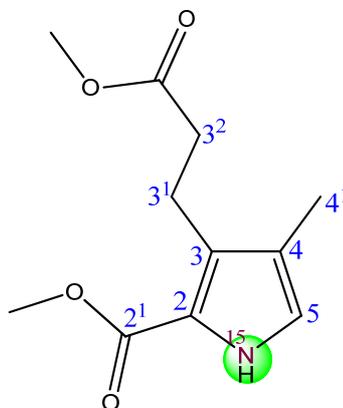
^{13}C -NMR-Spektrum (CDCl_3 ; 100 MHz)

δ (ppm) = 9.76 (C4¹); 20.59 (C3¹); 28.42 (*tert*-Butyl); 35.01 (C3²); 51.41 (COOMe); 80.70 (*tert*-Butyl); 119.75 (C5); 119.80 (C4); 120.50 (C3); 128.03 (C2); 160.96 (C2¹); 174.20 (C3³)

Massenspektrum (EI)

m/z (%) = 267 (24, $[\text{M}]^+$); 211 (32); 194 (7); 180 (22); 167 (48); 151 (100); 133 (27); 120 (28); 108 (18); 94 (32); 57 (18); 41 (8)

8.3.2.13 Darstellung von ^{15}N -3-(2-Methoxycarbonyl-ethyl)-4-methyl-1H-pyrrol-2-carbonsäuremethylester (**29**)^[64]



$$M = 225.24 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Lichtausschluss und Inertgasatmosphäre werden 2.4 g (10.29 mmol) 4-Acetoxy-5-nitrohexansäuremethylester (**11**) in 20 ml einer Mischung aus 2-Propanol und Tetrahydrofuran (1:1) gelöst. Dann wird eine Mischung aus 1.409 g (14.05 mmol) ^{15}N -Isocyanoessigsäuremethylester (**31**) und 3.7 ml (29.55 mmol) Tetramethylguanidin, gelöst in 10 ml 2-Propanol/Tetrahydrofuran (1:1,) zugefügt und die Reaktionsmischung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch über eine 40 cm-Glassäule (Durchmesser = 5 cm) mit Kieselgel (Merck 60) und einem Laufmittelgemisch aus Dichlormethan und Diethylether (9:1) gereinigt. Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

Ausbeute = 1.289 (5.721 mmol; 56%)

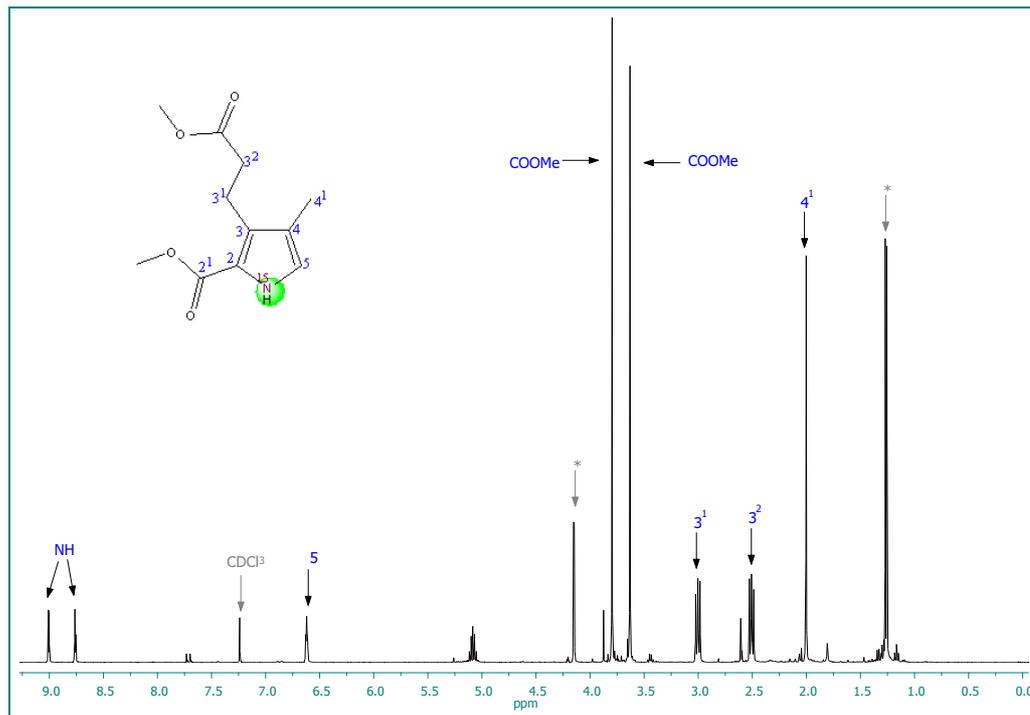


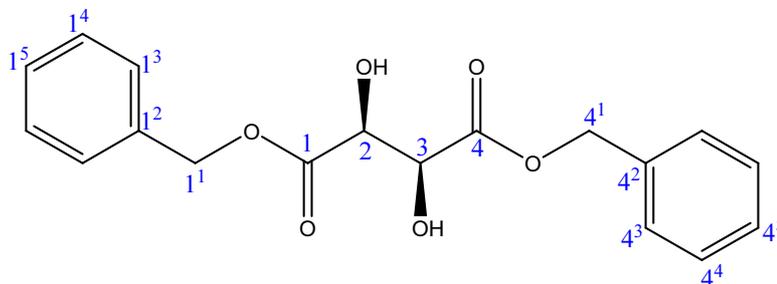
Abb. 104: ^1H -NMR-Spektrum von ^{15}N -3-(2-Methoxycarbonylethyl)-4-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure-methylester (**29**) in CDCl_3 (400MHz)

^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3 ; 400 MHz)

δ (ppm) = 2.00 (s, 3H, C4¹); 2.51 (t, 2H, $^3\text{J} = 7.98$ Hz, C3²); 3.00 (t, 2H, $^3\text{J} = 7.98$ Hz, C3¹); 3.63 (s, 3H, COOMe); 3.80 (s, 3H, COOMe); 6.62 (m, 1H, C5); 8.76 und 9.01 (2 x s, 1H, $^1\text{J} = 98.07$ Hz, NH)

8.3.3 Synthese des B-Rings

8.3.3.1 Darstellung von D-(-)-Weinsäuredibenzylester (19)^[64]



(19)



$$M = 330.33 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Inertgasatmosphäre werden 15.85 g (105.6 mmol) (2S)-(3S)-(-)-Weinsäure zusammen mit 3.61 g (21.14 mmol) Toluolsulfonsäure Monohydrat in 73 ml Benzol gelöst und 35 ml (336.6 mmol) Benzylalkohol hinzugefügt. Dann wird die Reaktionsmischung zum Rückfluss erhitzt bis sich kein Wasser mehr abscheidet. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 50 ml Isooctan zugegeben. Der ausgefallene farblose Feststoff wird abfiltriert und in 250 ml Ethylacetat aufgenommen. Die organische Lösung wird daraufhin zunächst zweimal mit jeweils 100 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und dann zweimal mit jeweils 100 ml einer gesättigten Natriumchloridlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

Ausbeute = 42.64 g (100%; quantitativ)

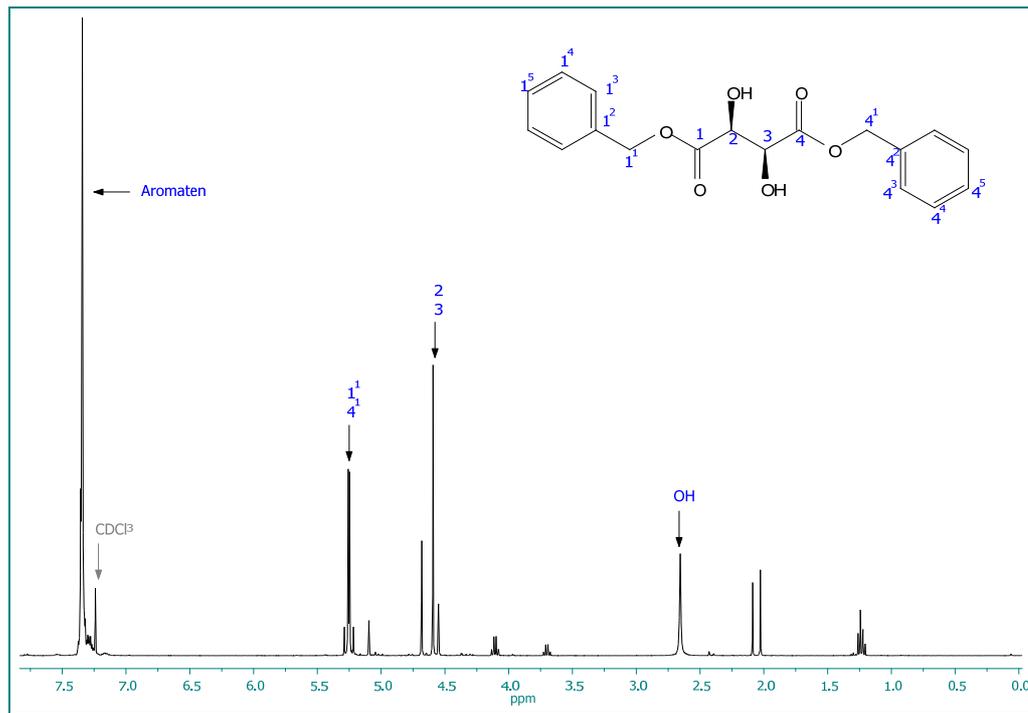


Abb. 105: ¹H-NMR-Spektrum von D-(-)-Weinsäuredibenzylester (**19**) in CDCl₃ (400 MHz)

¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃; 400 MHz)

δ (ppm) = 2.66 (s, breit, OH); 4.59 und 4.68 (2 x s, 2H, C2 und C3); 5.25 und 5.26 (2 x s, 4H, C1¹ und C4¹); 7.34 (s, 10H, C1³, C1⁴, C1⁵, C4³, C4⁴, C4⁵)

¹³C-NMR-Spektrum (CDCl₃; 100 MHz)

δ (ppm) = 68.05 (C1¹ und C4¹); 72.15 (C2 und 3); 128.40 (C1³ und C4³); 128.69 (C1⁴, C1⁵, C4⁴ und C4⁵); 134.83 (C1² und C4²); 171.38 (C1 und C4)

Massenspektrum (EI)

m/z (%) = 330 (0.02, [M]⁺); 239 (2.18, [M-Ph]⁺); 166 (2); 91 (100)

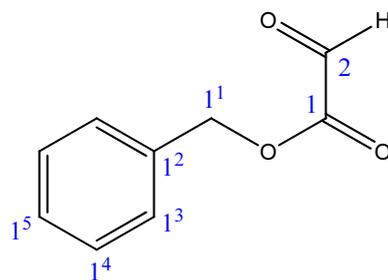
Massenfeinbestimmung

Experimentell bestimmte Masse = 353.099566 g/mol

Berechnete Masse = 353.009558 g/mol

Differenz (ppm) = -0.02

8.3.3.2 Darstellung von Glyoxylsäurebenzylester (18)^[64]



(18)



$$M = 164.16 \text{ g/mol}$$

Durchführung

Unter Inertgasatmosphäre werden 6.00 g (18.16 mmol) D-(-)-Weinsäuredibenzylester (19) in 50 ml Diethylether gelöst und mit 5.00 g (21.94 mmol) Periodsäure versetzt. Die Lösung wird 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der farblose Niederschlag abfiltriert und das Filtrat einmal mit 50 ml gesättigter Natriumchloridlösung und 50 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das gelbe Rohprodukt wird über eine kurze Destillationsbrücke mit Trockeneiskühlung destilliert. Das Produkt wird als gelbes hochviskoses Öl erhalten.

Ausbeute = 2.086 g (12.71 mmol; 70%)

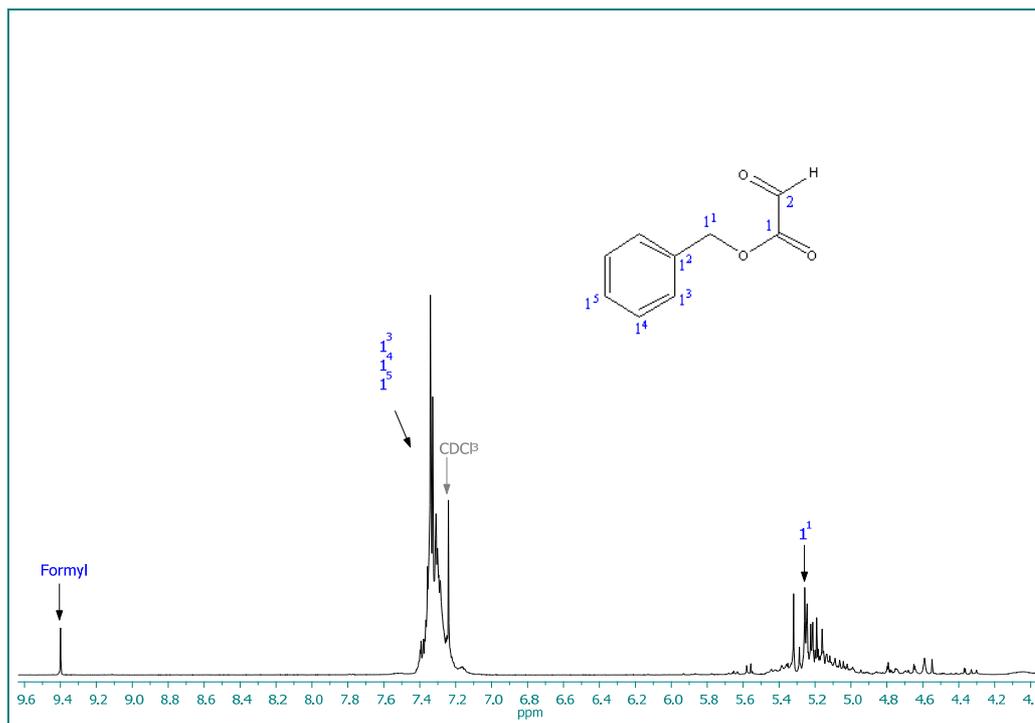


Abb. 106: ¹H-NMR-Spektrum von Glyoxylsäurebenzylester (**18**) in CDCl₃ (400 MHz)

¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃; 400 MHz)

δ (ppm) = 5.32 (s, 2H, C1¹); 7.30 (m, 5H, C1³, C1⁴ und C1⁵); 9,40 (s, 1H, Formyl)

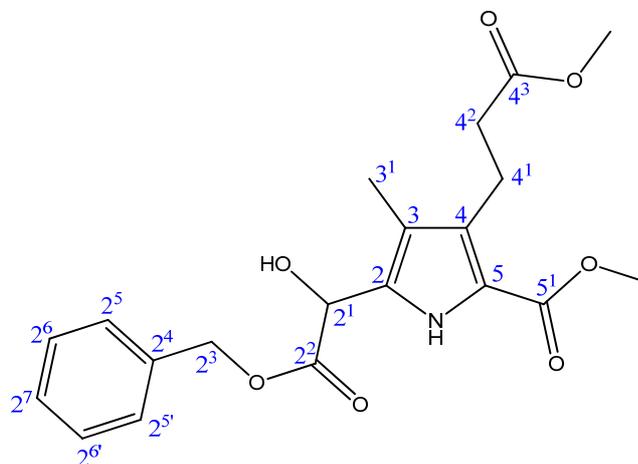
¹³C-NMR-Spektrum (CDCl₃; 100 MHz)

δ (ppm) = 68.02 (C1¹); 128.39 (C1³); 128.56 (C1⁵); 128.58 (C1⁴); 134.62 (C-1²); 168.85 (C1); 183, 25 (C2)

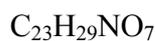
Massenspektrum (EI)

m/z (%) = 91 (100); 77 (8); 65 (10); 51 (6); 39 (6)

8.3.3.3 Darstellung von 3-(5-((Benzylcarbonyl)-hydroxymethyl)-2-(*tert*-butoxycarbonyl)-4-methylpyrrol-3-yl)-propionsäuremethylester (20)^[64]



(20)



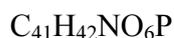
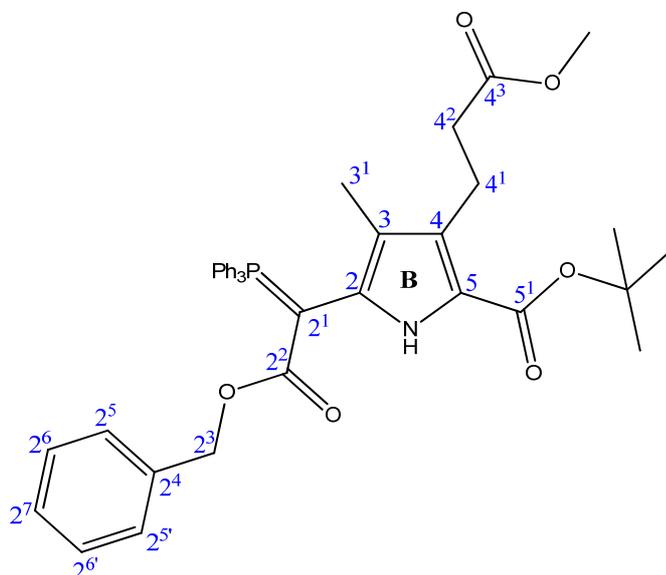
$$M = 431.48 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Lichtausschluss und Inertgasatmosphäre werden 4 g (14.96 mmol) 3-(2-Methoxycarbonylethyl)-4-methyl-1H-pyrrol-2-carbonsäure-*tert*-butylester (**10**) in 60 ml Dichlormethan gelöst und bei Raumtemperatur mit einer Lösung aus 20 ml Dichlormethan und 8 g (48.73 mmol) Glyoxylsäurebenzylester (**18**) versetzt. Dann werden 1.15 g (8.438 mmol) Zinkchlorid zugefügt und die Reaktionsmischung 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, anschließend zweimal mit zehnpromzentiger Natriumhydrogensulfidlösung (aus $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) und zweimal mit destilliertem Wasser. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Kieselgel (Merck 60) mit Dichlormethan und Diethylether (4:1) als Laufmittelgemisch gereinigt. Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

Ausbeute = 0.397 g (0.920 mmol; 6%)

8.3.3.4 Darstellung von Benzyloxycarbonyl-(5-*tert*-butoxycarbonyl-4-(2-methoxycarbonyl)ethyl)-3-methylpyrrol-2-yl)-(triphenylphosphonid)-methanid (17)^[64]



$$M = 675.76 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Lichtausschluss und Inertgasatmosphäre werden 1.05 g (7.863 mmol) N-Chlorsuccinimid in 24 ml Dichlormethan (UVASOL) gelöst und mit 1 ml (14.08 mmol) Dimethylsulfoxid versetzt. Dann wird die Suspension auf -50°C abgekühlt (Trockeneis/Aceton) und eine Lösung aus 20 ml Dichlormethan und 1.006 g (2.330 mmol) 3-(5-((Benzylcarbonyl)-hydroxymethyl)-2-(*tert*-butoxycarbonyl)-4-methylpyrrol-3-yl)-propionsäuremethylester (**20**) langsam zugetropft und die Lösung anschließend 5.5 h gerührt. Dann wird eine Lösung aus 4.5 g (17.16 mol) Triphenylphosphin und 35 ml Dichlormethan zugefügt und die Reaktionsmischung anschließend 21.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Lösung viermal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wird danach abwechselnd mit 50 ml destilliertem Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen bis die wässrige Phase einen pH-Wert von 7 hat. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

Ausbeute = 0.454 g (0.672 mmol; 29%)

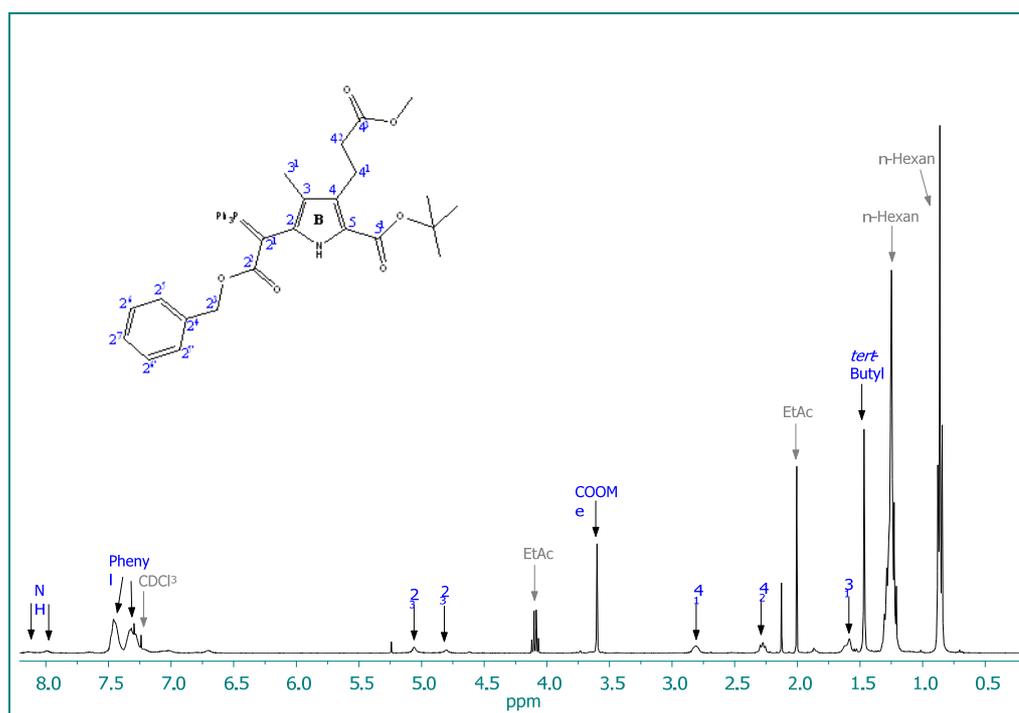


Abb. 108: ^1H -NMR-Spektrum von Benzyloxycarbonyl-(5-*tert*-butoxycarbonyl-4-(2-methoxycarbonyl-ethyl)-3-methylpyrrol-2-yl)-(triphenylphosphonid)-methanid (**17**) in CDCl_3 (400 MHz)

^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3 ; 400 MHz)

δ (ppm) = 1.47 (s, 9H, *tert*-Butyl); 1.57 (s, 2H, $\text{C}3^1$); 2.27 (t, 2H, $^3J = 8.09$ Hz, $\text{C}4^2$); 2.80 (m, 2H, $\text{C}4^1$); 3.65 (s, 3H, COOMe); 4.80 (s, breit, 0.7H, $\text{C}2^3$); 5.06 (s, breit, 1.3H, $\text{C}2^3$); 7.28-7.48 (m, 20H, Phenyl); 7.96 (s, breit, 0.6H, NH); 8.11 (s, breit, 0.4H, NH)

^{13}C -NMR-Spektrum (CDCl_3 ; 100 MHz)

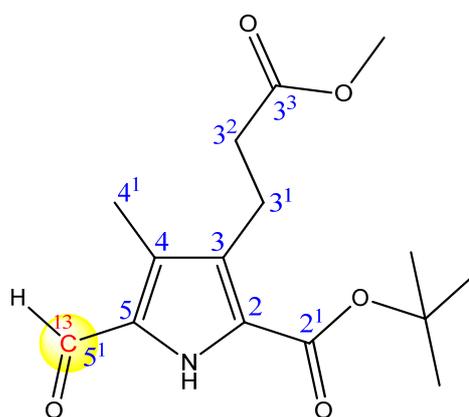
δ (ppm) = 9.63 ($\text{C}3^1$); 21.25 ($\text{C}4^1$); 28.45 (*tert*-Butyl); 35.20 ($\text{C}4^2$); 51.31 (COOMe); 64.10 ($\text{C}2^3$); 79.86 (*tert*-Butyl); 117.78 (C2); 121.81 (C3); 137.44 ($\text{C}2^4$); 139.16 (PPh_3); 160.85 (*tert*-Butyl); 168.83 ($\text{C}2^2$); 171.10 ($\text{C}2^1$); 173.82 (COOMe)

Massenspektrum (EI)

m/z (%) = 675 (100, $[\text{M}]^+$); 619 (85); 440 (24); 319 (9); 262 (97); 183 (48); 146 (9); 108 (22); 91 (40); 57 (15)

8.3.4 Synthese des C-Rings

8.3.4.1 Darstellung von (5-¹³C)-5-Formyl-3-(2-methoxycarbonylethyl)-4-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure-*tert*-butylester (33)^[64]



(33)



$$M = 295.33 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Lichtausschluss und Inertgasatmosphäre werden 1.8 ml (0.023 mol) N,N-Dimethylformamid (Cambridge Isotopes, Carbonyl-¹³C, 99%), das zuvor auf 0°C abgekühlt wurde, 0.31 ml (2.191 mmol) frisch destilliertes Phosphorylchlorid zugetropft und anschließend 30 min bei Raumtemperatur gerührt.

In einer zweiten Apparatur werden 0.658 g (2.461 mmol) 3-(2-Methoxycarbonylethyl)-4-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure-*tert*-butylester (**10**) in 0.2 ml (2.599 mmol) N,N-Dimethylformamid (Cambridge Isotopes, Carbonyl-¹³C, 99%) angelöst und auf 0°C abgekühlt. Dann wird die zuvor zubereitete Lösung aus N,N-Dimethylformamid (Cambridge Isotopes, Carbonyl-¹³C, 99%) und Phosphorylchlorid zugegeben und die Reaktionsmischung 15 min auf 65°C erwärmt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 41 ml einer 10%igen Natriumacetatlösung (5 g auf 45 ml destilliertem Wasser) zugefügt und die Lösung über Nacht im Kühlschrank gelagert.

Die gelbe wässrige Phase wird durch vorsichtiges Abpipettieren von der an der Wand haftenden, orangenen, organischen Phase getrennt. Die wässrige Phase wird anschließend mit jeweils 70 ml Chloroform extrahiert. Die orangefarbene organische

Phase wird in 50 ml Chloroform aufgenommen und dreimal mit jeweils 50 ml destilliertem Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden dreimal mit jeweils 150 ml Chloroform rückextrahiert. Alle organischen Phasen werden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Kieselgel (Merck 60) über eine 40 cm-Glassäule (Durchmesser 2.5 cm) mit Ethylacetat und n-Hexan als Laufmittel getrennt. Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

Ausbeute = 0.624 g (2.113 mmol; 86%)

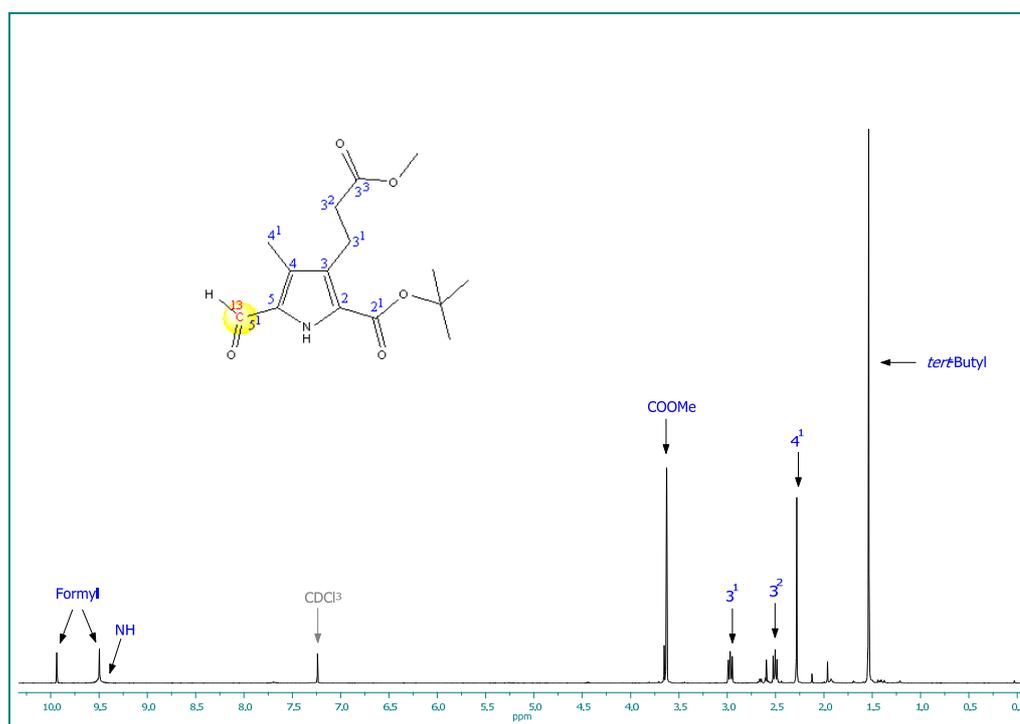


Abb. 109: ^1H -NMR-Spektrum von (5- ^{13}C)-5-Formyl-3-(2-methoxycarboneylethyl)-4-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure-*tert*-butylester (**33**) in CDCl_3 (400 MHz)

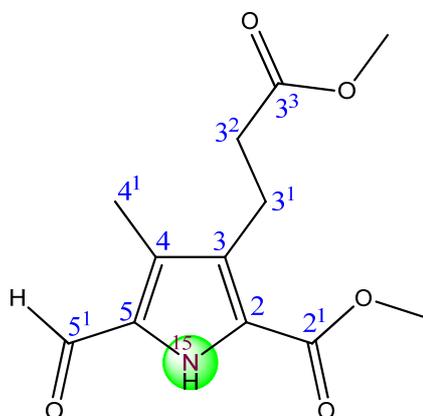
^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3 , 400 MHz)

δ (ppm) = 1.58 (s, 9H, *tert*-Butyl); 2.28 (s, 3H, $\text{C}4^1$); 2.50 (t, 2H, $^3J = 7.86$ Hz, $\text{C}3^2$); 2.97 (t, 2H, $^3J = 8.09$ Hz, $\text{C}3^1$); 3.63 (s, 3H, COOMe); 9.50 (s, 1H, NH); 9.50 und 9.94 (2 x s, 1H, $^1J = 176.13$ Hz, ^{13}C -Formyl)

^{13}C -NMR-Spektrum (CDCl_3 ; 100 MHz)

δ (ppm) = 8.29 ($\text{C}4^1$); 19.84 ($\text{C}3^1$); 28.20 (*tert*-Butyl); 34.53 ($\text{C}3^2$); 51.49 (COOMe); 82.50 (*tert*-Butyl); 125.86 (C2); 128.76 (C3); 129.31 (C5); 129.91 (C4); 159.79 (*tert*-Butyl); 173.25 (COOMe); 179.03 (Formyl)

8.3.4.2 Darstellung von ^{15}N -Methyl-3-(2-methoxycarbonyl)ethyl)-5-formyl-4-methyl-1H-pyrrol-2-carbonsäuremethylester (70)^[64]



(70)



$$M = 253.25 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Lichtausschluss und Inertgasatmosphäre werden 6 ml (77.98 mmol) Dimethylformamid auf 0°C abgekühlt und langsam 0.9 ml (9.861 mmol) Phosphorylchlorid zugetropft. Die Reaktionsmischung wird anschließend 15 min bei Raumtemperatur gerührt. In einer zweiten Apparatur werden 1.289 g (5.721 mmol) ^{15}N -Methyl-3-(2-(methoxycarbonyl)ethyl)-4-methyl-1H-pyrrol-2-carbonsäuremethylester (29) in 5 ml (64.979 mmol) Dimethylformamid gelöst und auf 0°C abgekühlt. Dann werden langsam 7 ml der Dimethylformamid/Phosphorylchloridlösung zugegeben und die Reaktionsmischung anschließend 15 min auf 65°C erwärmt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 100 ml einer 10%igen Natriumacetatlösung zugefügt und die Reaktionsmischung wird anschließend 15 min auf 75°C erwärmt. Daraufhin wird die Reaktionsmischung über Nacht im Kühlschrank gelagert, wobei sich an der Gefäßwand eine bräunliche Phase bildet. Die beiden Phasen werden von einander getrennt. Die wässrige Phase wird fünfmal mit jeweils 100 ml Dichlormethan extrahiert. Das bräunliche Öl wird in 100 ml Dichlormethan aufgenommen und fünfmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die wässrigen Phasen werden vereinigt und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt. Das rotbraune Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Kieselgel (Merck 60) mit n-Hexan und Ethylacetat (1:1) als Laufmittelgemisch über eine 40 cm-Glassäule

(Durchmesser = 1.5 cm) gereinigt. Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

Ausbeute = 1.44 g (5.686 mmol: 99%)

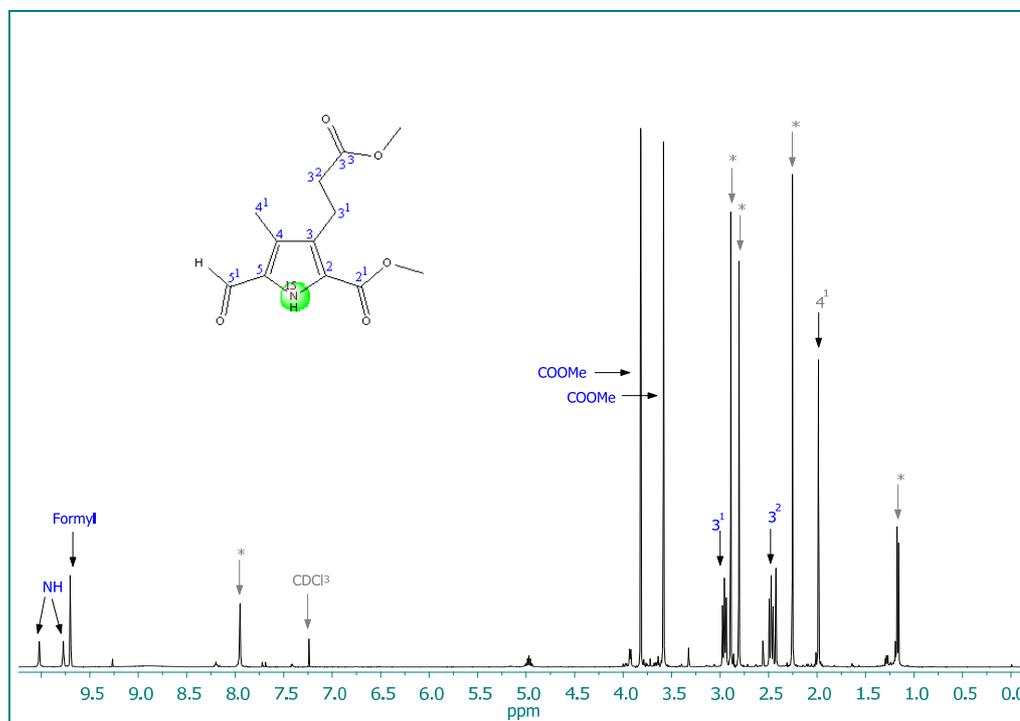


Abb. 110: ^1H -NMR-Spektrum von ^{15}N -Methyl-3-(2-methoxycarbonyl)ethyl-5-formyl-4-methyl-1H-pyrrol-2-carbonsäuremethylester (**70**) in CDCl_3 (400 MHz)

^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3 ; 400 MHz)

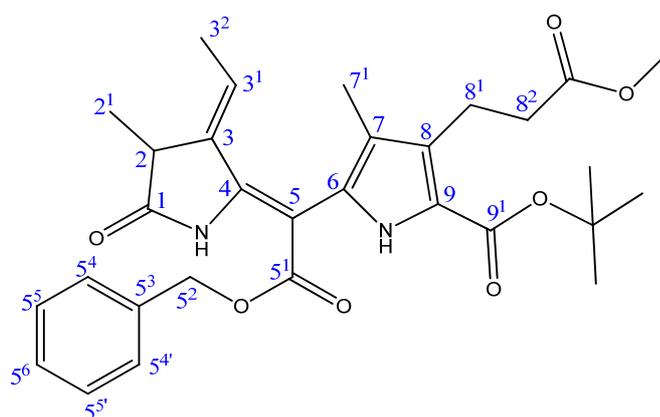
δ (ppm) = 1.99 (s, 3H, $\text{C}4^1$); 2.47 (t, 2H, $^3J = 7.77$ Hz; $\text{C}3^2$); 2.96 (t, 2H, $^3J = 7.77$ Hz, $\text{C}3^1$); 3.58 (s, 3H, COOMe); 3.82 (s, 3H, COOMe); 9.70 (s, 1H, Formyl); 9.77 und 10.02 (2 x s, 1H, $^1J = 99.49$ Hz, NH)

^{13}C -NMR-Spektrum (CDCl_3 ; 100 MHz)

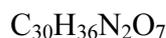
δ (ppm) = 8.24 ($\text{C}4^1$); 19.61 ($\text{C}3^1$); 36.42 ($\text{C}3^2$); 51.41 (COOMe); 51.78 (COOMe); 124.18 (C2); 129.62 (C3); 130.08 (C5); 130.23 (C4); 162.73 (COOMe); 173.25 (COOMe); 179.03 (Formyl)

8.3.5 Synthese der AB-Hälfte

8.3.5.1 Darstellung von 3-(5-Benzyloxycarbonyl-9-*tert*-butoxycarbonyl-2,3-dihydro-2,7-dimethyl-3-ethyliden-dipyrriin-1-(10*H*)-on-8-yl)-propionsäuremethylester (25)^[64]



(25)



$$M = 536.62 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Inertgasatmosphäre und Lichtausschluss werden 0.520 g (3.351 mmol) (E)-3-Ethyliden-4-methyl-2-thiosuccinimid (**5**) zusammen mit 0.239 g (3.534 mmol) Benzyloxycarbonyl-(5-*tert*-butoxycarbonyl-4-(2-methoxycarbonyl-ethyl)-3-methyl-pyrrol-2-yl)-(triphenylphosphonid)-methanid (**17**) in 200 ml Toluol gelöst und 26 h zum Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird anschließend säulenchromatographisch über Kieselgel (Merck 60) über eine 60 cm Säule (4 cm Durchmesser) mit einem Lösungsmittelgemisch aus n-Pentan und Ethylacetat (3:1) aufgetrennt. Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

Ausbeute = 0.234 g (0.435 mmol; 13%)

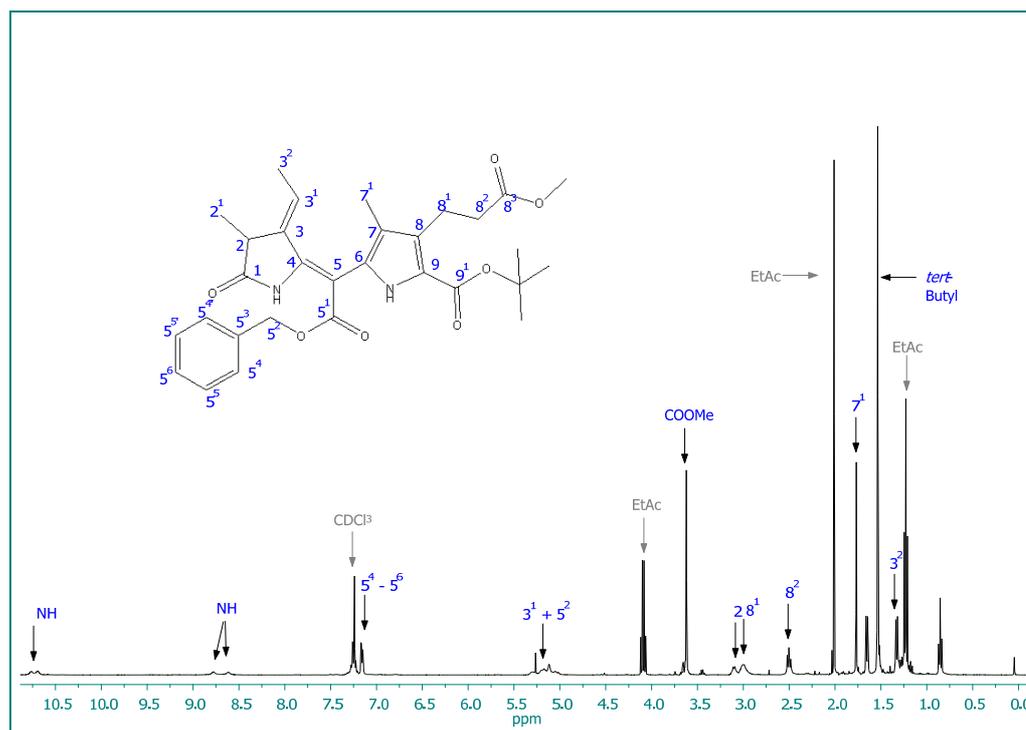


Abb. 111: ^1H -NMR-Spektrum von 3-(5-Benzyloxycarbonyl-9-*tert*-butoxycarbonyl-2,3-dihydro-2,7-dimethyl-3-ethyliden-dipyrin-1-(10*H*)-on-8-yl)-propionsäuremethylester (**25**) in CDCl_3 (400 MHz)

^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3 ; 400 MHz)

δ (ppm) = 1.33 (d, 3H, $^3J = 7.44$ Hz, $\text{C}2^1$); 1.54 (s, 9H, *tert*-Butyl); 1.65 (s, 3H, $\text{C}7^1$); 2.50 (t, 2H, $^3J = 7.72$ Hz, $\text{C}8^2$); 3.00 (m, breit, 2H, $\text{C}8^1$); 3.10 (q, 1H, $^3J = 7.09$ Hz, $\text{C}2$); 3.62 (s, 3H, COOMe); 5.20 (m, 3H, $\text{C}3^1$ und $\text{C}5^2$); 7.16 (m, 2H, $\text{C}5^4$); 7.25 (m, 4H, $\text{C}5^5$ und $\text{C}5^6$); 8.70 (s, breit, NH-Pyrrol)

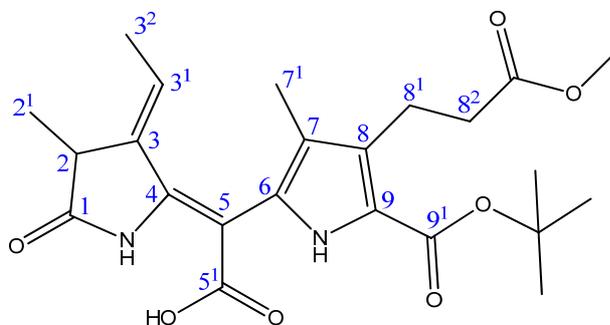
^{13}C -NMR-Spektrum (CDCl_3 ; 100 MHz)

δ (ppm) = 9.12 ($\text{C}7^1$); 15.86 ($\text{C}3^2$); 16.37 ($\text{C}2^1$); 21.02 ($\text{C}8^1$); 28,46 (*tert*-Butyl); 35.26 ($\text{C}8^2$); 37.90 ($\text{C}2$); 51.39(COOMe); 66.06 ($\text{C}5^2$); 80.90 (*tert*-Butyl); 119.12, 119.89, 125.49, 132.50, 133.63, 134.59 ($\text{C}3, 4, 6, 7, 8, 9$); 127.31 ($\text{C}5^4$); 127.92 ($\text{C}3^1, 5^6$); 128.43 ($\text{C}5^5$); 136.17 ($\text{C}5^3$); 153.19 ($\text{C}5$); 160.78 (*tert*-Butyl); 168.31 ($\text{C}5^1$); 173.48 (COOMe); 177.80 ($\text{C}1$)

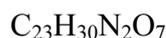
Massenspektrum (EI)

m/z (%) = 536 (82, $[\text{M}]^+$); 480 (62); 465 (11); 435 (9); 389 (24); 345 (100); 330 (11); 91 (52)

8.3.5.2 Darstellung von 9-*tert*-Butoxycarbonyl-2,3-dihydro-2,7-dimethyl-3-ethyliden-8-(2-methoxycarbonyl)-ethyl-dipyrrin-1-(10*H*)-on-5-carbonsäure (23)^[64]



(23)



$$M = 446.49 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Inertgasatmosphäre und Lichtausschluss werden 0.251 g (0.467 mmol) 3-(5-Benzyloxycarbonyl-9-*tert*-butoxycarbonyl-2,3-dihydro-2,7-dimethyl-3-ethylidendipyrrin-1-(10*H*)-on-8-yl)-propionsäuremethylester (25) in 30 ml Tetrahydrofuran gelöst und mit 0.191 g (2.975 mmol) Palladium 10% auf Aktivkohle versetzt. Die Apparatur wird evakuiert und dann mit Wasserstoff geflutet. Die Lösung wird anschließend 30 min gerührt. Dann wird die Apparatur erneut evakuiert und der Arbeitsschritt noch zweimal wiederholt. Die Apparatur wird zum Abschluss evakuiert und dann belüftet. Die Aktivkohle wird über einen Faltenfilter abfiltriert und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird chromatographisch mittels präparativer Schichtchromatographie (PSC) über Silicagel mit Ethylacetat/n-Pentan (2:1) getrennt. Die einzelnen Banden werden von der Platte entfernt und mit Ethylacetat extrahiert. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt.

Ausbeute = 0.152 g (0.340 mmol; 73%)

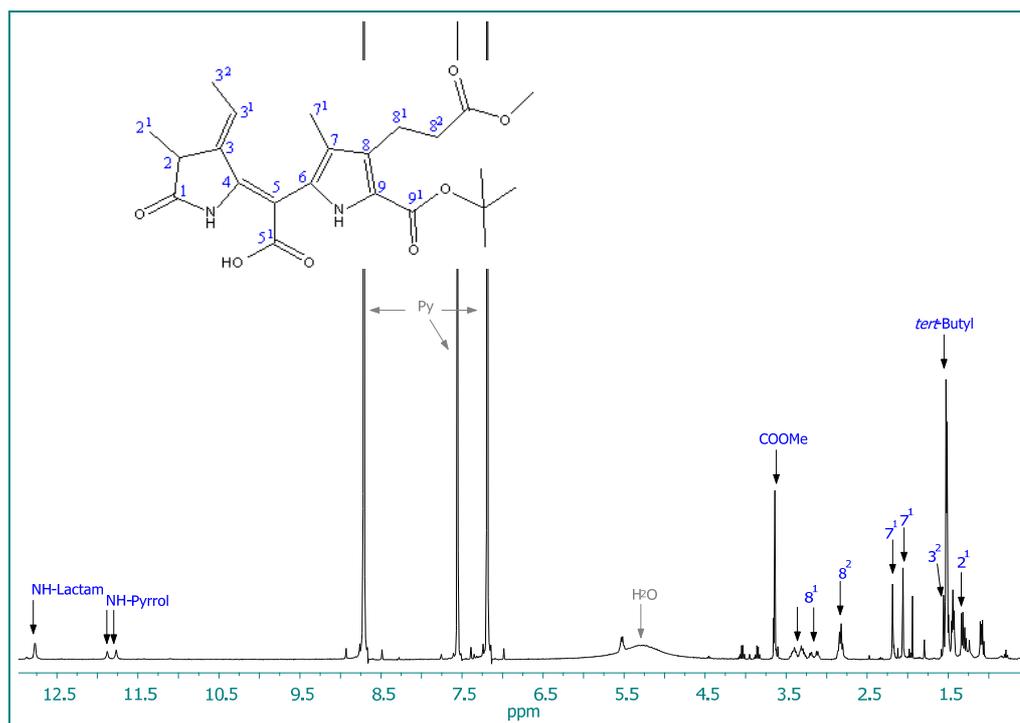


Abb. 112: ^1H -NMR-Spektrum von 9-*tert*-Butoxycarbonyl-2,3-dihydro-2,7-dimethyl-3-ethyliden-8-(2-methoxycarbonyl)-ethyl-dipyrin-1-(10*H*)-on-5-carbonsäure (**23**) in Pyridin- d_5 (400 MHz)

^1H -NMR-Spektrum (Pyridin- d_5 ; 400 MHz)

δ (ppm) = 1.36(m, 3H, $\text{C}2^1$); 1.57 (s, 9H, *tert*-Butyl); 1.69 (d, 3H, $^3J = 6.41$ Hz; $\text{C}3^2$); 1.82 (s, 1.5H, $\text{C}7^1$); 1.87 (s, 1.5H, $\text{C}7^1$); 2.55 (m, 2H, $\text{C}8^2$); 2.90 (m, 2H, $\text{C}8^1$); 3.66 (s, 3H, COOMe); 5.32 (m, 1H, $\text{C}3^1$); 8.81 (s, breit, 0.5H, NH-Pyrrol); 9.09 (s, breit, 0.5H, NH-Pyrrol); 10.73 (s, breit, 0.5H, NH-Lactam); 10.84 (s, breit, 0.5H, Lactam)

^{13}C -NMR-Spektrum (CDCl_3 ; 100 MHz)

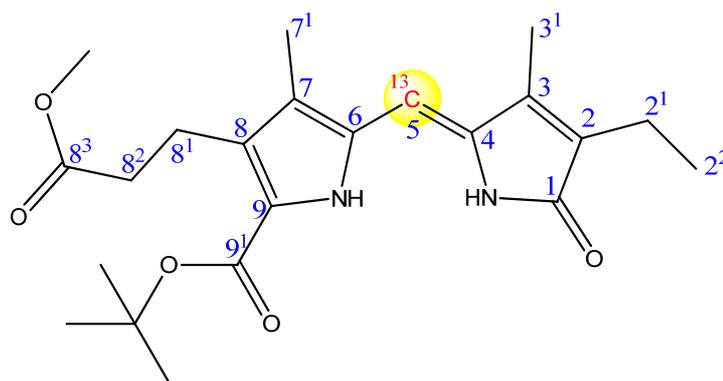
δ (ppm) = 9.13 (7^1); 15.66 ($\text{C}3^2$); 16.38 ($\text{C}2^1$); 20.90 ($\text{C}8^1$); 28.18 (*tert*-Butyl); 35.02 ($\text{C}8^2$); 37.67 (C2); 51.21 (COOMe); 81.00 (*tert*-Butyl); 133.23 ($\text{C}3^1$); 119.04, 120.08, 125.28, 133.12, 134.23, 134.26 (C3, 4, 6, 7, 8, 9); 153.29 (C5); 160.92 (*tert*-Butyl); 170.66 (COOMe); 180.09 (C1)

Massenspektrum (EI)

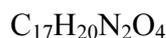
m/z (%) = 446 (9, $[\text{M}]^+$), 402 (25); 390 (12); 346 (100); 313 (50), 271 (18); 224 (7);

8.3.6 Synthese der CD-Hälfte

8.3.6.1 Darstellung von (5-¹³C)-2-Ethyl-9-carbonsäure-*tert*-butylester-8-(2-methoxycarbonyl-ethyl)-3,7-dimethylpyrromethen-1*H*-pyrrol (50)^[64]



(50)



$$M = 316.35 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Lichtausschluss und Inertgasatmosphäre werden 0.575 g (1.948 mmol) (5-¹³C)-5-Formyl-3-(2-methoxycarbonyl-ethyl)-4-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure-*tert*-butyl-ester (**49**) mit 0.250 g (1.997 mmol) 3-Ethyl-4-methyl-2-(5*H*)-pyrrol (**26**) und 0.67 ml (4.489 mmol) Diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-en (DBU) in 2.6 ml Tetrahydrofuran und Molekularsieb (3Å) gemischt und anschließend 19 h zum Rückfluss erhitzt. Dann wird das Molekularsieb abdekantiert und mit Chloroform gewaschen, bis das Lösungsmittel farblos ist. Die vereinigten organischen Phasen werden erst dreimal mit jeweils 200 ml einer 2 molaren Natriumcarbonatlösung gewaschen. Anschließend wird dreimal mit jeweils 200 ml einer gesättigten Kaliumdihydrogenphosphatlösung und zuletzt dreimal mit jeweils 200 ml einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Kieselgel (Merck 60) mit Dichlormethan und Ethylacetat als Laufmittelgemisch (49:1) über eine 20 cm-Glassäule (1 cm Durchmesser) gereinigt. Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

Ausbeute = 0.201 g (0.635 mmol; 26%)

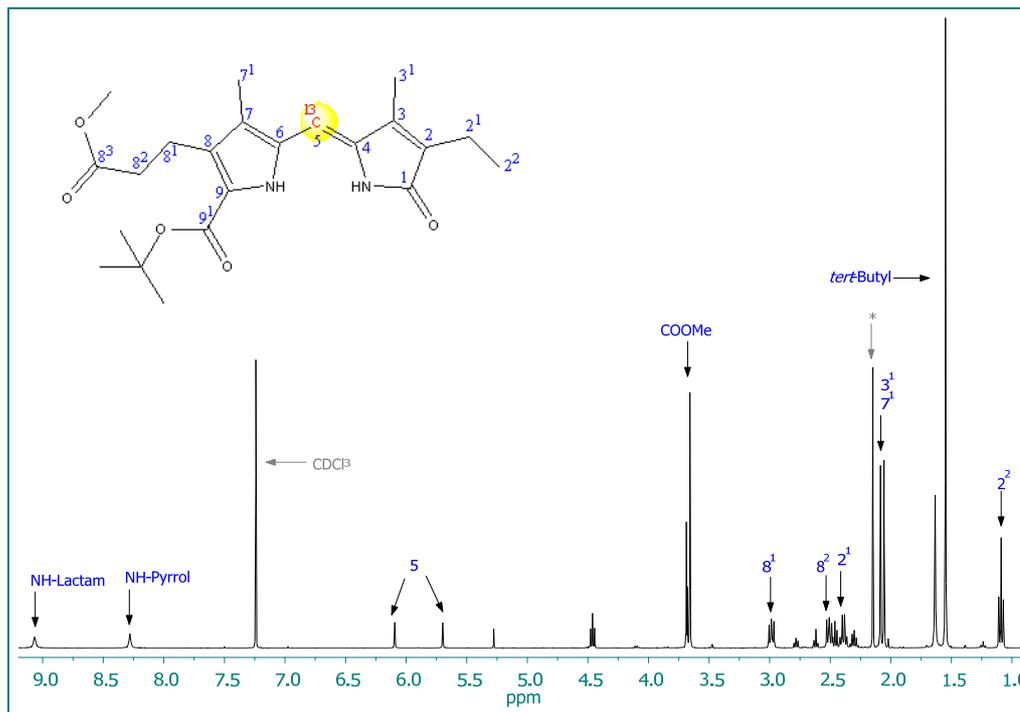


Abb. 113: ^1H -NMR-Spektrum von (5- ^{13}C)-2-Ethyl-9-carbonsäure-*tert*-butylester-8-(2-methoxycarbonyl-ethyl)-3,7-dimethylpyrromethen-1*H*-pyrrol (**50**)

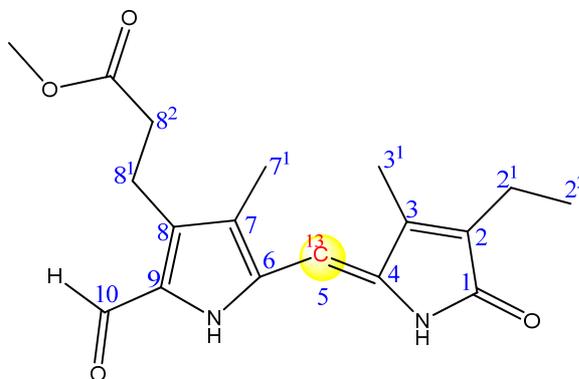
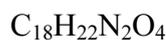
^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3 ; 400 MHz)

δ (ppm) = 1.11 (t, 3H, $^3J = 7.56$ Hz, $\text{C}2^2$); 1.55 (s, 9H, *tert*-Butyl); 2.06 und 2.09 (2 x s, 6H, $\text{C}3^1$ und $\text{C}7^1$); 2.39 (q, 1H, $^3J = 7.55$ Hz, $\text{C}2^1$); 2.51 (t, 2H, $^3J = 8.05$ Hz, $\text{C}8^1$); 2.99 (t, 2H, $^3J = 8.05$ Hz, $\text{C}8^2$); 3.66 (s, 3H, COOMe); 5.70 und 6.09 (2 x s, 1H, $J = 158.69$ Hz, ^{13}C -5); 8.28 (s, NH-Pyrrol); 9.07 (s, NH-Lactam)

^{13}C -NMR-Spektrum (CDCl_3 ; 100 MHz)

^{13}C -5 = 96.57 ppm

8.3.6.2 Darstellung von (5- C^{13})-2-Ethyl-9-formyl-8-(2-methoxycarbonylethyl)-3,7-dimethylpyrromethen-1*H*-pyrrol (**52**)^[64]

**(52)**

$$M = 330.38 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Lichtausschluss und Inertgasatmosphäre werden 0.201 g (0.500 mmol) (5- ^{13}C)-2-Ethyl-9-carbonsäure-*tert*-butylester-8-(2-methoxycarbonylethyl)-3,7-dimethylpyrromethen-1*H*-pyrrol (**50**) in 16.8 ml (0.218 mol) Trifluoressigsäure gelöst. Dann werden 16.8 ml (0.154 mol) Trimethylorthoformiat zugefügt und die Reaktionsmischung 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird in 900 ml Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit jeweils 400 ml destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wird zweimal mit jeweils 400 ml einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Kieselgel (Merck 60) mit Dichlormethan und Ethylacetat als Laufmittelgemisch (2:1) getrennt. Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

Ausbeute = 60 mg (0.182 mmol; 36.4%)

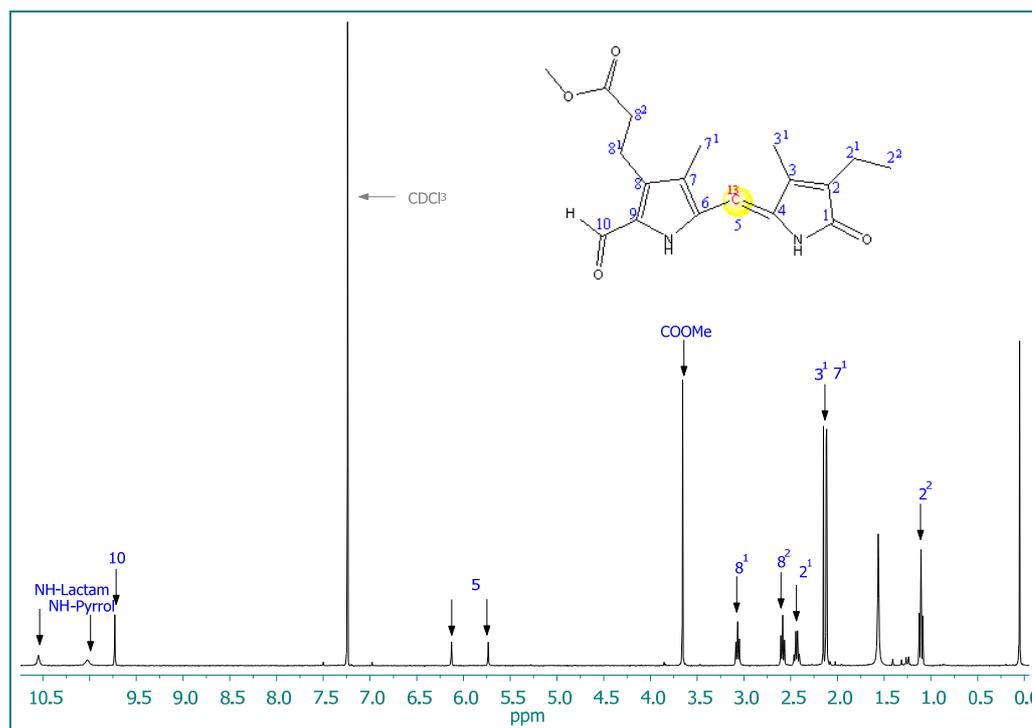
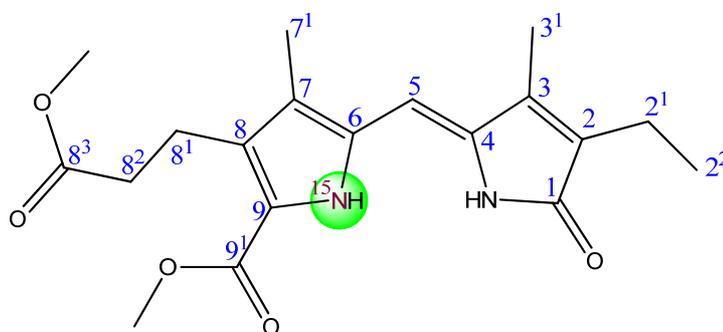


Abb. 114: ¹H-NMR-Spektrum von (5-C¹³)-2-Ethyl-9-formyl-8-(2-methoxycarbonylethyl)-3,7-dimethylpyrromethen-1*H*-pyrrol (**52**) in CDCl₃ (400 MHz)

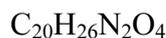
¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃, 400 MHz)

δ (ppm) = 1.11 (t, 2H, ³J = 7.60 Hz, C2²); 2.11 (s, 3H, C7¹); 2.15 (s, 3H, C3¹); 2.44 (q, 2H, ³J = 7.6 Hz, C2¹); 2.59 (t, 2H, ³J = 7.7 Hz, C8²); 3.07 (t, 2H, ³J = 7.7 Hz, C8¹); 3.66 (s, 3H, COOMe); 5.74 und 6.13 (2 x s, 1H, ¹J = 151.84 Hz, C5); 9.73 (s, 1H, C10); 10.02 (s, breit, NH-Pyrrol); 10.55 (s, breit, NH-Lactam)

8.3.6.3 Darstellung von ^{15}N -2-Ethyl-9-carbonsäuremethylester-8-(2-methoxycarbonyl)ethyl)-3,7-dimethylpyrromethen-1*H*-pyrrol^[64,70] (72)



(72)



$$M = 358.43 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Lichtausschluss und Inertgasatmosphäre werden 1.44 g (5.686 mmol) ^{15}N -Methyl-3-(2-methoxycarbonyl)ethyl)-5-formyl-4-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäuremethylester (**70**) in 6.5 ml (80.16 mmol) Tetrahydrofuran gelöst. Dann werden 0.8 g (6.391 mmol) 3-Ethyl-4-methyl-2-(5*H*)-pyrrol (**26**), Molekularsieb (3Å) und 1.8 ml (12.06 mmol) 1,8-Diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-en (DBU) zugefügt und die Reaktionsmischung 19 h zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung von dem Molekularsieb getrennt und das Molekularsieb anschließend mit Chloroform gewaschen, bis die Lösung nicht mehr gefärbt ist. Die organischen Phasen werden vereinigt und dreimal mit jeweils 100 ml (2 M) Natriumcarbonatlösung gewaschen. Dann wird dreimal mit jeweils 100 ml gesättigter Kaliumhydrogenphosphatlösung und dreimal mit jeweils 100 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das dunkelbraune Rohprodukt wird säulenchromatographisch über Kieselgel (Merck 60) mit Dichlormethan und Ethylacetat als Laufmittelgemisch (4:1) getrennt. Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

Ausbeute = 0.928 mg (2.559 mmol;45%)

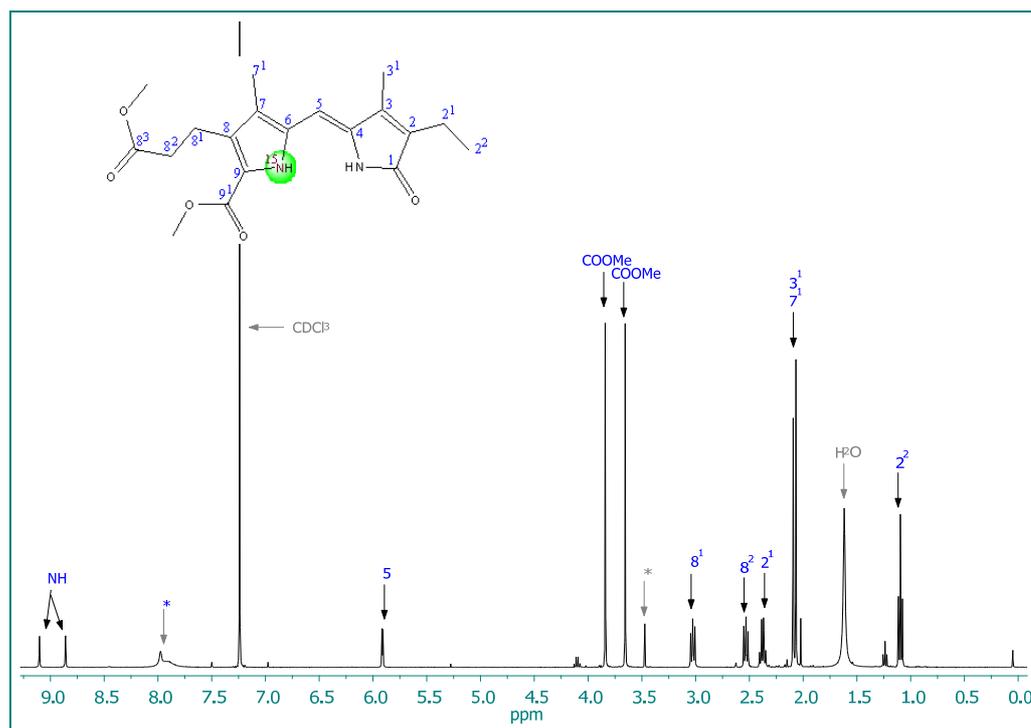


Abb. 115: ^1H -NMR-Spektrum von ^{15}N -2-Ethyl-9-carbonsäuremethylester-8-(2-methoxycarbonyl-ethyl)-3,7-dimethylpyrromethen-1*H*-pyrrol (**72**) in CDCl_3 (400 MHz)

^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3 ; 400 MHz)

δ (ppm) = 1.10 (t, 2H, $^3J = 7.57$ Hz, $\text{C}2^2$); 2.07 und 2.09 (2 x s, 6H, $\text{C}3^1$ und $\text{C}7^1$); 2.38 (q, 1H, $^3J = 7.57$ Hz, $\text{C}2^1$); 2.53 (t, 2H, $^3J = 7.89$ Hz, $\text{C}8^2$); 3.03 (t, 2H, $^3J = 7.89$ Hz, $\text{C}8^1$); 3.66 (s, 3H, COOMe); 3.84 (s, 3H, COOMe); 5.91 (d, 1H, $^1J = 3.79$ Hz, $\text{C}5$); 8.86 und 9.10 (2 x s, ^{15}NH , $^1J = 96.69$ Hz)

^{13}C -NMR-Spektrum (CDCl_3 , 100 MHz)

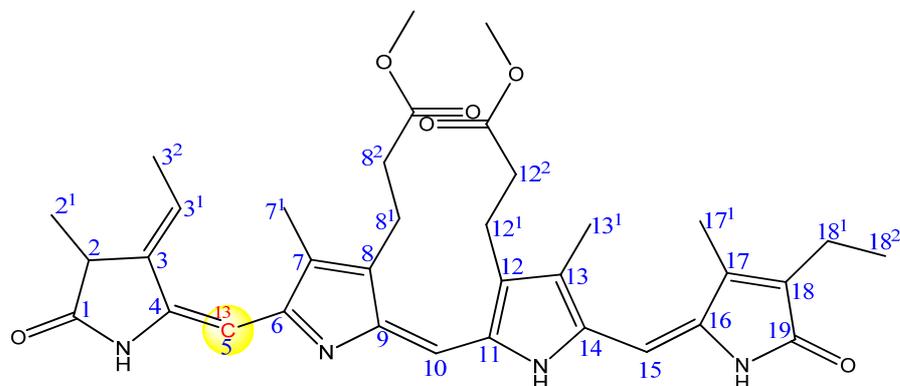
δ (ppm) = 9.16 ($\text{C}7$); 9.63 ($\text{C}2^2$); 13.30 ($\text{C}3^1$); 16.76 ($\text{C}2^1$); 20.50 ($\text{C}8^1$); 34.58 ($\text{C}8^2$); 51.35 und 51.52 (2 x COOMe); 97.83 ($\text{C}5$); 121.17 und 121.32 ($\text{C}9$); 123.19 und 123.23 ($\text{C}7$); 128.17 und 128.32 ($\text{C}6$); 130.46 und 130.50 ($\text{C}8$); 133.43 ($\text{C}4$); 135.68 ($\text{C}2$); 141.74 ($\text{C}3$); 161.15 ($\text{C}10$); 173.50 ($\text{C}1$); 173.59 (COOMe)

Massenspektrum (EI)

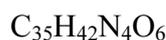
m/z (%) = 361 (81, $[\text{M}]^+$); 330 (10, $[\text{M}-\text{OMe}]^+$); 301 (8, $[-\text{COOMe}]^+$); 287 (100, $[\text{M}-\text{CH}_2\text{COOMe}]^+$); 269 (9); 227 (12); 212 (6); 135 (2)

8.3.7 Synthese des Tetrapyrrols

8.3.7.1 Darstellung von (5-¹³C)-Phycocyanobilindimethylester (75)^[64]



(75)



$$M = 615.73 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Lichtausschluss und Inertgasatmosphäre werden 23.3 mg (0.052 mmol) (5-¹³C)-9-*tert*-Butoxycarbonyl-2,3-dihydro-2,7-dimethyl-3-ethyliden-8-(2-methoxycarbonyl)-ethyl-dipyrrin-1-(10*H*)-on-5-carbonsäure (**42**) in 1 ml (12.98 mmol) Trifluoressigsäure gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird die Lösung auf -20 °C abgekühlt und 20.5 mg (0.062 mmol) 2-Ethyl-9-formyl-8-(2-methoxycarbonyl)ethyl-3,3-dimethyl-1*H*-pyrrol (**24**), gelöst in 5 ml (64.90 mmol) Trifluoressigsäure, zugefügt. Anschließend wird die Lösung 8 h bei -20 °C gerührt. Dann werden 2.4 ml Methanol zugefügt und die Reaktionsmischung weitere 30 min gerührt. Danach wird das Lösungsmittel unter Erwärmen auf Raumtemperatur im Argonstrom vertrieben. Der Rückstand wird in 70 ml Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit jeweils 100 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der dunkelblaue Rückstand wird mittels präparativer Schichtchromatographie über Kieselgel (Merck 60) mit Dichlormethan und Ethylacetat als Lösungsmittelgemisch (1:1) gereinigt. Die dunkelblaue Bande ($R_f = 0.65$) wird von der Platte entfernt und mit Pyridin eluiert. Das Lösungsmittel wird im Anschluss unter Vakuum entfernt. Zurück bleibt das Produkt in Form eines dunkelblauen Feststoffs.

Ausbeute = 19.4 mg (0.032 mmol, 62%)

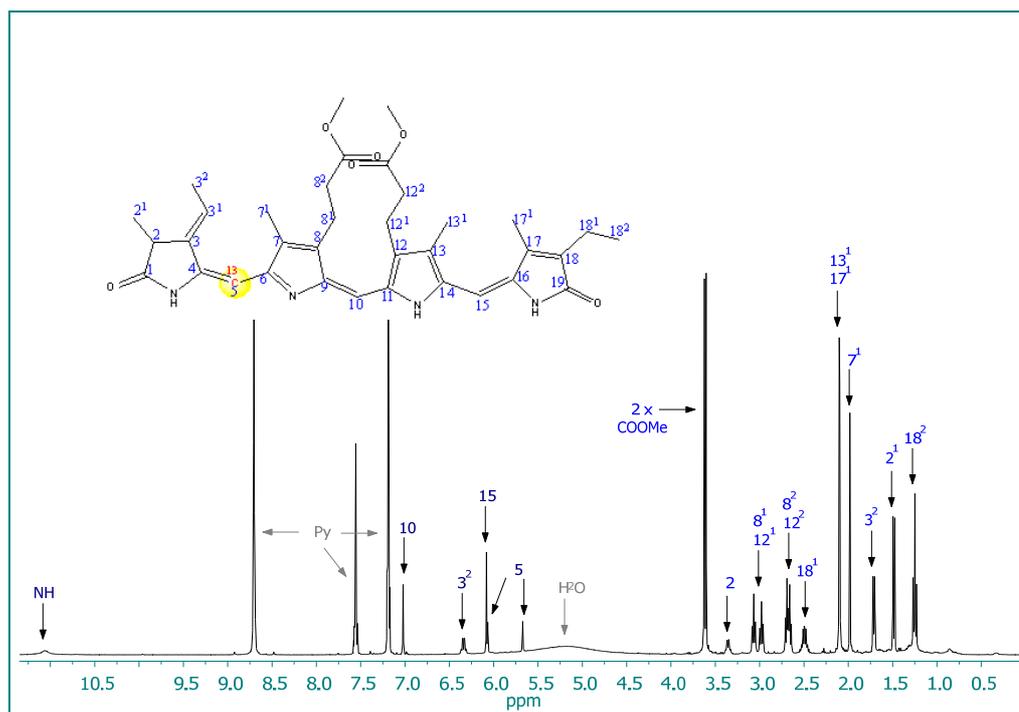


Abb. 116: ^1H -NMR-Spektrum von (5- ^{13}C)-Phycocyanobilindimethylester (**75**) in Pyridin- d_5 (400 MHz)

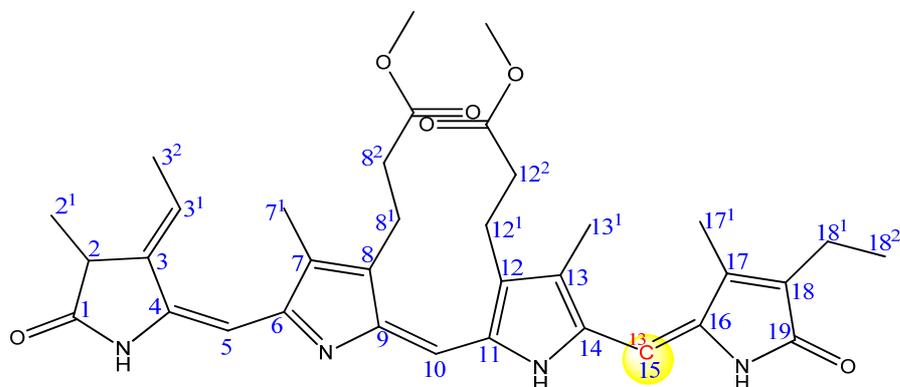
^1H -NMR-Spektrum (Pyridin- d_5 ; 400 MHz)

δ (ppm) = 1.44 (t, 3H, $^3J = 7.5$ Hz, C18 2); 1.68 (d, 3H, C2 1); 1.90 (d, 3H, $^3J = 7.2$ Hz, C3 2); 2.140 (s, 3H, C7 1); 2.292 und 2.296 (2 x s, 6H, C13 1 und C17 1); 2.686 (m, 2H, C18 1); 2.886 (m, 4H, C8 2 und C12 2); 3.173 und 3.261 (2 x t, 4H, $^3J = 7.4$ Hz, $^3J = 7.5$ Hz, C8 1 und C12 1); 3.553 (q, 1H, $^3J = 7.4$ Hz, C2); 3.798 und 3.818 (2 x s, 6H, COOMe); 5.67 und 6.07 (2 x s, 1H, $^1J = 157.9$ Hz, C5); 6.08 (s, 1H, C15); 6.534 (dq, 1H, C3 1); 7.220 (s, 1H, C10); 11.294 (s, breit, NH)

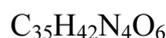
^{13}C -NMR-Spektrum (Pyridin- d_5 ; 100 MHz)

5- $^{13}\text{C} = 87.54$ ppm

8.3.7.2 Darstellung von (15-¹³C)-Phycocyanobilindimethylester (51)^[64]



(51)



$$M = 615.73 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Lichtausschluss und Inertgasatmosphäre werden 48 mg (0.011 mmol) 9-*tert*-Butoxycarbonyl-2,3-dihydro-2,7-dimethyl-3-ethyliden-8-(2-methoxycarbonyl)ethyl-dipyrrin-1-(10*H*)-on-5-carbonsäure (**23**) in 3 ml (38.94 mmol) Trifluoressigsäure gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird die Lösung auf -10°C abgekühlt und langsam eine Lösung aus 60 mg (0.018 mmol) (5-¹³C)-2-Ethyl-9-formyl-8-(2-methoxycarbonyl)ethyl)-3,7-dimethylpyrromethen-1*H*-pyrrol (**52**) und 11 ml (142.8 mmol) Trifluoressigsäure zugetropft. Anschließend wird die Reaktionsmischung 18 h bei -10°C gerührt. Dann werden 6 ml (147.9 mmol) Methanol zugefügt und die Reaktionsmischung weitere 30 min gerührt. Das Lösungsmittel wird im Argonstrom eingengt und anschließend in Dichlormethan aufgenommen. Die organische Lösung wird dreimal mit jeweils 200 ml einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels präparativer Schichtchromatographie über Silicagel (Merck) mit einem Laufmittelgemisch aus Ethylacetat und Dichlormethan (1:1) gereinigt. Die dunkelblaue Bande wird von der DC-Platte entfernt und mit Ethylacetat gewaschen. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt. Das Produkt wird als dunkelblauer Feststoff erhalten.

Ausbeute = 17.9 mg (2.88 mmol; 27%)

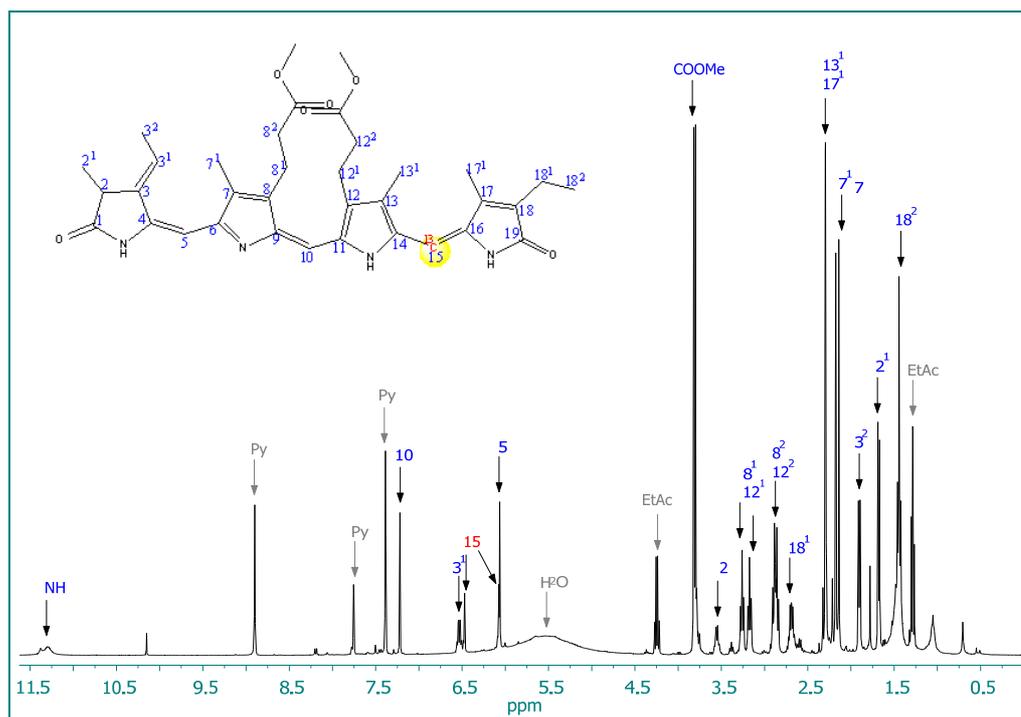


Abb. 117: ^1H -NMR-Spektrum von ($^{15}\text{-}^{13}\text{C}$)-Phycocyanobilindimethylester (**51**) in Pyridin- d_5 (400 MHz)

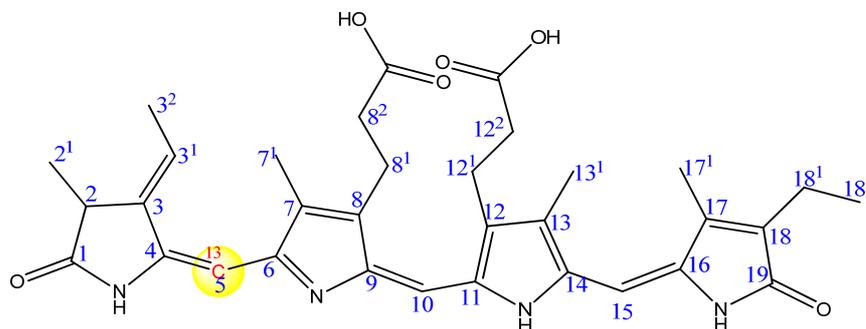
^1H -NMR-Spektrum (Pyridin- d_5 ; 400 MHz)

δ (ppm) = 1.44 (t, 3H, $^3\text{J} = 7.5$ Hz, C18²); 1.68 (d, 3H, C2¹); 1.90 (d, 3H, $^3\text{J} = 7.2$ Hz, C3²); 2.14 (s, 3H, C7¹); 2.29 und 2.30 (2 x s, 6H, C13¹ und C17¹); 2.69 (m, 2H, C18¹); 2.89 (m, 4H, C8² und C12²); 3.17 und 3.26 (2 x t, 4H, $^3\text{J} = 7.4$ Hz, $^3\text{J} = 7.5$ Hz, C8¹ und C12¹); 3.55 (q, 1H, $^3\text{J} = 7.4$ Hz, C2); 3.80 und 3.82 (2 x s, 6H, COOMe); 6.06 (s, 1H, C5); 6.08 und 6.47 (2 x s, 1H, C15); 6.53 (dq, 1H, C3¹); 7.22 (s, 1H, C10); 11.29 (s, breit, NH)

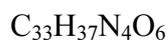
^{13}C -NMR-Spektrum (Pyridin- d_5 ; 100 MHz)

$^{13}\text{C}_{15} = 96.07$ ppm

8.3.7.3 Darstellung von (5-¹³C)-Phycocyanobilin (41)^[64]



(41)



$$M = 586.67 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Lichtausschluss und Inertgasatmosphäre werden 19.4 mg (0.032 mmol) (5-¹³C)-Phycocyanobilindimethylester (**75**) in 60 ml eines Gemisches aus destilliertem Wasser und Trifluoressigsäure (1:1) gelöst und mit 20.25 g saurem Ionenaustauscher versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird der saure Ionenaustauscher über eine Fritte abfiltriert und fünfmal abwechselnd mit jeweils 50 ml destilliertem Wasser und 50 ml einer Mischung aus Chloroform und Methanol (49:1) gewaschen. Die organischen Phasen werden vereinigt und mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen bis der pH-Wert der wässrigen Lösung bei pH = 6 liegt. Die wässrigen Phasen werden vereinigt und einmal mit einer Mischung aus Chloroform und Methanol (49:1) rückextrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Dann wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird in wenig Dichlormethan aufgenommen und mittels präparativer Schichtchromatographie über Kieselgel (Merck) mit einem Lösungsmittelgemisch aus Dichlormethan, Methanol und n-Hexan (10:2:2) gereinigt. Die untere blaue Bande ($R_f = 0.25$) wird von der Platte gelöst und mit Pyridin eluiert.

Ausbeute = 11 mg (0.019 mmol; 59%)

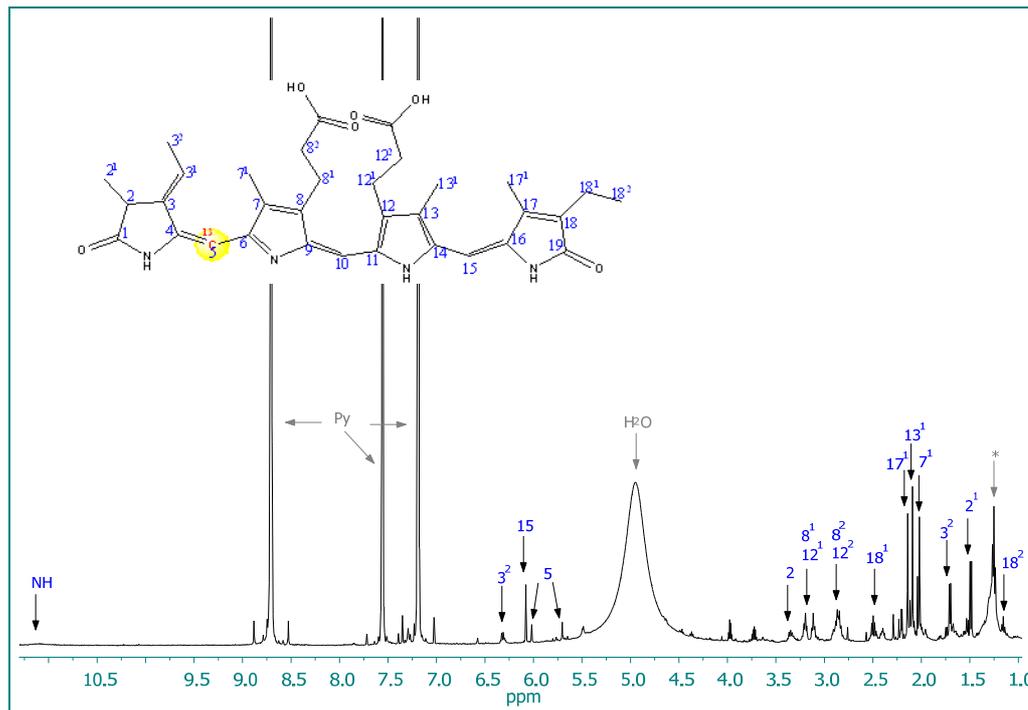


Abb. 118: ^1H -NMR-Spektrum von (5- ^{13}C)-Phycocyanobilin (**41**) in Pyridin- d_5 (400 MHz)

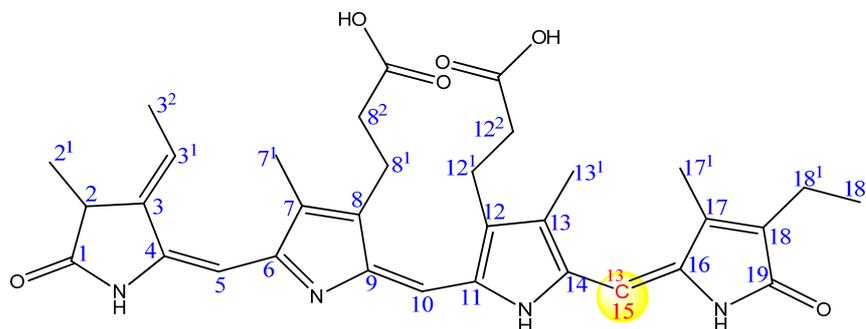
^1H -NMR-Spektrum (Pyridin- d_5 , 400 MHz)

δ (ppm) = 1.50 (t, 3H, $^3J = 7.24$ Hz, C18 2); 1.71 (d, 3H, $^3J = 7.36$ Hz, C2 1); 2.03, 2.10 und 2.15 (3 x s, 12H, C7 1 , C13 1 und C17 1); 2.50 (m, 2H, C18 1); 2.87 (m, 4H, C8 1 und C12 1); 3.12 und 3.20 (m, 4H, C8 2 und C12 2); 3.36 (m, 1H, C2); 5.70 und 6.02 (2 x s, 1H, $^1J = 157.67$ Hz, C5); 6.08 (s, 1H, C15); 6.31 bis 6.35 (m, 1H, C3 1); 11.12 (s, breit, NH)

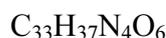
^{13}C -NMR-Spektrum (Pyridin- d_5 ; 100 MHz)

(5- ^{13}C) = 87.63 ppm

8.3.7.4 Darstellung von (15-¹³C)-Phycocyanobilin (48)^[64]



(48)



$$M = 586.67 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Lichtausschluss und Inertgasatmosphäre werden 17.7 mg (0.029 mmol) (15-¹³C)-Phycocyanobilindimethylester (**51**) in 66 ml eines Gemisches aus destilliertem Wasser und Trifluoressigsäure (1:1) gelöst und mit 27.3 g saurem Ionenaustauscher versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 40 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird der saure Ionenaustauscher über eine Fritte abfiltriert und fünfmal abwechselnd mit jeweils 75 ml destilliertem Wasser und 75 ml einer Mischung aus Chloroform und Methanol (49:1) gewaschen. Die organischen Phasen werden vereinigt und mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen bis der pH-Wert der wässrigen Lösung bei pH = 6 liegt. Die wässrigen Phasen werden vereinigt und einmal mit einer Mischung aus Chloroform und Methanol (49:1) rückextrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Dann wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird in wenig Dichlormethan aufgenommen und mittels präparativer Schichtchromatographie über Kieselgel (Merck) mit einem Lösungsmittelgemisch aus Dichlormethan, Methanol und n-Hexan (10:2:2) gereinigt. Die beiden blauen Banden werden von der Platte gelöst und mit Pyridin eluiert.

Ausbeute = 8 mg (0.014 mmol; 48%)

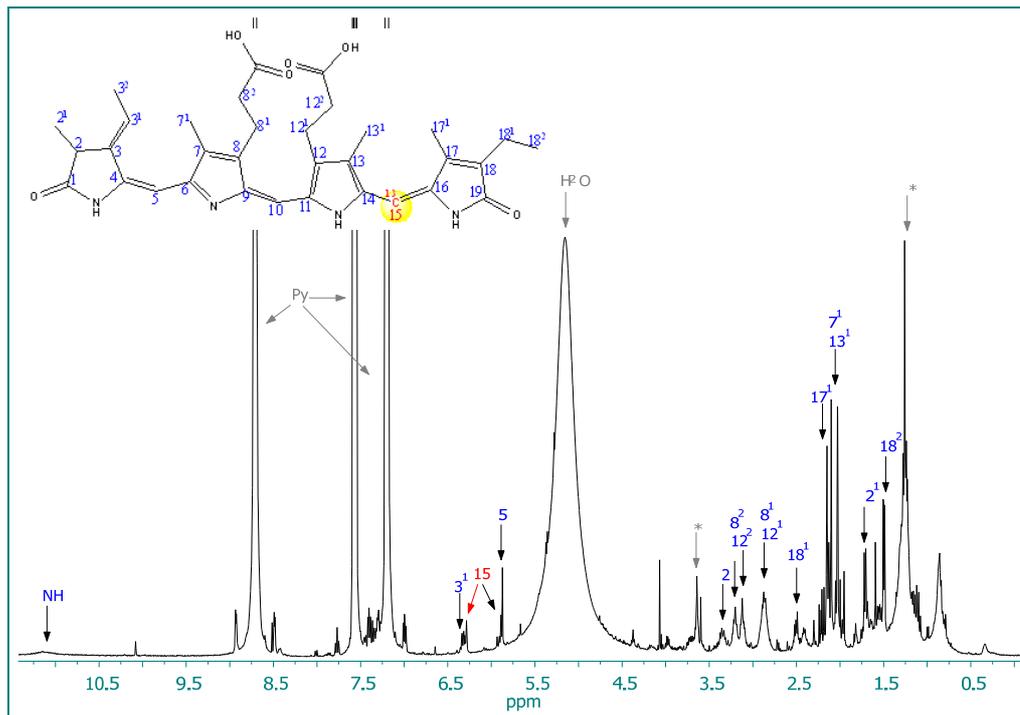


Abb. 119: ^1H -NMR-Spektrum von ($^{15}\text{-}^{13}\text{C}$)-Phycocyanobilin (**48**) in Pyridin- d_5 (400 MHz)

^1H -NMR-Spektrum (Pyridin- d_5 , 400 MHz)

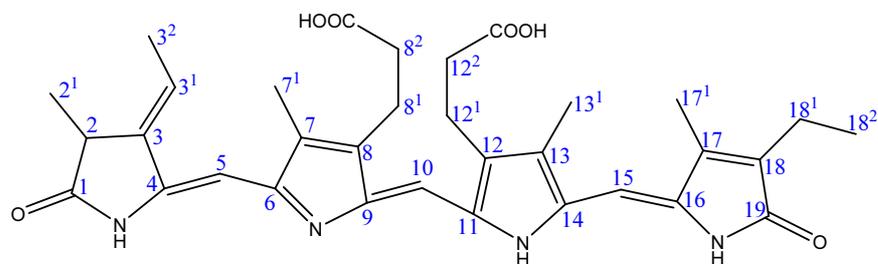
δ (ppm) = 1.50 (t, 3H, $^3\text{J} = 7.24$ Hz, C18 2); 1.71 (d, 3H, $^3\text{J} = 7.36$ Hz, C2 1); 2.03, 2.10 und 2.15 (3 x s, 12H, C7 1 , C13 1 und C17 1); 2.50 (m, 2H, C18 1); 2.87 (m, 4H, C8 1 und C12 1); 3.12 und 3.20 (m, 4H, C8 2 und C12 2); 3.36 (m, 1H, C2); 5.87 (1, 1H, C5); 5.89 und 6.29 (2 x s, 1H, $^1\text{J} = 158.11$ Hz, C15); 6.31 bis 6.35 (m, 1H, C3 1); 11.12 (s, breit, NH)

^{13}C -NMR-Spektrum (Pyridin- d_5 , 100 MHz)

$^{13}\text{C}_{15} = 96.07$ ppm

8.4 Spaltung von Phycocyanobilindimethylester (28)

8.4.1 Isolierung von Phycocyanobilin (3) aus *Spirulina platensis*



(3)



$$M = 586.68 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Das Phycocyanobilin (PCB) (3) wird aus dem Cyanobakterium *Spirulina platensis* isoliert. Dazu werden 200 g der gefriergetrockneten Cyanobakterien in 1000 ml Methanol aufgeschlämmt und in einem Ultraschallbad 10 min gewaschen. Die Cyanobakterien werden abfiltriert und wieder in 1000 ml Methanol aufgeschlämmt. Der Arbeitsschritt wird solange wiederholt bis das Filtrat nahezu farblos ist. Anschließend wird der Filtrationsrückstand zusammen mit 8.00g (45.42 mmol) Ascorbinsäure in 1500 ml destilliertem Methanol aufgeschlämmt und unter Lichtausschluss 16 h und Inertgasatmosphäre bei 50°C gerührt.

Dann werden die Cyanobakterien abfiltriert, erneut in 900 ml Methanol aufgeschlämmt und für ca. 10 min in einem Ultraschallbad gewaschen. Die Cyanobakterien werden abfiltriert und der Arbeitsschritt wird zweimal wiederholt. Die Filtrate werden vereinigt und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

Der Rotationsrückstand wird in wenig 0.2 M Kaliumphosphat-Puffer (pH = 8.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (94:6)) gelöst und säulenchromatographisch über reversed-phase C-18-Material (Merck LiChroprep RP-18 – für die Flüssigkeitschromatographie) mit einem Lösungsmittelgemisch aus 0.2 M Kaliumphosphat-Puffer und Acetonitril (70 / 30) aufgereinigt. Das Säulenmaterial wird dazu zunächst mit Isopropanol aufgeschlämmt und auf die Säule (Glasfritte; 100 mm Länge und 55 mm Durchmesser) gegeben. Danach wird das Isopropanol durch Zugabe des vierfachen Volumens destillierten

Wassers entfernt. Die Säule mittels wird 0.5 M Kaliumphosphat-Puffer konditioniert und das Rohprodukt aufgetragen. Eventuell vorhandenes Chlorophyll wird durch Waschen mit 0.2 M Kaliumphosphat-Puffer eluiert und das Phycocyanobilin anschließend mit einem Lösungsmittelgemisch aus 0.2 M Kaliumphosphat-Puffer und Acetonitril (7:3). Das Lösungsmittel wird daraufhin durch Gefriertrocknung über Nacht entfernt.

Der Rückstand wird in 200 ml destilliertem Wasser gelöst, durch Zugabe einer Spatelspitzen Kaliumdihydrogenphosphat neutralisiert und mit Dichlormethan extrahiert, bis die wässrige Phase nahezu farblos ist. Das Lösungsmittel wird anschließend unter Vakuum entfernt.

Ausbeute = 261.5 mg (0.446 mmol)

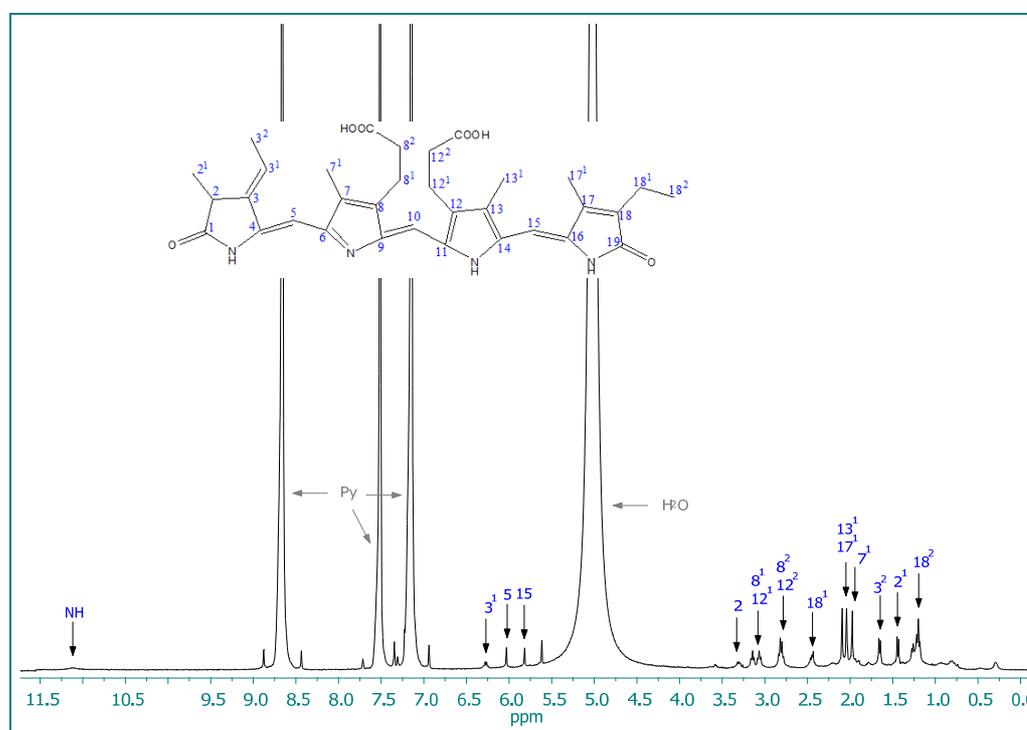


Abb. 120: ^1H -NMR-Spektrum von Phycocyanobilin (**3**) in Pyridin- d_5 (400 MHz)

^1H -NMR-Spektrum (Pyridin- d_5 ; 400 MHz)

δ (ppm) = 1.27 (t, 3H, $^3J = 7.42$ Hz, C18²); 1.51 (d, 3H, $^3J = 7.51$ Hz, C2¹); 1.73 (d, 3H, $^3J = 7.12$ Hz, C3²); 2.05 (s, 3H, C7¹); 2.12 (s, 3H, C17¹); 2.17 (s, 3H, C13¹); 2.53 (m, 2H, C18¹), 2.88 (m, 4H, C8² und C12²); 3.14 und 3.22 (2 x t, 4H, $^3J = 7.25$ Hz, $^3J = 6.70$ Hz, C8¹ und C12¹); 3.39 (q, 1H, $^3J = 6.39$ Hz, C2); 5.89 (s, 1H, C5); 6.11 (s, 1H, C15); 6.35 (q, 1H, $^3J = 6.82$ Hz, C3¹); 7.30 (s, 1H, C10)

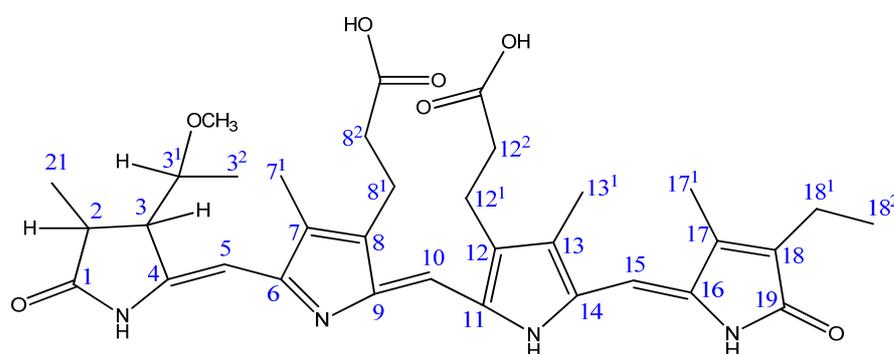
^{13}C -NMR-Spektrum (Pyridin- d_5 ; 100 MHz)

δ (ppm) = 9.29 ($\text{C}17^1$); 9.62 ($\text{C}13^1$); 9.73 ($\text{C}7^1$); 13.33 ($\text{C}18^2$); 14.77 ($\text{C}2^1$); 15.93 ($\text{C}3^2$); 17.54 ($\text{C}18^1$); 20.43 und 20.65 ($\text{C}8^1$ und 12^1); 36.30 und 36.45 ($\text{C}8^2$ und 12^2); 38.33 ($\text{C}2$); 87.61 ($\text{C}5$); 96.07 ($\text{C}15$); 112.55 ($\text{C}10$); 122.64 ($\text{C}3^1$); 124.60, 131.68, 132.43, 132.94, 133.97, 135.08 und 135.91 ($\text{C}4$, 6, 7, 9, 11, 16, 17); 136.86 ($\text{C}18$); 139.17 ($\text{C}13$); 141.46 und 142.58 ($\text{C}8$ und 12); 145.98 ($\text{C}3$); 148.88 ($\text{C}14$); 174.87 ($\text{C}19$); 175.26 (2 x COOH); 177.92 ($\text{C}1$)

Massenspektrum (ESIpos., Methanol)

m/z = 609 (53, $[\text{M}+\text{Na}]^+$); 587 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$); 381 (82); 353 (54); 288 (15); 242 (25)

8.4.2 Abtrennung der Methanoladdukte von Phycocyanobilin (73,74)^[70]



(73,74)

$\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_6$

$M = 618.72 \text{ g/mol}$

Durchführung:

Das aus 300 g Algen (*Spirulina platensis*) isolierte Rohprodukt von Phycocyanobilin wird nach dem Lyophilisieren in wenig 0.2 M Kaliumphosphatpuffer (pH = 7) gelöst und auf eine Vorsäule aufgetragen (Fritte 5 x 10 cm, Säulenmaterial RP C-18) und mit 0.5 M Kaliumphosphatpuffer (pH = 7) gewaschen. Dann werden die beiden Methanoladdukte (73,74) und das Phycocyanobilin (3) mit einem Lösungsmittelgemisch aus 0.5 M Kaliumphosphatpuffer und Acetonitril (70:30) eluiert. Das

Lösungsmittel wird durch Gefriertrocknung entfernt. Der Rückstand wird in wenig 0.2 M Kaliumphosphatpuffer gelöst, auf eine Säule (2 x 35 cm, Säulenmaterial RP C-18) aufgetragen und mit einem Lösungsmittelgemisch aus 0.2 M Kaliumphosphatpuffer und Acetonitril (70:30) getrennt. Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt. Der größte Teil des Phycocyanobilins kann auf diese Weise rein gewonnen werden. Eine Isolierung der Methanoladdukte ist allerdings nicht möglich, es kann nur eine Anreicherung erzielt werden.

Die Fraktion der angereicherten Methanoladdukte wird in wenig 5 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 7) gelöst und mittels präparativer HPLC getrennt (Säule Chromasil RP C18, 30 cm, Durchfluss 2 ml/min, $\lambda = 370$ nm). Anschließend werden die geeigneten Fraktionen vereinigt und das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt.

Die Rückstände werden in wenig destilliertem Wasser gelöst, mit einer Spatelspitze Kaliumdihydrogenphosphat versetzt und mit Dichlormethan extrahiert, bis die wässrige Phase farblos ist. Dann wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Die Produkte werden als dunkelblauer Feststoff erhalten.

Ausbeute: Phycocyanobilin = 34.3 mg (0.058 mmol)

Methanoladdukt 1 = 9.6 mg (0.016 mmol)

Methanoladdukt 2 = 33.2 mg (0.054 mmol)

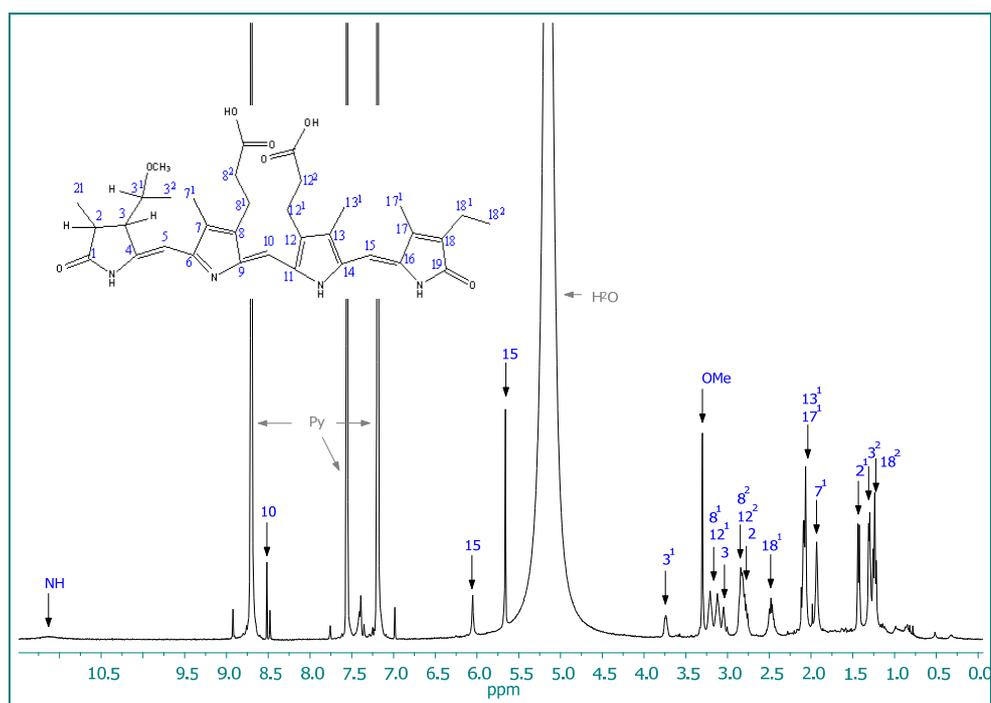


Abb. 121: ^1H -NMR-Spektrum vom PCB-Methanoladdukt 1 (73) in Pyridin- d_5 (400 MHz)

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Methanoladdukt 1 (73) (Pyridin- d_5 , 400 MHz)

δ (ppm) = 1.28 (t, 3H, $^3J = 7.54$ Hz, C18 2); 1.32 (d, 3H, $^3J = 6.22$ Hz, C3 2); 1.47 (d, 3H, $^3J = 7.35$ Hz, C2 1); 2.03 (s, 3H, C7 1); 2.11 (s, 3H, C17 1); 2.16 (s, 3H, C13 1); 2.41 (m, 2H, C18 1); 2.82 (m, 1H, C2); 2.85 (m, 4H, C8 2 und C12 2); 3.15 und 3.23 (m, 5H, C8 1 , C12 1 und C3); 3.37 (s, 3H, MeO); 3.89 (m, 1H, C3 1); 5.70 (d, 1H, $J = 1.343$ Hz, C5); 6.101 (s, 1H, C15); 7.331 (s, 1H, C10)

 $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum Methanoladdukt 1 (73) (Pyridin- d_5 , 100 MHz, BB, HMQC)

δ (ppm) = 9.64 (C17 1); 9.97 (C13 1); 10.07 (C7 1); 13.60 (C18 2); 15.97 (C3 2); 17.45 (C2 1); 17.92 (C18 1); 20.81, 20.99 (C12 1 und C8 1); 36.69 (C2); 36.81, 37.22 (C12 2 und C18 2); 51.66 (C3); 56.61 (MeO); 92.99 (C5); 96.50 (C15); 113.38 (C10); 175.65 (COOH); 179.66 (C1)

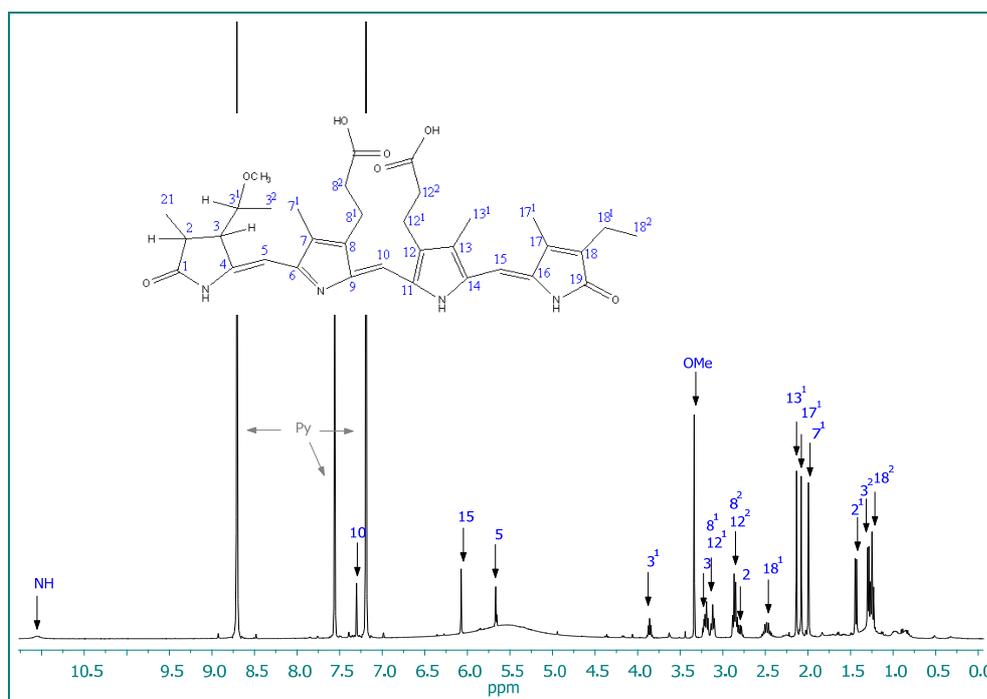


Abb. 122: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum vom PCB-Methanoladdukt 2 (74) in Pyridin- d_5 (400 MHz)

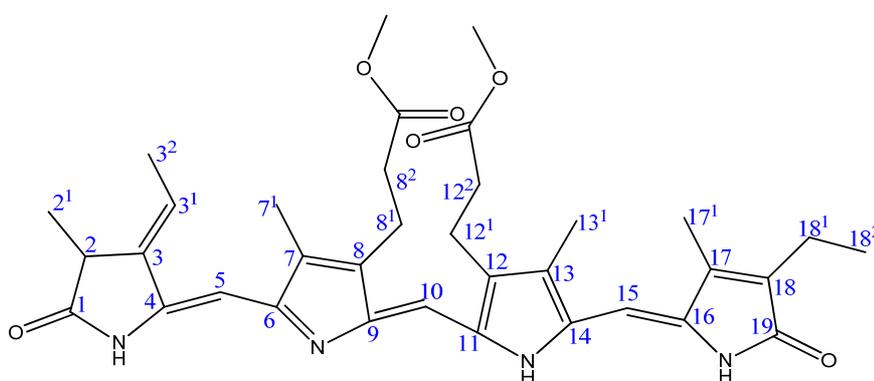
 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Methanoladdukt 2 (74) (Pyridin- d_5 , 400 MHz)

δ (ppm) = 1.27 (t, 3H, $^3J = 7.46$ Hz, C18 2); 1.33 (d, 3H, $^3J = 5.66$ Hz, C3 2); 1.46 (d, 3H, $^3J = 7.29$ Hz, C2 1); 1.96 (s, 3H, C7 1); 2.10 (s, 3H, C17 1); 2.12 (s, 3H, C13 1); 2.51 (m, 2H, C18 1); 2.75 – 2.92 (m, 4H, C8 2 und C12 2), 3.08 (m, 1H, C3); 3.15, 3.24 (m, 4H, C8 1 und C12 1); 3.33 (s, 3H, C3 1 -OMe); 3.77 (m, 1H, C3 1); 5.69 (s, 1H, C5); 6.01 (s, 1H, C15); 7.44 (s, 1H, C10); 11.16 (NH)

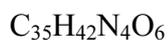
^{13}C -NMR-Spektrum von PCB-Methanoladdukt 2 (74) (Pyridin- d_5 ; 100 MHz)

δ (ppm) = 9.09 (C13¹); 9.11 (C17¹); 9.40 (C7¹); 12.67 (C18²); 15.20 (C3²); 16.51 (C2¹); 17.15 (C18¹); 19.88 und 20.65 (C8¹ und 12¹); 35.93 und 36.20 (C8² und 12²); 51.49 (C3); 55.81 (OMe); 92.40 (C5); 96.70 (C15); 112.68 (C10)

8.4.3 Veresterung von Phycocyanobilin (3)^[59,70]



(28)



M = 610.7 g/mol

Durchführung:

127.4 mg (0.208 mmol) Phycocyanobilin (3) werden unter Lichtausschluss und Inertgasatmosphäre in 175 ml Methanol gelöst und auf 4°C abgekühlt. Dann werden portionsweise 15 ml konzentrierte Schwefelsäure zugegeben und die Reaktionsmischung anschließen für 17 h gerührt. Danach wird die Lösung auf 600 ml Eiswasser gegeben und mit jeweils 200 ml Dichlormethan extrahiert, bis die wässrige Phase farblos (schwach lila) ist. Die vereinigten organischen Phasen werden erst mit einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung und dann mit einer gesättigten Natriumchloridlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird anschließend chromatographisch (Flashchromatographie) über Kieselgel (RediSep Normal Phase) mit Dichlormethan und Ethylacetat als Laufmittelgemisch (Gradient 30-60% Ethylacetat) gereinigt. Im Anschluss werden die geeigneten Fraktionen vereinigt und das

Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Produkt wird als dunkelblauer Feststoff erhalten.

Ausbeute = 21.33 mg (0.033 mmol; 16%)

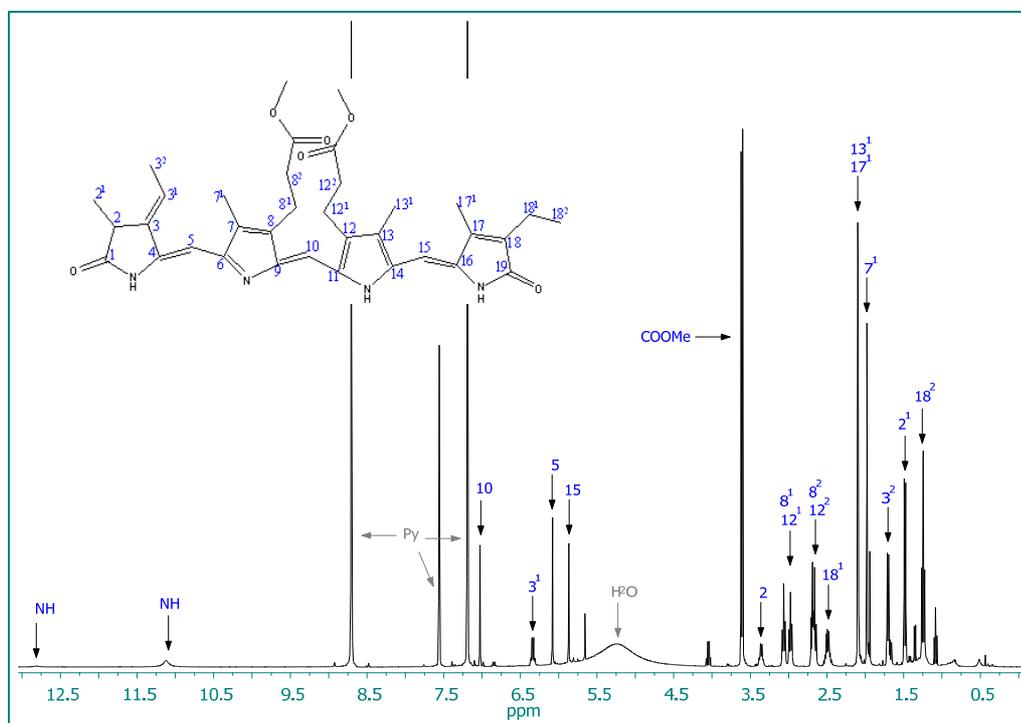


Abb. 123: ^1H -NMR-Spektrum von Phycocyanobilindimethylester (**28**) in Pyridin- d_5 (400 MHz)

^1H -NMR (Pyridin- d_5 , 400 MHz)

δ (ppm) = 1.28 (t, 3H, $^3\text{J} = 7.55$ Hz, C18²); 1.51 (d, 3H, $^3\text{J} = 7.53$ Hz, C2¹); 1.74 (d, 3H, $^3\text{J} = 7.24$ Hz, C3²); 2.01 (s, 3H, C7¹); 2.12 (s, 3H, C17¹); 2.13 (s, 3H, C13¹); 2.51 (m, 2H, C18¹); 2.71 (m, 4H, C8² und C12²); 3.01 und 3.09 (2 x t, 4H, $^3\text{J} = 7.54$ Hz und $^3\text{J} = 7.37$ Hz, C8¹ und C12¹); 3.39 (q, 1H, $^3\text{J} = 7.69$ Hz, C-); 3.63 und 3.65 (2 x s, 6H, 2 x COOMe); 5.99 (s, 1H, C5); 6.00 (s, 1H, C15); 6.37 (dq, 1H, $^3\text{J} = 7.27$ Hz, $^4\text{J} = 2.25$ Hz, C3¹); 7.06 (s, 1H, C10); 11.15 (s, breit, 1H, Pyrrol-NH); 12.84 (s, breit, 2H, Lactam-NH)

^{13}C -NMR-Spektrum (Pyridin- d_5 ; 100 MHz)

δ (ppm) = 8.94 (C7¹); 9.34 (C13¹); 9.37 (C17¹); 13.07 (C18²); 14.50 (C2¹); 15.64 (C3²); 17.28 (C18¹); 19.81, 19.93 (C12¹ und C8¹); 35.36, 35.47 (C12¹ und C8¹); 38.02 (C2); 51.20, 51.22 (COOMe); 87.29 (C5); 95.68 (C15); 111.71 (C10); 122.60 (C3¹); 131.39,

131.75, 132.41, 133.79; 136.59 (C18); 139.05 (C13); 141.26, 141.52 (C8 und C12); 145.91 (C3); 148.50 (C14); 164.83, 172.87, 172.93, 174.61, 177.72

Massenspektrum (EI)

m/z (%) = 614 (100), 599 (93, $[M - CH_3]^+$), 583 (7, $[M - OCH_3]^+$), 527 (15, $[M - CH_2CH_2COOCH_3]^+$), 493 (11), 467 (5), 346 (6), 315 (21), 300 (34), 270 (8), 226 (12)

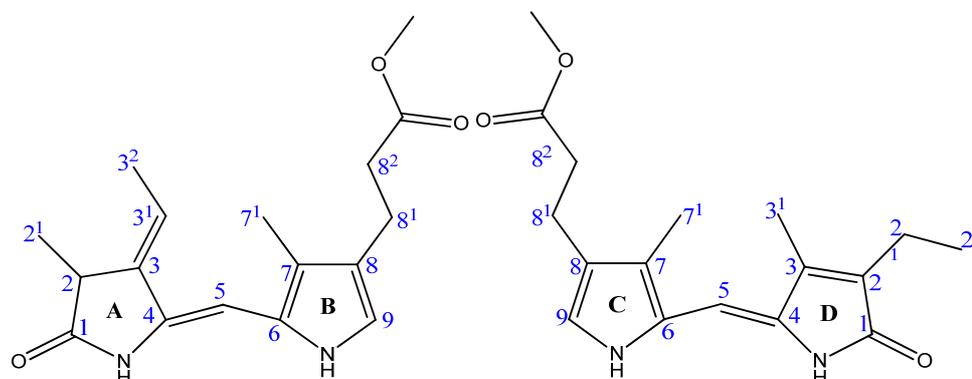
Massenfeinbestimmung

Experimentell bestimmte Masse (m/z) = 637.300205 g/mol

Theoretisch bestimmte Masse (m/z) = 637.299656 g/MOL

Differenz (ppm) = -0.86

8.4.4 Spaltung von Phycocyanobilindimethylester (**28**) mittels Thiobarbitursäure^[63]



Links: 3-Ethyliden-8-(2-methoxycarbonyl-ethyl)-2,7-dimethylpyrrolidin-1*H*-on (**76**)

Rechts: 2-Ethyl-8-(2-methoxycarbonyl-ethyl)-3,7-dimethylpyrrolidin-1*H*-on (**71**)



$$M = 302.37 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Licht- und Sauerstoffausschluss werden 58.5 mg (0.091 mmol) Phycocyanobilindimethylester (**28**) in 100 ml Ethylacetat gelöst und mit 21.03 mg

(0.146 mmol) 2-Thiobarbitursäure versetzt. Die Reaktionsmischung wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt und der Verlauf der Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, Ethylacetat/Dichlormethan (1:1)) verfolgt. Nach 1.5 h wird eine weitere Spatelspitze 2-Thiobarbitursäure zugefügt und weiter gerührt. Die Reaktion wird abgebrochen, wenn die blaue Eduktbande nicht mehr sichtbar ist. Das Lösungsmittel wird dazu unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in wenig Chloroform gelöst und die unerwünschten Säureaddukte mit n-Hexan ausgefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der Reaktionsschritt wird wiederholt, bis der Überstand nicht mehr gelb gefärbt ist und sich kein Niederschlag mehr mit n-Hexan bildet. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wird chromatographisch mittels präparativer Dünnschichtchromatographie über Alugram Alox N/UV₂₅₄ mit Dichlormethan und Ethylacetat (1:3) als Lösungsmittelgemisch aufgetrennt. Die Banden werden abgenommen und mit Pyridin gewaschen, bis der Überstand farblos ist. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt. Man erhält die Produkte in Form von gelben Feststoffen.

Ausbeute: 2-Ethylisomer = 8 mg (0.026 mmol)

3-Ethylidenisomer = 3.7 mg (0.012 mmol)

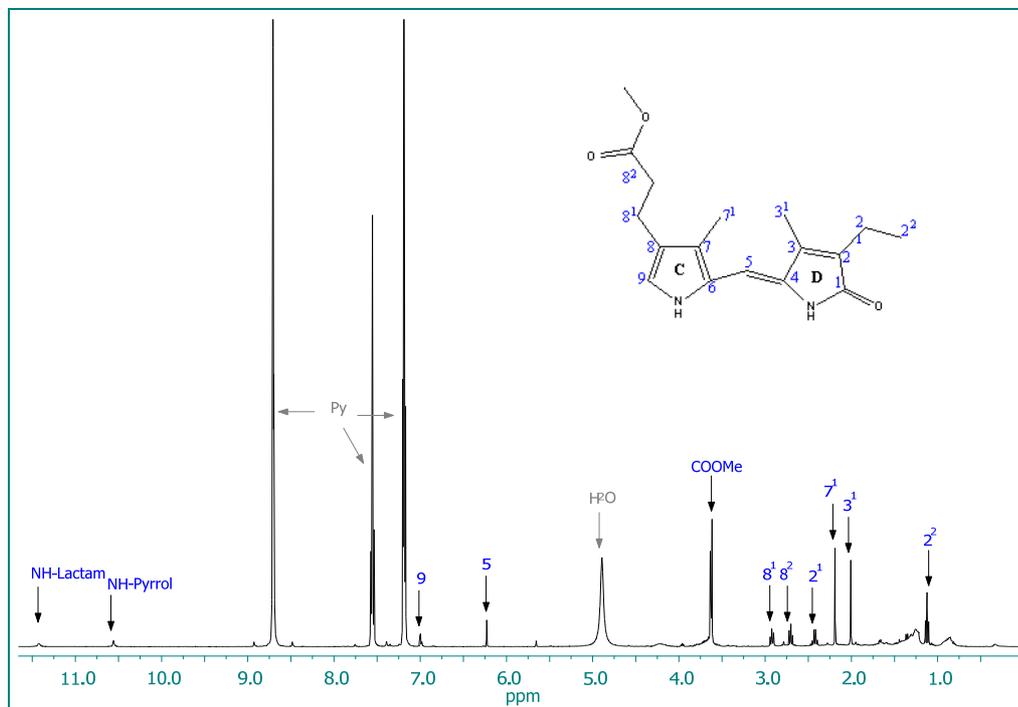


Abb. 124: ¹H-NMR-Spektrum von 2-Ethyl-8-(2-methoxycarbonyl)ethyl-3,7-dimethylpyrrolidin-1H-on (**71**) in Pyridin-d₅ (400 MHz)

¹H-NMR-Spektrum (Pyridin-d₅; 400 MHz)

δ (ppm) = 1.15 (t, 3H, ³J = 7.54 Hz, C2²); 2.04 (s, 3H, C3¹); 2.22 (s, 3H, C7¹); 2.46 (q, 2H, ³J = 7.53 Hz, C2¹); 2.74 (t, 2H, ³J = 7.60, C8²); 2.96 (t, 2H, ³J = 7.63 Hz, C8¹); 3.65 (s, 3H, COOMe); 6.26 (s, 1H, C5) 7.03 (d, 1H, ⁴J = 2.74, C9); 10.59 (s, breit, 1H, NH-Pyrrol); 11.45 (s, breit, 1H, NH-Lactam)

¹³C-NMR-Spektrum (BB, HMBC, HMQC, Pyridin-d₅, 100 MHz) δ (ppm) = 9.39 (C7¹); 9.49 (C3¹); 13.70 (C2²); 21.36 (C8¹); 35.24 (C8²); 52.41 (COOMe); 98.75 (C5); 119.42 (C9); 120.86 (C7); 123.28 (C8); 125.63 (C6); 132.30 (C2); 134.06 (C4); 141.40 (C3); 173.07 (C1); 173.31 (COOMe)

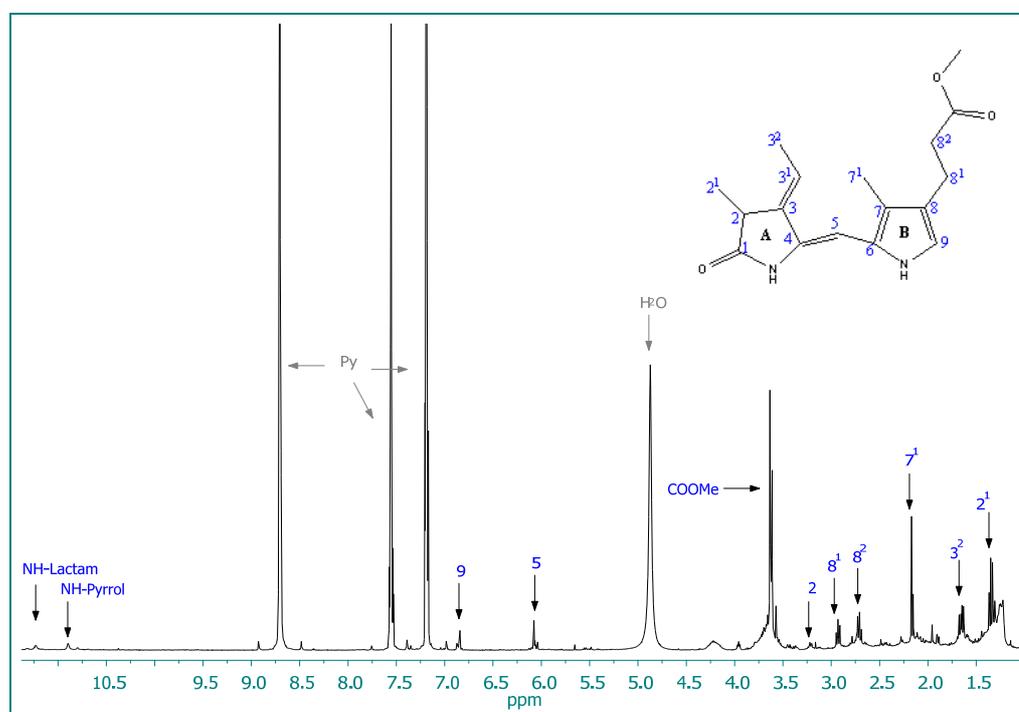


Abb. 125: ¹H-NMR-Spektrum von 3-Ethyliden-8-(2-methoxycarbonyl)ethyl-2,7-dimethylpyrrolidin-1*H*-on (76) in Pyridin-d₅ (400 Hz)

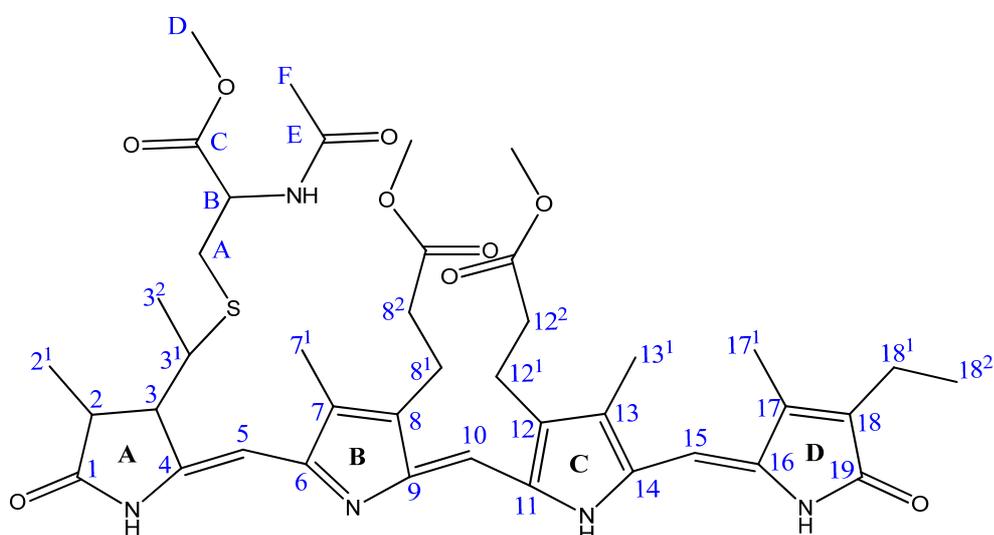
¹H-NMR-Spektrum (Pyridin-d₅; 400 MHz)

δ (ppm) = 1.36 (d, 3H, ³J = 7.54 Hz, C2¹); 1.63 (s, 3H, C3²); 2.22 (s, 3H, C7¹); 2.62 (m, 2H, C8²); 2.92 (t, 2H, ³J = 7.63 Hz, C8¹); 3.65 (s, 3H, COOMe); 6.06 (s, 1H, C5); 6.77 (d, 1H, ⁴J = 2.74, C9); 10.82 (s, breit, 1H, NH-Pyrrol); 11.45 (s, breit, 1H, NH-Lactam)

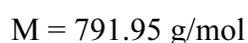
¹³C-NMR-Spektrum (Pyridin-d₅; 100 MHz)

δ (ppm) = 8.94 (C7¹); 14.50 (C2¹); 15.64 (C3²); 19.93 (C8¹); 35.47 (C8¹); 38.02 (C2);
 51.20 (COOMe); 87.29 (C5); 119.42 (9); 122.60 (C3¹); 141.52 (C8); 145.91 (C3);
 173.07 (C1); 173.31 (COOMe)

8.5 Darstellung eines 3¹-Cystein-Phycocyanobilindimethylesteradduktes (53)^[85]



(53)



Durchführung:

Unter Licht- und Sauerstoffausschluss werden 47.03 mg (0.077 mmol) Phycocyanobilindimethylester (**28**) in 10 ml Chloroform gelöst. Dann werden 28.6 mg (0.161 mmol) N-Acetyl-L-cysteinmethylester zugefügt und die Lösung 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in wenig Dichlormethan gelöst, auf eine Säule (Merck Kieselgel 60, Pipette) aufgetragen und mit einem Gemisch aus Dichlormethan/Aceton (100:6) eluiert. Die dunkelblaue Bande wird aufgefangen und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

Ausbeute = 24 mg (0.030 mmol; 40%)

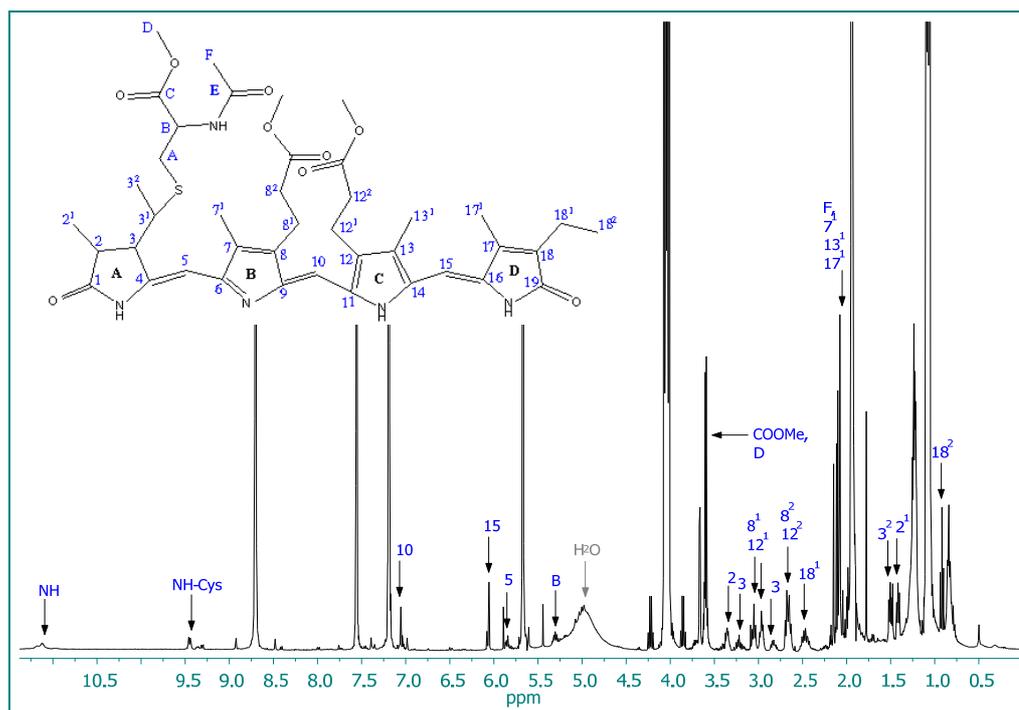


Abb. 126: ^1H -NMR-Spektrum von 3^1 -Cystein-Phycocyanobilindimethylesteradduktes (**53**) in Pyridin- d_5 (400 MHz)

^1H -NMR-Spektrum (Pyridin, 400 MHz)

δ (ppm) = 1.27 (m, 3H, C18²); 1.46 (m, 3H, C2¹); 1.55 (m, 1H, C3²); 2.12 (s, 9H, C7¹, C13¹ und C17¹); 2.50 (m, 2H, C18¹); 2.70 (m, 4H, C8² und C12²); 3.01 und 3.09 (t und m, 4H, C8¹ und C12¹); 3.65 (3 x s, 9H, 3 x COOMe); 5.23 (m, 2H, B); 5.66 und 5.73 (2 x d, 1H, C5); 6.10 und 6.12 (s und d, 1H, C15); 7.07 und 7.09 (s und d, 1H, C10); 11.11 (s, breit NH)

Massenspektrum (ESI, CH₂Cl₂)

m/z = 830 (M + K), 814 (M + Na); 792 (M + H); 615.4 (M – Cystein); 374.9

Massenfeinbestimmung

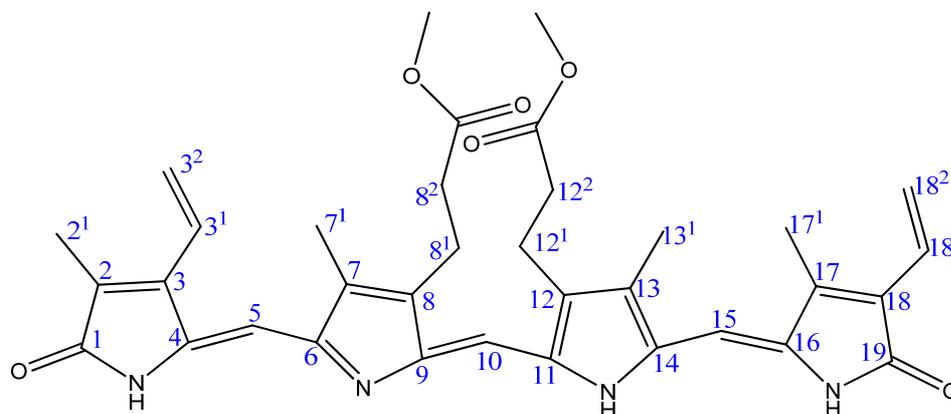
Experimentell bestimmte Masse (m/z) = 814.346315 g/mol

Theoretische berechnete Masse (m/z) = 814.345621 g/mol

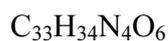
Differenz (ppm) = -0.85

8.6 Synthese von Biliverdin IX α (1)

8.6.1 Darstellung von Biliverdin IX α (1)^[59]



(1)



$$M = 582.65 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Lichtausschluss und Inertgasatmosphäre werden 163 mg (0.718 mmol) 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-p-benzochinon (DDQ) in 250 ml sauerstofffreiem Dimethylsulfoxid gelöst. Es wird sofort eine frisch zubereitete Lösung aus 200 mg (0.342 mmol) Bilirubin (66) und 250 ml sauerstofffreiem Dimethylsulfoxid zugefügt. Die Reaktionsmischung wird fünf Minuten gerührt. Dann werden 1500 ml eisgekühltes, sauerstofffreies Wasser zugegeben und weitere zehn Minuten gerührt. Anschließend wird der feine Niederschlag über einen Büchnertrichter mit Celliteschicht abfiltriert. Der Filterkuchen wird mit 25 ml 0.1 N Natronlauge aufgeschlämmt und erneut filtriert. Der Arbeitsschritt wird dreimal wiederholt. Die vereinigten Filtrate werden mit 0.5 ml Eisessig versetzt und der Niederschlag wird abzentrifugiert (Rotor JA, 10.000 rpm, 10°C, 25 min). Das Pellet wird erst mit wenig destilliertem Wasser gewaschen und dann mit destilliertem Wasser gelöst und lyophilisiert.

Ausbeute = 193.3 mg (0.332 mmol; 97%)

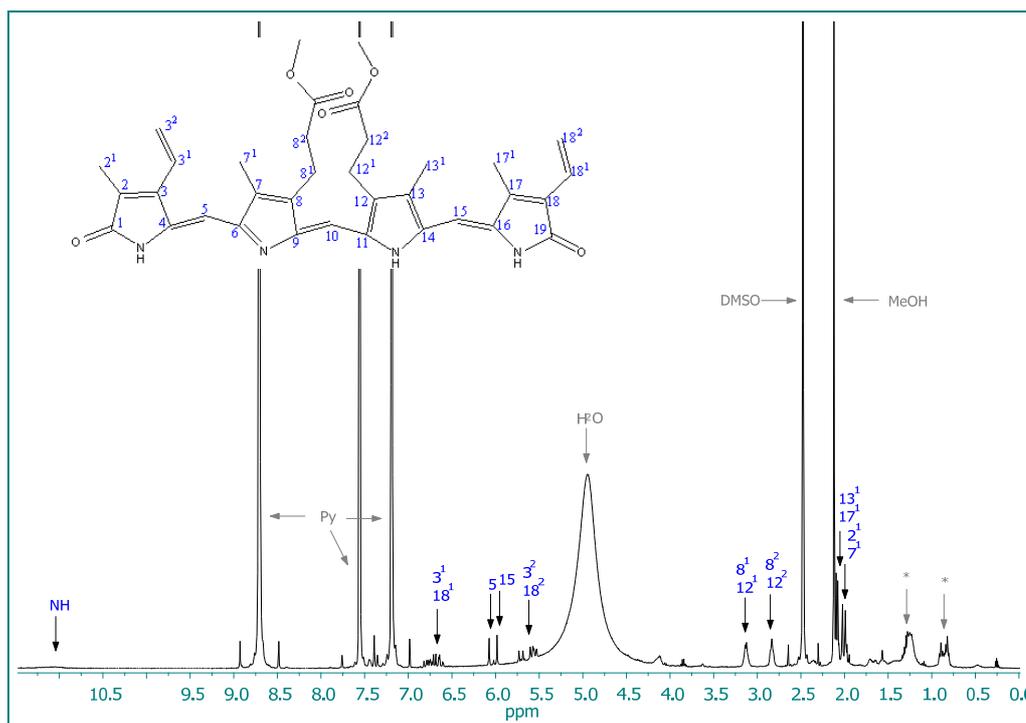


Abb. 127: ^1H -NMR-Spektrum von Biliverdin IX α (**1**) in Pyridin- d_5 (400 MHz)

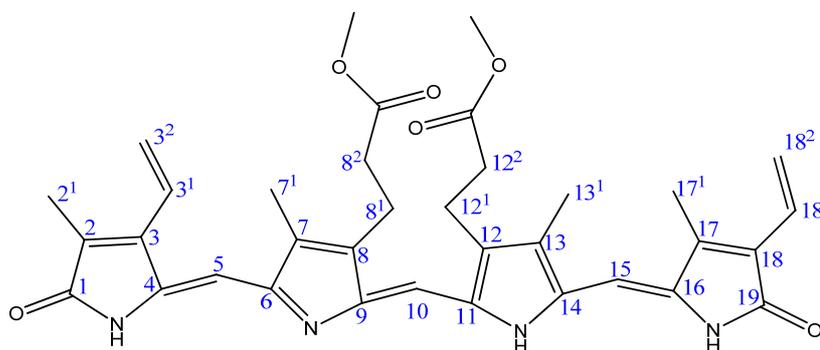
^1H -NMR-Spektrum (Pyridin, 400 MHz)

δ (ppm) = 2.02 (s, 3H, C 2^1); 2.05 (s, 3H, C 7^1); 2.11 (s, 3H, C 17^1); 2.13 (s, 3H, C 13^1); 2.86 (m, 4H, C 8^2 und 1C 2^2); 3.15 (m, 4H, C 8^1 und C 12^1); 5.59 (m, 2H, C 18^2); 5.74 (m, 2H, C 3^2); 6.01 (s, 1H, C5); 6.10 (s, 1H, C15); 6.68 (m, 1H, C 18^1); 6.81 (m, 1H, C 3^1); 11.08 (s, breit, 1H, NH)

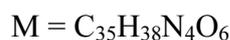
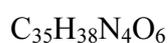
^{13}C -NMR-Spektrum (HMBC, HMQC, 100 MHz)

δ (ppm) = 8.84, 9.04, 9.14, 9.43 (C 2^1 , C 7^1 , C 13^1 und C 17^1); 20.29, 20.49 (C 8^1 und C 12^1); 36.33, 36.53 (C 8^2 und C 12^2); 97.14 (C15); 97.47 (C5); 116.09 (C10); 121.97 (C 18^2); 121.64 (C 3^2); 127.44, 127.806, 128.17, 129.65 (C2, C7, C13 und C17); 138.26, 139.12, 139.98, 149.08, 141.46, 151.24 (C3, C4, C6, C8, C9, C11, C12, C14, C16, C18); 172.93, 173.30 (C1 und 1C9); 175.64, 175.88 (2 x COOH)

8.6.2 Darstellung von Biliverdindimethylester (63)^[59,70]



(63)



Durchführung:

Unter Lichtausschluss und Inertgasatmosphäre werden 168.7 mg (0.290 mmol) Biliverdin IX α (**1**) in 400 ml destilliertem Methanol gelöst und auf -5°C abgekühlt (Kryostat, Ethanolbad). Anschließend werden 17.5 ml konzentrierte Schwefelsäure langsam zutropft und die Reaktionsmischung 17 h gerührt. Die Lösung wird auf 1000 ml Eiswasser gegossen und mit jeweils 200 ml Dichlormethan extrahiert, bis die wässrige Phase farblos ist. Die vereinigten organischen Phasen werden erst mit einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und anschließend mit einer gesättigten Natriumchloridlösung. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird chromatographisch durch MPLC über Silicagel mit Dichlormethan und Ethylacetat (Gradient 30-60% Ethylacetat) als Laufmittelgemisch getrennt. Die geeigneten Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Produkt wird als dunkelgrüner Feststoff erhalten.

Ausbeute = 119.0 mg (0.195 mmol; 67%)

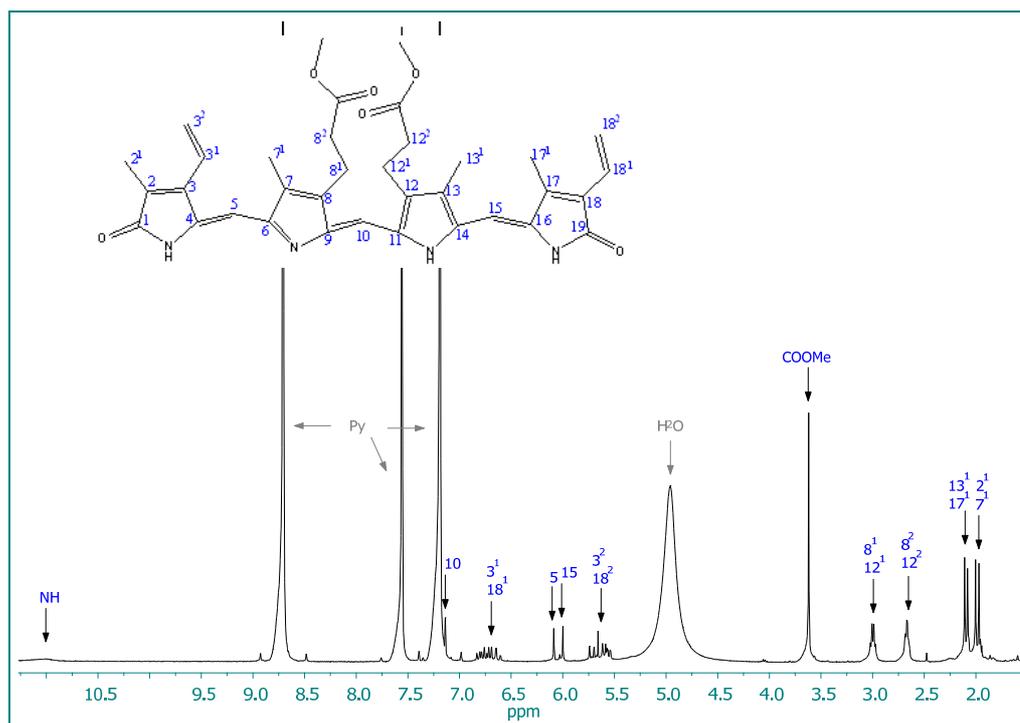


Abb. 128: ^1H -NMR-Spektrum von Biliverdindimethylester (**63**) in Pyridin- d_5 (400 MHz)

^1H -NMR-Spektrum (Pyridin, 400 MHz)

δ (ppm) = 2.00 (s, 3H, C $^{2^1}$); 2.04 (s, 3H, C $^{7^1}$); 2.11 (s, 3H, C $^{13^1}$); 2.14 (s, 3H, C $^{17^1}$); 2.70 (m, 4H, C $^{8^2}$ und C $^{12^2}$); 3.03 (m, 4H, C $^{8^1}$ und C $^{12^1}$); 3.65 (s, 6H, COOMe); 5.59 (dd, 2H, $^4J = 3.0055$ Hz, C $^{18^2}$); 5.68 (m, 2H, C $^{3^2}$); 6.03 (s, 1H, C 5); 6.12 (s, 1H, C 15); 6.69 (m, 1H, C $^{18^1}$); 6.81 (m, 1H, C $^{3^1}$); 11.00 (s, breit, NH)

^{13}C -NMR-Spektrum (Pyridin, BB)

δ (ppm) = 9.24, 9.27, 9.37, 9.96 (C $^{2^1}$, C $^{7^1}$, C $^{13^1}$ und C $^{17^1}$); 20.01 (C $^{8^1}$ und C $^{12^1}$); 35.52 (C $^{8^2}$ und C $^{12^2}$); 51.47 (2x COOMe); 97.33, 97.85 (C 5 und C 15); 115.23 (C 0); 119.69 (C $^{18^2}$); 122.17 (C $^{3^2}$); 127.23, 127.32 (C $^{3^1}$ und C $^{8^1}$); 127.72, 128.10, 128.60, 129.73 (C 2 , C 7 , C 13 und C 18); 137.51, 138.24, 140.23, 140.86, 141.43, 141.54, 141.97, 149.15, 151.53 (C 3 , C 4 , C 6 , C 8 , C 9 , C 11 , C 12 , C 14 , C 16 und C 17); 172.23 (C 19); 173.01 (C 1); 173.06 (2x CO $_2$ Me)

Massenspektrum (ESI, MeOH)

m/z (%) = 633.4 (100, $[\text{M} + \text{Na}]^+$), 611 (8, $[\text{M} + \text{H}]^+$), 528.2 (2), 413.1 (2), 337.0 (1)

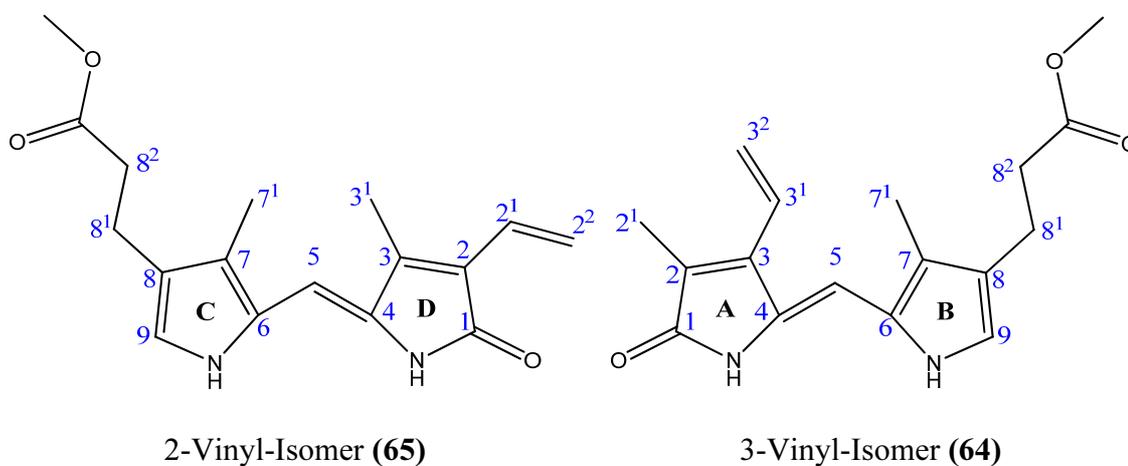
Massenfeinbestimmung (ESIpos., CH $_2$ Cl $_2$ + CH $_3$ OH)

Experimentell bestimmte Masse (m/z) = 633.268364 g/mol

Theoretisch berechnete Masse = 633.268356 g/mol

Differenz (ppm) = -0.01

8.6.3 Spaltung von Biliverdindimethylester (63) mittels Thiobarbitursäure^[70]



M = 300.35 g/mol

Durchführung:

Unter Licht- und Sauerstoffausschluss werden 110.0 mg (0.180 mmol) Biliverdindimethylester (63) in 190 ml destillierten Ethylacetat gelöst. Zu dieser Lösung werden 43.9 mg (0.343 mmol) 2-Thiobarbitursäure zugefügt und die Reaktionsmischung wird 4.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Verlauf der Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie (Silica, Ethylacetat/Dichlormethan (1:1)) kontrolliert. Nachdem die grüne Eduktbande nicht mehr zu sehen ist, wird die Reaktion durch die Entfernung des Lösungsmittels unter Vakuum beendet. Der Rückstand wird in wenig Dichlormethan gelöst und die Säureaddukte mit n-Hexan ausgefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Die beiden zurückbleibenden Isomere (gelb) werden mittels präparativer Dünnschichtchromatographie über Alugram Alox N/UV254 mit Ethylacetat und Dichlormethan (3:1) getrennt. Die Banden werden von der Dünnschichtchromatografiefolie abgenommen und mit Pyridin (über KOH

getrocknet) gewaschen, bis der Überstand farblos ist. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt.

Ausbeute = 2-Vinyl-Isomer = 9.2 mg (0.031 mmol)

3-Vinyl-Isomer = 6.25 mg (0.021 mmol)

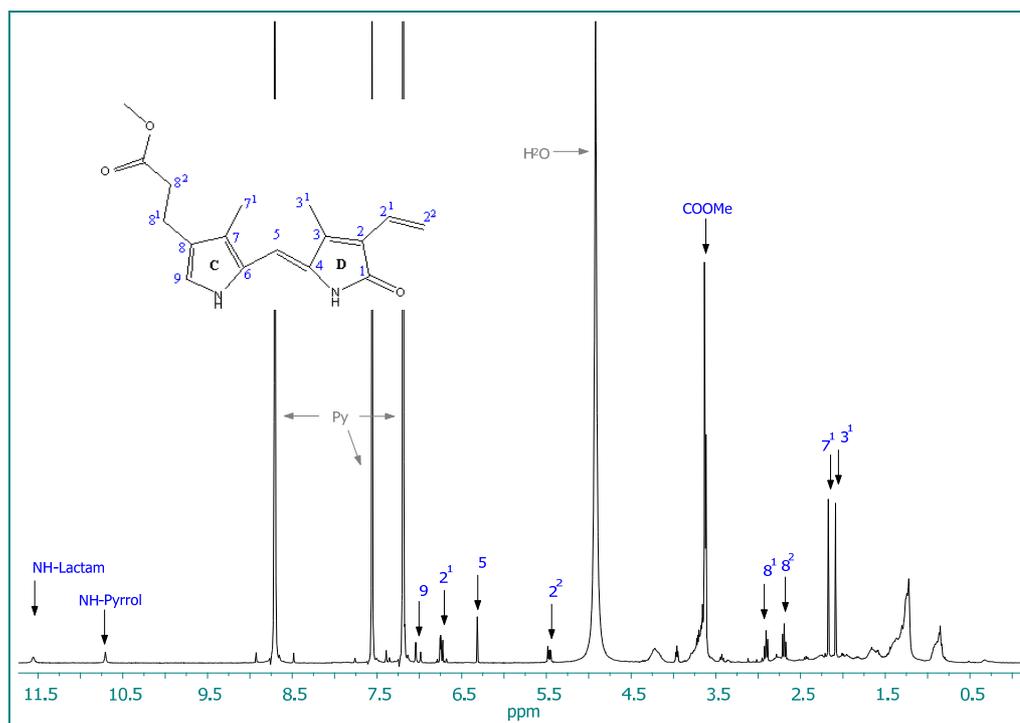


Abb. 129: ^1H -NMR-Spektren vom 2-Vinyl-Isomer (**65**) in Pyridin- d_5 (400MHz)

^1H -NMR-Spektrum 2-Vinyl-Isomers (**65**) (Pyridin, 400 MHz)

δ (ppm) = 2.12 (s, 3H, C 3^1); 2.20 (s, 3H, C 7^1); 2.72 (t, 2H, $^3J = 7.58$ Hz, C 8^2); 2.94 (t, 2H, $^3J = 7.58$ Hz, C 8^1); 3.65 (s, 3H, COOMe); 5.50 (dd, 2H, $^4J = 4.45$ Hz und $^3J = 9.77$ Hz, C 2^2); 6.35 (s, 1H, C 5); 6.77 (m, 1H, C 2^1); 7.07 (d, 1H, $^4J = 2.53$ Hz, C 9), 10.74 (s, breit, NH-Pyrrol); 11.57 (s, breit, NH-Lactam)¹³C-NMR-Spektrum (Pyridin, HMBC, HMQC)

δ (ppm) = 8.94 (C 3^1); 9.15 (C 7^1); 20.94 (C 8^1); 34.87 (C 8^2); 50.95 (COOMe); 100.40 (C 5); 118.17 (C 2^1); 118.45 (C 2^2); 120.59 (C 9); 122.69 (C 7); 123.45 (C 8); 124.72 (C 2); 125.74 (C 6); 132.59 (C 4); 142.24 (C 3); 172.45 (COOMe)

Massenspektrum (EI)

m/z (%) = 300 (100, $[M]^+$); 269 (9, $[M-OMe]^+$); 241 (12, $[M-COOMe]^+$); 227 (33); 211 (45); 183 (8)

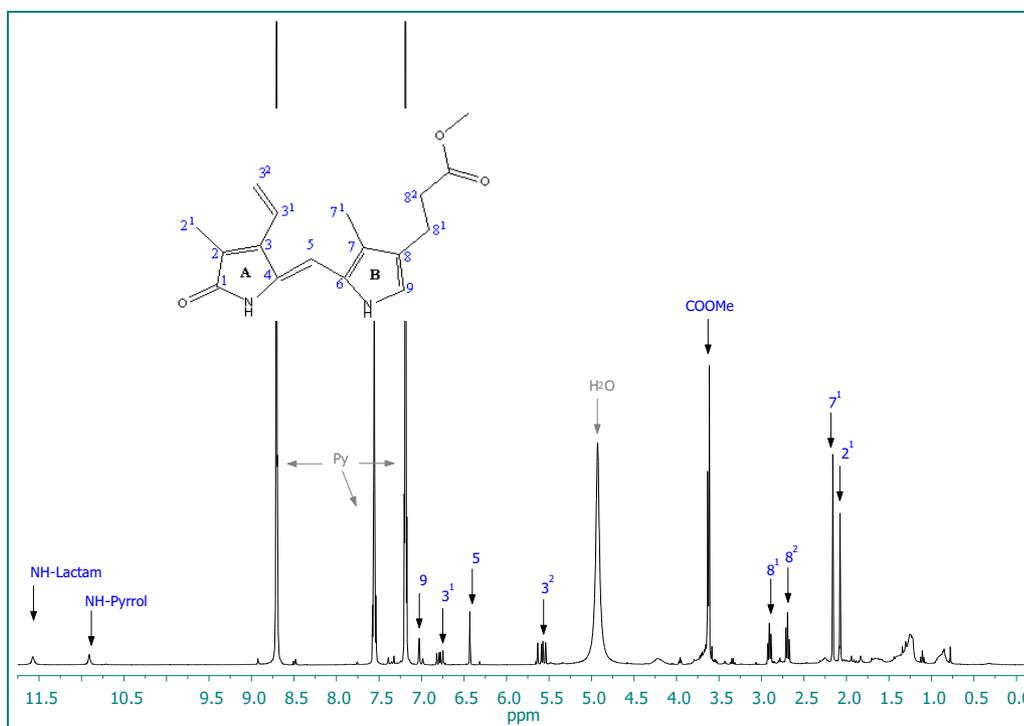


Abb. 130: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum vom 3-Vinyl-Isomer (**64**) in Pyridin- d_5 (400 MHz)

 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum 3-Vinyl-Isomer (64**) (Pyridin, 400 MHz)**

δ (ppm) = 2.11 (s, 3H, $C2^1$); 2.20 (s, 3H, $C7^1$); 2.73 (t, 2H, $^3J = 7.61$ Hz, $C8^2$); 2.95 (t, 2H, $^3J = 7.62$ Hz, $C8^1$); 3.65 (s, 3H, COOMe); 5.62 (dd und m, 2H, $C3^2$); 6.47 (s, 1H, C5); 6.81 (m, 1H, $C3^1$); 7.06 (d, 1H, $^4J = 2.76$ Hz, C9); 10.93 (s, breit, NH-Pyrrol); 11.58 (s, breit, NH-Lactam)

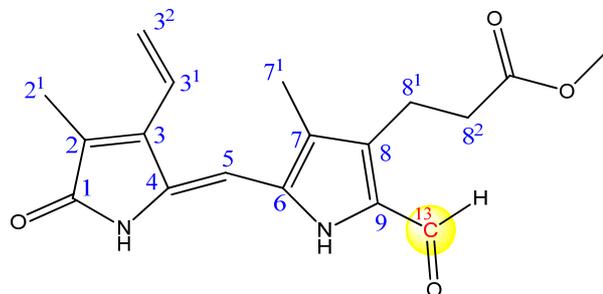
 $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (Dept, HMBC, HMQC)

δ (ppm) = 9.48 ($C7^1$); 9.86 ($C2^1$); 21.30 ($C8^1$); 35.20 ($C8^2$); 51.32 (COOCH₃); 100.21 (C5); 119.91 ($C3^1$); 121.39 ($C3^2$); 121.90 (C9); 125.74 (C2); 126.10 (c7); 127.65 (C6); 132.18 (C4); 141.21 (C3); 172.96 (C4); 173.56 (COOCH₃)

Massenspektrum (EI)

m/z (%) = 300 (100, $[M]^+$); 269 (12, $[M-OMe]^+$); 241 (18, $[M-COOMe]^+$); 227 (25); 211 (37); 183 (7)

8.6.4 Darstellung von (10-¹³C)-9-Formyl-3-vinyl-neoxantho- bilirubinsäuremethylester (67)^[70]



(67)



$$M = 329.36 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Licht- und Sauerstoffausschluss werden 22.92 mg (0.076 mmol) 3-Vinyl-neoxanthobilirubinsäuremethylester (**64**) in 0.5 ml *ortho*-Ameisensäuretrimethylester (Formyl-¹³C, 99%) gelöst und bei Raumtemperatur mit 1 ml Trifluoressigsäure versetzt. Die Reaktionsmischung wird 5 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Argonstrom vertrieben. Der Rückstand wird in 25 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 30 ml einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Anschließend wird mit 30 ml einer gesättigten Natriumchloridlösung gewaschen. Die wässrigen Phasen werden vereinigt und mit 40 ml Dichlormethan rückextrahiert. Dann werden die organischen Phasen vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird anschließend daran unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in wenig Dichlormethan gelöst und chromatographisch mittels präparativer Schichtchromatographie über Silica (Merck, PSC-Platten Kieselgel 60F₂₅₄) mit einem Lösungsmittelgemisch aus Dichlormethan und Ethylacetat (1:1) aufgetrennt. Die einzelnen Banden werden von der Platte genommen und mit Pyridin extrahiert. Daraufhin wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt.

Ausbeute = 16.33 mg (0.050 mmol; 65%)

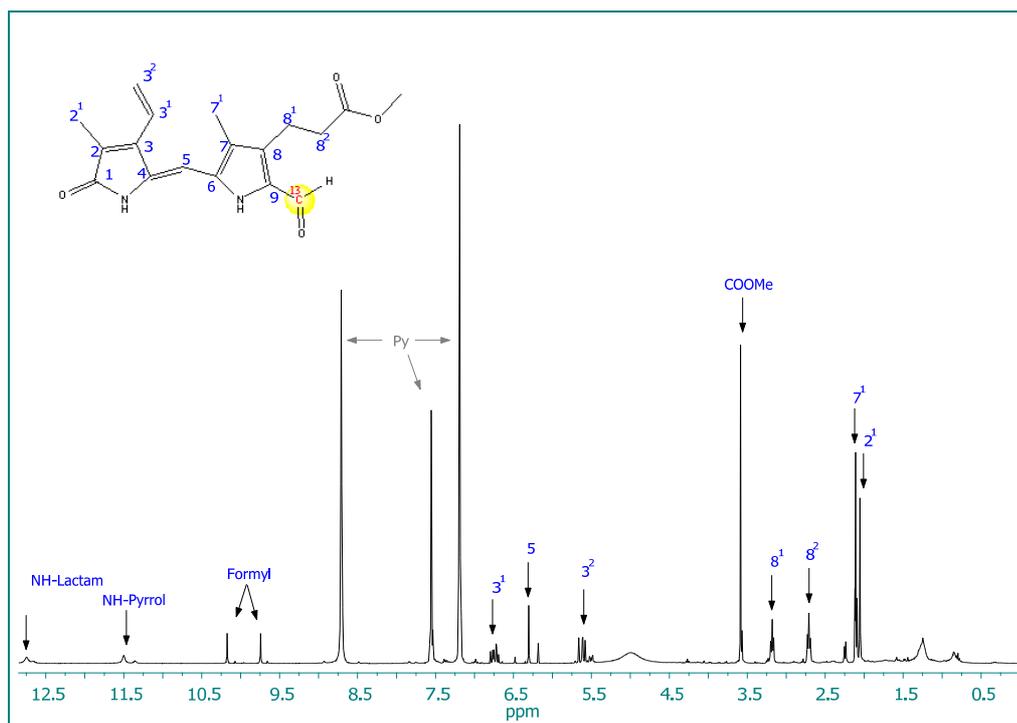


Abb. 131: ^1H -NMR-Spektrum von $(10\text{-}^{13}\text{C})$ -9-Formyl-3-vinyl-neoxanthobilirubinsäuremethylester (**67**) in CDCl_3 (400 MHz)

^1H -NMR (Pyridin- d_5 , 400 MHz)

δ (ppm) = 2.08 (s, 3H, $\text{C}2^1$); 2.14 (s, 3H, $\text{C}7^1$); 2.74 (t, 2H, $^3J = 7.52$ Hz, $\text{C}8^2$); 3.21 (t, 2H, $^3J = 7.53$ Hz, $\text{C}8^1$); 3.62 (s, 3H, COOMe); 5.65 (m, 2H, $\text{C}3^2$); 6.33 (s, 1H, $\text{C}5$); 6.77 (m, 1H, $\text{C}3^1$); 9.77 und 10.20 (2 x s, 1H, $^1J = 171.66$ Hz, Formyl); 11.53 (s, breit, NH-Pyrrol); 12.78 (s, breit, NH-Lactam)

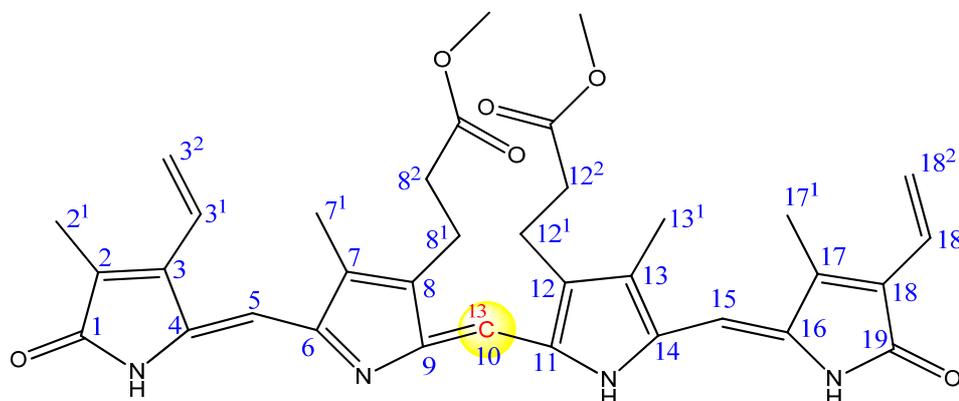
^{13}C -NMR-Spektrum (Pyridin- d_5 ; 100 MHz)

^{13}C -Formyl = 177.88 ppm

Massenspektrum (EI)

m/z (%) = 326 (60, M^{3+}); 267 (55); 149 (65); 57(65)

8.6.5 Darstellung von (10-¹³C)-Biliverdindimethylester (68) (Kupplung mittels Phosphorylchlorid)^[94]


(68)


$$M = 610.7 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Licht- und Sauerstoffausschluss werden 10 mg (0.030 mmol) (10-¹³C)-9-Formyl-3-vinyl-neoxanthobilirubinsäuremethylester (**67**) zusammen mit 7.68 mg (0.036 mmol) 2-Vinyl-isonoxanthobilirubinsäuremethylester (**65**) in 8 ml Ethylacetat gelöst und auf 0°C abgekühlt (Eis/ Kochsalz). Dann werden 0.08 ml frisch destilliertes Phosphorylchlorid zugefügt und die Reaktionsmischung wird weitere 15 min gerührt. Danach werden 6 ml Methanol zugefügt und die Reaktionsmischung wird nochmals 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt, der Rückstand in wenig Dichlormethan aufgenommen und mit einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Dann wird mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und die wässrigen Phasen werden vereinigt. Die wässrige Phase wird mit Dichlormethan rückextrahiert und die organischen Phasen werden vereinigt. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat entfernt man Lösungsmittel unter Vakuum. Dann wird das Rohprodukt in wenig Dichlormethan gelöst und reinigt es mittels Schichtchromatographie über PSC-Fertigplatten Aluminiumoxid 150 F254 (Typ T, Merck) mit einem Laufmittelgemische aus Ethylacetat und Dichlormethan (3:1). Die einzelnen Banden werden von der Platte entfernt und mit Pyridin extrahiert. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt.

Ausbeute = 6.72 mg (0.011 mmol; 32%)

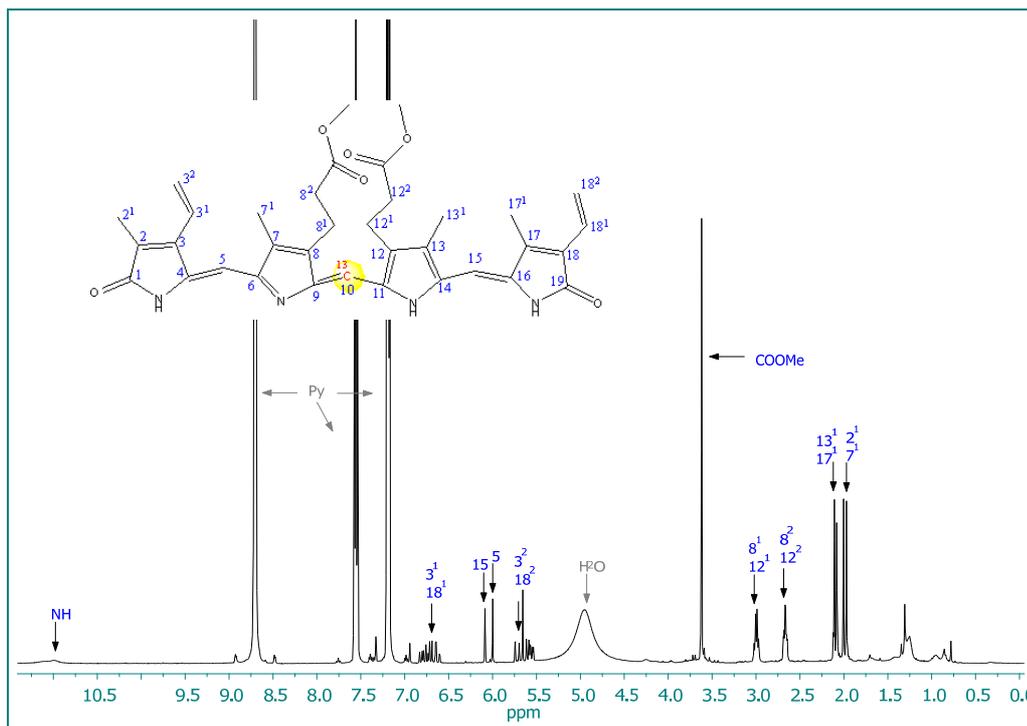


Abb. 132: ^1H -NMR-Spektren von ($10\text{-}^{13}\text{C}$)-Biliverdindimethylester (**68**) in CDCl_3 (400 MHz)

^1H -NMR-Spektrum (Pyridin- d_5 ; 400 MHz)

δ (ppm) = 2.00 (s, 3H, $\text{C}2^1$); 2.03 (s, 3H, $\text{C}7^1$); 2.11 (s, 3H, $\text{C}17^1$); 2.14 (s, 3H, $\text{C}13^1$); 2.70 (m, 4H, $\text{C}8^2$ und $\text{C}12^2$); 3.03 (dd, 4H, $^3J = 7.2$ Hz, $\text{C}8^1$ und $\text{C}12^1$); 3.65 (s, 6H, 2x COOMe); 5.67 (m, 2H, $\text{C}3^2$ und $\text{C}18^2$); 6.03 (s, 1H, $\text{C}5$); 6.12 (s, 1H, $\text{C}15$); 6.75 (m, 2H, $\text{C}3^1$ und $\text{C}18^1$); 11.02 (s, breit, NH-Lactam)

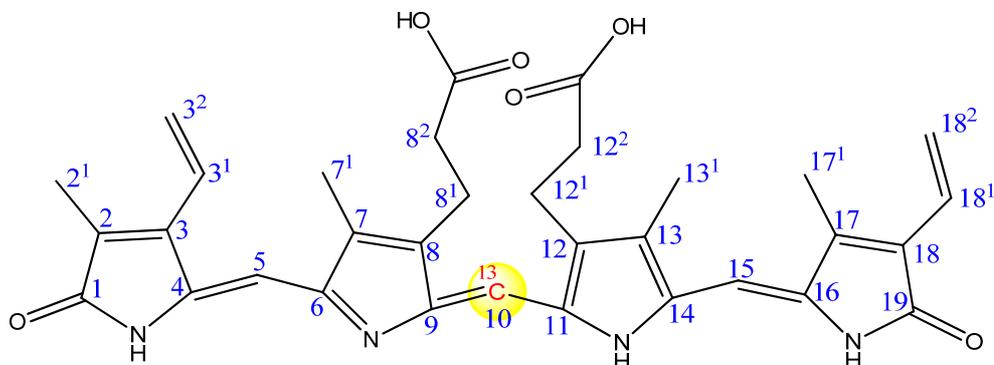
^{13}C -NMR-Spektrum (Pyridin- d_5 ; 100 MHz)

$10\text{-}^{13}\text{C} = 114.98$ ppm

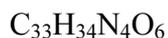
Massenspektrum

Auf die Aufnahme eines Massenspektrums wurde verzichtet, um weitere Ausbeuteverluste zu vermeiden.

8.6.6 Darstellung von (10-¹³C)-Biliverdin IX α (**62**) (Abspaltung der Schutzgruppen)^[64,70]



(**62**)



$$M = 582.65 \text{ g/mol}$$

Durchführung:

Unter Licht- und Sauerstoffausschluss werden 12 mg (0.020 mmol) (10-¹³C)-Biliverdindimethylester (**68**) in 40 ml einer Mischung aus destilliertem Wasser und Trifluoressigsäure (1:1) gelöst und mit 16.89 g in Wasser aufgeschlammtem, saurem Ionenaustauscher (Dowex) versetzt. Die Reaktionsmischung wird dann 43 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der Ionenaustauscher über eine Fritte abfiltriert und dreimal abwechselnd mit destilliertem Wasser und einer Mischung aus Chloroform und Methanol (49:1) gewaschen. Die beiden Phasen werden separiert und die wässrige Phase wird mit Dichlormethan extrahiert, bis sie farblos ist. Die organischen Phasen werden vereinigt und mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in wenig Dichlormethan gelöst und dünnschichtchromatographisch über TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) mit einem Lösungsmittelgemisch aus Dichlormethan, Methanol und n-Hexan (10:2:2) aufgetrennt. Die dunkelgrünen Banden werden von der Platte entfernt und mit Pyridin (getrocknet über KOH) extrahiert. Anschließend wird das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Produkt, (10-¹³C)-Biliverdin IX α (**62**), wird als dunkelgrüner Feststoff erhalten.

Ausbeute = 8.8 mg (0.015 mmol; 77%)

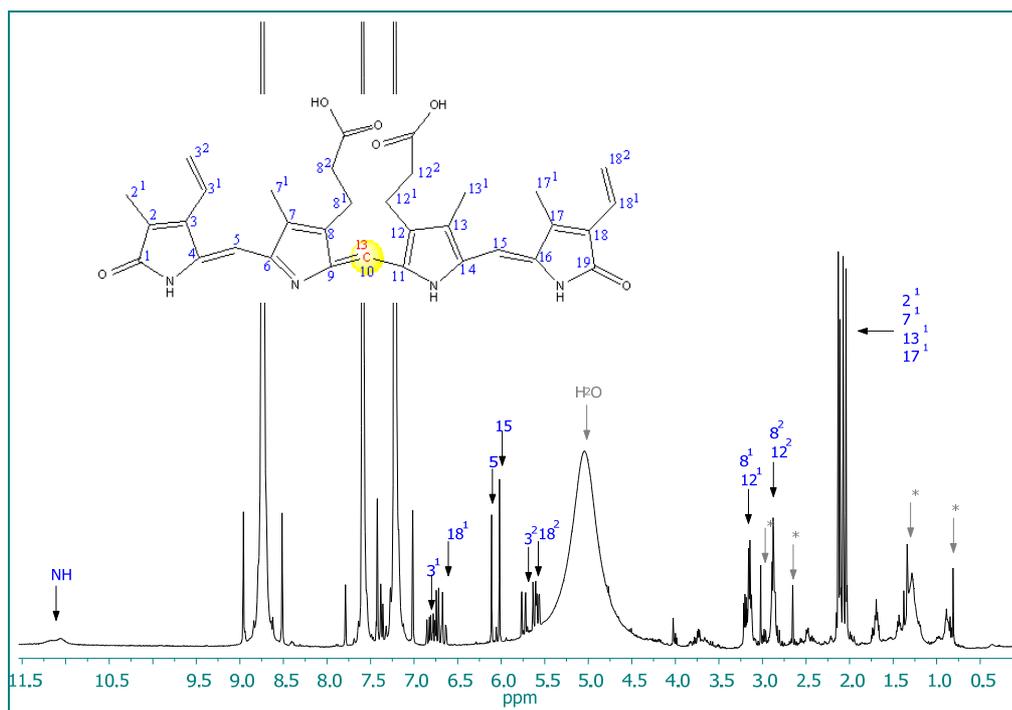


Abb. 133: ^1H -NMR-Spektrum von (^{13}C)-Biliverdin IX α (**62**) in Pyridin- d_5 (400 MHz)

^1H -NMR-Spektrum (Pyridin- d_5 ; 400 MHz)

δ (ppm) = 2.04, 2.07, 2.11, 2.13 (s, 12H, $\text{C}2^1$ und $\text{C}7^1$ und $\text{C}13^1$ und $\text{C}17^1$); 2.87 (m, 4H, $\text{C}8^2$ und $\text{C}12^2$); 3.15 (m, 4H, $\text{C}8^1$ und $\text{C}12^1$); 5.58 (m, 2H, $\text{C}18^2$); 5.69 (m, 2H, $\text{C}3^2$); 6.02 (s, 1H, $\text{C}15$); 6.11 (s, 1H, $\text{C}5$); 6.69 (m, 1H, $\text{C}18^1$); 6.81 (m, 1H, $\text{C}3^1$); 11.06 (s, breit, NH)

^{13}C -NMR-Spektrum (Pyridin- d_5 ; 400 MHz)

$10^{-13}\text{C} = 115.884$ ppm

Massenspektrum (ESIpos; MeOH)

Charakteristisches Ion (einfach geladen) = 583.3

9 Anhang

9.1 Substanzen

- (1) Biliverdin IX α (BV)
- (2) Phytochromobilin (P Φ B)
- (3) Phycocyanobilin (PCB)
- (4) (^{12}C - ^{13}C)-Phycocyanobilin
- (5) 3-Ethyl-4-methyl-2-thiosuccinimid (A-Ring)
- (6) Lawesson-Reagenz
- (7) (4-Methoxybenzyl)-3-methylpyrrol-2,5-dion
- (8) (*E*)-3-Ethyliden-1-(4-methoxybenzyl)-4-methylpyrrolidin-2,5-dion
- (9) (*E*)-3-Ethyliden-4-methylpyrrolidin-2,5-dion
- (10) 3-(2-Methoxycarbonylethyl)-4-methyl-1*H*-pyrrol (B/C-Vorstufe)
- (11) 4-Acetoxy-5-nitrohexansäuremethylester
- (12) 4-Nitrobutansäuremethylester
- (13) 4,4-Dimethoxybutansäuremethylester
- (14) 4-Oxobutansäuremethylester
- (15) N-Formylglycin-*tert*-butylester
- (16) Isocyanoessigsäure-*tert*-butylester
- (17) Benzyloxycarbonyl-(5-*tert*-butoxycarbonyl-4-(2-methoxycarbonlethyl)-3-methyl-pyrrol-2-yl)-(triphenylphosphonid)-methanid (B-Ring)
- (18) Glyoxylsäurebenzylester
- (19) D-(-)-Weinsäuredibenzylester
- (20) 3-(5-((Benzylcarbonyl)-hydroxymethyl)-2-(*tert*-butoxycarbonyl)-4-methylpyrrol-3-yl)-propionsäuremethylester
- (21) 3-(5-((Benzylcarbonyl)-chloromethyl)-2-(*tert*-butoxycarbonyl)-4-methyl-pyrrol-3-yl)-propionsäuremethylester
- (22) 5-Formyl-3-(2-methoxycarbonylethyl)-4-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure-*tert*-butylester (C-Ring)
- (23) 9-*tert*-Butoxycarbonyl-2,3-dihydro-2,7-dimethyl-3-ethyliden-8-(2-methoxycarbonyl)-ethyl-dipyrrin-1(10*H*)-on-5-carbonsäure (AB-Hälfte)
- (24) 2-Ethyl-9-carbonsäure-*tert*-butylester-8-(2-methoxycarbonylethyl)-3,7-dimethylpyrrolin-1*H*-on (CD-Hälfte)
- (25) 3-(5-Benzyloxycarbonyl-9-*tert*-butoxycarbonyl-2,3-dihydro-2,7-dimethyl-3-ethyliden-dipyrrin-1(10*H*)-on-8-yl)-propionsäure-methylester
- (26) 3-Ethyl-4-methyl-2-(5*H*)-pyrrol (D-Ring)

- (27) 2-Ethyl-9-formyl-8-(2-methoxycarbonylethyl)-3,7-dimethylpyrrolin-1*H*-on
- (28) Phycocyanobilindimethylester (PCBMe₂)
- (29) (¹⁵N)-3-(2-Methoxycarbonylethyl)-4-methyl-1*H*-pyrrol (¹⁵N-B/C-Vorstufe)
- (30) ¹⁵N-Formylglycinmethylester
- (31) ¹⁵N-Isocyanoessigsäuremethylester
- (32) ¹⁵N-Glycinmethylesterhydrochlorid
- (33) (5-¹³C)-5-Formyl-3-(2-methoxycarbonylethyl)-4-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure-*tert*-butylester ((5-¹³C)-C-Ring)
- (34) (1-¹³C)-4,4-Dimethoxybutansäuremethylester
- (35) 3-(2-Methoxycarbonyl-(¹³C)-ethyl)-4-methyl-1*H*-pyrrol ((3³-¹³C)-B/C-Vorstufe)
- (36) (12³-C)-Phycocyanobilin
- (37) (1-¹³C)-4,4-Dimethoxybutyronitril
- (38) (1-¹³C)-4,4-Dimethoxybutansäure
- (39) (1-¹³C)-4-Oxobutansäuremethylester
- (40) (1-¹³C)-4-Acetoxy-5-nitrohexansäuremethylester
- (41) (5-¹³C)-Phycocyanobilin
- (42) (5-¹³C)-9-*tert*-Butoxycarbonyl-2,3-dihydro-2,7-dimethyl-3-ethyliden-8-(2-methoxycarbonyl)-ethyl-dipyrrin-1(10*H*)-on-5-carbonsäure ((5-¹³C)-AB-Hälfte)
- (43) (5-¹³C)-5-Formyl-3-(2-methoxycarbonylethyl)-4-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure-*tert*-butylester ((5-¹³C)-C-Ring)
- (44) (2-¹³C)Bromessigsäurebenzylester
- (45) (2-¹³C)-Iodessigsäurebenzylester
- (46) *tert*-Butyl-5-(benzyloxycarbonylmethyl)-3-(2-methoxycarbonylethyl)-4-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure
- (47) *tert*-Butyl-5-(benzyloxycarbonylchloromethyl)-3-(2-(methoxycarbonyl)ethyl)-4-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure
- (48) (15-¹³C)-Phycocyanobilin
- (49) (5-¹³C)-5-Formyl-3-(2-methoxycarbonylethyl)-4-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure-*tert*-butylester ((5-¹³C)-C-Ring)
- (50) (5¹³C)-2-Ethyl-9-carbonsäure-*tert*-butylester-8-(2-methoxycarbonylethyl)-3,7-dimethylpyrrolin-1*H*-on ((5-¹³C)-CD-Hälfte)
- (51) (15-¹³C)-Phycocyanobilindimethylester
- (52) (5-C¹³)-2-Ethyl-9-formyl-8-(2-methoxycarbonylethyl)-3,7-dimethylpyrromethen-1*H*-pyrrol
- (53) 3¹-Cystein-Phycocyanobilinaddukt
- (54) (20,21,22,23-¹⁵N)-Phycocyanobilin
- (55) (22,23-¹⁵N)-Phycocyanobilin
- (56) (20,21,22,23-¹⁵N)-Phycocyanobilindimethylester

- (57) (10,11-¹⁵N)-2,3-dihydro-2,7-dimethyl-3-ethyliden-8-(2-methoxycarbonyl)-ethyl-dipyrrin-1(10*H*)-on-5-carbonsäure
- (58) (10,11-¹⁵N)-2-Ethyl-8-(2-methoxycarbonylethyl)-3,7-dimethylpyrrolin-1*H*-on ((10,11-¹⁵N)-CD-Hälfte)
- (59) (22,23-¹⁵N)-Phycocyanobilidimethylester
- (60) (10,11-¹⁵N)-9-Formyl-2-Ethyl-8-(2-methoxycarbonylethyl)-3,7-dimethylpyrrolin-1*H*-on
- (61) 2-Ethyl-8-(2-methoxycarbonylethyl)-3,7-dimethylpyrrolin-1*H*-on
- (62) (10-¹³C)-Biliverdin IX α
- (63) Biliverdindimethylester
- (64) 3-Vinyl-neoxanthobilirubinsäuremethylester
- (65) 2-Vinyl-isoneoxanthobilirubinsäuremethylester
- (66) Bilirubin
- (67) 9-Formyl-(¹³C)-3-vinyl-neoxanthobilirubinsäuremethylester
- (68) (10-¹³C)-Biliverdindimethylester
- (69) 4-Hydroxy-5-nitrohexansäuremethylester
- (70) (¹⁵N)-5-Formyl-3-(2-methoxycarbonylethyl)-4-methyl-1*H*-pyrrol-2-carbonsäure-*tert*-butylester ((¹⁵N)-C-Ring)
- (71) 2-Ethyl-8-(2-methoxycarbonylethyl)-3,7-dimethylpyrrolin-1*H*-on (CD-Hälfte)
- (72) (11-¹⁵N)-2-Ethyl-9-methoxycarbonyl-8-(2-methoxycarbonylethyl)-3,7-dimethylpyrrolin-1*H*-on (CD-Hälfte)
- (73) PCB-Methanoladdukt 1
- (74) PCB-Methanoladdukt 2
- (75) (5-¹³C)-Phycocyanobilindimethylester
- (76) 3-Ethyliden-8-(2-methoxycarbonylethyl)-2,7-dimethylpyrrolidin-1*H*-on (AB-Hälfte)

9.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Einteilung der elektromagnetischen Strahlung 7
- Abb. 2: Prothetische Gruppen von Photorezeptoren: links Xanthopsin (Chromophor der Xanthopsine), oben rechts 11-cis-Retinal (Chromophor der Wirbeltier-Rhodopsine, durch Absorption eines Photons wird eine cis-trans-Isomerisierung zu all-trans-Retinal induziert; in Bacteriorhodopsin führt die Absorption von Licht hingegen zu einer all-trans-13-cis-Isomerisierung) und unten rechts der Flavingrundkörper (Chromophor der LOVs, Cryptochrome und BLUFs). Die roten Pfeile geben die isomerisierende Doppelbindung an. Die Funktion von Riboflavin basiert nicht auf der Isomerisierung einer Doppelbindung, sondern abhängig vom jeweiligen Photorezeptor entweder auf der Bildung einer kovalenten Bindung (LOV), der Änderung des Wasserstoffbrückennetzwerks (BLUF) oder Elektronentransfer (Cryptochrome)^[1]. 8
- Abb. 3: Strukturdomänen der Phytochrome mit der Bindungsstelle des Chromophors (C). Gelblich: photosensorischer Kern; bläulich: Signaltransduktionsregion 12
- Abb. 4: Chromophore in Phytochromen und die Art ihrer Anbindung an das Protein. Oben: links Phytochromobilin (PΦB) (2) in ZZZssa-Konformation: die Nummerierung des Kohlenstoffgerüsts ist in blauen Ziffern angegeben; die Position der Z/E-Isomerisierung ist durch einen orangefarbenen Pfeil markiert, rechts Phytochromobilin in ZZEssa-Konformation (blau unterlegt: Bindungen, die die syn- und anti-Konformation bestimmen, orange eingefärbte Bindungen bestimmen die Z- und E-Konformation). Unten: links Phycocyanobilin (PCB) (3) in ZZZssa-Konformation, rechts Biliverdin IX α (BV) (1) in der ZZZssa-Konformation; die strukturellen Unterschiede an den Ringen A und D sind rot markiert. R₁ und R₂= Proteinrest 13
- Abb. 5: Kristallstruktur von Cph1Δ2 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (PDB: 2VEA). Der N-Terminus ist grün markiert, die PAS-Domäne dunkelblau, die GAF-Domäne orange, der Chromophor ist hellblau dargestellt und der C-Terminus blau. Die Vergrößerung zeigt den Chromophor eingelagert in die PAS-Domäne und nahezu abgeschlossen von dem umgebenden Medium durch die „zungenartig“ zurückgefaltete PHY-Domäne in seiner gestreckten P_r-Form (ZZZssa-

- Konformation). Das protonierte PCB (3) ist über das Kohlenstoffatom 3¹ durch eine Thioetherbindung an das Cystein(C) 259 gebunden. Die Propionsäurereste sind durch Wechselwirkungen mit den Argininresten(R) 254 und 222, Serin(S) 272 und Phenylalanin(F) 216 stabilisiert. Die Stickstoffatome der Ringe A, B und C sind über Wasserstoffbrückenbindungen mit einem Wassermolekül verbunden und darüber ebenfalls mit den Resten Histidin(H) 260 und Asparaginsäure(D) 207. Zu erkennen ist zudem die, im Vergleich zu den drei anderen Ringen, weniger starke Fixierung des D-Rings, wodurch die lichtinduzierte Z/E-Isomerisierung der C15-16-Doppelbindung und die damit verbundene Drehung des D-Rings möglich wird. 15
- Abb. 6: Absorptionsspektrum von Phytochrom (PΦB) (2) im P_r- (blau) und P_{fr}-Zustand (rot) und das daraus resultierende Differenzspektrum (schwarz) 16
- Abb. 7: Photozyklus von Phytochrom (Cph1) 18
- Abb. 8: Synthese von Porphobilinogen in Chloroplasten ausgehend von Glutamat 19
- Abb. 9: Reaktionswege für Häm, Biliverdin IXα (1) und Chlorophylle ausgehend von Porphobilinogen 20
- Abb. 10: Biosynthese von PΦB (2), PEB und PCB (3) ausgehend von Biliverdin IXα (1) 21
- Abb. 11: Schematische Wiedergabe der klassischen Tetrapyrrolsynthese nach Gossauer 23
- Abb. 12: Synthese der AB-Hälfte nach Jacobi mittels Sonogashira-Kupplung 24
- Abb. 13: Syntheseweg von tetrasubstituierten Furanen nach Inomata 25
- Abb. 14: Sterisch fixierte 18-Ethyl-Biliverdine, oben: links 15Zs-18-Ethylbiliverdin, rechts 15Za-18-Ethylbiliverdin, unten: links 15Es-18-Ethylbiliverdin, rechts 15Ea-18-Ethylbiliverdin nach Inomata^[61] 26
- Abb. 15: Absorptionsspektren der überbrückten Biliverdine (15Za; 15Zs; 15Ea; 15Es) und des natürlichen Biliverdin IXα (BV) (1) eingebaut in Agp1. Die schwarzen Kurven geben das Absorptionsspektrum nach der Assemblierung unter Lichtausschluss wieder; die gestrichelten Kurven zeigen die Absorptionsspektren nach der Belichtung mit rotem Licht (BV (1), 15Za und 15Ea) bzw. weißem Licht (15Zs und 15Es). (a) zeigt das Spektrum des Agp1 mit chemisch unverändertem

	Biliverdin IX α (1) wieder. Das Protein unterläuft durch die Belichtung mit rotem Licht den zu erwartenden Photocyclus, was sich in der Änderung der beiden Kurven vor und nach Belichtung äußert. Die jeweiligen Absorptionsmaxima P _r und P _{fr} lassen sich eindeutig voneinander unterscheiden. Die vier sterisch fixierten Chromophore zeigen hingegen keinen Photocyclus. Der Vergleich der Absorptionsmaxima zeigt die größere Ähnlichkeit des 15Za-Spektrum (b) mit dem P _r -Spektrum von a, wohingegen das syn-Isomer (c) nur wenig Ähnlichkeit mit dem P _r -Spektrum zeigt. Das gleiche gilt für den Vergleich von d und e mit dem P _{fr} -Spektrum von a. ^[61]	27
Abb. 16:	Phycocyanobilin mit photolabiler Schutzgruppe (in blau) an C17 nach Inomata <i>et al.</i> ^[61]	28
Abb. 17:	1D ¹⁵ N CP/MAS NMR-Spektren von vollständig ¹³ C- und ¹⁵ N-markiertem PCB (3) (A) und (21- ¹⁵ N)-PCB (3) (B) eingebaut in Cph1Δ2 im P _{fr} -Zustand. Das Signal der im Proteinrest enthaltenen ¹⁵ N-Stickstoffatome ist mit einem Stern markiert. ^[67]	30
Abb. 18:	Darstellung der möglichen Wechselwirkungen zwischen Chromophor (PCB (3)) und Proteinhülle (grün) während des P _{fr} -P _r -Übergangs: P _{fr} (A), Lumi-F (B), Meta-F (C) und P _r (D). Das konjugierte π -Elektronen-System ist rot bzw. orange hervorgehoben. ^[67]	30
Abb. 19:	Synthesekonzept für den A-Ring (3-Ethyliden-4-methyl-2-thiosuccinimid (5)) nach Inomata <i>et al.</i> ^[64,68] .	32
Abb. 20:	Synthesekonzept der B/C-Vorstufe (10) ^[64,69-71]	33
Abb. 21:	Synthesekonzept für den Glyoxylsäurebenzylester (18) als B-Ring-Schutzgruppe ^[64,72]	34
Abb. 22:	Funktionalisierung der B/C-Vorstufe (10) zum B-Ring (17)	34
Abb. 23:	Darstellung des C-Rings (22) ^[73]	35
Abb. 24:	Kupplung von A- (5) und B-Ring (17) ^[64,72]	35
Abb. 25:	Abspaltung des Benzylesters ^[64,70,74]	36
Abb. 26:	Kupplung des C-Rings (22) mit dem D-Ring (26) ^[64,75,76]	36
Abb. 27:	Formylierung der CD-Hälfte (24) ^[76,77]	37
Abb. 28:	Kupplung zum Phycocyanobilindimethylester (28) ^[70,76,77]	37
Abb. 29:	Freisetzung der Disäure (3) ^[64,70]	38
Abb. 30:	Synthesekonzept für ¹⁵ N-markierte B/C-Vorstufe (29) ^[64,70,76,78,79]	39

Abb. 31:	Synthesekonzept für (3 ³ -C ¹³)-B/C-Vorstufe ^[3,80,81]	40
Abb. 32:	Syntheseübersicht (5- ¹³ C)-markierte AB-Hälfte (42) ^[82]	41
Abb. 33:	Kurzübersicht (15- ¹³ C)-PCB Synthese (48) ^[82]	42
Abb. 34:	Synthese des PCBMe ₂ -Cysteinaddukts (53) ^[59,85]	43
Abb. 35:	Spaltung von ¹⁵ N-Phycocyanobilin (54) ^[59,63]	44
Abb. 36:	Synthese von (22,23- ¹⁵ N)-Phycocyanobilin (55)	45
Abb. 37:	Darstellung von Biliverdin IX α (1) durch Oxidation von Bilirubin (66)	46
Abb. 38:	Veresterung von Biliverdin IX α (1) ^[63]	47
Abb. 39:	Spaltung von Biliverdindimethylester (63) nach Manitto und Monti ^[63]	47
Abb. 40:	Formylierung der AB-Hälfte (BV) (64) mit ¹³ C-Baustein ^[70,82]	48
Abb. 41:	Kupplung zum (10- ¹³ C)-Biliverdindimethylester (68)	48
Abb. 42:	Acidolyse von (10- ¹³ C)-Biliverdindimethylester (68) ^[70]	49
Abb. 43:	Additions-Eliminierungs-Mechanismus der 1-(4-Methoxybenzyl)-3-methylpyrrol-2,5-dions (7)	50
Abb. 44:	Mechanismus der Michael-Addition von Nitroethan an 1-(4-Methoxybenzyl)-3-methylpyrrol-2,5-dion (7)	51
Abb. 45:	Mechanismus der Darstellung von (E)-3-Ethyliden-4-methylpyrrolidin-2,5-dions (9)	51
Abb. 46:	Mechanismus der Thionylierung der Carbonylfunktion des A-Rings (5) ^[3]	52
Abb. 47:	Mechanismus der Synthese von 4-Nitrobutansäuremethylester (12)	53
Abb. 48:	Mechanismus der abgewandelten Nef-Reaktion zur Synthese des 4,4-Dimethoxybutansäure-methylesters (13) ^[91]	54
Abb. 49:	Mechanismus der Acetalhydrolyse	55
Abb. 50:	Mechanismus der Henry-Reaktion zur Synthese des 4-Acetoxy-5-nitrohexansäuremethylesters (11)	56
Abb. 51:	Mechanismus der Synthese von (1- ¹³ C)-4,4-Dimethoxybutyronitril (37)	56
Abb. 52:	Mechanismus der Isonitrilsynthese ausgehend von Formamid und Chloressigsäure- <i>tert</i> -butylester	58
Abb. 53:	Mechanismus der Veresterung von ¹⁵ N-Glycin	59

Abb. 54:	Formylierung von ^{15}N -Glycinmethylester (32)	60
Abb. 55:	Mechanismus des Ringschlusses zur B/C-Vorstufe (10) ^[69]	60
Abb. 56:	Mechanismus der Darstellung von Glyoxylsäurebenzylester (18) durch Veresterung von D-(-)-Weinsäure und anschließende Spaltung des Esters mittels Periodsäure	62
Abb. 57:	Mechanismus der elektrophilen aromatischen Substitution ($\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$) von Glyoxylsäurebenzylester (18) mit der B/C-Vorstufe (10)	63
Abb. 58:	Mechanismus der Ylid-Darstellung	64
Abb. 59:	Mechanismus der Vilsmeier-Reaktion zur Formylierung des C-Rings (22)	65
Abb. 60:	Mechanismus der Thio-Wittig-Reaktion zur Kupplung der AB-Hälfte (25)	66
Abb. 61:	Entfernung der Benzylesterschutzgruppe durch Hydrierung an Palladium auf Aktivkohle	67
Abb. 62:	Mechanismus der Knoevenagel-Reaktion zur Kupplung des C- (22) und D-Rings (26)	68
Abb. 63:	Mechanismus der Abspaltung der <i>tert</i> -Butoxycarbonylschutzgruppe mit anschließender Formylierung der CD-Hälfte (24) mittels Trimethylorthoformiat	69
Abb. 64:	Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von 2-Ethyl-9-formyl-8-(2-methoxycarbonylethyl)-3,7-dimethylpyrromethen-1 <i>H</i> -pyrrol (50) in CDCl_3 (400 MHz). Abgebildet ist das durch die ^{13}C -Markierung aufgespaltene Signal der Methinbrücke. Das Signal des ^{12}C , das sich zwischen den beiden Signalen befinden müsste (ca. 5.93 ppm) fehlt, ein Indiz für die Vollständigkeit der ^{13}C -Markierung	69
Abb. 65:	Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von (11- ^{15}N)-2-Ethyl-9-methoxycarbonyl-8-(2-methoxycarbonylethyl)-3,7-dimethylpyrromethen-1 <i>H</i> -pyrrol (72) in CD_3OD unter Zusatz von 0.1 M Natronlauge. Abgebildet ist die Aufspaltung des pyrrolischen ^{15}NH -Signals um $^1J_{\text{NH}} = 97$ Hz.	70
Abb. 66:	(^1H)- ^{13}C -HSQC-Spektrum des (11- ^{15}N)-2-Ethyl-9-methoxycarbonyl-8-(2-methoxy-carbo-nylethyl)-3,7-dimethylpyrromethen-1 <i>H</i> -pyrrol (72) in CD_3OD . Dieses Spektrum wird zur Zuordnung der ^{13}C -Signale verwendet.	71

- Abb. 67: Das (^1H -) ^{15}N -HMBC-Spektrum von ($^{11}\text{-}^{15}\text{N}$)-2-Ethyl-9-methoxycarbonyl-8-(2-methoxy-carbonylethyl)-3,7-dimethylpyrromethen-1*H*-pyrrol (72) in CD_3OD weist die Nachbarschaft der Methingruppe bei 6.1 ppm und der pyrrolischen NH-Gruppe bei 10.6 – 10.8 ppm nach. 71
- Abb. 68: Abspaltung der *tert*-Butoxycarbonyl- und Carboxy-Schutzgruppe der AB-Hälfte (23) vor der Kupplung mit der CD-Hälfte (27) 72
- Abb. 69: Mechanismus der säurekatalysierten Kondensation der AB- (23) mit der CD-Hälfte (27) 73
- Abb. 70: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von ($^{5}\text{-}^{13}\text{C}$)-Phycocyanobilin (41) in Pyridin- d_5 (400 MHz) 74
- Abb. 71: simulierte Raman- und experimentelle Resonanz-Raman-Spektren von phyA-PCB mit Isotopen-markiertem Chromophor (rot) und mit unmarkiertem phyA-PCB (schwarz) in der P_r -Form. Oben: mittels QMMM-Hybridansatz berechnetes Minimumspektrum. Mitte: experimentell ermitteltes Spektrum. Unten: mittels QMMM-Hybridansatz berechnetes Spektrum der Summe über 25 „snapshots“. Die drei NH-Signale zwischen 1450 und 1575 cm^{-1} zeigen nur eine geringe Empfindlichkeit gegenüber der ^{13}C -Isotopenmarkierung. Das Signal bei 1637 cm^{-1} spaltet durch die Einführung des schwereren Isotops auf. Das intensive Signal wird im simulierten Spektrum um 20 cm^{-1} verschoben und im experimentellen Spektrum um 19 cm^{-1} . Das Simulierte Minimumspektrum gibt die Ergebnisse des experimentellen Spektrums gut wieder. Die Aufspaltung der beiden schwächeren Signale bei 1630 cm^{-1} wird im Experiment nicht beobachtet, dort findet sich in dem Bereich ein bereites Signal, dass durch die Überlagerung der beiden Signale resultiert. Der Vergleich zwischen Simulierten Minimumspektrum mit der Summierung von 25 „snapshots“ zeigt den Verlust der Aussagekraft des summierten Spektrums durch die Verbreiterung der Signale. (noch nicht publiziert) 76
- Abb. 72: Ausschnitte aus den FSRS-Spektren von Cph1 mit PCB als Chromophor. Links: Zuordnung des HOOP-Signals anhand der Verschiebung der Bande durch die ($^{15}\text{-}^{13}\text{C}$) Isotopenmarkierung des Chromophors (rot) im Vergleich zum unmarkierten Chromophor (schwarz). Rechts: Vergleich des HOOP-Signals im Spektrum des P_r -Zustands mit dem des P_{fr} -Zustands. Die deutliche Veränderung des

- Signals nach der Photoreaktion identifiziert den D-Ring als Ort der lichtinduzierten Z/E-Isomerisierung. 77
- Abb. 73: Elutionsdiagramm der analytischen HPLC der beiden angereicherten Methanoladdukte (73, 74) (in blau) und einem Rest von PCB (3) (Chromasil RP-C18; 0.2 M Kaliumphosphatpuffer und Acetonitril (70:30)) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 370$ nm. Die Addukte werden nach der Elutionsreihenfolge nummeriert. 78
- Abb. 74: Links: Elutionsdiagramm der analytischen HPLC vom Methanoladdukt 2 (74) nach der präparativen HPLC (Beobachtungswellenlänge $\lambda = 370$ nm). Rechts: Elutionsdiagramm der analytischen HPLC vom Methanoladdukt 1 (73) nach der präparativen HPLC ($\lambda = 370$ nm) 78
- Abb. 75: Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des PCB-Methanoladdukts 1 (73) in Pyridin- d_5 (400 MHz). Die für die Methanoladduktidentifizierung relevanten Positionen des A-Rings sind blau hervorgehoben. 79
- Abb. 76: Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des PCB-Methanoladdukts 2 (74) in Pyridin- d_5 (400 MHz). Die für die Methanoladduktidentifizierung relevanten Positionen des A-Rings sind blau hervorgehoben. 80
- Abb. 77: UV/Vis-Spektren der beiden PCB-Methanoladdukte. Links: Methanoladdukt 1 (73); Rechts: Methanoladdukt 2 (74) 80
- Abb. 78: Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von u- ^{15}N -markiertem PCB (54) in Pyridin- d_5 (400 MHz). Aufspaltung des NH-Signals 82
- Abb. 79: Mechanismus der Spaltung von Biliverdindimethylester (63) mittels Thiobarbitursäure^[63,70] 84
- Abb. 80: HMQC-Spektrum des 3-Vinyl-Isomers (64) (Pyridin- d_5) 85
- Abb. 81: HMBC-Spektrum des 2-Vinyl-Isomers (65) in Pyridin- d_5 85
- Abb. 82: Formylierung der AB-Hälfte (64) von Biliverdin (1) mittels Triethylorthoformiat^[70] 86
- Abb. 83: Kupplung der formylierten AB- (67) mit der CD-Hälfte (65) zum (^{13}C)Biliverdindimethylester (68) 88
- Abb. 84: links: Gelelektrophorese der Holoprotein unter Verwendung eines SDS-PAGE-Gels und MOOS SDS-Puffer. Am linken Rand des Gels

- sind die Signale des Proteinmachers SDS-PAGE Low Range (Bio-Rad) zusehen. 88
- Abb. 85: UV/Vis-Spektrum von $(10\text{-}^{13}\text{C})\text{-BV}$ in Cph1. Blau: Absorptionsspektrum von BV; Grün: Spektrum des P_{fr} -Zustands des Phytochroms, Violett: Spektrum des P_{r} -Zustands des Phytochroms, Rot: Differenzspektrum 89
- Abb. 86: A: Resonanz-Raman-Spektren von Agp1M15 und CphB im P_{r} und P_{fr} -Zustand (H_2O -Spektren, in schwarz und $\text{BV-}^{13}\text{C}_{10}$ in blau). B: Resonanz-Raman-Spektren von Agp1M15 und CphB im P_{r} und P_{fr} -Zustand (H_2O -Spektren, n.a. in schwarz und $\text{BV-}^{13}\text{C}_{10}$ in blau). In dieser Darstellung wird nur der ausgewählte Markerbanden-Bereich gezeigt. (noch nicht publiziert) 89
- Abb. 87: A: Resonanz-Raman-Spektren Agp1M15 beider thermostabilen Zustände (P_{r} und P_{fr}) in H_2O und D_2O . B: Resonanz-Raman-Spektren CphB beider thermostabilen Zustände (P_{r} und P_{fr}) in H_2O und D_2O . 90
- Abb. 88: ^1H -NMR-Spektrum von (4-Methoxybenzyl)-3-methylpyrrol-2,5-dion (7) in CDCl_3 (400 MHz) 102
- Abb. 89: ^1H -NMR-Spektrum von (E)-3-Ethyliden-1-(4-methoxybenzyl)-4-methylpyrrolidin-2,5-dion (8) in CDCl_3 (400 MHz) 104
- Abb. 90: ^1H -NMR-Spektrum von (E)-3-Ethyliden-4-methylpyrrolidin-2,5-dion (9) in CDCl_3 (400 MHz) 106
- Abb. 91: ^1H -NMR-Spektrum von (E)-3-Ethyliden-4-methyl-2-thiosuccinimid (5) in CDCl_3 (400 MHz) 108
- Abb. 92: ^1H -NMR-Spektrum von N-Formylglycin-*tert*-butylester (15) in CDCl_3 (500 MHz) 110
- Abb. 93: ^1H -NMR-Spektrum von Isocyanoessigsäure-*tert*-butylester (16) in CDCl_3 (400 MHz) 112
- Abb. 94: ^1H -NMR-Spektrum von ^{15}N -Glycinmethylesterhydrochlorid (32) in DMSO (400 MHz) 113
- Abb. 95: ^1H -NMR-Spektrum von ^{15}N -Formylglycinmethylester (30) in CDCl_3 (400 MHz) 115
- Abb. 96: ^1H -NMR-Spektrum von ^{15}N -Isocyanoessigsäuremethylester (31) in CDCl_3 (400 MHz) 117
- Abb. 97: ^1H -NMR-Spektrum von 4-Nitrobutansäuremethylester (12) in CDCl_3 (500 MHz) 119

Abb. 98:	¹ H-NMR-Spektrum von 4,4-Dimethoxybutansäuremethylester (13) in CDCl ₃ (400 MHz)	121
Abb. 99:	¹ H-NMR-Spektrum von 4-Oxobutansäuremethylester (14) in CDCl ₃ (400 MHz)	123
Abb. 100:	¹ H-NMR-Spektrum von 4-Acetoxy-5-nitrohexansäuremethylester (11) in CDCl ₃ (400 MHz)	125
Abb. 101:	¹ H-NMR-Spektrum von 4,4-Dimethoxybutannitril-(1- ¹³ C) (37) in CDCl ₃ (400 MHz)	126
Abb. 102:	¹ H-NMR-Spektrum von (1- ¹³ C)-4,4-Dimethoxybutansäure in D ₂ O (400 MHz)	128
Abb. 103:	¹ H-NMR-Spektrum von 3-(2-Methoxycarbonylethyl)-4-methyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-carbonsäure- <i>tert</i> -butylester (10) CDCl ₃ (400 MHz)	130
Abb. 104:	¹ H-NMR-Spektrum von ¹⁵ N-3-(2-Methoxycarbonylethyl)-4-methyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-carbonsäure-methylester (29) in CDCl ₃ (400MHz)	132
Abb. 105:	¹ H-NMR-Spektrum von D-(-)-Weinsäuredibenzylester (19) in CDCl ₃ (400 MHz)	134
Abb. 106:	¹ H-NMR-Spektrum von Glyoxylsäurebenzylester (18) in CDCl ₃ (400 MHz)	136
Abb. 107:	¹ H-NMR-Spektrum von 3-(5-(Benzylcarbonyl)-hydroxymethyl)-2-(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)-4-methylpyrrol-3-yl)-propionsäuremethylester (20) in CDCl ₃ (400 MHz)	138
Abb. 108:	¹ H-NMR-Spektrum von Benzyloxycarbonyl-(5- <i>tert</i> -butoxycarbonyl)-4-(2-methoxycarbonyl-ethyl)-3-methylpyrrol-2-yl)-(triphenylphosphonid)-methanid (17) in CDCl ₃ (400 MHz)	140
Abb. 109:	¹ H-NMR-Spektrum von (5- ¹³ C)-5-Formyl-3-(2-methoxycarbonylethyl)-4-methyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-carbonsäure- <i>tert</i> -butylester (33) in CDCl ₃ (400 MHz)	142
Abb. 110:	¹ H-NMR-Spektrum von ¹⁵ N-Methyl-3-(2-methoxycarbonyl)ethyl)-5-formyl-4-methyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-carbonsäuremethylester (70) in CDCl ₃ (400 MHz)	144
Abb. 111:	¹ H-NMR-Spektrum von 3-(5-Benzyloxycarbonyl-9- <i>tert</i> -butoxycarbonyl-2,3-dihydro-2,7-dimethyl-3-ethyliden-dipyrin-1-(10 <i>H</i>)-on-8-yl)-propionsäuremethylester (25) in CDCl ₃ (400 MHz)	146

Abb. 112:	¹ H-NMR-Spektrum von 9- <i>tert</i> -Butoxycarbonyl-2,3-dihydro-2,7-dimethyl-3-ethyliden-8-(2-methoxycarbonyl)-ethyl-dipyrrin-1-(10 <i>H</i>)-on-5-carbonsäure (23) in Pyridin-d ₅ (400 MHz)	148
Abb. 113:	¹ H-NMR-Spektrum von (5- ¹³ C)-2-Ethyl-9-carbonsäure- <i>tert</i> -butylester-8-(2-methoxycarbonyl-ethyl)-3,7-dimethylpyrromethen-1 <i>H</i> -pyrrol (50)	150
Abb. 114:	¹ H-NMR-Spektrum von (5-C ¹³)-2-Ethyl-9-formyl-8-(2-methoxycarbonylethyl)-3,7-dimethyl-pyrromethen-1 <i>H</i> -pyrrol (52) in CDCl ₃ (400 MHz)	152
Abb. 115:	¹ H-NMR-Spektrum von ¹⁵ N-2-Ethyl-9-carbonsäuremethylester-8-(2-methoxycarbonylethyl)-3,7-dimethylpyrromethen-1 <i>H</i> -pyrrol (72) in CDCl ₃ (400 MHz)	154
Abb. 116:	¹ H-NMR-Spektrum von (5- ¹³ C)-Phycocyanobilindimethylester (75) in Pyridin-d ₅ (400 MHz)	156
Abb. 117:	¹ H-NMR-Spektrum von (15- ¹³ C)-Phycocyanobilindimethylester (51) in Pyridin-d ₅ (400 MHz)	158
Abb. 118:	¹ H-NMR-Spektrum von (5- ¹³ C)-Phycocyanobilin (41) in Pyridin-d ₅ (400 MHz)	160
Abb. 119:	¹ H-NMR-Spektrum von (15- ¹³ C)-Phycocyanobilin (48) in Pyridin-d ₅ (400 MHz)	162
Abb. 120:	¹ H-NMR-Spektrum von Phycocyanobilin (3) in Pyridin-d ₅ (400 MHz)	164
Abb. 121:	¹ H-NMR-Spektrum vom PCB-Methanoladdukt 1 (73) in Pyridin-d ₅ (400 MHz)	166
Abb. 122:	¹ H-NMR-Spektrum vom PCB-Methanoladdukt 2 (74) in Pyridin-d ₅ (400 MHz)	167
Abb. 123:	¹ H-NMR-Spektrum von Phycocyanobilindimethylester (28) in Pyridin-d ₅ (400 MHz)	169
Abb. 124:	¹ H-NMR-Spektrum von 2-Ethyl-8-(2-methoxycarbonylethyl)-3,7-dimethylpyrrolidin-1 <i>H</i> -on (71) in Pyridin-d ₅ (400 MHz)	171
Abb. 125:	¹ H-NMR-Spektrum von 3-Ethyliden-8-(2-methoxycarbonylethyl)-2,7-dimethylpyrrolidin-1 <i>H</i> -on (76) in Pyridin-d ₅ (400 Hz)	172
Abb. 126:	¹ H-NMR-Spektrum von ³ ¹ -Cystein-Phycocyanobilindimethylesteradduktes (53) in Pyridin-d ₅ (400 MHz)	174
Abb. 127:	¹ H-NMR-Spektrum von Biliverdin IX α (1) in Pyridin-d ₅ (400 MHz)	176

Abb. 128: ^1H -NMR-Spektrum von Biliverdindimethylester (63) in Pyridin- d_5 (400 MHz)	178
Abb. 129: ^1H -NMR-Spektren vom 2-Vinyl-Isomer (65) in Pyridin- d_5 (400MHz)	180
Abb. 130: ^1H -NMR-Spektrum vom 3-Vinyl-Isomer (64) in Pyridin- d_5 (400 MHz)	181
Abb. 131: ^1H -NMR-Spektrum von $(10\text{-}^{13}\text{C})$ -9-Formyl-3-vinyl-neoxanthobilirubinsäuremethylester (67) in CDCl_3 (400 MHz)	183
Abb. 132: ^1H -NMR-Spektren von $(10\text{-}^{13}\text{C})$ -Biliverdindimethylester (68) in CDCl_3 (400 MHz)	185
Abb. 133: ^1H -NMR-Spektrum von $(10\text{-}^{13}\text{C})$ -Biliverdin IX α (62) in Pyridin- d_5 (400 MHz)	187

9.3 Literaturverzeichnis

- [1] Moeglich, A.; Yang, X.; Ayers, R. A.; Moffat, K. Structure and Function of Plant Photoreceptors. *Annual Review of Plant Biology*, 61 **2010**, 21-47.
- [2] Losi, A. Flavin-based blue-light photosensors: A photobiophysics update. *Photochem. Photobiol.* **2007**, 83, 1283-1300.
- [3] Schwetlick, K. *Organikum - Organisch-chemisches Grundpraktikum*; 21. Auflage ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2001.
- [4] Batschauer, A. *Photoreceptors and Light Signalling*; Royal Society of Chemistry 2003: Cambridge, 2003.
- [5] Shoham, S.; Deisseroth, K. Special issue on optical neural engineering: advances in optical stimulation technology. *J Neural Eng* **2010**, 7, 040201.
- [6] Deisseroth, K.; Feng, G. P.; Majewska, A. K.; Miesenbock, G.; Ting, A.; Schnitzer, M. J. Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J. Neurosci.* **2006**, 26, 10380-10386.
- [7] Sage, L. C. *Pigment of the Imagination - A History of Phytochrome Research*; Academic Press: San Diego, 1992.
- [8] Butler, W. L.; Norris, K. H.; Siegelman, H. W.; Hendricks, S. B. Detection, Assay, and Preliminary Purification of the Pigment Controlling Photoresponsive Development of Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1959**, 45, 1703-1708.
- [9] Hershey, H. P.; Barker, R. F.; Idler, K. B.; Lissemore, J. L.; Quail, P. H. Analysis of Cloned Cdna and Genomic Sequences for Phytochrome - Complete Amino-Acid-Sequences for 2 Gene-Products Expressed in Etiolated Avena. *Nucleic Acids Res.* **1985**, 13, 8543-8559.
- [10] Quail, P. H. Phytochrome - A Light-Activated Molecular Switch That Regulates Plant Gene-Expression. *Annual Review of Genetics* **1991**, 25, 389-409.
- [11] Nakasako, M.; Wada, M.; Tokutomi, S.; Yamamoto, K. T.; Sakai, J.; Kataoka, M.; Tokunaga, F.; Furuya, M. Quaternary Structure of Pea Phytochrome-I Dimer Studied with Small-Angle X-Ray-Scattering and Rotary-Shadowing Electron-Microscopy. *Photochem. Photobiol.* **1990**, 52, 3-12.
- [12] Heyer, A.; Gatz, C. Isolation and Characterization of A cDNA-Clone Coding for Potato Type-A Phytochrome. *Plant Mol. Biol.* **1992**, 18, 535-544.
- [13] Vierstra, R. D.; Quail, P. H. Proteolysis Alters the Spectral Properties of 124 K Dalton Phytochrome from Avena. *Planta* **1982**, 156, 158-165.
- [14] Hershey, H. P.; Barker, R. F.; Idler, K. B.; Murray, M. G.; Quail, P. H. Nucleotide-Sequence and Characterization of A Gene Encoding the Phytochrome Polypeptide from Avena. *Gene* **1987**, 61 (3), 339-348.

- [15] Kaneko, T.; Tanaka, A.; Sato, S.; Kotani, H.; Sazuka, T.; Miyajima, N.; Sugiura, M.; Tabata, S. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. I. Sequence features in the 1 Mb region from map positions 64% to 92% of the genome. *Dna Res* **1995**, *2*, 153-158.
- [16] Xiaojing, Y.; Kuk, J.; Moffat, K. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophytochrome: photoconversion and signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 14715-14720.
- [17] Essen, L. O.; Mailliet, J.; Hughes, J. The structure of a complete phytochrome sensory module in the Pr ground state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 14709-14714.
- [18] Quail, P. H. Phytochromes. *Current Biology* **2010**, *20*, R504-R507.
- [19] Davis, S. J.; Vener, A. V.; Vierstra, R. D. Bacteriophytochromes: Phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science* **1999**, *286*, 2517-2520.
- [20] Kehoe, D. M.; Grossman, A. R. Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science* **1996**, *273*, 1409-1412.
- [21] Lamparter, T. Evolution of cyanobacterial and plant phytochromes. *FEBS Lett.* **2004**, *573* (1-3), 1-5.
- [22] Blumenstein, A.; Vienken, K.; Tasler, R.; Purschwitz, J.; Veith, D.; Frankenberg-Dinkel, N.; Fischer, R. The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Current Biology* **2005**, *15*, 1833-1838.
- [23] Rockwell, N. C.; Lagarias, J. C. A Brief History of Phytochromes. *Chemphyschem* **2010**, *11*, 1172-1180.
- [24] Rockwell, N. C.; Su, Y. S.; Lagarias, J. C. Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **2006**, *57*, 837-858.
- [25] Jorissen, H. J. M. M.; Braslavsky, S. E.; Wagner, G.; Gärtner, W. Heterologous expression and characterization of recombinant phytochrome from the green alga *Mougeotia scalaris*. *Photochem. Photobiol.* **2002**, *76*, 457-461.
- [26] Wu, S. H.; McDowell, M. T.; Lagarias, J. C. Phycocyanobilin is the natural precursor of the phytochrome chromophore in the green alga *Mesotaenium caldariorum*. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 25700-25705.
- [27] Kidd, D. G.; Lagarias, J. C. Phytochrome from the Green-Alga *Mesotaenium-Caldariorum* - Purification and Preliminary Characterization. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 7029-7035.
- [28] Sharrock, R. A.; Quail, P. H. Novel Phytochrome Sequences in *Arabidopsis-Thaliana* - Structure, Evolution, and Differential Expression of A Plant Regulatory Photoreceptor Family. *Genes Dev.* **1989**, *3* (11), 1745-1757.

- [29] Davis, S. J.; Hennig, L.; Karniol, B.; Kircher, S.; Mathews, S.; Nagy, F.; Schäfer, E.; Sharrock, R. A.; Vierstra, R. D. The phytochrome. In *Photomorphogenesis in plants and bacteria*, 3. Auflage ed.; Hrsg.; Springer: Dordrecht, 2006; pp 41-170.
- [30] Lamparter, T.; Michael, N.; Caspani, O.; Miyata, T.; Shirai, K.; Inomata, K. Biliverdin binds covalently to Agrobacterium phytochrome Agp1 via its ring a vinyl side chain. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 33786-33792.
- [31] Wagner, J. R.; Zhang, J. R.; Brunzelle, J. S.; Vierstra, R. D.; Forest, K. T. High resolution structure of Deinococcus bacteriophytochrome yields new insights into phytochrome architecture and evolution. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 12298-12309.
- [32] Yang, X.; Stojkovic, E. A.; Kuk, J.; Moffatt, K. Crystal structure of the chromophore binding domain of an unusual bacteriophytochrome, RpBphP3, reveals residues that modulate photoconversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 12571-12576.
- [33] von Stetten, D.; Seibeck, S.; Michael, N.; Scheerer, P.; Mroginski, M. A.; Murgida, D. H.; Krauss, N.; Heyn, M. P.; Hildebrandt, P.; Borucki, B.; Lamparter, T. Highly conserved residues Asp-197 and His-250 in Agp1 phytochrome control the proton affinity of the chromophore and Pfr formation. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 2116-2123.
- [34] Borthwick, H. A.; Hendricks, S. B.; Parker, M. W.; Toole, E. H.; Toole, V. K. A Reversible Photoreaction Controlling Seed Germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1952**, *38*, 662-666.
- [35] Lamparter, T.; Mittmann, F.; Gärtner, W.; Borner, T.; Hartmann, E.; Hughes, J. Characterization of recombinant phytochrome from the cyanobacterium *Synechocystis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 11792-11797.
- [36] Gensch, T.; Churio, M. S.; Braslavsky, S. E.; Schaffner, K. Primary quantum yield and volume change of phytochrome-A phototransformation determined by laser-induced optoacoustic spectroscopy. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *63*, 719-725.
- [37] Remberg, A.; Lindner, I.; Lamparter, T.; Hughes, J.; Kneip, C.; Hildebrandt, P.; Braslavsky, S. E.; Gärtner, W.; Schaffner, K. Raman spectroscopic and light-induced kinetic characterization of a recombinant phytochrome of the cyanobacterium *Synechocystis*. *Biochemistry* **1997**, *36*, 13389-13395.
- [38] Matysik, J.; Hildebrandt, P.; Schlamann, W.; Braslavsky, S. E.; Schaffner, K. Fourier-Transform Resonance Raman-Spectroscopy of Intermediates of the Phytochrome Photocycle. *Biochemistry* **1995**, *34*, 10497-10507.
- [39] Kneip, C.; Mozley, D.; Hildebrandt, P.; Gärtner, W.; Braslavsky, S. E.; Schaffner, K. Effect of chromophore exchange on the resonance Raman spectra of recombinant phytochromes. *FEBS Lett.* **1997**, *414*, 23-26.

- [40] Foerstendorf, H.; Benda, C.; Gärtner, W.; Storf, M.; Scheer, H.; Siebert, F. FTIR studies of phytochrome photoreactions reveal the C=O bands of the chromophore: Consequences for its protonation states, conformation, and protein interaction. *Biochemistry* **2001**, *40*, 14952-14959.
- [41] Andel, F.; Lagarias, J. C.; Mathies, R. A. Resonance Raman analysis of chromophore structure in the lumi-R photoproduct of phytochrome. *Biochemistry* **1996**, *35*, 15997-16008.
- [42] Lagarias, J. C.; Rapoport, H. Chromopeptides from Phytochrome - the Structure and Linkage of the Pr Form of the Phytochrome Chromophore. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 4821-4828.
- [43] Mizutani, Y.; Tokutomi, S.; Kitagawa, T. Resonance Raman-Spectra of the Intermediates in Phototransformation of Large Phytochrome - Deprotonation of the Chromophore in the Bleached Intermediate. *Biochemistry* **1994**, *33*, 153-158.
- [44] Schumann, C.; Gross, R.; Wolf, M. M. N.; Diller, R.; Michael, N.; Lamparter, T. Subpicosecond midinfrared spectroscopy of the P-fr reaction of phytochrome Agp1 from *Agrobacterium tumefaciens*. *Biophys. J.* **2008**, *94*, 3189-3197.
- [45] Heyne, K.; Herbst, J.; Stehlik, D.; Esteban, B.; Lamparter, T.; Hughes, J.; Diller, R. Ultrafast dynamics of phytochrome from the cyanobacterium *Synechocystis*, reconstituted with phycocyanobilin and phycoerythrobilin. *Biophys. J.* **2002**, *82*, 1004-1016.
- [46] Bischoff, M.; Hermann, G.; Rentsch, S.; Strehlow, D. First steps in the phytochrome phototransformation: A comparative femtosecond study on the forward (Pr → Pfr) and back reaction (Pfr → Pr). *Biochemistry* **2001**, *40*, 181-186.
- [47] Bischoff, M.; Hermann, G.; Strehlow, D.; Rentsch, S. Femtosecond studies of the phototransformation process in phytochrome. *Recent Research Developments in Applied Physics, Vol 5, Pt 1* **2002**, *5*, 107-120.
- [48] Ulijasz, A. T.; Cornilescu, G.; Cornilescu, C. C.; Zhang, J. R.; Rivera, M.; Markley, J. L.; Vierstra, R. D. Structural basis for the photoconversion of a phytochrome to the activated Pfr form. *Nature* **2010**, *463*, 250-U143.
- [49] Falk, H. *The Chemistry of Linear Oligopyrroles and Bile Pigments*; Springer-Verlag Wien New York: 1989.
- [50] Glazer, A. N. Light Harvesting by Phycobilisomes. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* **1985**, *14*, 47-77.
- [51] Terry, M. J.; Wahleithner, J. A.; Lagarias, J. C. Biosynthesis of the Plant Photoreceptor Phytochrome. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *306*, 1-15.
- [52] Heldt, H. W.; Piechulla, B. *Pflanzenbiochemie*; 4. Auflage ed.; Spektrum Akademischer Verlag: 2008.

- [53] Leeper, F. J. The Biosynthesis of Porphyrins, Chlorophylls, and Vitamin-B12. *Nat. Prod. Rep.* **1989**, *6*, 171-203.
- [54] Terry, M. J.; McDowell, M. T.; Lagarias, J. C. (3Z)-Phytochromobilin and (3E)-Phytochromobilin Are Intermediates in the Biosynthesis of the Phytochrome Chromophore. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 11111-11118.
- [55] Beale, S. I.; Cornejo, J. Biosynthesis of Phycobilins - 15,16-Dihydrobiliverdin-Ix-Alpha Is A Partially Reduced Intermediate in the Formation of Phycobilins from Biliverdin-Ix-Alpha. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 22341-22345.
- [56] Elich, T. D.; Lagarias, J. C. Phytochrome Chromophore Biosynthesis - Both 5-Aminolevulinic Acid and Biliverdin Overcome Inhibition by Gabaculine in Etiolated *Avena-Sativa* l Seedlings. *Plant Physiol.* **1987**, *84*, 304-310.
- [57] Elich, T. D.; McDonagh, A. F.; Palma, L. A.; Lagarias, J. C. Phytochrome Chromophore Biosynthesis - Treatment of Tetrapyrrole-Deficient *Avena* Explants with Natural and Non-Natural Bilatrienes Leads to Formation of Spectrally Active Holoproteins. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 183-189.
- [58] Borucki, B.; Otto, H.; Rottwinkel, G.; Hughes, J.; Heyn, M. P.; Lamparter, T. Mechanism of Cph1 phytochrome assembly from stopped-flow kinetics and circular dichroism. *Biochemistry* **2003**, *42*, 13684-13697.
- [59] Dolphin, D. *The Porphyrins*; Academic Press: New York; San Francisco; London, 1979; Vol. VI.
- [60] Jacobi, P. A.; Odeh, I. M. A.; Buddhu, S. C.; Cai, G. L.; Rajeswari, S.; Fry, D.; Zheng, W. J.; DeSimone, R. W.; Guo, J. S.; Coutts, L. D.; Hauck, S. I.; Leung, S. H.; Ghosh, I.; Pippin, D. Synthetic studies in phytochrome chemistry. *Synlett* **2005**, 2861-2885.
- [61] Inomata, K. Studies on the structure and function of phytochromes as photoreceptors based on synthetic organic chemistry. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2008**, *81*, 25-59.
- [62] Scheerer, P.; Michael, N.; Park, J. H.; Nagano, S.; Choe, H. W.; Inomata, K.; Borucki, B.; Krauss, N.; Lamparter, T. Light-Induced Conformational Changes of the Chromophore and the Protein in Phytochromes: Bacterial Phytochromes as Model Systems. *Chemphyschem* **2010**, *11*, 1090-1105.
- [63] Manitto, P.; Monti, D. Reaction of Biliverdins with Thiobarbituric Acid - Novel Fragmentation Reaction of Bilin-1,19(21H,24H)-Diones. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1980**, 178-180.
- [64] Bongards, C. Darstellung strukturell modifizierter Biline als Chromophore des pflanzlichen Photorezeptors Phytochrom. Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, **2007**.
- [65] Mroginski, M. A.; von Stetten, D.; Escobar, F. V.; Strauss, H. M.; Kaminski, S.; Scheerer, P.; Gunther, M.; Murgida, D. H.; Schmieder, P.; Bongards, C.; Gärtner, W.; Mailliet, J.; Hughes, J.; Essen, L. O.; Hildebrandt, P. Chromophore

- Structure of Cyanobacterial Phytochrome Cph1 in the Pr State: Reconciling Structural and Spectroscopic Data by QM/MM Calculations. *Biophys. J.* **2009**, *96*, 4153-4163.
- [66] von Stetten, D.; Gunther, M.; Scheerer, P.; Murgida, D. H.; Mroginski, M. A.; Krauss, N.; Lamparter, T.; Zhang, J.; Anstrom, D. M.; Vierstra, R. D.; Forest, K. T.; Hildebrandt, P. Chromophore heterogeneity and photoconversion in phytochrome crystals and solution studied by resonance Raman spectroscopy. *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, *47*, 4753-4755.
- [67] Rohmer, T. MAS NMR study of the photoreceptor phytochrome. Univ. Leiden, Niederlande, **2010**.
- [68] Kakiuchi, T.; Kato, H.; Jayasundera, K. P.; Higashi, T.; Watabe, K.; Sawamoto, D.; Kinoshita, H.; Inomata, K. Total syntheses of (+/-)-phycoerythrin and its derivatives bearing a photoreactive group at D-ring. *Chem. Lett.* **1998**, (10), 1001-1002.
- [69] Barton, D. H. R.; Kervagoret, J.; Zard, S. Z. A Useful Synthesis of Pyrroles from Nitroolefins. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 7587-7598.
- [70] Lindner, I. Totalsynthese neuartiger Chromophore des pflanzlichen Photorezeptors Phytochrom und Charakterisierung der biochemischen und spektralen Eigenschaften der damit generierten Chromoproteine. Gerhard-Mercator-Universität-Gesamthochschule Duisburg, Max-Planck-Institut für Strahlenchemie, Mülheim an der Ruhr, **2000**.
- [71] Ugi, I.; Betz, W.; Fetzer, U.; Offermann, K. Notiz Zur Darstellung Von Isonitrilen aus Monosubstituierten Formamiden Durch Wasserabspaltung Mittels Phosgen und Trialkylaminen. *Chemische Berichte-Recueil* **1961**, *94*, 2814-2816.
- [72] Bishop, J. E.; Oconnell, J. F.; Rapoport, H. The Reaction of Thioimides with Phosphorus Ylides. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5079-5091.
- [73] Gossauer, A.; Mische, D. Syntheses of Bile-Pigments .3. Total Synthesis of Mesobilirubin Dimethyl Ester. *Annalen der Chemie-Justus Liebig* **1974**, (3), 352-362.
- [74] Hartung, W. H.; Simonoff, R. Hydrogenolysis of Benzyl Groups Attached to Oxygen, Nitrogen, Or Sulfur. *Organic Reactions* **1953**, *7*, 263-326.
- [75] Montforts, F. P.; Schwartz, U. M. A Directed Synthesis of the Chlorin System. *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 1228-1253.
- [76] Robben, U.; Lindner, I.; Gärtner, W. G. New open-chain tetrapyrroles as chromophores in the plant photoreceptor phytochrome. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11303-11311.
- [77] Weller, J. P.; Gossauer, A. Syntheses of Bile-Pigments .10. Synthesis and Photoisomerization of Racemic Phytochromobilin Dimethyl Ester. *Chemische Berichte-Recueil* **1980**, *113*, 1603-1611.

- [78] Schultz, M.; Kulis, J.; Murison, J.; Andrews, G. W. Synthesis of dianionic and trianionic chiral, chelating ligands based on amino acids. *Aust. J. Chem.* **2008**, *61*, 297-302.
- [79] Jones, R. G. Studies on Imidazoles .2. the Synthesis of 5-Imidazolecarboxylates from Glycine and Substituted Glycine Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 644-647.
- [80] Gribble, G. W.; Switzer, F. L.; Soll, R. M. A Biomimetic Approach to the Elaeocarpus Alkaloids - Syntheses of (+/-)-Elaeokanine-A, (+/-)-Elaeokanine-C, (+/-)-Elaeocarpidine, and (+/-)-Tarennine. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3164-3170.
- [81] Wohl, A.; Schweitzer, H. A process for the representation of dialdehydes of the fatty series. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1906**, *39*, 890-897.
- [82] Makhynya, Y.; Hussain, Z.; Bauschlicher, T.; Schwinte, P.; Siebert, F.; Gärtner, W. Synthesis of selectively C-13-labelled bilin compounds. *European Journal of Organic Chemistry* **2007**, 1287-1293.
- [83] Kufer, W.; Scheer, H. Studies on Plant Bile-Pigments .7. Preparation and Characterization of Phycobiliproteins with Chromophores Chemically Modified by Reduction. *Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie* **1979**, *360*, 935-956.
- [84] Kufer, W.; Krauss, C.; Scheer, H. Studies of Plant Bile-Pigments .10. 2 Mild, Regioselective Methods of Degrading Biliprotein Chromophores. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1982**, *21*, 446-447.
- [85] Stumpe, H.; Müller, N.; Grubmayr, K. The Addition of Methyl-2-Mercaptoacetate to Phycocyanobilin Dimethyl Ester - A Model Reaction for Biliprotein Biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 4165-4168.
- [86] Navech, J.; Majoral, J. P.; Kraemer, R. Synthesis of the first Stable Metadithiophosphonate. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5885-5886.
- [87] Rauchfuss, T. B.; Zank, G. A. Mechanistic Studies on the Thiation of Carbonyls by Lawessons Reagent - the Role of A 3-Coordinate Phosphorus(V) Species. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3445-3448.
- [88] Yoshifuji, M.; An, D. L.; Toyota, K.; Yasunami, M. 2,4-Di-*tert*-Butyl-6-Methoxyphenyldithioxophosphorane As A Probe for the Mechanistic Studies of Lawessons Reagent. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4379-4382.
- [89] Nakai, T.; McDowell, C. A. Determination of Spin Parameters Reflected in the Nuclear-Magnetic-Resonance Powder Patterns for 2 Equivalent P-31 Nuclei in Lawessons Reagent. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **1995**, *4*, 163-171.
- [90] Fluck, E.; Binder, H. Chemische Reaktionen der Perthiophosphonsäureanhydride. *Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie* **1967**, *354*, 113-&.

- [91] Breitmaier, E.; Jung, G. *Organische Chemie - Grundlagen, Stoffklassen, Reaktionen, Konzepte, Molekülstruktur*; 4. überarbeitete Auflage ed.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart; New York, 2001.
- [92] Dawadi, P. B. S.; Lugtenburg, J. Efficient preparation of [1-N-15]-3-Cyano-4-methyl-1H-pyrrole by a Wittig-based strategy. *European Journal of Organic Chemistry* **2008**, 2288-2292.
- [93] Mozley, D.; Remberg, A.; Gärtner, W. Large-scale generation of affinity-purified recombinant phytochrome chromopeptide. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *66*, 710-715.
- [94] Eichinger, D.; Falk, H. On the Chemistry of Pyrrole Pigments .69. Tripyrrines of the Prodigiosene Type As Ionophores. *Monatshefte für Chemie* **1987**, *118*, 255-260.
- [95] Drinan, M. A.; Lash, T. D. Synthesis of Benzyl and Tert-Butyl 3-(2-Methoxycarbonylethyl)-4-Methylpyrrole-2-Carboxylates from Methyl 4-Oxobutanoate. *J. Heterocycl. Chem.* **1994**, *31* (1), 255-257.

9.4 Abkürzungsverzeichnis

ΔA	Absorptionsdifferenz
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
BB	^1H -Breitband-entkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum
BLUF	Blue-light sensors using flavin adenine dinucleotide
BphP	Bakterielle Phytochrome
BV	Biliverdin IX α ; (8,12-Bis-(2-carboxyethyl)-2,7,13,17-tetramethyl-3,18-divinylnobilin-1,19-(21,24 <i>H</i>)-dion)
CAN	Ammoniumcer-(IV)-nitrat
cm	Zentimeter
CphP	Cyanobakterielle Phytochrome
δ	Chemische Verschiebung [ppm]
Da	Dalton
DBU	1,8-Diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-en
DMAP	N,N'-Dimethyl-4-aminopyridin
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>Dr</i> CBD	<i>Deinococcus radiodurans</i> , chromophore-binding-domain
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektronenspray-Ionisation
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FMN	Flavin-Mononucleotid (Riboflavin-5'-phosphat)
Fph	Phytochrome aus Pilzen
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot (-Spektroskopie)
Φ	Quantenausbeute
Φ_{fl}	Fluoreszenz Quantenausbeute
GAF	cGMP spezifische Phosphodiesterase
h	Stunde
HRKD	histidine-related kinase domain
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Herz
I_{700}	Intermediat mit einem Absorptionsmaximum bei 700 nm
I_{bl}	gebleichtes Intermediat
J	Kopplungskonstante [Hz]
λ	Wellenlänge [nm]
λ_{max}	Wellenlänge des Absorptionsmaximums [nm]

Lit.	Literatur
LOV	Light-Oxygen-Voltage (-Sensoren)
M	molar [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]
MM	Molekularmechanische Kraftfeldmethode
min	Minute
MPLC	Medium Pressure Liquid Chromatography
ms	Millisekunde
NCS	<i>N</i> -Chlorsuccinimid
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
ns	Nanosekunden
PaBphP	Bakterielles Phytochrom aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAS	PER ARNT SIM (period clock protein, aromatic hydrocarbon receptor nuclear translocator, single minded)
PCB	Phycocyanobilin (8,12-Bis(2-carboxyethyl)-18-ethyl-3-ethyliden-2,3-dihydro-2,7,13,17-tetramethylbilin-1,19-(21,24 <i>H</i>)-dion)
PCBMe ₂	Phycocyanobilindimethylester
PCC	Pasteur Culture Collection
PEB	Phycoerythrobilin
P _{fr}	dunkelrot (far red) absorbierende Form des Phytochroms
PΦB	Phytochromobilin (8,12-Bis-(2-carboxyethyl)-3-ethyliden-2,3-dihydro-2,7,13,17-tetramethyl-18-vinylbilin-1,19-(21,24 <i>H</i>)-dion)
PHY	Phytochrom spezifische Domäne
Phy	Phytochrom
PhyA	Pflanzliches Phytochrom
ppm	parts per million
P _r	hellrot (red) absorbierende Form des Phytochroms
ps	Pikosekunden
QM	Quantenmechanisch
RP	Reverse Phase
RpBphP3	<i>Rhodospseudomons palustris</i> bacterial phytochrome photoreceptor 3
s	Sekunde
Sdp.	Siedepunkt [°C]
Smp.	Schmelzpunkt [°C]
tert	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure

THF	Tetrahydrofuran
TMG	N,N,N',N'-Tetramethylguanidin
UV	Ultraviolett (-Spektroskopie)
vgl.	vergleiche
Vis	Spektroskopie im sichtbaren Wellenlängenbereich
z.A.	zur Analyse
z.S.	zur Synthese

Curriculum vitae

Simone Ringsdorf

Staatsangehörigkeit

deutsch

Geburtsdatum

11.02.1982

Studium

von/bis

Oktober 2007 – November 2010

Promotionsstudium Chemie

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Doktorarbeit

ausgeführt am Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie, Mülheim, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Wolfgang Gärtner
„Synthese gezielt isopenmarkierter und strukturell modifizierter Tetrapyrrole“

von/bis

September 2001 – August 2007

Diplomchemie

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Diplomarbeit (Dezember 2006 – Juni 2007)

am Lehrstuhl für Organische Chemie, Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Arbeitsgruppe HD Dr. Klaus Schaper

„Beiträge zur Synthese von photolabilen Neurotransmittervorstufen“

Berufliche Tätigkeiten

von/bis

August 2001 – September 2001

Aushilfe, als Laborantin

Aggerverband – Körperschaft des öffentlichen Rechts

Sonnenstraße 40

51645 Gummersbach

Schulbildung

von/bis

1992 – 2001

Erzbischöfliches St.-Angela-Gymnasium, Wipperfürth

Allgemeine Hochschulreife

Besondere Kenntnisse

Soziale und organisatorische Fähigkeiten und Kompetenzen

Erfahrungen:

als Gruppenleiterin einer Voltigiermannschaft, in der Führung einer Kindergruppe,

als Mitglied einer Seglergemeinschaft

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen

Mülheim an der Ruhr, 03.November 2007

Simone Ringsdorf

