

Synthese verschiedener Monolignolderivate

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Patrick Oliver Sanwald
geb. Marx

aus
Berlin (Deutschland)

Jülich, 2020

aus dem Institut für Bioorganische Chemie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Jörg Pietruszka
Koreferent: Prof. Dr. Thomas J. J. Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2020

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Patrick Marx, versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbst verfasst und ohne unzulässige Hilfe unter Beachtung der Grundsätze zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erstellt worden ist. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Bei Ergebnissen, welche in Zusammenarbeit mit anderen produziert wurden, habe ich meinen Beitrag genannt.

Ferner erkläre ich, dass ich in keinem anderen Dissertationsverfahren mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen.

Jülich, den

(Patrick Marx)

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Publikationen

J. Aschenbrenner*, P. Marx*, J. Pietruszka, J. Marienhagen, *ChemBioChem* **2019**, 20, 949-954; 'Microbial Production of Natural and Unnatural Monolignols with *Escherichia coli*'.^[1]

Konferenzteilnahmen

16th BOSS (Belgian Organic Synthesis Symposium), 8.-13.7.**2018**, Brüssel, Belgien; P. Marx, J. Aschenbrenner, M. Kolomytseva, L. Golovleva, J. Marienhagen, J. Pietruszka; 'Production of Natural and Non-natural Monolignols in *E. coli*'. (Poster)

69. Mosbacher Colloquium, 22.-24.3.**2018**, Mosbach, Deutschland.

9th ÖGMBT (Österreichische Gesellschaft für Molekulare Biowissenschaften und Biotechnologie) Annual Meeting and 8th Life Science Meeting Innsbruck, 25.-27.09.**2017**, Innsbruck, Österreich.

67. Mosbacher Colloquium, 30.03-02.04.**2016**, Mosbach, Deutschland; P. Marx, J. Aschenbrenner, T. Classen, J. Marienhagen, J. Pietruszka; 'Mutasyntetic approach towards the synthesis of monolignol derivatives'. (Poster)

Abschlussarbeiten

Die vorliegende Arbeit enthält keine Ergebnisse aus den hier aufgeführten Arbeiten, welche vom Autor betreut wurden.

B. Sc. Ferdinand Wrusch (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Bachelorarbeit), **2018**; 'Synthese und Umsetzung von Bromchroman-4-onen'.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Zusammenfassung	5
2 Abstract	7
3 Einleitung	9
3.1 Einführung	9
3.2 Zielsetzung	11
4 Kenntnisstand	13
4.1 Lignan	13
4.1.1 Strukturen	13
4.1.2 Biosynthese	14
4.1.3 Biologische Funktion	17
4.1.4 Pharmazeutische Nutzung	19
4.2 Laccasen	20
4.2.1 Struktur	20
4.2.2 Mechanismus	23
4.2.3 Funktion und Anwendung	25
4.3 Suzuki-Kupplung	26
4.3.1 Reaktionszyklus	26
4.3.2 Borverbindung	33
5 Ergebnisse und Diskussion	35
5.1 Synthese von Monolignolreferenzen	35
5.1.1 Synthesemethode A	35
5.1.2 Synthesemethode B	37
5.1.3 Synthese der Zimtsäurederivate	40
5.2 Biotechnologische Monolignolsynthese	41
5.2.1 Reduktion mit <i>E. coli</i>	41
5.2.2 Nachweis mit q-NMR	43
5.2.3 Vergleich enzymatische und chemische Synthese	47
5.3 Enzymatische Lignansynthese	48
5.3.1 Synthese von Pinoresinol	48
5.3.2 Synthese von Dibrompinoresinol	52
5.4 Dibrompinoresinolderivatisierung	56
5.4.1 Suzuki-Kupplung	56
5.4.2 Toxizitätsassays	62
6 Material	71
6.1 Geräte	71
6.2 Software	73
6.3 Verbrauchsmaterialien	73
6.4 Chemikalien und Enzyme	73

6.5	Nährmedien	73
7	Methoden	75
7.1	Allgemeine Methoden	75
7.1.1	Lösungsmittel	75
7.1.2	Durchführung von Reaktionen	75
7.1.3	Chromatographie	75
7.1.4	Infrarot (IR)	75
7.1.5	NMR	75
7.1.6	HPLC-Messungen	76
7.1.7	Assays	77
7.2	Mikrobielle Methoden	80
7.2.1	Anzucht von Bakterien	80
7.2.2	Genexpression und Reinigung	81
7.2.3	Biotechnologische Monolignolproduktion	81
7.3	Synthesevorschriften	82
7.3.1	Synthese von Monolignolreferenzen	82
7.3.2	Lignansynthese	98
7.3.3	Suzuki-Kupplung	102
	Abbildungsverzeichnis	107
	Tabellenverzeichnis	111
8	Danksagung	113
9	Anhang	125
9.1	Cyclodextrinversuch	125
9.2	Toxizitätsassays gegenüber Mikroorganismen	125
9.2.1	Dosis-Wirkungs-Kurven	125
9.3	NMR-Spektren	129
10	Formelregister	163

Abkürzungsverzeichnis

ALK	Alkalische Phosphatase
Äq.	Äquivalente
ATP	Adenosintriphosphat
DiBAI-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DMAP	Dimethylaminopyridin
TBAF	<i>tetra</i> -Butylammoniumfluorid
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
CAD	Cinnamoylalkoholdehydrogenase
CCR	Cinnamoyl-CoA-reduktase
COMT	Cinnamoyl- <i>O</i> -methyltransferase
<i>p</i>C3H	<i>p</i> -Cumarat-3-hydroxylase
DC	Dünnschichtchromatographie
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMS	Dimethylsulfon
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBSS	<i>earles balanced salt solution</i>
EE	Essigsäureethylester
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EPR	<i>electron paramagnetic resonance</i>
F5H	Ferulat-5-hydroxylase
<i>FR</i>	<i>fully reduced intermediate</i>
HWE-Reaktion	Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion
4CL	4-Hydroxyzinnamoyl-CoA-ligase
HQT	Hydroxyzinnamoyl-quinat-transferase
HCT	Hydroxyzinnamoyl-shikimat-transferase

NHC	<i>N</i> -heterozyklische Carbene
HFIP	1,1,1,2,2,2-Hexafluorisopropanol
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
IC₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IPP	Isopentenylphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC3	<i>microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B</i>
MIDA	<i>N</i> -Methyliminodiessigsäure
MPLC	<i>medium pressure liquid chromatography</i>
MIC	minimale inhibitorische Konzentration
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
qNMR	<i>quantitative nuclear magnetic resonance</i>
OD	optische Dichte
PE	Petrolether
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PLR	Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktase
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
RP-HPLC	<i>reversed-phase high pressure liquid chromatography</i>
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SDH	Secoisolariciresinolreduktase
TBAF	<i>tetra</i> -Butylammoniumfluorid
THF	Tetrahydrofuran
TEA	Triethylamin
TFE	2,2,2-Trifluorethanol

TNC	Trinuklearen Cluster
TAL	Tyrosin-Ammoniak-Lyase
VE	Valenzelektronen
CAD	Zimtalkoholdehydrogenase
C4H	Zimtsäure-4-hydroxylase

1 Zusammenfassung

Ein Großteil der pharmazeutischen Wirkstoffe sind Sekundärmetabolite verschiedenster Organismen oder von diesen abgeleitet. Die Isolation und Strukturaufklärung stellen dabei seit jeher die ersten Schritte in der Gewinnung neuer Pharmazeutika dar. Sind die nachgewiesenen Eigenschaften ausreichend vielversprechend, folgt meist die Entwicklung einer robusten chemischen Synthese zur großtechnischen Herstellung zur Vermeidung der Isolation aus dem Originalproduzenten. Die systematische Biotechnologie erweitert dabei die klassische chemische Synthese mit Reaktionsschritten die zuvor nicht möglich gewesen sind. Dies führt zu einer Verschiebung von „relativ“ einfachen organischen Molekülen zu immer komplexeren Systemen, deren Synthese erst durch Kombination von chemischer Synthese und Biotechnologie möglich ist. Die Lignane stellen eine solche Klasse an Sekundärmetaboliten dar. Aufgrund der komplexen, nur äußerst schwer herstellbaren chemischen Struktur ist ihr pharmazeutisches Potential trotz vielversprechender Eigenschaften nahezu unangetastet.

Die Arbeit gliedert sich in zwei Abschnitte. Zunächst wurden zwei robuste Synthesemethoden zur Herstellung verschiedener natürlicher und unnatürlicher Monolignole entwickelt. Die Synthesen starten dabei entweder von den Säurederivaten oder den jeweiligen Benzaldehyden und führen in 2-4 Schritten zu den gewünschten Monolignolalkoholen. Eine Reinigung der Zwischenprodukte stellte sich als nicht notwendig heraus. Mithilfe dieser Synthese konnten neun Alkohole (fünf natürliche und vier unnatürliche) in akzeptablen bis sehr guten Ausbeuten (13-96%) hergestellt werden. Die hergestellten Monolignolalkohole dienen teilweise als Referenzen zur biotechnologischen Produktion. Außerdem wurden zwei unnatürliche Zimtsäurederivate [Naphthylensäure (**1**) und 2-Nitroferulasäure (**2**)] zur biotechnologischen Reduktion durch einen modifizierten *E. coli*-Stamm hergestellt. Die Fähigkeit dieses Stammes diese sowie weitere Zimtsäurederivate zu den jeweiligen Alkoholen zu reduzieren wurde durch Dr. Jennifer Aschenbrenner untersucht. Für diese Experimente wurde ein *quantitative nuclear magnetic resonance* (qNMR) Analyseverfahren des Kulturüberstandes zur Bestimmung der Reduktionseffizienz entwickelt. Die Reduktion aller Monolignole wurde analytisch quantifiziert (0-90%) und im Falle des Coniferylalkohols eine präparative Isolation (62% Ausbeute) durchgeführt. Diese Ergebnisse wurden bereits im Rahmen des BioLiSy-Projektes publiziert.^[1]

Im zweiten Abschnitt wurde ein unnatürlicher Alkohol [5-Bromconiferylalkohol (**3**)] zum Lignan dimerisiert. Dazu wurden zunächst publizierte Bedingungen für Coniferylalkohol (**4**) reproduziert.^[2] Anschließend wurden verschiedene Versuche zur Optimierung der Bedingungen durchgeführt. Der Test verschiedener Laccasen zeigte deutliche Schwankungen in den produzierten Pinoresinolmengen, wobei sich die Laccase aus *T. versicolor* als klar überlegen herausstellte. Die Zugabe von fluoridierten Lösungsmitteln zur Vermeidung der Polymerisierung war dagegen nicht erfolgreich. Das optimierte System wurde zur Dimerisierung von 5-Bromconiferylalkohol (**3**) genutzt. Die Einführung des Brom-Substituenten führte dabei zur erwarteten Steigerung der Ausbeute des gewünschten Pinoresinolderivates **5**. Die Ausbeute konnte von 8% für Pinoresinol (**6**) auf 24% für das 5,5'-Dibrompinoresinol (**5**) gesteigert werden. Weitere Optimierungen wurden ebenfalls getestet. Die Einführung eines Zwei-Phasensystems führte zu einem kompletten Einbruch des Umsatzes. Tests mit Cyclodextrinen zur Steigerung der Produktmenge waren zwar erfolgreich, sind jedoch aufgrund des Kostenfaktors ohne Rückgewinnung nicht zu empfehlen.

Nach der Synthese des 5,5'-Dibrompinoresinol (**5**) sollte dieses über eine Palladiumkreuzkupplung derivatisiert werden. Nach zahlreichen Tests konnte eine erfolgreiche Suzuki-Kupplung mit Phenylboronsäure durchgeführt werden. Mithilfe dieses Protokolles konnten fünf Arylboronsäuren in guten bis sehr guten Ausbeuten gekuppelt werden. In fünf weiteren Fällen konnte kein Umsatz erreicht werden. Zusätzlich wurden erste erfolglose Tests mit Stannanen (Stille-Kupplung) sowie Amininen (Buchwald-Hartwig-Kupplung) unternommen.

Die Synthese eines Pinoresinolderivates war demnach erstmals erfolgreich. Das Selektivitätsproblem einer Laccase-initiierten Dimerisierung konnte durch Blockierung einer Position umgangen werden. Mithilfe der Suzuki-Kupplung konnten fünf weitere Derivate in sehr guten bis ausgezeichneten Ausbeuten hergestellt werden.

2 Abstract

The majority of pharmaceuticals are either secondary metabolites of various organisms or derivatives thereof. Isolation and structural elucidation are usually the first steps in the development of pharmaceuticals derived from secondary metabolites, which have shown positive in initial activity screening. If the biological activity of the isolated compound is promising enough, the development of a chemical total synthesis will be considered. A synthesis is generally preferred over an isolation from the natural producer due to yield per time constraints. In latter years the systematic usage of biotechnological methods has led to an increase in compound numbers and complexity. Biotechnologically engineered enzymes are able to catalyse reactions which are either very difficult to achieve using classical organic synthesis or outright impossible. This has led to a shift to more complex pharmaceuticals. A possible group of such complicated compounds are the lignans, secondary metabolites from plants. Due to their complex chemical structure their vast pharmaceutical potential remains yet to be developed.

This thesis is separated into two main parts. Two different methods for the synthesis of natural and non-natural monolignols were been developed. Starting materials were either the respective acid or benzaldehyde derivatives. Production of the monolignolic alcohol was achieved in 2-4 steps without the need for isolation of intermediates. Using these methods nine monolignols (five natural and four non-natural) were successfully synthesised in yields ranging from 13-96 %. The produced monolignolic alcohols were partly used as reference substances in this project. Additionally, two different non-natural cinnamic acid [Naphthyllic acid and 2-Nitroferulic acid (**2**)] derivatives were produced on a multi-gramm scale. The carboxylic acid of these compounds was reduced by an engineered *E. coli* strain as part of the BioLiSy project by Dr. Jennifer Aschenbrenner to the respective alcohol.^[3] The ability of this strain to produce any of the other seven monolignolic alcohols from their acid derivatives was also tested by Dr. Jennifer Aschenbrenner. For this, a qNMR system for the determination of the reduction efficiency was been developed. Consequently, the reduction of all alcohols was determined (0-90 %) and in case of coniferyl alcohol (**4**) a large-scale isolation was conducted (62 % yield). This marks the first time a *E. coli* strain was able to reduce different cinnamic acid derivatives. These results have been published.^[1]

In the second part of the thesis, a non-natural monolignolic alcohol [5-bromo coniferyl alcohol (**3**)] was dimerised to its pinoresinol derivative **5**. Initially, the reproduction of the conditions for the laccase initiated dimerisation of coniferyl alcohol (**4**) published by Pickel *et al.* was the main goal.^[2] After this was achieved, various optimisations were attempted. The examination of different laccases revealed significant differences in the production of the desired product pinoresinol (**6**). The commercially available laccase from *Trametes versicolor* was identified as the best candidate. The utilisation of fluorinated solvents to stabilise radicals during dimerisation was unsuccessful. The newly optimised system was then applied to the dimerisation of 5-bromo coniferyl alcohol (**3**). As anticipated the yield could be increased from 8 % for pinoresinol (**6**) to 24 % for the 5,5'-dibromo pinoresinol (**5**). Based on these results, additional optimisations were conducted. A two-phase solvent system during the dimerisation was not beneficial. No conversion to the product could be observed in this experiment. The addition of α -cyclodextrine to protect 5,5'-dibromo pinoresinol (**5**) against further oxidation lead to an increase of yield, but due to the associated costs further optimisation is required.

With the synthesis of 5,5'-dibromo pinosresinol (**5**), a derivatization of this compound was developed. The bromine substituent could be easily by a palladium cross coupling. Owing to its prevalence and robustness, the Suzuki reaction was chosen. After numerous optimisations, a successful coupling using phenyl boronic acid could be conducted in near quantitative yield (95%). Using this protocol, five additional aryl boronic acids could be coupled. Meanwhile tests with vinylic and alkylic boronic acids failed. Some initial experiments using stannanes and amines were also carried out, but failed to achieve similar results compared to the Suzuki reaction.

To summarise, a new pinosresinol derivative was synthesised. By blocking a position in the aromatic ring, the problematic regio-selectivity associated with laccase-initiated dimerisations was circumvented. Starting from this derivative **5** five additional products could be synthesised using the Suzuki reaction in high yields.

3 Einleitung

In diesem Kapitel soll zunächst eine Einführung in die Thematik gegeben werden, bevor im zweiten Teil die wissenschaftliche Aufgabenstellung erörtert wird.

3.1 Einführung

Sekundärmetabolite

Die enorme Vielfalt der Naturstoffe, von Lebewesen gebildete Stoffe, wird in zwei Klassen (Primär- und Sekundärmetabolite) eingeteilt. Die Primärmetabolite treten mit wenigen Ausnahmen in allen Lebewesen auf und werden für die essentiellen Prozesse des Lebens und Wachstums benötigt. Die Sekundärmetabolite stellen die sehr viel größere Gruppe an Naturstoffen dar, die nicht direkt an der Aufrechterhaltung des Lebens beteiligt sind. Sie werden aus Intermediaten des Primärstoffwechsels gebildet. Diese enge Verknüpfung macht eine Unterscheidung in Primär- und Sekundärstoffwechsel manchmal schwierig. Das mit der strikte Einteilung verbundene Ranking in vermeintlich lebensnotwendig und „zusätzliche“ Stoffwechselprozesse wird als veraltet angesehen. Dennoch besticht es mit seiner Verständlichkeit. Die Sekundärmetabolite sind häufig einzigartig für bestimmte Taxa der Lebewesen und sind verantwortlich für die Vielfältigkeit des Lebens. Aufgrund ihrer der Funktion zur Erhöhung der biologischen Fitness eines Organismus produzierte ihr Studium eine Reihe von Produkten, die zum Beispiel unsere Lebensqualität signifikant erhöhten. Die systematische Analyse und Katalogisierung dieses umfangreichen Reservoirs seit dem Beginn des 19. Jahrhunderts führte zur Entwicklung einer Reihe von Methoden, die heute zum Standard in der organischen Synthese geworden sind. Allerdings ist dieses Potential keinesfalls ausgeschöpft. Bisher konnte trotz intensiver Forschung nur ein kleiner Teil der vermutlich Millionen umfassenden Klasse an Substanzen isoliert und studiert werden.^[4-6]

Sekundärmetabolite werden meist in vier Hauptgruppen eingeteilt:

1. Terpene

Terpene sind aus Isopentenylphosphat (IPP) Einheiten aufgebaut. Die Art der Verknüpfung (*head-to-head* oder *head-to-tail*) hat dabei entscheidenden Einfluss auf die Eigenschaften des resultierenden Oligo-Polymers. Nach der Verknüpfung folgt die Modifikation des nackten Kohlenstoffskeletts über Oxidationen, Reduktionen, Hydroxylierungen, Isomerisierungen oder der Verlust einzelner Kohlenstoffe. Dennoch ist meist das charakteristische Isoprenengerüst im funktionalen Naturstoff zu erkennen. Eine Unterteilung wird anhand der Anzahl an Isopreneinheiten vorgenommen. Die Bezeichnung setzt sich aus einer lateinischen bzw. griechischen Zahl und Terpen zusammen. Bei Terpenen die aus 9 oder mehr IPP-Einheiten bestehen spricht man schließlich von den Polyterpenen. Die gängigsten Terpene stellen dabei die Monoterpene (C₁₀-Körper), Sesquiterpene (C₁₅-Körper), Diterpene (C₂₀-Körper) und Triterpene (C₃₀-Körper). Terpene aus mehr als 8 IPP-Einheiten werden zu den Polyterpenen gezählt. Mono- bis Diterpene sind aufgrund ihres geringen Dampfdrucks häufig Botenstoffe. Größere Oligo- bzw. Polyterpene (>4

IPP-Einheiten) dienen häufig zur direkten oder indirekten Abwehr von Fressfeinden.^[7, 8]

2. Alkaloide

Alkaloide sind stickstoffhaltige, meist basische Naturstoffe mit pharmakologischer Aktivität. Die Alkaloide weisen die größte Diversität aller Sekundärmetabolite auf. Sie werden aus verschiedenen Aminosäuren gebildet. Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin und Histidin stellen dabei die häufigsten Startpunkte dar. Aufgrund der Funktion der ersten isolierten Alkaloide sind sie meist ausschließlich mit einer Verteidigung gegen Fressfeinde assoziiert. Allerdings stellen sie auch eine wichtige Gruppe von Phytohormonen dar. Ihre Verwendung reicht von Antibiotika (Chinine) zu Schmerzmitteln (Morphin, Codein) und stimulierenden Drogen (Coffein, Kokain oder Nikotin).^[9, 10]

3. Polyketide

Polyketide sind eine Klasse von Naturstoffen, die aus der Addition mehrerer Carboxylsäureeinheiten in Form von Acetyl-, Malonyl- oder Propionyl-CoA gebildet werden. Polyketide bilden eine strukturell stark verschieden sein. Wiederkehrende Elemente sind -Ketogruppen, aromatische Ringe mit meta-ständigen Hydroxylgruppen und Macrozyklen. Die primäre Funktionen der Polyketide stellt den Schutz vor Fraßfeinden und Nahrungskonkurrenten dar. Bekannte Gruppen sind dabei die Aflatoxine und Tetracycline. Ihre Verwendung beschränkt sich zumeist auf den pharmazeutischen Bereich (Antibiotika, Immunsuppressoren, Antikrebsmittel).^[11-15]

4. Phenylpropanoide

Das charakteristische Strukturelement der Phenylpropanoide ist die namensgebende Phenylgruppe. Sie werden aus den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin durch Deaminierung gewonnen. Die resultierenden Säuren werden weiter über Hydroxylierung, *O*-Methylierung und Reduktionen modifiziert. In Abhängigkeit von der Funktion können weitere Gruppen-spezifische Umsetzungen stattfinden. Die wichtigsten Untergruppen der Phenylpropanoide mit ihren Funktionen sind in siehe Tabelle 3.1 aufgeführt. Einzelne Phenylpropanoide wurden bereits vor der systematischen Erforschung als Geschmacksverstärker oder Farbstoffe genutzt. Aufgrund der Prävalenz von Lignin in Pflanzen stellen die Phenylpropanoide die häufigste Form der Sekundärmetabolite in der Natur dar.^[14]

Tabelle 3.1: Wichtigste Gruppen der Phenylpropanoide mit den jeweiligen Hauptfunktionen

Gruppe	Funktion
Lignin	Gerüstfunktion
Lignan	Verteidigung, Oxidativer Schutz
Suberine	Schutzfunktion
Flavonoide	Signalmoleküle (meist farbig), UV-Schutz
Coumarine	Verteidigung, UV-Schutz
Stilbene	Schutzfunktion, Phytohormone

Palladium-Kreuzkupplungen

Kreuzkupplungen stellen Reaktionen von Organometallverbindungen mit organischen Elektrophilen in Anwesenheit von Übergangsmetallen der Gruppen 8-10 dar. Die Reaktion resultiert zumeist in der Bildung einer neuen C-C Bindung, allerdings können auch Bindungen mit Heteroatomen wie z. B. C-N, C-O oder C-S gebildet werden. Die ersten Kupplungsreaktionen wurden mit Kupferacetylen bereits vor 150 Jahren durchgeführt.^[16, 17] Mit der Entwicklung der Ullmann-Reaktion 1901 begann die moderne Kupplungschemie. Die erstmalige Nutzung von Halogenen war dabei wegweisend für zukünftige Forschungsarbeiten.^[18] Zur selben Zeit brachte die Entdeckung der Grignard-Reaktion erstmalig eine relativ milde, selektive Reaktion hervor.^[19] Die größten Probleme, der stöchiometrische oder superstöchiometrische Einsatz des Metalls und die geringe Toleranz gegenüber chemischen Funktionalitäten, konnten allerdings auch diese neuen Methoden nicht lösen. Der substöchiometrische Einsatz von Metallen sowie die Kreuzkupplung (Kupplung zwischen unterschiedlichen Reaktionspartnern) gelang erstmals Kharasch in 1943.^[20] Die 1940er brachten auch eine Definition der drei grundlegenden Komponenten der metallkatalysierten Kreuzkupplungen hervor.

1. Verwendung eines Organohalogens als elektrophile Komponente
2. stöchiometrische Verwendung eines Organometalls als Kupplungspartner
3. Einsatz einer katalytischen Menge eines Übergangsmetalls

Die Entwicklung des Feldes nahm in den 1970er Jahren mit ersten Kupplungen zwischen Grignardverbindungen und Alkenyl- und Arylhalogenen in Anwesenheit von Nickel(II)phosphinkomplexen durch Corriu *et al.* und Kumada und Mitarbeitern Schwung auf.^[21, 22] Richard Heck gelang es 1972 erstmals, eine Kreuzkupplung mit Palladium ohne die Verwendung eines präfunktionalisierten Organometalls durchzuführen. Seine Kupplung von Iodbenzol und Styrol kam noch ohne die später charakteristischen Phosphinliganden aus.^[23] Aufgrund der höheren Selektivität der Palladiumkatalysatoren und der Abhängigkeit der Nickel-katalysierten Reaktionen von Grignardreagenzien verdrängten diese andere Katalysatoren nahezu vollständig aus dem Gebiet der Kreuzkupplungen.

1975 folgte die Kreuzkupplung zwischen Arylhalogenen und Alkinen durch Kenkichi Sonogashira. Dabei gelang es erstmals die Reaktion auch unter milden Bedingungen (Raumtemperatur) durchzuführen, was die Selektivität erhöhte.^[24] Die folgenden Jahre brachte weitere Kombinationen an Kupplungspaaren hervor. 1977 stellte Ei-ichi Negishi die Kreuzkupplung mit Hilfe von Zinkhalogenen vor. John Stille folgte 1978 mit der Kupplung zwischen Organostannanen und Arylhalogenen.^[25] 1979 konnte der nächste Durchbruch mit der Verwendung von Boronsäuren bzw. Boronsäureestern durch Miyaura und Suzuki erzielt werden. Klare Vorteile dabei sind die einfache Darstellung und langfristige Stabilität der Reaktanten. Die Palladium-Kreuzkupplungen zählen heute zu den bedeutendsten Reaktionen in der organischen Chemie. Gerechtfertigterweise wurden daher Richard F. Heck, Ei-ichi Negishi und Akira Suzuki für ihre Entwicklungen auf diesem Feld 2010 mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt.

3.2 Zielsetzung

Die Markteinführung neuer Wirkstoffe wie Antibiotika oder spezialisierter Antitumormedikamente gestaltet sich zunehmend schwierig. Äußerst kostspielige Entwicklungs- und Zulassungsverfahren, verbunden mit einer sinkenden Zahl forschender Unternehmen führt zu geringen Zahlen an Neuzulassungen. Immer noch hat ein Großteil der zugelassenen Präparate einen Naturstoffhintergrund. Die Zahl der neu erschlossenen Leitstrukturen, der pharmakologisch

wirksamen Kernstruktur, nimmt jedoch deutlich ab. Gleichzeitig steigt die Zahl der isolierten und identifizierten Naturstoffe jedes Jahr aufs neue. Viele Klassen wurden lange Zeit als zu komplex beurteilt, um sie kosteneffizient herstellen zu können. Mit dem zunehmend interdisziplinären Ansatz in der Herstellung, sowie große Entwicklungen in der Biotechnologie, rückt die Erschließung dieser Klassen jedoch zunehmend näher.^[26–29]

Das Ziel dieser Arbeit ist die Synthese und Untersuchung von Pinoresinolderivaten. Pinoresinol ist der wichtigste Vertreter der Klasse der Lignane. Lignane gehören zu den vielfältigsten Gruppen an Naturstoffen. Dennoch sind nur wenige auf ihnen basierende Pharmazeutika entwickelt worden. Seit der Aufklärung der Biosynthese nimmt jedoch das Interesse an ihnen signifikant zu. In der vorliegenden Arbeit sollte die Synthese durch eine Kombination von chemischen und enzymatisch katalysierten Schritten erfolgen. Startpunkt ist dabei ein Zimtsäurederivat. Durch die Wahl der Substituenten des Aromaten soll dabei die Selektivität nachfolgender Schritte erhöht werden.

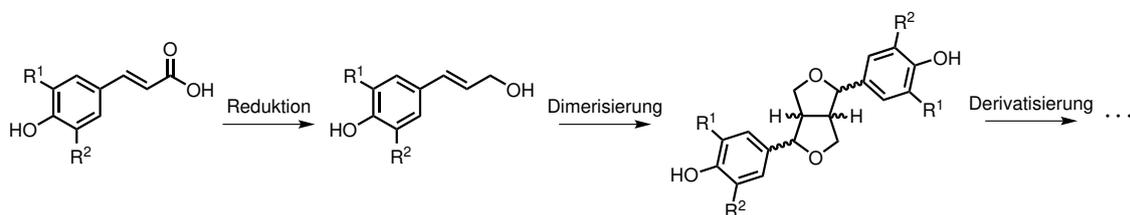


Abbildung 3.1: Synthesestrategie zur Herstellung von Pinoresinolderivaten

Nach der Etablierung einer Synthese soll eine Bibliothek an Derivaten zur Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung erzeugt werden. Entscheidend für die Erzeugung der Derivate ist die Verwendung einer robusten und vielseitigen Methode. Palladium-Kreuzkupplungen sind dafür besonders geeignet. Sie stellen eine flexible Klasse, mit hervorragenden Reaktivitäten, Selektivitäten sowie einer breiten Toleranz chemischer Gruppen dar, welche zur Erzeugung großer Substanzbibliotheken geeignet sind. Die Suzuki-Kupplung nimmt dabei aufgrund ihrer Vielseitigkeit und geringen Toxizität eine besondere Rolle ein. Sie ist eine der wenigen Reaktionen die auch großtechnisch mit relativ geringem Aufwand zu betreiben ist und stellt dabei einen idealen Startpunkt für die Derivatisierungen dar.

In einem Kooperationsprojekt soll der Transfer der chemischen Synthese in einen modifizierten *E. coli* Stamm getestet werden. Die Nutzung von Mikroorganismen in der Synthese von Pharmazeutika hat eine Reihe von Vorteilen. Enzyme sind oftmals in der Lage hochkomplizierte Reaktionen in exzellenten Ausbeuten und mit hoher Selektivität durchzuführen. Die Verwendung von teuren chemischen Katalysatoren wird vermieden, was sich positiv auf die Kosten eines Prozesses auswirkt. Von zunehmender Bedeutung wird auch die Umweltfreundlichkeit eines Prozesses. Auch dabei liegen die meisten enzymatischen Prozesse vor vergleichbaren chemischen. Bei der Entwicklung eines solchen Prozesses ist die Flexibilität des Systems ein entscheidender Faktor. Daher sollen eine Reihe verschiedener Zimtsäuren getestet werden. Da nicht alle kommerziell erhältlich sind sollen Synthesen zur Darstellung dieser, sowie benötigter Referenzsubstanzen, entwickelt werden.

4 Kenntnisstand

Im Kenntnisstand sollen nun die wichtigsten theoretischen Grundlagen der vorliegenden Arbeit vorgestellt werden. Sie werden chronologisch nach ihrem Auftreten in der Arbeit erläutert. Zunächst wird die Stoffklasse der Lignane als die Zielstruktur vorgestellt, gefolgt von den Enzymen, welche mit deren Synthese assoziiert sind. Als Letztes wird Suzuki-Kupplung beschrieben.

4.1 Lignan

Lignane sind polyphenolische Sekundärmetabolite aus der Gruppe der Phenylpropanoide. Sie werden nahezu ausschließlich von Landpflanzen gebildet, finden sich jedoch auch in anderen Taxa. In Pflanzen sind sie in allen Organen verbreitet und erfüllen eine Reihe verschiedener Funktionen. Sie werden meist durch radikalische Dimerisierung von Zimtalkoholderivaten (siehe Abbildung 4.1), den Monolignolen (**7**, **4** oder **8**), synthetisiert.^[30–32] Der Term Lignan wurde in den 1940er Jahren durch Haworth vorgeschlagen und bezeichnete ursprünglich nur die wichtigste Untergruppe (8-8' verknüpfte Dimere). Alle anderen Verknüpfungsformen wurden mit ähnlichen Termen (z.B.: Neolignan, Norlignan) bezeichnet.^[33] Aufgrund der Bedeutungszunahme dieser Gruppen wird in neuer Literatur wie auch in der vorliegenden Arbeit der Term Lignan für alle Verknüpfungsformen verwendet. Sofern notwendig, wird die genaue Verknüpfungsform spezifiziert.

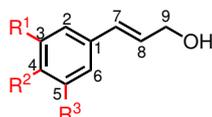


Abbildung 4.1: Zimtalkoholgrundstruktur (schwarz) mit möglichen Derivatisierungspositionen (rot). $R^{1,3} = H$ für Zimtalkohol (**9**). $R^{1,3} = -H, -OH, -OMe$ $R^2 = -OH$ für Zimtalkoholderivate. Cumaralkohol (**7**) $R^{1,3} = H, R^2 = OH$, Coniferylalkohol (**4**) $R^1 = OMe, R^2 = OH, R^3 = H$, Sinapylalkohol (**8**) $R^{1,3} = OMe, R^2 = OH$

4.1.1 Strukturen

Lignane sind aus den Monolignolen Cumaralkohol (**7**), Coniferylalkohol (**4**) und Sinapylalkohol (**8**) aufgebaut. Die Dimerisierung erfolgt in einem radikalischen Mechanismus, nach der Oxidation des 4'-Phenols. Aufgrund der hohen Reaktivität der Radikale ist eine Reihe verschiedener Verknüpfungsmöglichkeiten denkbar und auch in der Natur vorhanden. Mögliche Produkte, die auch in Lebewesen gefunden wurden, beinhalten 8-8', 8-1', 8-5', 8-O-4', 5-5', 3-O-4', 7-1', 1-5' und 2-O-3' Verknüpfungen. Aus dieser Vielfalt stechen die 8-8' Verknüpfungsformen heraus, sowohl was die Anzahl der Vertreter als auch die Bedeutung betrifft. Basierend auf der Struktur der Verknüpfung werden noch weitere Unterteilungen vorgenommen (siehe Abbildung 4.2).

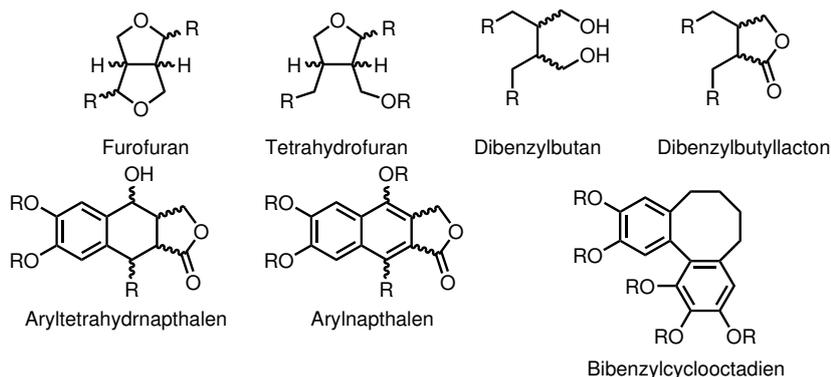


Abbildung 4.2: Klassifikation der 8-8' Verknüpfungen basierend auf der Struktur

4.1.2 Biosynthese

Die Biosynthese der Monolignolbausteine beginnt mit den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (**10**) oder Tyrosin (**11**). Eine Ammoniaklyase (Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) für Phenylalanin (**10**) und Tyrosin-Ammoniak-Lyase (TAL) für Tyrosin (**11**)) eliminiert die Aminofunktion (siehe Abbildung 4.3). *p*-Cumarsäure (**12**) entsteht durch Hydroxylierung der 4-Position der Zimtsäure (**13**). Die *p*-Cumarsäure (**12**) wird mit Coenzym A zum respektiven Thioester (**14**) umgesetzt. Eine Umesterung mit Shikimisäure oder Chinasäure ist notwendig für die Erkennung durch die *p*-Cumarat-3-hydroxylase (*p*C3H). Lange Zeit war nicht bekannt, welcher Ester die Edukte für Lignane bereitstellt oder ob es sich um einen redundanten Stoffwechselweg handelt. Erkenntnisse bei Niggeweg *et al.* legen jedoch nahe, dass Monolignole hauptsächlich aus dem Shikimisäureester gebildet werden.^[34] Die *p*C3H hydroxyliert die *p*-Cumarsäure (**12**) in 3-Position und erzeugt damit das jeweilige Kaffeoylderivat. Eine Umesterung mit Coenzym A resultiert im Kaffeesäure-CoA-ester (**15**). Manche Pflanzenfamilien haben eine direkte Hydroxylierung der *p*-Cumarsäure (**12**) zur Kaffeesäure durch eine Mutation in der *p*C3H entwickelt.^[35] Ausgehend von Thioester **15** kann eine Reihe Monolignole synthetisiert werden. Durch eine Reduktion zum Alkohol erhält man Kaffeealkohol (**16**). Nach einer *O*-Methylierung mit anschließender Reduktion erreicht man das wahrscheinlich häufigste Monolignol Coniferylalkohol (**4**). Durch eine weitere Hydroxylierung in 5-Position auf der Stufe von Coniferylalkohol (**4**) oder -aldehyd (**17**) erhält man 5-Hydroxyconiferylalkohol (**18**)/-aldehyd (**19**). Aufgrund der hohen Oxidationsempfindlichkeit durch die zusätzliche Hydroxylgruppe, wird diese sehr schnell methyliert. Dies führt entweder direkt oder nach Reduktion zum letzten Monolignolbaustein Sinapylalkohol (**8**). Verzweigungen führen zu anderen Gruppen der Phenylpropanoide wie den Stilbenen (ausgehend von Zimtsäure), Coumarinen (ausgehend von Cumarsäure) oder ähnliche.

Die eigentlichen Lignane werden anschließend aus der Dimerisierung der Monolignolbausteine gebildet. Die Dimerisierung wird durch eine ein-Elektronenoxidation initiiert. Laccasen sind die Enzyme der Wahl für diese Oxidation. Aufgrund der hohen Reaktivität der Radikale und der Delokalisierung des Radikals innerhalb des Moleküls können eine erhebliche Menge an verschiedenen Kupplungsprodukten gebildet werden. Dennoch sind aus Pflanzen isolierte Lignane optisch aktiv, was eine selektive Umsetzung zu einem Enantiomers erforderte. Lange Zeit konnten diese Ergebnisse nicht erklärt werden. In 1992 wurde erstmals ein Protein aus *Forsythia intermedia* isoliert, welches zur Anreicherung von (+)-Pinoresinol [(+)-**6**] im Produktgemisch führte.^[36] Diese neue Klasse von Enzymen wurde dirigierende Proteine (aus dem Lateinischen *dirigere* = ausrichten, leiten) getauft, da sie selbst keinerlei katalytische Aktivität aufwiesen, aber das Produktspektrum in Richtung eines Enantiomers verschoben. Bei der Un-

tersuchung dieser Proteine konnte gezeigt werden, dass sie die Radikale in extrem hoher Affinität binden und die Reaktion zum gewünschten Produkt durch die Orientierung erzwingen.^[37] Die Entdeckung beschränkte sich nicht nur auf die Bildung von (+)-Pinoresinol [(+)-**6**]. Innerhalb weniger Jahre konnten dirigierende Proteine nicht nur für das korrespondierende Enantiomer identifiziert werden,^[2] sondern auch in anderen Biosynthesewegen nachgewiesen werden.^[38] Genaue Untersuchungen zeigten, dass das dominante Enantiomer in Abhängigkeit vom dirigierenden Protein in verschiedenen Organen und zwischen Arten variieren kann. *In-vitro* Experimente zeigen jedoch, dass die hohe Enantiomerenreinheit der Lignane nicht allein durch die dirigierenden Proteine zustande kommen kann. Eine weitere Selektion muss daher in darauffolgenden Reaktionen erfolgen. Nach der Dimerisierung finden eine Reihe weiterer Modifikation am Lignan statt. Diese bestehen häufig aus zusätzlichen Reduktions- und Oxidationsschritten sowie Glykosylierungen. Die dafür verantwortlichen Reduktasen weisen eine hohe Enantioselektivität auf, was die weitere Anreicherung des gewünschten Enantiomers unterstützt.

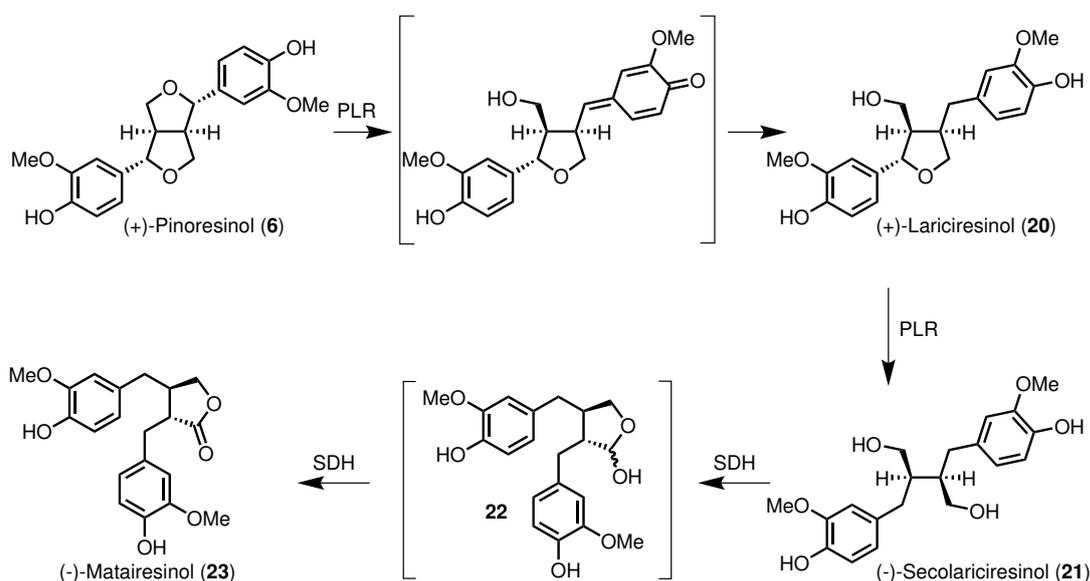


Abbildung 4.4: Beispiel zur Synthese von (-)-Matairesinol [(+)-**23**] aus (+)-Pinoresinol [(+)-**6**], PLR = Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktase, SDH = Secoisolariciresinolreduktase

Zunächst wird ein Tetrahydrofuranring des (+)-Pinoresinols [(+)-**6**] reduktiv unter dem Verbrauch von Nicotinamidadenindinukleotidphosphathydrid (NADP-H) geöffnet. Die verantwortlichen Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktasen (PLRs) weisen dabei eine sehr große Enantioselektivität auf. Ricklefs *et al.* zeigten erstmals die Anwendung einer PLR zur Anreicherung eines Enantiomers ohne die Verwendung eines dirigierenden Proteins.^[39] Das gebildete (+)-Lariciresinol [(+)-**20**] wird anschließend erneut durch dieselbe PLR zum (-)-Secoisolariciresinol [(+)-**21**] reduziert. Durch eine Oxidation mit anschließendem Ringschluss einer der C-9 Alkoholfunktionen wird zunächst das Lactol **22** gebildet. Als Oxidationsmittel dient dabei ein Äquivalent Nicotinamidadenindinukleotid (NAD). Die Reaktion wird von der Secoisolariciresinolreduktase (SDH) katalysiert. Eine weitere Reduktion, welche ebenfalls durch die SDH katalysiert wird, führt zu (-)-Matairesinol [(+)-**23**] (siehe Abbildung 4.4). Von (-)-Matairesinol [(+)-**23**] ausgehend wird der Rest der 8-8'-verknüpfter Lignane produziert [z.B.: Podophyllotoxin (**24**) siehe Kapitel 4.1.4].

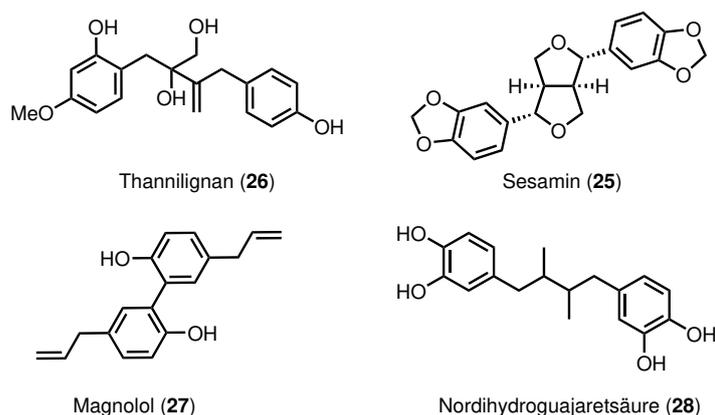


Abbildung 4.5: Zusammenstellung antioxidativer, antimykotischer und antibakterieller Lignane. Lignane mit antioxidativer Wirkung: Sesamin (**25**) Lignane mit antimykotischer Wirkung: Thannilignan (**26**), Magnolol (**27**) und Nordihydroguajaretsäure (**28**) Lignane mit antibakterieller Wirkung: Magnolol (**27**) und Nordihydroguajaretsäure (**28**).

4.1.3 Biologische Funktion

4.1.3.1 Pflanzen

Lignane erfüllen eine Reihe verschiedener Funktionen in Pflanzen. Der Schutz gegenüber verschiedenen Risikofaktoren (z.B.: oxidativem Stress, Fraßfeinde oder Pathogene) stellt dabei die Hauptfunktion dar. Sesamin (**25**) aus *Sesamum indicum* ist ein bekanntes Beispiel für die antioxidativen Eigenschaften. In Form von Sesamöl findet es vielfach Anwendung in der Körperpflege oder als Speiseöl in verschiedenen asiatischen Ländern. Auch wenn viele der ihm zugeschriebenen Eigenschaften nicht wissenschaftlich belegt sind, so ist ein positiver Effekt auch wissenschaftlich nachgewiesen worden.^[40] Neben seiner Rolle als Startpunkt des Lignansynthesewegs wurde Pinoresinol (**6**) auch eine Reihe antimikrobieller Funktionen nachgewiesen. Eine antimykotische Wirkung ist für viele Lignane belegt. (-)-Matairesinol [(-)-**23**] in *Picea abies* besitzt eine fungizide Wirkung gegenüber *Fomes annosus*. Termilignan und (-)-Thannilignan [(-)-(**26**)] konnten in *Terminalia bellirica* nach einer Infektion mit *Penicillium expansum* nachgewiesen werden. Die minimale inhibitorische Konzentration (MIC) betrug dabei nur 1 bzw. 2 µg Lignan (siehe Abbildung 4.5).^[41] Viele Lignane weisen zusätzlich zur fungiziden auch eine antibakterielle Wirkung auf. Dazu gehört Magnolol (**27**) aus *Melissa officinalis* oder *M. grandiflora*. Magnolol (**27**) wurde Aktivität gegenüber *Aspergillus niger* (30 µg/mL), sowie gegenüber *Staphylococcus aureus* und *Bacillus subtilis* (5-10 µg/mL) nachgewiesen. Nordihydroguajaretsäure (**28**) konnte ebenfalls erfolgreich gegenüber verschiedenen *Salmonella spp.*, *Streptococcus pyrogenes*, *Saccharomyces cerevisiae* und verschiedenen *Penicillium spp.* getestet werden.^[42, 43]

Beispiele für Lignane mit insektizider Wirkung sind äußerst weit verbreitet. (+)-Haedoxon A [(+)-**29**] aus *Phryma leptostachya* bewirkt eine Muskelrelaxation bei Schmetterlings- und Fliegenlarven, die zur Paralyse und Tod der Larve führen kann.^[44] Licarin B (**30**), ein 8-5' verknüpftes Lignan aus *Myristica fragans*, wurde erfolgreich gegen das Larvenstadium des Seidenspinners *Bombyx mori* getestet. Magnolol (**27**) weist neben den bereits beschriebenen Aktivitäten auch eine toxische Wirkung gegenüber Mosquitolarven auf.^[45] Cannabisin B/C (**31**)/(**32**) zeigen eine ähnliche Wirkung gegenüber Arbeitern der Spezies *Reticulitermes speratus* (Termiten).^[46]

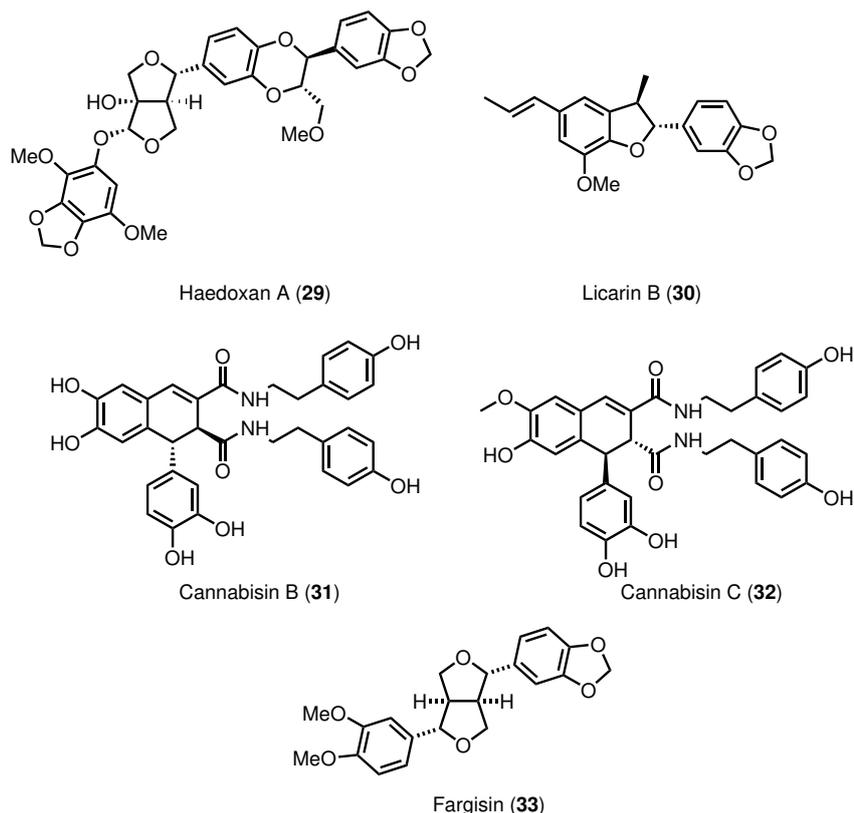


Abbildung 4.6: Zusammenstellung verschiedener Lignane mit insektizider (**29**, **30**, **31**, **32**) oder allelopathischer (**33**) Wirkung.

Die Lignane sind allerdings nicht zwangsweise toxisch. Die molekularen Targets sind genauso vielfältig wie die Struktur der Lignane. (+)-Sesamin [(+)-**25**] hemmt das Wachstum des Seidenpflanzenschädling *Oncopeltus fasciatus* (Milchkrautwanze).^[47] (-)-Matairesinol [(-)-**23**] inhibiert die Entwicklung des Kartoffelzystennematoden *Globodera rostochienis* (siehe Abbildung 4.6).^[48]

Die Rolle der Lignane erstreckt sich auch in das Feld der Phytohormone. Eine allelopathische (inhibitorische) Wirkung wurde auch gegenüber anderen Pflanzen nachgewiesen. Nordihydroguajaretsäure (**28**) inhibiert die Keimung/das Wachstum einer Reihe von Pflanzen.^[49] Fargisin (**33**) und Sesamin (**25**) inhibieren das Keimen von *Arachis hypogaea* (Erdnüssen) über eine Wechselwirkung mit dem Lipidstoffwechsel.^[50] Dehydrodiconiferylalkohol-Glucoside [(+) und (-)] stimulieren das Zellwachstum ähnlich wie das Zytokin Zeatinribosid.

4.1.3.2 Säugetiere

Säugetiere synthetisieren keine eigenen Lignane, da ihnen der Phenylpropanoidstoffwechsel fehlt. Stattdessen werden mit der Nahrung aufgenommene Lignane modifiziert. Beispiele für diese mammalen Lignane sind Enterolacton (**34**) und Enterodiol (**35**) (siehe Abbildung 4.7). Die Bildung dieser beiden Lignane erfolgt im Darm aus Matairesinol (**23**) oder Secoisolaricresinoldiglukosid durch Deglykosylierungen, Demethylierungen und Dehydroxylierungen über Bakterien.^[51] Ein hoher Gehalt dieser beiden Lignane ist mit einem geringeren Risiko gegenüber bestimmten Krebsarten assoziiert (siehe Kapitel 4.1.4). Eine Schädigung der Darmflora (z. B. durch Antibiotikaeinnahme) hat nachweislich einen negativen Effekt auf den Gehalt an Enterolacton (**34**) und Enterodiol (**35**), welcher noch bis zu einem Jahr nach Einnahme

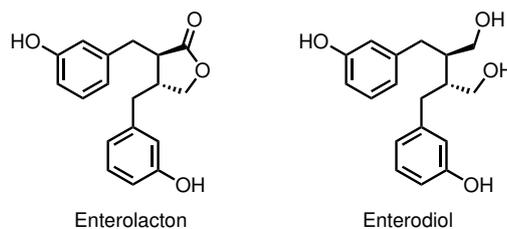


Abbildung 4.7: Mammale Lignane Enterolacton (**34**) und Enterodiol (**35**). Die Bildung aus Matairesinol (**23**) oder Secoisolariciresinol (**21**) findet im Darm durch Bakterien, mit anschließender Aufnahme über die Darmschleimhaut, statt.

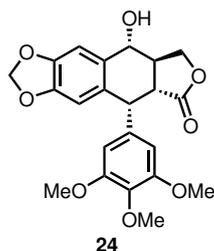
nachweisbar ist.^[52]

4.1.4 Pharmazeutische Nutzung

Das pharmazeutische Potential von Lignanene ist enorm.^[53] Eine Schwierigkeit ist die Quantifikation des Effekts der einzelnen Lignane auf Säugetiere, insbesondere den Menschen. Die Aufnahme kann durch eine Reihe von Quellen erfolgen, die eine große Vielfalt an Lignanene enthalten, deren Qualität und Quantität wiederum unter anderem von der Verarbeitung abhängt. Häufige Quellen von Lignanene sind Cerealien, Brot, Flachs-, Sesamsamen, Rot-, Rosenkohl, aber auch Tee, Kaffee und Wein. Hinzu kommt die Schwierigkeit, diese Lignane sowohl im Lebensmittel, als auch im Patienten nachzuweisen.

Dennoch können verschiedene Effekte *in-vitro* und *in-vivo* nachgewiesen werden. Als Extrakt werden sie in verschiedenen traditionellen Medikamenten verwendet.^[54–57] Mammale Lignane, wie Enterolacton und Enterodiol, reduzieren das Krebsrisiko für sexualhormonell induzierte Krebsarten (Brustkrebs, Prostatakrebs und Darmkrebs) in Menschen. Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit zu Östrogenen und Androgenen kann eine kompetitive Hemmung oder eine Konkurrenzsituation auftreten.^[58–61] Als Begründung dafür wurden unter anderem auch die antioxidativen Eigenschaften der Lignane postuliert.^[62] Neben präventiver Wirkung besonders gegenüber Brustkrebs konnten auch anti-cancerogene Effekte in *in-vitro* Studien belegt werden.^[63, 64] Studien aus verschiedenen Ländern zeigen eine positive Korrelation zwischen der Konzentration an Enterolacton (**34**) in Teilnehmern und einem reduzierten Risiko für das Auftreten eines akuten Koronarsyndroms (Verschluss/Verengung von Herzkranzgefäßen).^[65]

Anderen Lignanene konnten antiinflammatorische [Isolariciresinol, Pinoresinol (**6**)] oder blutgerinnende (Neojusticin A, Justicidin A/B) Wirkungen nachgewiesen werden.^[66–71] Trotz vielversprechender Aktivitäten stellt der Transfer in pharmazeutische Tests aufgrund der geringen Verfügbarkeit der Reinstoffe ein großes Problem dar. Eine Ausnahme von dieser Regel stellt das bekannteste Beispiel der Lignane Podophyllotoxin (**24**) dar (siehe Abbildung 4.8). Es wird zur Behandlung der von humanen Papillomaviren verursachten Feigwarzen sowie einiger spezieller Tumore (Wilms Tumore, Genitaltumore und malignen Lymphomen) eingesetzt.^[72–74] Podophyllotoxin (**24**) bindet an Tubulin und verhindert dadurch deren Polymerisation während der Zellteilung, was zur Nekrose der betroffenen Zellen führt.^[75] Ausgehend von Podophyllotoxin (**24**) konnten mehrere Derivate (Etopophos, Etoposid und Teniposid) hergestellt werden. Aufgrund der geringeren Toxizität können sie gegenüber einer größeren Anzahl an Tumoren verwendet werden. Die geänderte Toxizität hängt dabei mit einem Targetshift zur Inhibition der DNA Topoisomerase II zusammen, deren Inhibition zu Strangbrüchen, gefolgt vom Zelltod, führt.^[76]

Abbildung 4.8: Struktur von Podophyllotoxin (**24**)

4.2 Laccasen

Laccasen sind eine weit verbreitete Gruppe der Oxidoreduktasen (EC 1.10.3.2.). Erstmalig wurden sie 1883 aus dem japanischen Lackbaum *Rus vernicifera* isoliert, dem sie auch ihren Namen verdanken.^[77] In der Natur sind Laccasen in allen Domänen verbreitet. Besonders unter den Pflanzen und Pilzen findet sich eine Vielfalt verschiedener Laccasen, was mit ihrer Funktion im Auf- und Abbau von Makromolekülen wie zum Beispiel Lignin zusammenhängt. Lange Zeit wurde vermutet, dass sich ihre Verbreitung auf die Eukarya beschränkt, jedoch wurden mittlerweile auch prokaryotische Laccasen identifiziert. Ein bedeutender Unterschied zwischen Laccasen aus verschiedenen Taxa ist das Oxidationspotential. Laccasen aus Pflanzen und vielen Bakterien weisen mit bis zu 400 mV nur ein etwa halb so großes Potential auf, wie Laccasen aus Pilzen mit bis zu 780 mV. Sie katalysieren die Ein-Elektronen-Oxidation verschiedener organischer Substanzen oder metallischer Ionen bei gleichzeitiger Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser. Ihr aktives Zentrum, der Trinuklearen Cluster (TNC), enthält vier Kupferionen, weshalb sie zu den Multikupferenzymen gezählt werden. Pilzliche Laccasen sind Glykoproteine deren, Kohlenhydratanteil meist zwischen 10-45 % liegt. Ihre Unabhängigkeit von Cosubstraten und die geringe Substratspezifität macht sie interessant für eine großtechnische Anwendung. Ihr pH-Optimum liegt häufig im sauren bis schwach sauren Bereich. Jedoch konnten auch eine Reihe von Laccasen mit Optima im basischen Bereich charakterisiert werden.^[78–80]

4.2.1 Struktur

Laccasen sind Multidomänenproteine, die vermutlich im Verlauf der Evolution aus der Duplikation einer einzelnen Kupferbindenden-Domäne entstanden sind.^[81] Zunächst wird der am weitesten verbreitete Fall der drei-Domänen Laccase beschrieben. Die Drei-Domänen Laccasen waren lange Zeit der einzige bekannte Typus und sind dementsprechend besser erforscht.

Die einzelnen Domänen der Laccase bilden jeweils eine Cupredoxin-Falte. Die Cupredoxin-Falte ist eine *Greek-key barrel* Struktur. In einer *Greek-key barrel* Struktur formen mehrere β -Sheets ein Fass. Im Falle der Laccasen wird das *barrel* aus zwei β -Sheets mit jeweils vier Strängen gebildet (siehe Abbildung 4.9).^[82] Ein einzelstehendes Kupferion ist dabei in Domäne drei gebunden. Die anderen Kupferionen bilden einen TNC an der Schnittstelle der Domänen 1 und 3. Die Bindetasche für das zu oxidierende Substrat befindet sich in der Schnittstelle der Domänen 1 und 2 nahe des einzelnen Kupfers. Die Wechselwirkung mit dem Substrat findet dabei indirekt über einen Histidinrest statt. Die Reduktion des molekularen Sauerstoff läuft im TNC ab.^[83, 84] Vor kurzem wurden in Bakterien zwei verschiedene Arten kleinerer zwei-Domänen Laccasen gefunden. Diese liegen im Gegensatz zu ihren größeren Verwandten als funktionelle Homotrimere vor. In beiden Typen befindet sich der TNC an der Schnittstelle von Domäne 1 und 2 verschiedener Monomere. Sie unterscheiden sich jedoch in der Position

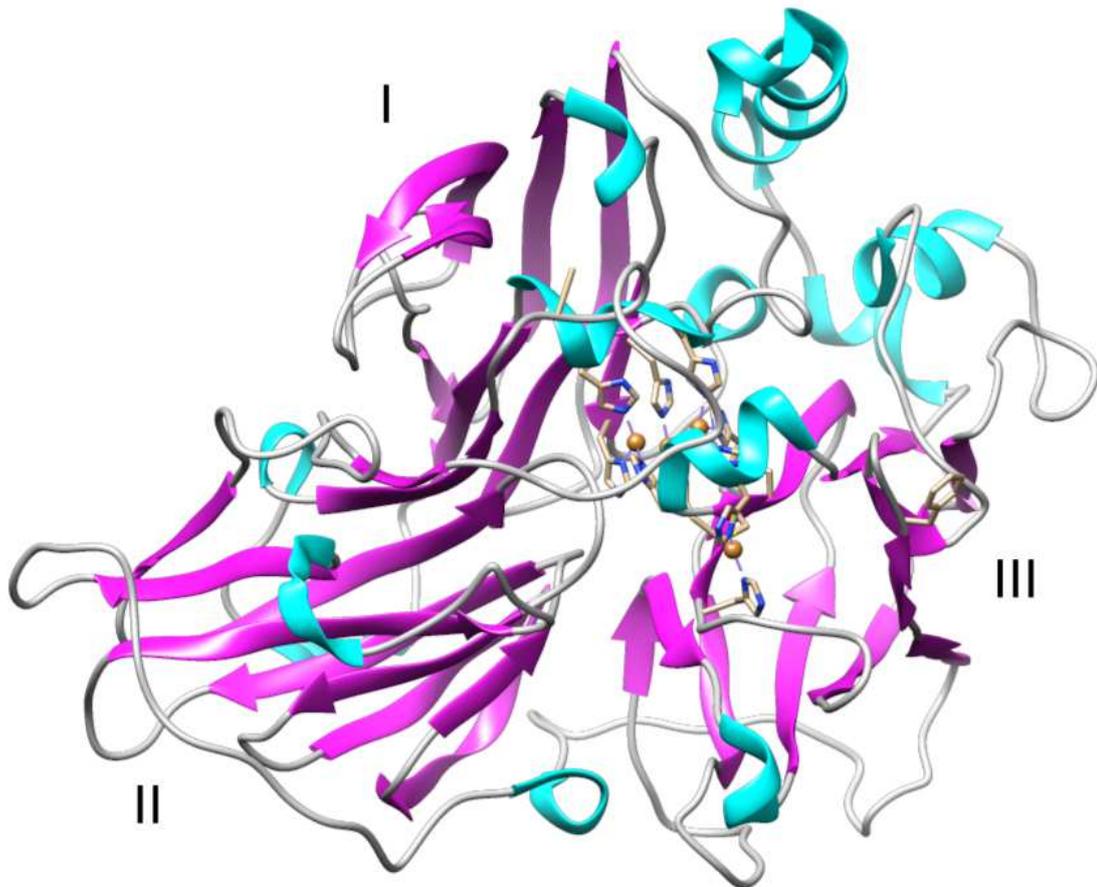


Abbildung 4.9: Dreidimensionale Darstellung der Sekundärstruktur der Laccase aus *Melanocarpus albomyces* einer drei-Domänen Laccase (1GW0), adaptiert nach Hakulinen *et al.* citeupHakulinen2015

der Substratbindetasche/-mulde und des einzelstehenden Kupfers. Im Typ A liegen diese in Domäne 1 und bei Typ B in Domäne 2 (siehe Abbildung 4.10).^[85–87]

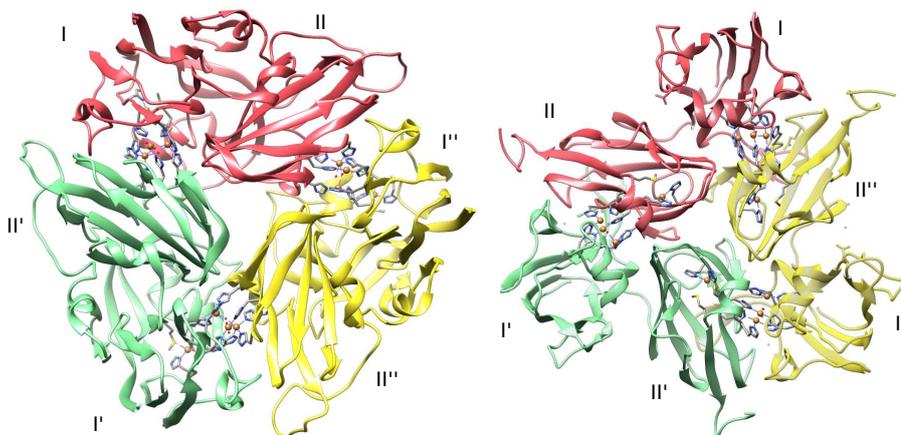


Abbildung 4.10: Dreidimensionale Darstellung der Sekundärstruktur zweier Zwei-Domänen Laccasen aus *Streptomyces coelicolor* (3CG8) und aus einem nicht näher identifizierten Organismus aus einer Metagenomstudie (4E9V).^[87]

4.2.1.1 Kupferzentrum

Die vier Kupferionen können in drei verschiedene Kategorien (T1, T2 und T3) eingeteilt werden. Die intensive Absorptionsbande bei 600 nm (blauer Spektralbereich) ist charakteristisch für das T1 Kupfer. Die blaue Farbe gibt den Laccasen auch den Beinamen *blue enzymes* und kommt durch die starke Bindung zu einer Cysteinseitenkette zustande. Als Ort der Substratoxidation weist es das höchste Oxidationspotential auf. Zwei Histidine sind ebenfalls als Liganden sehr stark konserviert. Ein wesentlicher Unterschied zwischen verschiedenen Organismen zeigt sich im letzten Liganden. In Pflanzen und vielen Bakterien nimmt Methionin diese Position ein, während sich in Pilzen meist ein Leucin oder Phenylalanin findet. Mutationsexperimente zeigten einen wesentlichen Einfluss des Liganden, auf das Oxidationspotential der Laccase. Der Einfluss verschiedener Liganden auf die Reaktivität von Metallkatalysatoren ist auch in der chemischen Katalyse entscheidend. Auf dem Gebiet der Kreuzkupplungen kann beispielsweise ein Wechsel des Phosphinligandens die Ausbeute um ein Vielfaches erhöhen oder senken. Ein Austausch des Liganden in pflanzlichen Laccasen führt zu einer starken Erhöhung des Oxidationspotentials.^[80, 88, 89] Die anderen Kupferionen bilden, wie erwähnt, einen TNC im Abstand von 13 Å zum T1 Cu. Das T2 Kupfer weist eine quadratisch planare Koordination auf. Es konnte ebenso wie das T1 Kupfer über sein spezifisches Signal im *electron paramagnetic resonance* (EPR) nachgewiesen werden. Eine Koordinationstelle zeigt ins Innere des Clusters und ist im Ruhezustand unbesetzt. Die beiden direkt benachbarten Positionen sind durch zwei Histidinreste besetzt. Die letzte Position wird durch ein Wassermolekül bzw. Hydroxidion eingenommen. Die beiden letzten Kupferionen gehören beide zum Typ 3. Sie weisen eine Absorptionsbande bei 330 nm auf. Aufgrund des Diamagnetismus sind beide Kupfer im EPR nicht sichtbar. Sie weisen eine trigonal bipyramidale Struktur auf (siehe Abbildung 4.11). Jeweils eine äquatoriale Position, die ins Innere des Clusters zeigt, ist unbesetzt. Zwei äquatoriale und die nach außen weisende axiale Position sind durch jeweils drei Histidinreste besetzt. Die verbleibende axiale Position wird im Ruhezustand durch ein von beiden gebundenes Hydroxidion gefüllt (μ -Hydroxobridge). Unabhängig vom Organismus sind die Aminosäuren des aktiven Zentrums sehr stark konserviert. Dies erlaubt es unbekannte Laccasen anhand der HXH-Sequenz der acht Histidine im TNC zu identifizieren.^[79, 90, 91]

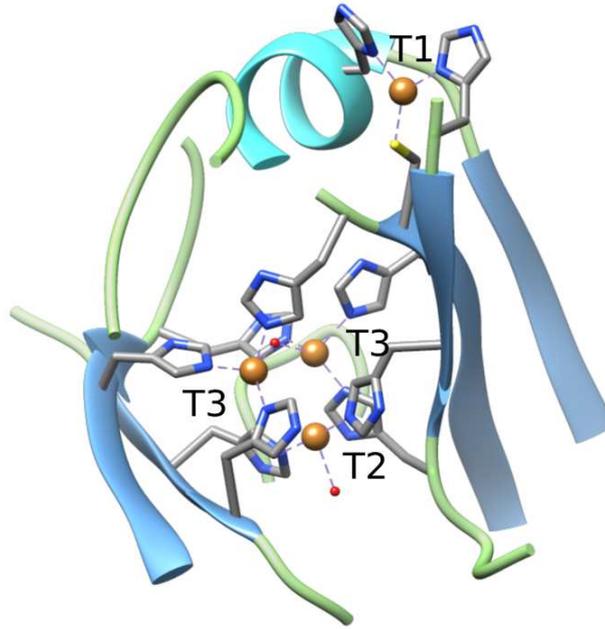


Abbildung 4.11: Dreidimensionale Verteilung der vier Kupferionen im aktiven Zentrum der Laccase aus *M. albomyces* (1GW0). mit den konservierten Aminosäureseitenketten

4.2.2 Mechanismus

Der Grundzustand der Laccase wird als *resting oxidized state* (*RO*) bezeichnet. Dabei sind alle vier Kupferionen oxidiert (=zweifach positiv) und zwischen den beiden T3 Kupfern ist ein Hydroxidion gebunden. Der Eintritt eines Substrates in die Bindetasche, gefolgt von dessen Oxidation, setzt den Katalysezyklus mit der Reduktion des T1 Kupfers in Bewegung. Röntgenkristallanalysen zeigen, dass das T1 Kupfer dabei nicht direkt mit dem Substrat interagiert. Der Kontakt wird durch ein Histidin vermittelt, welches das Kupfer koordiniert.^[84] Das dabei entstandene Substratradikal durchläuft weitere Reaktionen in Abhängigkeit der Funktion der Laccase (siehe Kapitel 4.2.3). Das aufgenommene Elektron wird über eine Reihe von Histidinen und Cysteinen an den TNC übertragen. Der Prozess wiederholt sich, bis mit der vollständigen Reduktion aller Kupferionen das reaktive *fully reduced intermediate* (*FR*) entsteht. Das Hydroxidion verlässt dabei nach der Aufnahme eines Protons als Wassermolekül, nach zwei Oxidationsschritten, den Cluster. Die genaue Reihenfolge der Elektronenaufnahme im TNC konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Die Aufnahme von Sauerstoff durch das *FR*, verbunden mit einer zwei-Elektronen Reduktion, führt zur Bildung des *peroxide intermediate* (*PI*). Das dabei entstandene Peroxid wird im Inneren des TNC durch eine Wechselwirkung mit allen Kupfern stabilisiert. Über Mutation der Histidine zu Glutaminen, welche nicht in der Lage sind Kupfer(II) zu binden, konnte nachgewiesen werden, dass die Elektronen des ersten Reduktionsschrittes vom T2 und T3_β Kupfer stammen. Beide Kupfer sind dabei über die Wechselwirkung mit einem negativ geladenen konservierten Aspartatrest (nicht dargestellt) aktiviert. Die Mutation des Aspartat zu einem ähnlichen ungeladenen Substituenten führt zu vollständigem Aktivitätsverlust, während der Austausch gegen Glutamat nur zu einer verminderten Aktivität führt. Die Bildung des *PI* stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reduktion dar. Die folgende reduktive Spaltung des Peroxids ist so schnell, dass der gesamte Prozess lange fälschlicherweise als vier-Elektronenreduktion angesehen wurde.^[92, 93] Die Spaltung der O-O Bindung im Peroxid wird durch den Elektronentransfer vom T1 Kupfer

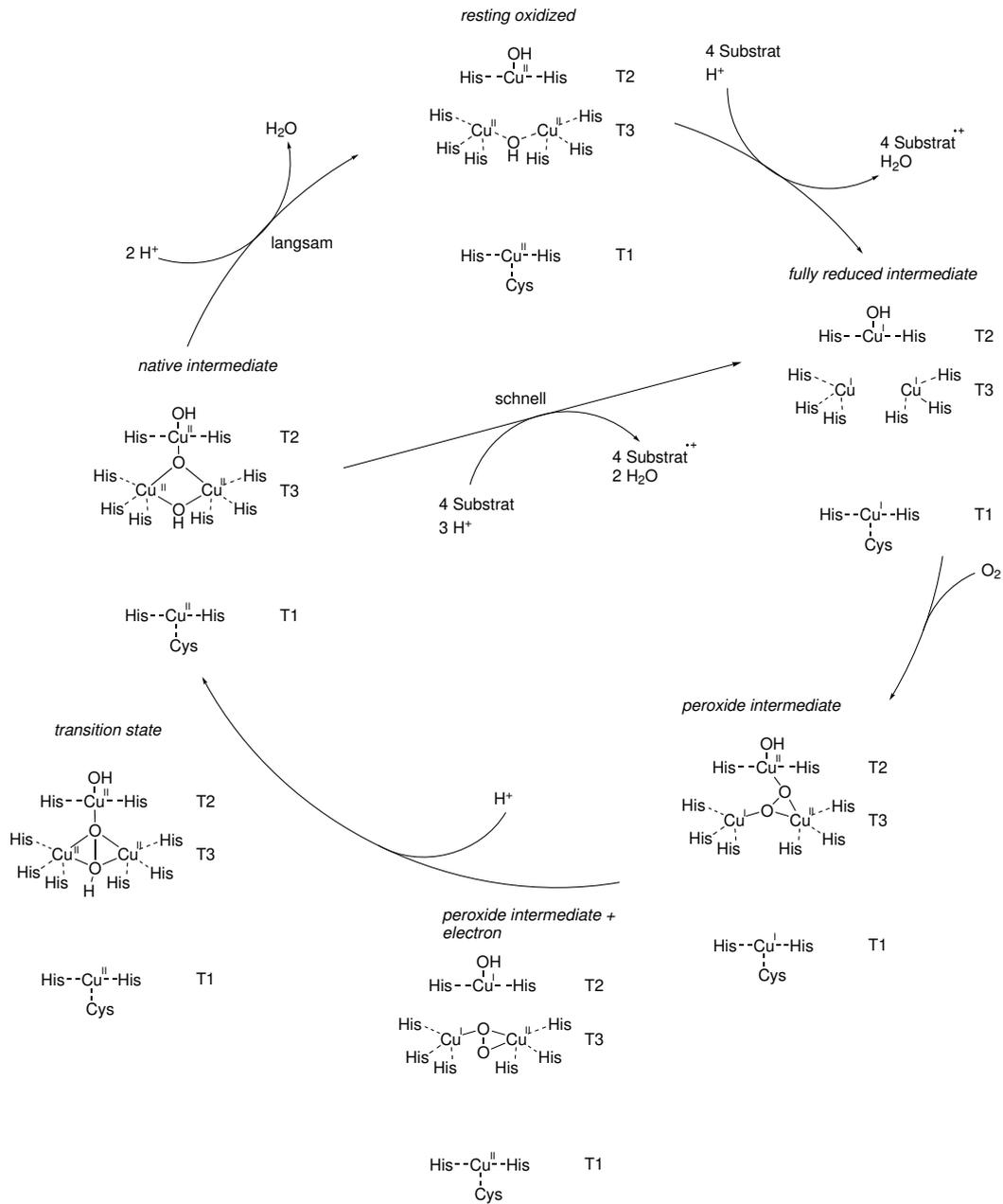


Abbildung 4.12: Darstellung des katalytischen Zyklus einer Laccase bestehend aus der ein-Elektronen Oxidation von vier Substratmolekülen verbunden mit der vier-Elektronenoxidation von molekularen Sauerstoff zu Wasser.

zum T2 Kupfer eingeleitet. Die Reduktion des T2 Kupfers führt zu einer Konformationsänderung des Peroxids, verbunden mit einem Brechen der Bindung zum T2 Kupfer. Das Peroxid shiftet zwischen die beiden T3 Kupfer. Diese Konformation wird als *PI+e* bezeichnet. Das Peroxid wird anschließend indirekt durch ein Glutamat protoniert. Die folgende Reduktion führt zur Spaltung des Peroxids und zur Bildung des *native intermediate (NI)*. Das *NI* bildet eine stabile Spezies, in der Sauerstoff bis zur Oxidationsstufe des Wassers reduziert ist. Die Sauerstoff-Atome sind dabei von allen Kupferionen im TNC gebunden. Eines ist bereits zum Hydroxid protoniert. Dichtefunktionaltheorie (DFT)-Rechnungen und Experimente konnten für diesen Reduktionsschritt noch einen alternativen möglichen Mechanismus nachweisen. In diesem Fall tritt die Spaltung des Peroxids vor dem Transfer des Protons auf. Berechnungen zeigten den Unterschied für die Aktivierungsenergien von nur 0.7 kcal/mol, was eine Festlegung auf einen Mechanismus ohne weitere Erkenntnisse verhindert. In Anwesenheit weiterer Substrate kann die Laccase unter Umgehung des *RO* direkt zum *FR* übergehen. Die gebundenen Sauerstoffe werden dabei nach Aufnahme von Protonen als Wasser abgegeben. In Abwesenheit geeigneter Substrate geht die Laccase langsam unter Freisetzung eines Sauerstoffes, nach doppelter Protonierung, in den *RO* über (siehe Abbildung 4.12).^[94, 95]

4.2.3 Funktion und Anwendung

Die Oxidation phenolischer organischer Moleküle ist die Hauptfunktion von Laccasen in Eukarya. Die entstehenden Radikale bauen über Di-, Oligo- und Polymerisierung essentielle Sekundärmetabolite wie Lignane und Lignin auf (siehe Kapitel 4.1). Der Kupplungspartner muss sich dabei nicht auf andere Radikale beschränken, sondern kann beispielsweise auch Proteine umfassen, wie bei der Sklerotisierung von Insekten oder der Bildung von Melanin in Pilzen und Tieren.^[79, 96–98] Für die oxidative Spaltung pflanzlicher Makromoleküle greifen Bakterien und Pilze unter anderem auf die Laccasen zurück. Aufgrund des sterischen Anspruchs kommen dabei häufig auch Mediatormoleküle zum Einsatz.^[99, 100] Laccasen sind auch in der Lage, aromatische Ringe zu spalten. Dies ermöglicht den Abbau der potentiell toxischen phenolischen Monomere aus Lignin oder anderen Quellen zu verwertbaren Kohlenstoffquellen.^[101] Die Oxidation von Metallen zur Entgiftung oder Bereitstellung als Nährstoff ist besonders bei bakteriellen Laccasen verbreitet.^[102]

Laccasen werden in verschiedensten industriellen Bereichen eingesetzt. In der Papierherstellung werden sie in der Sauerstoff-Delignifizierung verwendet und können dabei herkömmliche Oxidationsmittel ersetzen.^[103, 104] Ihre Fähigkeit zur Umsetzung aromatischer Substanzen wird zur Degradierung von Farbstoffen genutzt. Dies erzeugt zum Beispiel den sogenannten *used look* von Jeans.^[105, 106] Daneben können sie auch genutzt werden, um gezielt einzelne Farbstoffe aufzubauen.^[107, 108] Ihre Eigenschaft aromatische Systeme aufzubrechen macht Laccasen besonders interessant für die Reinigung von Abwasser. Der Abbau synthetischer Aromaten stellt übliche Reinigungsprozesse häufig vor große Probleme. Die relativ unspezifisch arbeitenden Laccasen sind in solchen Fällen willkommene Alternativen.^[101, 109, 110] Aufgrund ihrer Unabhängigkeit von Cosubstraten finden sie auch als Biosensoren in der Analytik Verwendung (Vermeidung eines häufig aufwendigen Cosubstratrecycling).^[105, 111, 112] Auch im akademischen Bereich finden die Laccasen in der Methodenentwicklung und Naturstoffsynthese Verwendung.^[113] Eines der ersten Beispiele ist die Synthese von Benzofuranen durch Hajdok *et al.*^[28] Wang *et al.* und Suljic *et al.* zeigten die Verwendung von Laccasen in C-C Bindungsknüpfungen. Dabei wurden erstmalig alkalophile Laccasen verwendet. Alkalophile Laccasen eröffnen über die basische Reaktionsumgebung neue Möglichkeiten, wie in diesem Fall die Kupplung arylischer Substrate.^[114–116]

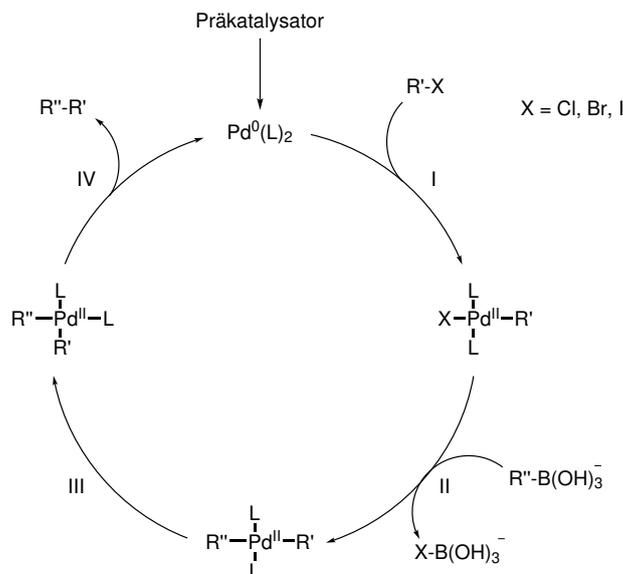


Abbildung 4.13: Grundlegender Reaktionszyklus einer Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung mit den vier wichtigsten Reaktionsschritten: I = Oxidative Addition, II = Transmetallierung, III = *cis/trans*-Isomerisierung, IV = Reduktive Eliminierung.

4.3 Suzuki-Kupplung

Nach der Vorstellung der Stoffklasse der Zielverbindung und der für die Synthese benötigten Enzyme der Laccasen folgt nun die Vorstellung der Suzuki-Kupplung als Methode der Wahl für die Derivatisierung.

Trotz erster Versuche bereits zu Beginn der 1970er Jahre konnte sich die Verwendung von Borverbindungen in Metall-katalysierten Kreuzkupplungen zunächst nicht durchsetzen. Die Elektrophilie des Bors, welche zu Nukleophilie umgepolt werden musste, verlangsamte die Entwicklung geeigneter Protokolle trotz vieler Vorteile von Borreagenzien. Erst die Zugabe von Basen und die Verwendung von Boronsäuren bzw. Boronsäureestern durch Miyaura und Suzuki ermöglichte die effiziente Kupplung mit Organohalogenen. Die nach ihnen benannte Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung (kurz: Suzuki-Kupplung) entwickelte sich schnell zur am weitesten verbreiteten Palladium-Kreuzkupplung. Die geringe Toxizität von Borverbindungen sowie der im Verlauf der Reaktion entstehenden Nebenprodukten und die einfache Herstellung stellten dabei die größten Vorteile gegenüber anderen Kupplungsreaktionen dar. Dies spiegelt sich in zahllosen Publikationen und Patenten, sowie wie bereits erwähnt in der Verleihung des Nobelpreises für Chemie 2010 wider.^[117–127]

4.3.1 Reaktionszyklus

Der Reaktionszyklus der meisten der palladiumkatalysierten Kreuzkupplungen gliedert sich in drei Schritte (oxidative Addition, Transmetallierung und reduktive Eliminierung). Die aktive Katalysatorspezies stellt üblicherweise eine zweifach koordinierte Palladium(0)-spezies [14 Valenzelektronen (VE)-Komplex] dar. Als Liganden finden meist verschiedene dreifach substituierte Phosphine Verwendung. Der sterische und elektronische Anspruch der Reste hat dabei einen bedeutenden Einfluss auf die Reaktivität des Katalysators. Seit 2002 finden sich auch zunehmend *N*-heterozyklische Carbene (NHC) als Liganden. NHC-Liganden sind weniger giftig als Phosphine, stabiler gegenüber Sauerstoff und zeigen eine höhere Aktivität. Aufgrund der höheren Kosten und schwierigeren Herstellung bzw. geringerer Verfügbarkeit konnten sie sich jedoch noch nicht allgemein durchsetzen.^[128, 129]

4.3.1.1 Katalysatoraktivierung

Palladium(0)katalysatoren stellen die aktive Spezies des Katalysators. Die gängigen Palladium(0)verbindungen sind tetra- oder biskoordiniert. In beiden Fällen kann es zu Problemen kommen. Im Falle der tetrakoordinierten Spezies muss ein Ligandenaustausch zur Bindung der Halogenverbindung stattfinden. Die dafür nötige Energiebarriere verlangsamt die Reaktion sehr stark. Biskoordinierte Palladium(0)katalysatoren sind äußerst oxidationsempfindlich. Aus diesem Grund wird die aktive Katalysatorspezies meist *in-situ* aus geeigneten Vorläuferverbindungen generiert. Palladium(II)verbindungen sind weit weniger oxidationsempfindlich. Über eine Reduktion des Palladiums wird die aktive Spezies generiert. Vier verschiedene Reduktionsmethoden haben sich in der Praxis durchgesetzt (siehe Abbildung 4.14).

1. **Doppelte Transmetallierung** des Palladium(II)katalysators gefolgt von einer reduktiven Eliminierung zur Generierung der aktiven Spezies und eines homogegekuppelten Produktes.
2. **Oxidation des Phosphinliganden** in Gegenwart von Wasser und sauerstoffhaltiger Base (z. B. Acetat). Als Nebenprodukt wird das jeweilige Phosphinoxid und eine protonierte Form der Base gebildet. Meist wird ein leichter Überschuss an Phosphinliganden zugegeben, um einen Mangel an Liganden durch die Bildung des Oxides zu vermeiden.
3. **Zugabe von Diboron** (z. B. B_2pin_2), welches mit dem Palladium(II)komplex reagiert.
4. **-Hydrid Eliminierung** von gebundenen Aminen (seltener Alkylgruppen oder Alkoxide) gefolgt von reduktiver Eliminierung.
5. **elektrochemische Reduktion** des Palladiumkatalysators mittels elektrochemischer Reaktion (kaum Anwendung aufgrund des hohen experimentellen Aufwands)

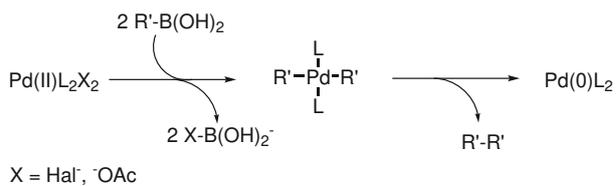
Nicht alle Palladium(0)katalysatoren sind derartig oxidationsempfindlich. Tetrakoordinierte Komplexe wie $Pd(PPh_3)_4$ sind aufgrund ihrer Verfügbarkeit meist die erste Wahl, wenn auf eine Reduktion verzichtet werden soll. Allerdings kann die Effizienz der Generierung der bisligierten, aktiven Spezies aufgrund der starken Metall-Liganden Bindung variieren. Zudem tritt eine signifikante Inaktivierung bei längerer Lagerzeit auf.^[133] Tris(dibenzylidenaceton)dipalladium(0) ist ebenfalls eine relativ stabile Lagerungsform für Palladium(0). Durch Zugabe von Phosphinliganden kann dieser den Liganden verdrängen und die aktive Spezies generieren. Die Aktivität ist dabei wieder stark von der Effizienz der Substitution abhängig.^[134]

4.3.1.2 Oxidative Addition

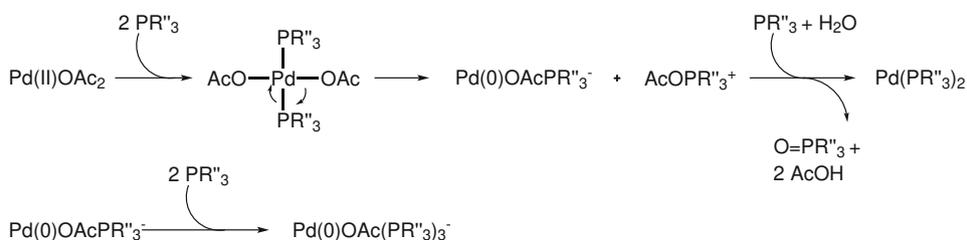
Bereits kurz nach der Entdeckung der Suzuki-Kupplung begann die Analyse des Reaktionsmechanismus. Die oxidative Addition stand dabei besonders im Fokus, da sie häufig den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Zyklus darstellt. Innerhalb weniger Jahre konnten eine Reihe verschiedener Faktoren identifiziert werden, welche die Reaktionsgeschwindigkeit positiv und negativ beeinflussen. Die Aktivierungsenergie sinkt mit steigendem Atomradius des Halogens. Zudem addieren elektronenarme Arylhalogene schneller als elektronenreiche. Der Hybridisierungsgrad des Kohlenstoffes sowie die Art eines möglichen π -Systems stehen ebenfalls in Korrelation zur Aktivierungsenergie (Alkyl Vinyl Aryl).^[135, 136]

Erste Studien sagten anhand dieser Erkenntnisse einen pentakoordinierten Palladiumkomplex als Intermediat voraus (siehe Abbildung 4.15 A).^[137] Derartige Palladiumkomplexe sind jedoch aufgrund ihrer Instabilität äußerst selten. Folgestudien belegten eine direkte Addition

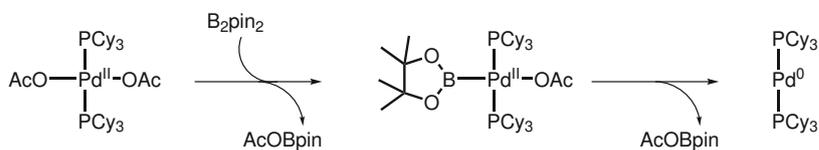
1) Doppelte Transmetallierung



2) Oxidation der Phosphinliganden



3) Reduktion mit Diboron



3) β -Hydrid Eliminierung

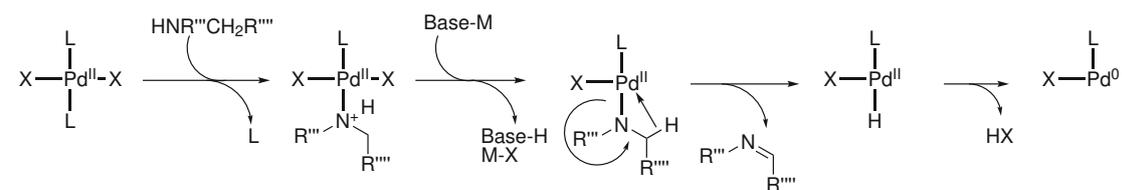


Abbildung 4.14: Mechanismen der vier häufigsten chemischen Reduktionsverfahren von Palladium(II) zu Palladium(0).^[130-132]

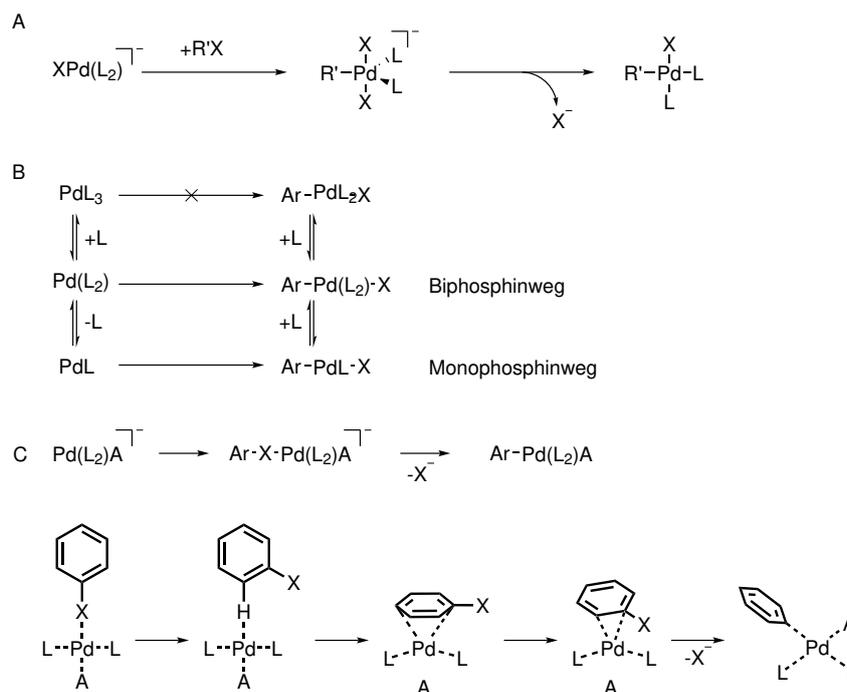


Abbildung 4.15: Mechanismen der oxidativen Addition. A Mechanismus mit pentakoordiniertem Palladium, B Additionsmechanismus an verschiedenanzahlige koordinierte Palladium(0)spezies, C Addition von Arylhalogenen an $[\text{Pd}(\text{L}_2)\text{A}]^-$ adaptiert nach Gooßen *et al.*^[142]

des Organohalogens an das zweifach koordinierte Palladium (siehe Abbildung 4.15 B Biphosphinweg). Es kommt dabei stets zur Bildung des kinetisch und thermodynamisch stabilen *trans*-Produktes.^[138] Mitchell *et al.* zeigten experimentell und mittels DFT-Rechnungen, dass eine Addition an den reaktiveren, einfach koordinierten Palladiumkatalysator ebenfalls möglich ist (Monophosphinweg). Der sterische Anspruch des Liganden verbunden mit der Labilität bestimmt maßgeblich die Aktivierungsenergie beider Reaktionswege. Eine Addition an ein dreifach koordiniertes Palladium wurde aufgrund der hohen Energiebarriere durch die sterische Hinderung als irrelevant eingestuft. Die Änderung des Koordinationszustandes benötigt nur wenig Energie, da die Palladium-Liganden-Bindung für Palladium (0) vergleichsweise schwach ist.^[139, 140]

1995 konnten Amatore *et al.* einen weiteren Reaktionsmechanismus in polaren Lösungsmitteln nachweisen.^[141] Sie konnten die Bildung eines dreifach koordinierten anionischen Palladium(0)-katalysators anstelle der üblichen $\text{Pd}(\text{L}_2)(0)$ -spezies zeigen. Der anionische Katalysator weist dabei eine veränderte Reaktivität in der Suzuki-Miyaura-Reaktion auf. Gooßen *et al.* konnten mithilfe von DFT-Rechnungen den Mechanismus aufklären. Im Laufe der Reaktion addiert das Organohalogen zunächst an den anionischen Komplex. Über verschiedene Intermediate kommt es zu einer π -Wechselwirkung des Palladiums mit dem Aromaten, bevor die Spaltung der Kohlenstoff-Halogenbindung auftritt. Das Verlassen des Komplexes durch das negativ geladene Halogen führt zur Bildung des Zwischenproduktes und leitet die Transmetallierung ein (siehe Abbildung 4.15 C).^[142]

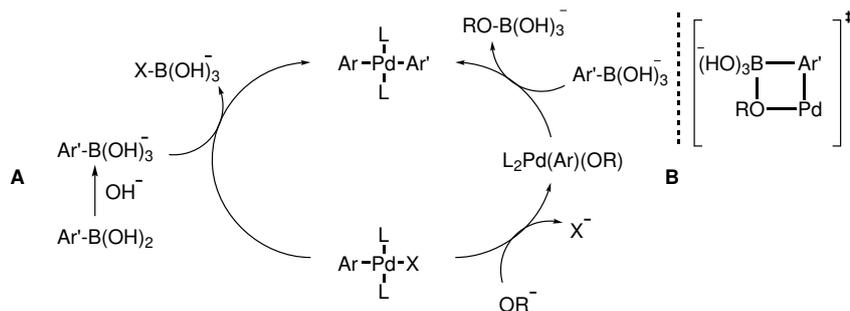


Abbildung 4.16: Postulierte Mechanismen der Transmetallierung: A Boronatmechanismus B Palladiumhydroxocomplex Mechanismus.

4.3.1.3 Transmetallierung

Die Transmetallierung blieb lange Zeit der am wenigsten verstandene der drei Reaktionsschritte. Aufgrund der starken Abhängigkeit von Reaktionsbedingungen und Reagenzien wurde die systematische Untersuchung erschwert. Zwei mögliche Reaktionswege wurden bereits 1979 postuliert (siehe Abbildung 4.16). Beiden liegt die Bildung einer vierbindigen Boronspezies für die Durchführung der Transmetallierung zugrunde. Der Unterschied in beiden liegt in der Rolle der Base bei der Bildung dieser Boronspezies. Der Boronatweg (Mechanismus A) geht von der direkten Bildung eines Boronates aus, welches dann die Transmetallierung einget. Dieser Mechanismus wurde zunächst auch durch Miyaura und Suzuki in ihrer Arbeit postuliert.^[143] Der Oxo-Palladiumweg (Mechanismus B) geht vom Austausch des am Palladium gebundenen Halogens gegen die Base aus. Das Metall reagiert anschließend als Lewis-Säure, was zu einem viergliedrigen Übergangszustand führt. Dieser Mechanismus gelangte erstmals 1985 in den Fokus, nachdem der Einsatz von Boronaten zu nicht erklärlichen geringeren Umsätzen führte.^[144] Beide Mechanismen konnten durch Experimente und theoretische Studien gestützt werden. Lange Zeit blieb die Frage des korrekten Mechanismus ungeklärt, auch, da ein direkter Vergleich beider Mechanismen selten blieb und eine starke Abhängigkeit von den verwendeten Reagenzien besteht.^[145, 146] Erste DFT Berechnungen konnten keinen Übergangszustand für den Austausch des Halogens gegen eine Base finden.^[118, 147] 2011 erschien eine Reihe von Publikationen, welche den Ablauf der Reaktion nach dem Oxo-Palladiummechanismus unter Standardbedingungen in theoretischen Studien und praktischen Versuchen bestätigten. Carrow *et al.* gelang es erstmals in einer systematischen Studie Geschwindigkeitskonstanten für beide Reaktionswege für dasselbe Substrat nachzuweisen. Dabei zeigten sie, dass die Reaktion über den Oxo-Palladiummechanismus etwa viermal so schnell ablief wie über den Boronatmechanismus.^[148, 149] Aufgrund des experimentellen Designs, bleiben allerdings folgende Einschränkungen:

1. Verwendung schwacher Basen (z. B. Carbonate, Phosphate)
2. Standardphosphinliganden (PPh_3 oder PCy_3)
3. Boronsäuren oder Boronsäureester als Substrate

Trotz dieser Einschränkung ermöglicht diese Arbeiten erstmals eine verlässliche, belastbare Voraussage des Reaktionsmechanismus der Transmetallierung.

4.3.1.4 *cis-trans*-Isomerisierung

Im Verlauf der oxidativen Addition wird stets der thermodynamisch und kinetisch stabilere *trans*-Komplex gebildet. Für die reduktive Eliminierung ist jedoch eine Isomerisierung

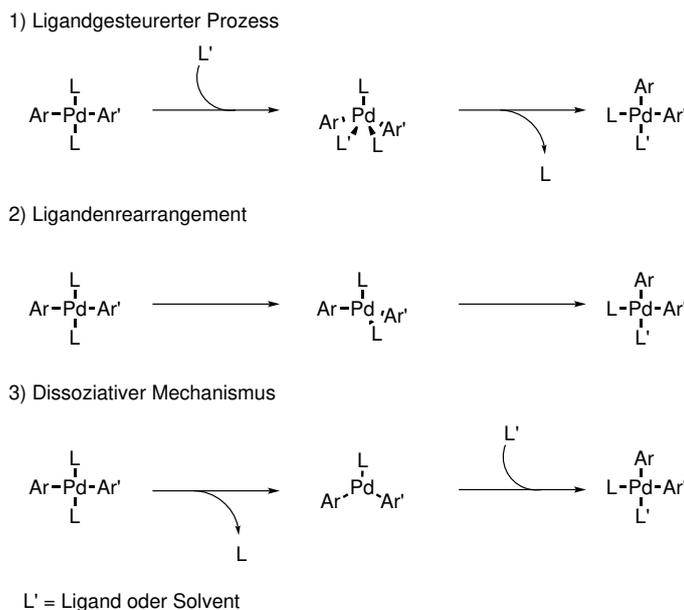


Abbildung 4.17: Mögliche Reaktionsmechanismen der *cis-trans*-Isomerisierung, adaptiert nach Xue *et al.*^[150]

zum *cis*-Komplex erforderlich. Der Energieunterschied zwischen beiden Komplexen beträgt normalerweise 5-10 kcal/mol. Für die Umwandlung der Komplexe sind drei verschiedene Mechanismen möglich (siehe Abbildung 4.17).

1. Ligandengesteuerter Prozess
Ein freier Ligand bzw. ein Solventmolekül koordiniert an das Palladium. Der entstandene pentakoordinierte Palladiumkomplex bildet dabei eine pyramidale Struktur aus. Durch die Dissoziation eines Liganden kommt es anschließend zur Bildung des tetrakoordinierten *cis*-Komplexes.
2. Ligandenrearrangement
Zunächst bildet sich ein tetraedrisches Intermediat, welches in den planaren *cis*-Komplex regiert
3. Dissoziativer Mechanismus
Ein Ligand dissoziiert unter Bildung eines trigonalen Intermediates. Die Bildung des *cis*-Komplexes erfolgt mit der Rekoordination des Liganden oder eines Solventmoleküls.

Die verschiedenen Mechanismen wurden im Hinblick auf ihre Aktivierungsenergie untersucht. Für den ligandengesteuerten Prozess 1 wurde eine Aktivierungsenergie von ca. 15 kcal/mol ermittelt. Die beiden anderen lagen mit 20 kcal/mol deutlich darüber. Dies liegt daran, dass ein tetraedrischer Übergangszustand für Palladium(II)komplexe energetisch extrem ungünstig ist und die Dissoziationsenergie für Palladium(II)komplexe deutlich über denen von Palladium(0)komplexen liegt.^[151-153] Diese Berechnungen konnten experimentell von Casado *et al.* bestätigt werden, wobei allerdings die genauen Werte abhängig vom Solvens, den Liganden und der Temperatur noch schwanken können.^[154]

4.3.1.5 Reduktive Eliminierung

Die reduktive Eliminierung ist der letzte Reaktionsschritt im Katalysezyklus. Im Gegensatz zu oxidativer Addition und Transmetallierung wurde die reduktive Eliminierung nur wenig

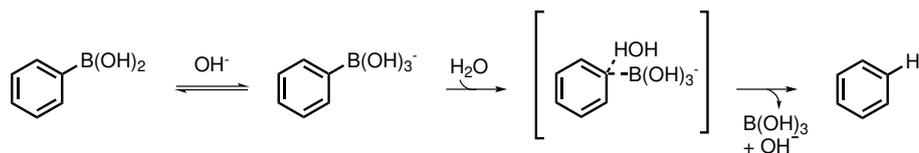


Abbildung 4.18: Die Substitution der Borgruppe in einer basisch katalysierten Protodeboronierung, als Nebenreaktion in einer Suzuki-Kreuzkupplung.

untersucht. Die geringe Aktivierungsenergie machte eine Optimierung meist unnötig und führte zu einem geringen Interesse an einer genaueren Untersuchung. Dennoch wurden einzelne Trends in gezielten Experimenten nachgewiesen. Ähnlich zur *cis-trans*-Isomerisierung hat der Hybridisierungsgrad einen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Arylreste werden am schnellsten eliminiert, gefolgt von Vinylresten und Alkylresten. Bei Untersuchungen mit verschiedenen Arylgruppen eliminierten solche mit elektronenschiebenden Gruppen langsamer als Aryle mit elektronenziehenden Substituenten.^[155]

Komplexe mit sterisch anspruchsvollen Liganden eliminieren signifikant schneller. Die Reduktion in der Koordinationszahl führt zu einem stärkeren Einfluss des sterischen Effektes bei den Edukten im Vergleich zum Übergangszustand oder den Produkten. Zweizählige Liganden reduzieren zusätzlich noch die Konkurrenzreaktion der β -Hydrideliminierung. Ähnlich wie bei den Reduktionspartnern sorgen elektronenschiebende Liganden für eine Verlangsamung der Eliminierung.^[156–158] Aus diesen Trends wurden zwei allgemeine vereinfachte Regeln für die reduktive Eliminierung abgeleitet.

1. Die reduktive Eliminierung von elektronenarmen Komplexen, aufgrund stark elektronenschiebender Liganden, ist schneller als bei elektronenreichen.
2. Elektronenziehende Reste stärken die Pd-C Bindung durch eine Erhöhung des ionischen Charakters und verlangsamen die Eliminierung.

4.3.1.6 Nebenreaktionen

Im Laufe der Suzuki-Kupplung kann es zu einer Reihe von Nebenreaktionen kommen, die zur Reduktion der Ausbeute beitragen. Die Optimierungen der Palladium-Kreuzkupplungen haben dazu beigetragen diese zu minimieren und die durchschnittliche Ausbeute der Kupplung von ca. 60 % auf über 90 % zu erhöhen. Eine mögliche Quelle für Nebenreaktionen stellt die Borverbindung selbst statt. Die ursprünglich verwendeten Organoborverbindungen sind anfällig für Oxidationen. Der Wechsel zu Boronsäuren als Substrate löste dieses Problem, wobei allerdings ein neues entstand. Bei der Umsetzung unter wasserfreien Bedingungen, muss die Bildung von Boroxinen vermieden werden. Unabhängig vom Startmaterial stellt die Protodeboration ein signifikantes Problem dar. Der Verlust der Borfunktion kann dabei über drei verschiedene Mechanismen katalysiert werden. Die basenkatalysierte Hydrolyse stellt für die Suzuki-Kupplung meist das größte Problem dar. Dabei kommt es zunächst zu einer Boronatbildung mit Hydroxidionen, welche dann in wässrigen Lösungen gegen ein Proton unter Regeneration des Hydroxids substituiert wird (siehe Abbildung 4.18).^[159] Andere Möglichkeiten sind eine säurenkatalysierte Spaltung oder mittels Katalyse durch Metallionen. Die Verwendung von Boronsäureestern bzw. Fluorboronatsalzen, welche die aktive Boronsäure langsam vor der Reaktion freisetzen umgeht diese Probleme weitestgehend.

Auch während des katalytischen Zyklus können Nebenreaktionen auftreten. Die beiden bedeutendsten sind die Homokupplung und die β -Hydrideliminierung. Die oxidative Homo-

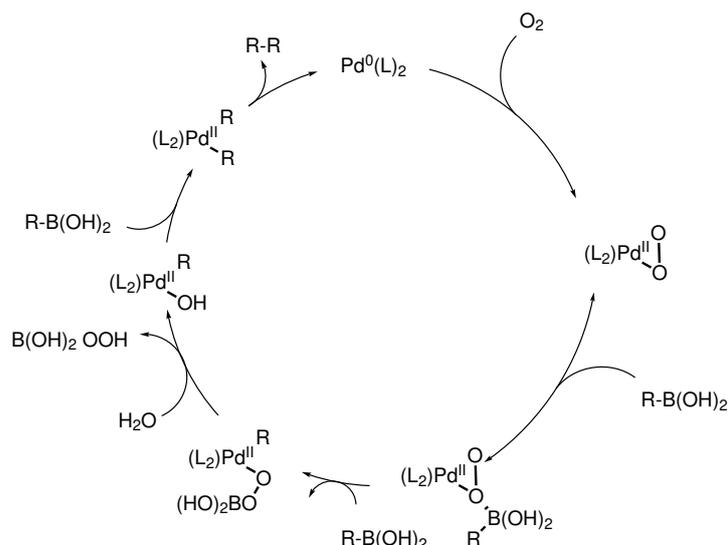


Abbildung 4.19: Der Reaktionszyklus der oxidativen Homokupplung zweier Boronsäuren unter Anwesenheit von Sauerstoff.

kupplung tritt bei unzureichender Entgasung auf. Sauerstoff addiert oxidativ an den Palladium(0)komplex. Dieser Palladiumperoxokomplex wird durch ein Äquivalent Boronsäure koordiniert. Ein weiteres Äquivalent reagiert in einer Transmetallierung mit dem aktivierten Komplex unter Bildung einer Peroxidboronsäure. Die Hydrolyse dieses Substituenten bildet einen Hydroxypalladiumkomplex, der eine weitere Transmetallierung mit einem zweiten Äquivalent Boronsäure eingeht. Nach Isomerisierung zum *cis*-Komplex findet die reduktive Eliminierung unter Bildung des homogekuppelten Produktes statt (siehe Abbildung 4.19).^[160, 161]

Die β -Hydrideliminierung kann vor und nach der Transmetallierung im Reaktionszyklus auftreten. Anstelle des folgenden Schrittes im katalytischen Zyklus findet eine Übertragung eines Hydrides in β -Position zur Palladium-Kohlenstoffbindung statt. Das neugebildete Alken bleibt zunächst über Metall- π -Wechselwirkungen mit dem Komplex assoziiert. Das Auftreten der β -Hydrideliminierung kann durch eine Optimierung des Katalysezyklus vermieden werden. Die Gefahr ist dabei für das Organohalogen aufgrund der längeren Verweildauer am Palladium höher als für die Borverbindung. Die Verwendung von Organohalogenen und Borverbindungen ohne geeignetes β -Hydrid ist, wenn möglich, die Methode der Wahl (siehe Abbildung 4.20).^[162]

4.3.2 Borverbindung

Eine Reihe von Borverbindungen sind für die Umsetzung in der Suzuki-Kupplung geeignet (siehe Abbildung 4.21 für Beispiele). Organoborane gehören zu den ursprünglichen Substraten, die von Suzuki und Mitarbeitern verwendet wurden. Aufgrund ihrer geringeren Stabilität und des höheren Aufwands in der Darstellung wurden sie sehr schnell durch andere Borverbindungen abgelöst.^[159, 163] Boronsäuren sind die am weitesten verbreiteten Substrate für die Suzuki-Kupplung. Sie sind stabiler gegenüber Oxidation als die Organoborane, können über eine Vielzahl an Methoden hergestellt werden und besitzen eine höhere Aktivität in der Transmetallierung. Viele Boronsäuren sind zudem im Kilogrammmaßstab kommerziell erhältlich. Eine noch höhere Stabilität besitzen die Boronsäureester. Im Gegensatz zu Boronsäuren können die jeweiligen Ester meist bei Raumtemperatur (= *bench stable*) gelagert werden. Die-

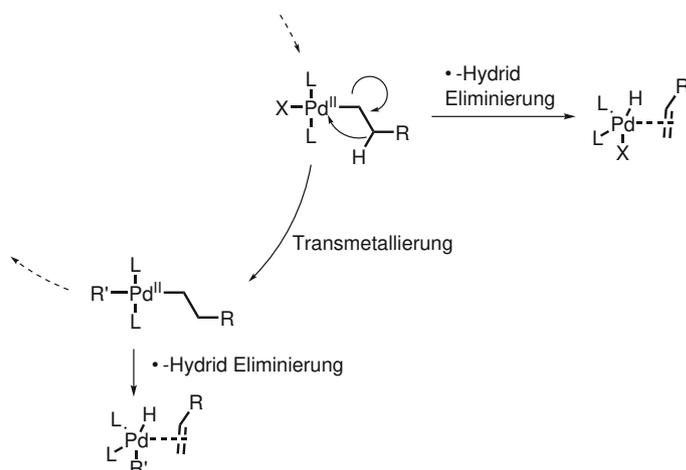


Abbildung 4.20: Die Nebenreaktion der β -Hydrideliminierung, welche vor oder nach der Transmetallierung im Reaktionszyklus auftreten kann.

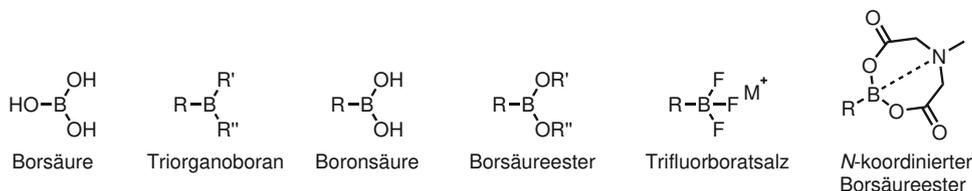


Abbildung 4.21: Wichtige Borverbindungen für die Suzuki-Kreuzkupplung.

se höhere Stabilität geht allerdings auch mit einer geringeren Aktivität einher. Die Zugabe von Wasser ist bei der Verwendung vielfach notwendig, was eine Hydrolyse und Reaktion über die Boronsäure nahelegt.^[164-167] Trifluorboratsalze gehören zu den neuesten Substraten für die Suzuki-Kreuzkupplung. Die hohe Stabilität verbunden mit einer den Boronsäuren überlegenen Aktivität trägt zu ihrer raschen Verbreitung in der wissenschaftlichen Forschung bei. Ihre Verwendung erfordert ein protisches Lösungsmittel, üblicherweise Wasser, zur Auflösung des tetraedrischen Komplexes. Ihre höhere Aktivität wird auf die dabei entstehende Hydroxy/Fluoro-Verbindung zurückgeführt. Die langsame Freisetzung der Boronsäure unter Reaktionsbedingungen trägt wie bei den Boronsäureestern hauptsächlich zur erhöhten Stabilität bei.^[168, 169] Die letzte bedeutende Gruppe der Borverbindungen sind die N-koordinierten Boronate. Durch die intramolekulare Komplexierung des freien p-Orbitales durch das freie Elektronenpaar des Stickstoffes wird eine äußerst stabile Spezies gebildet. Derartige Verbindungen sind aufgrund ihrer hohen Hydrolysestabilität praktisch unbegrenzt lagerbar. Unter den basischen Bedingungen der Suzuki-Kreuzkupplung tritt eine langsame Freisetzung der Borsäure ein. Innerhalb der Gruppe sind die N-Methyliminodiessigsäure (MIDA)-Komplexe aufgrund ihrer überlegenen Stabilität und Verfügbarkeit am bedeutendsten.^[170]

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Synthese von Monolignolreferenzen

Als Startpunkt jeder Lignansynthese steht die Darstellung des zu dimerisierenden Monolignols. In früheren Fällen wurde sich meist auf Coniferylalkohol (**4**) als Vorgänger des Pinorensinols (**6**) konzentriert.^[2, 171] Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Etablierung einer flexiblen Synthese, die die Darstellung verschiedener Monolignole ermöglicht. Dafür sollte sie möglichst einfach und robust gehalten werden. Idealerweise sollten alle Lignane mit nur geringfügigen Modifikationen der einzelnen Schritte herstellbar sein. Dazu wurden zwei Methoden entwickelt und getestet.

5.1.1 Synthesemethode A

Die Synthese A sollte dabei vom Säurederivat ausgehen und dieses zum Alkohol reduzieren. Als Modellsubstrat für diese Methode wurde die Ferulasäure (**36**) gewählt, da sie relativ günstig zu erwerben ist und alle chemischen Gruppen aufweist, welche die natürlichen Monolignole kennzeichnen. Die Säure **36** wurde zunächst mit Ethanol verestert. Die Zugabe einer katalytischen Menge an Schwefelsäure ermöglichte die Umsetzung mittels Mikrowelle unter leichtem Überdruck. Das Produkt **37** kristallisierte in sauberer Form nach einer Reduktion des Volumens auf ca. 60 % aus. Die Ausbeute dabei war quantitativ. Dies stellte einen Vorteil gegenüber anderen Synthesen dar, die entweder zusätzliche Schritte mit dementsprechend schlechterer Atomökonomie oder eine deutlich längere Reaktionszeit aufweisen.^[172] Die Reduktion erfolgte direkt nach der Isolation des Esters **37** ohne weiteren Reinigungsschritt. Für die Reduktion wurde Diisobutylaluminiumhydrid (DiBAI-H) dem billigeren LiAlH₄ vorgezogen, da es eine Reihe von Vorteilen bot:

- 1 genaue Dosierung der Reduktionsäquivalente
- 2 weniger Nebenreaktionen

Der Alkohol **4** konnte nach der Aufarbeitung aus der organischen Phase als weißlich-gelblicher Feststoff in 72-96 % Ausbeute erhalten werden. Eine unvollständige Reduktion zum Aldehyd **17** trat nicht auf. Dies war aufgrund des Reaktionsmechanismus zu erwarten (siehe

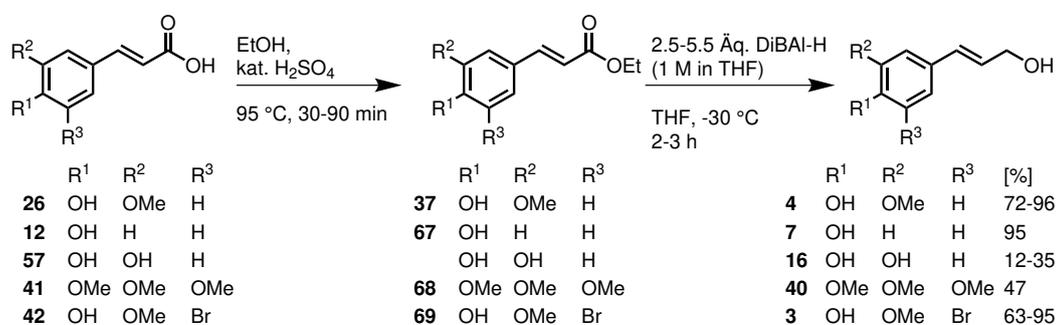


Abbildung 5.1: Synthesestrategie zur Herstellung von Monolignolreferenzen aus kommerziell erhältlichen Säurederivaten

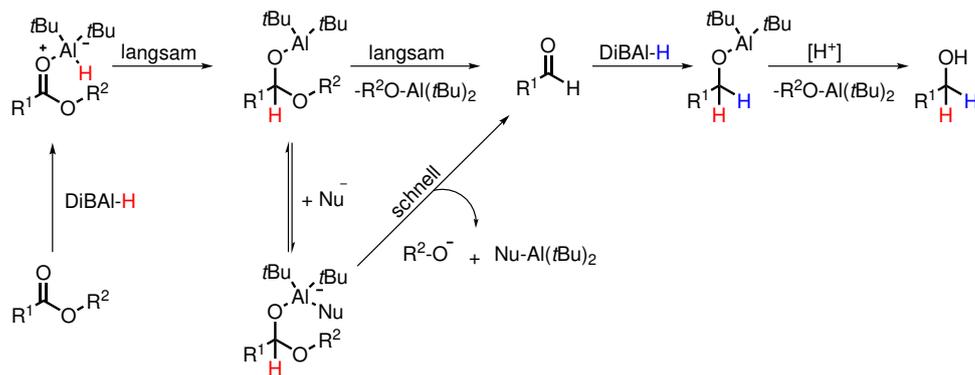


Abbildung 5.2: Mechanismus der Reduktion von Estern mit DiBAL-H. Adaptiert nach [173]

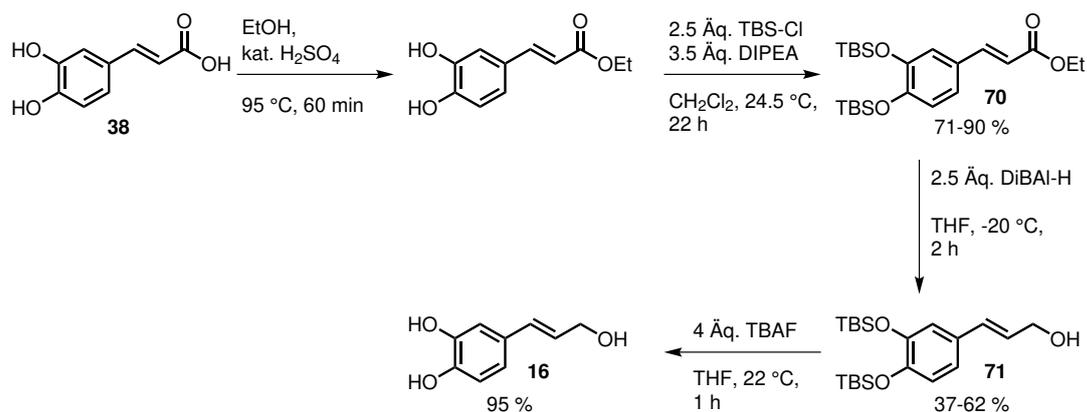
Abbildung 5.3: Synthese von Kaffeealkohol (**16**) in einer modifizierten Synthesemethode A. DIPEA = *N*-Ethyldiisopropylamin, TBAF = *tetra*-Butylammoniumfluorid

Abbildung 5.2). Die Phenolgruppe zersetzt den Aluminiumkomplex nach dem ersten Reduktionsschritt, was zur Freisetzung des Aldehyds führt. Die weitere Reduktion zum Alkohol wird dadurch ermöglicht. Eine Reduktion der DiBAL-H-Äquivalente hatte neben der Verringerung des Umsatzes keine Auswirkungen. Ein Wechsel zu unpolaren Lösungsmitteln kann die Spaltung des Aluminiumkomplexes verlangsamen und so eine Isolation des Aldehyds ermöglichen. Ein Wechsel des Lösungsmittels von Tetrahydrofuran (THF) auf Toluol brachte jedoch keine Änderung im Produktverhältnis hervor.

Nachdem die Synthese von Coniferylalkohol erfolgreich abgeschlossen werden konnte, wurde die Methode auch bei anderen Säuren angewandt (siehe Abbildung 5.1). *p*-Cumaralkohol (**7**) konnte erfolgreich in 95% Ausbeute, ausgehend von kommerziell erhältlicher *p*-Cumarensäure (**12**), hergestellt werden. Bei der Umsetzung der Kaffeesäure (**38**) traten Probleme bei der Reduktion auf. Trotz vollständiger Umsetzung des Eduktes **39** konnte kein Alkohol **16** isoliert werden. Eine Erklärung dafür könnte die hohe Oxydationsempfindlichkeit des Alkohols **16** sein. Um eine mögliche Zersetzung zu verhindern, wurden die beiden Hydroxylgruppen mit einer *tert*-Butyldimethylsilylschutzgruppe (TBS-Schutzgruppe) geschützt. Nach der Reduktion wurden die beiden Schutzgruppen mit *tetra*-Butylammoniumfluorid (TBAF) entfernt und das Produkt unter Schutzgas bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Mit dieser Modifikation der Synthesestrategie war es möglich den Alkohol **16** in 12-35% Gesamtausbeute zu isolieren (siehe Abbildung 5.3).

Um das Spektrum an Monolignolen zu erweitern, sollten auch zwei unnatürliche Derivate

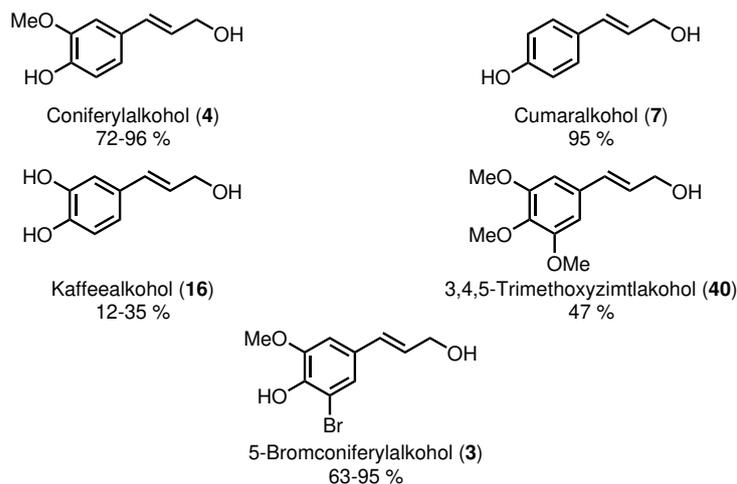


Abbildung 5.4: Auflistung aller Alkohole die mittels Synthesestrategie A aus ihren Säurederivaten synthetisiert wurden.

hergestellt werden. Der dreifach methylierte Alkohol **40** wurde erfolgreich aus seinem Säurederivat **41** in 47% Ausbeute hergestellt. Halogenierte Naturstoffderivate sind aus semisynthetischer Perspektive aufgrund der Möglichkeiten des späteren Austausches interessant. Bisher gibt es jedoch keine halogenierten Monolignolderivate. Die bromierte Säure **42** schließt diese Lücke. Der korrespondierende 5-Bromconiferylalcohol (**3**) konnte in guten Ausbeuten von 63-95% synthetisiert werden. Der Austausch des Bromsubstituenten gegen verschiedene Arylreste wird in Kapitel 5.4.1 näher beschrieben.

Folgende Alkohole konnten mittels Methode A synthetisiert werden: Coniferylalcohol (**4**), Cumaralcohol (**7**), Kaffealcohol (**16**), 3,4,5-Trimethoxycinnamylalcohol (**40**) und 5-Bromconiferylalcohol (**3**) (siehe Abbildung 5.4).

5.1.2 Synthesemethode B

Ein Großteil der Monolignole sind entweder nicht als Säure zu erhalten oder sind äußerst teuer. Daher sollte eine weitere Synthesestrategie getestet werden, welche die günstigeren Benzaldehyde als Startpunkt nutzt. Die Aldehyde sollten zum Ethylester umgesetzt werden. Ausgehend vom Ester kann nicht nur der Alkohol über die Reduktion erhalten werden, sondern auch die Säure über die Hydrolyse. Dies ermöglicht die Produktion nicht kommerziell erhältlicher Säuren. Die Synthese von 2-Nitroconiferylalcohol (**43**) wurde zum Test der Synthesemethode ausgewählt. Nitrierte Monolignole sind zudem in der Natur nicht vorhanden. Nach erfolgreicher Synthese wäre es möglich, Zugang zu einem weiteren elektronenarmen Aromaten und über Reduktion zur Gruppe der Amine mit den darin liegenden Optionen zur weiteren Umsetzung zu erhalten. Dazu wurde zunächst Acetylvainillin (**44**) nach einer Vorschrift von Grenier *et al.* in 2-Position nitrosyliert.^[174] Die Ausbeute schwankte dabei sehr stark von 38-95%. Die Reinheit der Salpetersäure ist dabei entscheidend für die Ausbeute. Bei der Verwendung einer neuen Charge Salpetersäure (>95% Reinheit) wurden die besten Ausbeuten erzielt. Ältere Chargen derselben nominell Reinheit lieferten schlechtere Ausbeuten, während geringere Konzentrationen zu keinem Umsatz führten. Zur Einführung der Propenylseitenkette wurde bei Grenier *et al.* eine Knoevenagel-Kondensation mit Doebner-Modifikation durchgeführt. Die Knoevenagel-Kondensation litt allerdings unter einer Reihe von Nachteilen, wie der langen Reaktionszeit von sechs Tagen und der Notwendigkeit harscher Reaktionsbedingungen von C. Es wurde entschieden, stattdessen eine Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion (HWE-Reaktion) zu versuchen. Li *et al.* zeigten 2001 den Erfolg in der Synthese

eines ähnlichen Substrates.^[175] Der in der HWE-Reaktion erhaltene Ester kann zudem direkt zum Alkohol reduziert werden. Ausgehend vom nitrosylierten Aldehyd **45** konnte der Ester **46** in 51-65 % Ausbeute synthetisiert werden. Wie erwartet konnte die Reaktionszeit massiv von 6 d auf 2-3 h reduziert werden. Der Ester **46** wurde anschließend mithilfe von DiBAL-H direkt zum Alkohol **43** in 8-25 % Gesamtausbeute reduziert.

Nach der erfolgreichen Synthese von 2-Nitroconiferylalkohol (**43**) wurde die Synthese auf eine Reihe weiterer natürlicher und unnatürlicher Monolignole übertragen. Ein bizyklischer unnatürlicher Alkohol (Naphthylenalkohol) (**47**) konnte aus 4-Hydroxy-1-naphthylenaldehyd (**48**) hergestellt werden (52-90 % Ausbeute). Die Herstellung von Sinapylalkohol (**8**) und 5-Hydroxyconiferylalkohol (**18**) gelang zunächst nicht. Trotz erfolgreicher HWE-Reaktion konnte nach der Reduktion kein Produkt isoliert werden. Eine Oxidation mit anschließendem Zerfall könnte für den Verlust an Produkt verantwortlich sein. Daher wurde entschieden die Benzaldehyde **49** und **50** mit Acetylschutzgruppen zu versehen. Sinapylalkohol (**8**) konnte auf diese Weise in 25-59 % Ausbeute hergestellt werden. Im Verlauf der HWE-Reaktion trat teilweise ein Verlust der Schutzgruppe auf, sodass neben dem acetylierten Produkt **51** auch der freie Ester **52** isoliert werden konnte. Beide Produkte wurden vor der Reduktion vereinigt und zusammen reduziert. Die Schutzgruppe erwies sich dabei unter den Bedingungen der Reduktion als labil und musste nicht durch einen zusätzlichen Schritt entfernt werden. Im Falle von 5-Hydroxyconiferylalkohol (**18**) konnte auch in diesem Fall kein Produkt isoliert werden. Es ist möglich, dass der entstandene Alkohol sich zu schnell zersetzt.

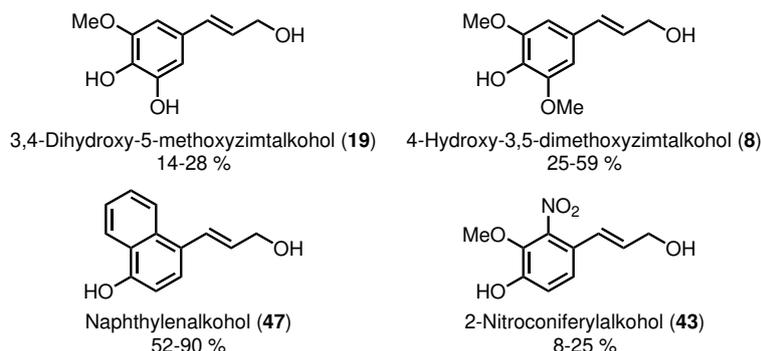


Abbildung 5.6: Aufstufung aller Alkohole die mittels Synthesestrategie B aus ihren Benzaldehydderivaten synthetisiert wurden.

5.1.2.1 Synthese von 5-Hydroxyconiferylalkohol (**18**)

Wie im vorherigen Paragraphen beschrieben, führte die Einführung einer Acetylschutzgruppe nicht zur erfolgreichen Synthese des 5-Hydroxyconiferylalkohols. Um die geringe Stabilität der Schutzgruppe als Faktor auszuschließen, wurde eine stabilere Schutzgruppe gewählt. Die Pivaloylschutzgruppe besitzt aufgrund ihres großen sterischen Anspruchs eine sehr hohe Stabilität. Die Einführung gelang ohne Probleme mit nahezu quantitativer Ausbeute. Das Esterderivat **53** wurde mittels Roh-NMR aus der HWE-Reaktion nachgewiesen und ohne Aufreinigung nach der Isolation reduziert. Zunächst wurde mit DiBAL-H reduziert und das Produkt mit NaH entschützt, um den freien Alkohol **19** zu erhalten. Trotz Nachweis des Produktes mit GC-MS konnte kein sauberes Produkt isoliert werden. Eine Trennung von ge- und entschütztem Alkohol war nicht möglich. Um eine Trennung zu ermöglichen, wurde das Reduktionsmittel LiAlH₄ gewählt, welches sowohl für die Reduktion, als auch für die Entschützung verwendet werden kann. Mit dieser Änderung war es möglich den Alkohol **19** in 14-28 % Gesamtausbeute

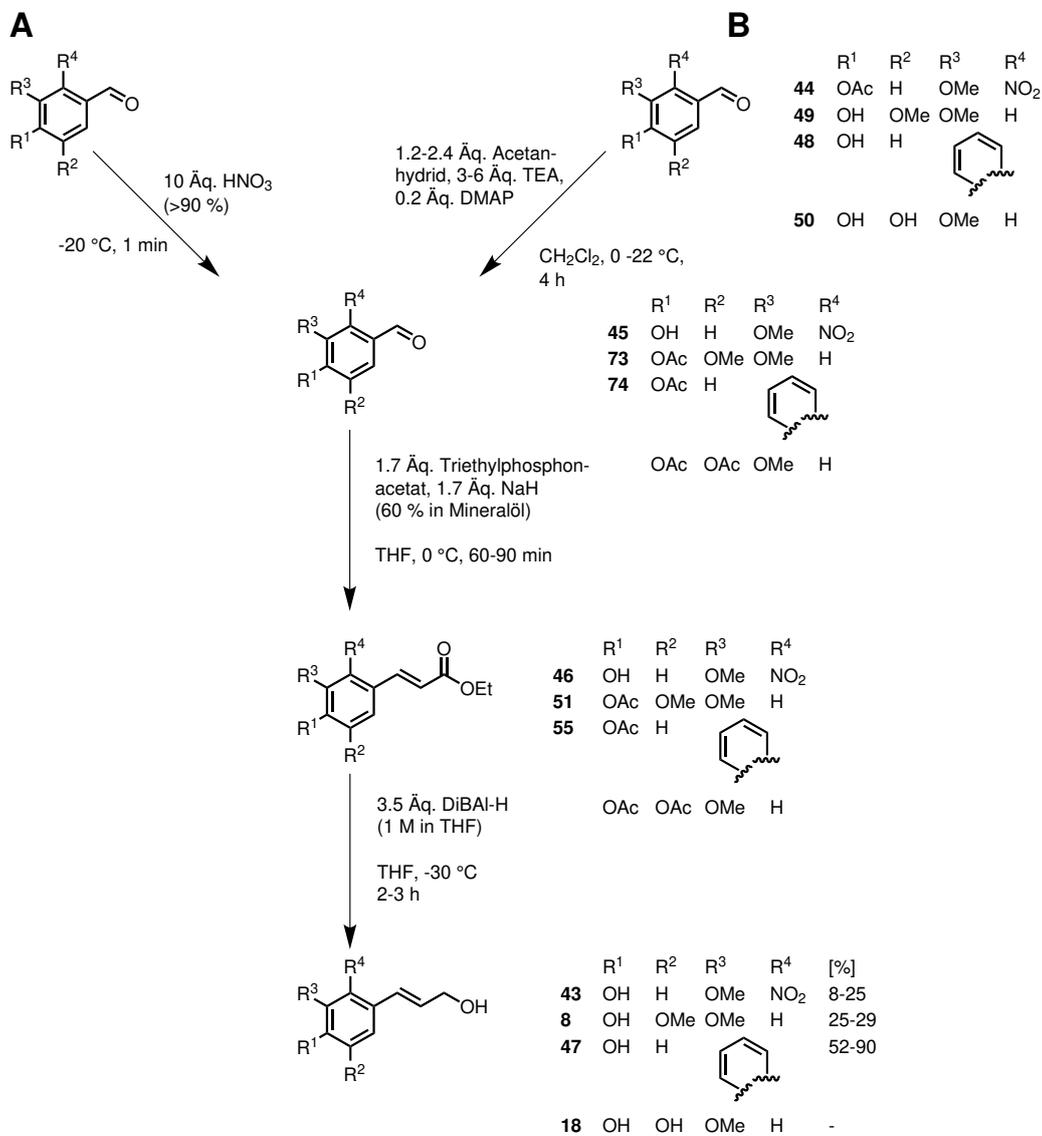


Abbildung 5.5: Synthesestrategie zur Herstellung von Monolignolreferenzen aus Benzaldehydderivaten. Acetylvanillin (**44**) wurde zuvor nitriert (Verzweigung A). 4-Hydroxy-1-naphthylaldehyd (**48**), 4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyd (**49**) und 3,4-Dihydroxy-5-methoxybenzaldehyd (**50**) wurden acetyliert (Verzweigung B). Die Synthesestrategie musste für die Herstellung von 5-Hydroxyconiferylalkohol (**18**) modifiziert werden (siehe Abbildung 5.7). TEA = Triethylamin; DMAP = Dimethylaminopyridin.

zu isolieren. Der Alkohol **19** wurde dabei stets unter Schutzgas bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, um die Oxidation zu verlangsamen (siehe Abbildung 5.7).

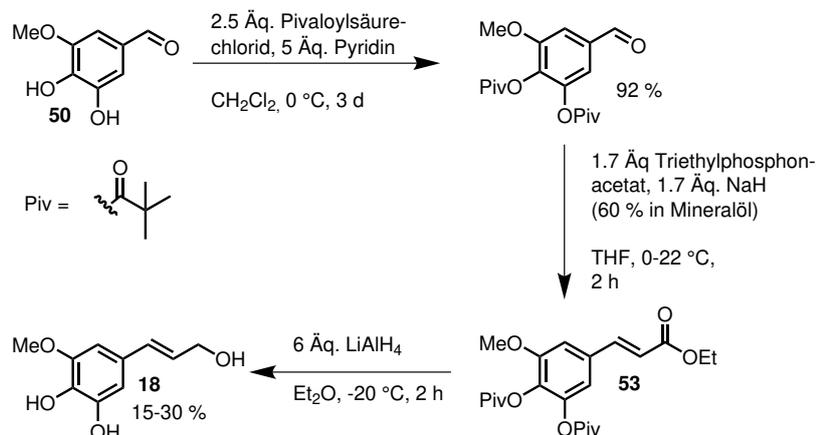


Abbildung 5.7: Synthesestrategie zur Herstellung von 5-Hydroxyconiferylalkohol. Anstelle der Acetylschutzgruppe wurde eine Pivaloylschutzgruppe verwendet. Zur Abspaltung dieser Gruppe wurde für die Reduktion LiAlH_4 anstelle von DiBAL-H verwendet. Das Produkt **54** wurde nach Bestätigung der Identität über $^1\text{H-NMR}$ direkt weiter umgesetzt.

Folgende Alkohole wurden nach der Methode B synthetisiert: 3,4-Dihydroxy-5-methoxyzimmtalkohol (**18**), 4-Hydroxy-3,5-dimethoxyzimmtalkohol (**8**), Naphthylenalkohol (**47**) und 2-Nitroconiferylalkohol (**43**) (siehe Abbildung 5.6).

5.1.3 Synthese der Zimtsäurederivate

Im Rahmen des Kooperationsprojektes zum Transfer der Lignansynthese in einen *E. coli* Stamm wurden zwei unnatürliche Zimtsäurederivate hergestellt. Beide Derivate sind literaturbekannt, wurden jedoch bisher nicht als potentielle unnatürliche Monolignole verwendet.^[Burtner1951, 174]

Synthese von 2-Nitroferulasäure (**2**)

Die Synthese der Säure **2** erfolgte mithilfe der Synthesemethode B (siehe Abbildung 5.6). Anstelle der Reduktion mit DiBAL-H wurde der Ester **46** basisch hydrolysiert. Die Ausbeute der Hydrolyse betrug entgegen den Erwartungen lediglich 45-48%. Trotz dieser vermutlich stark verbesserungsfähigen letzten Reaktion konnten mit 30% Gesamtausbeute ähnliche Werte wie in der Literatur (35%) erreicht werden (Grenier *et al*). Eine Verbesserung der Hydrolyse könnte dabei die Ausbeute noch wesentlich erhöhen (siehe Abbildung 5.8).

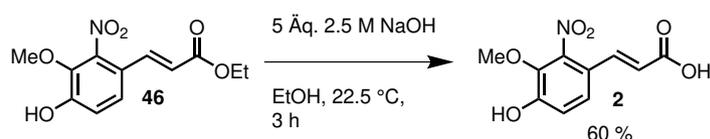


Abbildung 5.8: Synthesestrategie zur Herstellung von 2-Nitroferulasäure (**2**) aus 2-Nitroferulasäureethylester (**46**).

Synthese von Naphthylensäure (**1**)

Die Naphthylensäure **1** kann analog zur 2-Nitroferulasäure (**2**) aus ihrem Benzaldehyd **54**

hergestellt werden. Aufgrund der Verfügbarkeit der Startmaterialien erfolgte die Synthese jedoch zunächst aus einer *O*-methylierten Vorgängerverbindung **55**. Dabei wird diese mit BBr_3 in Dichlormethan entschützt und anschließend mit Säulenchromatographie gereinigt (siehe Abbildung 5.9). Die Reaktion lief auch bei längeren Reaktionszeiten und Erhöhung der Äquivalente (Äq.) an BBr_3 nicht bis zur vollständigen Umsetzung des Eduktes ab. Dies führte direkt zum Problem der Trennung von Edukt und Produkt. Es gelang nicht ein Lösungsmittelgemisch zu identifizieren, in dem eine vollständige Trennung beider Substanzen möglich war. Stattdessen mussten mehrere Säulenchromatographien durchgeführt werden, was die Ausbeute stark verringerte. Aus diesen Gründen wurde die Naphthylensäure (**1**) nach den ersten Tests ausschließlich über die oben genannte Syntheseroute B hergestellt. Dabei konnte die Säure **1** in 84 % Gesamtausbeute über den geschützten Ester **56** synthetisiert werden. Die Naphthylensäure (**1**) wurde in der Biotechnologischen Monolignolsynthese verwendet (siehe Kapitel 5.2.1).

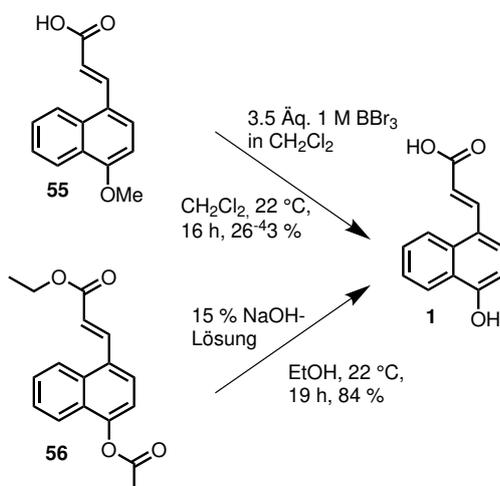


Abbildung 5.9: Synthesestrategie zur Herstellung von Naphthylensäure (**1**) aus 4-*O*-Methoxynaphthylensäure (**55**) bzw. 4-*O*-Acetoxynaphthylensäureethylester (**56**).

5.2 Biotechnologische Monolignolsynthese

5.2.1 Reduktion mit *E. coli*

Die Reduktionsexperimente mit *E. coli* wurden von Frau Dr. Jennifer Aschenbrenner im Institut für Bio- und Geowissenschaften 1, Abteilung Systemische Mikrobiologie, Arbeitsgruppe Synthetische Zellfabriken, im Rahmen ihres Dissertationsprojekts durchgeführt und teilweise veröffentlicht.^[1] Frau Aschenbrenner verwendete in ihrem Dissertationsprojekt einen modifizierten *E. coli* Stamm zur Produktion verschiedener Monolignole aus den jeweiligen Säuren (siehe Abbildung 5.10).^[3]

Der Stamm wurde mit einem Plasmid transformiert, in welches eine *4-coumaroyl-CoA ligase* (4CL_{PC} , GenBank: X13324.1) aus *Petroselinum crispum*, eine Cinnamoyl-CoA-reduktase (CCR) (CCR_{Zm} , GenBank: Y15069.1) aus *Zea mays* und eine Zimtalkoholdehydrogenase (CAD) aus *Zea mays* kloniert wurden. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der Stamm zur Produktion von Cumaralkohol (**7**) aus der Säure **12** in der Lage ist.^[176] Aufgrund der geringen Produktspezifität der verwendeten Enzyme ist anzunehmen, dass sie eine Reihe der getesteten Säuren umsetzen werden (siehe Kapitel 4.1.2). Die Nährmedien wurden zu Beginn der Kultivierung mit 125 mmol (2.5 mM) der jeweiligen Säure versetzt. Die Kultur

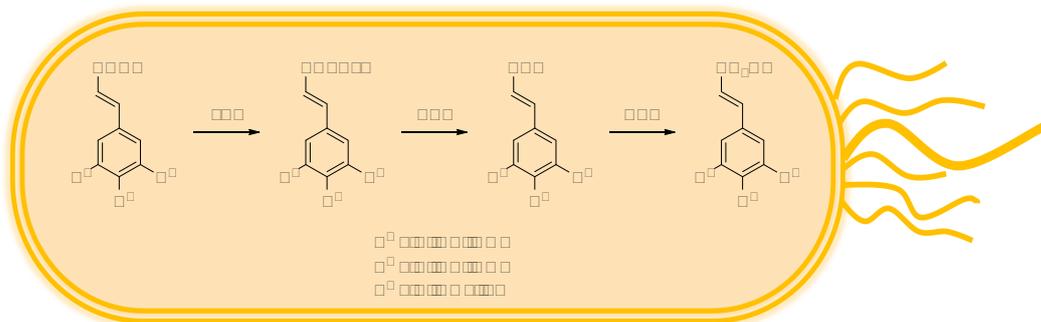
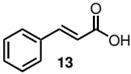
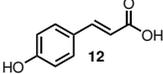
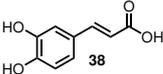
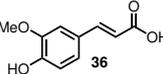
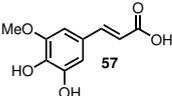
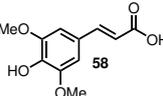


Abbildung 5.10: Reduktion von Monolignolsäuren/-derivaten mithilfe des mutierten *E. coli* Stammes.^[176]

Tabelle 5.1: Titer der natürlichen Zimtsäurederivate im Kulturüberstand identifiziert über HPLC mit internem Standard. Der interne Standard für Kaffeealkohol **16** wurde dabei gemäß Synthesemethode A synthetisiert (siehe Kapitel 5.1.1).

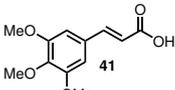
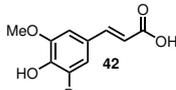
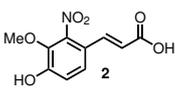
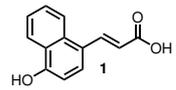
Zimtsäurederivat	Ausbeute Alkohol	Zimtsäurederivat	Ausbeute Alkohol
	195.4 mg/L (1.46 mM)		121.8 mg/L (0.81 mM)
	5.6 mg/L (0.03 mM)		327.8 mg/L (1.82 mM)
	102.4 mg/L (0.52 mM)		102.4 mg/L (0.52 mM)

wurde unter Schütteln bei 37°C angezogen. Nach 17 h wurde die Kultivierung abgebrochen und die Konzentration an gebildetem Alkohol, sowie nicht umgesetzter Säure mit *high pressure liquid chromatography* (HPLC) untersucht.

Zunächst wurden verschiedene natürliche Zimtsäurederivate umgesetzt (siehe Tabelle 5.1). Zur Bestimmung der Produktmenge wurde eine Kalibrierung für jeden Standard durchgeführt. Anhand dieser Geraden konnte die gebildete Menge an Produkt bestimmt werden. Im Falle der Zimtsäure (**13**) konnten dabei 195.4 mg/L (1.46 mM) Zimtalkohol (**9**) nachgewiesen werden. Die Einführung der Hydroxylgruppe (*p*-Cumarsäure) (**12**) senkte die Reduktionseffizienz leicht ab auf 121.8 mg/L (0.81 mM). Der Tiefpunkt bei den natürlichen Monolignolen wurde mit der doppelt hydroxylierten Kaffeesäure (**38**) mit 5.6 mg/L (0.03 mM) erreicht. Die Reduktion der Ferulasäure (**36**) gelang dagegen am effizientesten mit 327.8 mg/L (1.82 mM). Die Reduktion von 4,5-Dihydroxy-3-methoxyzimtsäure (**57**) und 4-Hydroxy-3,5-dimethoxyzimtsäure (**58**) zum Alkohol konnte dabei mit jeweils 102.4 mg/L (0.52 mM) erstmalig erfolgreich durchgeführt werden (siehe Tabelle 5.1).

Nach der erfolgreichen Umsetzung der natürlichen Zimtsäurederivate wurde eine Reihe von unnatürlichen getestet. Zuerst wurde die den natürlichen Monolignolen relativ ähnliche, 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure (**41**) verwendet. Dabei konnten lediglich 4.5 mg/L (0.02 mM) des Alkohols **40** nachgewiesen werden. Der bromierte Alkohol **3** konnte in hervorragenden Ausbeuten von 462.2 mg/L (1.78 mM) erhalten werden. Dieses Ergebnis ist dabei besonders aufgrund der Möglichkeiten zur weiteren semisynthetischen Umsetzung interessant.^[177] Die Reduktion

Tabelle 5.2: Titer der natürlichen Zimtsäurederivate im Kulturüberstand identifiziert über HPLC mit internem Standard. Der interne Standard für 5-Bromconiferylalkohol (**3**) wurde dabei über Synthesemethode A synthetisiert (siehe Kapitel 5.1.1). Die internen Standards für 2-Nitroconiferylalkohol (**43**) und Naphthylenalokhol (**47**) wurden nach Synthesemethode B hergestellt (siehe Kapitel 5.1.2).

Zimtsäurederivat	Ausbeute Alkohol	Zimtsäurederivat	Ausbeute Alkohol
 <chem>COc1cc(OC)c(OC)cc1C(=O)O</chem> 41	4.5 mg/L (0.02 mM)	 <chem>COc1cc(Br)cc1C(=O)O</chem> 42	462.2 mg/L (1.78 mM)
 <chem>COc1cc([N+](=O)[O-])cc1C(=O)O</chem> 2	74.6 mg/L (0.33 mM)	 <chem>Oc1ccc2ccccc2c1C(=O)O</chem> 1	25.4 mg/L (0.13 mM)

des elektronenärmeren Derivates **2** gelang trotz der in der Natur nicht vorkommenden Nitro-Gruppe mit 74.6 mg/L (0.33 mM). Als letztes wurde die Naphthylensäure (**1**) umgesetzt. Dabei konnten immer noch 25.4 mg/L (0.13 mM) des Alkohols **47** nachgewiesen werden. Die beiden letzten Ergebnisse demonstrieren dabei eindrucksvoll die Promiskuität des Systems. Die prominenten Strukturelemente in beiden Säuren ähneln keinen natürlichen Zimtsäurederivaten und werden dennoch umgesetzt. Neben der erstmaligen biotechnologischen Produktion dieser unnatürlichen Zimtalkoholderivate gelang es auch erstmalig verschiedene Alkohole mit einem einzelnen *E. coli* Stamm herzustellen (siehe Tabellen 5.2, 5.1).^[178, 179]

Folgende Experimente sind wieder Eigenleistung, sofern nicht anders gekennzeichnet. Die erhaltenen Werte spiegeln die Effizienz der Reduktion wieder, geben jedoch keine Hinweise auf potentielle Probleme bei einer Isolation des Produktes. Um auch über diesen Bereich eine Aussage treffen zu können, wurde eine Extraktion, gefolgt von einer Bestimmung der Produktmenge mittels qNMR, für alle Säuren durchgeführt (siehe Kapitel 5.2.2). Zudem soll die Isolation von von Coniferylalkohol (**4**) aus einer 1 L Kultur durchgeführt werden, um eine Aussage über die Maßstabsvergrößerung treffen zu können. Nach der Isolation wurde eine Säulenchromatographie zur Reinigung durchgeführt. Dabei konnten 280 mg des reinen Alkohols **4** isoliert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 62 % (bezogen auf die eingesetzte Säure).

5.2.2 Nachweis mit q-NMR

Die Kultivierungen wurden von Frau Dr. Aschenbrenner durchgeführt. Die darauffolgenden Schritte sind Eigenleistung. Das Produkt wurde aus dem Kulturüberstand extrahiert. Nach der Zugabe des internen Standards Dimethylsulfon (DMS) wurde die Probe in deuteriertem Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert. DMSO wurde aufgrund von Löslichkeitstests im Verlauf der Herstellung der Monolignolreferenzen gewählt. Nachdem sich alle Substanzen vollständig gelöst hatten, wurde die Probe in ein *nuclear magnetic resonance* (NMR)-Röhrchen überführt und vermessen. Für die Quantifizierung wurde das C₈ Proton ausgewählt. Dieses Proton besitzt in allen Oxidationszuständen deutlich unterschiedliche chemische Verschiebungen, ein eindeutiges Kupplungsmuster und überlappt nicht mit anderen Signalen (siehe Abbildung 5.11). Zur Bestimmung der Reduktionseffizienz wurde folgende Formel verwendet (siehe Formel 5.1).

$$\text{Alkohol} = \frac{\text{DMS}}{\text{DMS}} \cdot \text{Ana} \cdot \text{Säure} \quad (5.1)$$

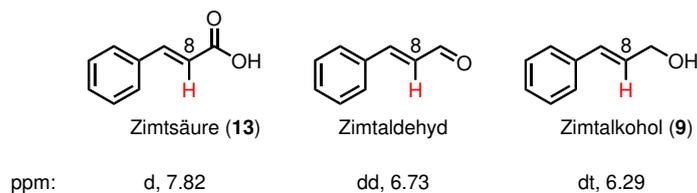


Abbildung 5.11: Vergleich der chemischen Verschiebungen von Zimtsäure, -aldehyd und -alkohol mit Markierung des zur Identifikation verwendeten C⁸-H. Chemische Verschiebung von Zimtaldehyd entnommen aus Könning *et al.*^[180]

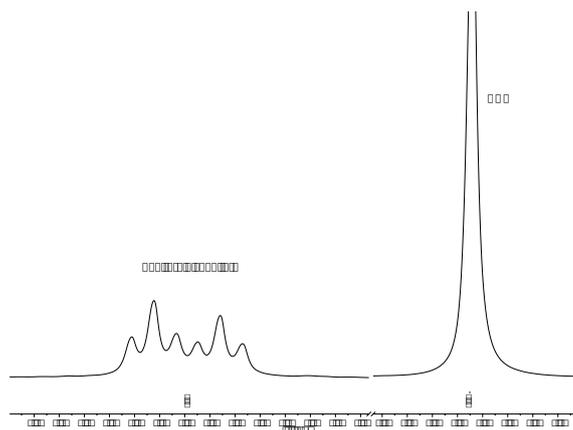
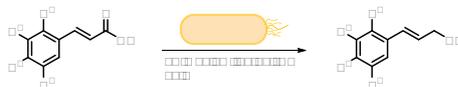


Abbildung 5.12: Ausschnitt eines NMR-Spektrums von Coniferylalkohol (**4**) mit DMS.

Die Isolation wurde zunächst mit dem einfachsten Substrat, der Zimtsäure (**13**), durchgeführt. Der Umsatz zum Alkohol von 90 % war äußerst vielversprechend. Als nächstes wurden die natürlichen Monolignole *p*-Cumarsäure (**12**), Ferulasäure (**36**) und Sinapinsäure (**58**) getestet. Die Ferulasäure (**36**) zeigte den besten Umsatz mit 52 %, gefolgt von der *p*-Cumarsäure (**12**) mit 32 %. Die Sinapinsäure (**58**) wurde nur zu knapp 6 % zum Alkohol reduziert. Die hohen Umsätze bei Ferulasäure (**36**) und *p*-Cumarsäure (**12**) entsprechen den Erwartungen. Beide Säuren sind natürliche Zwischenprodukte im Lignanstoffwechsel und erzielten bereits in der HPLC-Experimenten hohe Umsätze. Der geringe Umsatz der Sinapinsäure (**58**) ist überraschend, da auch diese Säure ein natürliches Zwischenprodukt im Stoffwechsel ist (siehe Abbildung 4.4). Anschließend wurden die doppelt hydroxylierten Säuren Kaffeesäure (**38**) und 5-Hydroxyferulasäure (**57**) umgesetzt. In beiden Fällen blieb die Ausbeute mit 9 % und 7 % stark hinter den Erwartungen zurück. Beide Säuren bzw. ihre Alkohole sind aufgrund der zwei Hydroxylygruppen äußerst oxidationsempfindlich. Ein Zerfall während der Aufarbeitung kann demnach nicht ausgeschlossen werden. Ein weiteres Problem könnte die hohe Wasserlöslichkeit darstellen. Mit der 5-Hydroxyferulasäure (**57**) scheint sich ein Trend zu bilden, dass Substituenten in 5-Position nur schwer umgesetzt werden.

Zuletzt wurden die vier unnatürlichen Säuren umgesetzt. Einzig im Falle der Trimethoxyzimtsäure (**41**) konnte keinerlei Umsatz nachgewiesen werden. Im Falle der Bicyclosäure (**1**) konnte zwar kein Umsatz zum Alkohol detektiert werden, aber ein Umsatz von 13 % zum Aldehyd wurde detektiert (siehe Abbildung 5.3). Die 2-Nitroferulasäure (**2**) wurde mit 15 % umgesetzt. Als letztes wurde die 5-Bromferulasäure (**42**) getestet. Der Umsatz war mit 59 % der zweitbeste und übertraf sogar den des natürlichen Monolignols Ferulasäure (**36**). Die nicht vorhandene Umsetzung der Trimethoxyzimtsäure (**41**) war nach den Umsetzungen der Säuren (**58**) und (**57**) erwartet worden. Sie unterstützt die Theorie der geringen Toleranz der Enzyme

Tabelle 5.3: Effizienz der Reduktion verschiedener natürlicher und unnatürlicher Monolignole zum Alkohol ausgehend vom Säurederivat durch *E. coli* BL21-Gold(DE3) *lact*^{Q1} pALXtreme-*tal-4cl-ccr-cad*. Ergebnisse sind die Summe dreier biologischer Triplikate. Nachweis erfolgte durch qNMR. R¹ = -H, -NO₂, -C₄H₄-; R² = -H, -OH, -OMe, -C₄H₄-; R³ = -H, -OH, -OMe; R⁴ = -H, -OH, -OMe, -Br.



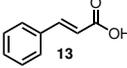
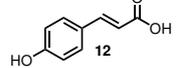
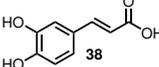
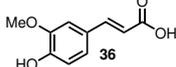
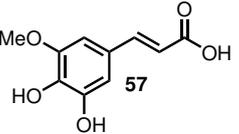
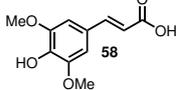
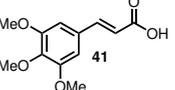
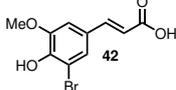
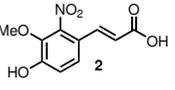
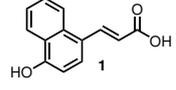
Alkohol	Umsatz [%]	Alkohol	Umsatz [%]
Zimtalkohol	89.8 2.6	<i>p</i> -Cumaralkohol	32.2 5.0
Kaffeealkohol	8.9 2.5	Coniferylalkohol	51.9 1.2
5-Hydroxyconiferylalkohol	7.2 0.7	Sinapylalkohol	6.1 2.9
Trimethoxyzimtalkohol	0	5-Bromconiferylalkohol	59.2 8.3
Naphthylenalkohol	0 (13.3 1.4 für Aldehyd)	2-Nitroconiferylalkohol	15.2 4.1

für Substituenten in 5-Position. Demgegenüber steht allerdings die ausgezeichnete Umsetzung der 5-Bromferulasäure (**42**). Der sterische Bedarf des Broms ist zwar geringer als bei einer Methoxygruppe, aber größer als bei einer Hydroxylgruppe. Der umgekehrte elektronische Effekt des Bromsubstituenten könnte eine Rolle bei der Umsetzung spielen. Der Umsatz der 2-Nitroferulasäure (**2**) liegt im Rahmen der Umsetzung der dreifach substituierten Säuren. Da kein Versuch mit +M-Substituenten in 2-Position durchgeführt wurde, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob sich der Effekt der 5-Position wiederholt. Das vollständige Fehlen des Naphthylenalkohol (**47**) war aufgrund der großen Unterschiede zu den natürlichen Monolignolen nicht unerwartet. Die Tatsache, dass dennoch der Aldehyd detektiert werden konnte, deutet darauf hin, dass die CAD der limitierende Schritt in der Reduktion zu sein scheint. Ein Austausch oder eine gezielte Mutation dieses Enzyms könnte auch die Umsetzung verbessern.

5.2.2.1 Vergleich der HPLC und qNMR Ergebnisse

Die Ergebnisse aus der HPLC und qNMR Analyse liegen in vielen Fällen erwartungsgemäß nahe beieinander. Im Falle der *p*-Cumarsäure (**12**), Kaffeesäure (**38**), Trimethoxyzimtsäure (**41**), 5-Bromferulasäure (**42**), 2-Nitroferulasäure (**2**) und der Naphthylensäure (**1**) stimmen die Ergebnisse weitestgehend überein. Aufgrund der unterschiedlichen Probenaufbereitung vor beiden Messmethoden sind geringfügige Unterschiede zu erwarten. Bei der Zimtsäure (**13**) liegt die mit qNMR bestimmte Menge deutlich über der mit HPLC bestimmten Menge (89.2 zu 58.4). Eine mögliche Erklärung könnte die geringere Löslichkeit des vergleichsweise unpolaren Zimtalkohols in der polaren Phase der HPLC sein. In der Probenaufbereitung für das qNMR wurde mit dem deutlich unpolaren Lösungsmittel Essigsäureethylester (EE) extrahiert, was bei der HPLC-Messung nicht vonnöten war. Die Ausbeute für 5-Hydroxyferulasäure (**57**) und Sinapinsäure (**58**) sind bei der Analyse mit qNMR deutlich geringer als bei der HPLC. Eine mögliche Erklärung dafür könnte in der Oxidationsempfindlichkeit beider Substanzen liegen. Die längere Zeit in der Probenaufbereitung für qNMR könnte zu einer stärkeren Oxidation geführt haben. Beide Methoden weisen insgesamt sehr ähnliche Werte auf und sind daher gleichermaßen zur Analyse geeignet (siehe Tabelle 5.4). Ein Vorteil von qNMR ist jedoch die Möglichkeit zum Nachweis von Alkoholen ohne Referenz, da NMR im Gegensatz zu HPLC eine direkte Auskunft über die Struktur enthält.

Tabelle 5.4: Vergleich der Reduktionseffizienz der dargestellten Zimtsäure (**13**) bzw. des Zimtsäurederivates zum jeweiligen Alkohol bestimmt durch HPLC und qNMR.
¹= % des korrespondierenden Aldehyds

Zimtsäurederivat	Ausbeute [%]		Zimtsäurederivat	Ausbeute [%]	
	HPLC	qNMR		HPLC	qNMR
					
					
					
					
		1			

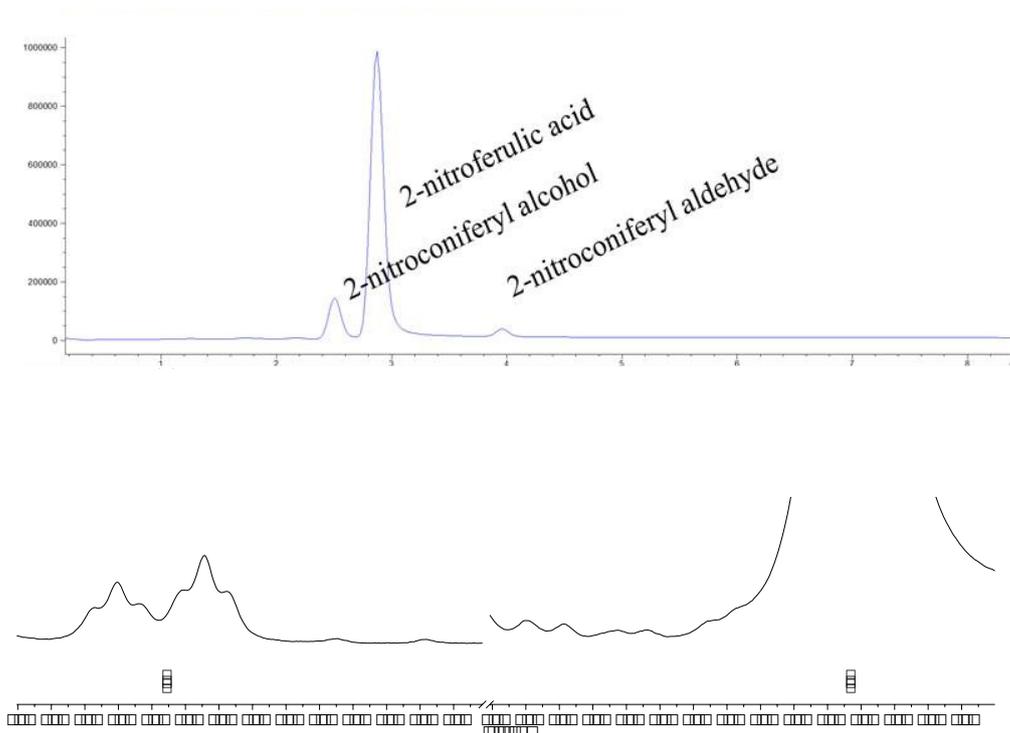


Abbildung 5.13: Vergleich eines HPLC-Chromatogramms des Kulturüberstandes mit einem Ausschnitt eines NMR-Chromatogramms. In beiden Fällen wurde die Reduktion von 2-Nitroferulasäure (**2**) zu 2-Nitroconiferylalkohol (**43**) untersucht. Das HPLC-Chromatogramm wurde von Jennifer Aschenbrenner zur Verfügung gestellt.

Tabelle 5.5: Kostenvergleich der chemischen und biotechnologischen Produktion von Coniferylalkohol (**4**). Die Kosten sind umgerechnet auf die Produktion von 1 g Coniferylalkohol (**4**). Die benötigte Arbeitszeit wurde nicht berücksichtigt. Für die chemische Synthese wurde mit einer Ausbeute von 84 % gerechnet und für die biotechnologische Produktion mit 62 %. Ferulasäure (**36**) und die Lösungsmittel/Füllmaterial für Säulenchromatographie sind nicht berücksichtigt, da diese in beiden Fällen im selben Umfang benötigt werden. Die Preise der Chemikalien wurden am 08.09.2019 von *Carl Roth GmbH & Co KG* und *Merck KGaA* abgerufen und enthalten keinerlei Vergünstigungen. ¹= 25 g LB-Medium Feststoff auf 1 L entmineralisiertes Wasser

Chemikalie	Menge	Kosten	Verbrauch		Kosten
chemische Synthese					
Ethanol (99.8 %)	1 L	12.9 €	171.3 mmol	12.6 mL	0.16 €
Schwefelsäure (>95 %)	1 L	72.2 €	0.1 mmol	0.01 mL	<0.01 €
DiBAL-H (1 M/L in THF)	100 mL	84.4 €	13.5 mmol	13.5 mL	11.38 €
NaK-Tartrat Tetrahydrat	500 g	69.6 €	25.9 mmol	7.3 g	1.02 €
THF	1 L	32.9 €	218.2 mmol	17.6 mL	0.58 €
EE	2.5 L	37.9 €	706.2 mmol	69.6 mL	1.05 €
Gesamtkosten/g					14.19 €
biotechnologische Synthese					
LB-Medium ¹	500 g	49.9 €		89.25 g	8.91 €
entmineralisiertes Wasser	10 L	17.9 €		3.57 L	6.39 €
Salzsäure (5 %)	1 L	11.5 €		35.7 mL	0.41 €
EE	2.5 L	37.9 €		3.21 L	48.66 €
Gesamtkosten/g					64.37 €

5.2.3 Vergleich enzymatische und chemische Synthese

Die biotechnologische Produktion von Feinchemikalien ist mittlerweile eine realistische Alternative zur klassischen chemischen Synthese. Dabei ist besonders die Umweltfreundlichkeit mit wenigen toxischen Nebenprodukten und die Verwendung milder Bedingungen gefragt. Im Folgenden soll eine Analyse der Kosten beider Prozesse für die Produktion von Coniferylalkohol durchgeführt werden (siehe Tabelle 5.5).

Die Herstellungskosten von 1 g Coniferylalkohol (**4**) mittels chemischer Synthese betragen 14.19 €. Im Vergleich dazu belaufen sich die Kosten für eine biotechnologische Produktion auf 64.37 €. Die chemische Produktion ist also um ein Vielfaches günstiger. Die große Menge an Extraktionsmittel ist dabei hauptsächlich für die Kosten verantwortlich (48.66 € von den Gesamtkosten). Eine Rückgewinnung des Extraktionsmittels oder ein Wechsel zu einer kontinuierlichen Extraktion mit einer geringeren Menge an Extraktionsmittel könnte dieses Problem wahrscheinlich umgehen. Ein Vorteil der biotechnologischen Produktion stellt jedoch die Verringerung der Arbeitszeit und des Arbeitsaufwandes dar. Die Kultivierung kann über Nacht (17 h) ohne Beaufsichtigung ablaufen und benötigt lediglich 2 h Vor- sowie Aufarbeitungszeit. Die chemische Synthese erfordert dagegen doppelt so viel Arbeitszeit (ca. 8 h). Eine Erhöhung der Komplexität der produzierten Chemikalien steigert der Wert erheblich und lässt die Kosten einer chemischen Synthese überproportional zur biotechnologischen steigen. Die Einführung eines nachfolgenden Dimerisierungsschrittes zum Pinoresinol (**6**) könnte die biotechnologische Produktion wettbewerbsfähiger machen, da Pinoresinol (**6**) zurzeit äußerst

kostenintensiv aus Pflanzenmaterial gewonnen wird. Erste Versuche in diese Richtung wurden von Aschenbrenner *et al.* unternommen.^[3]

5.3 Enzymatische Lignansynthese

5.3.1 Synthese von Pinoresinol

Nach der Synthese der Monolignole/-derivate erfolgte die Dimerisierung zu Lignanen. Pickett *et al.* zeigten bereits die erfolgreiche Synthese von (±)-Pinoresinol [(±)-**6**] sowie der zwei Nebenprodukte (±)-Dehydrodiconiferylalkohol [(±)-**59**] und (±)-Guaiacylglycerin-8-*O*-4'-coniferylether [(±)-**60**] mittels Laccase initiiertes Dimerisierung aus Coniferylalkohol (**4**) (siehe Abbildung 5.14). Die Laccase oxidiert die Phenolgruppe des Monolignols. Das entstehende Radikal ist durch das konjugierte Doppelbindungssystem stabilisiert und delokalisiert. Infolge der inhärent hohen Reaktivität der Radikale und der Delokalisation treten eine Reihe möglicher Kopplungsprodukte auf. (±)-Pinoresinol [(±)-**6**] stellt aufgrund seiner Eigenschaften und Möglichkeiten zur weiteren Umsetzung das wertvollste Produkt dar. Aus dem Produktgemisch kann jedoch nur bis zu 8% an racemischen Pinoresinol (**6**) isoliert werden. Chemische Synthesewege zur Umgehung der radikalischen Dimerisierung existieren, leiden jedoch unter einer hohen Anzahl an Schritten mit nur mäßigen Ausbeuten. Eine elegante Synthese von Albertson *et al.* ausgehend von Ferulasäure (**36**) erreicht immerhin vergleichbare Ergebnisse zur enzymatischen Synthese mit 7% Ausbeute über 11 Schritte.^[171] In Pflanzen wird das Selektivitätsproblem durch die sogenannten dirigierenden Proteine gelöst. Die Schwierigkeit, diese Proteine in größeren Mengen zu produzieren, verhindert noch ihren Einzug in die Synthese.^[36] Die Verwendung von Monolignolderivaten könnte eine Lösung für das Selektivitätsproblem darstellen. Zum Beispiel kann die gezielte Blockierung einzelner Produkte über Substituenten kann zu einer Steigerung an gewünschtem Produkt führen.

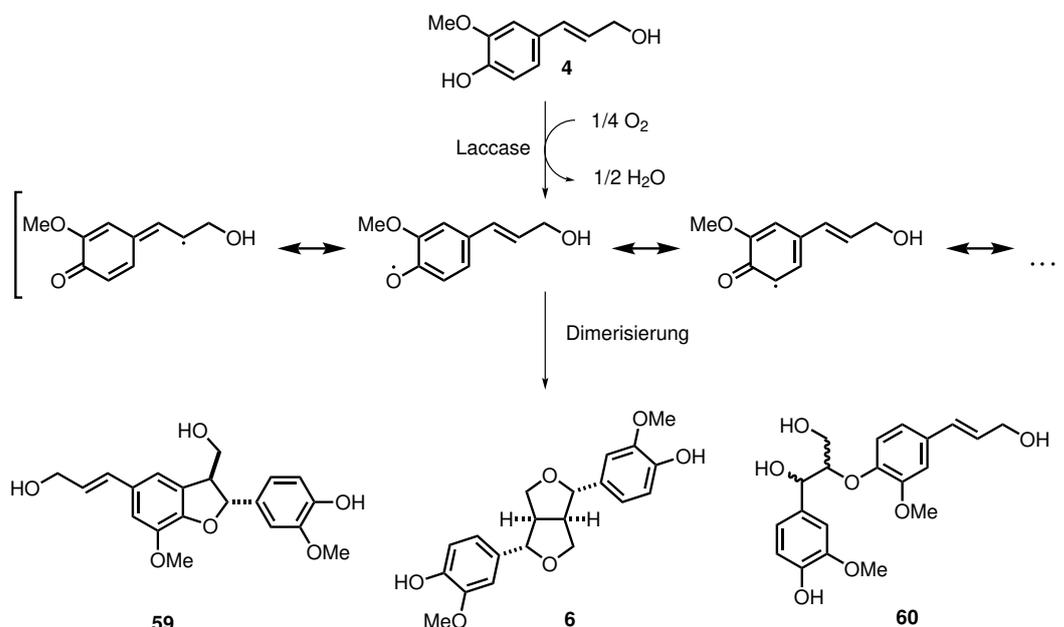


Abbildung 5.14: Die Bildung der Hauptdimerisierungsprodukte der enzymatisch katalysierten Dimerisierung von Coniferylalkohol (**4**). (±)-Dehydrodiconiferylalkohol [(±)-**59**], (±)-Pinoresinol [(±)-**6**] und (±)-Guaiacylglycerin-8-*O*-4'-coniferylether [(±)-**60**].

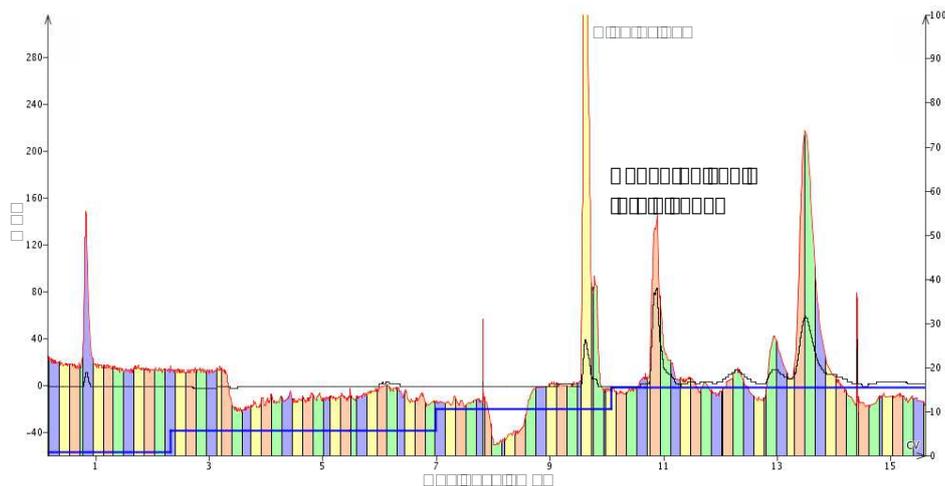


Abbildung 5.15: Chromatogramm der MPLC Aufreinigung der Dimerisierung von Coniferylalkohol (**4**). Lösungsmittel A = Dichlormethan, Lösungsmittel B = MeOH

Zuerst wurde versucht, die von Pickel *et al.* publizierten Ergebnisse zu reproduzieren und, wenn möglich, zu optimieren.^[2] Dabei ist zu erwähnen, dass die Reaktion unter den angegebenen Bedingungen stets als Suspension vorlag. Auch bei äußerst vorsichtiger Zugabe des gelösten Eduktes **4** bildet sich innerhalb weniger Minuten die Suspension. Dies schien die Reaktion nicht zu beeinträchtigen, da eine Vergleichsreaktion mit 30 % Acetonitril ohne Suspensionsbildung schlechteren Umsatz zeigte. Acetonitril wurde als Cosolvens gewählt, da es in unserer Arbeitsgruppe bereits für Laccase-initiierte Arylierungen verwendet wurde.^[181] Um die zahlreichen Säulenchromatographieschritte von Pickel *et al.* zu vermeiden, wurde versucht die Reaktionsprodukte mittels *medium pressure liquid chromatography* (MPLC) zu trennen. MPLCs sind automatisierte Säulenchromatographiesysteme. Im Gegensatz zu weiter verbreiteten HPLC arbeiten sie nur mit geringen Überdrücken. Zudem sind sie in der Lage, auch größere Substanzmengen zu trennen. Die Trennleistung ist dabei deutlich geringer als die einer HPLC. Basierend auf Dünnschichtchromatographie (DC) Untersuchungen des Produktspektrums wurde eine Trennmethode für die MPLC entwickelt. Initiale Trennversuche waren dabei nicht erfolgreich. Erst nach der Einführung eines Gradienten konnte eine Trennung erreicht werden. Pinoresinol (**6**) wurde erfolgreich isoliert (siehe Abbildung 5.15). Die MPLC verkürzte zwar die Aufreinigung, allerdings traten andere Probleme während der Trennung auf:

1. Hoher Verlust an Produkt im Verlauf der Chromatographie
2. Hoher Verbrauch an Lösungsmittel
3. Schlechte Reproduzierbarkeit

Aufgrund dieser Probleme wurden verschiedene alternative Trennverfahren erkundet (präparative DC, präparative HPLC und wiederholte Säulenchromatographie). Bei der präparativen DC wird die stationäre Phase wie bei einer normalen DC auf einer Oberfläche immobilisiert. Die präparative DC unterscheidet sich jedoch in Bezug auf die Größe (20x20 cm) sowie das Material der Oberfläche (Glas) und die Dicke der aufgetragenen Schicht (0.5-2 mm) von einer normalen DC. Die zu trennende Substanz wird als möglichst feine Linie in gelöstem Zustand aufgetragen. Der Ablauf ist identisch zu einer normalen DC. Nach der Trennung muss das Produkt von der Platte extrahiert werden. Dazu wird nach Identifikation der Produktbande die stationäre Phase vorsichtig von der Glasoberfläche abgetrennt. Die Extraktion kann dann mit einem geeigneten Lösungsmittel erfolgen. Die präparative DC ist eine sehr alte

Trennmethode und wird bereits seit dem späten 19. Jahrhundert mit großen Erfolg verwendet. Über die Wahl der geeigneten stationären und mobilen Phase können eine Vielzahl von Gemischen getrennt werden. Nachteile der präparativen DC sind jedoch ihre Beschränkung auf eine geringe Substanzmenge und der höhere apparative Aufwand im Vergleich zu anderen Techniken wie der Säulenchromatographie.^[182]

Die präparative HPLC unterscheidet sich nur in ihren Dimensionen von einer analytischen HPLC. Die präparative HPLC arbeitet mit größeren Substanzkonzentrationen, um die Ausbeute pro Zeiteinheit zu erhöhen. Die Vorteile einer präparativen HPLC liegen in ihrer hohen Trenneffizienz und der Fähigkeit, auch geringste Mengen trennen zu können. Die schlechte Skalierbarkeit limitiert allerdings ihre Anwendung erheblich.

Trotz zahlreicher Versuche gelang es nicht, eine erfolgreiche Trennung über präparative DC durchzuführen. Die Effizienz der Trennung war zu gering. Statt sauberer Produkte konnten nur Gemische erhalten werden. Auch nach wiederholten Trennungen mit verschiedenen mobilen Phasen konnte keine Verbesserung erreicht werden. Die präparative HPLC lieferte dagegen ein sehr sauberes Produkt. Aufgrund der Limitation der zu trennenden Substanzmenge ist sie jedoch ungeeignet. Demnach blieb nur die Säulenchromatographie als mögliche Trennmethode. Es gelang durch Optimierung der Trennung, beide Produkte innerhalb eines einzelnen Aufreinigungsschrittes in leicht erhöhten Ausbeuten (10 % für **6** und 12 % für **59**) im Vergleich zur Literatur zu isolieren. Anschließend wurden weitere Optimierungen durchgeführt.

5.3.1.1 Vergleich verschiedener Laccasen

Zunächst wurden verschiedene Laccasen im Hinblick auf ihre Bildung von Pinoresinol untersucht. Obwohl Laccasen normalerweise keinen Einfluss auf die Dimerisierung ausüben, sollte untersucht werden ob aufgrund des Oxidationspotenziales bzw. der Reaktionsbedingungen Änderungen im Produktspektrum auftreten. Untersucht wurden die Laccasen aus *A. bisporus*, *T. versicolor*, *P. ostreatus* und *S. sviveus*. Die ersten drei sind kommerziell erhältlich, während die letzte von Gunne *et al.* isoliert wurde und bereits in unserer Arbeitsgruppe verwendet wurde.^[80, 116, 181, 183]

Die Tests wurden unter Optimalbedingungen für jede Laccase mit einer Enzymaktivität von 2U durchgeführt. Nach 2h wurden die Reaktionen gestoppt und die Bildung der Produkte ()-Dehydrodiconiferylalkohol [()-**59**] und ()-Pinoresinol [()-**6**] sowie des Eduktes Coniferylalkohol (**4**) mittels HPLC untersucht. Die Quantifizierung erfolgt dabei anhand des internen Standards Benzophenon (siehe Tabelle 5.6).

Alle getesteten Laccasen wiesen überraschenderweise große Unterschiede im Produktspektrum auf. Keine Laccase setzte das Edukt **4** im Laufe der Reaktion vollständig um, allerdings variiert die Menge an verbleibendem Coniferylalkohol (**4**) sehr stark. Die Reaktion mit Laccase aus *T. versicolor* wies mit 26 % die größte Menge an Coniferylalkohol auf, gefolgt von der Reaktion mit Laccase aus *S. sviveus* mit 24 %. Die beiden anderen Reaktionsansätze wiesen ähnliche Mengen an Coniferylalkohol (**4**) (9.8 % und 9.7 %) auf, die damit knapp zwei Drittel geringer waren. Auch in der Bildung des Produktes **59** unterschieden sich alle Ansätze. Die Laccase aus *T. versicolor* bildete mit 27.4 % die größte Menge, gefolgt von *A. bisporus* dessen Bildungsrate jedoch um ein Drittel niedriger lag (18.2 %). *P. ostreatus* bildete mit 9.7 % noch weniger Produkt **59**. Die Laccase aus *S. sviveus* bildete mit 1.4 % eine Menge die nur knapp über dem Detektionslimit lag. Die größten Unterschiede waren bei der Bildung von ()-Pinoresinol [()-**6**] zu beobachten. Während die Laccase aus *T. versicolor* mit 12.3 % die

Tabelle 5.6: Vergleich der Bildung der beiden Produkte ()-Dehydrodiconiferylalkohol [()-**59**] und ()-Pinoresinol [()-**6**], sowie des noch vorhandenen Eduktes Coniferylalkohol (**4**), durch verschiedene Laccasen. ¹ = Natriumacetatpuffer (100 mM, pH 5.0), ² = Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 6.0), ³ = Natriumcitratpuffer (100 mM, pH 5.8), ⁴ = Glycin-Natriumhydroxidpuffer (100 mM, pH 9.0).

	<i>A. bisporus</i> ¹	<i>T. versicolor</i> ²	<i>P. ostreatus</i> ³	<i>S. sviveus</i> ⁴
Coniferylalkohol (4)	9.8	26.0	9.7	24.0
()-Dehydrodiconiferylalkohol (59)	18.2	27.4	9.7	1.4
()-Pinoresinol (6)	3.7	12.3	0.4	1.9

größte Produktmenge bildete, lag die Rate von *A. bisporus* mit 3.7% bereits deutlich niedriger. Die Bildungsrate von *P. ostreatus* lag mit 1.9% nahe dem Bereich der Messungenauigkeit und die von *S. sviveus* war mit 0.4% zu vernachlässigen.

Zusammenfassend lässt sich die Laccase aus *T. versicolor* klar als am besten geeignet identifizieren. Sie bildet die größte Menge an gewünschtem Produkt **6** und auch die mit Abstand die größte Menge Nebenprodukt in der gegebenen Zeit. Zudem kann die Bildung vermutlich noch weiter gesteigert werden, da noch eine größere Menge an Edukt **4** identifiziert wurde. Alle anderen Laccasen sind aufgrund ihrer geringen Bildungsrate für das Produkt **6** nicht für die Produktion geeignet. Diese Ergebnisse sind durchaus überraschend, da die Laccasen lediglich das Substrat oxidieren und ansonsten keinen Einfluss auf das Produktspektrum ausüben.^[36]

5.3.1.2 Verwendung von Hexafluorisopropanol

Cross-dehydrogenative couplings ermöglichen die direkte Knüpfung von C-C Bindungen aus nicht aktivierten C-H Bindungen. Aufgrund der hohen Atomökonomie der Kupplung nimmt ihre Beliebtheit in der organischen Chemie stetig zu. Ein Problem ist jedoch die mangelnde Selektivität in den radikalischen Bindungsknüpfungen. Fluorierte Lösungsmittel (z. B. 1,1,1,2,2,2-Hexafluorisopropanol (HFIP) oder 2,2,2-Trifluorethanol (TFE)) werden in solchen Fällen häufig als Lösungsmittel verwendet. Fluorierte Alkohole sind in der Lage, die Aktivierungsenergie der Oxidation zu senken (siehe Abbildung 5.16). Dies erlaubt die Reaktion unter mildereren Bedingungen, was die Selektivität erhöhen kann.^[184, 185]

Es wurden drei verschiedene Konzentrationen (10, 50 und 100%) an HFIP (**61**) als Cosolvens getestet. Die Reaktionen wurden unter den zuvor etablierten Bedingungen durchgeführt und alle 30 min wurde eine Probe entnommen. Nach der Aufarbeitung wurde die Bildung von ()-Pinoresinol [()-**6**] mittels HPLC untersucht. Dabei wurde wieder Benzophenon als interner Standard verwendet. Bei keiner Probe konnte eine Bildung von ()-Pinoresinol [()-**6**] nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde ein Verbrauch von Coniferylalkohol gemessen, ohne dass eine korrespondierende Steigerung eines Produktes zu erkennen war. Denkbar ist daher, dass eine Polymerisierung auftrat, welche nicht detektiert werden konnte. Die Versuche mit HFIP (**61**) wurden daher nicht weitergeführt.

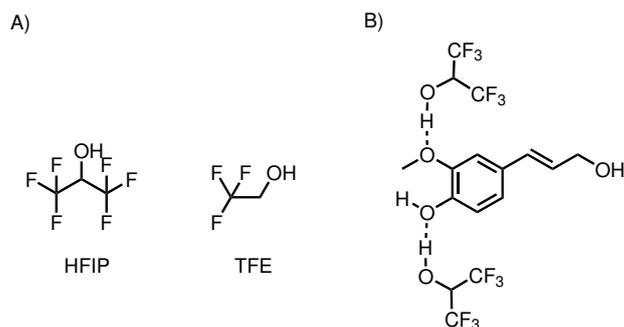


Abbildung 5.16: A) Fluorierte Alkohole HFIP und TFE B) Mögliche Wechselwirkung von HFIP mit Coniferylalkohol (**4**) adaptiert nach Libman *et al.*

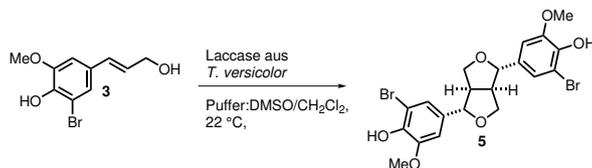
5.3.2 Synthese von Dibrompinoresinol

Zur Dimerisierung von 5-Bromconiferylalkohol (**3**) gibt es soweit bekannt keinerlei Untersuchungen, jedoch ist aufgrund der Ähnlichkeit zu Coniferylalkohol ein ähnliches Produktspektrum zu erwarten. Allerdings ist die Bildung des Produktes **59** durch das Brom in 5-Position nicht möglich, was zu einem Anstieg des Pinoresinolanteiles am Produktgemisch führen könnte. Zudem sollte durch die Blockierung der Position die Polymerisierung, welche bei der Synthese von Pinoresinol (**6**) ein großes Problem darstellt, vermieden werden.^[186]

Die ersten Versuche der Dimerisierung zum 5,5'-Dibrompinoresinol (**5**) waren nicht erfolgreich. Daher mussten einige Anpassungen durchgeführt werden. Aufgrund der Löslichkeit des Eduktes **3** musste das Cosolvens von Ethanol auf DMSO geändert werden. Unerwarteter Weise trat bei vollständiger Umsetzung eine Farbänderung in der Suspension auf. Dies ermöglichte es den Umsatz visuell zu verfolgen (siehe Abbildung 5.17). Die Menge an Laccase wurde leicht erhöht, da die Reaktion sehr viel langsamer verlief. Die folgenden Ausbeuten waren mit 5 % **5** zunächst sehr viel niedriger als erwartet (siehe Tabelle 5.7, 1). Eine Erhöhung des Cosolvensanteiles steigerte die Ausbeute nur minimal auf 7%, während einer Erhöhung der Verdünnung einen massiven Anstieg der Ausbeute auf bis zu 35 % zur Folge hatte (siehe Tabelle 5.7, 2 & 3). Eine weitere Verdünnung würde zu einer erheblichen Volumenvergrößerung führen. Tests mit großen Volumen zeigten allerdings Ausbeuteverluste, weshalb keine weiteren Versuche in diese Richtung unternommen wurden. Der Bromsubstituent in 5-Position führt also zum erwarteten Anstieg in der Pinoresinolderivatmenge im Produktgemisch. Ein qNMR (siehe Kapitel 5.4.1) zeigte eine Reinheit des Produktes von ca. 60 %. Über einen einfachen Waschschrift mit Chloroform nach der Säulenchromatographie konnte die Reinheit auf gesteigert werden. Die Ausbeute sank dadurch auf (siehe Tabelle 5.7, 4). Zusammenfassend gelang es, ein bisher noch nicht beschriebenes Pinoresinolderivat **5** ausgehend von kommerziell erhältlichem Edukt **3** in 24 % Ausbeute zu synthetisieren. Die Ausbeute übertrifft dabei wie von uns erwartet die Literaturangaben zu vergleichbaren Synthesen von ()-Pinoresinol [()-**6**] deutlich (siehe Tabelle 5.7, 1-4). Trotz der erfolgreichen Umsetzung wurde versucht die Ausbeute noch weiter zu steigern.

Eine enzymatische Zwei-Phasenreaktion kann zur Steigerung der Ausbeute führen.^[183] Aus diesem Grund wurde die Verwendung von Dichlormethan als organisches Lösungsmittel getestet. Ein erster Versuch zeigte jedoch keinerlei Umsatz auch nach sehr viel längerer Reaktionszeit. Es ist anzunehmen, dass das Edukt **3** nicht in ausreichender Menge in der wässrigen Phase vorliegt (siehe Tabelle 5.7, 5).

Tabelle 5.7: Optimierung der Produktion von ()-5,5'-Brompinoresinol [()-**5**] aus **3**; ¹ = Natriumacetat-Puffer (100 mM, pH 6.0); ² = Zugabe von 1.8 Äq. β -Cyclodextrin



Nummer	Substrat	Laccase	Cosolvens	Volumen [mL]	Ausbeute
1	0.77 mmol Bromconiferylalkohol (3)	14 U/mmol <i>T. versicolor</i> ¹	2 % DMSO	102	5 % 5
2	1.16 mmol Bromconiferylalkohol (3)	14 U/mmol <i>T. versicolor</i> ¹	10 % DMSO	165	7 % 5
3	0.77 mmol Bromconiferylalkohol (3)	14 U/mmol <i>T. versicolor</i> ¹	10 % DMSO	165	35 % 5 (21 % nach Waschen)
4	1.93 mmol Bromconiferylalkohol (3)	25 U/mmol <i>T. versicolor</i> ¹	10 % DMSO	165	24 % 5
5	0.77 mmol Bromconiferylalkohol	14 U/mmol <i>T. versicolor</i> ¹	33 % CH ₂ Cl ₂	150	kein Umsatz
6	0.77 mmol Bromconiferylalkohol (3) ¹	14 U/mmol <i>T. versicolor</i> ¹	10 % DMSO	165	7 % 5 , 16 % 3
7 ²	0.77 mmol Bromconiferylalkohol (3)	14 U/mmol <i>T. versicolor</i> ¹	10 % DMSO	165	12 % 5 , 19 % 3



Abbildung 5.17: Vergleich der Dimerisierung von 5-Bromconiferylalkohol (**3**) zu Beginn (links) und nach vollständigem Umsatz (rechts)

5.3.2.1 Zugabe von Cyclodextrin

Ein großes Problem in der Synthese von ()-Pinoresinol [()-**6**] mittels Laccase ist die aus der Überoxidation resultierende Polymerisierung. Da bei der Nutzung von Laccasen keine Kontrolle der Oxidationsäquivalente möglich ist, muss dieses Problem anderweitig gelöst werden. Einen möglichen Ansatz zeigten Tarrago *et al.*^[186] Sie verwendeten Cyclodextrine, um ()-Pinoresinol [()-**6**] nach der Bildung vor weiterer Oxidation zu schützen. Cyclodextrine sind eine Klasse cyclischer Oligosaccharide, die aufgrund ihrer Struktur als Einschlussverbindungen Verwendung finden.

Es sollte untersucht werden, ob ein ähnlicher Effekt bei der Synthese von ()-5,5'-Brompinoresinol [()-**5**] zu beobachten ist. Zunächst wurde der von Tarrago *et al.* entwickelten Assay mit 5-Bromconiferylalkohol (**3**) wiederholt. Nach jeder Stunde wurde eine Probe der Reaktion genommen und mittels HPLC untersucht. In allen Tests trat ein Maximum an Produkt nach 6 h auf. Die Proben nach 7 und 8 h wiesen ein stark reduziertes Level an ()-5,5'-Dibrompinoresinol [()-**5**] auf, vermutlich aufgrund von Überoxidation und damit verbundenen Nebenreaktionen. Alle Testreaktionen mit Cyclodextrin (, oder) zeigten eine verstärkte Bildung von ()-5,5'-Dibrompinoresinol [()-**5**] im Vergleich zur Kontrollreaktion. Die Reaktionen mit Cyclodextrin wiesen erwartungsgemäß die größte Menge an Produkt **5** auf, im Maximum fast doppelt so viel wie die Kontrollreaktion. und Cyclodextrin zeigten im Maximum eine nahezu identische, um ca. ein Drittel erhöhte Konzentration.

Nachdem eine vermehrte Bildung von ()-5,5'-Dibrompinoresinol [()-**5**] im Assay nachgewiesen werden konnte, sollte eine präparative Umsetzung stattfinden. Aufgrund von Löslichkeitsproblemen beim *Upscaling* mussten die Cyclodextrinäquivalente von 5 auf 1.85 reduziert werden. Die Testreaktion und Kontrollreaktion wurden nach 3 h gestoppt, nachdem kein Um-

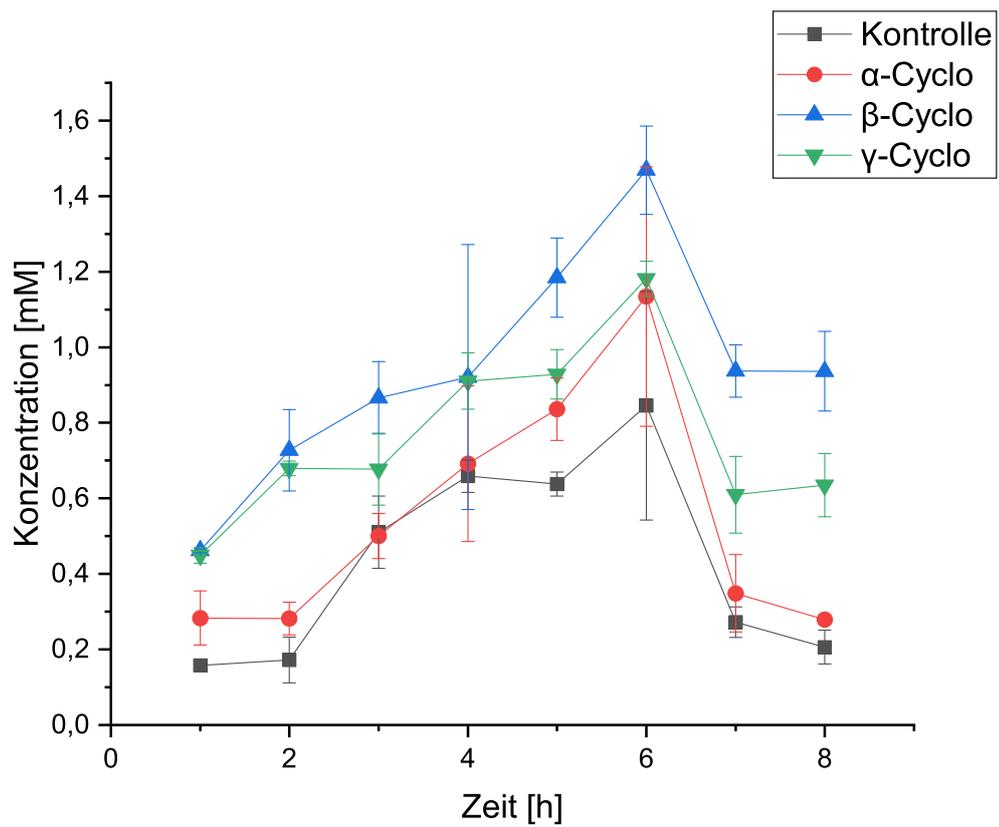


Abbildung 5.18: Über RP-HPLC bestimmte Konzentrationen an 5,5'-Dibrompinoresinol(5) mit und ohne Zugabe der verschiedenen Cyclodextrine

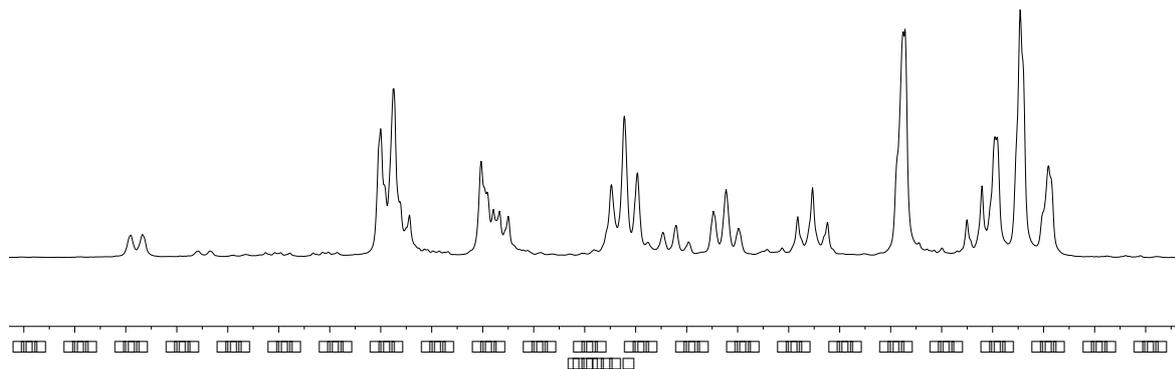


Abbildung 5.19: Ausschnitt des aromatischen Bereichs eines NMR-Spektrums des einfach gesäulten Gemisches.

satz mehr nachzuweisen war. Nach der Isolation und Aufreinigung der Produkte konnte eine Steigerung der Ausbeute um 9 % nachgewiesen werden (siehe Tabelle 5.7, Reaktionsnummer 6 & 7). Die Steigerung der Ausbeute ist zwar signifikant, ist allerdings ohne eine Möglichkeit der Rückgewinnung des eingesetzten Cyclodextrins aufgrund der verbundenen Kosten nicht empfehlenswert.

5.4 Dibrompinoresinolderivatisierung

5.4.1 Suzuki-Kupplung

5.4.1.1 Reaktionsoptimierung

Nach Erhalt des 5,5'-Dibrompinoresinols (**5**) sollte dieses semisynthetisch weiter umgesetzt werden. Die Suzuki-Kreuzkupplung wurde aufgrund der Toleranz funktioneller Gruppen und der Bandbreite an kommerziell verfügbaren Borverbindungen ausgewählt. Für die ersten Tests zur Umsetzung von 5,5'-Dibrompinoresinol (**5**) wurde Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) als Katalysator und Dinatriumcarbonat als Base ausgewählt. Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) ist ein häufig verwendeter, relativ stabiler Palladium(0)-Katalysator. Um Probleme bei der Bildung der aktiven Katalysatorspezies zu vermeiden, wurde auf die Verwendung der üblicheren Palladium(II)salze verzichtet und es wurden stattdessen direkt Palladium(0)katalysatoren verwendet. Phenylboronsäure wurde als Reaktionspartner gewählt. Arylische Boronsäuren zeigen eine hohe Aktivität in der Suzuki-Kreuzkupplung und verhindern das Auftreten von Nebenreaktionen wie der β -Hydrideliminierung. Drei verschiedene Temperaturen (und °C) wurden getestet (siehe Tabelle 5.8, 1-3). In allen Reaktionen wurde ein Umsatz mittels DC beobachtet. Die chemischen Verschiebungen im aromatischen System sowie die Intensitätsverteilung der Signale deutet auf die Anwesenheit mehrerer Produkte hin (siehe Abbildung 5.19). Die wahrscheinlichste Ursache dafür ist die unvollständige Umsetzung des Eduktes **5**, wodurch neben dem gewünschten doppelt gekuppelten Produkt **62** auch das einfach gekuppelte Nebenprodukt **63** auftritt. Eine Trennung der Substanzen gelang aufgrund der geringen Unterschiede in den R_f -Werten zunächst nicht. Es war nicht möglich, die verschiedenen Verbindungen in einer Säulenchromatographie zu trennen. Aufgrund der geringen Ansatzgröße konnten auch nicht mehrere Aufreinigungsschritte nacheinander durchgeführt werden.

Um eine ausreichende Menge an Produkt für wiederholte Säulenchromatographien zu erhalten, wurden mehrere vorgereinigte Gemische vereinigt. Nach einer Reihe von Säulenchromatographieschritten und einer präparativen DC war es möglich geringe Mengen an doppelt

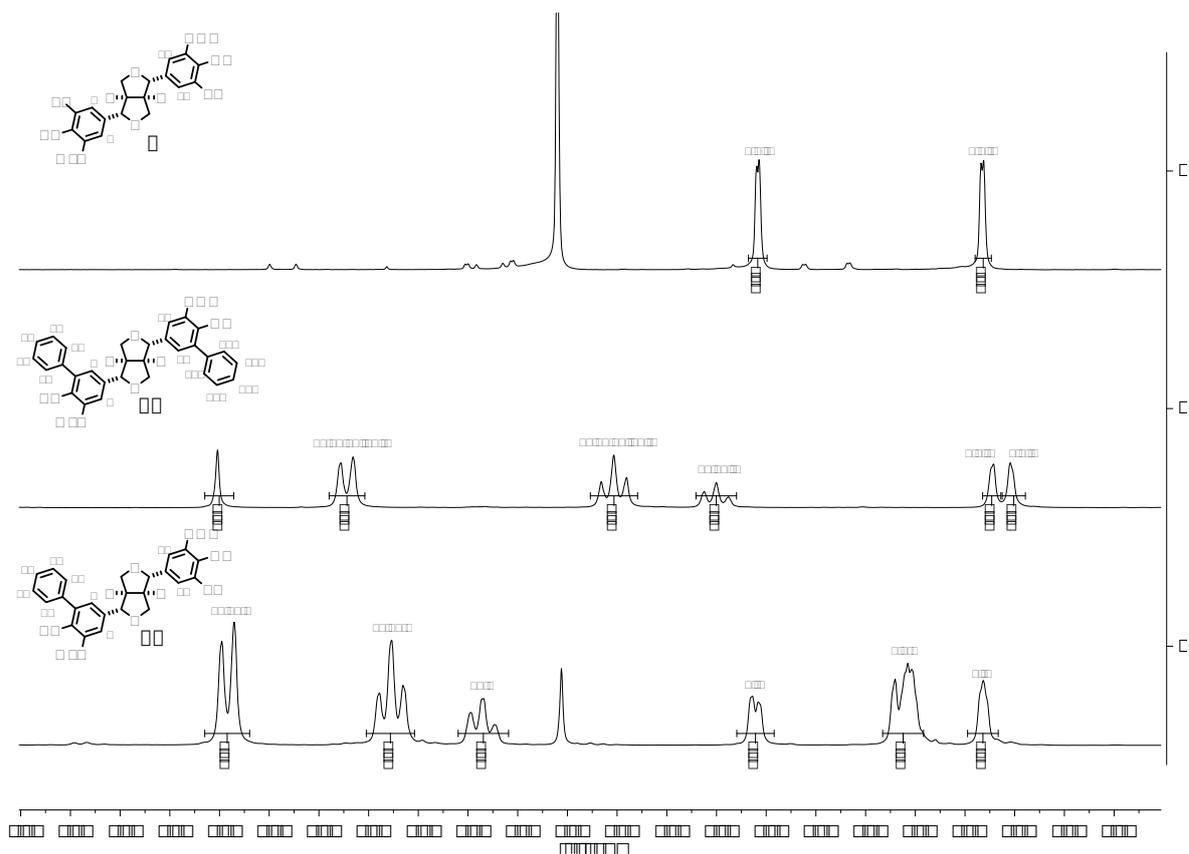
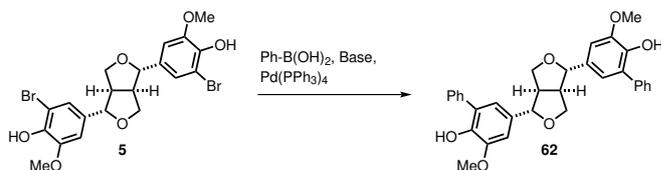


Abbildung 5.20: Ausschnitt des aromatischen Bereichs eines NMR-Spektrums (600 MHz) von 5,5'-Dibrompinoresinol (**5**), 5,5'-Diphenylpinoresinol (**62**) und 5'-Brom-5-phenylpinoresinol (**63**) (oben nach unten). Der nicht markierte Peak bei 7.26 in 1 und 3 stellt das Lösungsmittel CDCl_3 dar.

gekuppeltem Produkt und einfach gekuppeltem Nebenprodukt zu erhalten. Dehalogeniertes Nebenprodukt konnte nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.20). In der Vergrößerung des aromatischen Bereichs ist die Verschiebung der 2- und 6-H Signale deutlich zu erkennen. Die Signalintensitäten zeigen eindeutig die einfache bzw. doppelte Kupplung.

Mithilfe der chemischen Verschiebungen beider Produkte war es nun möglich, die Verhältnisse für die verschiedenen Temperaturen zu bestimmen. Anhand der Produkt-Nebenprodukt-Edukt Verhältnisse wurde 0°C als Temperatur für zukünftige Reaktionen gewählt (siehe Tabelle 5.8, 1-3). Als nächstes wurden alternative organische Lösungsmittel getestet. MeOH und 1,4-Dioxan wurden anstelle von THF verwendet. Bei der Verwendung von MeOH als Lösungsmittel erhöhte sich die Rate an Produkt geringfügig, weswegen es für zukünftige Reaktionen verwendet wurde (siehe Tabelle 5.8, 4 & 5). Fluoridbasen werden häufig in Suzuki-Kupplungen verwendet und zeigen meist höhere Ausbeuten im Vergleich zu Carbonatbasen. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte die höhere Aktivität von gemischten Hydroxy-Fluorid-Borverbindungen in der Transmetallierung sein, welche bei Trifluorboratsalzen beobachtet wird (siehe 4.3.2).^[187] In diesem Fall sank zwar der Umsatz des Eduktes im Vergleich zur vorherigen Reaktion, allerdings konnte eine doppelt so große Menge an gebildetem Produkt nachgewiesen werden. Daher wurden Cäsiumfluorid und Methanol in nachfolgenden Versuchen verwendet (siehe Tabelle 5.8, 6 & 7). Aufgrund des immer noch unvollständigen Umsatzes wurde eine Erhöhung der Menge an Katalysator zu Beginn sowie nach mehreren Stunden getestet. Aus dem gleichen Grund wurden die Äquivalente an Base und Boronsäure leicht er-

Tabelle 5.8: Vorscreening für die Suzuki-Reaktion von ()-5,5'-Dibrompinoresinol [()-**5**]; ¹ = bestimmt durch NMR

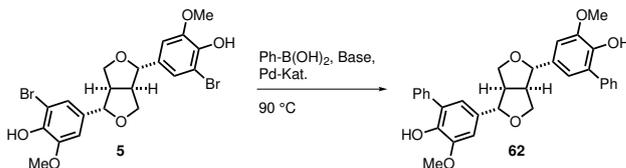
	Äq. PhB(OH) ₂	Base	Äq. Pd(PPh ₃) ₄	Lösungsmittel	T [°C]	Umsatz [Verhältnis]
1	3	6 Äq. Na ₂ CO ₃	0.1 Äq.	THF:Wasser 9:1		3:1 63 : 62 ¹
2	3	6 Äq. Na ₂ CO ₃	0.1 Äq.	THF:Wasser 9:1		1:4 63 : 62 ¹
3	3	6 Äq. Na ₂ CO ₃	0.1 Äq.	THF:Wasser 9:1		1:1 63 : 62
4	3	6 Äq. Na ₂ CO ₃	0.1 Äq.	1,4-Dioxan: Wasser 9:1		1:2.5 63 : 62 ¹
5	3	6 Äq. Na ₂ CO ₃	0.1 Äq.	MeOH:Wasser 9:1		1:3 5 : 62 ¹
6	3	6 Äq. CsF	0.1 Äq.	1,4-Dioxan: Wasser 9:1		1:2 5 : 62 ¹
7	3	6 Äq. CsF	0.1 Äq.	MeOH:Wasser 9:1		1:1 5 : 62 ¹
						Ausbeute
8	5	8 Äq. CsF	2x 0.1 Äq.	MeOH:Wasser 9:1		6 % 5 , 23 % 63 , 10 % 62
9	5	8 Äq. CsF	0.2 Äq.	MeOH:Wasser 9:1		Spuren 63 , 5 % 62
10	5	8 Äq. CsF	2x 0.1 Äq.	MeOH:Wasser 9:1		13 % 63 , 20 % 62

höht, um Verluste durch Nebenreaktionen auszugleichen. Die Erhöhung des Katalysators zu Beginn der Reaktion brachte keine Verbesserung. Die erneute Zugabe nach mehreren Stunden Reaktionszeit steigerte den Umsatz jedoch maßgeblich auf 23 % **63** und 10 % **62** (siehe Tabelle 5.8, 8 & 9). Da eine Korrelation zwischen Temperatur und Produktbildung erkennbar war, wurden auch 100 °C (siehe Tabelle 5.8, 10) und 120 °C untersucht. Die Reaktion bei 120 °C war aufgrund der Evaporation des Lösungsmittels nicht erfolgreich (Ergebnisse nicht gezeigt), während bei 100 °C eine deutliche Steigerung der Produktbildung auf 20 % zu beobachten war (siehe Tabelle 5.8, 10). Allerdings war eine Abtrennung des monosubstituierten Nebenproduktes **63** (13 %) erneut nicht möglich.

Die Versuche im Screening verliefen äußerst positiv. Es gelang das gewünschte Produkt in wenigen Versuchen herzustellen. Allerdings zeigte es auch die Problematik der Trennung von Edukt **5**, Neben- **63** und Hauptprodukt **62**. Säulenchromatographie ist keine geeignete Trennmethode für die Produkte. Die Umsätze waren äußerst gering, könnten aber im Verlauf der nachfolgenden Optimierung noch angehoben werden.

Für die Optimierung wurde auf eine bereits zuvor verwendete Trennmethode zurückge-

Tabelle 5.9: Optimierung der Suzuki-Reaktion von ()-5,5'-Brompinoresinol [()-**5**]; ¹ = Aufreinigung mit präparativer DC; ² = 4,4'-Di*O*-acetyl-5,5'-dibrompinoresinol (**64**) als Substrat.



	Äq. PhB(OH) ₂	Base	Pd-Kat.	Lösungsmittel	Ausbeute
1	5 Äq.	8 Äq. CsF	0.1 Äq. Pd(PPh ₃) ₄	MeOH:Wasser 9:1	22 % 62 ¹
2	17 Äq.	20 Äq. CsF	0.1 Äq. Pd(PPh ₃) ₄	MeOH:Wasser 9:1	19 % 62 ¹
3	5 Äq.	8 Äq. CsF	0.1 Äq. Pd(PPh ₃) ₄	MeOH:Wasser 1:1	12 % 62 ¹
4	17 Äq.	20 Äq. CsF	0.1 Äq. Pd(PPh ₃) ₄	MeOH:Wasser 1:1	21 % 62 ¹
5	3 Äq.	6 Äq. CsF	0.15 Äq. Pd(dppf)Cl ₂	MeOH:Wasser 9:1	Spuren 62 ¹
6	3 Äq.	6 Äq. K ₃ PO ₄	0.15 Äq. Pd(dppf)Cl ₂	MeOH:Wasser 9:1	5.6 % 63 , 1.8 % 62 ¹

griffen. Die präparative DC ist eine sehr alte Trennmethode, die besonders für geringe Substanzmengen geeignet ist. Boronsäuren können verschiedene Nebenreaktionen eingehen, was die Ausbeute der Reaktion senken kann. Um auszuschließen, dass die Boronsäure in unserer Reaktion limitierend ist, wurde die Reaktion mit 17 Äq. Boronsäure und 20 Äq. Base durchgeführt. Dabei konnte allerdings keine erhöhte Ausbeute gemessen werden (siehe Abbildung 5.9, Reaktionsnummer 1 & 2). Erstmals gelang dabei allerdings die Isolation von sauberem Produkt **62**. Gleichzeitig wurde auch eine Erhöhung des Wassergehaltes auf 1:1 getestet. Dabei ergab sich allerdings keine Steigerung im Produktgehalt (siehe Tabelle 5.9, Reaktionsnummer 3 & 4).

Zweizählige Liganden können aufgrund ihres sterischen Bedarfs zu erhöhten Ausbeuten führen (siehe Kapitel 4.3.1). Daher wurde der Pd(dppf)Cl₂-Katalysator getestet. Beim Pd(dppf)Cl₂-Katalysator handelt es sich um einen Pd(II)-Katalysator. Die Reduktion findet *in-situ* jedoch mit äußerst hoher Effizienz statt, weswegen er in einer Vielzahl von Publikationen verwendet wird.^[188–191] In zwei aufeinanderfolgenden Versuchen mit CsF und K₃PO₄ als Basen konnten nur geringe Mengen an unsauberem Produkt **62** isoliert werden (siehe Tabelle 5.9, Reaktionsnummer 5 & 6). Mit der präparativen DC konnte eine zufriedenstellende Trennmethode entwickelt werden. Damit gelang erstmalig die Isolation sauberen Produktes in einem einzelnen Aufreinigungsschritt. Trotz vollständigem Umsatz können jedoch nur Ausbeuten um 20 % erhalten werden. Veränderungen der Temperatur, Katalysator- bzw. Boronsäureäquivalente oder des Lösungsmittels haben nur geringfügige Auswirkungen auf die Produktbildung.

Die Optimierung der Reaktionsparameter hatte nicht den gewünschten Erfolg. Zur Steigerung der Ausbeuten sollten daher die Reaktanten systematisch variiert werden. Hydroxyl-

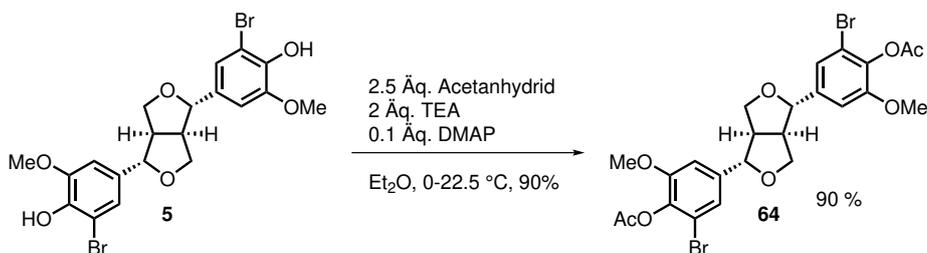


Abbildung 5.21: Synthese von 4,4'-Di-O-acetyl-5,5'-dibrompinoresinol (**64**) durch Acetylierung der beiden Hydroxylgruppen aus 5,5'-Dibrompinoresinol (**5**). DMAP = Dimethylaminopyridin, TEA = Triethylamin.

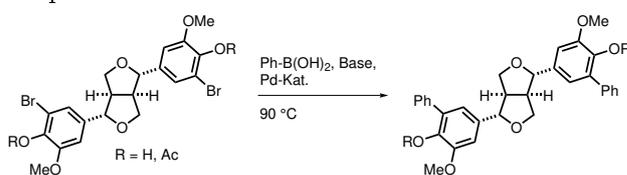
gruppen können Komplexe mit Palladiumkatalysatoren eingehen. Abhängig von der Stabilität des gebildeten Komplexes kann dies das Palladium komplett aus dem Katalysezyklus entfernen. Wir entschieden uns daher, die beiden Phenole zu schützen, um die Bildung derartiger Komplexe auszuschließen. Aufgrund des vergleichsweise geringen sterischen Anspruchs, sowie der einfachen synthetischen Handhabung wurde die Einführung einer Acetylschutzgruppe beschlossen (siehe Abbildung 5.21). Die Acetylschutzgruppe wurde ohne Probleme mit Ausbeute eingeführt. In einer Umsetzung mit Phenylboronsäure als Substrat konnte allerdings weder di- noch monosubstituiertes Produkt identifiziert werden. Zudem konnten nur des 4,4'-Di-O-acetyl-5,5'-dibrompinoresinol (**64**) reisoliert werden (siehe Tabelle 5.10, Reaktionsnummer 1).

Bei der Rückgewinnung des 4,4'-Di-O-acetyl-5,5'-dibrompinoresinol (**64**) konnten nur des Startmaterials zurückgewonnen werden. Aufgrund dieser unerwartet geringen Menge wurde eine Untersuchung der Reinheit des Eduktes **64** sowie des noch vorrätigen 5,5'-Dibrompinoresinol (**5**) mittels qNMR durchgeführt. Das qNMR zeigte eine Reinheit des 4,4'-Di-O-acetyl-5,5'-dibrompinoresinol (**64**) sowie des 5,5'-Dibrompinoresinol (**5**), von nur 60-70%. Säulenchromatographie von 4,4'-Di-O-acetyl-5,5'-dibrompinoresinol (**64**) blieb aufgrund der Unlöslichkeit des Produktes in gängigen Laufmitteln erfolglos. Stattdessen wurde das Produkt in Chloroform gelöst und über Filtration gereinigt. Nachfolgende qNMRs zeigten eine Reinheit von . Eine Säulenchromatographie von 5,5'-Dibrompinoresinol (**5**) führte ebenfalls zu keiner Steigerung der Reinheit. Die Entfernung dieser Verunreinigung gelang mit der Einführung eines Waschschrittes mit Chloroform, was die Reinheit auf erhöhte. Die gereinigten Verbindungen wurden anschließend in allen weiteren Versuchen verwendet.

Die langsame Freisetzung der Boronsäure durch Hydrolyse bei der Verwendung von Boronsäureestern kann sich positiv auf die Umsetzung auswirken (siehe Kapitel 4.3.2). Daher wurden die Verwendung von Phenylboronsäurepinakolester und Phenylboronsäure-1,3-propandiolester anstelle der Phenylboronsäure getestet. Dabei konnte im Falle von Phenylboronsäurepinakolester keinerlei Produktbildung, bzw. nur Spuren eines Produktes über NMR im Falle von Phenylboronsäure-1,3-propandiolester, nachgewiesen werden (siehe Tabelle 5.10, 2 & 3). Die Umsetzung von 4,4'-Di-O-acetyl-5,5'-dibrompinoresinol (**64**) wurde ab diesem Punkt aufgegeben, da kein wesentlicher Umsatz detektiert werden konnte.

Eine relativ weit verbreitete Klasse an Borverbindungen stellen die *N*-koordinierten Boronate dar. Aufgrund ihrer hohen Aktivität werden sie meist in komplexeren Reaktionen eingesetzt. Die Verwendung des Phenylboronsäure-MIDA-ester führte zu Produkt und

Tabelle 5.10: Optimierung der Suzuki-Reaktion von ()-5,5'-Dibrompinoresinol [()-**5**]; ¹ = bestimmt durch NMR; ² = Aufreinigung mit präparativer DC; ³ = 4,4'-DiO-acetyl-5,5'-dibrompinoresinol (**64**) als Substrat; ⁴ = Reinheit bestimmt über qNMR.



	Äq. RBR ²	Base	Pd-Kat.	Lösungsmittel	Ausbeute
1 ²	3 Äq. Phenyl- boronsäure	6 Äq. CsF	0.1 Äq. Pd(PPh ₃) ₄	MeOH:Wasser 9:1	10 % 62
2 ^{3,4}	3 Äq. Phenyl- boronsäure- pinakolester	6 Äq. CsF	0.1 Äq. Pd(PPh ₃) ₄	MeOH:Wasser 9:1	-
3 ^{3,4}	3 Äq. Phenyl- boronsäure- 1,3- propandiol- ester	6 Äq. CsF	0.1 Äq. Pd(PPh ₃) ₄	THF:Wasser 9:1	4 % 62
4 ⁴	3 Äq. Phenyl- boronsäure- MIDA-ester	6 Äq. K ₃ PO ₄	0.1 Äq. Pd(PPh ₃) ₄	1,4-Dioxan: Wasser 9:1	30 % 5 , 60 % 62
5 ⁴	5 Äq. Phenyl- boronsäure	8 Äq. K ₃ PO ₄	0.1 Äq. Bis(<i>tert</i> - Bu ₃ P)Pd(0)	1,4-Dioxan: Wasser 9:1	69 % 62

Edukt (siehe Tabelle 5.10, 4). Die Trennung beider Substanzen gelang dabei nur aufgrund der Verwendung von präparativer DC, welche jedoch bei größeren Ansätzen ungeeignet ist. Daher wurde versucht den Umsatz noch weiter zu steigern. Der Bis(tri-*tert*-butyl)phosphinpalladium(0)-Katalysator ist noch aktiver als der Tetrakistriphenylphosphinpalladium(0)-Katalysator. Durch die Verwendung dieses Katalysators konnte die Ausbeute, bei vollständigem Umsatz, auf gesteigert werden (siehe Tabelle 5.10, 5).

5.4.1.2 5,5'-Dibrompinoresinol (5) Derivatisierung

Mit den optimierten Bedingungen wurde eine Reihe von präparativen Reaktionen mit verschiedenen Boronsäuren durchgeführt (siehe Tabelle 5.22). Die Substrate wurden ausgewählt, um eine möglichst große Abdeckung verschiedenster Funktionalitäten zu erhalten. Arylboronsäuren mit unterschiedlichen Substituenten (elektronenziehend, elektronenschiebend oder Heteroaromaten) wurden getestet. Zusätzlich wurden einige vinyliche und alkyliche Boronsäuren verwendet, um die Limitationen des Systems herauszufinden. Die Fähigkeit des Systems, zwischen verschiedenen Halogenen zu unterscheiden, soll mit der Verwendung einer halogenierten Boronsäure getestet werden.

Die Reaktion wurde zuerst im größeren Maßstab (100 mg anstelle von 20 mg) mit Phenylboronsäure getestet. Nach vollständiger Umsetzung des Eduktes war es möglich das Produkt **62** in nahezu quantitativer Ausbeute (95 %) zu isolieren. Die deutlich höhere Ausbeute hängt vermutlich mit der einfacheren Handhabung im größeren Maßstab zusammen. Als nächstes wurde Methoxyphenylboronsäure als Arylboronsäure mit elektronenschiebendem Substituenten umgesetzt. Die Ausbeute des Produktes **64** war mit 88 % im sehr guten Bereich. Minimal darunter mit 84 % lag die Ausbeute an **65** bei der Verwendung der 4-Nitrophenylboronsäure. Eine höhere Ausbeute von 91 % für **66** konnte bei der Verwendung von 4-Carboxymethylphenylboronsäure erreicht werden. Die Ausbeute sank leicht bei der Verwendung des elektronenreichen Heteroaromaten 3-Thienylboronsäure auf 80 % von **67**. Tests mit 4-Pyridinylboronsäure, als elektronenarmen Heteroaromaten, waren nicht erfolgreich. Die Verwendung von alkylichen Boronsäuren (Butylboronsäure und Cyclopropylboronsäure) führten ebenfalls zu keiner Produkt- bzw. Nebenproduktbildung. Als Letztes wurden zwei vinyliche Boronsäuren umgesetzt. Weder bei *cis*-1-Propenboronsäure noch bei 3-Chlorvinylboronsäure war eine Bildung des Produktes zu beobachten.

Die Erklärung für die fehlende Umsetzung nicht arylischer Boronsäuren könnte im Mechanismus liegen. Im Schritt der Transmetallierung werden zwei verschiedene Mechanismen diskutiert. Carrow *et al.* konnten nachweisen, dass arylische Boronsäuren über den Oxo-Palladiummechanismus etwa viermal so schnell reagieren können wie über den Boronatmechanismus. Bislang konnten diese Ergebnisse noch nicht für vinyliche oder alkyliche Boronsäuren reproduziert werden. Es wäre daher denkbar, dass die Aktivierungsenergie für den Boronatweg zu hoch liegt um überwunden zu werden. In anderen Studien wurde auch ein Zusammenhang zwischen dem Umsatz und der Basenstärke gefunden. Vinyliche und alkyliche Boronsäuren benötigen häufig stärkere Basen als die arylischen Boronsäuren.

5.4.2 Toxizitätsassays

5.4.2.1 Toxizität gegenüber Mikroorganismen

Die Toxizität von Pinoresinol (**6**) enthaltenden Extrakten ist weitgehend bekannt und vielfach studiert worden.^[192, 193] Aufgrund der Schwierigkeiten in der Synthese wurden jedoch nur wenige Studien mit reinem Pinoresinol (**6**) durchgeführt. Eine Studie zur Toxizität von Pinoresinol (**6**) gegenüber verschiedenen in Lebensmitteln vorkommenden Bakterien wurde von Zhou *et al.* publiziert. Dabei wurde eine MIC von 31 µg gegenüber *E. coli* und 4 µg

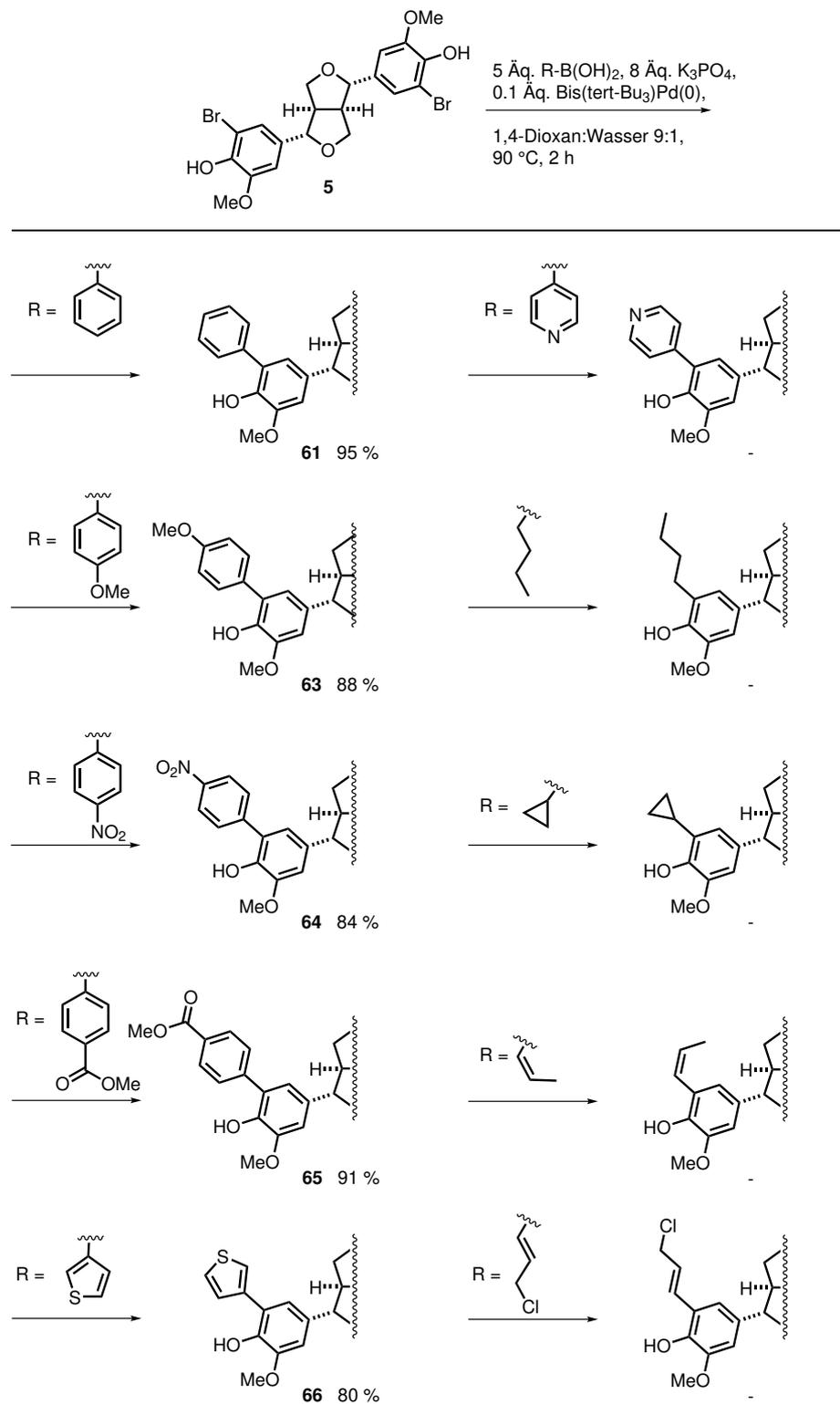


Abbildung 5.22: Ausbeuten der Suzuki-Kreuzkupplung von (S)-5,5'-Brompinoresinol [(S)-5] unter optimierten Bedingungen mit verschiedenen Boronsäuren.

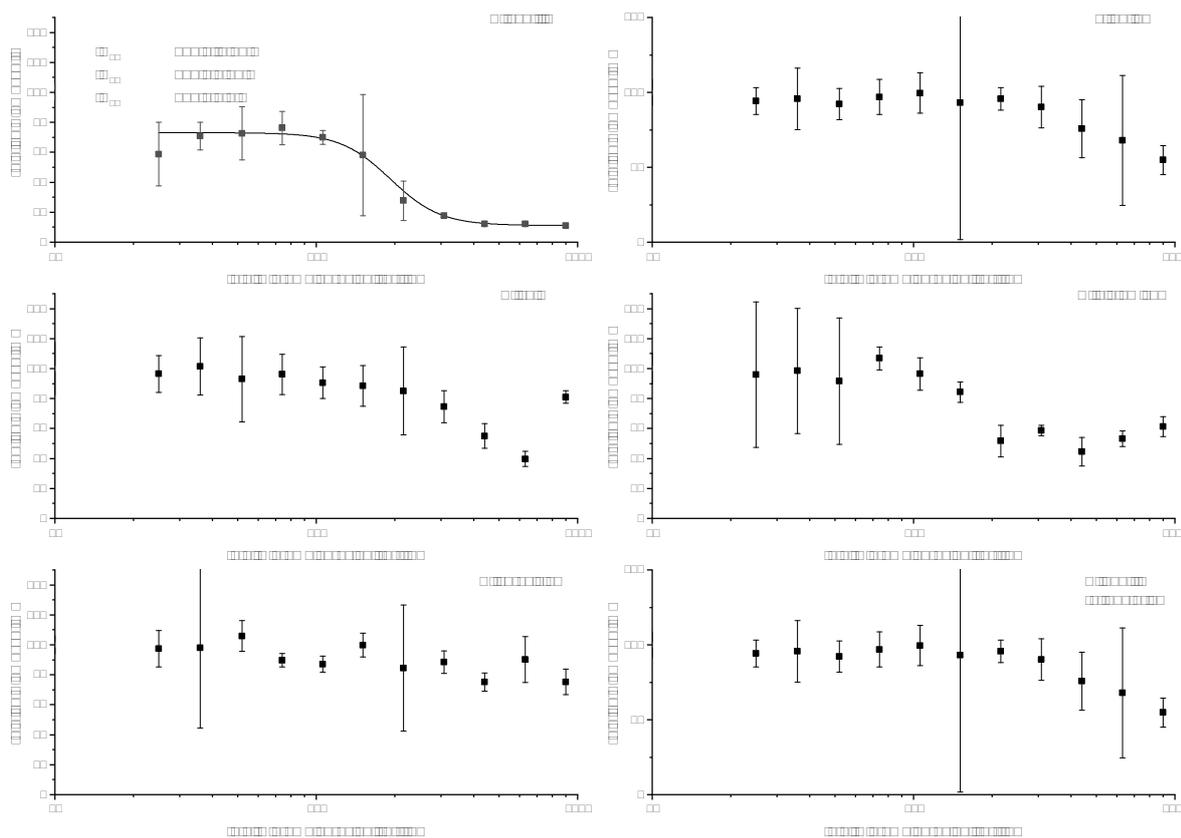


Abbildung 5.23: Toxizität von 5,5'-Dibrompinoresinol (**5**) gegenüber den Mikroorganismen *E. coli*, *P. putida*, *C. glutamicum*, *B. subtilis* und *S. cerevisae*.

gegenüber *Bacillus subtilis* nachgewiesen. Anhand von Gram-Färbungen und Elektronenmikroskopie wurde eine Zerstörung der Zellwand der behandelten grampositiven Bakterien als Wirkmechanismus postuliert.^[194]

Es wurde daher entschieden, die Toxizität der neuen Derivate zu bestimmen. Unter Nutzung von bereits publizierten Verfahren wurden die Derivate gegenüber fünf verschiedenen Mikroorganismen (*E. coli*, *Pseudomonas putida*, *C. glutamicum*, *B. subtilis* und *S. cerevisae*) getestet.^[195] Für die Tests wurde ein Mikrotiterplatten-basierter Assay gewählt. Dieser erlaubt die Aufnahme von Dosis-Wirkungs-Kurven zur Bestimmung des IC₅₀ Wertes als inhibitorische Kenngröße sowie des MICs. Die biologische Aktivität kann im Mikrotiterplatten-basierten Assay indirekt über die optische Dichte des Wachstumsmediums bestimmt werden. Dies stellt eine schnellere und genauere Auswertung der Daten im Vergleich zu den gängigen Agardiffusionstests sicher. Im Agardiffusionstest wird zu testende Substanz punktuell auf mit Mikroorganismen bewachsenes Nährmedium gegeben. Über die Größe des entstehenden Hemmhofes kann die Stärke der biologischen Aktivität bestimmt werden. *E. coli* und *P. putida* decken den Bereich der gramnegativen Bakterien ab, *Corynebacterium glutamicum* und *B. subtilis* den der grampositiven und *S. cerevisae* die Hefen. *E. coli* stellt den gängigsten gramnegativen Modellorganismus dar. *C. glutamicum* und *B. subtilis* sind ebenfalls Modellorganismen und gründlich untersucht.^[196-198] *C. glutamicum* wird vielfach als Modellorganismus für verschiedene pathogene Organismen verwendet (*Corynebacterineae*, *Mycobacterium tuberculosis* u. a.). Für das Experiment wurden Kulturen der jeweiligen Bakterien in LB-Flüssigmedium mit verschiedenen Konzentrationen eines Derivates, in DMSO gelöst, versetzt. Als Wachstumskontrolle diente eine Kultur ohne Zugabe des Derivats.

Zunächst wurde die Toxizität von 5,5'-Dibrompinoresinols (**5**) bestimmt. Nach Auswertung der Toxizitätsergebnisse war es nur im Fall von *B. subtilis* möglich eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von μM zu bestimmen. Eine Inhibition des bakteriellen Wachstums war ab einer Konzentration von $440 \mu\text{M}$ sichtbar. Eine Aussage zum Wirkmechanismus lässt sich aus diesen Ergebnissen ohne weitergehende Untersuchung nicht schließen. Für *P. putida*, *E. coli* und *C. glutamicum* ist eine Inhibition nur bei den höchsten Konzentrationen sichtbar. Eine Kalkulation eines IC_{50} ist aufgrund der teilweise stark schwankenden Werte nicht möglich. Lösungen mit höheren Konzentrationen zeigten das Erreichen des Löslichkeitslimits, weswegen keine weiteren Versuche in dieser Richtung durchgeführt wurden. Bei *S. cerevisiae* konnte keine signifikante Inhibition des Wachstums auch bei den höchsten Konzentrationen festgestellt werden (siehe Abbildung 5.23). Im Vergleich zur Literatur zeigt sich, dass 5,5'-Dibrompinoresinol (**5**) eine geringerer Toxizität als Pinoresinol (**6**) besitzt.

Abschließend wurde die Toxizität der fünf Produkte 5,5'-Diphenylpinoresinol (**62**), 5,5'-Di(4,4'-methoxyphenyl)-pinoresinol (**64**), 5,5'-Di(4,4'-(methoxycarbonyl)-phenyl)-pinoresinol (**66**), 5,5'-Di(4-nitrophenyl)-pinoresinol (**65**) und 5,5'-Di-(3-thienyl)-pinoresinol (**67**) nach der selben Methodik untersucht. Aufgrund von Problemen mit der Löslichkeit der Substanzen musste die höchste Konzentration von $900 \mu\text{M}$ auf $300 \mu\text{M}$ abgesenkt werden. Bedauerlicherweise konnte bei keinem der Produkte eine Toxizität im Rahmen der Löslichkeit festgestellt werden.

5.4.2.2 Einfluss auf Autophagieinduktion und den *Hedgehog* Signalweg

Die Studien zum Einfluss auf die Autophagieinduktion und den *Hedgehog* Signalweg durch Pinoresinolderivate wurden am *Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie* in Dortmund in der Abteilung für *Chemische Biologie* und am *Compound Management And Screening Center* (COMAS) von Dr. Luca Laraia und Dr. Sonja Sievers durchgeführt.

Autophagie ist der kontrollierte Abbau von Zellbestandteilen in Eukarya. Dabei werden nicht mehr benötigte, fehlerhafte oder schädliche Bestandteile zunächst von einer Doppelmembran umschlossen. Das so entstandene Organell wird als Autophagosom bezeichnet. Die Fusion mit einem Lysosom liefert dann die notwendigen Abbauenzyme. Nach der Fusion spricht man vom Autolysosom. Die beim Abbau entstehenden Nährstoffe werden von der Zelle zurückgewonnen und wiederverwendet. In der Krebstherapie kann die Inhibition der Autophagie zur Erhöhung der Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika führen. Einen bekannten Autophagieinhibitor stellt das Antimalariamittel Chloroquin dar.^[199–202]

Die Auswirkungen der Pinoresinolderivate auf die Autophagie wurde mithilfe von transfizierten eGFP-LC3 MCF-7-(Brustkrebs)-Zellen untersucht, bei denen künstlich Autophagie induziert wurde. Die Autophagie wird dabei über die Fluoreszenz des *enhanced green fluorescent protein* (eGFP), welches über einen Linker mit dem Autophagie assoziierten Protein *microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B* (LC3) verbunden ist, nachgewiesen. LC3 ist ein Markerprotein der Autophagie und findet sich bei der Bildung der Autophagosomen auf der Außenseite des Organells assoziiert mit der Membran. Die Fusion mit eGFP ermöglicht die direkte Beobachtung der Bildung der Autophagosomen über die Zunahme der Fluoreszenz. Über eine Änderung der Fluoreszenz kann dabei die Auswirkung auf die Autophagie gemessen werden. Bei der Analyse der Daten erfolgt zunächst eine Einzelanalyse, bevor der Mittelwert über ein *well* gebildet wird. Dazu werden vier Bilder pro *well* aufgenommen, wobei in jedem ca. 100 Zellen sichtbar sind (siehe Abbildung 5.24).

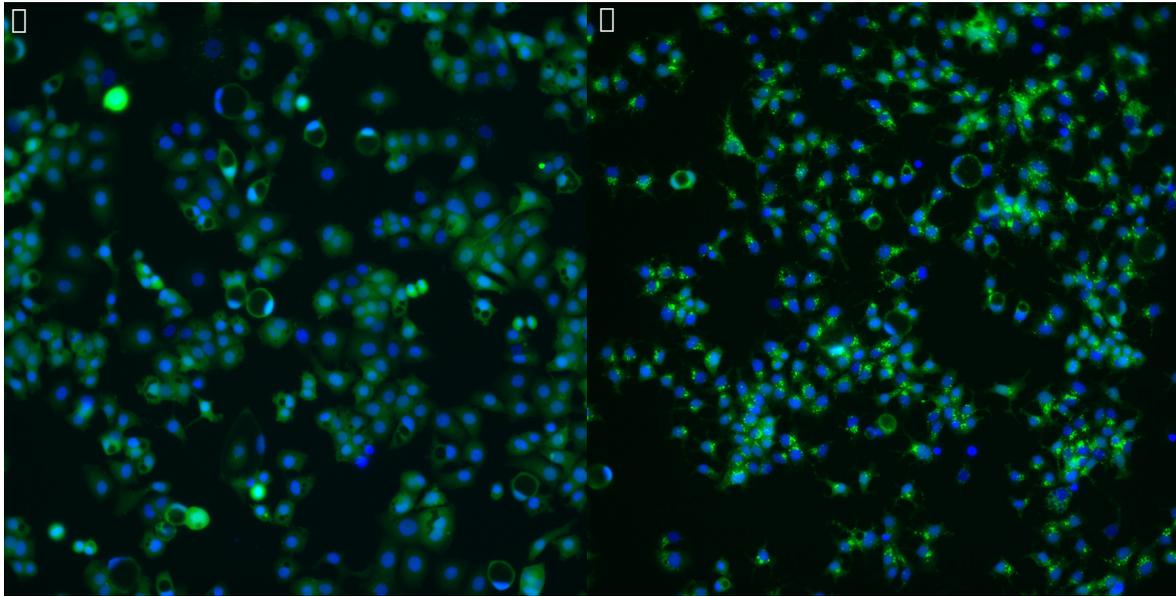


Abbildung 5.24: Mikroskopieaufnahmen von eGFP-LC3 MCF-7-(Brustkrebs)-Zellen im normalen Zustand (A) und unter Nährstoffmangel (B). Die initiierte Autophagie im Nährstoffmangelzustand ist sichtbar durch Bildung von LC3-Punkta in B.

Tabelle 5.11: Primärscreen zu den Auswirkungen auf die Rapamycin und durch Nährstoffmangel induzierte Autophagie von eGFP-LC3 MCF-7-(Brustkrebs)-Zellen durch verschiedene Pinoresinolderivate ($c = 10 \mu\text{M}$). Es handelt sich um eine 1-Punkt Bestimmung, allerdings wurde beim Nährstoffmangel ein technisches Replikat mitlaufen gelassen.

No.	Pinoresinol-derivat	Autophagie Rapamycin [%]	Autophagie Nährstoffmangel [%]
1	5	67 77	93
2	62	52 53	97
3	64	47 74	54
4	66	51 56	63
5	65	65 72	83
6	67	23 24	47

Tabelle 5.12: Assay zu den Auswirkungen von 5,5'-Di-(3-thienyl)-pinoresinol (**67**) auf die durch Nährstoffmangel oder durch Rapamycin-Zugabe induzierte Autophagie in eGFP-LC3 MCF-7-(Brustkrebs)-Zellen.

Messung	Autophagie Nährstoffmangel IC ₅₀ [μ M]	Autophagie Rapamycin IC ₅₀ [μ M]
1	8.85	>10
2	3.13	>10
3	5.33	>10
Mittelwert	5.77 2.88	-

Alle getesteten Pinoresinolderivate inhibieren die Autophagie in den getesteten MCF-7-(Brustkrebs)-Zellen. Die Inhibition für beide untersuchten Quellen (Nährstoffmangel und Rapamycin-Induktion) fällt jedoch stark unterschiedlich aus. Generell fällt die Inhibition bei Nährstoffmangel sehr viel stärker aus als bei Rapamycin-Induktion. Die besten Werte zeigt 5,5'-Di-(3-thienyl)-pinoresinol (**67**) mit 47 % im Rapamycin induzierten Versuch und 23/24 % im Nährstoffmangel induzierten Versuch. 5,5'-Dibrompinoresinol (**5**) zeigt mit 93 % im Rapamycin induzierten Versuch und 67/77 % im Nährstoffmangel induzierten Versuch die geringste Inhibition. Interessant sind die Ergebnisse von 5,5'-Diphenylpinoresinol (**62**), welches nahezu keine Inhibition bei der Rapamycin Zugabe zeigte (97 %), jedoch eine starke Inhibition bei Nährstoffmangel (52/53 %). Im Gegenzug dazu zeigte 5,5'-Di(4,4'-(methoxycarbonyl)-phenyl)-pinoresinol (**66**) mit 51/56 % für den Nährstoffmangel und 63 % für die Rapamycin-Induktion nur eine geringe Selektivität, aber immer noch eine starke Inhibition der Autophagie. Dies deckt sich mit den Ergebnissen für 5,5'-Di(4,4'-(methoxycarbonyl)-phenyl)-pinoresinol (**66**) mit 47/74 % und 54 %. 5,5'-Di(4-nitrophenyl)-pinoresinol (**65**) inhibierte in beiden Fällen die Autophagie nur minimal mit 65/72 % und 83 % (Nährstoffmangel und Rapamycin-Induktion). Erfolgversprechende Substanzen sind alle deren Inhibition im Primärscreen für beide Versuche bei über 50 % lag. Bei den Pinoresinolderivaten erfüllt nur 5,5'-Di-(3-thienyl)-pinoresinol (**67**) diese Voraussetzung. Es wurde daher als einzige Verbindung für weiter Tests verwendet.

Die Autophagieinhibitionsmessung wurde in Triplikaten durchgeführt. Bei jeder Messung wurden vier Bilder pro *well* aufgenommen. In jeder Aufnahme wurden ca. 100 Zellen untersucht. Mithilfe einer acht-stufigen Verdünnungsreihe wurde der IC₅₀-Wert von 5,5'-Di-(3-thienyl)-pinoresinol (**67**) bestimmt. Auffällig ist die unterschiedliche Inhibition in Abhängigkeit der Autophagieinduktion. Während bei der Induktion durch Nährstoffmangel ein IC₅₀ von 5.77 μ M ermittelt werden konnte, zeigte sich keine Inhibition im Rahmen des Messbereichs (<10 μ M) bei der Induktion mittels Rapamycin (siehe Tabelle 5.12). Das gängige Modellsubstrat Chloroquin zeigt in vergleichbaren Tests eine Reduktion um 46 6.79 % bei einer Konzentration von 20 μ M.^[203] Das Derivat **67** zeigt also signifikant bessere Ergebnisse. Die nicht messbare Inhibition der Rapamycin induzierten Autophagie steht im Widerspruch zum Ergebnis des Primärscreens, könnte jedoch an den teilweise bedeutenden Streuungen im Einzelpunktnachweis liegen. Die scheinbar selektive Inhibierung der Autophagie könnte Möglichkeiten zur Steuerung des Prozesses öffnen.

Die Gene des *Hedgehog* Signalwegs regulieren das Zellwachstum im embryonalen Stadium von Tieren. Mutationen sind für Entwicklungsstörungen wie die Holoprosencephalie verantwortlich. Holoprosencephalie ist eine Störung in der Entwicklung des Vorderhirns, welches in den meisten Fällen zum Tod des Embryos führt. Weniger schwerwiegende Mutationen können zum Auftritt von Zyklopie führen.

Tabelle 5.13: Auswirkungen der Pinoresinolderivate auf die osteogene Differenzierung von embryonalen, mesodermen Fibroblasten (C3H10T1/2) aus Mäusen. Die Differenzierung wird durch die Zugabe von Purmorphamin induziert. Gemessen wird die Aktivität der ALK, welche als Markerprotein für das Osteogenese-Differenzierungsprogramm dienen. Gleichzeitig wird die Toxizität der Verbindungen über einen Zellebensfähigkeitstest nachgewiesen.

No.	Pinoresinol-derivat	Osteogenese-Differenzierungsrate [%]	Überlebensrate [%]
1	5	64	95
2	62	53	86
3	64	15	87
4	66	44	86
5	65	15	82
6	67	74	84

Mutationen in einem der drei in Menschen vorhandenen Gene des Signalweges konnten in verschiedenen Krebsarten nachgewiesen werden. In nahezu allen Basaliomen, bösartige Krebserkrankungen der Haut, kann eine starke Aktivität des Signalwegs nachgewiesen werden, was zum unkontrollierten Wachstums des Tumors führt.^[204] Auch in einem Drittel der Medulloblastome, bösartige Tumore des Kleinhirns welche meist im Kindesalter auftreten, kann eine verstärkte Expression nachgewiesen werden.^[205, 206] Auch in vielen Krebsarten in denen keine Mutation im *Hedgehog* Signalweg nachgewiesen werden konnte, zeigt sich eine Verringerung des Wachstums bis zum vollständigen Stillstand nach der Inhibition des Signalwegs. Dies eröffnet Möglichkeiten zur Kombinationstherapie mit anderen Chemotherapeutika.^[207-209] Nebenwirkungen der Inhibition sind erstaunlich gering in Erwachsenen, jedoch zeigen Studien mit Mäusen massive Schädigungen bei heranwachsenden Tieren. Verschiedene Inhibitoren befinden sich bereits in den klinischen Testphasen I und II. Aufgrund der zu erwartenden auftreten Resistenzen sowie verschiedensten Anwendungen in Kombinationstherapien ist die Entwicklung weiterer Substanzklassen jedoch unbedingt notwendig.^[210, 211]

Für die Untersuchung der Auswirkungen der hergestellten Pinoresinolderivate auf den *Hedgehog* Signalweg wurde die Inhibition der Differenzierung von embryonalen, mesodermen Fibroblasten (C3H10T1/2) aus Mäusen untersucht. Nach Zugabe von Purmorphamin, ein Aktivator des *Hedgehog* Signalweges, entwickeln sich diese zu Osteoblasten. Während der Entwicklung werden große Mengen an Alkalischen Phosphatasen (ALK) produziert. Die Aktivität dieser Proteine wird über die Intensität der Lumineszenz spezifischer Produkte nachgewiesen. Die Inhibition des *Hedgehog* Signalweges korreliert damit direkt mit der Inhibition der Lumineszenz.^[212]

Richtwerte für erfolgversprechende Verbindungen sind eine Reduktion der Differenzierung um mehr als 50 % bei einer Überlebensrate der Zellen von mehr als 80 %. Die beiden Verbindungen **64** und **65** zeigen eine sehr starke Inhibition. In beiden Fällen findet nur in 15 % eine Differenzierung statt. Zudem zeigen beide eine geringe Toxizität mit 87 % bzw. 82 % überlebenden Zellen. 5,5'-Di(4,4'-(methoxycarbonyl)-phenyl)-pinoresinol (**66**) erreicht mit 44 % Differenzierungsrate bei 86 % überlebenden Zellen ebenfalls den pharmazeutisch interessanten Bereich. Die restlichen drei Verbindungen liegen knapp (**62**) bis deutlich (**5** und **65**) über dem Richtwert von 50 %, zeigen jedoch ebenfalls eine signifikante Inhibition. Die Osteogenese-Differenzierung wird demnach durch alle Derivate inhibiert, was Möglichkeiten zur weiteren Optimierung eröffnet. Das Pinoresinolstrukturmotiv könnte als *lead*-Verbindung zur Herstel-

lung einer Klasse von *hedgehog*-Inhibitoren dienen. Auch wenn die Ergebnisse bisher nur vorläufig sind und noch eine genaue Untersuchung im Assay erforderlich ist, sind sie äußerst vielversprechend.

6 Material

6.1 Geräte

Die in siehe Tabelle 6.1 aufgeführten Geräte wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 6.1: Liste der im Verlaufe der Arbeit verwendeten Geräte mit Herstellern

Gerät	Hersteller
<i>BioCote Stuart rotator SB2</i> , Rotor-schüttler in C Konstantraum für Kulturröhrchen	<i>BioCote</i> Ltd, Wolverhampton, UK
<i>Bandelin Sonorex RK 100 H</i> , Ultra-schallbad	<i>Bandelin electronic</i> GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
<i>Büchi Rotavapor R-205</i> , Rotations-verdampfer	<i>Büchi Labortechnik</i> GmbH, Essen, Deutschland
<i>Canon EOS 1000D</i> , Digitale Spie-gelreflexkamera	<i>Canon Deutschland</i> GmbH, Krefeld, Deutschland
<i>Carmag UV Cabinet</i> , UV Kammer für Chromatographie	<i>Camag</i> , Muttenz, Schweiz
<i>CEM Discover Labmate</i> , Synthese-mikrowelle	<i>CEM</i> GmbH, Kamp-Lintfort, Deutschland
<i>CEM Intelligent explorer</i> , Explorer	<i>CEM</i> GmbH, Kamp-Lintfort, Deutschland
<i>Dionex UltiMate™3000</i> HPLC Anla-ge	<i>Dionex/Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, MA, USA
<i>Edmund Bühler TiMix</i> , Schüttler mit Inkubationshaube für Reakti-onsplattem	<i>Edmund Bühler</i> GmbH, Hechingen, Deutschland
<i>Eppendorf Centrifuge 5424R</i> , ge-kühlte Zentrifuge mit Festwinkelro-tor für Reaktionsgefäße (1.5 + 2 mL)	<i>Eppendorf</i> AG, Hamburg, Deutsch-land
<i>Eppendorf Centrifuge 5810R</i> , ge-kühlte Zentrifuge mit Festwinkel-rotor für Reaktionsgefäße (15 + 50 mL)	<i>Eppendorf</i> AG, Hamburg, Deutsch-land
<i>Eppendorf Research</i> , Pipette 0.1-10 µL	<i>Eppendorf</i> AG, Hamburg, Deutsch-land
<i>Eppendorf Research</i> , Pipette 10-100 µL	<i>Eppendorf</i> AG, Hamburg, Deutsch-land
<i>Eppendorf Research</i> , Pipette 100-1000 µL	<i>Eppendorf</i> AG, Hamburg, Deutsch-land
<i>Gilson Pipetman</i> , Pipette 0.5-5 mL	<i>Gilson</i> , Middleton, WI, USA
<i>Hettich Beleux MKR23</i> , beheiz-ter/gekühlter Schüttelblock für 1.5-50 mL Reaktionsgefäße	<i>Hettich Benelux</i> B.V., Geldermal-sen, Niederlande

Tabelle 6.1: Liste der im Verlaufe der Arbeit verwendeten Geräte mit Herstellern

Gerät	Hersteller
<i>Infors HT Multitron Standard</i> , beheizbarer/kühlbarer Schüttelinkubator für Flüssigkulturen	<i>Infors HT</i> , Bottmingen, Schweiz
<i>Invitrogen Novex MiniCell</i> , vertikales Gelelektrophoresesystem für Invitrogen precast <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (SDS-PAGE) gels	<i>Invitrogen GmbH</i> , Darmstadt, Deutschland
<i>JASCO LC-2000Plus</i> HPLC Anlage	<i>JASCO Germany GmbH</i> , Groß-Umstadt, Deutschland
Jouan Innovens 234 EU1, Heizschrank für Laborglas	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, MA, USA
<i>kd Scientific Legato</i> TM 100, Spritzenpumpe	<i>kd Scientific Inc</i> , Holliston, MA, USA
<i>Labor-pH-Meter 766 Calimatic</i> , pH-Meter	<i>Knick elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG</i> , Berlin, Deutschland
<i>NanoDrop 2000c</i> , Kleinvolumenphotometer	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, MA, USA
<i>Sartorius LA1200S</i> , Feinwaage	<i>Sartorius AG</i> , Göttingen, Deutschland
<i>Sartorius MC1</i> , Laborwaage	<i>Sartorius AG</i> , Göttingen, Deutschland
<i>Sartorius 2004MP</i> , Ultrafeinwaage	<i>Sartorius AG</i> , Göttingen, Deutschland
<i>Sarvall RC6+</i> , gekühlte Standzentrifuge	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, MA, USA
<i>Shimadzu UV-1800</i> , kühlbares/beheizbares Spektrophotometer (CPS-240A)	<i>Shimadzu</i> , Duisburg, Deutschland
<i>Sonoplus</i> , Ultraschall Zelldisruptor mit diversen Horngrößen (1.5-50 mL)	<i>Bandelin electronic GmbH & Co. KG</i> , Berlin, Deutschland
<i>Steinel HG3002LCD Typ 3458</i> , Heißluftgebläse für C	<i>Steinel Vertrieb GmbH</i> , Herzebrock-Clarholz, Deutschland
<i>Vacuubrand MD 4C</i> , Vakuum Membranpumpe	<i>Vacuubrand GmbH & Co. KG</i> , Wertheim, Deutschland
<i>Vacuubrand RZ 6</i> , Vakuum Drehschieberpumpe	<i>Vacuubrand GmbH & Co. KG</i> , Wertheim, Deutschland
VKS-75 control, Plattenformschüttler in C Konstantraum für Flüssigkulturen	<i>Edmund Bühler GmbH</i> , Hechingen, Deutschland
<i>Zirbus VaCo2</i> , Lyophilisator	<i>Zirbus Technology GmbH</i> , Bad Grund, Deutschland

6.2 Software

Tabelle 6.2: Liste der im Verlaufe der Arbeit verwendeten Programme mit Herstellern

Name	Hersteller
ChemBioDraw Ultra 12.0 & 16.0	<i>PerkinElmer Informatics</i>
Clone Manager 9.4 Professional	<i>Scientific & Educational Software</i>
ensochemLab 7.0.5	<i>enso Software GmbH</i>
MestReNova 8.01-10878	<i>Mestrelab Research S.L.</i>
Microsoft Excel 2010, 2013 & 365	<i>Microsoft Corp.</i>
Microsoft Power Point 2010, 2013 & 365	<i>Microsoft Corp.</i>
Microsoft Word 2010, 2013 & 365	<i>Microsoft Corp.</i>
OriginPro 9.0G	<i>OriginLab Corp.</i>
TeXstudio	

6.3 Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen (0.1-1000 µL), Semimikroküvetten und Reaktionsgefäße (1.5, 2, 15 und 50 mL) wurden von *neoLab Migge GmbH* (Heidelberg, Deutschland) erworben. Fertigfolien mit Fluoreszenzindikator (Polygram® SIL G/UV245 von *Macherey Nagel*, Düren, Deutschland) wurden für die DC verwendet. Sie wurden von *Macherey Nagel* (Düren, Deutschland) bezogen. Für präparative DC wurden PLC Kieselgel 60 Platten (20 x 20 cm, 2 mm Dicke) mit und ohne F₂₅₄ Fluoreszenzindikator von *Merck* (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Säulenchromatographie wurde mit Silicagel 60, Partikelgröße 40-63 µm (230-240 mesh) durchgeführt, welches von *Macherey Nagel* (Düren, Deutschland) bezogen wurde. Die verwendeten Einwegspritzen (*Injekt*®) wurden bei der *B. Braun Melsungen AG* (Meldungen, Deutschland) erworben. Mikrotiterplatten von Typ *Nunclon*® wurden bei *Nunc™ Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA, USA) gekauft.

6.4 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien und Enzyme mit Ausnahme der Laccase aus *S. sviveus* wurden aus kommerziellen Quellen bezogen und soweit nicht anders angegeben, ohne weitere Reinigung verwendet. Die in dieser Arbeit verwendete Laccase aus *S. sviveus* stammt aus einer Schenkung von *Ceyda Kumru*. Die Chemikalien stammen von folgenden Herstellern *abcr GmbH* (Karlsruhe, Deutschland), *Alfa Aesar* (Karlsruhe, Deutschland), *Carl Roth GmbH & Co. KG* (Karlsruhe, Deutschland), *Deutero GmbH* (Kastellaun, Deutschland), *fluorochem Ltd.* (Hadfield, UK), *J&K Scientific Ltd.* (Beijing, V.R. China), *Merck* (Darmstadt, Deutschland) und *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Deutschland, übernommen von *Merck*, Darmstadt, Deutschland). Als Schutzgas wurde entweder N₂ (5.2, 99.9992 %) oder Ar (5.0, 99.999 %) verwendet.

6.5 Nährmedien

LB-Medium: 1 % (w/v) Trypton, 0.5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl

TB-Medium: 1.2 % (w/v) Trypton, 2.4 % (w/v) Hefeextrakt, 0.4 % (v/v) Glycerin, 0.231 % (w/v) KH₂PO₄, 1.254 % (w/v) K₂HPO₄; KP_i-Puffer wurde als 10x Lösung separat autoklaviert.

Alle Flüssigmedium wurden vor der Zugabe der Antibiotika autoklaviert (20 min bei \quad C). Das Antibiotikum wurde nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur (RT) zugegeben. Für die Herstellung von Nährbodenplatten wurde das jeweiligen Kulturmedium vor dem Autoklavieren mit 1.5 % Agarose versetzt. Um eine gleichmäßige Verteilung zu Erreichen, erfolgte die Antibiotikazugabe im handwarmen, flüssigen Zustand. Als Antibiotikum wurde Ampilicin mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ verwendet.

7 Methoden

7.1 Allgemeine Methoden

7.1.1 Lösungsmittel

Trockener/s Dichlormethan, Diethylether, THF und Toluol wurden einer Lösungsmitteltrocknungsanlage (MB-SPS 800, *MBraun*, Garching, Deutschland) entnommen. Entmineralisiertes Wasser wurde durch Filtrierung durch einen Wasservollentsalzer (Milli-Q, *Merck*, Darmstadt, Deutschland) erhalten. Dichlormethan, EE, MeOH, *n*-Pentan und Petrolether (PE) wurden vor ihrer Benutzung als Lösungsmittel für die Säulenchromatographie destilliert. Die für die DC verwendeten Lösungsmittel wurden aus den Behältnissen für Säulenchromatographie entnommen.

7.1.2 Durchführung von Reaktionen

Alle Reaktionen wurden soweit nicht anders angegeben unter inerten Bedingungen in ausgeheizten Glasgeräten unter Schutzgas durchgeführt. Die Trocknung der verwendeten Glasgeräte, sowie der Magnetrührstäbe, erfolgte in einem auf 100°C geheizten Trockenschrank. Zusätzlich wurden sie dreimal nach dem *Schlenk*-Prinzip mithilfe eines Heißluftgebläses erhitzt und mit Schutzgas befüllt. Für inerte Reaktionen wurden *Schlenk*-Kolben verwendet. Der Verlauf der Reaktionen wurde mit DC verfolgt. Das destillative Entfernen von Lösungsmitteln mittels Rotationsverdampfern wurde bei variierenden Unterdrücken und einer Wasserbadtemperatur von 40°C durchgeführt.

7.1.3 Chromatographie

Zur Entwicklung der Spots einer DC wurden die Folien nach der Trennung in eine Cer-Molybdat- [10 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, 25 g $\text{H}_3(\text{PMo}_{12}\text{O}_{40})$, 60 mL konz. H_2SO_4 , 940 mL H_2O] oder Kaliumpermanganat-Lösung [3 g KMnO_4 , 20 g K_2CO_3 , 5 mL 5 % (*v/v*) NaOH , 300 mL H_2O] getaucht. Die überschüssige Flüssigkeit wurde abgestreift und die Platten bis zur geeigneten Sichtbarkeit der Spots mit dem Heißluftgebläse behandelt. Für die Reinigung mittels Säulenchromatographie wurden Glassäulen unterschiedlicher Größen, befüllt mit Kieselgel 60M, verwendet. Zur Beschleunigung der Trennung wurde ein Überdruck angelegt. Der Überdruck wurde dabei entweder mit einer Handpumpe oder mit Druckluft (max. 0.5 bar) erzeugt.

7.1.4 IR

Messungen am IR-Spektrometer wurden grundsätzlich mit Flüssigkeiten durchgeführt. Sofern die Substanz als Feststoff vorlag, wurde sie in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst, aufgetragen und das Lösungsmittel vorsichtig verdampft. Charakteristische Schwingungen wurden anhand der IR Spektrogramme zugeordnet.

7.1.5 NMR

NMR Messungen wurden bei Raumtemperatur und 600 MHz (^1H) oder 151 MHz (^{13}C) gemessen. Dazu wurden die Proben in 0.5-0.7 mL eines geeigneten deuteriertem Lösungsmittel

gelöst. Die Messungen wurden in einem *Advance/DRX* 600 oder 300 Ultra Shield™ (*Bruker Corporation*, Billerica, MA, USA) durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen sind relativ zur Verschiebung des Lösungsmittelsignales in ppm angegeben [¹H: (CHCl₃) = 7.26 ppm], [¹³C: (CDCl₃) = 77.16 ppm], [¹H: (DMSO-d₆) = 2.50 ppm], [¹³C: (DMSO-d₆) = 39.52 ppm]. NMR Signale wurden mittels H-COSY-, HSQC- und HMBC-Messungen untersucht und zugeordnet. Das verwendete Lösungsmittel ist bei jeder Auswertung angegeben. Kupplungskonstanten (J) sind in Hz angegeben. Die Multiplizitäten der Signale werden als Singulett (s), Dublett (d), Triplett (t), Quartett (q) und Multipllett (m) sowie als Kombination mehrerer Multiplizitäten bezeichnet.

7.1.5.1 q-NMR

Die Bestimmung der Reinheit mittels qNMR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt. Als erstes wurden 4-5 mg Analyt in ein NMR-Röhrchen eingewogen. Anschließend wurden 3-4 mg Naphthalin bzw. DMS als interner Standard hinzugegeben. Als Lösungsmittel wurde entweder deuteriertes DMSO oder deuteriertes THF verwendet. Die Substanzen wurden in einem *Advance/DRX* 600 NMR Spektrometer (*Bruker Corporation*, Billerica, MA, USA) bei 600 MHz (1H) vermessen. Die Scanzahl wurde dabei im Vergleich zu einer normalen Messung auf 8 reduziert und die Relaxationszeit auf 90 s erhöht, um die Messgenauigkeit zu erhöhen. Das Messprogramm wurde von Marvin Mantel entwickelt.

$$\text{Ana} \quad \frac{\text{Ana}}{\text{Stand}} \quad \frac{\text{Stand}}{\text{Ana}} \quad \frac{\text{Ana}}{\text{Stand}} \quad \frac{\text{Stand}}{\text{Ana}} \quad \text{Stand} \quad (7.1)$$

7.1 = Formel zur Bestimmung der Reinheit einer chemischen Verbindung. Ana. = Analyt, Stand. = Standard, Gleichung übernommen von *Sigma Aldrich* (jetzt *Merck*)

7.1.6 HPLC-Messungen

Alle in der HPLC verwendeten Lösungsmittel wurden vor ihrer Benutzung für 3 h im Ultraschallbad entgast. Die Substanzen wurden im jeweiligen Laufmittel in einer Konzentration von 1 mg/mL gelöst und vor der Auftragung mit einem 0.45 µm Microsart-Filter filtriert und anschließend nach einer der folgenden Methoden A, B oder C gemessen.

Method A

Die Messung wurde auf einer *Dionex* UltiMate™3000 HPLC Anlage (*Dionex/Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Die Substanzen wurden mit einer *Chiralpeak*® IA Säule (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) getrennt. Als Lösungsmittel wurde eine 60:40 Mischung von 50:50 2-Propanol:*n*-Hexan und *n*-Hexan verwendet. Die Detektionswellenlänge betrug 228 nm. Die Flussrate betrug 0.5 mL/min für 120 min.

Method B

Die Messung wurde auf einer *JASCO* LC-2000Plus HPLC Anlage (*JASCO Germany* GmbH, Groß-Umstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Substanzen wurden mit einer *HyperClone*® ODS Säule (125 mm x 4 mm) getrennt. Als Lösungsmittel wurde ein Gradient von Wasser mit 0.1 %

Ameisensäure (A) und Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure (B) verwendet. Die Detektionswellenlänge betrug 205 nm. Der Gradient änderte sich dabei im Verlauf der Messung folgendermaßen:

1. 0-5 min
90 % A und 10 % B
2. 5-25 min
Gleichmäßige Erhöhung auf 0 % A und 100 % B
3. 25-27 min
0 % A und 100 % B
4. 27-28 min
Gleichmäßige Senkung auf 90 % A und 10 % B
5. 28-30 min
50 % A und 50 % B

Methode C

Die Messung wurde auf einer *Dionex* UltiMate™ 3000 HPLC Anlage (*Dionex/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) durchgeführt. Die Substanzen wurden mit einer *Chiralpeak*® IA Säule (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) getrennt. Als Lösungsmittel wurde eine 60:40 Mischung von 50:50 2-Propanol:*n*-Hexan 1:1 und *n*-Hexan verwendet. Die Detektionswellenlänge betrug 228 nm. Die Flussrate betrug 5 mL/min für 80 min.

7.1.7 Assays

7.1.7.1 HPLC-Assays

Vergleich verschiedener Laccasen

Für den Vergleich von verschiedenen Laccasen wurden zunächst 0.06 mmol Coniferylalkohol (**4**) in 0.5 mL DMSO gelöst. Die Lösung wurde zu 5 mL Puffer (100 mM, pH variabel) gegeben. Unter Rühren bei C wurden 2 U Laccase (EC 1.10.3.2) hinzugeben, um ausreichend Luftzufuhr zu gewährleisten wurde eine Kanüle durch das Septum gestochen. Die Reaktion wurde mit DC kontrolliert und nach 2 h durch Zugabe von 1 M Salzsäure gestoppt. Die Produkte wurden dreimal mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Die Rückstände wurden in 80:20 *n*-Heptan:2-Propanol aufgenommen und mit HPLC nach Methode C vermessen (siehe Kapitel 7.1.6).

Test des Einflusses von Cyclodextrin

2.5 µmol Coniferylalkohol (**4**) oder 5-Bromconiferylalkohol (**3**) wurden in 1 mL Natriumacetatpuffer (100 mM, pH 5.0) gelöst. 5 Äq. Cyclodextrin und 15 U/L Laccase aus *T. versicolor* wurden hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 8 h bei C geschüttelt, um ausreichend Luftzufuhr zu gewährleisten wurde eine Kanüle durch das Septum gestochen. Jede Stunde wurde eine Probe von 100 µL entnommen. Die Proben wurden mit 100 µL Acetonitril mit 2.85 mM Benzophenon verdünnt und mit HPLC nach Methode B untersucht (siehe Kapitel 7.1.6).

Test des Einflusses von HFIP

0.06 mmol Coniferylalkohol (4) wurden in 5.5 mL einem Gemisch aus Natriumacetatpuffer (100 mM, pH 6.0) und HFIP bzw. reinem HFIP gelöst. Es wurden HFIP-Konzentrationen von 10, 50 und 100 % getestet. 0.5 U an Laccase aus *T. versicolor* wurden zugegeben. Die Reaktion wurde für 2 h gerührt, um ausreichend Luftzufuhr zu gewährleisten wurde eine Kanüle durch das Septum gestochen. Alle 30 min wurde eine 1 mL Probe entnommen. Die Proben wurden mit 0.5 mL EE extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet und filtriert. Nach der Entfernung des Lösungsmittels unter reduziertem Druck wurde der Feststoff in einer 80:20 Mischung aus *n*-Heptan und 2-Propanol mit 3 mM Acetophenon als internem Standard resuspendiert. Die Lösung wurde anschließend mit HPLC nach Methode C untersucht (siehe Kapitel 7.1.6).

7.1.7.2 Aktivitätsassays

Alle Aktivitätsmessungen erfolgten am Photometer *Shimadzu UV-1800* der Firma *Shimadzu*, Duisburg, Deutschland. Die Aktivitäten wurden aus einer Dreifachbestimmung berechnet. Für die Berechnung wurde folgende aus dem Lambert Beerschen Gesetz abgeleitete Formel verwendet:

$$\text{volumetrische Aktivität} = \frac{A}{\text{Verd}_{\text{Enzym}}} \quad (7.2)$$

7.2 = Berechnung der volumetrischen Aktivität abgeleitet aus dem Lambert-Beerschen Gesetz. A = Änderung der Absorption, d = Schichtdicke der Küvette, ϵ = molarer Extinktionskoeffizient, $\text{Verd}_{\text{Enzym}}$ = Verdünnung Enzymlösung

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{\text{volumetrische Aktivität}}{c_{\text{Enzym}}} \quad (7.3)$$

7.3 = Berechnung der spezifischen Aktivität aus der volumetrischen Aktivität. c_{Enzym} = Konzentration der Enzymlösung in [mg/mL]

Laccaseaktivitätsmessung

In einer Küvette wurden 950 μL Puffer (100 mM, pH variabel) vorgelegt. 10 μL einer 50 mM 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) in H_2O werden dazugegeben. Nach der Zugabe von 40 μL Enzymlösung wurde die Messung gestartet. Die Oxidation wurde über die Absorptionsänderung bei 420 nm und C verfolgt.

Aktivitätsmessung für die Laccase aus *S. sviveus*

In einer Küvette wurden 950 μL Glycinnatriumhydroxid-Puffer (50 mM, pH 9.0) vorgelegt. 10 μL einer 50 mM 2,6-Dimethoxyphenollösung ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) in H_2O mit 3 % DMSO wurden dazugegeben. Nach der Zugabe von 40 μL Enzymlösung wurde die Messung gestartet. Die Oxidation wurde über die Absorptionsänderung bei 468 nm und C verfolgt.

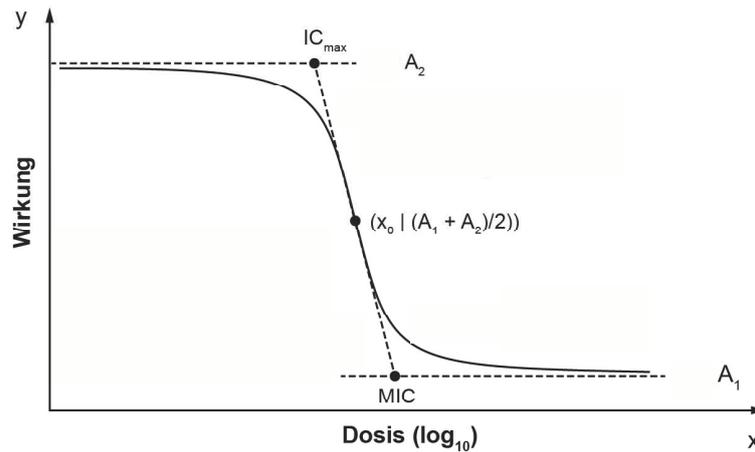


Abbildung 7.1: Schema einer Dosis-Wirkungskurve nach Klein *et al.*^[195]

7.1.7.3 Biologische Aktivitäts-Assay

Toxizitätsscreening gegenüber Mikroorganismen

Das Toxizitätsscreening wurde in 96 x 300 μL Mikrotiterplatten durchgeführt. Dazu wurden 145.5 μL LB-Flüssigmedium mit einer Übernachtskultur von *P. putida*KT2440, *E. coli*BL21(DE3), *B. subtilis*168, *C. glutamicum* oder *S. cerevisiae* auf eine optische Dichte (OD)_{600 nm} von 0.02 inokuliert. Anschließend wurden 4.5 μL Testsubstanz gelöst in DMSO (= 3 % Endkonzentration) hinzugeben. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. Zur Kontrolle der Absorption durch das Testsubstrat wurde eine Konzentrationsreihe ohne Mikroorganismus verwendet. Die Platten wurden mit luftdurchlässigen *AeraSeal*TM Film verschlossen und für 16 h bei 37°C und 800 *rotations per minute* (rpm) inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Film entfernt und die OD_{750 nm} mit einem *Tecan Infinite*[®] M1000 PRO Mikrotiterplatten Lesegerät gemessen. Für die Datenauswertung wurde jeweils die OD_{750 nm} der Absorptionskontrolle von den Werten der jeweiligen Konzentrationen subtrahiert und anschließend die OD_{750 nm} gegenüber der Substratkonzentration halblogarithmisch abgetragen. Zur Auswertung wurde ein nichtlinearer Fit unter Verwendung einer Dosis-Wirkungs-Kurve (siehe Formel 7.4) durchgeführt (siehe Abbildung 7.1).

$$y_{\text{dr}} = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{(x_0 - x)^p} \quad (7.4)$$

7.4 = Funktion zur Auswertung einer Dosis-Wirkungs-Kurve nach Klein *et al.*. y_{dr} = Wirkungs-Wert; x = Dosis; A_1 = untere Asymptote; A_2 = obere Asymptote; x_0 = x -Koordinate des Mittelpunkts der sigmoidalen Kurve; p = Hill-Steigung in x_0 .^[195]

Modulation der Autophagie

Das Autophagiemodulationscreening wurde in 384er Mikrotiterplatten von Greiner (Kremsmünster, Österreich) mit transfizierten eGFP-LC3-MCF-7-(Brustkrebs)-Zellen durchgeführt. 4000 Zellen wurden pro *Well* ausgesät. Die Platten wurden anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden alle Zellen dreimal mit 1 x *phosphate buffered saline* (PBS) mithilfe des ELX405 Plattenwascher von Biotek Instruments (Bad Friedrichshall,

Deutschland) gewaschen. Mithilfe eines *acoustic nanoliter dispenser* (ECHO 520) wurden die in DMSO gelösten Substanzen zugegeben. die Endkonzentration betrug dabei 10 μM . Für die Nährstoffmangeltests wurde zusätzlich *earles balanced salt solution* (EBSS) minimal Medium und Chloroquinin (50 μM Endkonzentration) zugefügt. Für die Rapamycintests wurde zusätzlich EBSS Minimalmedium mit Rapamycin (100 nM Endkonzentration) und Chloroquinin (50 μM Endkonzentration) verwendet. Nach 3 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durch Zugabe von 25 μL Formaldehyd in 1 x PBS fixiert. Gleichzeitig wurden die Zellkerne durch Zugabe von 1:500 Hoechst (Stammlösung 1 mg/mL) angefärbt. Nach 20 min wurden die fixierten Zellen dreimal mit 1 x PBS mithilfe des ELX405 Plattenwascher von Biotek Instruments (Bad Friedrichshall, Deutschland) gewaschen. Für die Datenauswertung wurden vier Bilder pro *Well* mithilfe des *ImageXpress Micro XL* von Molecular Devices (San Jose, CA, USA) bei 20facher Vergrößerung aufgenommen. Die Datenanalyse erfolgte mittels *granularity algorithm* der MetaXpress Software. Der Versuch zur Modulation der Autophagie wurde am *Mas-Planck-Institut für Molekulare Physiologie* in Dortmund in der Abteilung für *Chemische Biologie* und am *Compound Management And Screening Center* (COMAS) von Dr.Luca Laraia und Dr.Sonja Sievers durchgeführt.

Inhibition des *Hedgehog* Signalwegs

Das Inhibitionsscreening wurde in 384er Mikrotiterplatten von Greiner (Kremsmünster, Österreich) durchgeführt. In jedes *well* wurden 800 embryonale, mesoderme Fibroblasten (C3H10T1/2) aus Mäusen ausgesät. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Mithilfe eines *acoustic nanoliter dispenser* (ECHO 520) wurden die in DMSO gelösten Substanzen zugegeben. die Endkonzentration betrug dabei 10 μM . Nach einer Stunde wurde Purmorphamin mit dem selben System zugegeben (1.5 μM Endkonzentration). Bei den Kontrollen fand keine Zugabe von Purmorphamin statt. Nach vier Tagen wurde das Nährmedium entfernt und das kommerziell erhältliche ALK Substrat CDP-Star von Roche (Basel, Schweiz) wurde hinzugefügt. Nach einer Stunde wurde die Lumineszenz gemessen. Um eine Toxizität der Substanzen auszuschließen wurden Zellebensfähigkeitstests durchgeführt. Der Zellebensfähigkeitstest folgte demselben Ablauf wie der *Hedgehog*-Assay, mit der Ausnahme, dass 200 anstelle von 800 Zellen ausgesät wurden und in der Kontrolle ausschließlich Zellkulturmedium verwendet wurde. Die Überlebensrate der Zellen wurde mit dem *Cell Titer Glo reagent* von Promega (Madison, WI, USA). Dabei wird die zelluläre Adenosintriphosphat (ATP) Konzentration bestimmt. Positive Ergebnisse wurden als eine Reduktion des Lumineszenz Signales von 50 % bei gleichzeitiger Überlebensrate der Zellen von über 80 % definiert. Die Inhibition des *Hedgehog* Signalwegs wurde am *Mas-Planck-Institut für Molekulare Physiologie* in Dortmund in der Abteilung für *Chemische Biologie* und am *Compound Management And Screening Center* (COMAS) von Dr.Luca Laraia und Dr.Sonja Sievers durchgeführt.

7.2 Mikrobielle Methoden

7.2.1 Anzucht von Bakterien

Die Herstellung von Vorkulturen fand mit 5 mL Nährmedium über Nacht in einem 10 mL Kulturröhrchen bei 37°C statt. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten wurde ein Rotorschüttler verwendet. Für die Hauptkulturen mit einem Volumen von 1 L Nährmedium wurde ein 3 L *Fernbach*-Kolben mit Schikane verwendet. Die Kolben wurden während der Kultivierung mit 120 rpm geschüttelt.

7.2.2 Genexpression und Reinigung

7.2.2.1 Genexpression

Für eine Genexpression zur Proteinherstellung wurde eine 1 L Hauptkultur aus der Vorkultur auf eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0.05 inokuliert. Die Kultur wurde bei 37°C auf eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0.2 wachsen gelassen. Die Induktion erfolgte mit 0.1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), gefolgt von einer weiteren Inkubation über 14 h bei 37°C . Nach der Kultivierung wurden die Zellen über eine Zentrifugation bei 12000 rpm über 20 min bei 4°C sedimentiert und der Überstand dekantiert.

7.2.2.2 Zellaufschluss

Die geernteten Zellen wurden im 5-fachen Volumen an KPi -Puffer (50 mM, pH 7.5) resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte mittels Ultraschall (2x5 min, 40 % Leistung) über ein Sonotrode (*Bandelin electronic GmbH & Co.KG*, Berlin, Deutschland). Die Suspension wurde dabei über Eis gekühlt. Zwischen beiden Ultraschallbehandlungen wurde die Suspension für 5 min auf Eis gelagert. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde sie für 15 min bei 18.5k *relative centrifugal force* (rcf) separiert.

7.2.3 Biotechnologische Monolignolproduktion

1 mmol Zimtsäurederivat wurde in 20 mL/mmol LB-Medium gelöst. 50 mL des Kulturmedium wurde in 500 mL Erlenmeyerkolben mit Schikane gegeben. Die Lösung auf eine OD von 0.01 bei 600 nm okuliert und bei 37°C unter Schütteln (120 rpm) inkubiert. Nach dem Erreichen einer OD von 0.2 wurde die Temperatur auf 30°C gesenkt und die Translation des Vektors durch Zugabe von 1 mM IPTG nach dem Erreichen von einer OD von 0.6 induziert. Die Kultur wurde anschließend über 17h bei 30°C inkubiert. Die Kultivierung wurde von Frau Dr. Jennifer Aschenbrenner durchgeführt und publiziert.^[1]

qNMR Extraktion

20 mL zellfreier Kulturüberstand wurden nach Abtrennung der Zellen aus der 50 mL Kultivierung entnommen. Die nicht benötigte Lösung wurde mit flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert. Der pH-Wert des Überstandes wurde kontrolliert und mit 1 M Salzsäure vorsichtig auf 5-6 eingestellt. Das Produkt wurde durch dreimalige Extraktion mit 20 mL EE extrahiert. Die organischen Phasen wurden anschließend vereinigt und mit MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das zurückbleibende Produkt wurde in deuteriertem DMSO gelöst und nach der Zugabe des internen Standards DMS mittels NMR vermessen. Die Berechnung der Menge erfolgte dabei nach folgender Formel:

$$\text{Ana} \cdot \frac{\text{Stand}}{\text{Stand}} = \text{Ana} \cdot \text{Ana} \quad (7.5)$$

7.5 = Formel zur Bestimmung der Reinheit einer chemischen Verbindung. Ana. = Analyt, Stand. = Standard, Die Protonenzahl des internen Standards wurde stets auf 6 gesetzt.

Davon abhängig konnte Protonenzahl des Analyten bestimmt werden.

präparative Extraktion

Der pH-Wert des zellfreien Kulturüberstandes ($V = 1\text{L}$) wurde kontrolliert und auf pH 6.0 durch Zugabe von 1 M Salzsäure eingestellt. Das Produkt wurde dreimalig mit 450 mL EE extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und mit MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter reduziertem Druck entfernt. Die Identität des Produktes 4

wurde mit NMR überprüft. Wenn notwendig, wurde das Produkt **4** mit Säulenchromatographie (*n*-Pentan:EE 60:40) gereinigt.

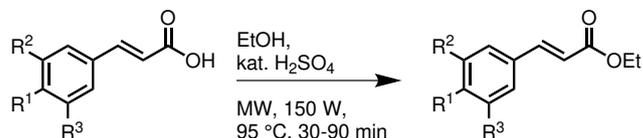
7.3 Synthesevorschriften

7.3.1 Synthese von Monolignolreferenzen

7.3.1.1 Synthesemethode A

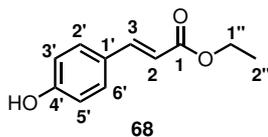
Synthese A wurde bei allen Substraten verwendet, bei denen das Säurederivat kommerziell erhältlich war. Der erste Schritt der Syntheseroute bestand aus einer Fischer-Veresterung mit Ethanol. Die erhaltenen Ester konnten direkt im nächsten Schritt verwendet werden. Eine Reinigung war nicht notwendig. Die Reduktion zum Alkohol folgte mit DiBAL-H als Reduktionsmittel. Die Identität der erhaltenen Alkohole wurde mit NMR geprüft. Wenn nötig wurden sie mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.

Fischer Veresterung



1 g Säure wurde mit 2.7 mL/mmol_{Säure} in Ethanol gelöst. Wenn notwendig, wurde das Gemisch bis zum vollständigen Lösen auf $^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Die Lösung wurde in 5 mL Fraktionen aufgeteilt und jede in ein Mikrowellenreaktionsgefäß überführt. Zu jeder Fraktion wurde eine katalytische Menge an Schwefelsäure $^{\circ}\text{C}$ zugegeben. Die Gefäße wurden verschlossen und für 30-90 min mit einer Mikrowelle (150 W) auf $^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Die Umsetzung wurde mit DC kontrolliert. Nach vollständiger Umsetzung wurden die Fraktionen vereinigt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das erhaltene Öl wurde in EE gelöst und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde erneut unter reduziertem Druck entfernt und das reine Produkt erhalten.

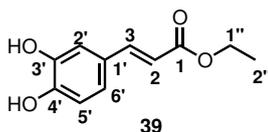
Cumarsäureethylester (68)



Gemäß der Fischer-Veresterung in Synthesemethode A wurde der Cumarsäureethylester (**68**) aus *p*-Cumarsäure (**12**) hergestellt und nach der Bestätigung der Identität mit NMR ohne Aufreinigung weiter umgesetzt. $R_f = 0.27$ (PE:EE 80:20); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 1,33 (t, $^3J_{2'',1''} = 7.1$ Hz, 3 H, 2''-H); 4.26 (q, $^3J_{1'',2''} = 8.6$ Hz, 2 H, 1''-H); 6.30 (d, $^3J_{3,2} = 8.5$ Hz, 2 H, 3-H); 6.84 (d, $^3J_{3'/5',2'/6'} = 8.9$ Hz, 2 H, 3'-,5'-H); 7.43 (d, $^3J_{2'/6',3'/5'} = 8.9$ Hz, 2 H, 2'-,6'-H); 7.63 (d, $^3J_{2,3} = 15.9$ Hz, 1 H, 2-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz) [ppm] : 14.50 (s, C-2''); 60.58 (s, C-1''); 115.9 (s, C-3); 116.1 (s, C-3',5'); 127.53 (s, C-1'); 130.08 (s, C-2',6'); 144.4 (s, C-2); 157.76 (s, C-4'); 167.51 (s, C-1) .

Die $^1\text{H-NMR}$ Daten stammten mit der Literatur überein.^[213]

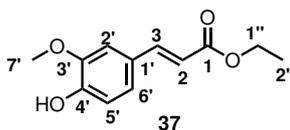
Kaffeensäureethylester (39)



Gemäß der Fischer-Veresterung in Synthesemethode A wurde der Kaffeensäureethylester (**39**) aus Kaffeensäure (**38**) hergestellt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (PE:EE 1:1) wurde der Reinstoff **39** in 50-67 % Ausbeute erhalten. $R_f = 0.46$ (PE:EE 50:50); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 1.24 (t, $^3J_{2'',1''} = 7.1$ Hz, 3 H, 2''-H); 4.15 (q, $^3J_{1'',2''} = 7.1$ Hz, 2 H, 1''-H); 6.25 (d, $^3J_{3,2} = 15.9$ Hz, 1 H, 3-H); 6.76 (d, $^3J_{5',6'} = 8.2$ Hz, 1 H, 5'-H); 7.00 (dd, $^3J_{6',5'} = 8.2$ Hz, $^4J_{6',2'} = 2.1$ Hz, 1 H, 6'-H); 7.04 (d, $^3J_{2',6'} = 2.1$ Hz, 1 H, 2'-H); 7.47 (d, $^3J_{2,3} = 15.9$ Hz, 1 H, 2-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz) [ppm] : 14.28 (s, C-2''); 55.69 (s, C-1''); 114.05 (s, C-3); 114.81 (s, C-2'); 115.73 (s, C-5'); 121.33 (s, C-6'); 125.51 (s, C-1'); 144.99 (s, C-2); 145.56 (s, C-4'); 148.36 (s, C-3'); 166.54 (s, C-1) .

Die $^1\text{H-NMR}$ Daten stammten mit der Literatur überein.^[214]

Ferulasäureethylester (37)

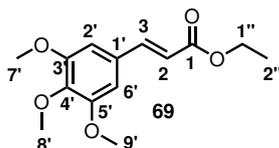


Gemäß der Fischer-Veresterung in Synthesemethode A wurde der Ferulasäureethylester (**37**) aus Ferulasäure (**36**) hergestellt. Nach der Kristallisation aus der Reaktionslösung wurde das Produkt **37** in quantitativen Ausbeuten erhalten und weiter umgesetzt. $R_f = 0.36$ (PE:EE 60:40); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 1.32 (t, $^3J_{2'',1''} = 7.0$ Hz, 3 H, 2''-H); 3.90 (s, 3 H, 7'-H); 4.25 (q, $^3J_{1'',2''} = 7.0$ Hz, 2 H, 1''-H); 5.98 (m, 1 H, 4'-OH); 6.28 (ddd, $^3J_{3,2} =$

15.9 Hz, $^4J_{3,2'} = 1.4$ Hz, $^4J_{3,6'} = 1.4$ Hz, 1 H, 3-H); 6.91 (d, $^3J_{5',6'} = 8.2$ Hz, 1 H, 5'-H); 7.02 (dd, $^4J_{2',6'} = 1.7$ Hz, $^4J_{2',3} = 1.4$ Hz, 1 H, 2'-H); 7.06 (ddd, $^3J_{6',5'} = 8.2$ Hz, $^4J_{6',2'} = 1.7$ Hz, $^4J_{6',3} = 1.4$ Hz, 1 H, 6'-H); 7.62 (d, $^3J_{2,3} = 15.9$ Hz, 1 H, 2-H); **$^{13}\text{C-NMR}$** (CDCl_3 , 151 MHz) [ppm] : 14.47 (s, C-2''); 56.03 (s, C-7'); 60.49 (s, C-1''); 109.46 (s, C-2'); 114.86 (s, C-5'); 115.72 (s, C-3); 123.12 (s, C-6'); 127.12 (s, C-1'); 144.81 (s, C-2); 146.91 (s, C-4'); 148.05 (s, C-3'); 167.43 (s, C-1) .

Die $^1\text{H-NMR}$ Daten stammten mit der Literatur überein.^[215]

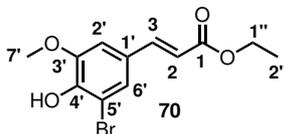
3,4,5-Trimethoxyzimtsäureethylester (69)



Gemäß der Fischer-Veresterung in Synthesemethode A wurde der 3,4,5-Trimethoxyzimtsäureethylester (**69**) aus 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure (**41**) hergestellt. Nach der Kristallisation aus der Reaktionslösung wurde das Produkt **69** in quantitativen Ausbeuten erhalten und weiter umgesetzt. $R_f = 0.17$ (*n*-Pentan:EE 90:10); **$^1\text{H-NMR}$** (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 1.34 (t, $^3J_{2'',1''} = 7.1$ Hz, 3 H, 2''-H); 3.88 (s, 9 H, 7',-8',-9'-H); 4.26 (q, $^3J_{1'',2''} = 7.1$ Hz, 2 H, 1''-H); 6.35 (d, $^3J_{3,2} = 15.7$ Hz, 1 H, 3-H); 6.76 (s, 2 H, 2',-6'-H); 7.60 (d, $^3J_{2,3} = 15.9$ Hz, 1 H, 2-H) .

Die $^1\text{H-NMR}$ Daten stammten mit der Literatur überein.^[216]

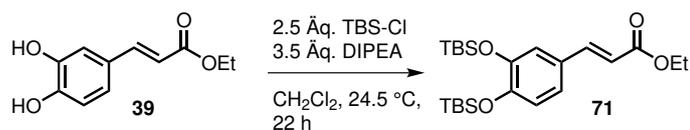
5-Bromferulasäureethylester (70)



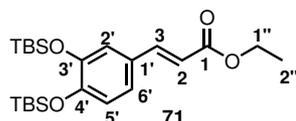
Gemäß der Fischer-Veresterung in Synthesemethode A wurde der 5-Bromferulasäureethylester (**70**) aus 5-Bromferulasäure (**42**) hergestellt. Nach der Kristallisation aus der Reaktionslösung wurde das Produkt **70** in quantitativen Ausbeuten erhalten und weiter umgesetzt. $R_f = 0.39$ (PE:EE 50:50); **$^1\text{H-NMR}$** (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 1.33 (t, $^3J_{2'',1''} = 7.2$ Hz, 3 H, 2''-H); 3.94 (s, 3 H, 7'-H); 4.25 (q, $^3J_{1'',2''} = 7.2$ Hz, 2 H, 1''-H); 6.30 (d, $^3J_{3,2} = 15.9$ Hz, 1 H, 3-H); 6.97 (d, $^4J_{6',2'} = 1.8$ Hz, 1 H, 6'-H); 7.30 (d, $^3J_{2',6'} = 1.8$ Hz, 1 H, 2'-H); 7.54 (d, $^3J_{2,3} = 15.9$ Hz, 1 H, 2-H); **$^{13}\text{C-NMR}$** (CDCl_3 , 151 MHz) [ppm] : 14.48 (s, C-2''); 56.58 (s, C-7'); 60.66 (s, C-1''); 108.75 (s, C-1'); 108.83 (s, C-6'); 117.43 (s, C-3); 125.81 (s, C-2'); 127.91 (s, C-5'); 143.31 (s, C-2); 145.19 (s, C-4'); 147.49 (s, C-3'); 166.95 (s, C-1).

Die $^1\text{H-NMR}$ Daten stammten mit der Literatur überein.^[217]

Schützung der Phenolgruppen mit TBS-Schutzgruppe



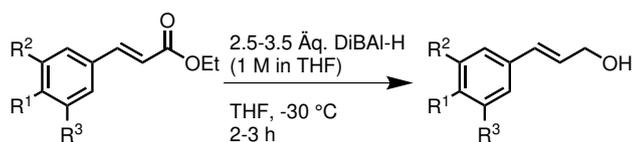
1.1 mmol des Kaffeesäureethylesters (**39**) wurden in 100 Äq. Dichlormethan gelöst. 2.5 Äq. *tert*-Butyldimethylsilylchlorid und 3.5 Äq. *N*-Ethyl-diisopropylamin wurden hinzugegeben. Die Lösung wurde für 22 h bei 0 °C gerührt. Der Umsatz wurde mit DC kontrolliert. Nachdem vollständiger Umsatz beobachtet wurde, wurde die Reaktionslösung mit 3 mL Dichlormethan und 5 mL Wasser verdünnt. Das erhaltene Zweiphasensystem wurde mit 10 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und anschließend filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und das saubere Produkt **71** (71-90 %) konnte erhalten werden.

3,4-DiTBS-kaffeesäureethylester (**71**)

Gemäß der Vorschrift zur Schützung der Phenolgruppen in Synthesemethode A wurde der 3,4-DiTBS-kaffeesäureethylester (**71**) aus Kaffeesäureethylester (**39**) hergestellt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (PE:EE 3:1) wurde das Produkt **71** in 71-90 % Ausbeute erhalten. $R_f = 0.53$ (PE:EE 75:25); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃, 600 MHz) [ppm]: 0.21 (s, 6 H, 2x Si-CH₃); 0.22 (s, 6 H, 2x Si-CH₃); 0.98 (s, 9 H, 3x CCH₃); 0.99 (s, 9 H, 3x CCH₃); 1.33 (t, $^3J_{2'',1''} = 7.1$ Hz, 3 H, 2''-H); 4.25 (q, $^3J_{1'',2''} = 7.1$ Hz, 2 H, 1''-H); 6.23 (d, $^3J_{3,2} = 15.9$ Hz, 1 H, 3-H); 6.81 (d, $^3J_{5',6'} = 8.9$ Hz, 1 H, 5'-H); 7.01 (m, 2 H, 2', 6'-H); 7.56 (d, $^3J_{2,3} = 15.9$ Hz, 1 H, 2-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl₃, 151 MHz) [ppm]: -4.13 (s, 2x Si[CH₃]₂); 14.31 (s, C-2''); 18.41 (s, 2xC[CH₃]₃); 25.83 (s, 2xC[CH₃]₃); 60.29 (s, C-1''); 115.77 (s, C-3); 120.31 (s, C-2'/6'); 121.06 (s, C-5'); 122.18 (s, C-6'/2'); 127.99 (s, C-1'); 144.49 (s, C-2); 147.10 (s, C-4'); 149.31 (s, C-3'); 167.28 (s, C-1).

Die $^1\text{H-NMR}$ Daten stimmten mit der Literatur überein.^[218]

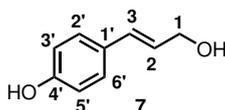
Reduktion mit DiBAL-H



In einem ausgeheizten Kolben wurden 2.5-3.5 Äq. 1 M DiBAL-H-Lösung in THF vorgelegt. Zusätzlich wurden 28 Äq. THF zugegeben. Die Lösung wurde unter Rühren auf 0 °C abgekühlt. Der Ester wurde in 28 Äq. THF gelöst und über 30 min langsam zugegeben. Die Reaktion wurde dann für 1 h bei 0 °C gerührt. Der Umsatz wurde mit DC kontrolliert. Nach vollständigem Umsatz wurde die Lösung langsam auf 25 °C aufgewärmt. Überschüssiges

DiBAL-H wurde mit EE gequenchet. Halbgesättigte NaK-Tartrat Lösung wurde zugegeben. Nach der Phasentrennung wurde noch in der wässrigen Phase befindliches Produkt mit EE extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt. Restwasser wurde durch Zugabe von $MgSO_4$ entfernt. Nach einer Filtration wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Bei Bedarf wurde der erhaltene Alkohol säulenchromatographisch gereinigt. Das Produkt wurde unter Schutzgas aufbewahrt.

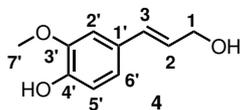
Cumaralkohol (7)



Gemäß der Vorschrift zur Reduktion mit DiBAL-H in Synthesemethode A wurde der Cumaralkohol (7) aus Cumarsäureethylester (68) hergestellt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (PE:EE 7:3) wurde das Produkt 7 in 95 % Ausbeute erhalten. $R_f = 0.31$ (PE:EE 70:30); 1H -NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) [ppm] : 4.16-4.20 (m, 2 H, 1-H); 6.2 (dt, $^3J_{2,3} = 15.8$ Hz, $^3J_{2,1} = 5.6$ Hz, 1 H, 2-H); 6.51 (d, $^3J_{3,2} = 15.9$ Hz, 1 H, 3-H); 6.79 (d, $^3J_{3',2} = 8.2$ Hz, $^3J_{5',6'} = 8.2$ Hz, 2 H, 3'-, 5'-H); 7.27 (d, $^3J_{2',3'} = 8.2$ Hz, $^3J_{6',5'} = 8.2$ Hz, 2 H, 2-, 6'-H); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 151 MHz) [ppm] : 62.6 (s, C-1); 115.3 (s, C-3', -5'); 127.0 (s, C-2); 127.5 (s, C-2', -6'); 128.9 (s, C-1'); 129.2 (s, C-3); 156.9 (s, C-4') .

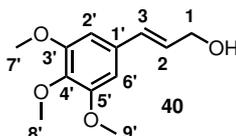
Die 1H -NMR Daten stammten mit der Literatur überein.^[219]

Coniferylalkohol (4)



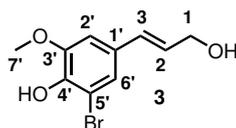
Gemäß der Vorschrift zur Reduktion mit DiBAL-H in Synthesemethode A wurde der Coniferylalkohol (4) aus Ferulasäureethylester (37) hergestellt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (PE:EE 1:1) wurde das Produkt 4 in 72-96 % Ausbeute erhalten. $R_f = 0.25$ (PE:EE 50:50); 1H -NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) [ppm] : 3.82 (s, 1 H, 1-OH); 3.87 (s, 3 H, 7'-H); 4.19 (dd, $^3J_{1,2} = 5.9$ Hz, $^4J_{1,3} = 1.7$ Hz, 2 H, 1-H); 5.63 (d, 1 H, 4'-OH); 6.23 (dt, $^3J_{2,3} = 15.8$ Hz, $^3J_{2,1} = 6.0$ Hz, 1 H, 2-H); 6.54 (dt, $^3J_{3,2} = 15.9$ Hz, $^4J_{3,1} = 1.9$ Hz, 1 H, 3-H); 6.77 (d, $^3J_{5',6'} = 8.1$ Hz, 1 H, 5'-H); 6.86 (dd, $^3J_{6',5'} = 8.1$ Hz, $^4J_{6',2'} = 2.0$ Hz, 1 H, 6'-H); 7.06 (s, $^4J_{2',6'} = 2.0$ Hz, 1 H, 2'-H); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 151 MHz) [ppm] : 56.7 (s, C-7'); 63.9 (s, C-1); 108.5 (s, C-2'); 114.6 (s, C-5'); 120.4 (s, C-6'); 126.3 (s, C-2); 129.3 (s, C-1'); 131.5 (s, C-3); 145.7 (s, C-3' oder C-4'); 145.3 (s, C-4' oder C-3').

Die 1H -NMR Daten stammten mit der Literatur überein.^[2]

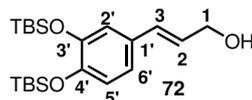
3,4,5-Trimethoxyzimtalkohol (40)

Gemäß der Vorschrift zur Reduktion mit DiBAL-H in Synthesemethode A wurde der 3,4,5-Trimethoxyzimtalkohol (**40**) aus 3,4,5-Triemthoxyzimtsäureethylester (**69**) hergestellt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (PE:EE 1:1) wurde das Produkt **40** in 47 % Ausbeute erhalten. $R_f = 0.3$ (*n*-Pentan:EE 50:50); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 3.84 (s, 3 H, 8'-H); 3.87 (s, 6 H, 7'-, 9'-H); 4.32 (m, 2 H, 1-H); 6.29 (dt, $^3J_{2,3} = 15.8$ Hz, $^3J_{2,1} = 7.1$ Hz, 1 H, 2-H); 6.54 (d, $^3J_{3,2} = 15.8$ Hz, 1 H, 3-H); 6.61 (s, 12 H, 2'-, 6'-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz) [ppm] : 56.2 (s, C-7', -9'); 63.8 (s, C-8'); 103.7 (s, C-2', -6'); 128.2 (s, C-1); 131.3 (s, C-2); 131.3 (s, C-3); 132.6 (s, C-1'); 138.0 (s, C-4'); 153.7 (s, C-3', -5').

Die $^1\text{H-NMR}$ Daten stammten mit der Literatur überein.^[220]

5-Bromconiferylalkohol (3)

Gemäß der Vorschrift zur Reduktion mit DiBAL-H in Synthesemethode A wurde der 5-Bromconiferylalkohol (**3**) aus 5-Bromferulasäureethylester (**70**) hergestellt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (PE:EE 3:2) wurde das Produkt **3** in 63-95 % Ausbeute erhalten. $R_f = 0.12$ (PE:EE 60:40); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 3.92 (s, 3 H, 7'-H); 4.31 (d, $^3J_{1,2} = 5.7$ Hz, 2 H, 1-H); 5.30 (s, 1 H, 1-OH); 5.92 (d, 1 H, 4'-OH); 6.23 (dt, $^3J_{2,3} = 15.8$ Hz, $^3J_{2,1} = 5.8$ Hz, 1 H, 2-H); 6.47 (d, $^3J_{3,2} = 15.8$ Hz, 1 H, 3-H); 6.85 (d, $^4J_{6',2'} = 1.8$ Hz, 1 H, 6'-H); 7.13 (d, $^4J_{2',6'} = 1.8$ Hz, 1 H, 2'-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz) [ppm] : 56.5 (s, C-7'); 63.7 (s, C-1); 107.8 (s, C-6'); 108.5 (s, C-4'); 123.4 (s, C-2'); 127.9 (s, C-2); 123.0 (s, C-3); 130.1 (s, C-5'); 142.9 (s, C-1'); 147.4 (s, C-3').

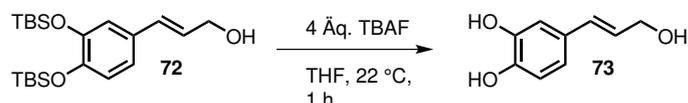
3,4-Di-TBS-kaffeealkohol (72)

Gemäß der Vorschrift zur Reduktion mit DiBAL-H in Synthesemethode A wurde der 3,4-Di-TBS-kaffeealkohol (**72**) aus 3,4-DiTBS-kaffeesäureethylester (**71**) hergestellt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (Dichlormethan) wurde das Produkt **72** in 37-62 % Ausbeute erhalten. $R_f = 0.21$ (Dichlormethan); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 0.19 (s, 6 H, 2x Si-CH₃); 0.2 (s, 6 H, 2x Si-CH₃); 0.98 (s, 9 H, 3x CCH₃); 0.99 (s, 9 H, 3x CCH₃); 4.28 (dd, $^3J_{1,2} = 6.0$ Hz, $^4J_{1,3} = 1.4$ Hz, 1 H, 1-H); 5.30 (s, 1 H, 1-OH); 6.18 (dt, $^3J_{2,3} = 15.8$ Hz, $^3J_{2,1} = 6.0$, 1 H, 2-H); 6.48 (d, $^3J_{3,2} = 15.8$ Hz, 1 H, 3-H); 6.77 (d, $^3J_{5',6'} = 8.2$ Hz, 1 H, 5'-H); 6.85

(dd, $^3J_{6',5'} = 8.3$ Hz, $^5J_{6',2'} = 2.1$ Hz, 1 H, 6'-H); 6.88 (d, $^4J_{2',6'} = 2.1$ Hz, 1 H, 2'-H) .

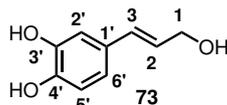
Die $^1\text{H-NMR}$ Daten stammten mit der Literatur überein.^[218]

Entschützung von TBS-geschütztem Kaffeealkohol (**72**)



0.25 mmol 3,5-Di-TBS-geschütztem Kaffeealkohol (**72**) wurden in 100 Äq. trockenem THF in einem *Schlenk*-Kolben unter Schutzgas gelöst. 4 Äq. TBAF wurden sehr langsam hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 1 h bei 22°C gerührt. Nach vollständiger Umsetzung (Kontrolle über DC) wurde die Reaktion mit 10 mL EE verdünnt und anschließend mit 10 mL gesättigter Ammoniumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde nach der Phasentrennung mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und mit MgSO_4 getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel entfernt und das Produkt **16** mit Säulenchromatographie gereinigt.

Kaffeealkohol (**16**)



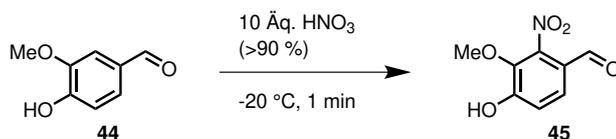
Gemäß der Vorschrift zur Entschützung von TBS-geschütztem Kaffeealkohol (**72**) in Synthesemethode A wurde der Kaffeealkohol (**16**) aus 3,5-Di-TBS-geschütztem Kaffeealkohol (**72**) hergestellt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (PE:EE 1:1) wurde das Produkt **16** in 95 % Ausbeute erhalten. $R_f = 0.1$ (PE:EE 50:50); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 4.04 (dd, $^3J_{1,2} = 5.4$ Hz, $^4J_{1,3} = 1.7$ Hz, 2 H, 1-H); 4.73 (d, $^3J_{1-OH,1} = 5.5$ Hz, 1 H, 1-OH); 6.03 (dt, $^3J_{2,3} = 15.9$ Hz, $^4J_{2,1} = 5.4$ Hz, 1 H, 2-H); 6.03 (d, $^3J_{3,2} = 15.8$ Hz, 1 H, 3-H); 6.64-6.67 (m, 2 H, 5', 6'-H); 6.80 (d, $^4J_{2',6'} = 1.8$ Hz, 1 H, 2'-H); 8.85 (s, 1 H, 3-OH); 8.92 (s, 1 H, 4'-OH); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz) [ppm] : 61.7 (s, C-1); 113.0 (s, C-2'); 115.6 (s, C-5'); 117.9 (s, C-6'); 127.0 (s, C-2); 128.4 (s, C-1'); 129.0 (s, C-3); 145.0 (s, C-4'); 145.3 (s, C-3') .

Die $^1\text{H-NMR}$ Daten stammten mit der Literatur überein.^[221]

7.3.1.2 Synthesemethode B

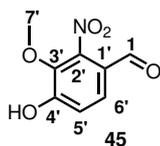
Synthese B wurde durchgeführt, wenn die Säuren nicht kommerziell erhältlich waren. Es wurden die kommerziell erhältlichen Benzaldehydderivate als Ausgangssubstanzen verwendet. Zunächst wurden die Alkoholfunktionen geschützt und anschließend die Doppelbindung über eine HWE-Reaktion eingeführt. Der dabei erhaltene Ester wurde anschließend mit DiBAL-H oder LiAlH_4 zum gewünschten Alkohol reduziert.

Nitrierung von Vanillinacetat (44)



10 Äq. >90 % Salpetersäure wurden in einem Rundkolben vorgelegt und bei -20 °C gerührt. 41.2 mmol Vanillinacetat (44) wurden portionsweise langsam hinzugegeben. Nach vollständiger Zugabe wurde die gesamte Reaktion in Eis gegeben. Der ausfallende Feststoff wurde über Filtration gesammelt und mit etwas Wasser gewaschen. Nachfolgend wurde er in 5 % (w/v) Natriumhydroxidlösung gelöst und für 30 min gerührt. Hierauf wurde der pH Wert mit 4 Mol Salzsäure auf ca. 5 eingestellt, worauf erneut ein weißlicher Feststoff ausfiel. Dieser Feststoff wurde mittels Filtration gesammelt und das Produkt 45 nach Waschen mit Wasser in reiner Form erhalten.

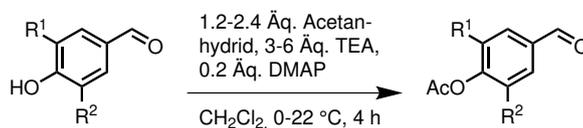
2-Nitrovanillin (45)



Gemäß der Vorschrift zur Nitrosylierung in Synthesemethode B wurde 2-Nitrovanillin (45) aus Vanillinacetat (44) hergestellt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (PE:EE 1:1) wurde das Produkt 45 in 38-95 % Ausbeute erhalten. $R_f = 0.1$ (Dichlormethan); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 3.98 (s, 3 H, 7'-H); 6.35 (m, 1 H, 4'-OH); 7.22 (d, $^3J_{5',6'} = 8.5$ Hz, 1 H, 5'-H); 7.65 (d, $^3J_{6',5'} = 8.5$ Hz, 1 H, 6'-H); 9.81 (s, 1 H, 1-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz) [ppm] : 63.4 (s, C-7'); 118.0 (s, C-5'); 121.3 (s, C-3', -4'); 128.6 (s, C-6'); 139.4 (s, C-2'); 155.5 (s, C-1'); 186.0 (s, C-1); **MS**: m/z (%): 197 [M+H⁺]; 167 [MH⁺-CH₃O]; 152 [MH⁺-NO₂]; 132 [152⁺-OH]; 121 [152⁺-CH₃O]; 107 [134⁺-CHO].

Die $^1\text{H-NMR}$ Daten stammten mit der Literatur überein.^[174]

Schützung der Phenolfunktion mit Acetanhydrid

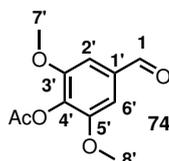


6 mmol des Aldehyds wurden zusammen mit 0.2 Äq. Dimethylaminopyridin (DMAP) in 100 Äq. Dichlormethan gelöst und die Lösung bei -20 °C gerührt. Je nach Anzahl an Hydroxylgruppen des Aldehyds (1 oder 2) wurden 3, 6 Äq. Triethylamin (TEA) und 1.2, 2.4 Äq. Acetanhydrid zugegeben. Die Reaktion wurde für 1 h bei -20 °C gerührt, gefolgt von 4 h bei 0 °C.

Die Reaktion wurde mittels DC verfolgt. Nachdem vollständiger Umsatz beobachtet wurde, wurde die Reaktion mit Wasser gequenchet. Die beiden Phasen wurden getrennt und die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen.

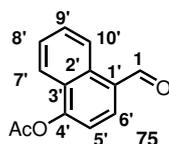
Über ein weiteren Waschschrift mit gesättigter Natriumchloridlösung und durch Zugabe von MgSO_4 wurde die organische Phase getrocknet. Das MgSO_4 wurde mit Filtration entfernt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt und reines Produkt blieb zurück.

4-*O*-Acetoxy-3,5-dimethoxybenzaldehyd (**73**)



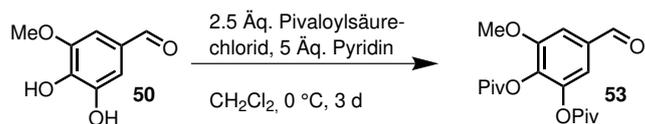
Gemäß der Vorschrift zur Schützung der Phenolfunktion mit Acetanhydrid in Synthesemethode B wurde 4-*O*-Acetoxy-3,5-dimethoxybenzaldehyd (**73**) aus 4-*O*-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyd (**49**) hergestellt. Nach der Bestätigung der Identität des Produktes über $^1\text{H-NMR}$ und der Bestimmung der Ausbeute (67-95 %) wurde es direkt weiter umgesetzt. $R_f = 0.36$ (*n*-Pentan:EE 70:30); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 2.34 (s, 3 H, $\text{C}[\text{O}]\text{CH}_3$); 3.88 (s, 6 H, 7',8'-H); 7.13 (s, 2 H, 2',6'-H); 9.88 (s, 1 H, 1-H).

4-*O*-Acetoxy-naphthalenaldehyd (**74**)



Gemäß der Vorschrift zur Schützung der Phenolfunktion mit Acetanhydrid in Synthesemethode B wurde 4-*O*-Acetoxy-naphthalenaldehyd (**74**) aus 4-Hydroxy-1-naphthalenaldehyd (**54**) hergestellt. Nach der Bestätigung der Identität des Produktes **74** über $^1\text{H-NMR}$ wurde es direkt weiter umgesetzt. $R_f = 0.41$ (*n*-Pentan:EE 70:30); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 2.52 (s, 3 H, $\text{C}[\text{O}]\text{CH}_3$); 7.58 (d, $^3J_{7',8'} = 7.8$ Hz, 1 H, 7'-H); 7.7 (dd, $^3J_{8',7'} = 7.8$ Hz, $^3J_{8',9'} = 7.7$ Hz, 1 H, 8'-H); 7.79 (dd, $^3J_{9',8'} = 7.7$ Hz, $^3J_{9',10'} = 7.7$ Hz, 1 H, 9'-H); 8.15 (d, $^3J_{5',6'} = 8.5$ Hz, 1 H, 5'-H); 8.22 (d, $^3J_{10',9'} = 7.8$ Hz, 1 H, 10'-H); 9.33 (d, $^3J_{6',5'} = 8.6$ Hz, 1 H, 6'-H); 10.41 (s, 1 H, 1-H).

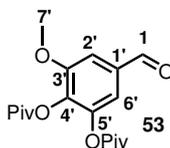
Schützung der Phenolfunktionen mit Pivalinsäurechlorid



1 mmol des Aldehyds **50** wurde in einem *Schlenk*-Kolben unter Schutzgas in 100 Äq. trockenem Pyridin gelöst. Die Lösung wurde unter Rühren auf 0°C gekühlt. 2.5 Äq. wurden hinzugegeben und die Lösung anschließend auf 0°C erwärmt. Die Umsetzung des Eduktes **50** wurde mit DC kontrolliert. Nach vollständiger Umsetzung wurde die Reaktion durch Zugabe von Eis beendet und die erhaltene Suspension mit Chloroform verdünnt. Die beiden Phasen wurden

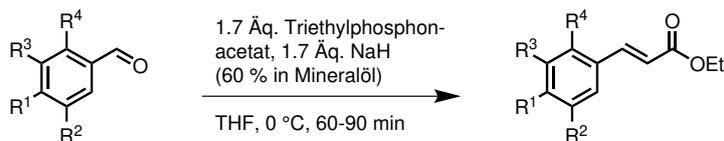
getrennt und die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Anschließend wurde sie mit MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Produkt **53** wurde mit Säulenchromatographie gereinigt.

3-Methoxy-4,5-dipivaloylhydroxy-benzaldehyd (**53**)



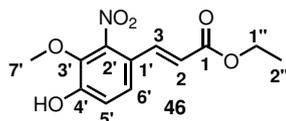
Gemäß der Vorschrift zur Schützung der Phenolfunktion mit Pivalinsäurechlorid in Synthesemethode B wurde sauberes 3-Methoxy-4,5-dipivaloylhydroxy-benzaldehyd (**53**) aus 3,4-Dihydroxy-5-methoxybenzaldehyd (**50**) hergestellt. Nach der Bestätigung der Identität des Produktes **53** über $^1\text{H-NMR}$ und der Bestimmung der Ausbeute (92 %) wurde es direkt weiter umgesetzt. $R_f = 0.31$ (PE:EE 80:20) $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 1.36 (s, 18 H, $6 \times \text{C}[\text{CH}_3]_3$); 3.89 (s, 3 H, 7'-H); 7.29 (d, $^4J_{2',6'} = 1.7$ Hz, 1 H, 2'-H); 7.36 (d, $^4J_{6',2'} = 1.7$ Hz, 1 H, 6'-H); 9.9 (s, 1 H, 1-H).

HWE-Reaktion



1.7 Äq. Triethylphosphonacetat wurden in 20 Äq. THF gelöst und die Lösung auf 0°C gekühlt. 1.7 Äq. NaH (60 % Suspension in Mineralöl) wurden in vier-zehn Chargen hinzugegeben. 1 mmol des geschützten Aldehyds wurde in 21 Äq. THF gelöst und tröpfchenweise zur Lösung gegeben. Der Umsatz wurde mittels NMR untersucht. Nachdem vollständiger Umsatz beobachtet wurde, wurde die Reaktion wurde mit 1 mol/L Salzsäure gequench. Das Produkt wurde aus der wässrigen Phase dreimal mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO_4 getrocknet und anschließend filtriert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck wurde das Produkt direkt für die Reduktion genutzt. In einzelnen Fällen war eine Reinigung mit Säulenchromatographie (PE/EE) notwendig.

2-Nitroferulasäureethylester (**46**)

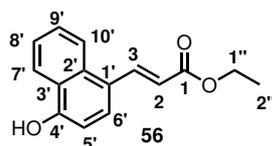


Gemäß der Vorschrift zur HWE-Reaktion in Synthesemethode B wurde 2-Nitroferulasäureethylester (**46**) aus 2-Nitrovanillin (**45**) hergestellt. Nach der Bestätigung der Identität des Produktes **46** über $^1\text{H-NMR}$ und der Bestimmung der Ausbeute (51-65 %) wurde es entweder säulenchromatographisch (PE:EE 3:2) gereinigt oder direkt weiter umgesetzt. $R_f = 0.42$ (PE:EE 60:40); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 1.32 (t, $^3J_{2'',1''} = 7.1$ Hz, 3 H, 2''-H);

3.94 (s, 3 H, 7'-H); 4.25 (q, $^3J_{1'',2''} = 7.1$ Hz, 1 H, 1''-H); 5.89 (s, 1 H, 4'-OH); 6.35 (d, $^3J_{3,2} = 15.8$ Hz, 1 H, 3-H); 7.11 (d, $^3J_{6',5'} = 8.7$ Hz, 1 H, 6'-H); 7.37 (d, $^3J_{5',6'} = 8.7$ Hz, 1 H, 5'-H); 7.46 (d, $^3J_{2,3} = 15.8$ Hz, 1 H, 2-H); **MS**: m/z (%): 268 [M+H⁺]; 221 [MH⁺-NO₂]; 204 [221⁺-OH]; 193 [221⁺-C₂H₅]; 166 [MH⁺-OH₃-C₄H₆O₂].

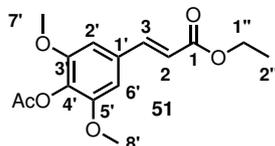
Die ¹H-NMR Daten stimmten mit der Literatur überein.^[174]

4-*O*-Hydroxynaphthylensäureethylester (**56**)

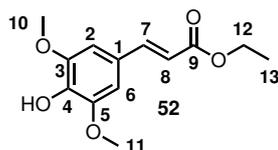


Gemäß der Vorschrift zur HWE-Reaktion in Synthesemethode B wurde 4-*O*-Hydroxynaphthylensäureethylester (**56**) aus 4-*O*-Acetoxynaphthylaldehyd (**74**) hergestellt. Nach der Bestätigung der Identität des Produktes **56** über ¹H-NMR direkt weiter umgesetzt. $R_f = 0.43$ (PE:EE 70:30); **¹H-NMR** (CDCl₃, 600 MHz) [ppm]: 1.32 (t, $^3J_{2'',1''} = 7.1$ Hz, 3 H, 2''-H); 4.26 (q, $^3J_{1'',2''} = 7.1$ Hz, 2 H, 1''-H); 6.7 (d, $^3J_{3,2} = 15.6$ Hz, 1 H, 3-H); 7.39 (d, $^3J_{7',8'} = 8.0$ Hz, 1 H, 7'-H); 7.66 (dd, $^3J_{8',7'} = 8.0$ Hz, $^3J_{8',9'} = 7.6$ Hz, 1 H, 8'-H); 7.71 (dd, $^3J_{9',8'} = 7.6$ Hz, $^3J_{9',10'} = 7.7$ Hz, 1 H, 9'-H); 8.02 (m, 2 H, 10', 6'-H); 8.27 (d, $^3J_{5',6'} = 8.5$ Hz, 1 H, 5'-H); 8.44 (d, $^3J_{2,3} = 15.6$ Hz, 1 H, 2-H).

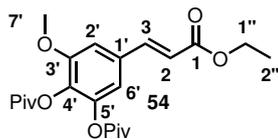
4-*O*-Acetoxysinapinsäureethylester (**51**)



Gemäß der Vorschrift zur HWE-Reaktion in Synthesemethode B wurde 4-*O*-Acetoxysinapylsäureethylester (**51**) aus 4-*O*-Acetoxy-3,5-dimethoxybenzaldehyd (**73**) hergestellt. Nach der Bestätigung der Identität des Produktes **51** über ¹H-NMR wurde es direkt weiter umgesetzt. $R_f = 0.25$ (*n*-Pentan:EE 60:40); **¹H-NMR** (CDCl₃, 600 MHz) [ppm]: 1.34 (t, $^3J_{2'',1''} = 7.1$ Hz, 3 H, 2''-H); 2.34 (s, 3 H, C[O]CH₃); 3.92 (s, 6 H, 7', 8'-H); 4.26 (q, $^3J_{1'',2''} = 7.1$ Hz, 2 H, 1''-H); 5.75 (s, 1 H, 4'-OH); 6.30 (d, $^3J_{3,2} = 15.8$ Hz, 1 H, 3-H); 6.77 (s, 2 H, 2', 6'-H); 7.59 (d, $^3J_{2,3} = 15.9$ Hz, 1 H, 2-H); **¹³C-NMR** (CDCl₃, 151 MHz) [ppm]: 14.46 (s, C-2''); 20.56 (s, C-1'); 56.35 (s, C-7', 8'); 60.73 (s, C-1''); 104.84 (s, C-2', 6'); 118.75 (s, C-3); 130.60 (s, C-4'); 132.93 (s, C-3', 5'); 144.42 (s, C-2); 152.6 (s, C[O]CH₃); 166.87 (s, C-1); 168.58 (s, C[O]CH₃).

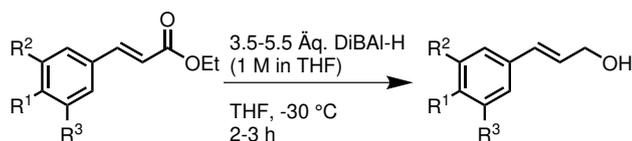
Sinapinsäureethylester (**52**)

Gemäß der Vorschrift zur HWE-Reaktion in Synthesemethode B wurde Sinapinsäureethylester (**52**) aus 4-*O*-Acetoxy-3,5-dimethoxybenzaldehyd (**73**) hergestellt. Nach der Bestätigung der Identität des Produktes **52** über $^1\text{H-NMR}$ wurde es direkt weiter umgesetzt. $R_f = 0.2$ (*n*-Pentan:EE 60:40); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 1.34 (t, $^3J_{13,12} = 7.1$ Hz, 3 H, 13-H); 2.34 (s, 3H, $\text{C}[\text{O}]\text{CH}_3$); 3.85 (s, 6 H, 10-,11-H); 4.27 (q, $^3J_{12,13} = 7.1$ Hz, 2 H, 12-H); 6.38 (d, $^3J_{7,8} = 15.9$ Hz, 1 H, 7-H); 6.77 (s, 2 H, 2-,6-H); 7.61 (d, $^3J_{8,7} = 15.9$ Hz, 1 H, 8-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz) [ppm] : 14.51 (s, C-13); 56.51 (s, C-10,11); 60.53 (s, C-12); 105.25 (s, C-2,6); 116.26 (s, C-7); 126.17 (s, C-1); 137.28 (s, C-4); 144.97 (s, C-8); 147.36 (s, C-3,5); 167.26 (s, C-9); **HRMS (in MeOH)**: *m/z* berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_5$ (M-H) 253.11; gefunden 253.11.

3-Methoxy-4,5-*O*-dipivaloylzimtsäureethylester (**54**)

Gemäß der Vorschrift zur HWE-Reaktion in Synthesemethode B wurde 3-Methoxy-4,5-*O*-dipivaloylzimtsäureethylester (**54**) aus 3-Methoxy-4,5-dipivaloylhydroxy-benzaldehyd (**53**) hergestellt. Nach der Bestätigung der Identität des Produktes **54** über $^1\text{H-NMR}$ wurde es direkt weiter umgesetzt. $R_f = 0.33$ (*n*-Pentan:EE 90:10); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 1.34 (m, 21 H, $6 \times \text{C}[\text{CH}_3]_3$, 2''-H); 3.84 (s, 3 H, 7'-H); 4.26 (q, $^3J_{1'',2''} = 7.1$ Hz, 2 H, 1''-H); 6.37 (d, $^3J_{3,2} = 16.0$ Hz, 1 H, 3-H); 6.92 (d, $^4J_{2',6'} = 2.3$ Hz, 1 H, 2'-H); 6.94 (d, $^4J_{6',2'} = 2.3$ Hz, 1 H, 6'-H); 7.59 (d, $^4J_{2,3} = 15.9$ Hz, 1 H, 2-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz) [ppm] : 14.45 (s, C-2''); 27.36 (s, $\text{C}[\text{CH}_3]_3$); 27.42 (s, $\text{C}[\text{CH}_3]_3$); 56.45 (s, C-7'); 60.75 (s, C-1''); 108.74 (s, C-2'); 115.26 (s, C-6'); 119.26 (s, C-3); 120.7 (s, $2 \times \text{C}[\text{CH}_3]_3$); 132.6 (s, C-1'); 134.3 (s, C-4'); 143.52 (s, C-2); 152.76 (s, C-3'); 167.0 (s, C-1); 175.5 (s, $2 \times \text{C}[\text{O}]\text{C}$).

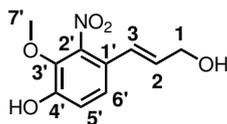
Reduktion mit DiBAL-H



In einem ausgeheizten Kolben wurden 5.5 Äq. 1 M DiBAL-H-Lösung in THF vorgelegt. Zusätzlich wurden 100 Äq. THF zugegeben. Die Lösung wurde gerührt und auf -30 °C abgekühlt. Der Ester wurde in 28 Äq. THF gelöst und über 30 min langsam zugegeben. Die Reaktion wurde dann für 1 h bei -30 °C gerührt. Der Umsatz wurde mit DC kontrolliert. Nach vollständigem Umsatz wird die Lösung langsam auf 0 °C aufgewärmt. Überschüssiges DiBAL-H wird mit EE

gequencht. Der erhaltene gelbe Feststoff wurde mit 2 mol/L Salzsäure behandelt. Das Produkt wurde dreimal mit Diethylether aus dem Zweiphasengemisch extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt. Restwasser wurde durch Waschen mit gesättigter Natriumchloridlösung, gefolgt von Zugabe von MgSO_4 entfernt. Nach einer Filtration wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der erhaltene Alkohol wurde säulenchromatographisch gereinigt und unter Schutzgas gelagert.

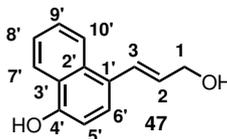
2-Nitroconiferylalkohol (**43**)



Gemäß der Vorschrift zur Reduktion mit DiBAL-H in Synthesemethode B wurde der 2-Nitroconiferylalkohol (**43**) aus 2-Nitroferulasäureethylester (**46**) hergestellt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (PE:EE 7:3) wurde das Produkt **43** in 40 % Ausbeute erhalten. $R_f = 0.07$ (PE:EE 70:30); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 3.81 (s, 3 H, 7'-H); 4.06-4.09 (m, 2 H, 1-H); 4.94 (d, $^3J_{1-OH,1} = 5.5$ Hz, 1 H, 1-OH); 6.20 (dt, $^3J_{3,2} = 15.7$ Hz, $^4J_{3,1} = 2.0$ Hz, 1 H, 3-H); 6.35 (dt, $^3J_{2,3} = 15.7$ Hz, $^3J_{2,1} = 4.5$ Hz, 1 H, 2-H); 7.03 (d, $^3J_{6',5'} = 8.7$ Hz, 1 H, 6'-H); 7.33 (d, $^3J_{5',6'} = 8.7$ Hz, 1 H, 5'-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz) [ppm] : 61.0 (s, C-7'); 61.2 (s, C-3); 118.9 (s, C-6'); 119.2 (s, C-1); 119.6 (s, C-1'); 121.4 (s, C-5'); 134.0 (s, C-2); 138.2 (s, C-3'); 144.6 (s, C-2'); 149.9 (s, C-4').

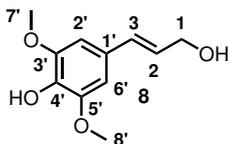
Die $^1\text{H-NMR}$ Daten stimmten mit der Literatur überein.^[174]

4-Hydroxynaphthylenalkohol (**47**)



Gemäß der Vorschrift zur Reduktion mit DiBAL-H in Synthesemethode B wurde der 4-Hydroxynaphthylenalkohol (**47**) aus 4-O-Acetylnaphthylensäureethylester (**56**) hergestellt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (*n*-Pentan:EE 1:1) wurde das Produkt **72** in 52-90 % Ausbeute erhalten. $R_f = 0.53$ (*n*-Pentan:EE 50:50); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 4.38 (d, $^3J_{1,2} = 6.9$ Hz, 2 H, 1-H); 6.32 (dt, $^3J_{2,3} = 16.1$ Hz, $^3J_{2,1} = 6.6$ Hz, 1 H, 2-H); 6.95 (d, $^3J_{7',8'} = 7.8$ Hz, 1 H, 7'-H); 7.36 (d, $^3J_{3,2} = 16.1$ Hz, 1 H, 3-H); 7.47-7.56 (m, 3 H, 8'-, 9'-, 10'-H); 8.15 (d, $^3J_{5',6'} = 8.4$ Hz, 1 H, 5'-H); 8.22-8.34 (m, 1 H, 6'-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz) [ppm] : 63.6 (s, C-1); 108.9 (s, C-7'); 123.3 (s, C-6'); 124.2 (s, C-5'); 124.8 (s, C-8' oder C-9' oder C-10'); 125.2 (s, C-8' oder C-9' oder C-10'); 125.6 (s, C-2'); 127.0 (s, C-8' oder C-9' oder C-10'); 127.0 (s, C-3'); 127.2 (s, C-3); 131.4 (s, C-2); 133.1 (s, C-1'); 153.7 (s, C-4')

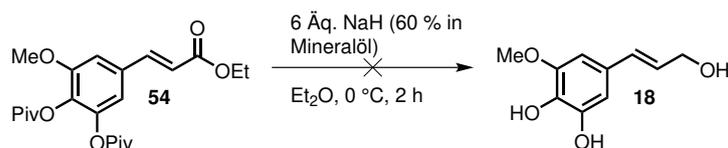
Sinapylalkohol (8)



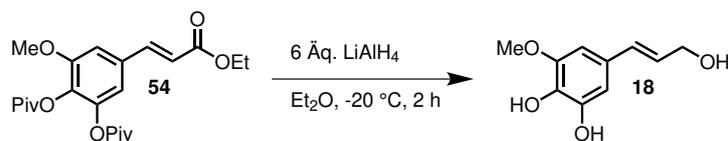
Gemäß der Vorschrift zur Reduktion mit DiBAL-H in Synthesemethode B wurde der Sinapylalkohol (8) aus 4-*O*-Acetoxysinapinsäureethylester (14) hergestellt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (PE:EE 7:3) wurde das Produkt 8 in 37-62 % Ausbeute erhalten. $R_f = 0.17$ (PE:EE 70:30); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 3.90 (s, 6 H, 7', 8'-H); 4.29-4.32 (m, 2 H, 1-H); 5.56 (s, 1 H, 4'-OH); 6.24 (dt, $^3J_{2,3} = 15.8$ Hz, $^3J_{2,1} = 5.9$ Hz, 1 H, 2-H); 6.52 (dt, $^3J_{3,2} = 15.9$ Hz, $^3J_{2,2'} = 1.5$ Hz, $^3J_{2,6'} = 1.5$ Hz, 1 H, 2'-H); 6.63 (s, 2 H, 2', 6'-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz) [ppm] : 56.4 (s, C-7', -8'); 63.9 (s, C-1); 103.5 (s, C-2', -6'); 126.7 (s, C-1'); 128.4 (s, C-2); 131.6 (s, C-3); 134.9 (s, C-4'); 147.3 (s, C-3', -5').

Die $^1\text{H-NMR}$ Daten stimmten mit der Literatur überein.^[222]

Entschützung von 5-Methoxy-3,4-dipivaloylzimtalkohol (54) mit NaH



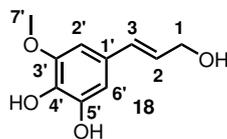
6 Äq. NaH (60 % Suspension in Mineralöl) wurden in einem *Schlenk*-Kolben unter Schutzgas in 40 Äq. Diethylether suspendiert. Die Suspension wurde unter Rühren auf 0°C gekühlt. 0.1 mmol Edukt 54 wurden in 280 Äq. Diethylether gelöst und sehr langsam zugegeben. Die Reaktion wurde bei 0°C gerührt und mit Hilfe von DC die Umsetzung bestimmt.

Reduktion mit LiAlH_4 

4 Äq. LiAlH_4 wurden in einem ausgeheiztem Kolben mit 100 Äq. Diethylether versetzt und bei -20°C gerührt. 1 mmol 3,4-Dipivaloyl-5-methoxycinnamsäureethylester (54) wurden in 75 Äq. Diethylether gelöst und über einen Zeitraum von 30 min hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 2 h bei -20°C gerührt. Der Umsatz wurde dabei mit DC verfolgt. Nachdem der komplette Verbrauch des Esters 54 beobachtet wurde, wurde noch vorhandenes LiAlH_4 durch Zugabe von EE bei 0°C gequenchet. Der erhaltene gelbe Feststoff wurde mit 2 M Salzsäure behandelt, bis er vollständig gelöst war. Das Produkt wurde dreimal mit Diethylether aus dem Zweiphasengemisch extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt. Restwasser wurde durch Waschen mit gesättigter Natriumchloridlösung, gefolgt von Zugabe von MgSO_4 entfernt. Nach einer Filtration wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Der erhaltene Alkohol 18 wurde säulenchromatographisch gereinigt (*n*-Pentan:EE 60:40) und unter Schutzgas

bei - C gelagert.

5-Hydroxyconiferylalkohol (**18**)

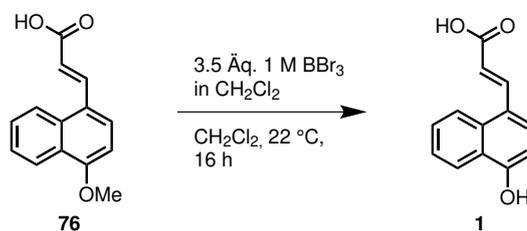


Gemäß der Vorschrift zur Reduktion mit LiAlH_4 in Synthesemethode B wurde der 5-Hydroxyconiferylalkohol (**18**) aus 3-Methoxy-4,5-*O*-dipivaloylzimtsäureethylester (**54**) hergestellt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (*n*-Pentan:EE:Essigsäure 50:50:1) wurde das Produkt **18** in 15-30 % Ausbeute erhalten. $R_f = 0.31$ (*n*-Pentan:EE:Essigsäure 50:50:1); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 3.84 (s, 3 H, 7'-H); 4.21 (d, $^3J_{1,2} = 4.8$ Hz, 2 H, 1-H); 6.21 (dt, $^3J_{2,3} = 15.7$ Hz, $^3J_{2,1} = 5.2$ Hz, 1 H, 2-H); 6.45 (d, $^3J_{3,2} = 15.9$ Hz, 1 H, 3 H); 6.60 (d, $^4J_{2,6'} = 2.3$ Hz, 1 H, 2'-H); 6.62 (d, $^3J_{6',2'} = 2.3$ Hz, 1 H, 6'-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz) [ppm] : 31.8 (s, C-1); 55.5 (s, C-7'); 101.6 (s, C-6'); 107.1 (s, C-2'); 127.4 (s, C-2); 129.8 (s, C-3); 133.6 (s, C-1'); 145.4 (s, C-3'); 147.9 (s, C-4' oder C-5'); 148.1 (s, C-5' oder C-4').

Die $^1\text{H-NMR}$ Daten stammten mit der Literatur überein.^[219]

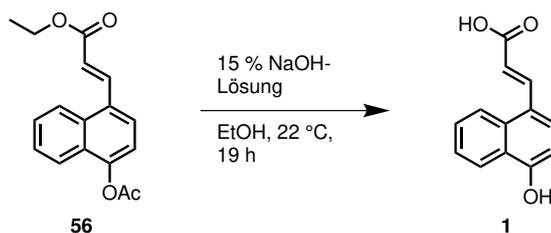
7.3.1.3 Synthese der unnatürlichen Zimtsäurederivate

Synthese von Naphthylensäure (**1**) - Demethylierung



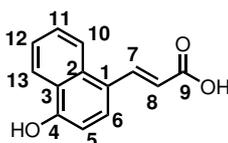
14 mmol (*E*)-3-(4-methoxynaphthalen-1-yl)acrylsäure (**75**) wurden in 12 mL/mmols_{Substrat} Dichlormethan in einem *Schlenk*-Kolben gelöst. Zu der rührenden Reaktionslösung wurden langsam 3.5 Äq. einer 1 M Lösung von Bortribromid in Dichlormethangegeben. Die Reaktion wurde bis zur vollständigen Umsetzung bei - C gerührt und dabei mit DC überprüft. Das Gemisch wurde durch Zugabe von Wasser gequench und anschließend mit EE verdünnt. Nach Extraktion des Produktes (dreimal mit EE) wurden die vereinigten organischen Phasen mit MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Produkt **1** wurde darauffolgend mit Säulenchromatographie (Dichlormethan:MeOH 98:2) gereinigt.

Synthese von Naphthylensäure (1) - Esterspaltung



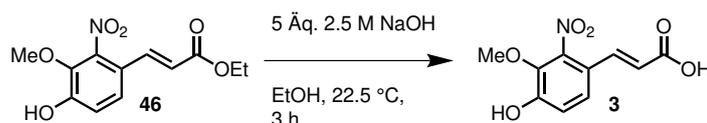
3.4 mmol 4-*O*-Acetoxynaphthylensäureethylester (**56**) wurden in 3 mL/mm_{ol}Substrat EtOH in einem Rundkolben gelöst. Zu der rührenden Reaktionslösung wurden langsam 15 mL 15%iger NaOH-Lösung zugegeben. Die Reaktion wurde über 19 h bei 22 °C gerührt. Die Umsetzung wurde mit DC überprüft. Nach vollständigem Umsatz wurde die Lösung durch Zugabe von 1 M NaCl-Lösung sauer gestellt und das Produkt dreimalig mit EE extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und durch Zugabe von MgSO₄ getrocknet. Nach einer Filtration wurde das Produkt mit Säulenchromatographie (Dichlormethan:MeOH 98:2) gereinigt.

Naphthylensäure (1)



Gemäß der Vorschrift zur Synthese von Naphthylensäure (**1**) im Abschnitt Synthese der unnatürlichen Zimtsäurederivate wurde die Naphthylensäure (**1**) aus (*E*)-3-(4-methoxynaphthalen-1-yl)acrylsäure (**75**) oder 4-*O*-Acetoxynaphthylensäureethylester (**56**) hergestellt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (Dichlormethan:MeOH 98:2) wurde das Produkt **1** in 26-43 % (über Demethylierung) bzw. 84 % (über Esterspaltung) Ausbeute erhalten. $R_f = 0.1$ (Dichlormethan:MeOH 98:2); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃, 600 MHz) [ppm]: 6.35 (d, $^3J_{3,2} = 15.7$ Hz, 1 H, 3-H); 6.88 (d, $^3J_{6',5'} = 7.6$ Hz, 1 H, 6'-H); 7.39-7.43 (m, 1 H, 9'-H); 7.49-7.53 (m, 1 H, 8'-H); 7.72 (d, $^3J_{5',6'} = 7.6$ Hz, 1 H, 5'-H); 8.09 (d, $^3J_{10',9'} = 8.6$ Hz, 1 H, 10'-H); 8.20 (d, $^3J_{7',8'} = 8.4$ Hz, 1 H, 7'-H); 8.34 (d, $^3J_{2,3} = 15.5$ Hz, 1 H, 2-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl₃, 151 MHz) [ppm]: 109.2 (s, C-5'); 118.3 (s, C-3); 123.6 (s, C-1'); 123.7 (s, C-10'); 123.8 (s, C-7'); 125.8 (s, C-2'); 126.0 (s, C-8'); 127.4 (s, C-6'); 128.3 (s, C-9'); 133.8 (s, C-3'); 142.1 (s, C-2); 156.6 (s, C-4'); 168.2 (s, C-1).

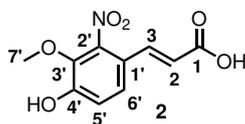
Synthese von 2-Nitroferulasäure (2)



0.37 mmol des Esters **46** wurden in 40 Äq. Ethanol gelöst. Die Lösung wurde zu 2.5 mL 2.5 M Natriumhydroxidlösung getropft und anschließend bei 22.5 °C gerührt. Die Umsetzung wurde mit DC überprüft. Nach vollständiger Umsetzung wurde die Reaktion mit Wasser verdünnt

und mit C 1 M Salzsäure auf einen pH-Wert von ca. 2 eingestellt. Der ausfallende Feststoff wurde abgetrennt und getrocknet. Die wässrige Phase wurde mit EE extrahiert. Nach Trocknung der organischen Phase und Entfernen des Lösungsmittels wurden beide Feststoffe vereinigt.

2-Nitroferulasäure (**2**)



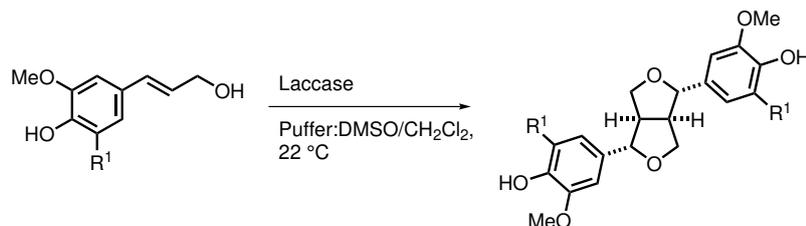
Gemäß der Vorschrift zur Synthese von 2-Nitroferulasäure (**3**) im Abschnitt Synthese der unnatürlichen Zimtsäurederivate wurde die Säure **3** aus ihrem Ethylester (**46**) hergestellt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (Dichlormethan:MeOH 98:2) wurde das Produkt **3** in 60 % Ausbeute erhalten. $R_f = 0.2$ (Dichlormethan:MeOH 98:2); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 3.84 (s, 3 H, 7'-H); 6.47 (dd, $^3J_{3,2} = 15.7$ Hz, $^4J_{3,6'} = 1.8$ Hz, 1 H, 3-H); 7.09 (dd, $^3J_{5',6'} = 8.8$ Hz, $^4J_{5',4'-OH} = 1.7$ Hz, 1 H, 5'-H); 7.13 (d, $^3J_{2,3} = 15.7$ Hz, 1 H, 2-H); 7.63 (dd, $^3J_{6',5'} = 8.8$ Hz, $^4J_{6',3} = 1.8$ Hz, 1 H, 6'-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz) [ppm] : 61.4 (s, C-7'); 116.5 (s, C-1'); 119.1 (s, C-6'); 121.1 (s, C-3); 123.2 (s, C-5'); 134.9 (s, C-2); 138.6 (s, C-3'); 145.7 (s, C-2'); 153.0 (s, C-4'); 166.9 (s, C-1); **HRMS (in MeOH)**: 262.0321 (Molekül+Na⁺) .

Die $^1\text{H-NMR}$ Daten stammten mit der Literatur überein.^[174]

7.3.2 Lignansynthese

7.3.2.1 Chemisch-enzymatische Lignansynthese

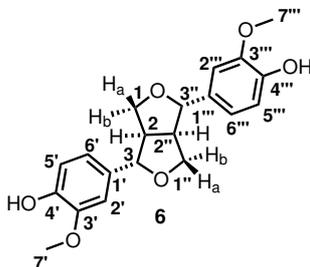
Dimerisierung der Monolignole



1.9 mmol Alkohol wurden in 370 μL DMSO gelöst. 25 U/mmol kommerziell verfügbare Laccase aus *T. versicolor* wurden in 250 mL Na-Acetat Puffer (0.1 mol/L, pH 6.0) in einem Rundkolben gegeben und die Lösung langsam gerührt. Der gelöste Alkohol wurde langsam zugegeben. Die Reaktion wurde anschließend bei C gerührt und mittels DC kontrolliert. Die Zufuhr von Sauerstoff wurde durch eine durch das Septum gestochene Kanüle sichergestellt. Im Falle von 5-Bromconiferylalkohol ging ein vollständiger Verbrauch des Eduktes mit einer Farbveränderung von farblos/gelblich zu orange/lachsfarben einher. Nach vollständigen Umsatz wurde die Reaktion durch Zugabe 1 M HCl-Lösung gequenchet. Das Produkt wurde mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mittels MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Produkt wurde mit Säulenchromatographie (Dichlormethan:MeOH 97:3 für Coniferylalkohol (**4**) als Edukt und Dichlormethan:MeOH 99:1 für 5-Bromconiferylalkohol (**3**)) gereinigt. Der erhaltene weiße Feststoff

wurde mit Chloroform gewaschen, um das saubere Produkt zu erhalten. Die Reinheit des Produktes wurde mit qNMR bestimmt.

Pinoresinol (6)



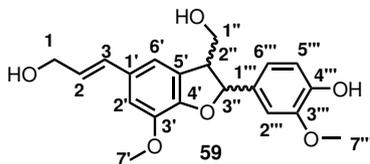
Gemäß der Vorschrift zur Dimerisierung der Monolignole im Abschnitt chemisch-enzymatische Lignansynthese wurde Pinoresinol (**6**) aus Coniferylalkohol (**4**) hergestellt. Die Reinigung wurde nach verschiedenen Methoden auch in Kombination miteinander durchgeführt.

- Präparative DC (PE:EE 1:1)
- MPLC (Dichlormethan:MeOH 99:1-90:10)
- Säulenchromatographie (Dichlormethan:MeOH 99:1)

Die Ausbeute für das Produkt **6** betrug dabei 0.4-12.3 %. $R_f = 0.24$ (Dichlormethan:MeOH 99:1); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 3.09-3.12 (m, 2 H, 2-, 2''-H); 3.88 (dd, $^2J_{1a/1b,1b'/1a} = 9.3$ Hz, $^2J_{1a''/1b'',1b'''/1a''} = 9.3$ Hz, $^3J_{1a/1b,2} = 3.6$ Hz, $^2J_{1a''/1b'',2''} = 3.6$ Hz, 2 H, 1_{a/b}-, 1''_{a/b}-H); 3.90 (s, 6 H, 7'-, 7''-H); 4.23-4.26 (m, 2 H, 1_{b/a}-, 1''_{b/a}-H); 4.74 (d, $^3J_{3,1} = 4.1$ Hz, $^3J_{3'',1''} = 4.1$ Hz, 2 H, 3-, 3''-H); 5.68 (brs, 2 H, 4'-, 4'''-OH); 6.82 (dd, $^3J_{6',5'} = 8.1$ Hz, $^3J_{6'',5''} = 8.1$ Hz, $^3J_{6',2'} = 1.8$ Hz, $^3J_{6'',2''} = 1.8$ Hz, 2 H, 6'-, 6''-H); 6.88 (d, $^3J_{5',6'} = 8.1$ Hz, $^3J_{5'',6''} = 8.1$ Hz, 2 H, 5'-, 5''-H); 6.90 (d, $^3J_{2',6'} = 1.8$ Hz, $^3J_{2'',6''} = 1.8$ Hz, 2 H, 2'-, 2''-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz) [ppm] : 54.3 (s, C-2, -2'); 56.1 (s, C-7', -7''); 71.8 (s, C-1, -1'); 86.0 (s, C-3, -3'); 100.1 (s, C-1', -1''); 108.2 (s, C-2', -2''); 114.4 (s, C-5', -5''); 119.1 (s, C-6', -6''); 132.9 (s, C-4', -4''); 145.2 (s, C-5', -5''); 146.7 (s, C-3', -3'').

Die experimentellen Daten deckten sich mit publizierten Daten.^[2]

Dehydrodiconiferylalkohol (59)



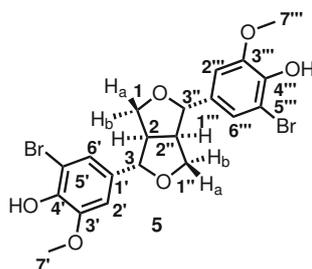
Gemäß der Vorschrift zur Dimerisierung der Monolignole im Abschnitt chemisch-enzymatische Lignansynthese wurde Dehydrodiconiferylalkohol (**59**) aus Coniferylalkohol (**4**) hergestellt. Die Reinigung wurde nach verschiedenen Methoden auch in Kombination miteinander durchgeführt.

- Präparative DC (PE:EE 1:1)

- MPLC (Dichlormethan:MeOH 99:1-90:10)
- Säulenchromatographie (Dichlormethan:MeOH 99:1)

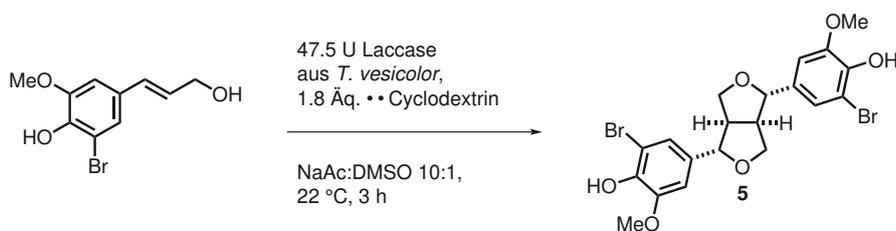
Die Ausbeute für das Produkt **6** betrug dabei 10-12 %. $R_f = 0.18$ (Dichlormethan:MeOH 97:3); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 3.57-3.61 (m, 1 H, 2''-H); 3.86 (s, 3 H, 7'-H/7''-H); 3.90 (s, 3 H, 7''-H/7'-H); 3.93 (m, 2 H, 1''-H); 4.29 (d, $^3J_{1,2} = 5.7$ Hz, 2 H, 1-H); 5.58 (d, $^3J_{3,2} = 7.0$ Hz, 1 H, 3''-H); 6.24 (dt, $^3J_{2,3} = 15.9$ Hz, $^3J_{2,10} = 5.9$ Hz, 1 H, 2-H); 6.55 (d, $^3J_{3,2} = 15.8$ Hz, 1 H, 3-H); 6.85-6.94 (m, 5 H, 2'-, 6'-, 2''-, 5''-, 6''-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz) [ppm] : 53.7 (s, C-2''); 56.1 (s, C-7', -7''); 63.7 (s, C-1); 64.1 (s, C-1''); 88.4 (s, C-3''); 109.0 (s, C-2' / -6' / -2'' / -5'' / -6''); 110.5 (s, C-2' / -6' / -2'' / -5'' / -6''); 114.53 (s, C-2' / -6' / -2'' / -5'' / -6''); 115.0 (s, C-2' / -6' / -2'' / -5'' / -6''); 119.5 (s, C-2' / -6' / -2'' / -5'' / -6''); 126.7 (s, C-2); 128.5 (s, C-2' / -6' / -2'' / -5'' / -6''); 131.0 (s, C-1'); 131.2 (s, C-3); 133.1 (s, C-1''); 144.5 (s, C-3' / -3''); 145.9 (s, C-4' / -4''); 146.9 (s, C-3' / -3''); 148.3 (s, C-4' / -4'').

Die experimentellen Daten deckten sich mit publizierten Daten.^[2]

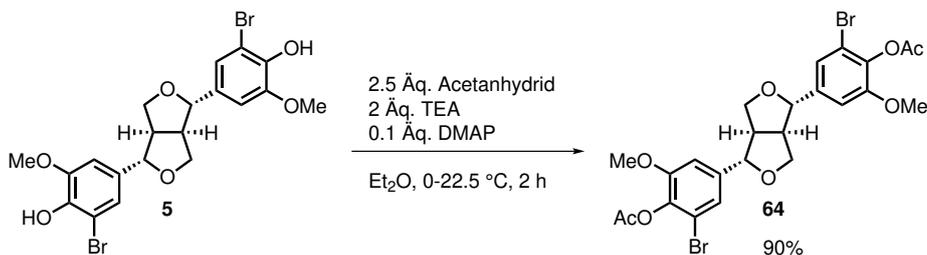
5,5'-Dibrompinoresinol (**5**)

Gemäß der Vorschrift zur Dimerisierung der Monolignole im Abschnitt chemisch-enzymatische Lignansynthese wurde 5,5'-Dibrompinoresinol (**5**) aus 5-Bromconiferylalkohol (**3**) hergestellt. Das Produkt wurde nach der säulenchromatographischen Reinigung (Dichlormethan:MeOH 98:2) in 24 % Ausbeute erhalten. $R_f = 0.47$ (Dichlormethan:MeOH 98:2); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ [ppm] : 3.05-3.08 (m, 2 H, 2-, 2''-H); 3.88 (dd, $^2J_{1a/1b,1b/1a} = 9.2$ Hz, $^2J_{1a''/1b'',1b''/1a''} = 9.2$ Hz, $^3J_{1a/1b,2} = 3.4$ Hz, $^2J_{1a'/1b',2'} = 3.4$ Hz, 2 H, 1_{a/b}-, 1'_{a/b}-H); 3.92 (s, 6 H, 7', 7''-H); 4.24 (ddd, $^2J_{1a/1b,1b/1a} = 9.2$ Hz, $^2J_{1a''/1b'',1b''/1a''} = 9.2$ Hz, $^2J_{1a/1b,2} = 4.4$ Hz, $^2J_{1a''/1b'',2''} = 4.4$ Hz, $^2J_{1a/1b,3} = 2.4$ Hz, $^2J_{1a''/1b'',3''} = 2.4$ Hz, 2 H, 1_{b/a}-, 1'_{b/a}-H); 4.70 (d, $^3J_{3,2} = 3.9$ Hz, $^3J_{3'',2''} = 3.9$ Hz, 2 H, 3-, 3''-H); 6.83 (d, $^4J_{2',6'} = 1.8$ Hz, $^4J_{2'',6''} = 1.8$ Hz, 2 H, 2'-, 2''-H); 7.06 (d, $^4J_{6',2'} = 1.8$ Hz, $^4J_{6'',2''} = 1.8$ Hz, 2 H, 6'-, 6''-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz) δ [ppm] : 54.2 (s, C-2, -2'); 56.6 (s, C-7', -7''); 71.9 (s, C-1, -1''); 85.3 (s, C-3, -3''); 107.8 (s, C-2', -2''); 108.3 (s, C-1', -1''); 122.2 (s, C-6', -6''); 133.9 (s, C-5', -5''); 142.8 (s, C-4', -4''); 147.5 (s, C-3', -3''); IR (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3482, 2967, 1723, 1434, 1378, 796; HRMS (in MeOH): m/z berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{Br}^{79}_2\text{O}_6$ (M-H) 513.0; gefunden 513.0; $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{Br}^{79}_1\text{Br}^{81}_1\text{O}_6$ (M-H) 515.0; gefunden 515.0; $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{Br}^{81}_2\text{O}_6$ (M-H) 517.0; gefunden 517.0.

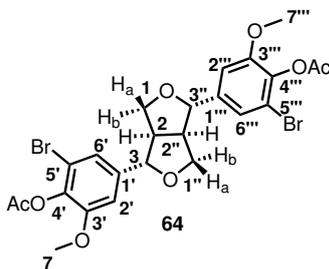
Dimerisierung im präparativen Maßstab mit Zugabe von Cyclodextrin



1.93 mmol 5-Bromconiferylalkohol (**3**) wurden in 30 mL DMSO gelöst und tropfenweise zu 300 mL Natriumacetatpuffer (100 mM, pH 5.0) gegeben. 1.8 Äq. β -Cyclodextrin gefolgt von 25 U/mmol Laccase aus *T. vesicolor* wurden unter Rühren dazugegeben. Eine kontinuierliche Sauerstoffzufuhr wurde mittels einer durch das Sptum gestochenen Kanüle sichergestellt. Die Suspension wurde für 2 h bei 22.5 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 M Salzsäure beendet und das Produkt dreimal mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Produkt wurde mit Säulenchromatographie (Dichlormethan:MeOH 9:1) aufgereinigt.

Acetylierung von 5,5'-Dibrompinoresinol (**5**)

1.2 mmol 5,5'-Dibrompinoresinol (**5**) wurden in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas in 100 Äq. Diethylether gelöst. Die Reaktion wurde auf 0°C gekühlt und nacheinander wurden 3 Äq. TEA, 0.1 Äq. DMAP und 2.4 Äq. Acetanhydrid zugegeben. Die Lösung wurde für 1 h bei 0°C gerührt. Anschließend wurde sie bis zur vollständigen Umsetzung bei 22.5°C Rühren gelassen. Die Kontrolle erfolgte dabei mit DC. Nach vollständigem Umsatz wurde die Lösung mit 1 M Salzsäure-Lösung neutralisiert und das Produkt anschließend mit Diethylether extrahiert. Das Rohprodukt wurde mit EE gewaschen und die Identität mit NMR überprüft. Zur Abtrennung der im qNMR identifizierten Verunreinigungen wurde das Produkt **64** in Chloroform gelöst und durch Filtration mit einem 0.45 μm Microsart-Filter gereinigt. Die Reinheit wurde erneut mit qNMR überprüft.

4,4'-Di-O-acetyl-5,5'-dibrompinoresinol (**64**)

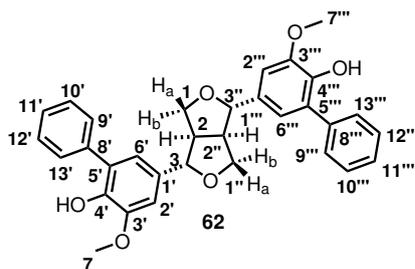
Gemäß der Vorschrift zur Acetylierung von 5,5'-Dibrompinoresinol (**5**) im Abschnitt chemisch-enzymatische Lignansynthese wurde 4,4'-Di-O-acetyl-5,5'-dibrompinoresinol (**64**) aus 5,5'-Dibrompinoresinol (**5**) hergestellt. Das Produkt wurde nach der säulenchromatographischen Reinigung (Dichlormethan:MeOH 1:1) in 90 % Ausbeute erhalten. $R_f = 0.33$ (Dichlormethan:MeOH 50:50); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm]: 2.36 (s, 6 H, 2x $\text{C}[\text{O}]\text{CH}_3$); 3.04-3.10 (m, 2 H, 2-, 2''-H); 3.85 (s, 6 H, 7', 7''-H); 3.94 (dd, $^2J_{1a/1b,1b/1a} = 9.4$ Hz, $^2J_{1a''/1b'',1b''/1a''} = 9.4$ Hz, $^3J_{1a/1b,2} = 3.2$ Hz, $^2J_{1a''/1b'',2''} = 3.2$ Hz, 2 H, 1_{a/b}-, 1''_{a/b}-H); 4.25-4.33 (m, 2 H, 1_{b/a}-, 1''_{b/a}-H); 4.76 (d, $^3J_{3,2} = 3.9$ Hz, $^3J_{3'',2''} = 3.9$ Hz, 2 H, 3-, 3''-H); 6.91 (d, $^4J_{2',6'} = 1.8$ Hz, $^4J_{2'',6''} = 1.8$ Hz, 2 H, 2'-, 2''-H); 7.13 (d, $^4J_{6',2'} = 1.8$ Hz, $^4J_{6'',2''} = 1.8$ Hz, 2 H, 6'-, 6''-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz) [ppm]: 20.6 (s, 2x $\text{C}[\text{O}]\text{CH}_3$); 54.4 (s, C-2, -2''); 56.4 (s, C-7', -7''); 72.2 (s, C-1, -1''); 85.0 (s, C-3, -3''); 108.9 (s, C-2', -2''); 117.5 (s, C-1', -1''); 121.7 (s, C-6', -6''); 137.3 (s, C-4', -4''); 141.0 (s, C-5', -5''); 152.8 (s, C-3', -3''); 168.1 (s, 2x $\text{C}[\text{O}]\text{CH}_3$).

7.3.3 Suzuki-Kupplung

Aus allen Lösungsmittel wurde der Sauerstoff vor der Reaktion mittels Hindurchleiten (= *purging*) von Stickstoff für 45 min entfernt. 0.1 mmol () 5,5'-Dibrompinoresinol [() **5**],

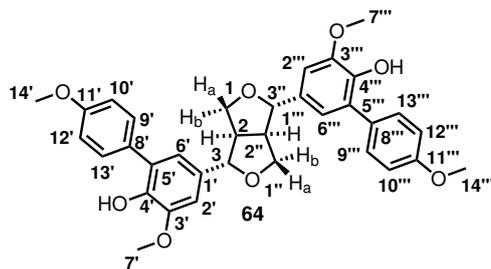
0.2 Äq. Bis(tri-*tert*-butylphosphin)-palladium (0), 8 Äq. K_3PO_4 , 5 Äq. Boronsäure und 5 mL 1,4-Dioxan:Wasser (9:1) wurden unter Schutzgas in ein *Schlenk*-Rohr gegeben. Die Reaktion wurde auf $60^\circ C$ erwärmt und für 3 h gerührt. Die Umsetzung wurde über DC kontrolliert. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion über Zugabe von 1 M Salzsäure gequencht. Das Rohprodukt wurde aus der wässrigen Phase mit EE (dreimal) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Produkt wurde mit Säulenchromatographie (Dichlormethan:MeOH 99:1) gereinigt.

() 5,5'-Diphenylpinoresinol [()-62]



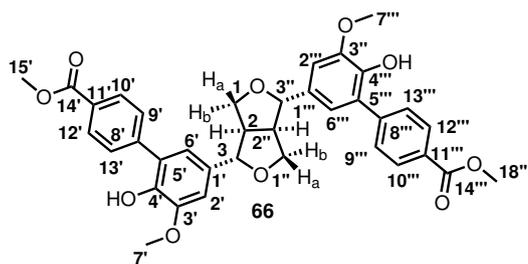
Gemäß der Vorschrift zur Suzuki-Kupplung im Abschnitt Lignansynthese wurde ()-5,5'-Diphenylpinoresinol [() 62] erfolgreich aus () 5,5'-Dibrompinoresinol [() 5] hergestellt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (Dichlormethan:MeOH 99:1) wurde das Produkt **62** in 95 % Ausbeute erhalten. $R_f = 0.34$ (Dichlormethan:MeOH 99:1); 1H -NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) [ppm]: 3.15-3.21 (m, 2 H, 2-, 2''-H); 3.93 (dd, $^2J_{1a/1b,1b/1a} = 9.2$ Hz, $^2J_{1a''/1b'',1b''/1a''} = 9.2$ Hz, $^3J_{1a/1b,2} = 3.4$ Hz, $^2J_{1a''/1b'',2''} = 3.4$ Hz, 2 H, 1_{a/b}-, 1''_{a/b}-H); 3.94 (s, 6 H, 7'-, 7''-H); 4.28-4.32 (m, 2 H, 1_{b/a}-, 1''_{b/a}-H); 4.81 (d, $^3J_{3,2} = 3.9$ Hz, $^3J_{3'',2''} = 3.9$ Hz, 2 H, 3-, 3''-H); 5.87 (s, 2 H, 4'-, 4''-O-H); 6.92 (d, $^4J_{2',6'} = 1.9$ Hz, $^4J_{2'',6''} = 1.9$ Hz, 2 H, 2'-, 2''-H); 6.94 (d, $^4J_{6',2'} = 1.9$ Hz, $^4J_{6'',2''} = 1.9$ Hz, 2 H, 6'-, 6''-H); 7.35 (t, $^3J_{11',10'} = 7.5$ Hz, $^3J_{11'',10''} = 7.5$ Hz, $^3J_{11'',12''} = 7.5$ Hz, 2 H, 11'-, 11''-H); 7.44 (dd, $^3J_{10',9'} = 7.5$ Hz, $^3J_{10'',9''} = 7.5$ Hz, $^3J_{10'',13''} = 7.5$ Hz, $^3J_{10'',11''} = 7.5$ Hz, $^3J_{12'',11''} = 7.5$ Hz, $^3J_{10'',11''} = 7.5$ Hz, $^3J_{12'',11''} = 7.5$ Hz, 4 H, 10'-, 12'-, 10''-, 12''-H); 7.61 (d, $^3J_{9',10'} = 7.5$ Hz, $^3J_{13',12'} = 7.5$ Hz, $^3J_{9'',10''} = 7.5$ Hz, $^3J_{13'',12''} = 7.5$ Hz, 4 H, 9'-, 13'-, 9''-, 13''-H); IR (ATR-Film): $[1/cm] = 3508, 2936, 1598, 1503, 1424, 1313, 1049, 848, 700$; ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 151 MHz) [ppm]: 54.3 (s, C-2, -2''); 56.4 (s, C-7', -7'''); 71.9 (s, C-1, -1''); 86.1 (s, C-3, -3''); 107.7 (s, C-2', -2'''); 120.4 (s, C-6', -6'''); 127.4 (s, C-11, -11''); 127.6 (s, C-5', -5'''); 128.3 (s, C-10', -12', -10''', -12'''); 129.3 (s, C-9', -13', -9''', -13'''); 132.5 (s, C-1', -1'''); 137.7 (s, C-8', -8'''); 142.8 (s, C-4', -4'''); 147.1 (s, C-3', -3'''); HRMS (in MeOH): m/z berechnet für $C_{32}H_{29}O_6$ (M-H) 509.20; gefunden 509.19.

() 5,5'-Di(4,4'-methoxyphenyl)-pinoresinol [()-64]



Gemäß der Vorschrift zur Suzuki-Kupplung im Abschnitt Lignansynthese wurde ()-5,5'-Di(4,4'-methoxyphenyl)-pinoresinol [() **51**] erfolgreich aus () 5,5'-Dibrompinoresinol [() **5**] hergestellt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (Dichlormethan:MeOH 99:1) wurde das Produkt **51** in 88 % Ausbeute erhalten. $R_f = 0.14$ (Dichlormethan:MeOH 99:1); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 3.13-3.21 (m, 2 H, 2-, 2''-H); 3.85 (s, 6 H, 14', 14''-H); 3.89-3.94 (m, 2 H, 1_{a/b}-, 1''_{a/b}-H); 3.95 (s, 6 H, 7', 7''-H); 4.27-4.32 (m, 2 H, 1_{b/a}-, 1''_{b/a}-H); 4.79 (d, $^3J_{3,2} = 3.9$ Hz, $^3J_{3'',2''} = 3.9$ Hz, 2 H, 3-, 3''-H); 5.86 (s, 2 H, 4', 4''-O-H); 6.89 (d, $^4J_{2',6'} = 2.0$ Hz, $^4J_{2'',6''} = 2.0$ Hz, 2 H, 2', 2''-H); 6.91 (d, $^4J_{6',2'} = 2.0$ Hz, $^4J_{6'',2''} = 2.0$ Hz, 2 H, 6', 6''-H); 6.98 (d, $^3J_{9',10'} = 8.7$ Hz, $^3J_{13',12'} = 8.7$ Hz, $^3J_{9'',10''} = 8.7$ Hz, $^3J_{13'',12''} = 8.7$ Hz, 4 H, 9', 13', 9'', 13''-H); 7.55 (d, $^3J_{10',9'} = 8.7$ Hz, $^3J_{12',13'} = 8.7$ Hz, $^3J_{10'',9''} = 8.7$ Hz, $^3J_{12'',13''} = 8.7$ Hz, 4 H, 10', 12', 10'', 12''-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz) [ppm] : 54.3 (s, C-2, -2''); 55.4 (s, C-14', -14''); 56.4 (s, C-7', -7''); 71.9 (s, C-1, -1''); 86.1 (s, C-3, -3''); 107.3 (s, C-2', -2''); 113.9 (s, C-9', -13', -9'', -13''); 120.2 (s, C-6', -6''); 127.2 (s, C-5', -5''); 130.0 (s, C-8', -8''); 130.4 (s, C-10', -12', -10'', -12''); 132.5 (s, C-1', -1''); 142.4 (s, C-4', -4''); 147.1 (s, C-3', -3''); 159.0 (s, C-11', -11''); IR (ATR-Film): $[1/\text{cm}] = 3504, 2938, 1609, 1515, 1244, 1034, 833$; HRMS (in MeOH): m/z berechnet für $\text{C}_{34}\text{H}_{33}\text{O}_8$ (M-H) 569.20; gefunden 569.22 .

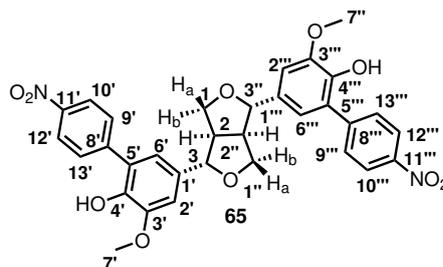
() 5,5'-Di(4,4'-(methoxycarbonyl)-phenyl)-pinoresinol [()-66]



Gemäß der Vorschrift zur Suzuki-Kupplung im Abschnitt Lignansynthese wurde ()-5,5'-Di(4,4'-(methoxycarbonyl)-phenyl)-pinoresinol [() **66**] erfolgreich aus () 5,5'-Dibrompinoresinol [() **5**] hergestellt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (Dichlormethan:MeOH 99:1) wurde das Produkt **66** in 91 % Ausbeute erhalten. $R_f = 0.1$ (Dichlormethan:MeOH 99:1); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 3.12-3.22 (m, 2 H, 2-, 2''-H); 3.89-3.94 (m, 2 H, 10_{a/b}-, 1''_{a/b}-H); 3.93 (s, 6 H, 15', 15''-H); 3.95 (s, 6 H, 7', 7''-H); 4.27-4.32 (m, 2 H, 1_{b/a}-, 1''_{b/a}-H); 4.80 (d, $^3J_{3,2} = 3.9$ Hz, $^3J_{3'',2''} = 3.9$ Hz, 2 H, 3-, 3''-H); 5.97 (s, 2 H, 4', 4''-O-H); 6.93 (d, $^4J_{2',6'} = 1.9$ Hz, $^4J_{2'',6''} = 1.9$ Hz, 2 H, 2', 2''-H); 6.94 (d, $^4J_{6',2'} = 1.9$ Hz, $^4J_{6'',2''} = 1.9$ Hz, 2 H, 6', 6''-H); 7.86 (d, $^3J_{9',10'} = 8.3$ Hz, $^3J_{13',12'} = 8.3$ Hz, $^3J_{9'',10''} = 8.3$ Hz, $^3J_{13'',12''} = 8.3$ Hz, 4 H, 9', 13', 9'', 13''-H); 8.1 (d, $^3J_{10',9'} = 8.3$ Hz,

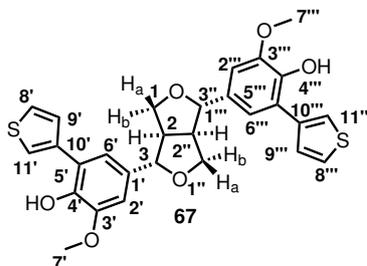
$^3J_{12',13'} = 8.3$ Hz, $^3J_{10''',9'''} = 8.3$ Hz, $^3J_{12''',13'''} = 8.3$ Hz, 4 H, 10¹⁻, 12¹⁻, 10^{2'-}, 12^{2'-}-H); **¹³C-NMR** (CDCl₃, 151 MHz) [ppm]: 52.2 (s, C-15', -15''); 54.3 (s, C-2, -2''); 56.4 (s, C-7', -7''); 71.9 (s, C-1, -1'); 86.0 (s, C-3, -3'); 108.2 (s, C-2', -2''); 120.1 (s, C-6', -6''); 126.4 (s, C-5', -5''); 128.8 (s, C-8', -8''); 129.3 (s, C-9', -13', -9''), -19''); 129.3 (s, C-10', -12', -10''), -12''); 132.7 (s, C-1', -1''); 142.5 (s, C-11', -11''); 142.7 (s, C-4', -4''); 147.2 (s, C-3', -3''); 167.2 (s, C-14', -14''); **IR** (ATR-Film): [1/cm] = 3407, 2951, 1712, 1503, 1608, 1435, 1277, 1104, 853, 708; **HRMS** (in MeOH): m/z berechnet für C₃₆H₃₃O₁₀ (M-H) 625.21; gefunden 625.21.

() **5,5'-Di(4-nitrophenyl)-pinoresinol** [()-**65**]



Gemäß der Vorschrift zur Suzuki-Kupplung im Abschnitt Lignansynthese wurde ()-5,5'-Di(4-nitrophenyl)-pinoresinol [() **65**] erfolgreich aus () 5,5'-Dibrompinoresinol [() **5**] hergestellt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (Dichlormethan:MeOH 99:1) wurde das Produkt **65** in 84% Ausbeute erhalten. **R_f** = 0.15 (Dichlormethan:MeOH 99:1); **¹H-NMR** (CDCl₃, 600 MHz) [ppm]: 3.14-3.20 (m, 2 H, 2-, 2''-H); 3.95 (dd, $^2J_{1a/1b,1b/1a} = 9.4$ Hz, $^2J_{1a''/1b'',1b''/1a''} = 9.4$ Hz, $^3J_{1a/1b,2} = 3.2$ Hz, $^2J_{1a''/1b'',2''} = 3.2$ Hz, 2 H, 1_{a/b-}, 1''_{a/b-}-H); 3.98 (s, 6 H, 7', 7''-H); 4.29-4.34 (m, 2 H, 1_{b/a-}, 1''_{b/a-}-H); 4.81 (d, $^3J_{3,2} = 3.9$ Hz, $^3J_{3'',2''} = 3.9$ Hz, 2 H, 3-, 3''-H); 6.0 (s, 2 H, 4', 4''-O-H); 6.95 (d, $^4J_{2',6'} = 1.9$ Hz, $^4J_{2'',6''} = 1.9$ Hz, 2 H, 2', 2''-H); 6.96 (d, $^4J_{6',2'} = 1.9$ Hz, $^4J_{6'',2''} = 1.9$ Hz, 2 H, 6', 6''-H); 7.76-7.79 (m, 4 H, 9', 13', 9'', 13''-H); 8.24-8.27 (m, 4 H, 10', 12', 10'', 12''-H); **¹³C-NMR** (CDCl₃, 151 MHz) [ppm]: 54.4 (s, C-2, -2''); 65.5 (s, C-7', -7''); 71.9 (s, C-1, -1''); 85.8 (s, C-3, -3''); 108.7 (s, C-6', -6''); 119.8 (s, C-2', -2''); 123.5 (s, C-10', -12', -10''), -12''); 125.0 (s, C-8', -8''); 130.1 (s, C-9', -13', -9''), -13''); 133.0 (s, C-5', -5''); 142.8 (s, C-1', -1''); 144.5 (s, C-14'1', -11''); 146.9 (s, C-4', -4''); 147.3 (s, C-3', -3''); **IR** (ATR-Film): [1/cm] = 3351, 2940, 1708, 1593, 1514, 1342, 1046, 851, 699; **HRMS** (in MeOH): m/z berechnet für C₃₂H₂₇N₂O₁₀ (M-H) 599.17; gefunden 599.16.

() **5,5'-Di-(3-thienyl)-pinoresinol** [()-**67**]



Gemäß der Vorschrift zur Suzuki-Kupplung im Abschnitt Lignansynthese wurde ()-5,5'-Di-(3-thienyl)-pinoresinol [() **67**] erfolgreich aus () 5,5'-Dibrompinoresinol [() **5**] hergestellt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (Dichlormethan:MeOH 99:1) wurde

das Produkt **67** in 80 % Ausbeute erhalten. $R_f = 0.14$ (Dichlormethan:MeOH 99:1); **$^1\text{H-NMR}$** (CDCl_3 , 600 MHz) [ppm] : 3.14-3.18 (m, 2 H, 2-, 2''-H); 3.91-3.94 (m, 2 H, 1_{a/b}-, 1''_{a/b}-H); 3.95 (s, 6 H, 7'-, 7'''-H); 4.30 (dd, $^2J_{1b/1a,1a/1b} = 8.8$ Hz, $^2J_{1b''/1a'',1a''/1b''} = 8.8$ Hz, 2 H, 1_{b/a}-, 1''_{b/a}-H); 4.7.9 (d, $^3J_{3,2} = 3.9$ Hz, $^3J_{3'',2''} = 3.9$ Hz, 2 H, 3-, 3''-H); 6.1 (s, 2 H, 4'-, 4'''-O-H); 6.86 (d, $^4J_{2',6'} = 1.9$ Hz, $^4J_{2'',6''} = 1.9$ Hz, 2 H, 2'-, 2'''-H); 7.1 (d, $^4J_{6',2'} = 1.9$ Hz, $^4J_{6'',2''} = 1.9$ Hz, 2 H, 6'-, 6'''-H); 7.37 (dd, $^3J_{8',9'} = 5.0$ Hz, $^3J_{8'',9''} = 5.0$ Hz, $^3J_{8',11'} = 3.0$ Hz, $^3J_{8'',11''} = 3.0$ Hz, 2 H, 8'-, 8'''-H); 7.51 (dd, $^3J_{9',8'} = 5.1$ Hz, $^3J_{9'',18''} = 5.1$ Hz, $^4J_{9',11'} = 1.4$ Hz, $^4J_{9'',11''} = 3.0$ Hz, 2 H, 9'-, 9'''-H); 7.73 (dd, $^3J_{11',8'} = 3.0$ Hz, $^3J_{11'',8''} = 3.0$ Hz, $^4J_{11',9'} = 1.3$ Hz, $^4J_{11'',9''} = 1.2$ Hz, 2 H, 11'-, 11'''-H); **$^{13}\text{C-NMR}$** (CDCl_3 , 151 MHz) [ppm] : 54.4 (s, C-2, -2''); 56.4 (s, C-7', -7''); 71.9 (s, C-1, -1''); 86.1 (s, C-3, -3''); 107.2 (s, C-2', -2''); 119.2 (s, C-6', -6''); 122.0 (s, C-10', -10''); 123.5 (s, C-11', -11''); 125.0 (s, C-8', -8''); 128.1 (s, C-9', -9''); 132.4 (s, C-1', -1''); 137.6 (s, C-5', -5''); 142.5 (s, C-4', -4''); 147.3 (s, C-3', -3''); **IR** (ATR-Film): $[1/\text{cm}] = 3369, 2937, 1707, 1599, 1496, 1461, 1290, 1226, 1120, 1045, 839, 791, 671$; **HRMS** (in MeOH): m/z berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{O}_6\text{S}_2$ (M-H) 521.11; gefunden 521.11 .

Abbildungsverzeichnis

3.1	Synthesestrategie zur Herstellung von Pinoresinolderivaten	12
4.1	Zimtalkoholgrundstruktur (schwarz) mit möglichen Derivatisierungspositionen (rot). $R^{1-3} = H$ für Zimtalkohol (9). $R^{1,3} = -H, -OH, -OMe$ $R^2 = -OH$ für Zimtalkoholderivate. Cumaralkohol (7) $R^{1,3} = H, R^2 = OH$, Coniferylalkohol (4) $R^1 = OMe, R^2 = OH, R^3 = H$, Sinapylalkohol (8) $R^{1,3} = OMe, R^2 = OH$	13
4.2	Klassifikation der 8-8' Verknüpfungen basierend auf der Struktur	14
4.3	Übersicht über den Phenylpropanoidstoffwechsel mit Verknüpfungen zu den einzelnen Klassen. TAL = Tyrosin-Ammoniak-Lyase, PAL = Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, C4H = Zimtsäure-4-hydroxylase, 4CL = 4-Hydroxyzinnamoyl-CoA-Ligase, CCR = Cinnamoyl-CoA Reduktase, CAD = Zimtalkohol Dehydrogenase, HQT = Hydroxycinnamoyl-quinat Transferase, HCT = Hydroxycinnamoylshikimat Transferase, <i>p</i> C3H = <i>p</i> -Coumarate-3-hydroxylase, COMT = Cinnamoyl-O-methyltransferase, F5H = Ferulat-5-Hydroxylase, R = Shikimisäure, Chinasäure	15
4.4	Beispiel zur Synthese von (-)-Matairesinol [(+)- 23] aus (+)-Pinoresinol [(+)- 6], PLR = Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktase, SDH = Secoisolariciresinolreduktase	16
4.5	Zusammenstellung antioxidativer, antimykotischer und antibakterieller Lignane. Lignane mit antioxidativer Wirkung: Sesamin (25) Lignane mit antimykotischer Wirkung: Thannilignan (26), Magnolol (27) und Nordihydrogengujaretsäure (28) Lignane mit antibakterieller Wirkung: Magnolol (27) und Nordihydrogengujaretsäure (28).	17
4.6	Zusammenstellung verschiedener Lignane mit insektizider (29, 30, 31, 32) oder allelopathischer (33) Wirkung.	18
4.7	Mammale Lignane Enterolacton (34) und Enterodiol (35). Die Bildung aus Matairesinol (23) oder Secoisolariciresinol (21) findet im Darm durch Bakterien, mit anschließender Aufnahme über die Darmschleimhaut, statt.	19
4.8	Struktur von Podophyllotoxin (24)	20
4.9	Dreidimensionale Darstellung der Sekundärstruktur der Laccase aus <i>Melanocarpus albomyces</i> einer drei-Domänen Laccase (1GW0), adaptiert nach Hakulinen <i>et al.</i> citeupHakulinen2015	21
4.10	Dreidimensionale Darstellung der Sekundärstruktur zweier Zwei-Domänen Laccasen aus <i>Streptomyces coelicolor</i> (3CG8) und aus einem nicht näher identifizierten Organismus aus einer Metagenomstudie (4E9V). ^[87]	22
4.11	Dreidimensionale Verteilung der vier Kupferionen im aktiven Zentrum der Laccase aus <i>M. albomyces</i> (1GW0). mit den konservierten Aminosäureseitenketten	23
4.12	Darstellung des katalytischen Zyklus einer Laccase bestehend aus der ein-Elektronen Oxidation von vier Substratmolekülen verbunden mit der vier-Elektronenoxidation von molekularem Sauerstoff zu Wasser.	24
4.13	Grundlegender Reaktionszyklus einer Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung mit den vier wichtigsten Reaktionsschritten: I = Oxidative Addition, II = Transmetallierung, III = <i>cis/trans</i> -Isomerisierung, IV = Reduktive Eliminierung.	26

4.14	Mechanismen der vier häufigsten chemischen Reduktionsverfahren von Palladium(II) zu Palladium(0). ^[130-132]	28
4.15	Mechanismen der oxidativen Addition. A Mechanismus mit pentakoordiniertem Palladium, B Additionsmechanismus an verschiedenartig koordinierte Palladium(0)spezies, C Addition von Arylhalogenen an $[Pd(L_2)A]^-$ adaptiert nach Gooßen <i>et al.</i> ^[142]	29
4.16	Postulierte Mechanismen der Transmetallierung: A Boronatmechanismus B Palladiumhydroxocomplex Mechanismus.	30
4.17	Mögliche Reaktionsmechanismen der <i>cis-trans</i> -Isomerisierung, adaptiert nach Xue <i>et al.</i> ^[150]	31
4.18	Die Substitution der Borgruppe in einer basisch katalysierten Protodeboronierung, als Nebenreaktion in einer Suzuki-Kreuzkupplung.	32
4.19	Der Reaktionszyklus der oxidativen Homokupplung zweier Boronsäuren unter Anwesenheit von Sauerstoff.	33
4.20	Die Nebenreaktion der β -Hydrideliminierung, welche vor oder nach der Transmetallierung im Reaktionszyklus auftreten kann.	34
4.21	Wichtige Borverbindungen für die Suzuki-Kreuzkupplung.	34
5.1	Synthesestrategie zur Herstellung von Monolignolreferenzen aus kommerziell erhältlichen Säurederivaten	35
5.2	Mechanismus der Reduktion von Estern mit DiBAL-H. Adaptiert nach ^[173]	36
5.3	Synthese von Kaffeealkohol (16) in einer modifizierten Synthesemethode A. DIPEA = <i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin, TBAF = <i>tetra</i> -Butylammoniumfluorid	36
5.4	Auflistung aller Alkohole die mittels Synthesestrategie A aus ihren Säurederivaten synthetisiert wurden.	37
5.6	Auflistung aller Alkohole die mittels Synthesestrategie B aus ihren Benzaldehydderivaten synthetisiert wurden.	38
5.5	Synthesestrategie zur Herstellung von Monolignolreferenzen aus Benzaldehydderivaten. Acetylvanillin (44) wurde zuvor nitriert (Verzweigung A). 4-Hydroxy-1-naphthylaldehyd (48), 4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyd (49) und 3,4-Dihydroxy-5-methoxybenzaldehyd (50) wurden acetyliert (Verzweigung B). Die Synthesestrategie musste für die Herstellung von 5-Hydroxyconiferylalkohol (18) modifiziert werden (siehe Abbildung 5.7). TEA = Triethylamin; DMAP = Dimethylaminopyridin.	39
5.7	Synthesestrategie zur Herstellung von 5-Hydroxyconiferylalkohol. Anstelle der Acetylschutzgruppe wurde eine Pivaloylschutzgruppe verwendet. Zur Abspaltung dieser Gruppe wurde für die Reduktion $LiAlH_4$ anstelle von DiBAL-H verwendet. Das Produkt 54 wurde nach Bestätigung der Identität über 1H -NMR direkt weiter umgesetzt.	40
5.8	Synthesestrategie zur Herstellung von 2-Nitroferulasäure (2) aus 2-Nitroferulasäureethylester (46).	40
5.9	Synthesestrategie zur Herstellung von Naphthylensäure (1) aus 4- <i>O</i> -Methoxynaphthylensäure (55) bzw. 4- <i>O</i> -Acetoxynaphthylensäureethylester (56).	41
5.10	Reduktion von Monolignolsäuren/-derivaten mithilfe des mutierten <i>E. coli</i> Stammes. ^[176]	42
5.11	Vergleich der chemischen Verschiebungen von Zimtsäure, -aldehyd und -alkohol mit Markierung des zur Identifikation verwendeten C^8 - <i>H</i> . Chemische Verschiebung von Zimtaldehyd entnommen aus Könning <i>et al.</i> ^[180]	44
5.12	Ausschnitt eines NMR-Spektrums von Coniferylalkohol (4) mit DMS.	44

5.13	Vergleich eines HPLC-Chromatogramms des Kulturüberstandes mit einem Ausschnitt eines NMR-Chromatogramms. In beiden Fällen wurde die Reduktion von 2-Nitroferulasäure (2) zu 2-Nitroconiferylalkohol (43) untersucht. Das HPLC-Chromatogramm wurde von Jennifer Aschenbrenner zur Verfügung gestellt.	46
5.14	Die Bildung der Hauptdimerisierungsprodukte der enzymatisch katalysierten Dimerisierung von Coniferylalkohol (4). ()-Dehydrodiconiferylalkohol [()- 59], ()-Pinoresinol [()- 6] und ()-Guaiacylglycerin-8- <i>O</i> -4'-coniferylether [()- 60].	48
5.15	Chromatogramm der MPLC Aufreinigung der Dimerisierung von Coniferylalkohol (4). Lösungsmittel A = Dichlormethan, Lösungsmittel B = MeOH . . .	49
5.16	A) Fluorierte Alkohole HFIP und TFE B) Mögliche Wechselwirkung von HFIP mit Coniferylalkohol (4) adaptiert nach Libman <i>et al.</i>	52
5.17	Vergleich der Dimerisierung von 5-Bromconiferylalkohol (3) zu Beginn (links) und nach vollständigem Umsatz (rechts)	54
5.18	Über RP-HPLC bestimmte Konzentrationen an 5,5'-Dibrompinoresinol(5) mit und ohne Zugabe der verschiedenen Cyclodextrine	55
5.19	Ausschnitt des aromatischen Bereichs eines NMR-Spektrums des einfach gesäulten Gemisches.	56
5.20	Ausschnitt des aromatischen Bereichs eines NMR-Spektrums (600 MHz) von 5,5'-Dibrompinoresinol (5), 5,5'-Diphenylpinoresinol (62) und 5'-Brom-5-phenylpinoresinol (63) (oben nach unten). Der nicht markierte Peak bei 7.26 in 1 und 3 stellt das Lösungsmittel CDCl ₃ dar.	57
5.21	Synthese von 4,4'-Di <i>O</i> -acetyl-5,5'-dibrompinoresinol (64) durch Acetylierung der beiden Hydroxylgruppen aus 5,5'-Dibrompinoresinol (5). DMAP = Dimethylaminopyridin, TEA = Triethylamin.	60
5.22	Ausbeuten der Suzuki-Kreuzkupplung von ()-5,5'-Brompinoresinol [()- 5] unter optimierten Bedingungen mit verschiedenen Boronsäuren.	63
5.23	Toxizität von 5,5'-Dibrompinoresinols (5) gegenüber den Mikroorganismen <i>E. coli</i> , <i>P. putida</i> , <i>C. glutamicum</i> , <i>B. subtilis</i> und <i>S. cerevisiae</i>	64
5.24	Mikroskopieaufnahmen von eGFP-LC3 MCF-7-(Brustkrebs)-Zellen im normalen Zustand (A) und unter Nährstoffmangel (B). Die initiierte Autophagie im Nährstoffmangelzustand ist sichtbar durch Bildung von LC3-Punkta in B. . .	66
7.1	Schema einer Dosis-Wirkungskurve nach Klein <i>et al.</i> ^[195]	79
9.1	Toxizitätsassaysresultate von 5,5'-Dibrompinoresinols (5)	125
9.2	Toxizitätsassaysresultate von 5,5'-Diphenylpinoresinol (62)	126
9.3	Toxizitätsassaysresultate von 5,5'-Di(4,4'-methoxyphenyl)-pinoresinol (51) .	126
9.4	Toxizitätsassaysresultate von 5,5'-Di(4,4'-(methoxycarbonyl)-phenyl)-pinoresinol (66)	127
9.5	Toxizitätsassaysresultate von 5,5'-Di(4-nitrophenyl)-pinoresinol (65)	127
9.6	Toxizitätsassaysresultate von 5,5'-Di(3-thienyl)-pinoresinol (67)	128
9.7	¹ H- und ¹³ C-NMR-Spektrum von 68 in CDCl ₃ (600 MHz/151 MHz)	129
9.8	¹ H- und ¹³ C-NMR-Spektrum von 39 in CDCl ₃ (600 MHz/151 MHz)	130
9.9	¹ H- und ¹³ C-NMR-Spektrum von 37 in CDCl ₃ (600 MHz/151 MHz)	131
9.10	¹ H-NMR-Spektrum von 69 in CDCl ₃ (600 MHz)	132
9.11	¹ H- und ¹³ C-NMR-Spektrum von 70 in CDCl ₃ (600 MHz/151 MHz)	133
9.12	¹ H- und ¹³ C-NMR-Spektrum von 71 in CDCl ₃ (600 MHz/151 MHz)	134
9.13	¹ H- und ¹³ C-NMR-Spektrum von 7 in CDCl ₃ (600 MHz/151 MHz)	135
9.14	¹ H- und ¹³ C-NMR-Spektrum von 4 in CDCl ₃ (600 MHz/151 MHz)	136
9.15	¹ H- und ¹³ C-NMR-Spektrum von 40 in CDCl ₃ (600 MHz/151 MHz)	137

9.16	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von 3 in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)	138
9.17	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von 72 in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)	139
9.18	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von 16 in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)	140
9.19	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von 45 in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)	141
9.20	^1H -NMR-Spektrum von 73 in CDCl_3 (600 MHz)	142
9.21	^1H -NMR-Spektrum von 74 in CDCl_3 (600 MHz)	142
9.22	^1H -NMR-Spektrum von 53 in CDCl_3 (600 MHz)	143
9.23	^1H -NMR-Spektrum von 46 in CDCl_3 (600 MHz)	143
9.24	^1H -NMR-Spektrum von 56 in CDCl_3 (600 MHz)	144
9.25	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von 51 in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)	145
9.26	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von 52 in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)	146
9.27	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von 54 in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)	147
9.28	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von 43 in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)	148
9.29	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von 43 in Aceton- D_6 (600 MHz/151 MHz)	149
9.30	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von 8 in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)	150
9.31	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von 18 in Aceton- D_6 (600 MHz/151 MHz)	151
9.32	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von 1 in Aceton- D_6 (600 MHz/151 MHz)	152
9.33	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von 6 in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)	153
9.34	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von 59 in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)	154
9.35	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von 5 in Aceton- D_6 (600 MHz/151 MHz)	155
9.36	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von 64 in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)	156
9.37	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von 62 in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)	157
9.38	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von 64 in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)	158
9.39	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von 66 in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)	159
9.40	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von 65 in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)	160
9.41	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von 67 in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)	161
9.42	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von 53 in HD_2 (600 MHz/151 MHz)	162

Tabellenverzeichnis

3.1	Wichtigste Gruppen der Phenylpropanoide mit den jeweiligen Hauptfunktionen	10
5.1	Titer der natürlichen Zimtsäurederivate im Kulturüberstand identifiziert über HPLC mit internem Standard. Der interne Standard für Kaffeealkohol 16 wurde dabei gemäß Synthesemethode A synthetisiert (siehe Kapitel 5.1.1).	42
5.2	Titer der natürlichen Zimtsäurederivate im Kulturüberstand identifiziert über HPLC mit internem Standard. Der interne Standard für 5-Bromconiferylalkohol (3) wurde dabei über Synthesemethode A synthetisiert (siehe Kapitel 5.1.1). Die internen Standards für 2-Nitroconiferylalkohol (43) und Naphthylenalokhol (47) wurden nach Synthesemethode B hergestellt (siehe Kapitel 5.1.2).	43
5.3	Effizienz der Reduktion verschiedener natürlicher und unnatürlicher Monolignole zum Alkohol ausgehend vom Säurederivat durch <i>E. coli</i> BL21-Gold(DE3) <i>lacl^{Q1}</i> pALXtreme- <i>tal-4cl-ccr-cad</i> . Ergebnisse sind die Summe dreier biologischer Triplikate. Nachweis erfolgte durch qNMR. R ¹ = -H, -NO ₂ , -C ₄ H ₄ -; R ² = -H, -OH, -OMe, -C ₄ H ₄ -; R ³ = -H, -OH, -OMe; R ⁴ = -H, -OH, -OMe, -Br.	45
5.4	Vergleich der Reduktionseffizienz der dargestellten Zimtsäure (13) bzw. des Zimtsäurederivates zum jeweiligen Alkohol bestimmt durch HPLC und qNMR. ¹ = % des korrespondierenden Aldehyds	46
5.5	Kostenvergleich der chemischen und biotechnologischen Produktion von Coniferylalkohol (4). Die Kosten sind umgerechnet auf die Produktion von 1 g Coniferylalkohol (4). Die benötigte Arbeitszeit wurde nicht berücksichtigt. Für die chemische Synthese wurde mit einer Ausbeute von 84 % gerechnet und für die biotechnologische Produktion mit 62 %. Ferulasäure (36) und die Lösungsmittel/Füllmaterial für Säulenchromatographie sind nicht berücksichtigt, da diese in beiden Fällen im selben Umfang benötigt werden. Die Preise der Chemikalien wurden am 08.09.2019 von <i>Carl Roth GmbH & Co KG</i> und <i>Merck KGaA</i> abgerufen und enthalten keinerlei Vergünstigungen. ¹ = 25 g LB-Medium Feststoff auf 1 L entmineralisiertes Wasser	47
5.6	Vergleich der Bildung der beiden Produkte ()-Dehydrodiconiferylalkohol [()- 59] und ()-Pinoresinol [()- 6], sowie des noch vorhandenen Eduktes Coniferylalkohol (4), durch verschiedene Laccasen. ¹ = Natriumacetatpuffer (100 mM, pH 5.0), ² = Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 6.0), ³ = Natriumcitratpuffer (100 mM, pH 5.8), ⁴ = Glycin-Natriumhydroxidpuffer (100 mM, pH 9.0).	51
5.7	Optimierung der Produktion von ()-5,5'-Brompinoresinol [()- 5] aus 3 ; ¹ = Natriumacetat-Puffer (100 mM, pH 6.0); ² = Zugabe von 1.8 Äq. -Cyclodextrin	53
5.8	Vorscreening für die Suzuki-Reaktion von ()-5,5'-Dibrompinoresinol [()- 5]; ¹ = bestimmt durch NMR	58
5.9	Optimierung der Suzuki-Reaktion von ()-5,5'-Brompinoresinol [()- 5]; ¹ = Aufreinigung mit präparativer DC; ² = 4,4'-DiO-acetyl-5,5'-dibrompinoresinol (64) als Substrat.	59

5.10	Optimierung der Suzuki-Reaktion von ()-5,5'-Dibrompinoresinol [()- 5]; ¹ = bestimmt durch NMR; ² = Aufreinigung mit präparativer DC; ³ = 4,4'-DiO-acetyl-5,5'-dibrompinoresinol (64) als Substrat; ⁴ = Reinheit bestimmt über qNMR.	61
5.11	Primärscreen zu den Auswirkungen auf die Rapamycin und durch Nährstoffmangel induzierte Autophagie von eGFP-LC3 MCF-7-(Brustkrebs)-Zellen durch verschiedene Pinoresinolderivate (c = 10 µM). Es handelt sich um eine 1-Punkt Bestimmung, allerdings wurde beim Nährstoffmangel ein technisches Replikat mitlaufen gelassen.	66
5.12	Assay zu den Auswirkungen von 5,5'-Di-(3-thienyl)-pinoresinol (67) auf die durch Nährstoffmangel oder durch Rapamycin-Zugabe induzierte Autophagie in eGFP-LC3 MCF-7-(Brustkrebs)-Zellen.	67
5.13	Auswirkungen der Pinoresinolderivate auf die osteogene Differenzierung von embryonalen, mesodermen Fibroblasten (C3H10T1/2) aus Mäusen. Die Differenzierung wird durch die Zugabe von Purmorphamin induziert. Gemessen wird die Aktivität der ALK, welche als Markerprotein für das Osteogenese-Differenzierungsprogramm dienen. Gleichzeitig wird die Toxizität der Verbindungen über einen Zellebensfähigkeitstest nachgewiesen.	68
6.1	Liste der im Verlaufe der Arbeit verwendeten Geräte mit Herstellern	71
6.1	Liste der im Verlaufe der Arbeit verwendeten Geräte mit Herstellern	72
6.2	Liste der im Verlaufe der Arbeit verwendeten Programme mit Herstellern	73
9.1	Konzentrationen an 5,5'-Dibrompinoresinol (m) im Verlauf einer Dimerisierungsreaktion mit und ohne der Zugabe von , und -Cyclodextrin.	125
10.1	Formelregister	163
10.1	Formelregister Fortsetzung	164

8 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater *Prof. Dr. J. Pietruszka* für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und die Überlassung des Themas bedanken. Seine Tür stand immer für ein Gespräch offen, auch wenn man häufig sehr viel länger zum Gespräch blieb als man eigentlich Zeit hatte. Die fachlichen Diskussionen führten stets zur fruchtbaren Ideen und gaben mir immer neue Anreize, um schwierige Probleme zu lösen. Die weniger fachlichen Gespräche haben mich auf eine Reihe von Brettspielen aufmerksam gemacht, die auch noch nach Jahren zu meinen Lieblingsspielen zählen.

Ich möchte mich auch bei *Prof. Dr. Thomas Müller* für die Übernahme des Korreferats bedanken.

Besonderer Dank gilt auch meinen Kollegen im *BioLiSy*-Projekt *Jennifer Aschenbrenner*, *David Dickmann* und *Jamila Rosengarten*. Ich konnte mich immer auf euch verlassen. Die Ausflüge nach Russland zum Projektmeeting und unsere zahlreichen Treffen außerhalb der Arbeit haben mir die Zeit deutlich versüßt. Ich freue mich noch auf eine Reihe weiterer Nintendo-Abende und darauf irgendwann einmal ohne KO bei *F-Zero* zu gewinnen.

Ich bedanke mich auch bei meinem Bachelorstudenten *Ferdinand Wrusch* für seine fleißige und engagierte Arbeit. Des weiteren möchte ich mich auch bei meinen Naturstoffstudenten *Dana Renk*, *Peter Schubert* und *Vincent Brüning* bedanken.

Für ihr stets offenes Ohr und tatkräftige Unterstützung bei auch den schwierigsten Analytikproblemen möchte ich *Birgit Henßen* danken. Ohne Dich und deine Expertise hätte ich die zahllosen Probleme bei der HPLC nicht lösen können.

Für die Zeit im besten Labor des IBOCs möchte ich mich bei meinen Kollegen aus 304 bedanken. Ihr habt mich ohne zögern bei euch aufgenommen und mir zahllose Fragen beantwortet. Unsere unzähligen Gespräche haben langwierige Säulenchromatographien nicht nur erträglich sondern sogar lustig gemacht, auch wenn es manchmal *Roxanne Krug* einiges an Nerven kostete. Besonderer Dank gilt meine Kollegen im besten Gang von 304 *Anja Weber*, *Vera Ophoven*, *Dennis Schröder* und *Pätrick Ullrich*. *Bastian Mechsner* möchte ich auch für die zahlreichen Grill-/Fußballabende in seiner Wohnung danken. Die Arbeitszeit verging stets wie im Flug, wenn man sich in Gedanken schon mit Bier und Bratwurst vor dem Fernseher sah. Zuletzt möchte ich noch dem "Rotlichtgang" mit *Fabian Hogenkamp* und *Ceyda Kumru* danken. *Ceyda Kumru* möchte ich auch nochmal für das Überlassen ihrer *S. sviveus* Laccase danken.

Für ihren fruchtbaren Input und das Beantworten vieler Fragen möchte ich mich bei *Julian Greb*, *Andreas Klein* und *Marvin Mantel* danken.

Danke an die gesamte restliche IBOC-Arbeitsgruppe für einen herzlichen Empfang. Auch wenn es in der Küche manchmal eng wurde, gibt es doch keinen, den ich nicht vermissen werde. Vielen Dank für die nette Aufnahme und tolle Zusammenarbeit, sowie für zahlreiche glutenfreie Kuchen und Kekse.

Bei meiner Familie, ganz besonders bei meinen Eltern *Silke* und *Jürgen Marx* und meiner Oma *Ingrid Prah*, möchte ich mich für ihre vielfältige Unterstützung während und nach meinem Studium bedanken. Meinem Bruder *Fabian Marx* danke ich für zahlreiche Wochenendnachmittage, in denen ich beim gemeinsamen Computerspielen wunderbar abschalten konnte. Ohne euch hätte ich die Promotion nicht abschließen können.

Zuletzt möchte ich meiner Verlobten *Julia Sanwald* danken. Ohne deine Unterstützung wäre ich nicht so weit gekommen. Du hast mich immer wieder aufgebaut wenn ich frustriert und gestresst war. Du standst immer an meiner Seite. Vielen Dank für Zuhören, Aufmuntern und Anspornen.

Literatur

- [1] J. Aschenbrenner, P. Marx, J. Pietruszka, J. Marienhagen, *ChemBioChem* **2019**, *20*, 949–954.
- [2] B. Pickel, M.-A. Constantin, J. Pfannstiel, J. Conrad, U. Beifuss, A. Schaller, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *49*, 202–204.
- [3] J. Aschenbrenner, Doktorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2019**.
- [4] M. S. Hussain, M. A. Rahman, S. Fareed, S. Ansari, I. Ahmad, M. Saeed, *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* **2012**, *4*, 10.
- [5] J. B. Harborne in *Chemicals from Plants*, Imperial College Press, **1999**, S. 1–25.
- [6] F. Bourgaud, A. Gravot, S. Milesi, E. Gontier, *Plant Science* **2001**, *161*, 839–851.
- [7] K. P. C. Vollhardt, N. E. Schore, *Organische chemie*, John Wiley & Sons, **2011**, S. 170–174.
- [8] J. Gershenzon, N. Dudareva, *Nature Chemical Biology* **2007**, *3*, 408–414.
- [9] K. P. C. Vollhardt, N. E. Schore, *Organische chemie*, John Wiley & Sons, **2011**, S. 1274–1277.
- [10] M. F. Roberts, *Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications*, Springer Science & Business Media, **2013**.
- [11] K. Compean, R. Ynalvez, *Research Journal of Medicinal Plants* **2014**, *8*, 204–213.
- [12] L. Katz, S. Donadio, *Annual review of microbiology* **1993**, *47*, 875–912.
- [13] L. Vining, *Gene* **1992**, *115*, 135–140.
- [14] R. Croteau, T. M. Kutchan, N. G. Lewis u. a., *Biochemistry and molecular biology of plants* **2000**, *24*, 1250–1319.
- [15] R. B. Herbert, *The biosynthesis of secondary metabolites*, Springer Science & Business Media, **1989**.
- [16] C. Glaser, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1869**, *2*, 422–424.
- [17] C. Glaser, *Annalen der Chemie und Pharmacie* **1870**, *154*, 137–171.
- [18] F. Ullmann, J. Bielecki, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1901**, *34*, 2174–2185.
- [19] V. Grignard, *CR Acad. Sci* **1900**, *130*, 1322–1324.
- [20] M. Kharasch, C. F. Fuchs, *Journal of the American Chemical Society* **1943**, *65*, 504–507.
- [21] R. Corriu, J. Masse, *Journal of the Chemical Society Chemical Communications* **1972**, 144a–144a.
- [22] K. Tamao, K. Sumitani, M. Kumada, *Journal of the American Chemical Society* **1972**, *94*, 4374–4376.
- [23] R. F. Heck, J. P. Nolley, *The Journal of Organic Chemistry* **1972**, *37*, 2320–2322.
- [24] K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron letters* **1975**, *16*, 4467–4470.

- [25] J. K. Stille, K. S. Y. Lau, *Accounts of Chemical Research* **1977**, *10*, 434–442.
- [26] F. H. Arnold, *Chemical Engineering Science* **1996**, *51*, 5091–5102.
- [27] F. H. Arnold, *Nature* **2001**, *409*, 253–257.
- [28] S. Hajdok, H. Leutbecher, G. Greiner, J. Conrad, U. Beifuss, *Tetrahedron Letters* **2007**, *48*, 5073–5076.
- [29] U. T. Bornscheuer, *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical Physical and Engineering Sciences* **2017**, *376*, 20170063.
- [30] F. Cullmann, K.-P. Adam, J. Zapp, H. Becker, *Phytochemistry* **1996**, *41*, 611–615.
- [31] T. Tanaka, A. Nishimura, I. Kouno, G.-i. Nonaka, T.-J. Young, *Journal of Natural Products* **1996**, *59*, 843–849.
- [32] T. Tanaka, A. Nishimura, I. Kouno, G.-i. NONAKA, C.-R. YANG, *Chemical and pharmaceutical bulletin* **1997**, *45*, 1596–1600.
- [33] R. D. Haworth, *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1942**, 448.
- [34] R. Niggeweg, A. J. Michael, C. Martin, *Nature biotechnology* **2004**, *22*, 746.
- [35] S. Suzuki, T. Umezawa, *Journal of Wood Science* **2007**, *53*, 273–284.
- [36] L. B. Davin, D. L. Bedgar, T. Katayama, N. G. Lewis, *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3869–3874.
- [37] R. Gasper, I. Effenberger, P. Kolesinski, B. Terlecka, E. Hofmann, A. Schaller, *Plant Physiology* **2016**, *172*, 2165–2175.
- [38] I. Effenberger, B. Zhang, L. Li, Q. Wang, Y. Liu, I. Klaiber, J. Pfannstiel, Q. Wang, A. Schaller, *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 14660–14663.
- [39] E. Ricklefs, M. Girhard, V. B. Urlacher, *Microbial cell factories* **2016**, *15*, 78.
- [40] R. d. C. A. Guimarães, M. L. R. Macedo, C. L. Munhoz, W. Filiu, L. H. Viana, V. T. Nozaki, P. A. Hiane, *Food Science and Technology* **2013**, *33*, 209–217.
- [41] R. Valsaraj, P. Pushpangadan, U. W. Smitt, A. Adsersen, S. B. Christensen, A. Sittie, U. Nyman, C. Nielsen, C. E. Olsen, *Journal of natural products* **1997**, *60*, 739–742.
- [42] H. C. Schröder, H. Merz, R. Steffen, W. E. G. Müller, P. S. Sarin, S. Trumm, J. Schulz, E. Eich, *Zeitschrift für Naturforschung C* **1990**, *45*, 1215–1221.
- [43] H. Pan, L. N. Lundgren, *Phytochemistry* **1995**, *39*, 1423–1428.
- [44] E. Taniguchi, K. Imamura, F. Ishibashi, T. Matsui, A. Nishio, *Agricultural and Biological Chemistry* **1989**, *53*, 631–643.
- [45] J. K. Nitao, M. G. Nair, D. L. Thorogood, K. S. Johnson, J. M. Scriber, *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2193–2195.
- [46] L. Lajide, P. Escoubas, J. Mizutani, *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1105–1112.
- [47] W. S. Bowers, *Science* **1968**, 895–897.
- [48] K. Yoshihara, Y. Kobayashi, *Agricultural and Biological Chemistry* **1982**, *46*, 109–117.
- [49] S. D. Elakovich, K. L. Stevens, *Journal of chemical ecology* **1985**, *11*, 27–33.
- [50] P. Bhiravamurty, R. D. Kanakala, *Current science* **1979**.
- [51] R. Wang, X. Lu, W. Ma, *Journal of Chromatography B* **2002**, *779*, 157–162.
- [52] D. Bhakta, C. D. Higgins, L. Sevak, P. Mangtani, H. Adlercreutz, A. J. McMichael, I. dos Santos Silva, *British Journal of Nutrition* **2006**, *95*, 1150–1158.
- [53] M. Saleem, H. J. Kim, M. S. Ali, Y. S. Lee, *Natural Product Reports* **2005**, *22*, 696.

- [54] B.-L. Wang, J.-P. Hu, W. Tan, L. Sheng, H. Chen, Y. Li, *Journal of Chromatography B* **2008**, *865*, 114–120.
- [55] C.-C. Wang, S. Chen, T.-S. Wu, *Journal of the Chinese Chemical Society* **2003**, *50*, 261–266.
- [56] Z.-Y. Li, J. Gu, J. Yan, J.-J. Wang, W.-H. Huang, Z.-R. Tan, G. Zhou, Y. Chen, H.-H. Zhou, D.-S. Ouyang, *The American Journal of Chinese Medicine* **2013**, *41*, 801–815.
- [57] X. He, J. Wang, M. Li, D. Hao, Y. Yang, C. Zhang, R. He, R. Tao, *Journal of Ethnopharmacology* **2014**, *151*, 78–92.
- [58] H. Adlercreutz, J. van der Wildt, J. Kinzel, H. Attalla, K. Wähälä, T. Mäkelä, T. Hase, T. Fotsis, *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **1995**, *52*, 97–103.
- [59] N. M. Saarinen, R. Huovinen, A. Wärrä, S. I. Mäkelä, L. Valentín-Blasini, R. Sjöholm, J. Ämmälä, R. Lehtilä, C. Eckerman, Y. U. Collan u. a., *Molecular Cancer Therapeutics* **2002**, *1*, 869–876.
- [60] M. Schöttner, G. Spiteller, D. Gansser, *Journal of Natural Products* **1998**, *61*, 119–121.
- [61] A. Kuijsten, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **2006**, *15*, 1132–1136.
- [62] K. Prasad, *Molecular and cellular biochemistry* **1997**, *168*, 117–123.
- [63] S. Habtemariam, *Toxicon* **2003**, *41*, 723–727.
- [64] S.-H. Day, Y.-C. Lin, M.-L. Tsai, L.-T. Tsao, H.-H. Ko, M.-I. Chung, J.-C. Lee, J.-P. Wang, S.-J. Won, C.-N. Lin, *Journal of Natural Products* **2002**, *65*, 379–381.
- [65] M. Vanharanta, S. Voutilainen, T. A. Lakka, M. van der Lee, H. Adlercreutz, J. T. Salonen, *The Lancet* **1999**, *354*, 2112–2115.
- [66] T. Shen, *Lipids* **1991**, *26*, 1154–1156.
- [67] C.-C. Chen, W.-C. Hsin, F.-N. Ko, Y.-L. Huang, J.-C. Ou, C.-M. Teng, *Journal of natural products* **1996**, *59*, 1149–1150.
- [68] Y. Kimura, H. Okuda, S. Arichi, *Planta medica* **1985**, *51*, 132–136.
- [69] J. Y. Cho, A. R. Kim, M. H. Park, *Planta Medica* **2001**, *67*, 312–316.
- [70] K.-S. Ahn, K. Y. Jung, J.-H. Kim, S. R. Oh, H.-K. Lee, *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2001**, *24*, 1085–1087.
- [71] J. Y. Cho, J. Park, P. S. Kim, E. S. Yoo, K. U. Baik, M. H. Park, *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2001**, *24*, 167–171.
- [72] F. Wantke, G. Fleischl, M. Götz, R. Jarisch, *Dermatology* **1993**, *186*, 79–79.
- [73] T. Utsugi, J. Shibata, Y. Sugimoto, K. Aoyagi, K. Wierzba, T. Kobunai, T. Terada, T. Oh-hara, T. Tsuruo, Y. Yamada, *Cancer research* **1996**, *56*, 2809–2814.
- [74] D. Subrahmanyam, B. Renuka, C. L. Rao, P. Sagar, D. S. Deevi, J. Babu, K. Vyas, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1998**, *8*, 1391–1396.
- [75] J. D. Loike, S. B. Horwitz, *Biochemistry* **1976**, *15*, 5435–5443.
- [76] G. L. Chen, L. Yang, T. C. Rowe, B. D. Halligan, K. M. Tewey, L. F. Liu, *Journal of Biological Chemistry* **1984**, *259*, 13560–6.
- [77] H. Yoshida, *J. Chem. Soc.* **1883**, *43*, 472–486.
- [78] G. Palmieri, P. Giardina, C. Bianco, A. Scaloni, A. Capasso, G. Sannia, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 31301–31307.
- [79] H. Claus, *Micron* **2004**, *35*, 93–96.

- [80] M. Gunne, A. Höppner, P.-L. Hagedoorn, V. B. Urlacher, *FEBS Journal* **2014**, *281*, 4307–4318.
- [81] L. G. Rydén, L. T. Hunt, *Journal of molecular evolution* **1993**, *36*, 41–66.
- [82] P. M. Colman, H. C. Freeman, J. M. Guss, M. Murata, V. A. Norris, J. A. M. Ramshaw, M. P. Venkatappa, *Nature* **1978**, *272*, 319–324.
- [83] A. Messerschmidt, R. Huber, *European Journal of Biochemistry* **1990**, *187*, 341–352.
- [84] N. Hakulinen, J. Rouvinen, *Cellular and Molecular Life Sciences* **2015**, *72*, 857–868.
- [85] K. Nakamura, T. Kawabata, K. Yura, N. Go, *FEBS Letters* **2003**, *553*, 239–244.
- [86] T. Skálová, J. Dohnálek, L. H. Østergaard, P. R. Østergaard, P. Kolenko, J. Dušková, A. Štěpánková, J. Hašek, *Journal of Molecular Biology* **2009**, *385*, 1165–1178.
- [87] H. Komori, R. Sugiyama, K. Kataoka, K. Miyazaki, Y. Higuchi, T. Sakurai, *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **2014**, *70*, 772–779.
- [88] D. Mate, E. Garcia-Ruiz, S. Camarero, M. Alcalde, *Current Genomics* **2011**, *12*, 113–122.
- [89] M. A. Tadesse, A. D'Annibale, C. Galli, P. Gentili, F. Sergi, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2008**, *6*, 868.
- [90] E. I. Solomon, U. M. Sundaram, T. E. Machonkin, *Chemical Reviews* **1996**, *96*, 2563–2606.
- [91] H. Decker, N. Terwilliger, *Journal of Experimental Biology* **2000**, *203*, 1777–1782.
- [92] A. J. Augustine, C. Kjaergaard, M. Qayyum, L. Ziegler, D. J. Kosman, K. O. Hodgson, B. Hedman, E. I. Solomon, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 6057–6067.
- [93] J. L. Cole, D. P. Ballou, E. I. Solomon, *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 8544–8546.
- [94] J. Yoon, E. I. Solomon, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 13127–13136.
- [95] A. J. Augustine, M. E. Kragh, R. Sarangi, S. Fujii, B. D. Liboiron, C. S. Stoj, D. J. Kosman, K. O. Hodgson, B. Hedman, E. I. Solomon, *Biochemistry* **2008**, *47*, 2036–2045.
- [96] K. J. Kramer, M. R. Kanost, T. L. Hopkins, H. Jiang, Y. C. Zhu, R. Xu, J. Kerwin, F Turecek, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 385–392.
- [97] R SUDERMAN, N DITTMER, M KANOST, K KRAMER, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **2006**, *36*, 353–365.
- [98] M. Nagai, *Microbiology* **2003**, *149*, 2455–2462.
- [99] H Claus, Z Filip, *Acta hydrochimica et hydrobiologica* **1998**, *26*, 180–185.
- [100] A. Leonowicz, N. Cho, J. Luterek, A. Wilkolazka, M. Wojtas-Wasilewska, A. Matuszewska, M. Hofrichter, D. Wesenberg, J. Rogalski, *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry Physiology Genetics Morphology and Ecology of Microorganisms* **2001**, *41*, 185–227.
- [101] E. Duran, Nelsonand Esposito, *Applied Catalysis B: Environmental* **2000**, *28*, 83–99.
- [102] C. Kim, W. W. Lorenz, J. T. Hoopes, J. F. D. Dean, *Journal of Bacteriology* **2001**, *183*, 4866–4875.
- [103] R Bourbonnais, M. Paice, B Freiermuth, E Bodie, S Borneman, *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 4627–4632.

- [104] S. Camarero, O. Garcia, T. Vidal, J. Colom, J. C. del Rio, A. Gutierrez, J. M. Gras, R. Monje, M. J. Martinez, A. T. Martinez, *Enzyme and Microbial Technology* **2004**, *35*, 113–120.
- [105] S. R. Couto, J. L. T. Herrera, *Biotechnology Advances* **2006**, *24*, 500–513.
- [106] N. Pazarlioglu, M. Sariisik, A. Telefoncu, *Process Biochemistry* **2005**, *40*, 1673–1678.
- [107] L. Setti, S. Giuliani, G. Spinozzi, P. G. Pifferi, *Enzyme and Microbial Technology* **1999**, *25*, 285–289.
- [108] P. Thozhukattu Valliyaparambil, K. Alagapuram Kaliyaperumal, N. Gopakumaran, *Journal of Applied Biotechnology Reports* **2019**, *6*, 88–95.
- [109] C. Pezzella, L. Guarino, A. Piscitelli, *Cellular and molecular life sciences* **2015**, *72*, 923–940.
- [110] D. Durante, R. Casadio, L. Martelli, G. Tasco, M. Portaccio, P. D. Luca, U. Bencivenga, S. Rossi, S. D. Martino, V. Grano, N. Diano, D. Mita, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2004**, *27*, 191–206.
- [111] J. Kulys, A. Drungiliene, U. Wollenberger, K. Krikstopaitis, F. Scheller, *Electroanalysis* **1997**, *9*, 213–218.
- [112] Y. Ferry, D. Leech, *Electroanalysis* **2005**, *17*, 113–119.
- [113] S. Witayakran, A. J. Ragauskas, *Green Chemistry* **2007**, *9*, 475.
- [114] J. Pietruszka, C. Wang, *Green Chemistry* **2012**, *14*, 2402.
- [115] J. Pietruszka, C. Wang, *ChemCatChem* **2012**, *4*, 782–785.
- [116] S. Suljić, F. B. Mortzfeld, M. Gunne, V. B. Urlacher, J. Pietruszka, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 1380–1385.
- [117] N. Miyaura, K. Yamada, A. Suzuki, *Tetrahedron Letters* **1979**, *20*, 3437–3440.
- [118] C. J. Seechurn, M. O. Kitching, T. J. Colacot, V. Snieckus, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 5062–5085.
- [119] A. Suzuki, *Journal of Organometallic Chemistry* **1999**, *576*, 147–168.
- [120] N. Miyaura, A. Suzuki, *Chemical Reviews* **1995**, *95*, 2457–2483.
- [121] J. Uenishi, J. M. Beau, R. W. Armstrong, Y. Kishi, *Journal of the American Chemical Society* **1987**, *109*, 4756–4758.
- [122] R. W. Armstrong, J. M. Beau, S. H. Cheon, W. J. Christ, H. Fujioka, W. H. Ham, L. D. Hawkins, H. Jin, S. H. Kang, *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*, 7530–7533.
- [123] D. Gao, G. A. O'Doherty, *Organic Letters* **2010**, *12*, 3752–3755.
- [124] N. A. Petasis, R. Keledjian, Y.-P. Sun, K. C. Nagulapalli, E. Tjonahen, R. Yang, C. N. Serhan, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18*, 1382–1387.
- [125] T. N. Glasnov, C. O. Kappe, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2010**, *352*, 3089–3097.
- [126] R. D. Larsen, A. O. King, C. Y. Chen, E. G. Corley, B. S. Foster, F. E. Roberts, C. Yang, D. R. Lieberman, R. A. Reamer, D. M. Tschaen, T. R. Verhoeven, P. J. Reider, Y. S. Lo, L. T. Rossano, A. S. Brookes, D. Meloni, J. R. Moore, J. F. Arnett, *The Journal of Organic Chemistry* **1994**, *59*, 6391–6394.
- [127] F. A. J. Kerdesky, M. R. Leanna, J. Zhang, W. Li, J. E. Lallaman, J. Ji, H. E. Morton, *Organic Process Research & Development* **2006**, *10*, 512–517.

- [128] M. S. Viciu, R. A. Kelly, E. D. Stevens, F. Naud, M. Studer, S. P. Nolan, *Organic Letters* **2003**, *5*, 1479–1482.
- [129] M. S. Viciu, R. F. Germaneau, O. Navarro-Fernandez, E. D. Stevens, S. P. Nolan, *Organometallics* **2002**, *21*, 5470–5472.
- [130] C. S. Wei, G. H. M. Davies, O. Soltani, J. Albrecht, Q. Gao, C. Pathirana, Y. Hsiao, S. Tummala, M. D. Eastgate, *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52*, 5822–5826.
- [131] K. H. Shaughnessy, *Israel Journal of Chemistry* **2019**.
- [132] E. R. Strieter, D. G. Blackmond, S. L. Buchwald, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 13978–13980.
- [133] E. Mednikov, N. Eremenko, *Russian Chemical Bulletin* **1984**, *33*, 2547–2552.
- [134] M. Rettig, P. Maitlis, F. Cotton, T. Webb, *Inorganic Syntheses: Reagents for Transition Metal Complex and Organometallic Syntheses* **1990**, *28*, 110–113.
- [135] P. Fitton, E. Rick, *Journal of Organometallic Chemistry* **1971**, *28*, 287–291.
- [136] A. Ariafard, Z. Lin, *Organometallics* **2006**, *25*, 4030–4033.
- [137] C. Amatore, A. Jutand, A. Suarez, *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 9531–9541.
- [138] C. Amatore, M. Azzabi, A. Jutand, *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 1670–1677.
- [139] E. A. Mitchell, P. G. Jessop, M. C. Baird, *Organometallics* **2009**, *28*, 6732–6738.
- [140] E. A. Mitchell, M. C. Baird, *Organometallics* **2007**, *26*, 5230–5238.
- [141] C. Amatore, E. Carre, A. Jutand, M. A. M'Barki, *Organometallics* **1995**, *14*, 1818–1826.
- [142] L. J. Gooßen, D. Koley, H. Hermann, W. Thiel, *Chem. Commun.* **2004**, 2141–2143.
- [143] N. Miyaoura, A. Suzuki, *Journal of the Chemical Society Chemical Communications* **1979**, 866.
- [144] N. Miyaoura, K. Yamada, H. Suginome, A. Suzuki, *Journal of the American Chemical Society* **1985**, *107*, 972–980.
- [145] K. Matos, J. A. Soderquist, *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63*, 461–470.
- [146] G. A. Molander, C. R. Bernardi, *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 8424–8429.
- [147] A. A. C. Braga, N. H. Morgon, G. Ujaque, F. Maseras, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 9298–9307.
- [148] B. P. Carrow, J. F. Hartwig, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 2116–2119.
- [149] C. Amatore, A. Jutand, G. Le Duc, *Chemistry - A European Journal* **2011**, *17*, 2492–2503.
- [150] L. Xue, Z. Lin, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1692–1705.
- [151] R. Álvarez, O. N. Faza, C. S. López, Á. R. de Lera, *Organic Letters* **2006**, *8*, 35–38.
- [152] A. A. C. Braga, G. Ujaque, F. Maseras, *Organometallics* **2006**, *25*, 3647–3658.
- [153] A. Nova, G. Ujaque, F. Maseras, A. Lledós, P. Espinet, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 14571–14578.

- [154] A. L. Casado, P. Espinet, *Organometallics* **1998**, *17*, 954–959.
- [155] M. J. Calhorda, J. M. Brown, N. A. Cooley, *Organometallics* **1991**, *10*, 1431–1438.
- [156] B. C. Hamann, J. F. Hartwig, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 7369–7370.
- [157] W. D. Jones, V. L. Kuykendall, *Inorganic Chemistry* **1991**, *30*, 2615–2622.
- [158] G. Mann, Q. Shelby, A. H. Roy, J. F. Hartwig, *Organometallics* **2003**, *22*, 2775–2789.
- [159] H. C. Brown, G. A. Molander, *The Journal of Organic Chemistry* **1986**, *51*, 4512–4514.
- [160] C. Adamo, C. Amatore, I. Ciofini, A. Jutand, H. Lakmini, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 6829–6836.
- [161] C. Amatore, A. Jutand, L. Mottier, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1991**, *306*, 125–140.
- [162] A. J. J. Lennox, G. C. Lloyd-Jones, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 412–443.
- [163] N. Miyaoura, M. Satoh, A. Suzuki, *Tetrahedron Letters* **1986**, *27*, 3745–3748.
- [164] C. D. Roy, H. C. Brown, *Journal of Organometallic Chemistry* **2007**, *692*, 784–790.
- [165] J. Yan, G. Springsteen, S. Deeter, B. Wang, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11205–11209.
- [166] D. W. Robbins, J. F. Hartwig, *Organic Letters* **2012**, *14*, 4266–4269.
- [167] T. E. Barder, S. D. Walker, J. R. Martinelli, S. L. Buchwald, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 4685–4696.
- [168] A. J. J. Lennox, G. C. Lloyd-Jones, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 7431–7441.
- [169] G. A. Molander, B. Biolatto, *The Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 4302–4314.
- [170] A. J. J. Lennox, G. C. Lloyd-Jones, *Israel Journal of Chemistry* **2010**, *50*, 664–674.
- [171] A. K. F. Albertson, J.-P. Lumb, *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 2204–2208.
- [172] S. S. Kumar, A. S. Begum, K. Hira, S. Niazi, B. P. Kumar, H. Araya, Y. Fujimoto, *Bioorganic Chemistry* **2019**, *89*, 102991.
- [173] R. Brückner, *Organic Mechanisms-Reactions, Stereochemistry and Synthesis*, ed. M. Harmata. 2010, Berlin Heidelberg: Springer, **2010**, S. 706.
- [174] J. L. Grenier, N. Cotelte, J. P. Catteau, P. Cotelte, *Journal of Physical Organic Chemistry* **2000**, *13*, 511–517.
- [175] L. Li, T. H. Chan, *Organic Letters* **2001**, *3*, 739–741.
- [176] P. Summeren-Wesenhagen, R. Voges, A. Dennig, S. Sokolowsky, S. Noack, U. Schwaneberg, J. Marienhagen, *Microbial Cell Factories* **2015**, *14*.
- [177] E. Kantchev, C. O'Brien, M. Organ, *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 2768–2813.
- [178] Z. Chen, X. Sun, Y. Li, Y. Yan, Q. Yuan, *Metabolic Engineering* **2017**, *39*, 102–109.
- [179] E. Klumbys, Z. Zebec, N. J. Weise, N. J. Turner, N. S. Scrutton, *Green Chemistry* **2018**, *20*, 658–663.
- [180] D. Könnig, W. Hiller, M. Christmann, *Organic Letters* **2012**, *14*, 5258–5261.
- [181] S. Suljić, J. Pietruszka, D. Worgull, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2015**, *357*, 1822–1830.
- [182] L. R. Snyder, *Analytical Chemistry* **1974**, *46*, 1384–1393.

- [183] R. Krug, Doktorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2019**.
- [184] A. Libman, H. Shalit, Y. Vainer, S. Narute, S. Kozuch, D. Pappo, *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137*, PMID: 26287435, 11453–11460.
- [185] E. Gaster, Y. Vainer, A. Regev, S. Narute, K. Sudheendran, A. Werbeloff, H. Shalit, D. Pappo, *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 4198–4202.
- [186] L. Tarrago, C. Modolo, M. Yemloul, V. Robert, P. Rousselot-Pailley, T. Tron, *New Journal of Chemistry* **2018**, *42*, 11770–11775.
- [187] F. Carson, V. Pascanu, A. Bermejo Gómez, Y. Zhang, A. E. Platero-Prats, X. Zou, B. Martín-Matute, *Chemistry - A European Journal* **2015**, *21*, 10896–10902.
- [188] J. A. Marshall, C. M. Grant, *The Journal of Organic Chemistry* **1999**, *64*, 696–697.
- [189] E. D. Hostetler, G. E. Terry, H. D. Burns, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **2005**, *48*, 629–634.
- [190] C. Vanier, A. Wagner, C. Mioskowski, *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 4335–4338.
- [191] T. Hayashi, M. Konishi, M. Kumada, *Tetrahedron Letters* **1979**, *20*, 1871–1874.
- [192] C. Panagouleas, H. Skaltsa, D. Lazari, A.-L. Skaltsounis, M. Sokovic, *Pharmaceutical Biology* **2003**, *41*, 266–270.
- [193] M. C. Carpinella, L. M. Giorda, C. G. Ferrayoli, S. M. Palacios, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 2506–2511.
- [194] H. Zhou, J. Ren, Z. Li, *Food Control* **2017**, *79*, 192–199.
- [195] A. S. Klein, H. U. C. Brass, D. P. Klebl, T. Classen, A. Loeschcke, T. Drepper, S. Sievers, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1545–1552.
- [196] C. R. Harwood, *e LS* **2001**.
- [197] A. Burkovski, *Archives of Microbiology* **2003**, *179*, 83–88.
- [198] A. Burkovski, *Corynebacterium glutamicum*, Caister Academic Press, **2015**.
- [199] T. Yorimitsu, D. J. Klionsky, *Cell Death & Differentiation* **2005**, *12*, 1542–1552.
- [200] D. J. Klionsky, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2007**, *8*, 931–937.
- [201] M. Selvakumaran, R. K. Amaravadi, I. A. Vasilevskaya, P. J. O'Dwyer, *Clinical Cancer Research* **2013**, *19*, 2995–3007.
- [202] D. A. Gewirtz, *Cancer Research* **2014**, *74*, 647–651.
- [203] D. H. Liang, D. S. Choi, J. E. Ensor, B. A. Kaiparettu, B. L. Bass, J. C. Chang, *Cancer Letters* **2016**, *376*, 249–258.
- [204] E. H. Epstein, *Nature Reviews Cancer* **2008**, *8*, 743–754.
- [205] M. C. Thompson, C. Fuller, T. L. Hogg, J. Dalton, D. Finkelstein, C. C. Lau, M. Chintagumpala, A. Adesina, D. M. Ashley, S. J. Kellie, M. D. Taylor, T. Curran, A. Gajjar, R. J. Gilbertson, *Journal of Clinical Oncology* **2006**, *24*, 1924–1931.
- [206] M. Kool, J. Koster, J. Bunt, N. E. Hasselt, A. Lakeman, P. Van Sluis, D. Troost, N. Schouten-van Meeteren, H. N. Caron, J. Cloos u. a., *PloS one* **2008**, *3*.
- [207] R. L. Yauch, S. E. Gould, S. J. Scales, T. Tang, H. Tian, C. P. Ahn, D. Marshall, L. Fu, T. Januario, D. Kallop, M. Nannini-Pepe, K. Kotkow, J. C. Marsters, L. L. Rubin, F. J. de Sauvage, *Nature* **2008**, *455*, 406–410.
- [208] L. Lum, *Science* **2004**, *304*, 1755–1759.

- [209] K. P. Olive, M. A. Jacobetz, C. J. Davidson, A. Gopinathan, D. McIntyre, D. Honess, B. Madhu, M. A. Goldgraben, M. E. Caldwell, D. Allard, K. K. Frese, G. DeNicola, C. Feig, C. Combs, S. P. Winter, H. Ireland-Zecchini, S. Reichelt, W. J. Howat, A. Chang, M. Dhara, L. Wang, F. Ruckert, R. Grutzmann, C. Pilarsky, K. Izeradjene, S. R. Hingorani, P. Huang, S. E. Davies, W. Plunkett, M. Egorin, R. H. Hruban, N. Whitebread, K. McGovern, J. Adams, C. Iacobuzio-Donahue, J. Griffiths, D. A. Tuveson, *Science* **2009**, *324*, 1457–1461.
- [210] P. M. Lorusso, C. M. Rudin, J. C. Reddy, R. Tibes, G. J. Weiss, M. J. Borad, C. L. Hann, J. R. Brahmer, I. Chang, W. C. Darbonne, R. A. Graham, K. L. Zerivitz, J. A. Low, D. D. V. Hoff, *Clinical Cancer Research* **2011**, *17*, 2502–2511.
- [211] H. Kimura, J. M. Ng, T. Curran, *Cancer Cell* **2008**, *13*, 249–260.
- [212] X. Wu, S. Ding, Q. Ding, N. S. Gray, P. G. Schultz, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 14520–14521.
- [213] X. Ma, J. J. Farndon, T. A. Young, N. Fey, J. F. Bower, *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56*, 14531–14535.
- [214] H. K. Wu, Z. Su, H. A. Aisa, A. Yili, B. Hang, *Chemistry of Natural Compounds* **2007**, *43*, 472–473.
- [215] A. Paul, M. Bera, P. Gupta, N. P. Singh, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2019**, *17*, 7689–7693.
- [216] K. G. Lalwani, A. Sudalai, *European Journal of Organic Chemistry* **2015**, *2015*, 7344–7351.
- [217] A. Gaspar, E. M. Garrido, M. Esteves, E. Quezada, N. Milhazes, J. Garrido, F. Borges, *European journal of medicinal chemistry* **2009**, *44*, 2092–2099.
- [218] M. Potgieter, G. L. Wenteler, S. E. Drewes, *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1101–1104.
- [219] N. Sakakibara, T. Nakatsubo, S. Suzuki, D. Shibata, M. Shimada, T. Umezawa, *Organic & biomolecular chemistry* **2007**, *5*, 802–815.
- [220] B. H. Nguyen, R. J. Perkins, J. A. Smith, K. D. Moeller, *The Journal of Organic Chemistry* **2015**, *80*, 11953–11962.
- [221] M. S. Prevost, S. Delarue-Cochin, J. Marteaux, C. Colas, C. V. Renterghem, A. Blondel, T. Malliavin, P.-J. Corringier, D. Joseph, *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56*, 4619–4630.
- [222] C. S. Lancefield, O. S. Ojo, F. Tran, N. J. Westwood, *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *54*, 258–262.

9 Anhang

9.1 Cyclodextrinversuch

Tabelle 9.1: Konzentrationen an 5,5'-Dibrompinoresinol (m) im Verlauf einer Dimerisierungsreaktion mit und ohne der Zugabe von α , β und γ -Cyclodextrin.

Zeit [h]	Konzentration Pinoresinol [mM] mit Standardabweichung							
	Kontrolle		α -CD		β -CD		γ -CD	
1	0.16	0.01	0.28	0.07	0.46	0.01	0.45	0.02
2	0.17	0.06	0.28	0.04	0.73	0.11	0.68	0.02
3	0.51	0.1	0.5	0.06	0.87	0.01	0.68	0.1
4	0.66	0.04	0.69	0.21	0.92	0.35	0.91	0.07
5	0.64	0.03	0.84	0.08	1.18	0.1	0.93	0.07
6	0.85	0.3	1.13	0.34	1.47	0.12	1.18	0.05
7	0.27	0.04	0.35	0.1	0.94	0.07	0.61	0.1
8	0.21	0.04	0.28	0.01	0.94	0.11	0.63	0.08

9.2 Toxizitätsassays gegenüber Mikroorganismen

9.2.1 Dosis-Wirkungs-Kurven

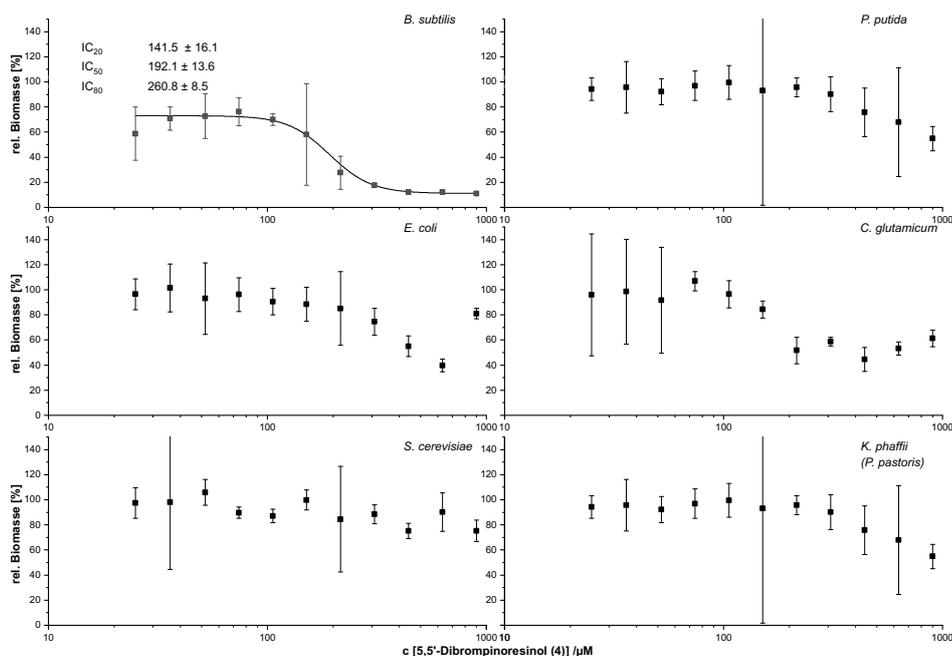
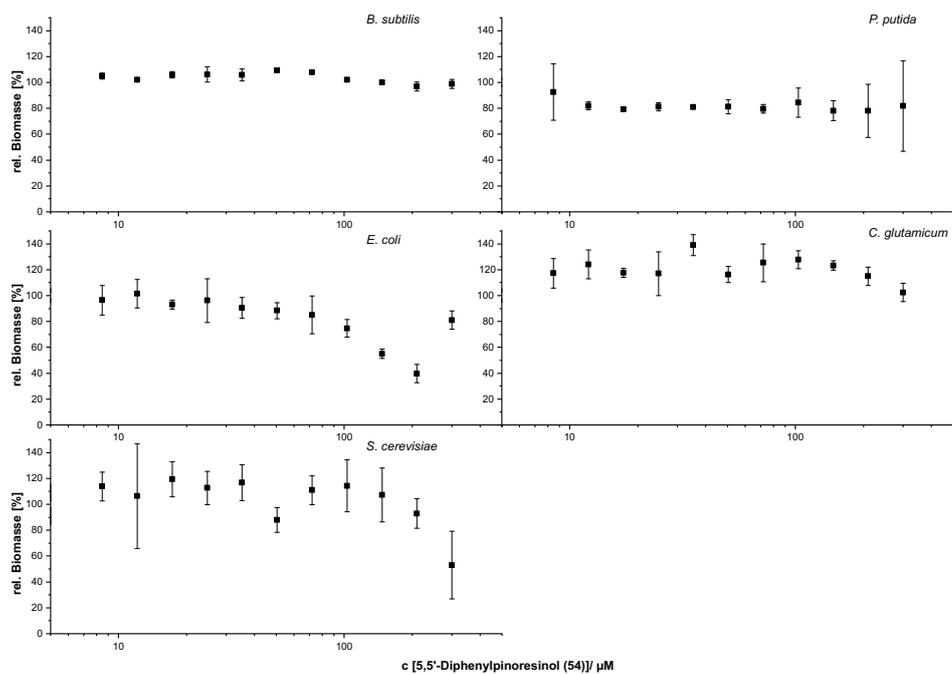
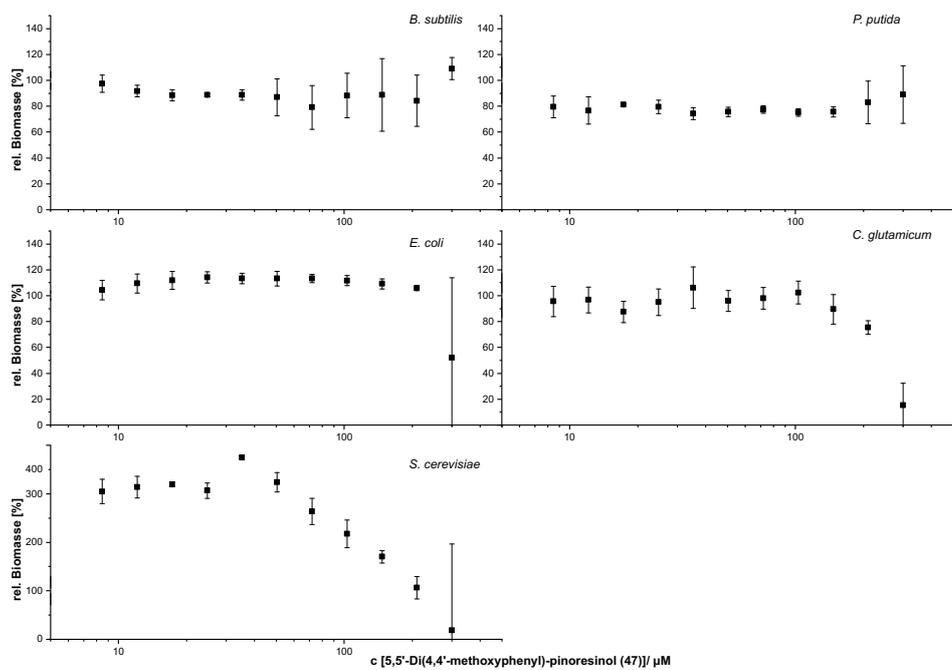


Abbildung 9.1: Toxizitätsassaysresultate von 5,5'-Dibrompinoresinol (5)

Abbildung 9.2: Toxizitätsassaysresultate von 5,5'-Diphenylpinoresinol (**62**)Abbildung 9.3: Toxizitätsassaysresultate von 5,5'-Di(4,4'-methoxyphenyl)-pinoresinol (**51**)

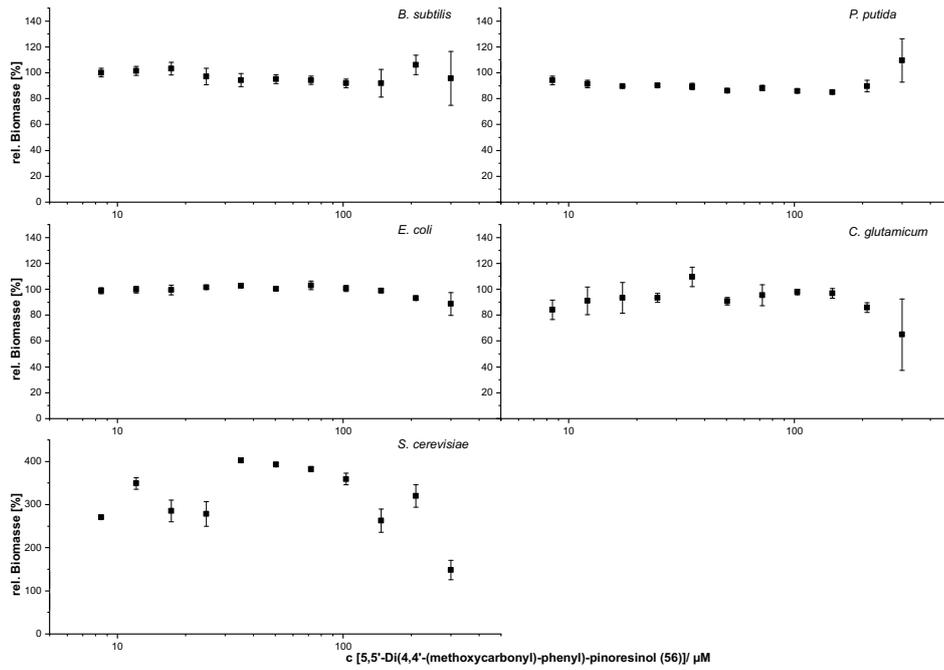


Abbildung 9.4: Toxizitätsassaysresultate von 5,5'-Di(4,4'-(methoxycarbonyl)-phenyl)-pinoresinol (**66**)

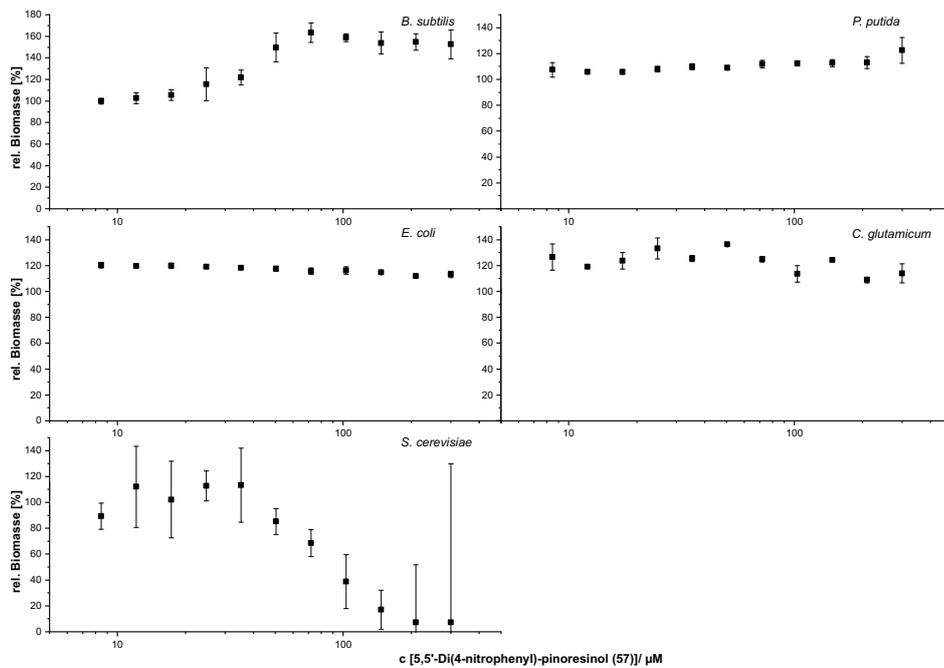
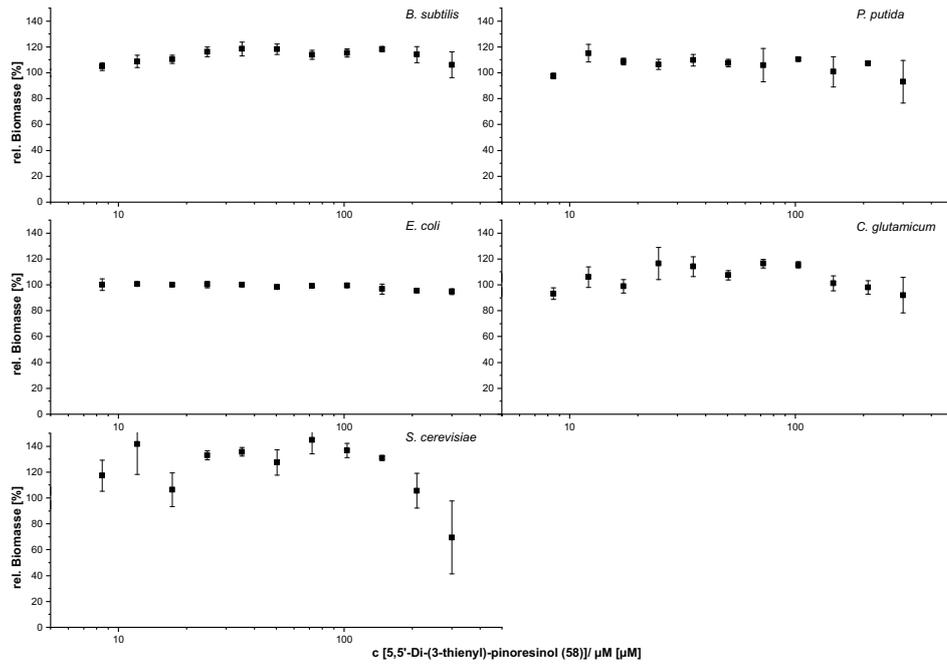
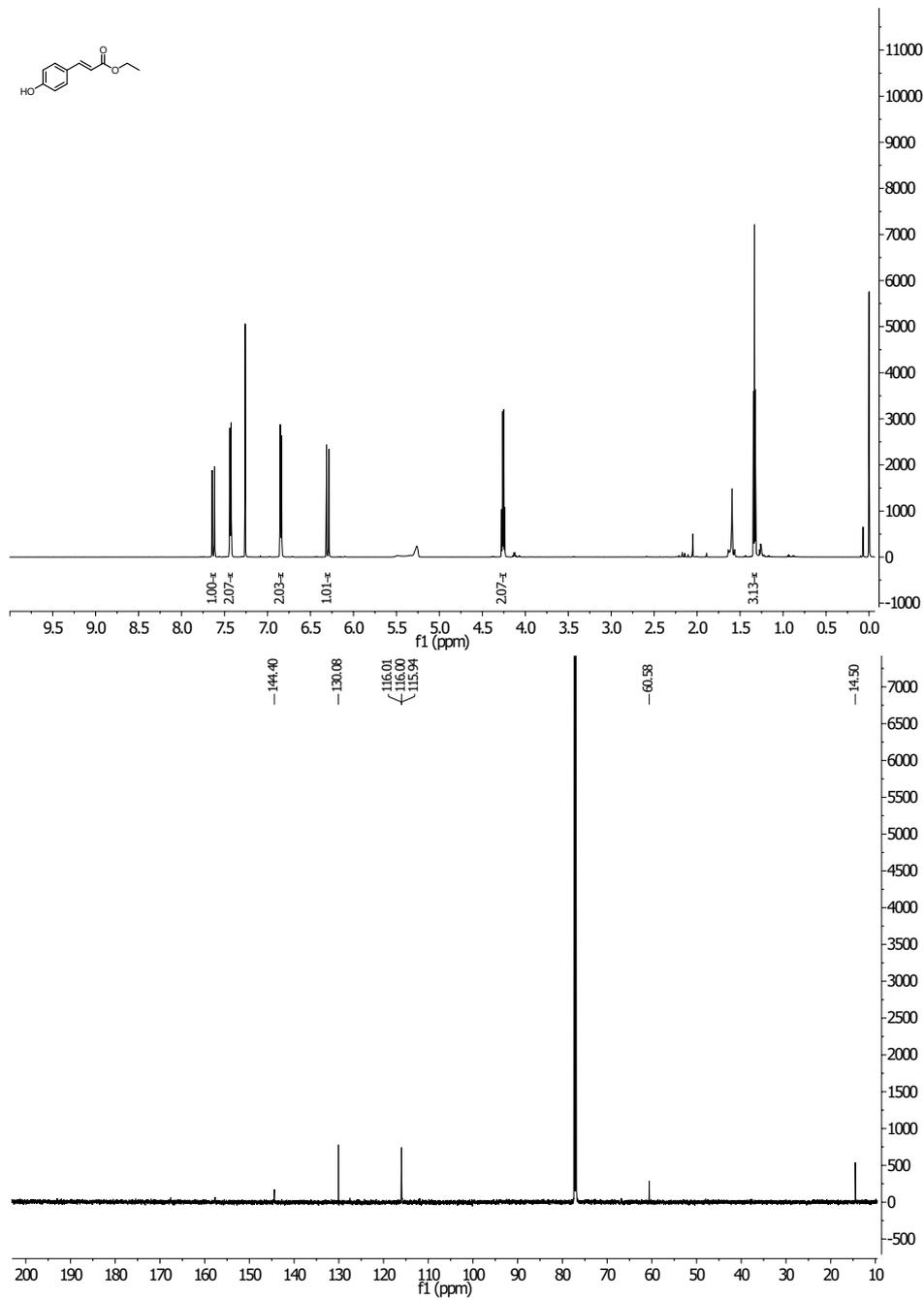
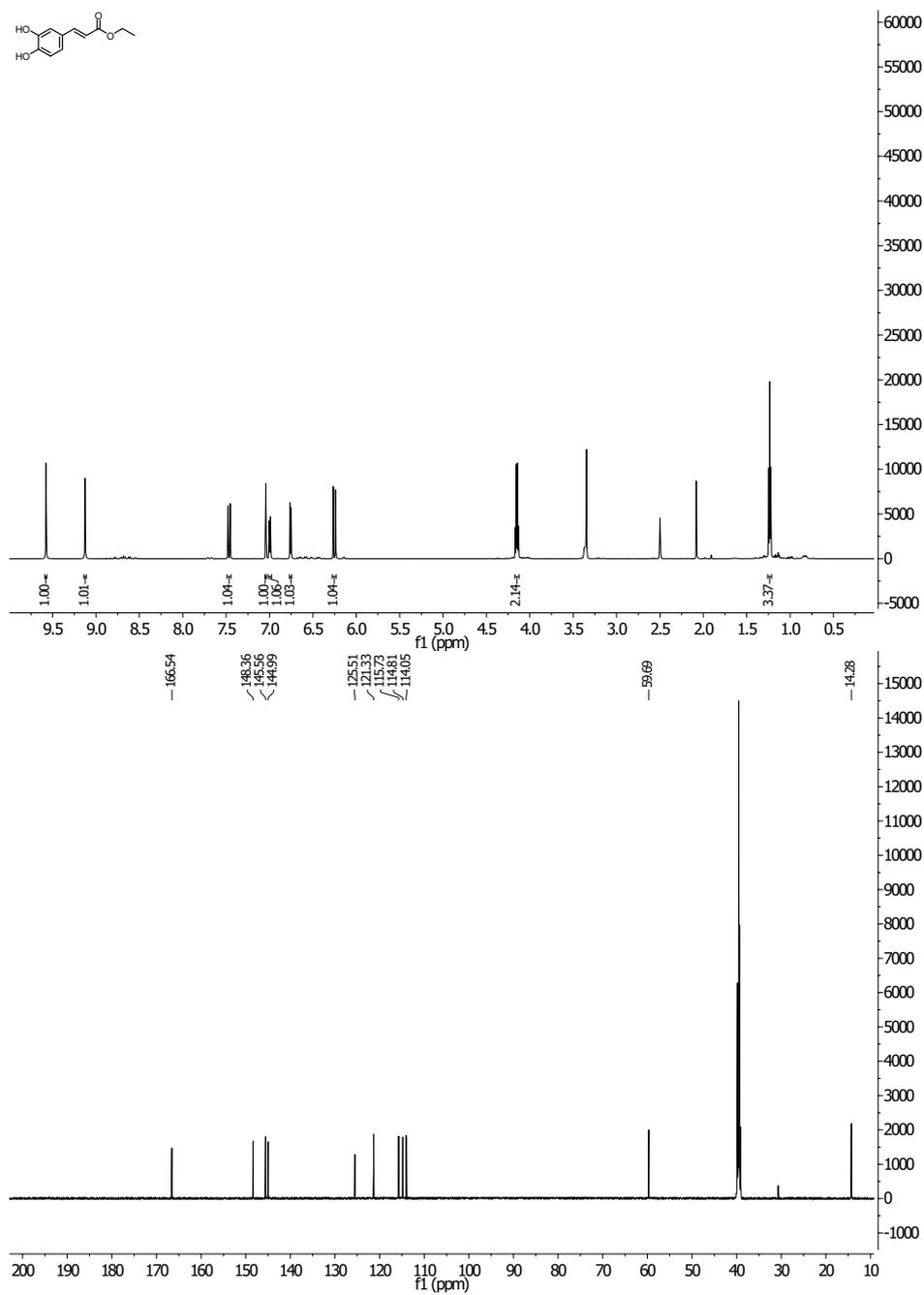


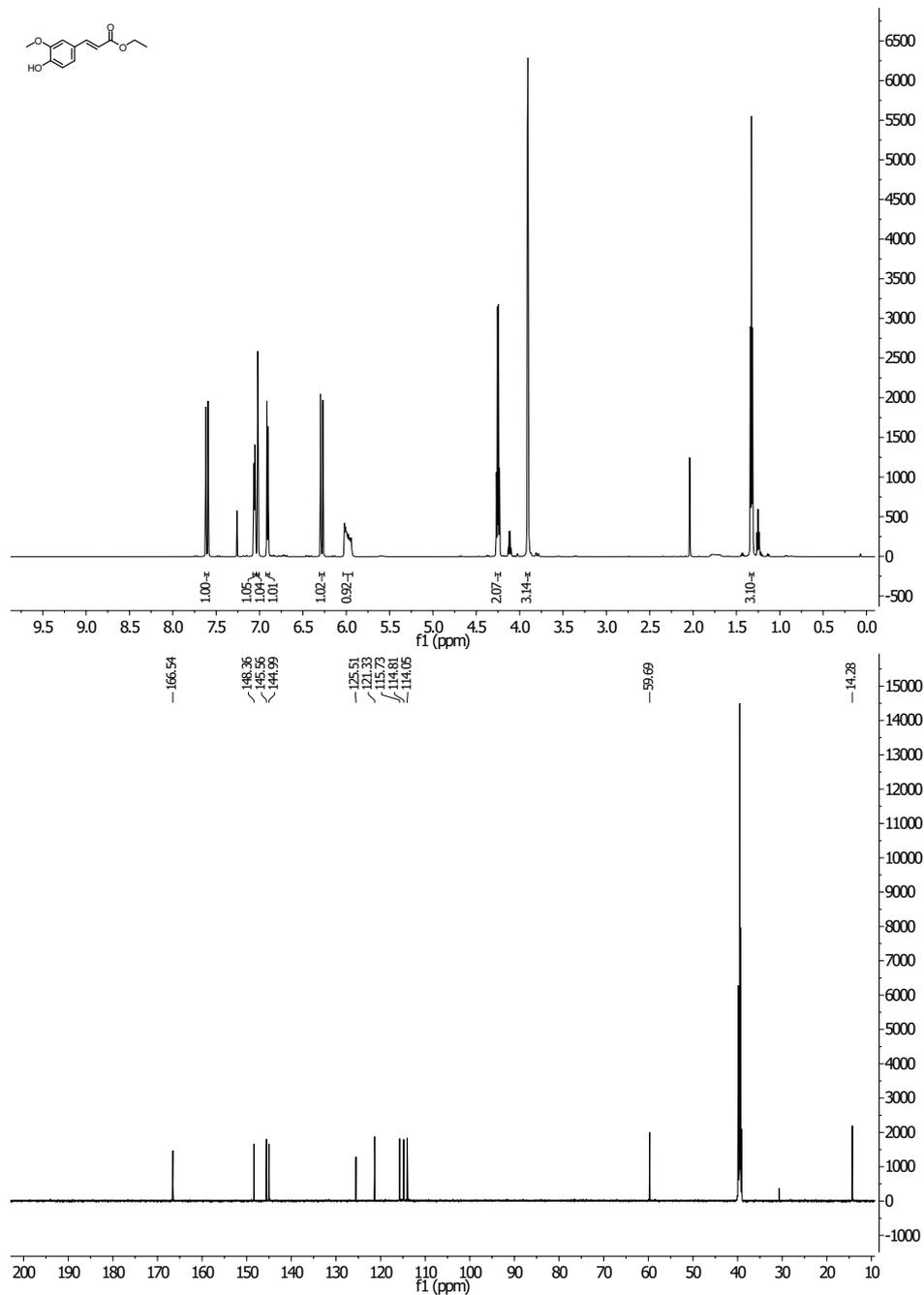
Abbildung 9.5: Toxizitätsassaysresultate von 5,5'-Di(4-nitrophenyl)-pinoresinol (**65**)

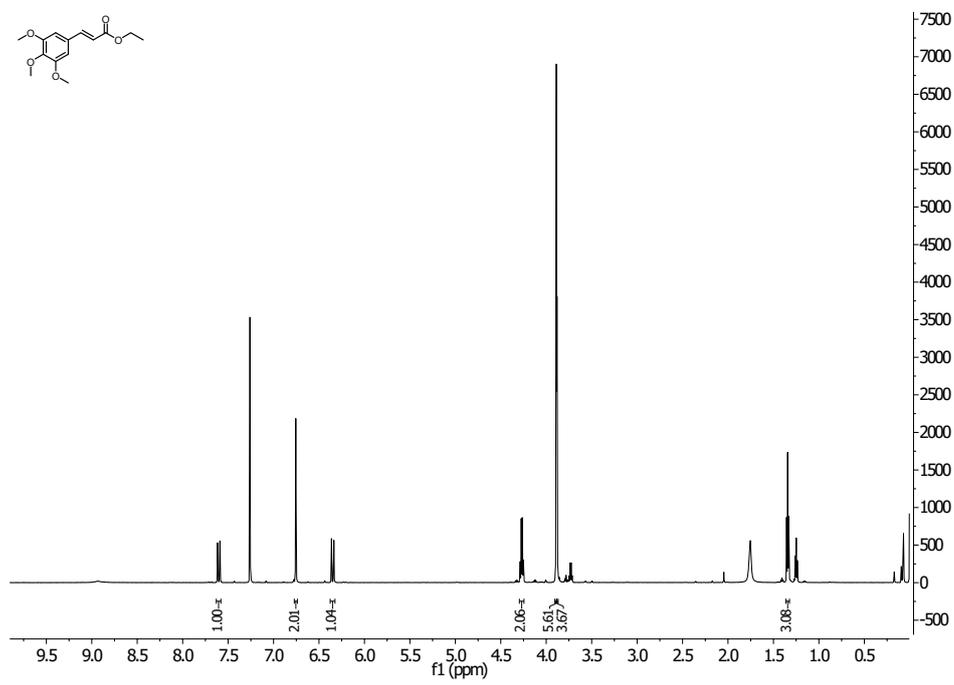
Abbildung 9.6: Toxizitätsassaysresultate von 5,5'-Di-(3-thienyl)-pinoresinol (**67**)

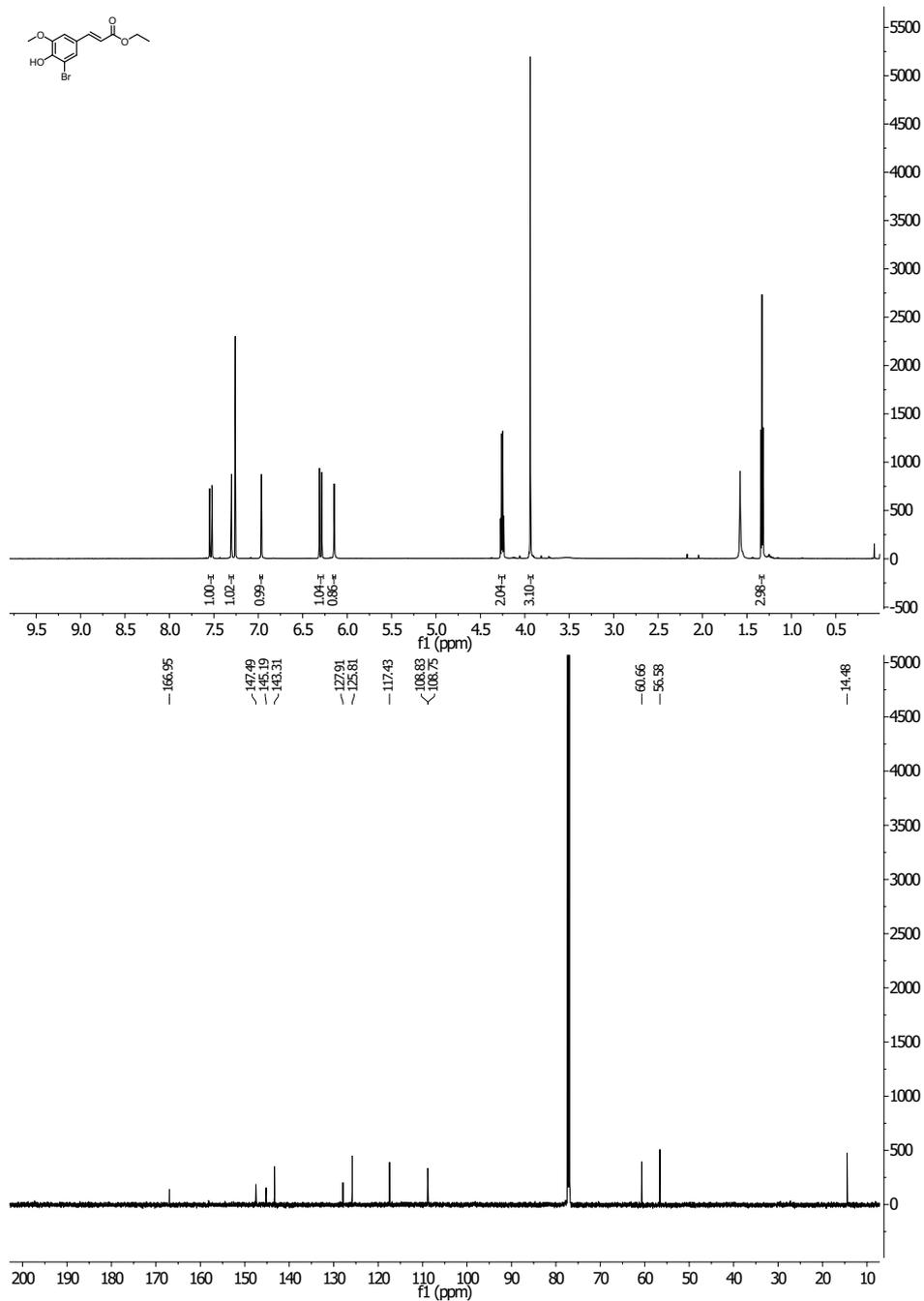
9.3 NMR-Spektren

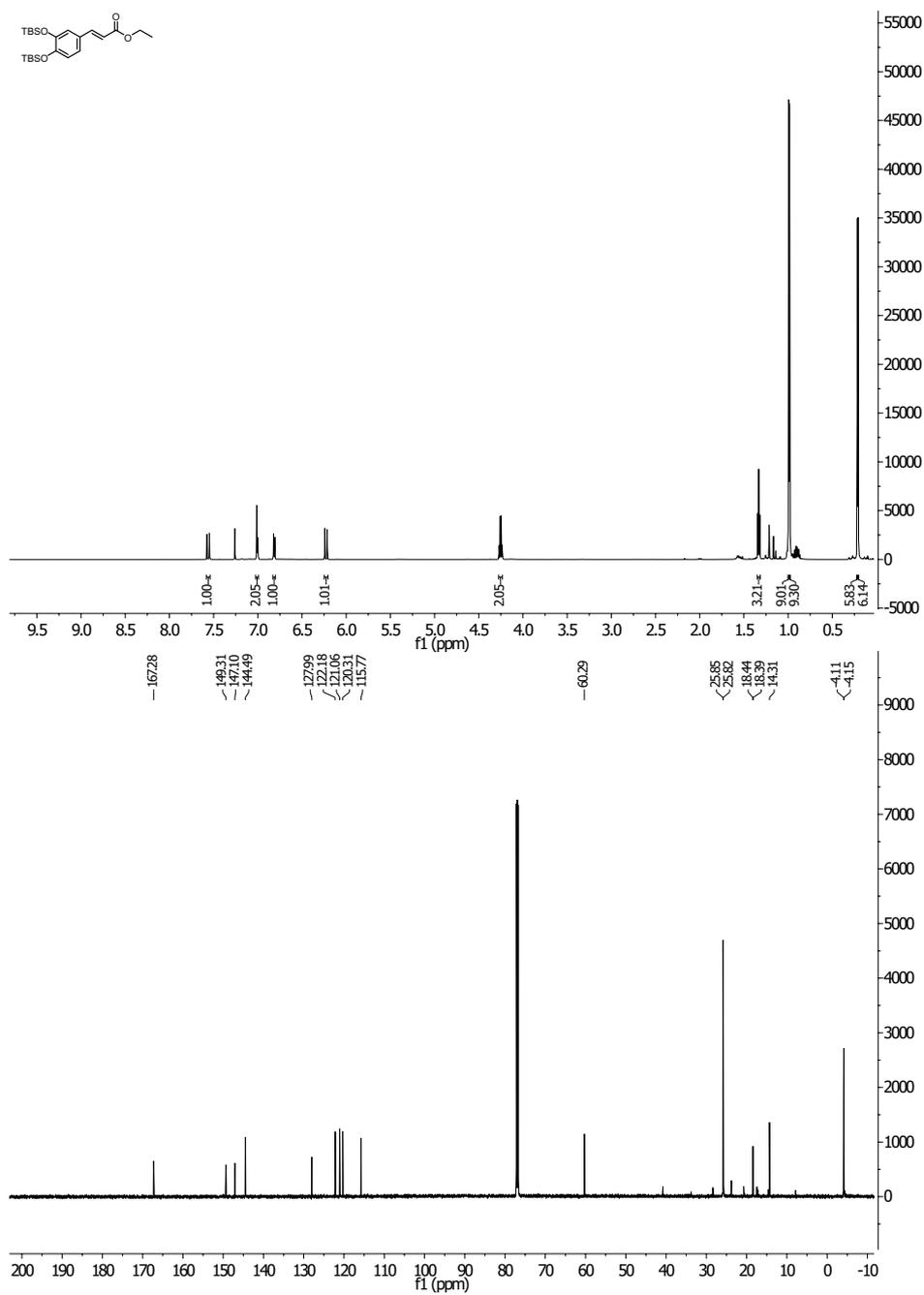
Abbildung 9.7: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **68** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)

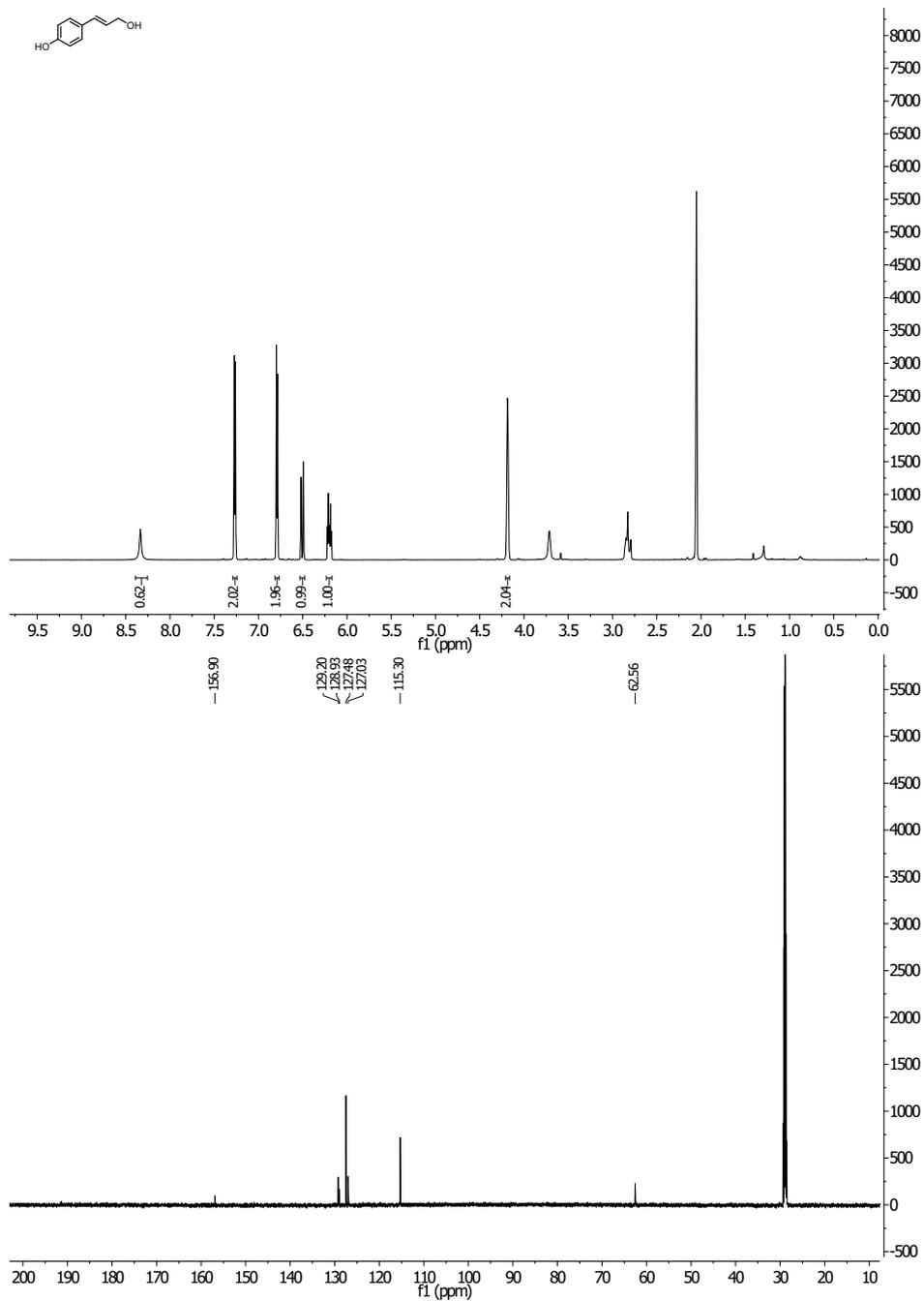
Abbildung 9.8: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **39** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)

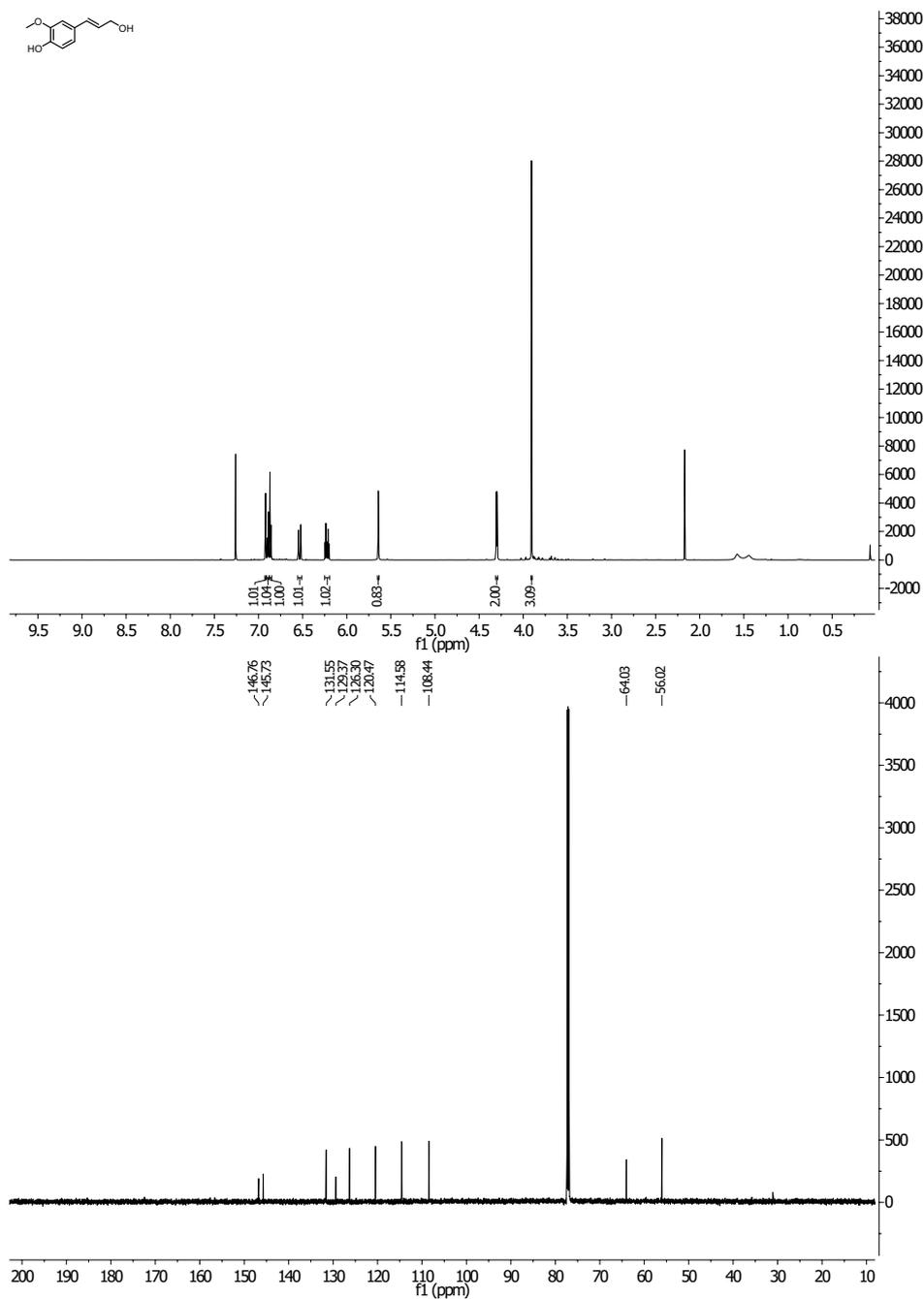
Abbildung 9.9: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **37** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz)

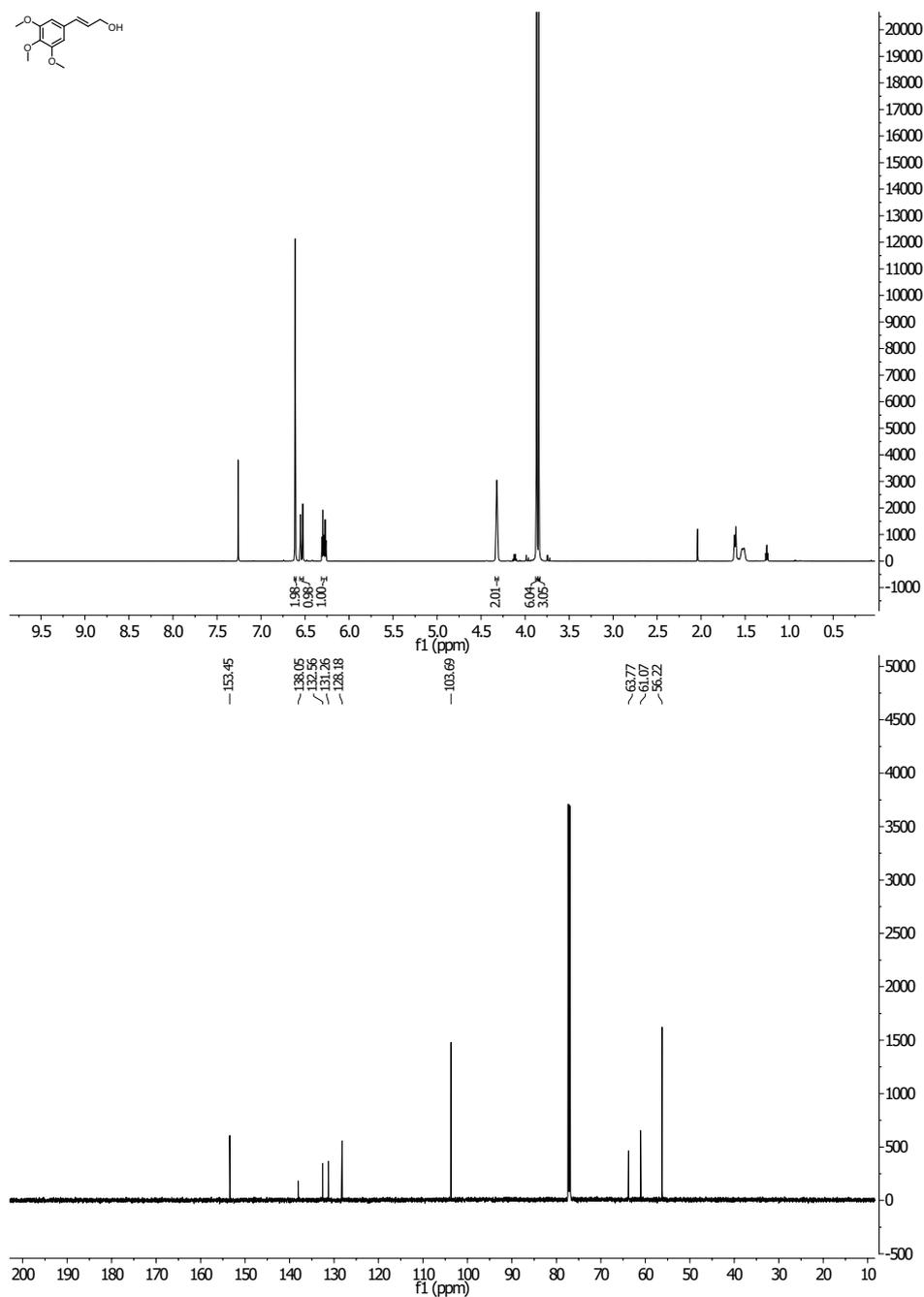
Abbildung 9.10: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **69** in CDCl_3 (600 MHz)

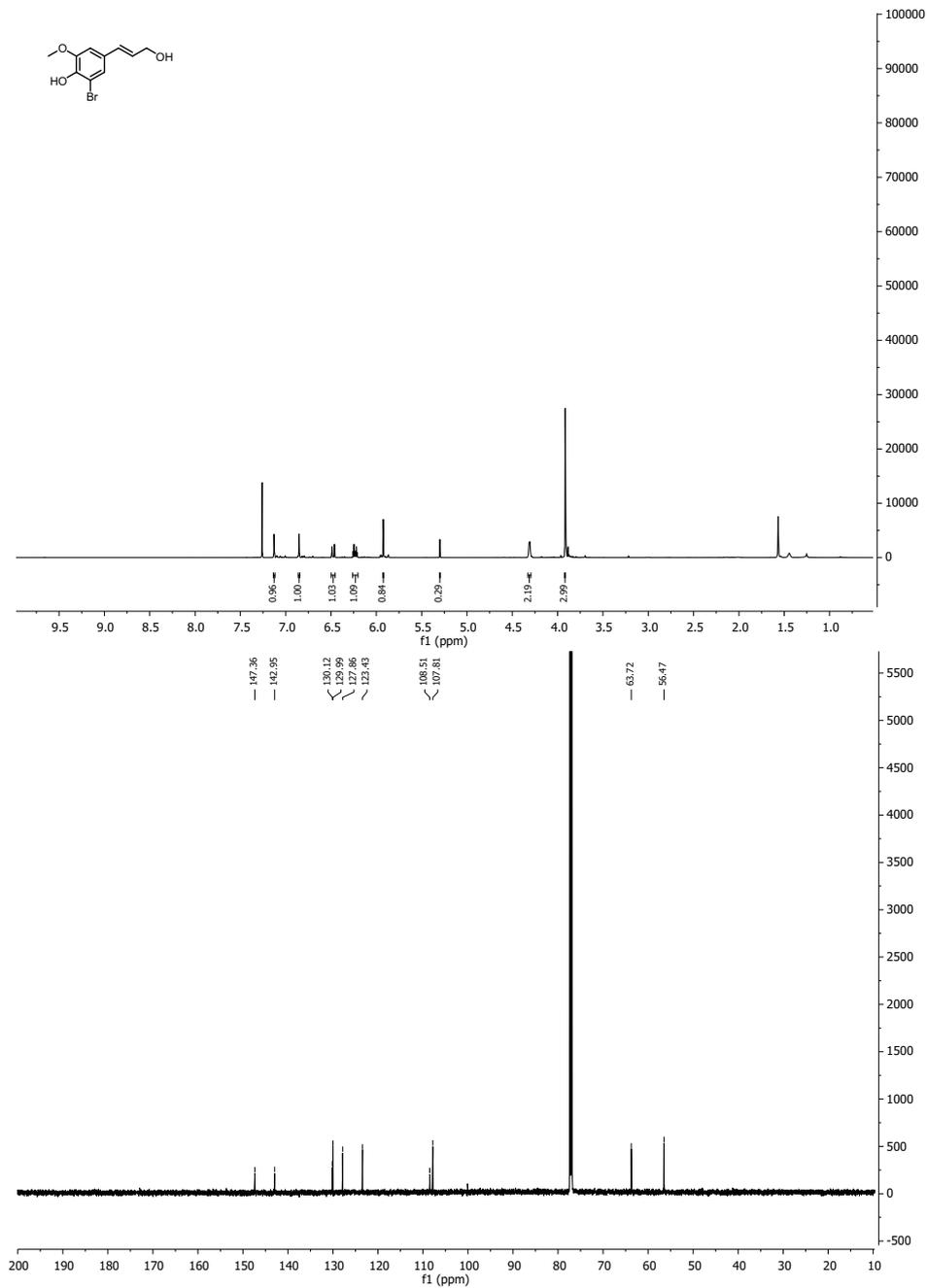
Abbildung 9.11: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **70** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)

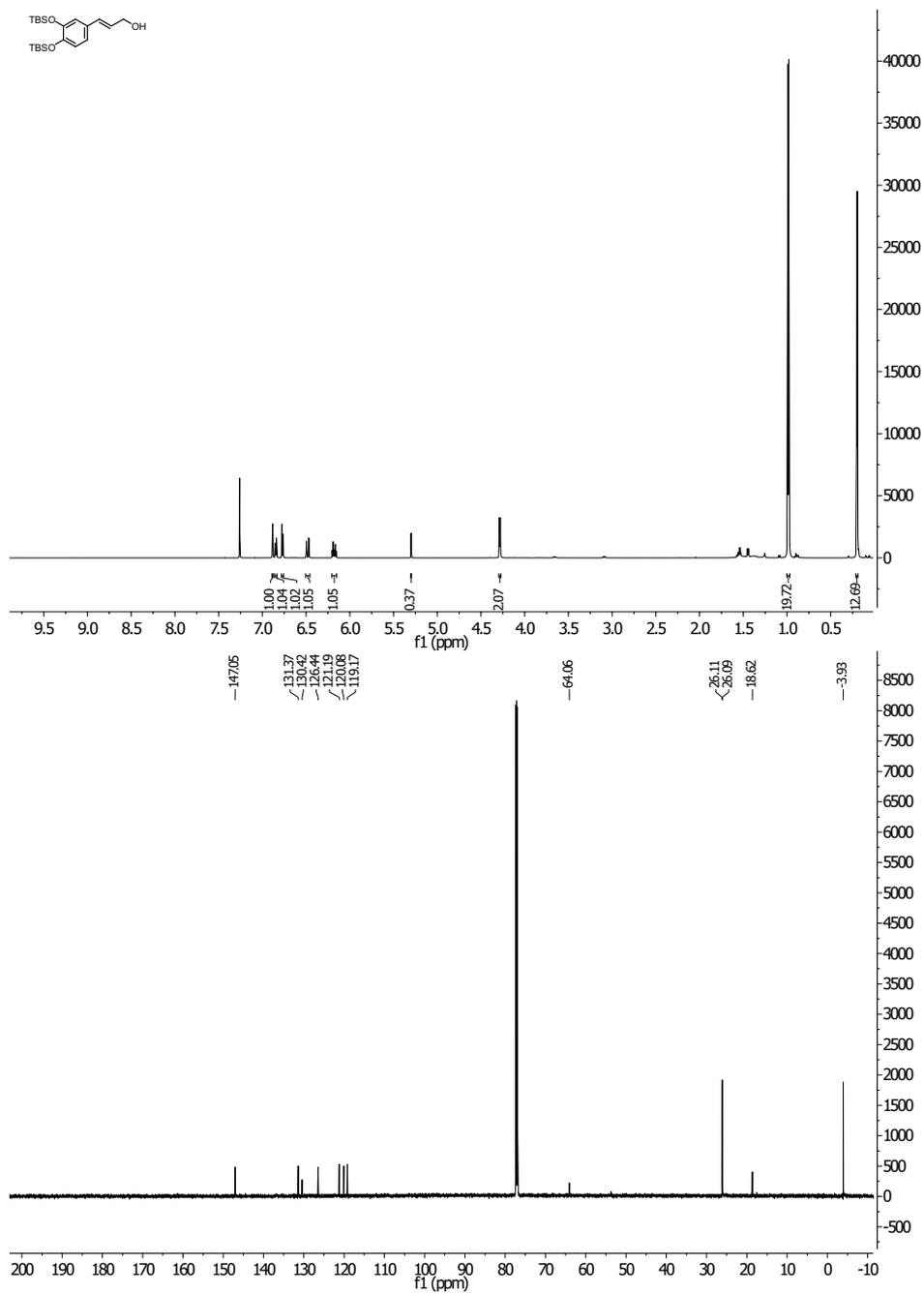
Abbildung 9.12: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **71** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz)

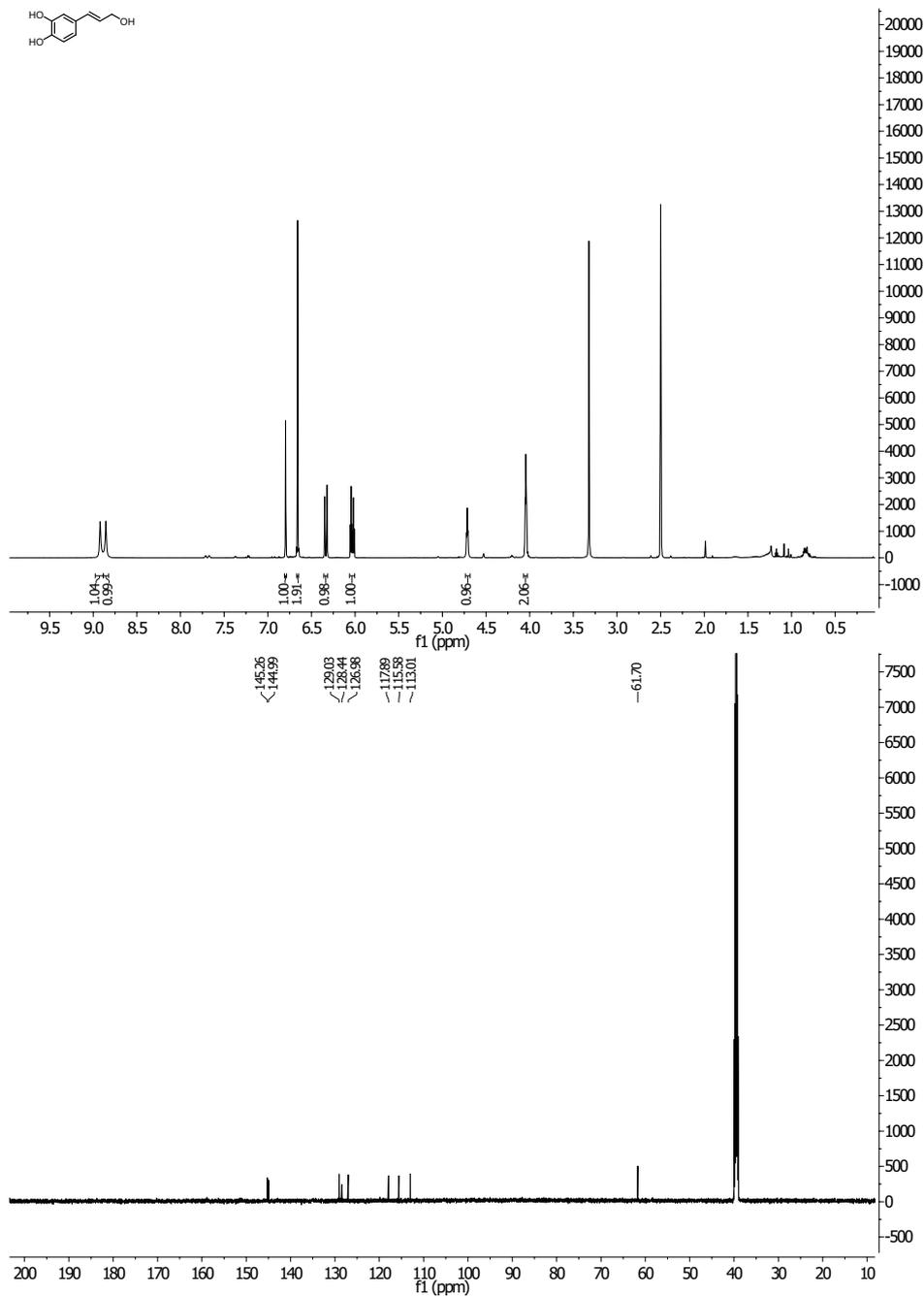
Abbildung 9.13: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **7** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)

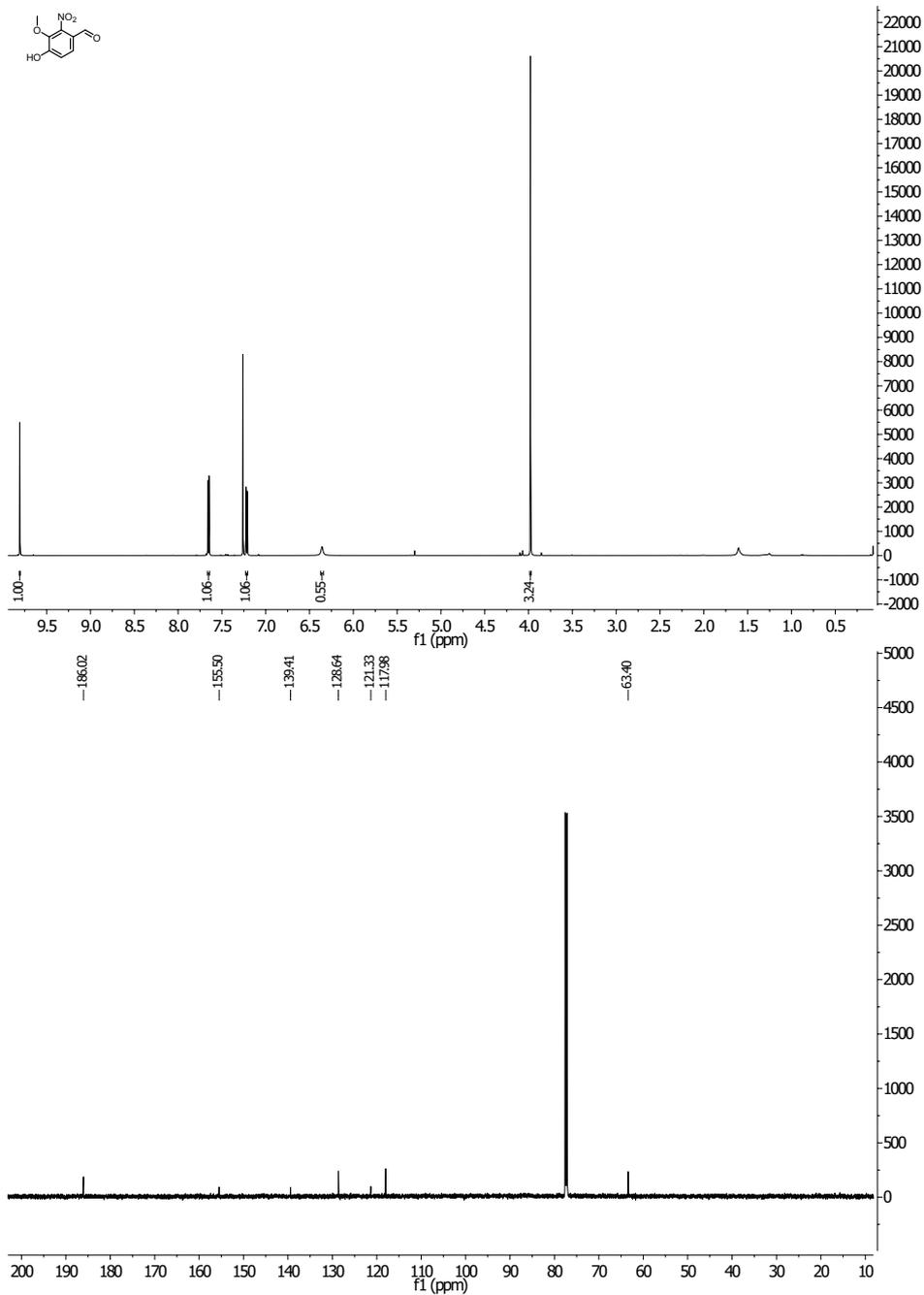
Abbildung 9.14: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 4 in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz)

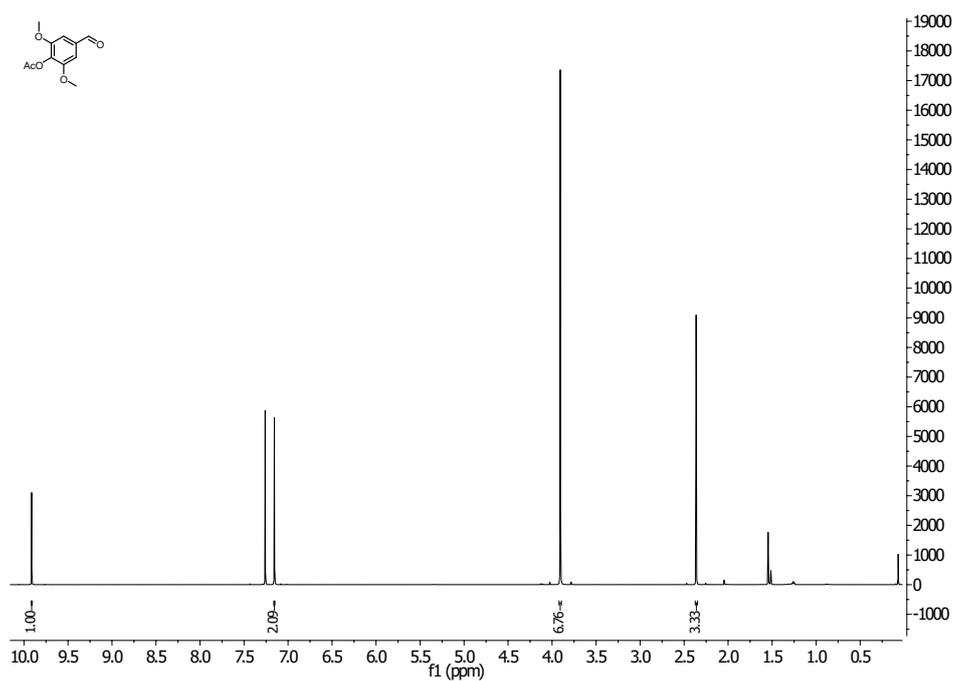
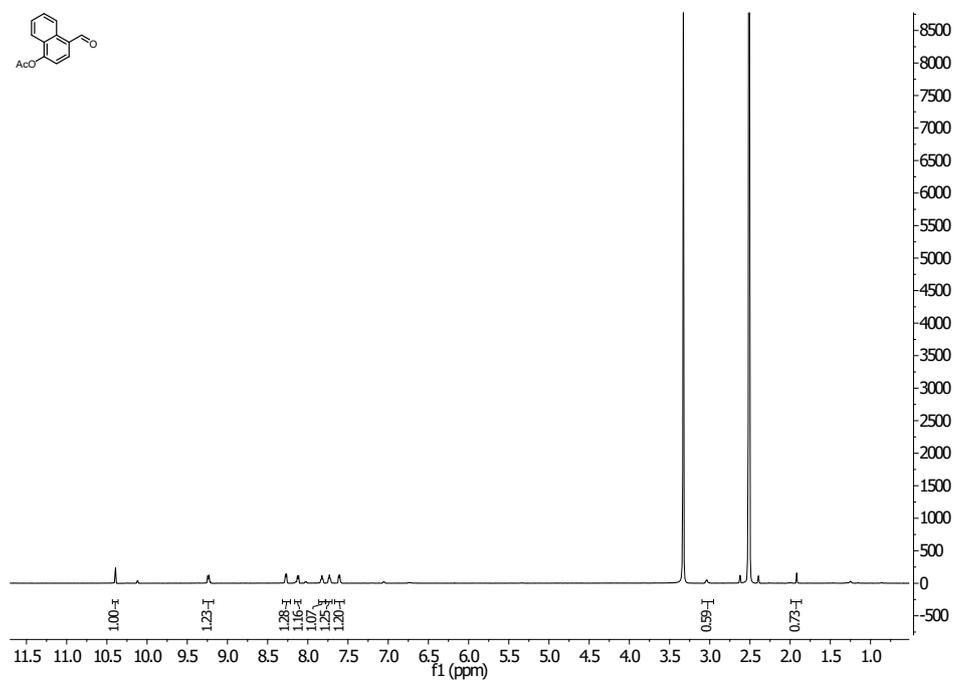
Abbildung 9.15: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **40** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz)

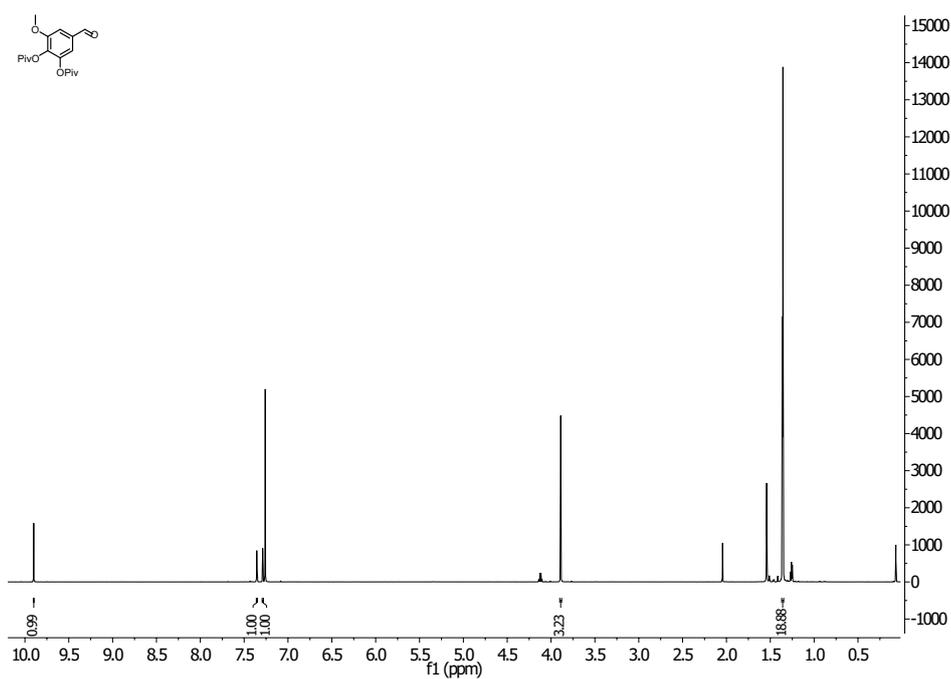
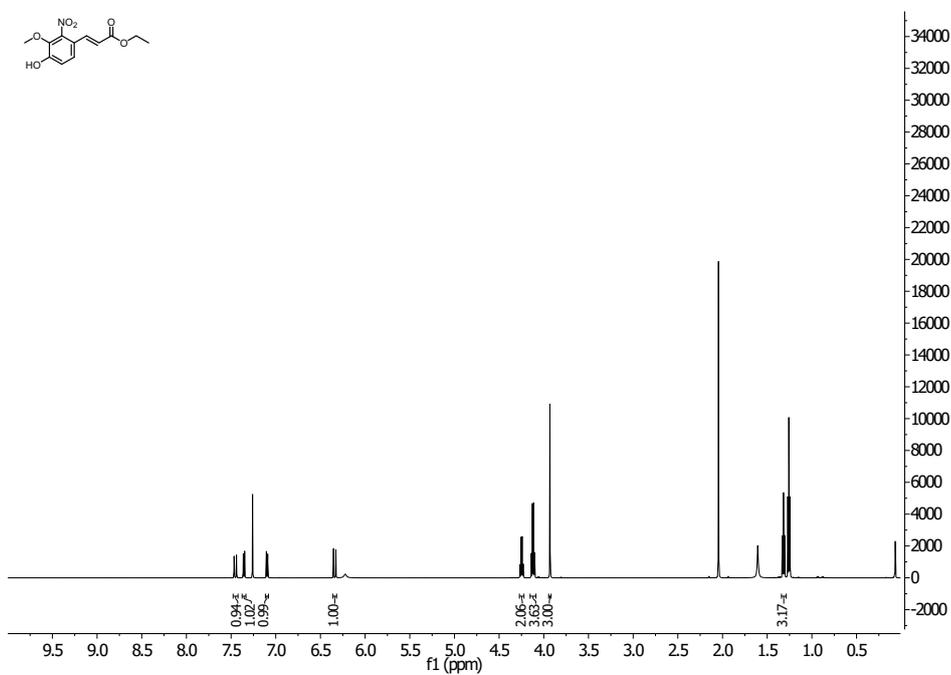
Abbildung 9.16: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **3** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz)

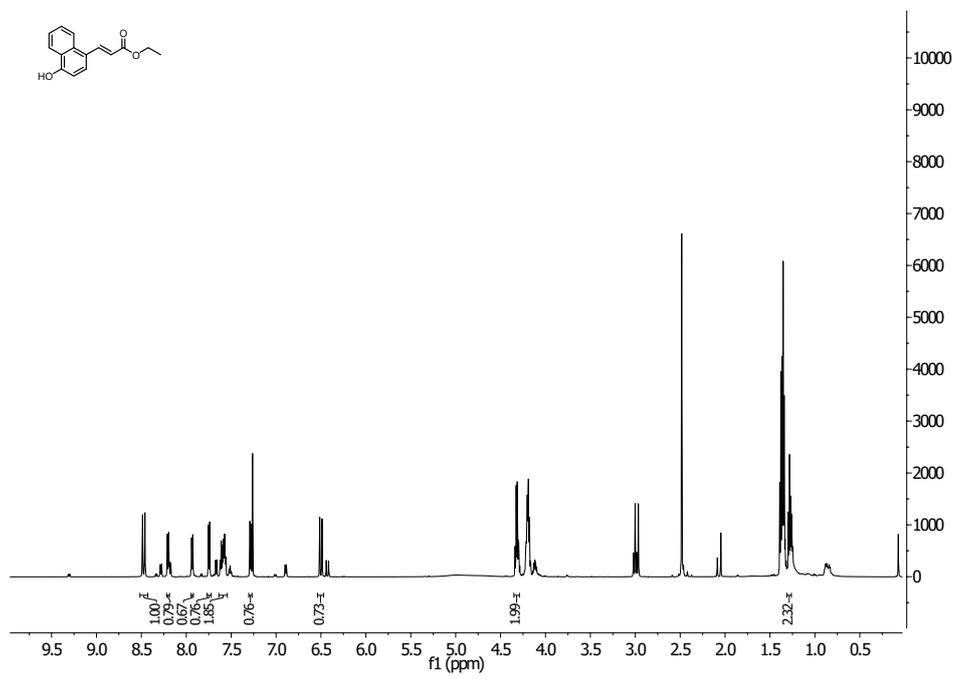
Abbildung 9.17: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **72** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz)

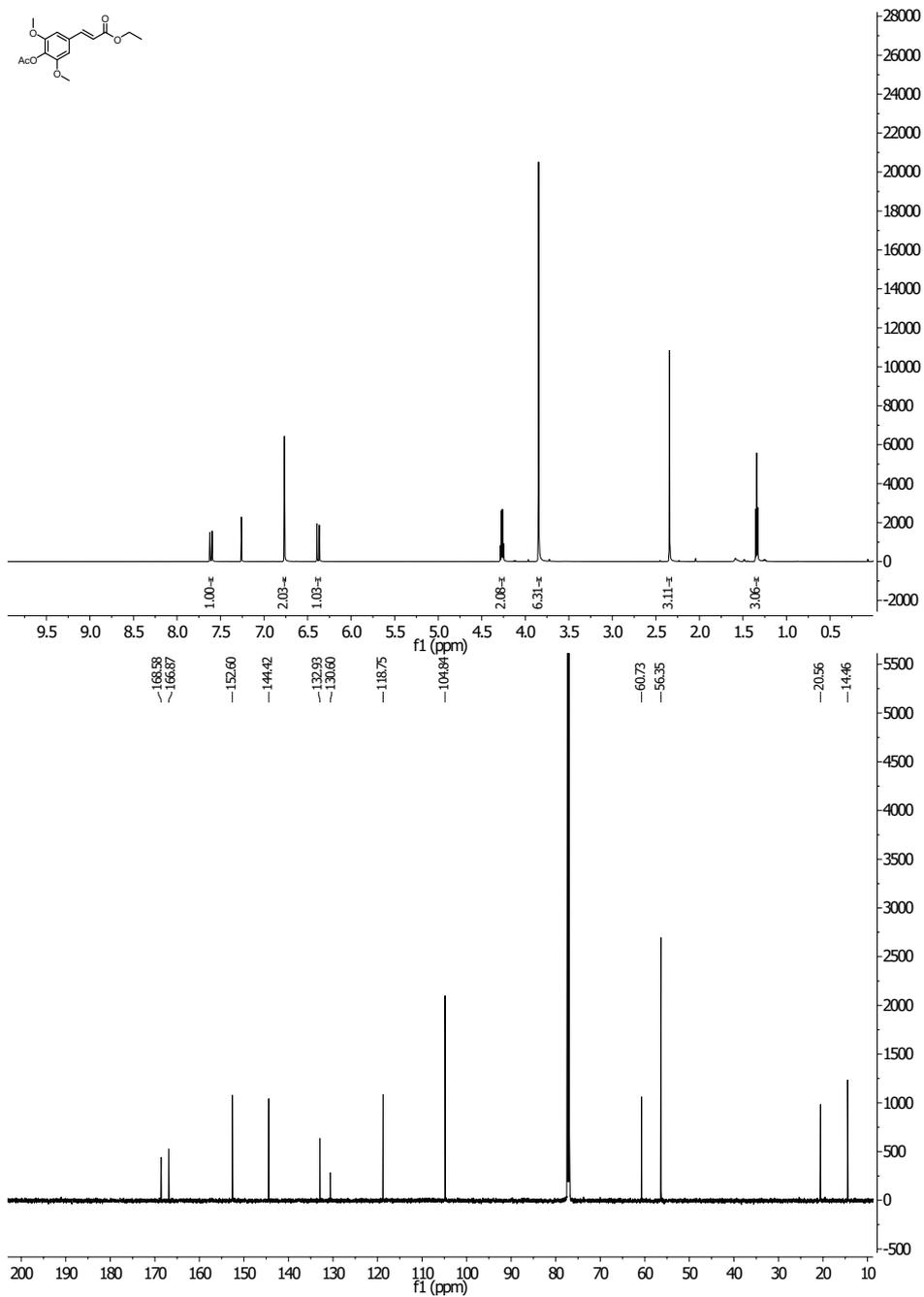
Abbildung 9.18: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **16** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz)

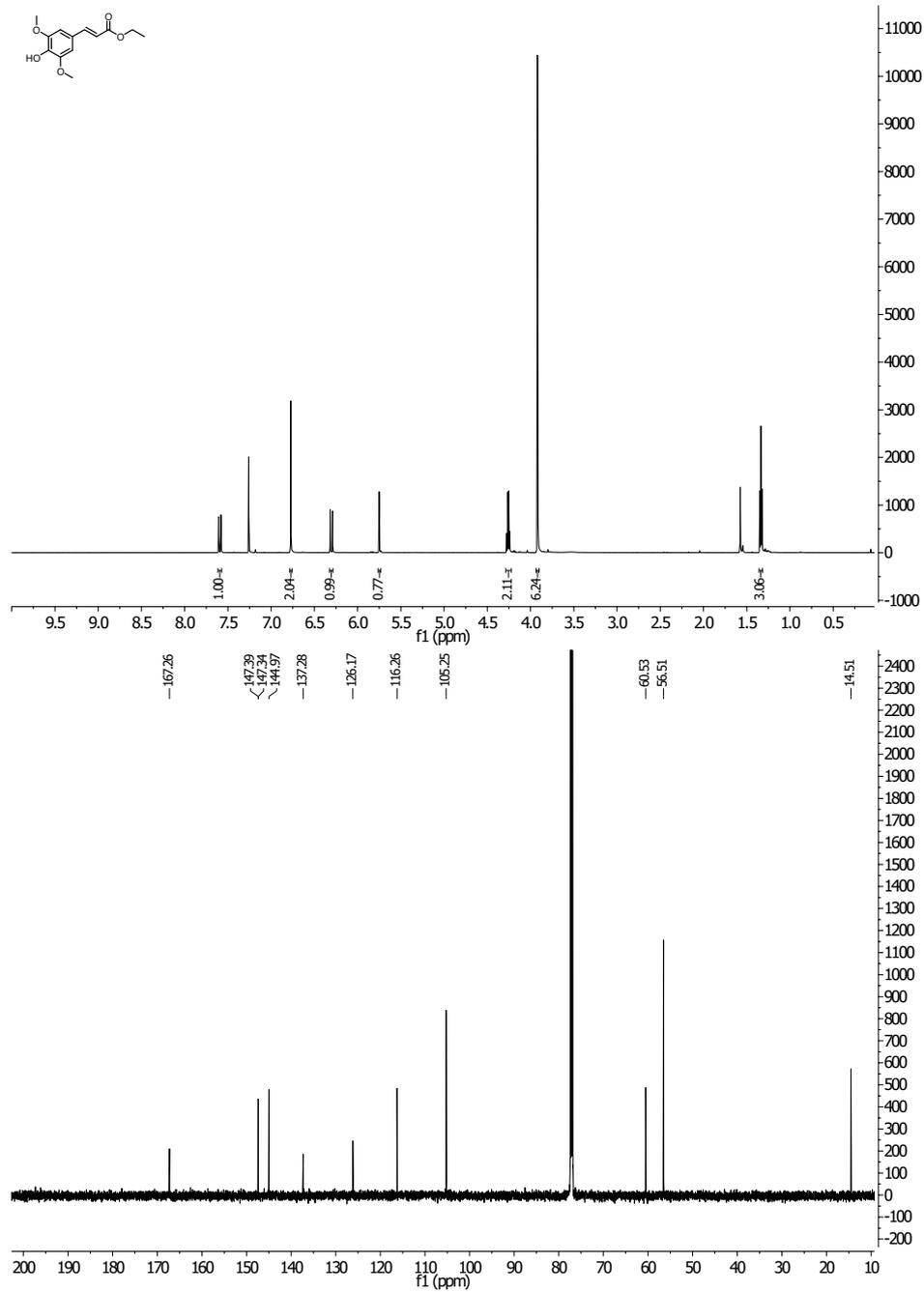
Abbildung 9.19: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **45** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz)

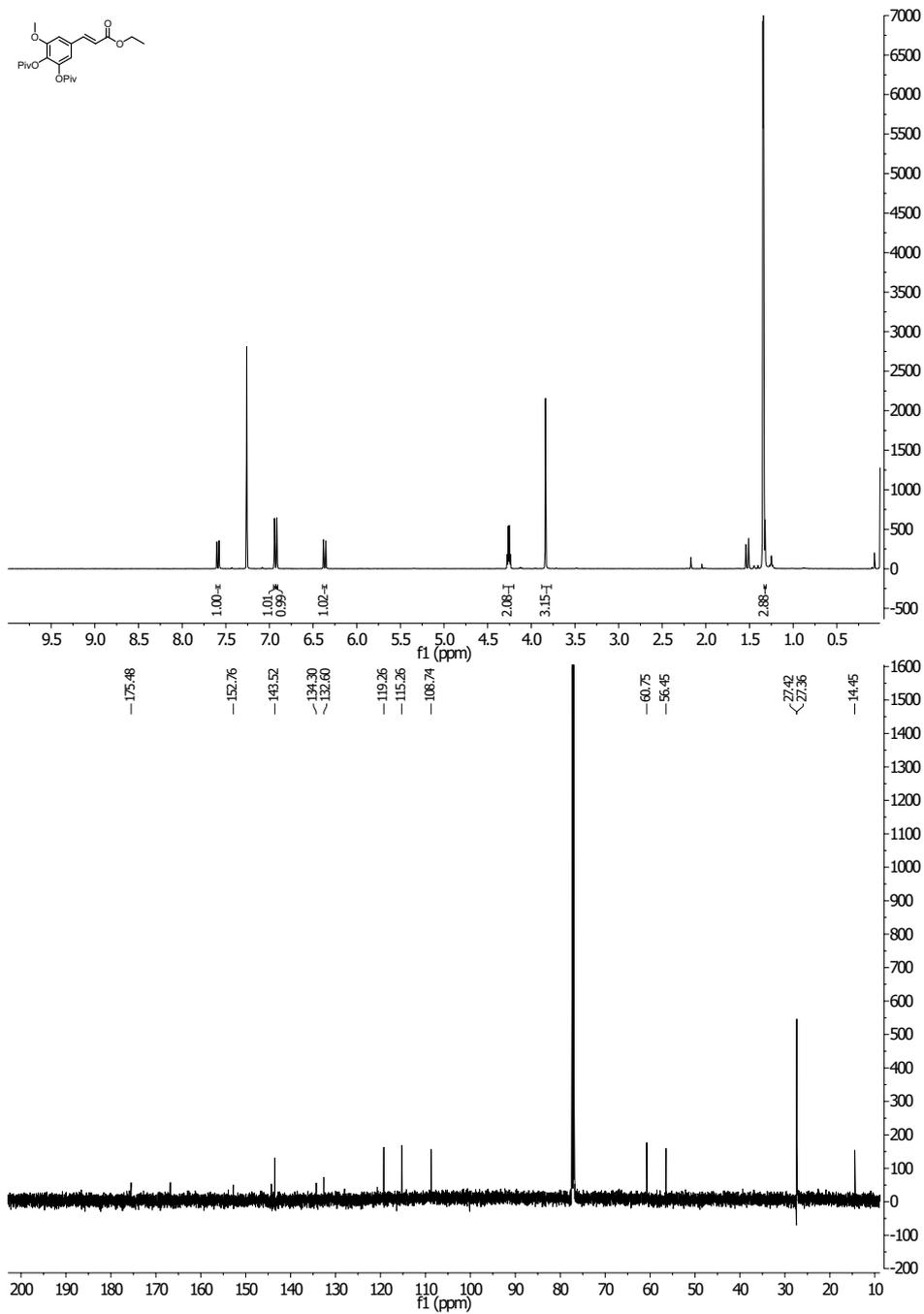
Abbildung 9.20: ^1H -NMR-Spektrum von **73** in CDCl_3 (600 MHz)Abbildung 9.21: ^1H -NMR-Spektrum von **74** in CDCl_3 (600 MHz)

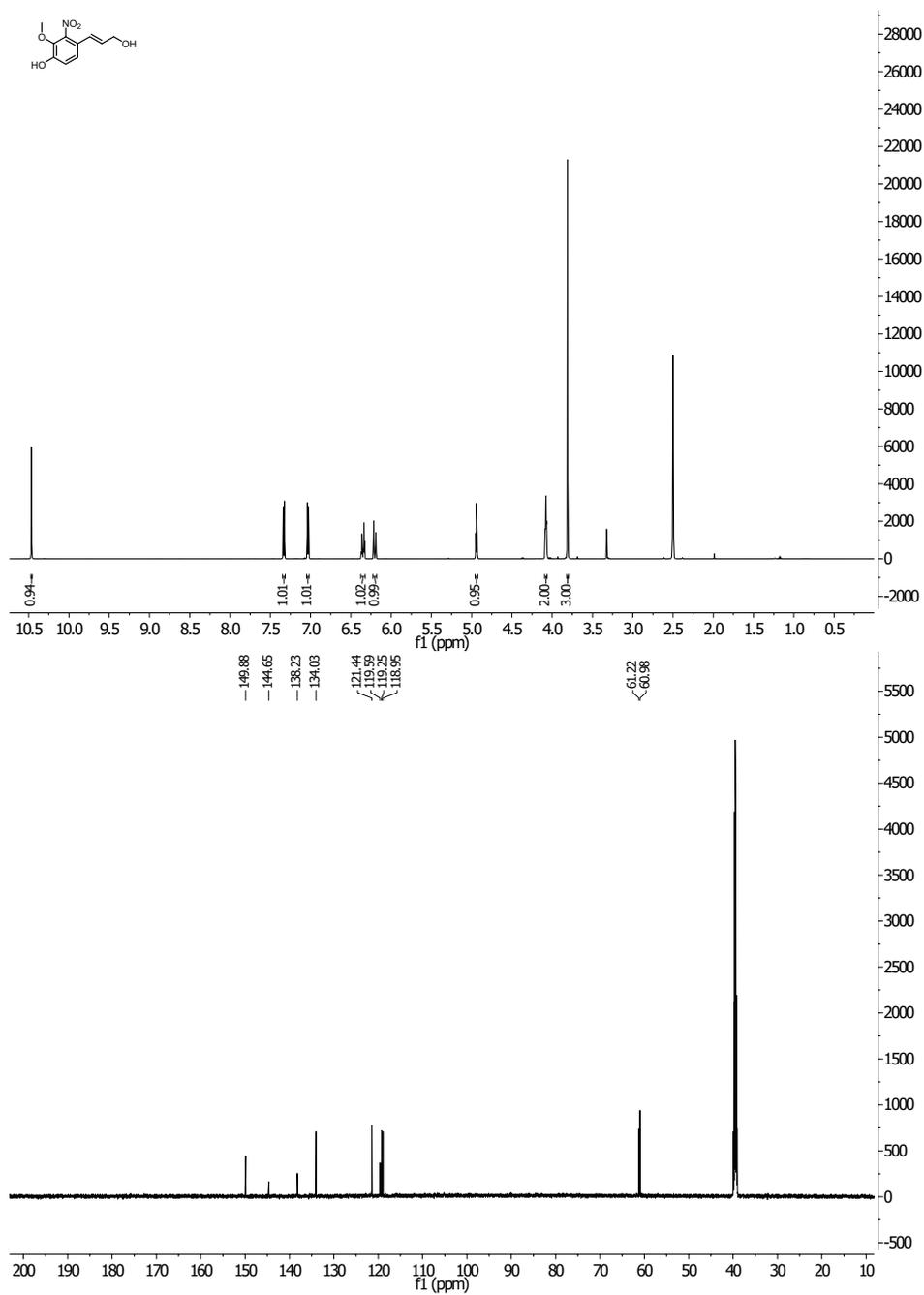
Abbildung 9.22: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **53** in CDCl_3 (600 MHz)Abbildung 9.23: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **46** in CDCl_3 (600 MHz)

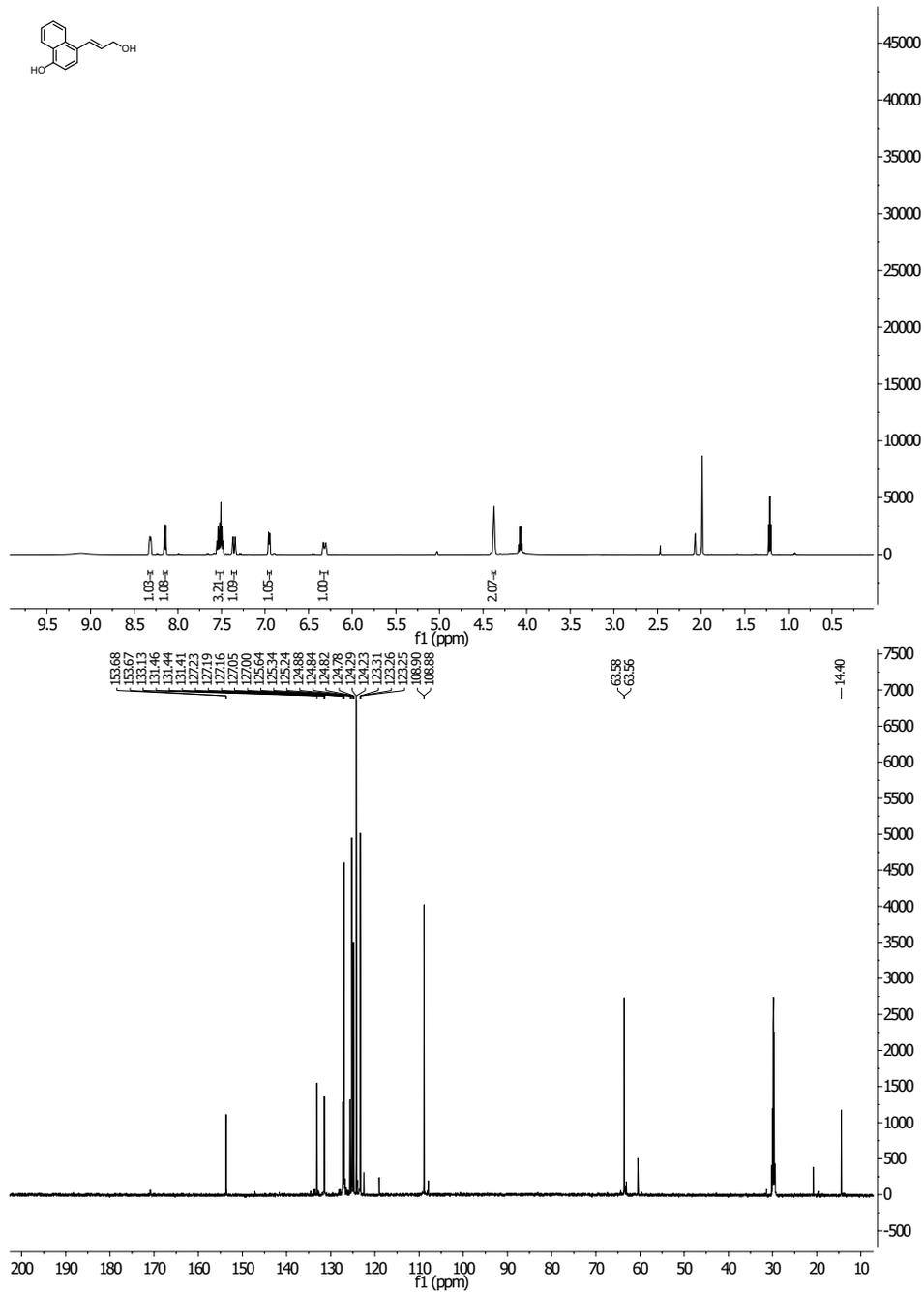
Abbildung 9.24: ¹H-NMR-Spektrum von **56** in CDCl₃ (600 MHz)

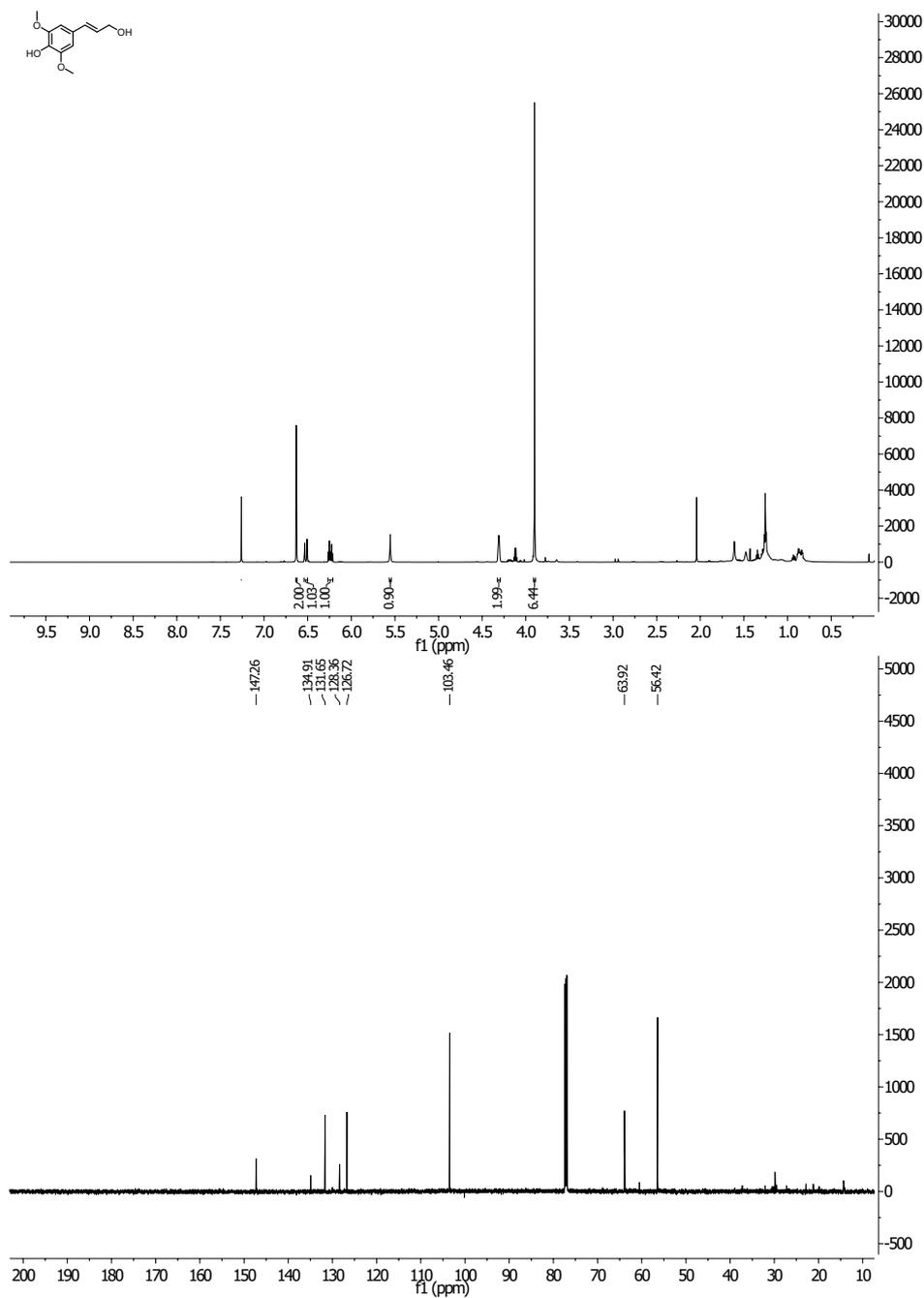
Abbildung 9.25: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **51** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz)

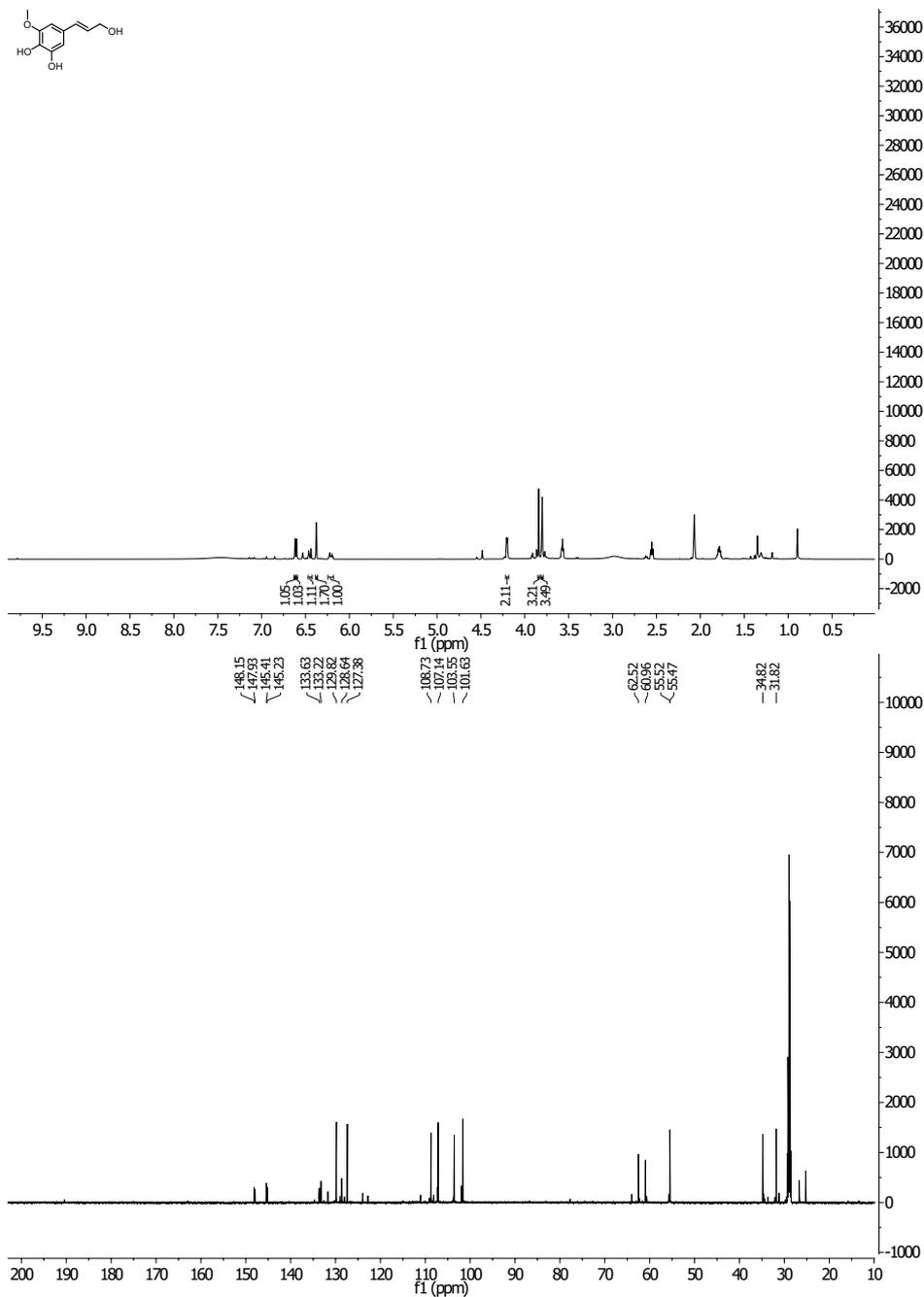
Abbildung 9.26: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **52** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)

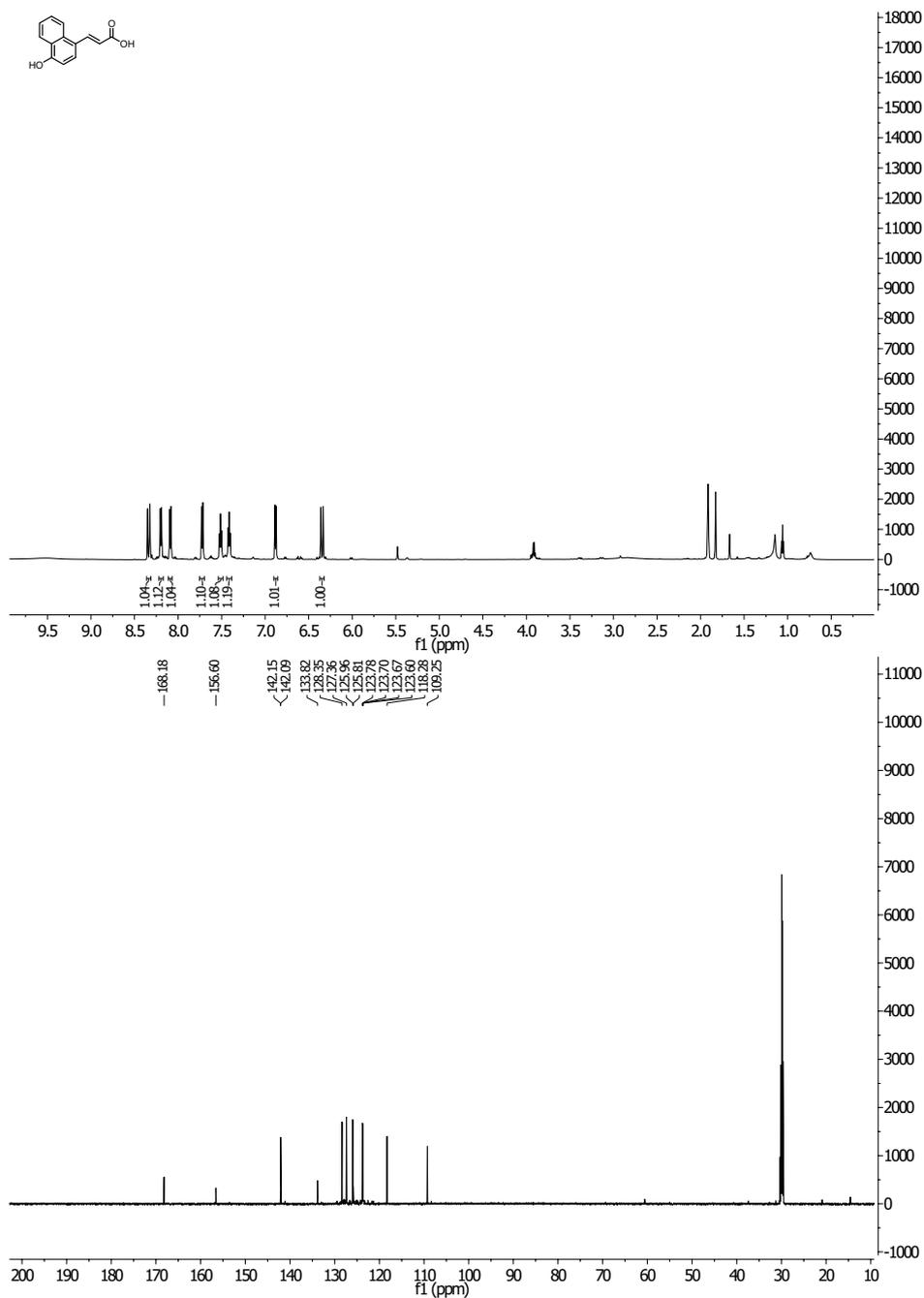
Abbildung 9.27: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **54** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz)

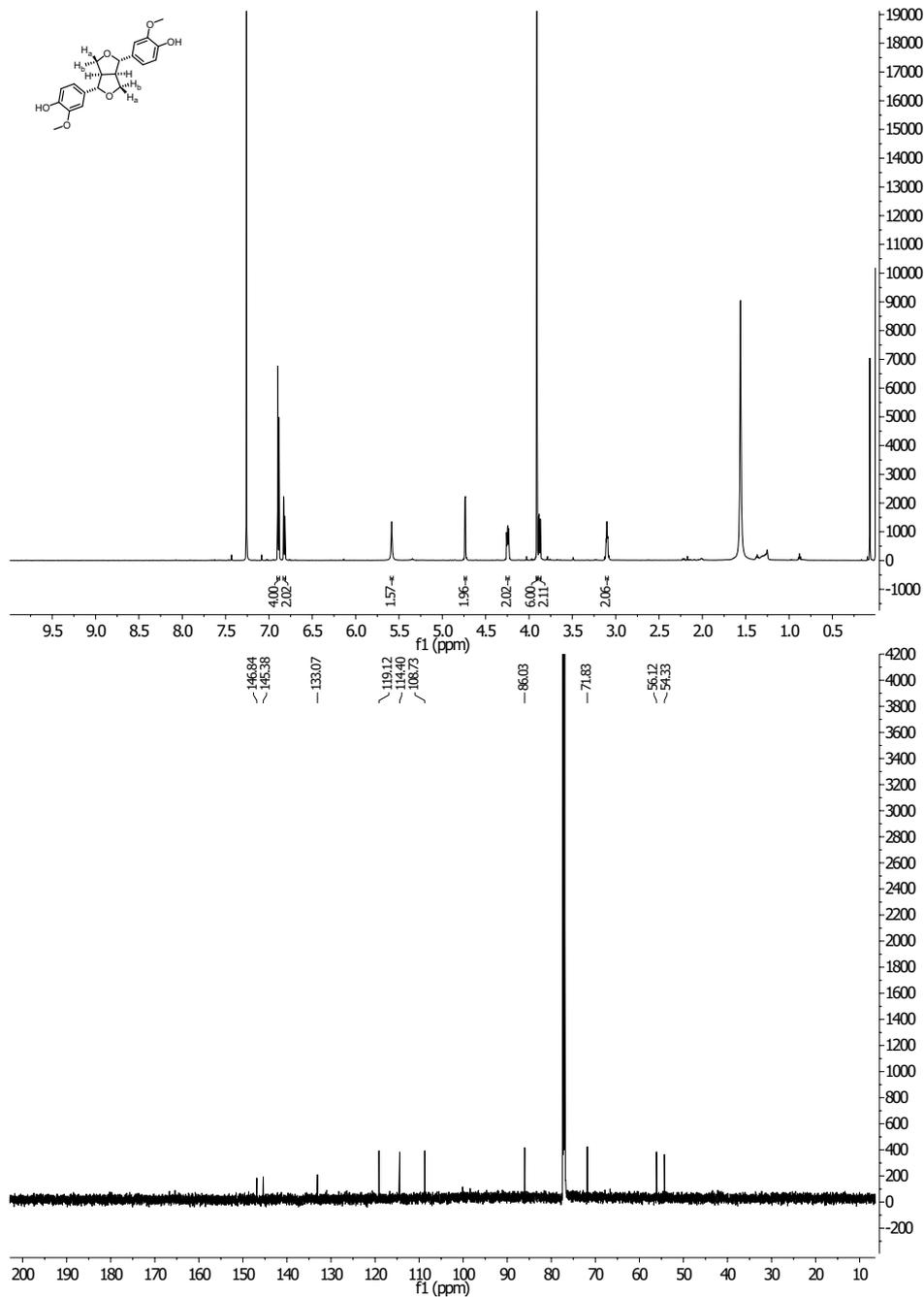
Abbildung 9.28: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **43** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)

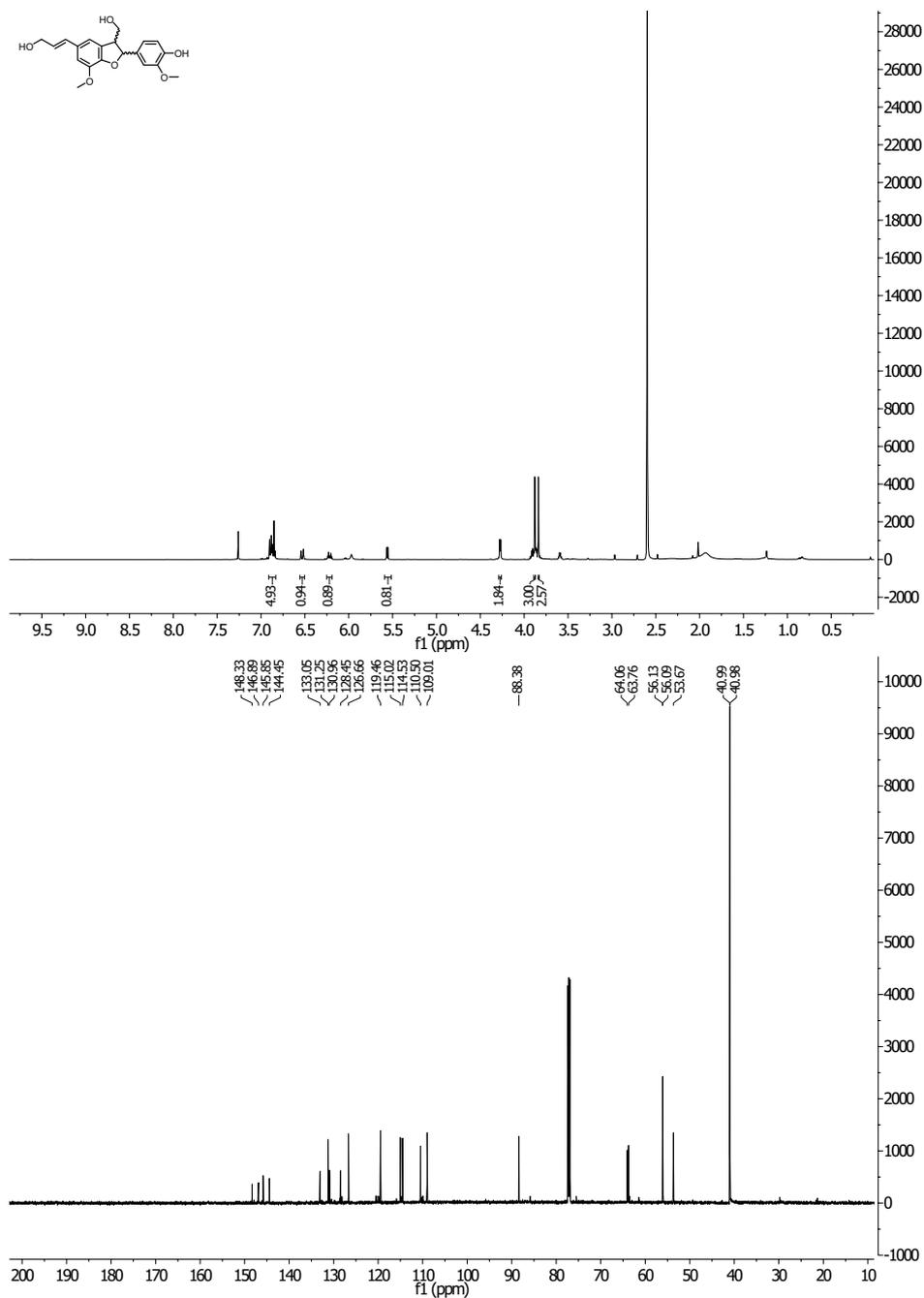
Abbildung 9.29: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **43** in Aceton-D₆ (600 MHz/151 MHz)

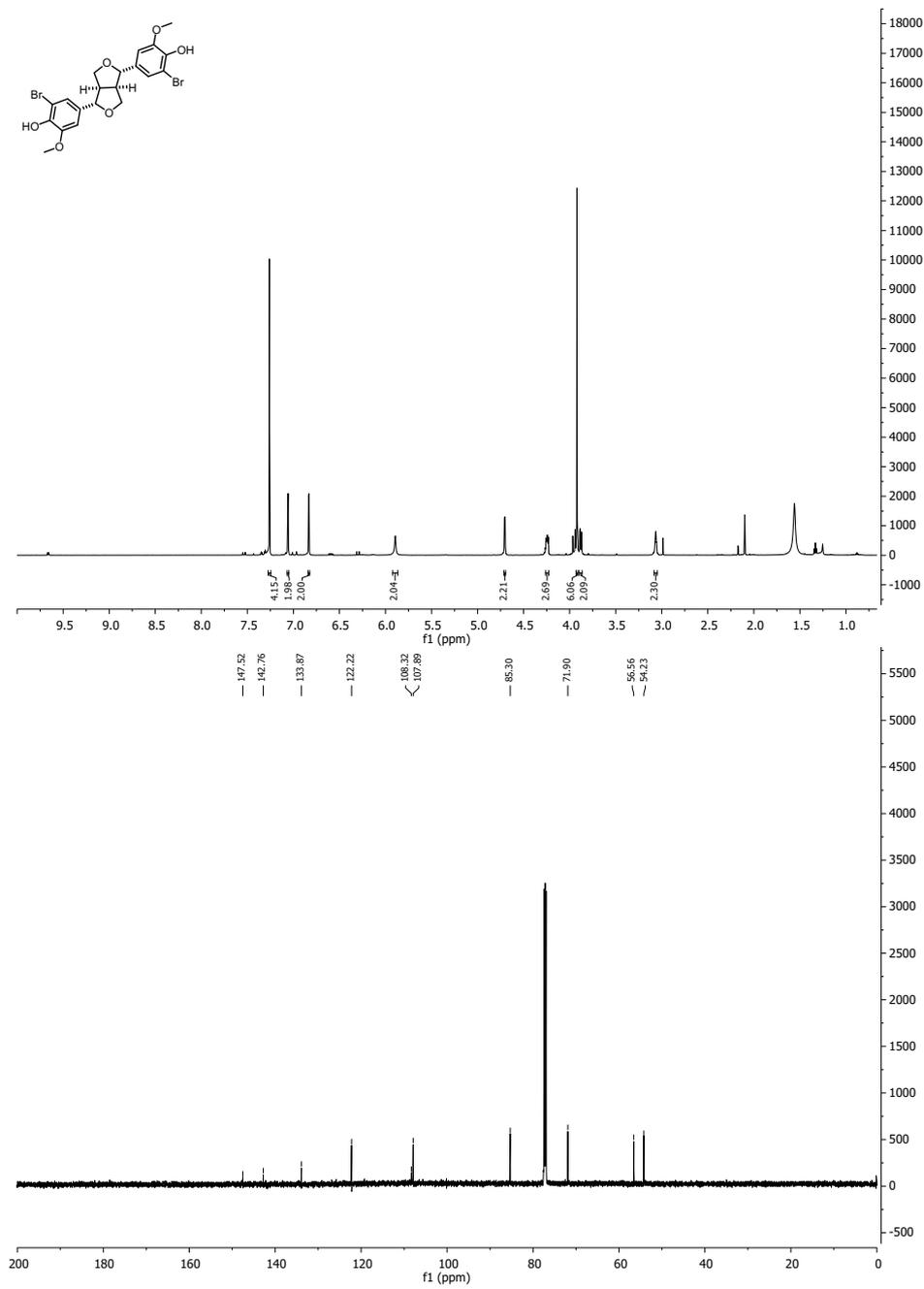
Abbildung 9.30: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **8** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)

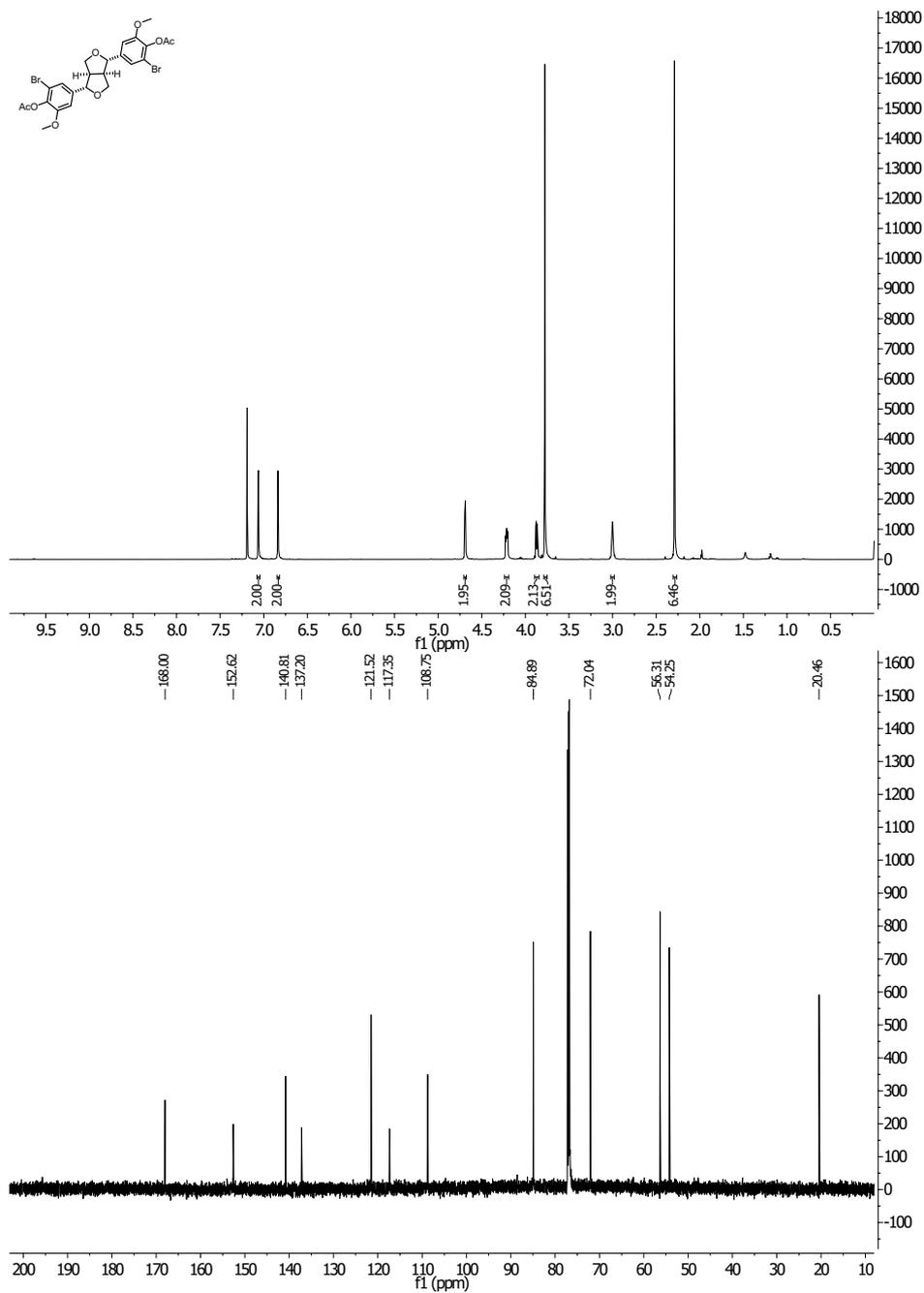
Abbildung 9.31: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **18** in Aceton-D₆ (600 MHz/151 MHz)

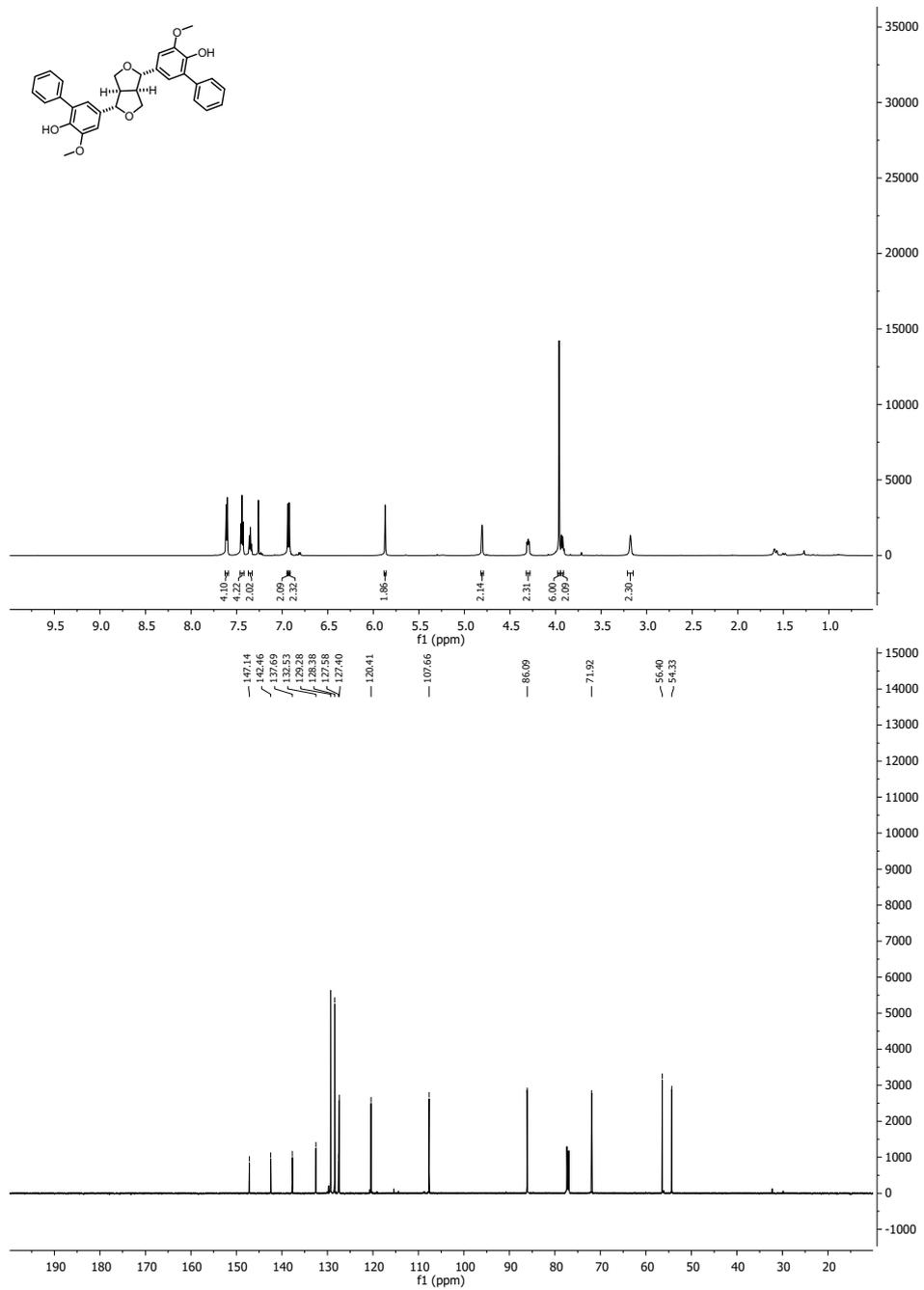
Abbildung 9.32: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von 1 in Aceton- D_6 (600 MHz/151 MHz)

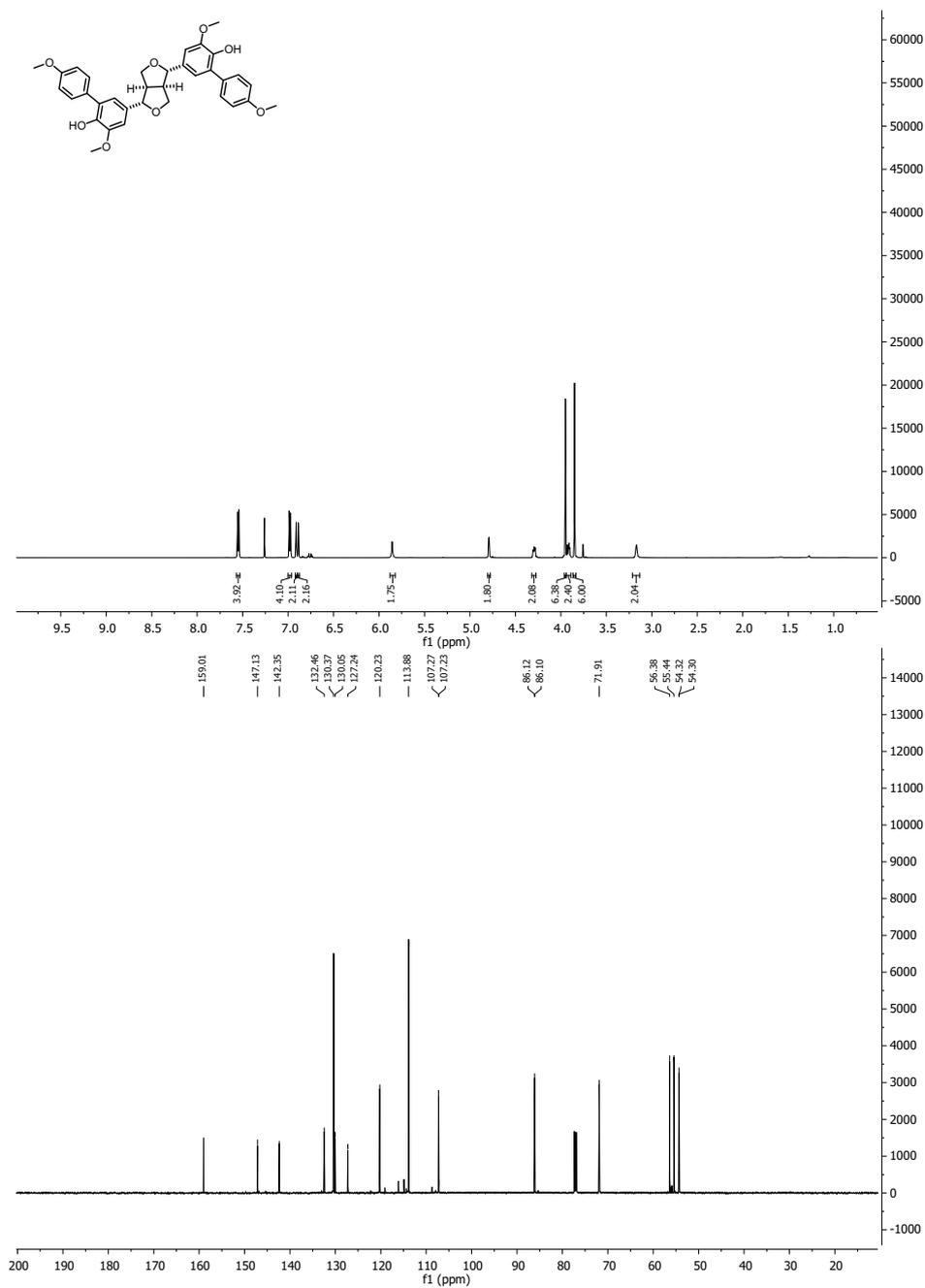
Abbildung 9.33: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **6** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)

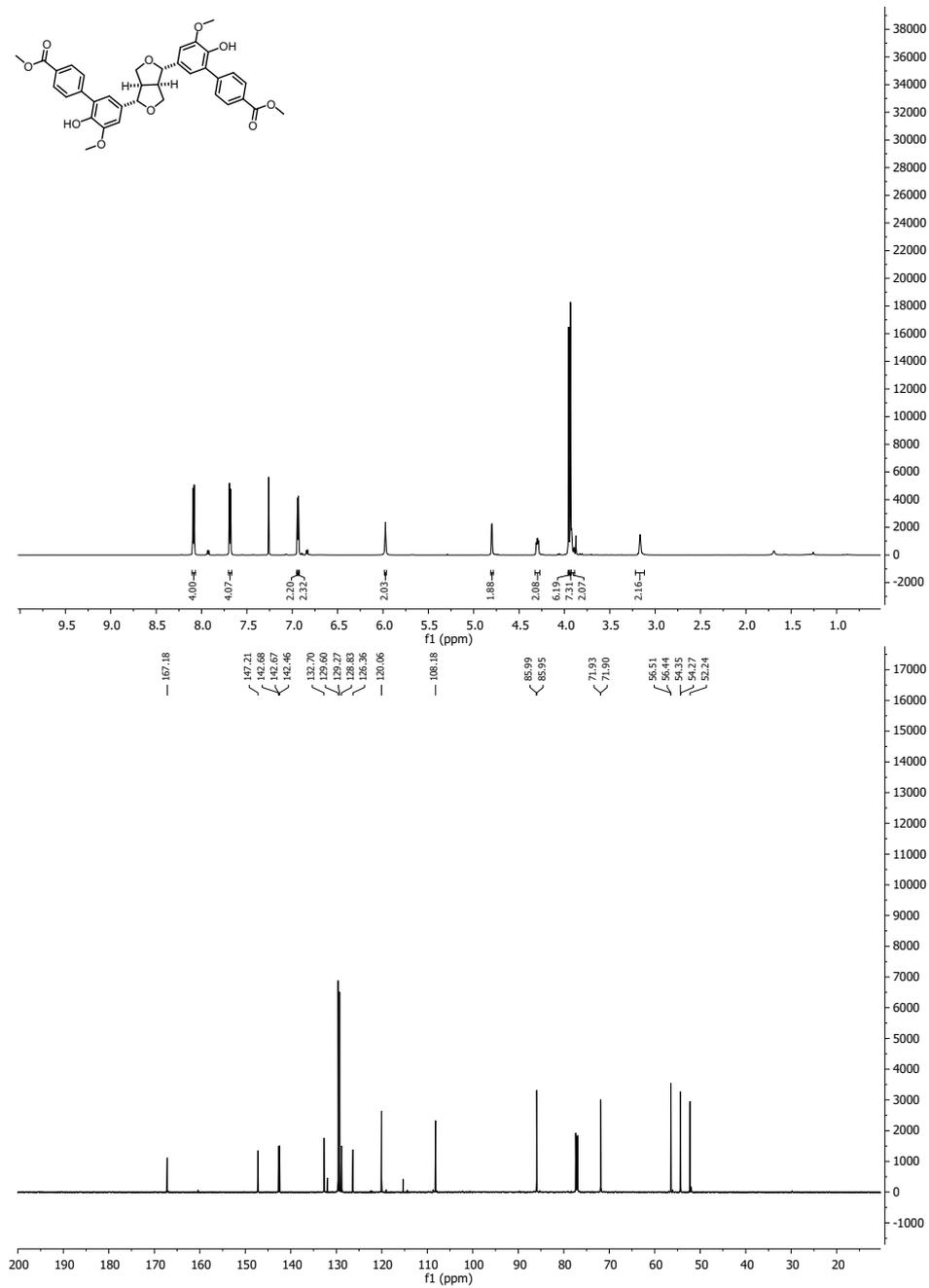
Abbildung 9.34: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **59** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)

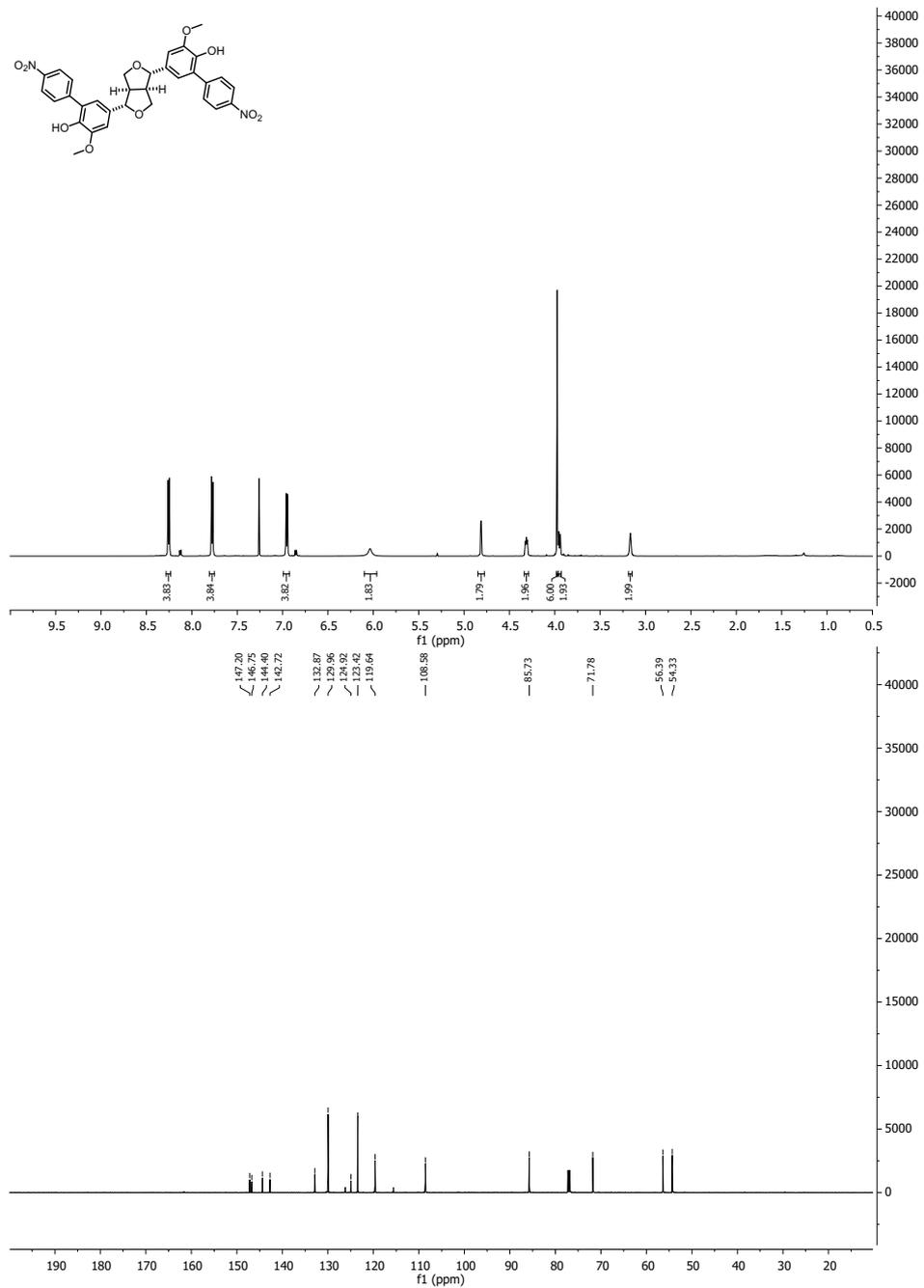
Abbildung 9.35: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **5** in Aceton-D₆ (600 MHz/151 MHz)

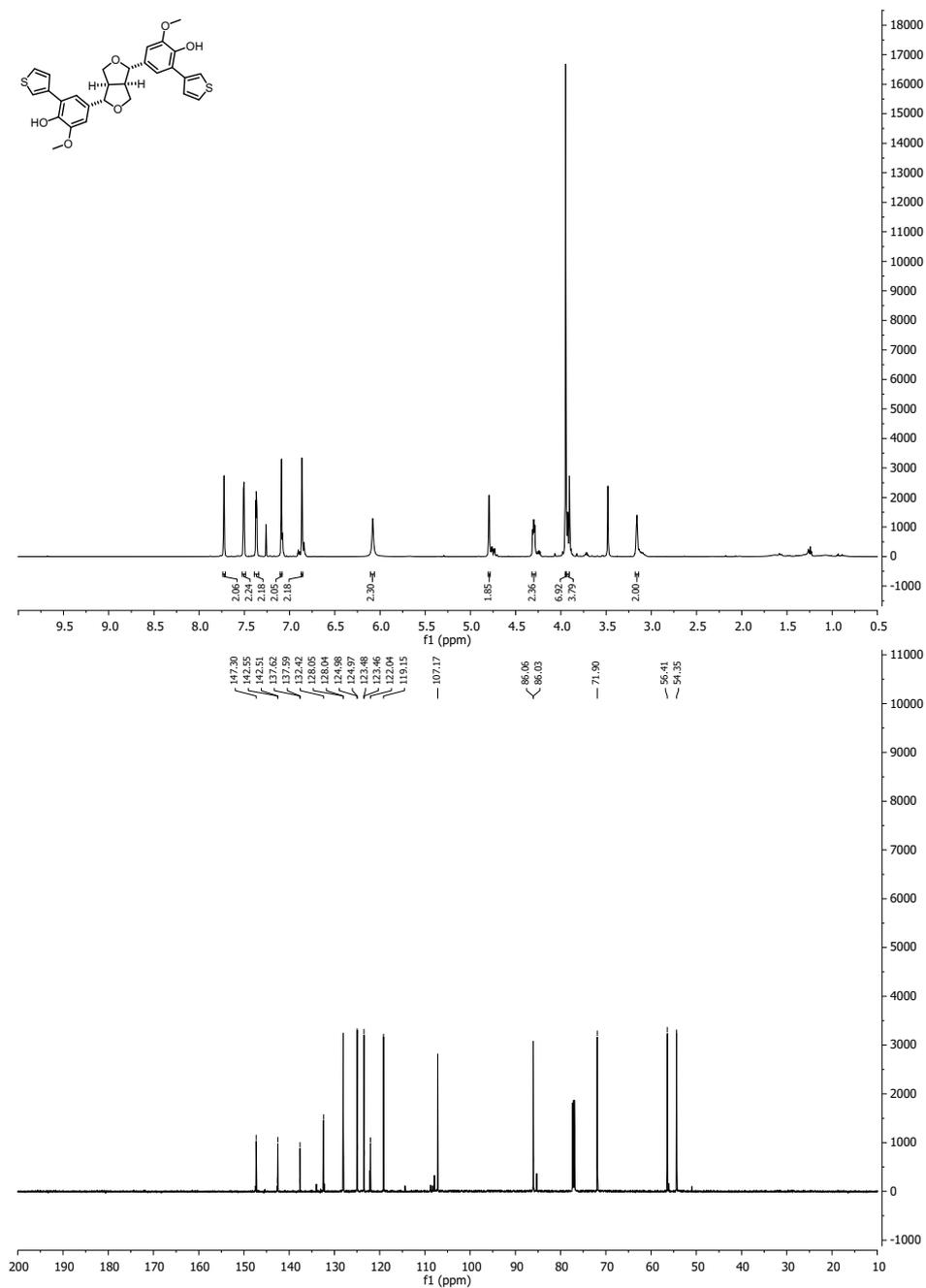
Abbildung 9.36: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **64** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)

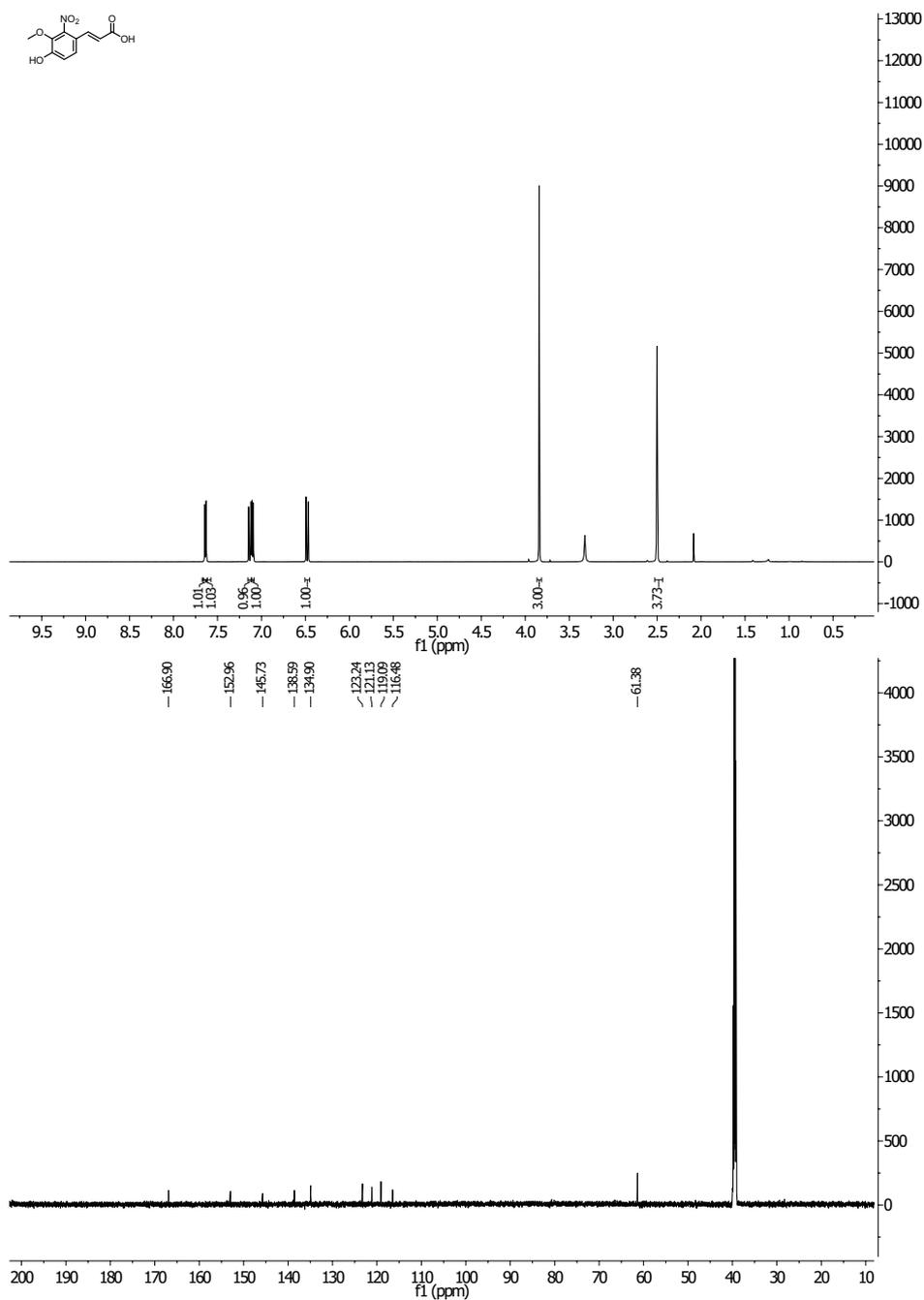
Abbildung 9.37: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **62** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)

Abbildung 9.38: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **64** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)

Abbildung 9.39: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **66** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)

Abbildung 9.40: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **65** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)

Abbildung 9.41: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **67** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz)

Abbildung 9.42: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **53** in HD₂ (600 MHz/151 MHz)

10 Formelregister

Tabelle 10.1: Formelregister

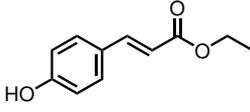
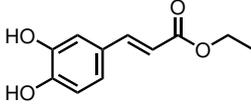
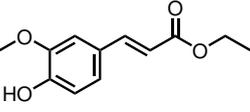
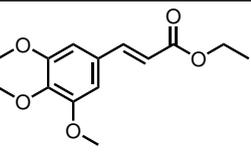
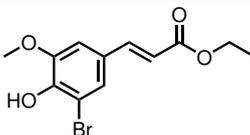
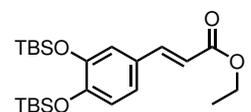
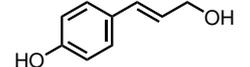
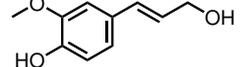
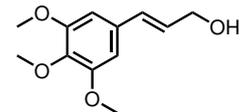
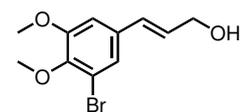
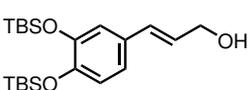
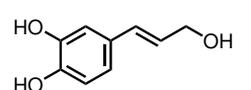
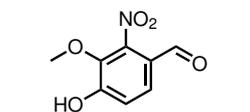
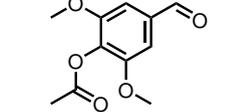
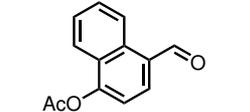
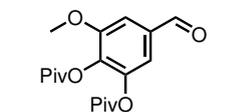
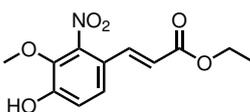
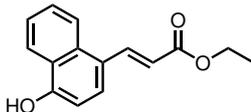
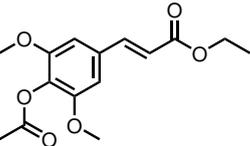
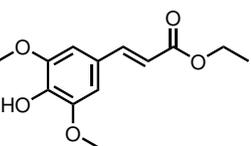
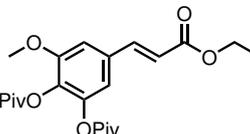
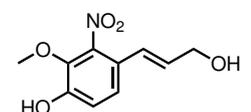
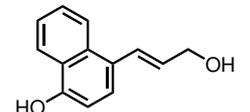
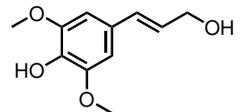
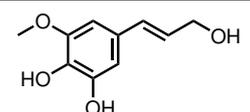
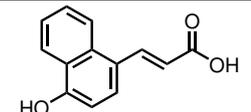
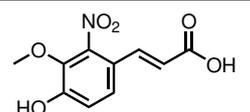
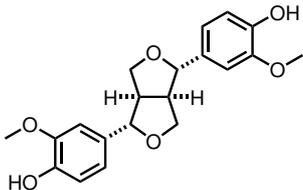
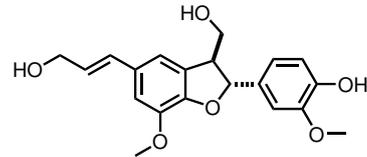
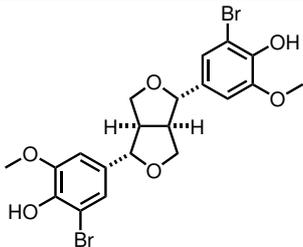
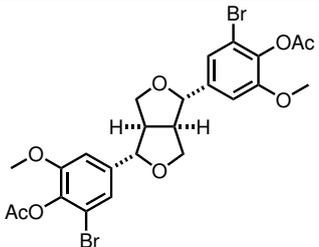
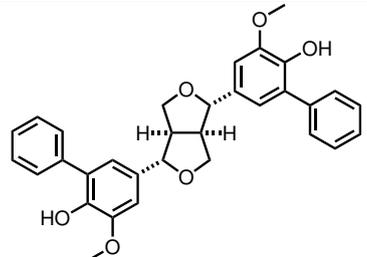
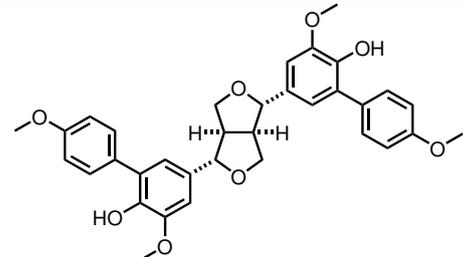
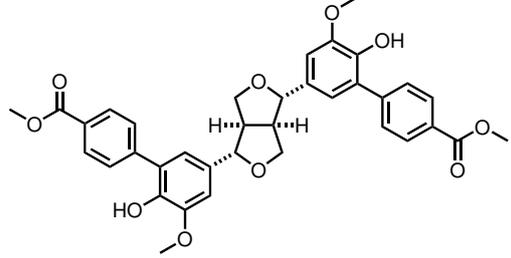
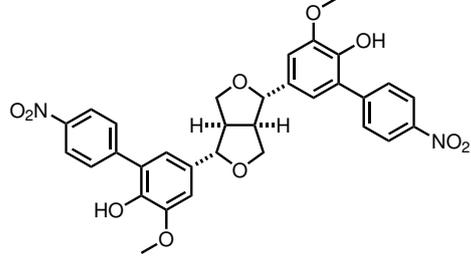
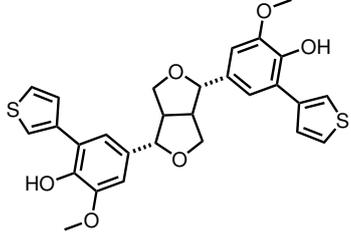
Nr	Kapitel	Nr	Kapitel	Nr	Kapitel	Nr	Kapitel
							
68	7.3.1.1	39	7.3.1.1	37	7.3.1.1	69	7.3.1.1
							
70	7.3.1.1	71	7.3.1.1	7	7.3.1.1	4	7.3.1.1
							
40	7.3.1.1	3	7.3.1.1	72	7.3.1.1	16	7.3.1.1
							
45	7.3.1.2	73	7.3.1.2	74	7.3.1.2	53	7.3.1.2
							
46	7.3.1.2	56	7.3.1.2	51	7.3.1.2	52	7.3.1.2
							
54	7.3.1.2	43	7.3.1.2	47	7.3.1.2	8	7.3.1.2
							
68	7.3.1.1	39	7.3.1.1	37	7.3.1.1	69	7.3.1.1

Tabelle 10.1: Formelregister Fortsetzung

Nr	Kapitel	Nr	Kapitel
	7.3.2.1		7.3.2.1
6	7.3.2.1	59	7.3.2.1
	7.3.2.1		7.3.2.1
5	7.3.2.1	64	7.3.2.1
	7.3.3		7.3.3
62	7.3.3	64	7.3.3
	7.3.3		7.3.3
66	7.3.3	65	7.3.3
	7.3.3		
67	7.3.3		