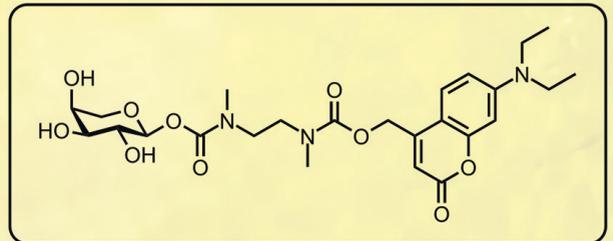
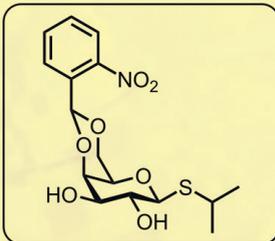


Design, Synthese und Charakterisierung neuartiger *photocaged compounds* – Optimierte Werkzeuge zur Etablierung wellenlängenselektiver Genexpression

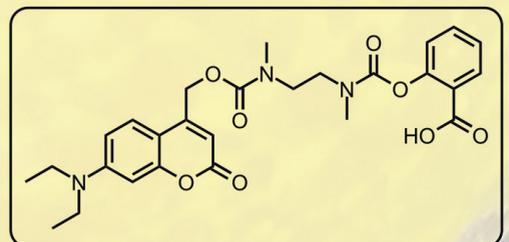
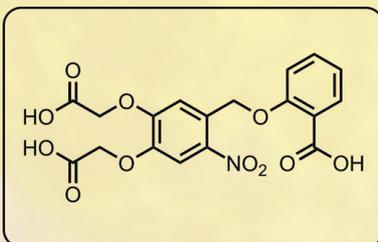
Fabian Hogenkamp



300 nm

400 nm

500 nm



Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio- und Geowissenschaften
IBOC – Bioorganische Chemie

**Design, Synthese und Charakterisierung
neuartiger *photocaged compounds* –
Optimierte Werkzeuge zur Etablierung
wellenlängenselektiver Genexpression**

Fabian Hogenkamp

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität
im Forschungszentrum Jülich

Band 44

ISBN 978-3-95806-637-3

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität
im Forschungszentrum Jülich

Band 44

Herausgegeben von Jörg Pietruszka

**Design, Synthese und Charakterisierung neuartiger
photocaged compounds –
Optimierte Werkzeuge zur Etablierung
wellenlängenselektiver Genexpression**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Fabian Hogenkamp

aus Willich

Düsseldorf, Dezember 2021

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten
sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

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

Referent: Prof. Dr. Jörg Pietruszka

Korreferent: Prof. Dr. Constantin Czekelius

Tag der mdl. Prüfung: 10.05.2022

Herausgeber: Prof. Jörg Pietruszka

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2022

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
im Forschungszentrum Jülich, Band 44

D 61 (Diss. Düsseldorf, Univ., 2022)

ISBN 978-3-95806-637-3

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funksendung, der Mikroverfilmung oder der Vervielfältigung auf anderen Wegen und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland vom 9. September 1965 in der jeweils gültigen Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtsgesetzes.

Für meine Familie und alle, die mir wichtig sind.

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Publikationen

F. Hilgers, F. Hogenkamp, N. L. Bitzenhofer, S. Thies, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka and T. Drepper, *Manuskript in Vorbereitung*; 'Wavelength-selective Control of Mono- and Di-rhamnolipid Synthesis in *Pseudomonas putida* Using Photocaged Compounds'.

F. Hilgers, F. Hogenkamp, O. Klaus, L. Kruse, A. Lappe, A. Loeschke, C. Bier, D. Binder, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka and T. Drepper, *Manuskript in Vorbereitung*; 'Photocaged Inducers for the Non-invasive Light Control of Production Processes in the Phototrophic Bacterium *Rhodobacter capsulatus*'.

F. Hogenkamp, F. Hilgers, N. L. Bitzenhofer, V. Ophoven, M. Haase, C. Bier, D. Binder, K.-E. Jaeger, T. Drepper and J. Pietruszka, *ChemBioChem* 10.1002/cbic.202100467; 'Optochemical Control of Bacterial Gene Expression – Novel Photocaged Compounds for Different Promoter Systems'.^[1]

A. Burmeister, Q. Akhtar, L. Hollmann, N. Tenhaef, F. Hilgers, F. Hogenkamp, S. Sokolowsky, J. Marienhagen, S. Noack, D. Kohlheyer, A. Grünberger, *ACS Synth. Biol.* **2021**, *10* (6), 1308–1319; '(Optochemical) Control of Synthetic Microbial Coculture Interactions on a Microcolony Level'.^[2]

F. Hogenkamp, F. Hilgers, A. Knapp, O. Klaus, C. Bier, D. Binder, K.-E. Jaeger, T. Drepper, J. Pietruszka, *ChemBioChem* **2021**, *22*, 539–547; 'Effect of Photocaged Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside Solubility on Light-Responsiveness of LacI-controlled Expression Systems in Different Bacteria'.^[3]

Publikationen (nicht in dieser Arbeit behandelt)

A. V. Fejzagić, S. Myllek, F. Hogenkamp, J. Greb, J. Pietruszka, T. Classen, *ChemistryOpen* **2020**, *9*, 959–966; 'A Fluorescence-Based Assay System for the Determination of Haloperoxidase-Activity Using a Two-Dimensional Calibration Approach'.^[4]

B. Mechsner, D. Böse, F. Hogenkamp, N. Ledermann, R. Hartmann, K. Bochinsky, W. Frey, J. Pietruszka, *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 2991–2997; 'Enantioselective Total Synthesis of Altersolanol A and N'.^[5]

Konferenztteilnahmen & Vorträge

CLIB Online Forum Event: “Biotechnology appeals to all senses”, 10.12.2020, (Deutschland); F. Hilgers, F. Hogenkamp, A. Loeschcke, J. Pietruszka, K.-E. Jaeger, T. Drepper; 'Lights on and action – New photobiotechnological approaches for the production of terpenes'. (Vortrag)

German Conference on Synthetic Biology (GCSB), 12.–13.09.2019, Aachen (Deutschland); F. Hilgers, N. Bitzenhofer, Y. Ackermann, D. Binder, A. Burmeister, A. Grünberger, A. Loeschcke, F. Hogenkamp, J. Pietruszka, K.-E. Jaeger, T. Drepper; 'Lights on and action – optogenetic control of biosynthetic pathways'. (Poster)

27th ISHC International Society of Heterocyclic Chemistry Congress, 01.–06.09.2019, Kyoto (Japan); F. Hogenkamp, C. Bier, F. Hilgers, D. Binder, D. Drobiez, A. Loeschcke, T. Drepper, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka; 'Heterocyclic Photocages for Carbohydrates'. (Kurzvortrag and Poster)

21st ESOC European Symposium on Organic Chemistry 14.–18.07.2019, Wien (Österreich); F. Hogenkamp, C. Bier, F. Hilgers, D. Binder, D. Drobiez, A. Loeschcke, T. Drepper, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka; 'Synthesis of Photocaged Compounds'. (Poster)

14th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations (Biotrans), 07.–11.07.2019, Groningen (Niederlande); A. V. Fejzagić, S. Myllek, J. Greb, F. Hogenkamp, T. Classen; 'Haloperoxidases - Invention of an activity assay'. (Poster)

Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), 17.–20.03.2019, Mainz (Deutschland); O. Klaus, A. Lappe, F. Hilgers, F. Hogenkamp, A. Loeschcke, J. Pietruszka, K.-E. Jaeger, T. Drepper (2019): 'Photocaged IPTG derivatives for light-controlled gene expression in *Rhodobacter capsulatus*'. (Poster)

Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), 17.–20.03.2019, Mainz (Deutschland); F. Hilgers, F. Hogenkamp, D. Binder, A. Loeschcke, J. Pietruszka, K.-E. Jaeger, T. Drepper; '(Opto)genetic control of microbial cell factories for an efficient biosynthesis of valuable secondary metabolites'. (Poster)

3. BioSC Symposium, 12.–13.11.2018, Bonn (Deutschland); F. Hilgers, F. Hogenkamp, D. Binder, A. Loeschcke, J. Pietruszka, K.-E. Jaeger, T. Drepper; '(Opto)genetic control of microbial cell factories for an efficient biosynthesis of valuable secondary metabolites'. (Poster)

Aachen Protein Engineering Symposium (AcES), 07.–10.10.2018, Aachen (Deutschland); F. Hilgers, F. Hogenkamp, D. Binder, A. Loeschcke, J. Pietruszka, K.-E. Jaeger, T. Drepper; 'Optogenetics – light controlled biosynthesis of structurally diverse secondary metabolites'. (Poster)

27th PhotoIUPAC International Symposium on Photochemistry 08.–13.07.2018, Dublin (Irland); F. Hogenkamp, C. Bier, F. Hilgers, D. Binder, D. Drobiez, A. Loeschke, T. Drepper, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka; 'Synthesis of Photocaged Carbohydrates and their Biotechnological Applications'. (Poster)

69. Mosbacher Kolloquium – "Synthetic Biology – from Understanding to Application", 22.–24.03.2018, Mosbach (Deutschland); F. Hilgers, F. Hogenkamp, D. Binder, A. Loeschke, J. Pietruszka, K.-E. Jaeger, T. Drepper; '(Opto)genetic control of microbial cell factories for an efficient production of valuable secondary metabolites'. (Poster)

CECP Central European Conference on Photochemistry 04.–08.02.2018, Bad Hofgastein (Österreich); F. Hogenkamp, C. Bier, F. Hilgers, D. Binder, D. Drobiez, A. Loeschke, T. Drepper, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka; 'Photocaged Carbohydrates: An Optogenetic Toolbox for Biotechnological Applications'. (Poster)

2. BioSC Symposium, 28.11.2017, Köln (Deutschland); F. Hilgers, F. Hogenkamp, A. Loeschke, J. Pietruszka, K.-E. Jaeger, T. Drepper; 'Molecular and optogenetic tools for efficient biosynthesis of structurally diverse secondary metabolites'. (Poster)

Annual Congress Biotechnology 2020+, 04.10.2017, Jülich (Deutschland); F. Hilgers, F. Hogenkamp, A. Loeschke, J. Pietruszka, K.-E. Jaeger, T. Drepper; 'Molecular and optogenetic tools for efficient biosynthesis of structurally diverse secondary metabolites'. (Poster)

26th ISHC International Society of Heterocyclic Chemistry Congress, 03.–08.09.2017, Regensburg (Deutschland); F. Hogenkamp, P. Kusen, M. Holz, S. Meyer zu Berstenhorst, J. Pietruszka; 'Orthogonal two wavelength regulation by coumarinylmethyl caging groups'. (Poster)

Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), 15.–18.04.2017, Wolfsburg (Deutschland); F. Hilgers, F. Hogenkamp, D. Binder, A. Loeschke, J. Pietruszka, K.-E. Jaeger, T. Drepper; 'Molecular and optogenetic tools for efficient biosynthesis of structurally diverse secondary metabolites'. (Poster)

Abschluss- und Praktikumsarbeiten

Die vorliegende Arbeit enthält Ergebnisse der Abschluss- und Praktikumsarbeiten der folgenden Personen:

M. Sc. Fabian Hogenkamp (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Masterarbeit), **2016**; „Studien zur Beeinflussung der Hydrophilie von photolabilen Schutzgruppen“.

B. Sc. Sven Mörsel (Fachhochschule Aachen – University of Applied Sciences, Bachelorarbeit), **2017**; „Synthese verschiedener Cumarine zur Anwendung als photolabile Schutzgruppe“.

B. Sc. Mona Haase (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Bachelorarbeit), **2018**; „Synthese einer 2*H*-Chromen-2-thion-Schutzgruppe: Auf dem Weg zu neuen Werkzeugen für die lichtregulierte Genexpression“.^[6]

Die entsprechenden Arbeiten wurden unter der Weisung des Autors durchgeführt und im Text kenntlich gemacht.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Kurzzusammenfassung	1
Abstract	2
1 Einleitung	3
2 Zielsetzung	5
3 Kenntnisstand	7
3.1 Photocaged compounds.....	7
3.1.1 Grundlegende Funktionsweise	7
3.1.2 Photolabile Schutzgruppen.....	9
3.1.2.1 <i>ortho</i> -Nitrobenzyl-Derivate	10
3.1.2.2 (Cumarin-4-yl)methyl-Derivate	21
3.1.2.3 Trimethyl-Lock-Derivate	31
3.2 Orthogonale und wellenlängenselektive Anregungssysteme	35
3.2.1 Grundlagen	35
3.2.2 Wegbereitende Experimente	37
3.2.3 Anwendungsbeispiele.....	39
3.3 Lichtgesteuerte Genexpression.....	44
3.3.1 In Eukaryoten.....	45
3.3.2 In Bakterien.....	47
4 Ergebnisse und Diskussion	50
4.1 Herstellung photolabiler Schutzgruppen.....	51
4.1.1 Synthese von <i>o</i> -Nitrobenzyl-Chromophoren	51
4.1.1.1 Kommerziell erhältliche und vorrätige <i>o</i> -Nitrobenzyl-Derivate	52
4.1.1.2 <i>o</i> -Nitrobenzyl-Derivate mit erhöhter Löslichkeit und Membrangängigkeit	54
4.1.1.3 <i>o</i> -Nitrobenzyl-Derivate mit erhöhtem sterischem Anspruch	55
4.1.2 Synthese von (Cumarin-4-yl)methyl-Chromophoren.....	58
4.1.2.1 Kupplungsmöglichkeiten	59
4.1.2.2 Gerüstmodifikationen	61
4.1.3 Synthese der Trimethyllock-Schutzgruppe.....	65
4.1.4 Zusammenfassung des Kapitels	68
4.2 Betrachtung der Induktoren	69
4.3 Herstellung der <i>photocaged compounds</i>	71
4.3.1 <i>Photocaged</i> Kohlenhydrate	71
4.3.1.1 Komposition des Grundstockes für eine Anregung im langwelligen UV-Bereich	71
4.3.1.2 Erste Generation von bathochrom verschobenen <i>photocaged</i> Kohlenhydraten – Ether und Acetale.....	84

4.3.1.3	Zweite Generation von bathochrom verschobenen <i>photocaged</i> Kohlenhydraten – Kohlendisäureester	96
4.3.1.4	Dritte Generation von bathochrom verschobenen <i>photocaged</i> Kohlenhydraten – Ester und Carbamate	112
4.3.2	Herstellung der <i>photocaged</i> Propionsäuren	126
4.3.2.1	Synthese	126
4.3.2.2	<i>In vitro</i> Charakterisierung	127
4.3.2.3	<i>In vivo</i> Applikation	129
4.3.2.4	Zusammenfassung des Kapitels	129
4.3.3	Herstellung der <i>photocaged</i> Benzoesäure-Derivate	130
4.3.3.1	Erste Generation	130
4.3.3.2	Zweite Generation	138
4.3.3.3	Zusammenfassung des Kapitels	146
4.4	Werkzeugkasten für wellenlängenselektive Genexpression	147
5	Zusammenfassung und Ausblick	152
5.1	Photolabile Schutzgruppen	152
5.2	<i>Photocaged</i> Kohlenhydrate	155
5.3	<i>Photocaged</i> Propionsäuren	161
5.4	<i>Photocaged</i> Benzoesäure-Derivate	163
5.5	Werkzeugkasten für wellenlängenselektive Genexpression	165
6	Experimenteller Teil	171
6.1	Material und Methoden	171
6.2	Charakterisierung der Bestrahlungsquellen	175
6.2.1	Messung mittels Powermeter	175
6.2.2	Messung mittels chemischer Aktinometrie ^[385-388]	177
6.2.2.1	<i>Hatchard–Parker</i> -Aktinometer	177
6.2.2.2	Synthese von Kaliumtrioxalatoferrat(III)-Trihydrat (228)	178
6.2.2.3	Bestimmung der Reinheit	178
6.2.2.4	Voraussetzungen	179
6.2.2.5	Durchführung	179
6.2.2.6	Berechnung	182
6.3	Charakterisierung der <i>photocaged compounds</i>	186
6.3.1	Absorptionsmessung	186
6.3.2	Löslichkeitsmessung	186
6.3.3	Zerfallsmessung	187
6.3.4	Bestimmung der Halbwertszeit und der Quantenausbeute mittels HPLC-Analytik	187
6.4	Synthesevorschriften zur Darstellung der <i>o</i>-Nitrobenzyl-Derivate	189
6.5	Synthesevorschriften zur Darstellung der (Cumarin-4-yl)methyl-Derivate	198
6.6	Synthesevorschriften zur Darstellung der Trimethyl-Lock-Derivate	215
6.7	Synthesevorschriften zur Darstellung der Kohlenhydrate	220
6.8	Synthesevorschriften zur Darstellung der <i>photocaged</i> Kohlenhydrate	241
6.9	Synthesevorschriften zur Darstellung der <i>photocaged</i> Propionsäuren	273
6.10	Synthesevorschriften zur Darstellung der <i>photocaged</i> Benzoesäure-Derivate	277

7	Anhänge.....	296
7.1	Absorptionsspektren	296
7.2	Zerfallskurven	302
7.3	NMR-Spektren	307
8	Literaturverzeichnis	424
9	Formelregister	443
10	Eigenanteile an den veröffentlichten Publikationen dieser Arbeit	452
11	Erklärung	454
12	Danksagung.....	455

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen

+M-Effekt	Positiver mesomerer Effekt	ESI	Elektrosprayionisation
Äq.	molares Äquivalent	EtOAc	Essigsäureethylester
ATP	Adenosintriphosphat	EWG	<i>electron withdrawing group</i>
ATR	<i>attenuated total reflection</i>	ges.	gesättigt
BC	4,5-Bis(carboxymethoxy)-2-nitrobenzyl	HEK	<i>human embryonic kidney cell</i>
BEC	4,5-Bis(ethoxycarbonyl-methoxy)-2-nitrobenzyl	HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
BECPh	1-[4,5-Bis(ethoxycarbonyl-methoxy)-2-nitrophenyl]phenyl	HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
ber.	berechnet	HRMS	<i>high-resolution mass spectrometry</i>
BODIPY	4,4-Difluor-4-bor-3a,4a-diaza-s-indazen	HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary cell</i>	IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>	IR	Infrarotspektroskopie
CSA	Camphersulfonsäure	IUPAC	<i>International Union for pure and applied Chemistry</i>
DBTL	Dibutylzinndilaurat	konz.	konzentriert
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en	KP _i	Kaliumphosphatpuffer
DC	Dünnschichtchromatographie	LC	<i>liquid chromatography</i>
DCC	<i>N,N</i> -Dicyclohexylcarbodiimid	LG	<i>leaving group</i>
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>	Lit.	Literatur
dest.	destilliert	<i>m</i>	<i>meta</i>
DIPEA	Diisopropylethylamin	MEF	<i>mouse embryo fibroblast</i>
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin	MHK	Minimale Hemm-Konzentration
DMF	Dimethylformamid	MPLC	<i>medium pressure liquid chromatography</i>
DMF-	Dimethylformamid-	MS	Massenspektrometrie
DMA	dimethylacetal	NaP _i	Natriumphosphatpuffer
DMP	<i>Dess–Martin</i> -Periodinan	NB	<i>ortho</i> -Nitrobenzyl
DMSO	Dimethylsulfoxid	NBE	1-(6-Nitrobenzo[<i>d</i>][1,3]dioxol-5-yl)ethyl
EDCI	1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid	NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
EM	Effektormolekül		

NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>	Organismen	
NP	6-Nitropiperonyl	<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Nu	Nukleophil	<i>C. antarctica</i>	<i>Candida antarctica</i>
<i>o</i>	<i>ortho</i>	<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
OD	Optische Dichte	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>p</i>	<i>para</i>	<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas Putida</i>
<i>p</i> -TSA	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure	<i>R. capsulatus</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
PE	Petrolether	<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
PMB	<i>para</i> -Methoxybenzyl		
PPG	<i>photolabile protecting group</i>		
ppm	<i>parts per million</i>		
PPTS	Pyridinium		
	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure		
rpm	<i>revolutions per minute</i>		
RP-HPLC	<i>reversed-phase high performance liquid chromatography</i>		
RT	Raumtemperatur		
TBAB	Tetrabutylammoniumbromid		
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid		
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl		
TFA	Trifluoressigsäure		
THF	Tetrahydrofuran		
TML	Trimethyllock		
t_R	Retentionszeit		
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol		

Kurzzusammenfassung

Photocaged compounds sind optochemische Werkzeuge, welche die lichtgesteuerte Freisetzung von biologischen Effektormolekülen mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung ermöglichen. Licht gewährleistet dabei als orthogonaler, externer und einfach regulierbarer Stimulus eine nicht-invasive Steuerung von biologischen Prozessen, wie der Genexpression. Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung und *in vitro* Charakterisierung von neuartigen photolabil-geschützten Induktoren, welche eine simultane, wellenlängenselektive Kontrolle über mehrere, biotechnologisch relevante Promotoren ermöglichen sollen.

Der Fokus lag zunächst auf der Synthese von *photocaged compounds*, welche verbesserte Eigenschaften für die Anwendung in mikrobiellen Organismen aufweisen sollten. Induktoren aus den Molekülklassen der Kohlenhydrate sowie der aliphatischen und der aromatischen Carbonsäuren (Propionsäure bzw. Benzoesäure-Derivate) konnten mit einer photolabilen Schutzgruppe versehen und in einem iterativen Prozess optimiert werden. Bei den photoabspaltbaren Schutzgruppen handelte es sich entweder um Vertreter der *o*-Nitrobenzyl-, (Cumarin-4-yl)methyl- oder Trimethyllock-Chromophore. Die mit *o*-Nitrobenzyl-Derivaten versehenen Induktoren wurden im Hinblick auf eine Belichtung bei 375 nm konzipiert, wohingegen die (Cumarin-4-yl)methyl- und Trimethyllock-geschützten Effektormoleküle für eine Anregung oberhalb von 400 nm entworfen wurden. So konnten erfolgreich eine diverse Bibliothek, bestehend aus 30 photolabil-geschützten Effektormolekülen, dargestellt und ihre relevanten Parameter für eine *in vivo* Anwendung wie Quantenausbeute sowie Löslichkeit und Stabilität in wässrigen Medien bestimmt werden.

Durch eine Kooperation mit M. Sc. *Fabienne Hilgers* (Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) wurde die *in vivo* Anwendbarkeit der synthetisierten *photocaged* Induktoren in Gram-negativen sowie Gram-positiven Bakterien demonstriert. Dabei wurden verschiedene Regulator/Promotor-Systeme unter Verwendung von *photocaged* Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid-, Arabinose- und Salicylsäure-Derivaten erfolgreich lichtgesteuert aktiviert. In *Escherichia coli* konnten die Regulator/Promotor-Kombinationen LacI/P_{T7}, AraC/P_{BAD} und NagR/P_{nagAa} kontrolliert werden. Des Weiteren wurden im Organismus *Pseudomonas putida* die LacI/P_{tac} und NagR/P_{nagAa}, Systeme sowie die IPTG-induzierbaren Promotoren P_{grac} in *Bacillus subtilis* und P_{T7} im anoxygenen phototrophen Organismus *Rhodobacter capsulatus* lichtgesteuert reguliert. Abschließend konnte in *P. putida* durch Kombination von zwei *photocaged* Induktoren eine lichtgesteuerte wellenlängenselektive Genexpression etabliert und am Beispiel der Biosynthese von Mono- und Di-Rhamnolipiden demonstriert werden.

Abstract

Photocaged compounds are photochemical tools that enable the light-controlled release of biological effector molecules with high spatiotemporal resolution. As an orthogonal, external, and easily tuneable stimulus, light ensures non-invasive control of biological processes such as gene expression. The aim of this work was the development and *in vitro* characterisation of novel photolabile-protected small molecule inducers, which should enable simultaneous, wavelength-selective control over several biotechnologically relevant promoters.

The initial focus was on the synthesis of photocaged compounds that should exhibit improved properties for application in microbial organisms. Inducers from the molecular classes of carbohydrates as well as aliphatic and aromatic carboxylic acids (propionic acid or else benzoic acid derivatives) were provided with a photolabile protecting group and optimised in an iterative process. The photocleavable protecting groups were either representatives of the *o*-nitrobenzyl, coumarin-4-ylmethyl or trimethyl lock chromophores. The *o*-nitrobenzyl-derived inducers were designed for exposure at 375 nm, whereas the (coumarin-4-yl)methyl- and trimethyl-lock-protected effector molecules were designed for excitation above 400 nm. Thus, a diverse library consisting of 30 photolabile-protected effector molecules was successfully prepared and their relevant parameters for *in vivo* application such as quantum yield as well as solubility and stability in aqueous media were determined.

In a cooperation with M. Sc. *Fabienne Hilgers* (Institute of Molecular Enzyme Technology, Heinrich Heine University Düsseldorf) the *in vivo* applicability of the synthesised photocaged inducers in Gram-negative as well as Gram-positive bacteria was demonstrated. Different regulator/promoter systems were successfully activated in a light-controlled manner using photocaged isopropyl β -D-thiogalactopyranoside, arabinose and salicylic acid derivatives. In *Escherichia coli*, the regulator/promoter combinations LacI/P_{T7}, AraC/P_{BAD} and NagR/P_{nagAa} were controlled. Furthermore, in the organism *Pseudomonas putida*, the LacI/P_{tac} and NagR/P_{nagAa}, regulatory systems as well as the IPTG-inducible promoters P_{grac} in *Bacillus subtilis* and P_{T7} in the anoxygenic phototrophic organism *Rhodobacter capsulatus* were regulated by irradiation. Finally, light-mediated wavelength-selective gene expression was established in *P. putida* by combining two photocaged inducers and demonstrated using the biosynthesis of mono- and di-rhamnolipids as an example.

1 Einleitung

Licht stellt sowohl für die Menschheit als auch die Natur selbst einen existenziellen Bestandteil des Lebens dar. Die fundamentalsten biologischen Prozesse nehmen sich der Eigenschaften des Lichtes an und machen sie sich zunutze. Sei es, wie im Fall der Photosynthese, die Konversion von Sonnenlicht in biochemisch nutzbare Energieformen^[7] oder die Umwandlung von Licht als optisches in ein (physiko-)chemisches Signal im menschlichen Auge.^[8] Die Fähigkeit Eigenschaften von Materie einzig durch die Einwirkung von Licht aufzudecken sowie zu beeinflussen und dies unabhängig von anderen externen Stimuli, offenbart die schier Vielzahl von potenziell möglichen Anwendungen. Diese reichen von der Lichtmikroskopie, welche einen ersten Einblick in die Welt der Mikrobiologie gewährte,^[9] über die vielfältigen Methoden der Spektroskopie^[10] bis hin zur modernen Photolithographie, welche eine der Schlüsseltechnologien zur Herstellung mikroelektronischer Elemente darstellt.^[11, 12]

Auch der Chemie konnte der Einsatz von Licht eine neue Dimension hinzufügen. So sind Moleküle, welche durch Absorption von Lichtquanten in einem angeregten Zustand vorliegen, dazu in der Lage Reaktivitäten aufzuzeigen, welche sich von denen im elektronischen Grundzustand unterscheiden.^[13] Die Felder der Photokatalyse^[14] und der Photochemie^[15] sind auf diesem Effekt begründet. Eine Unterkategorie stellen die photolabilen Schutzgruppen dar. Bei diesen handelt es sich um chromophore Substituenten, welche nach Schützung einer funktionellen Gruppe durch Bestrahlung mit Licht aktiviert und abgespalten werden können. Diese photoaktivierbaren Chromophore fanden früh nach ihrer Entwicklung eine breite Anwendung in der organischen Synthese^[16-19] und wurden, aufgrund ihrer Orthogonalität zu gängigen Schutzgruppen, beispielsweise in Totalsynthesen verwendet.^[20, 21] *Engels* und *Schlager* sowie *Kaplan et al.* untersuchten als erste die Desaktivierung von biologisch-aktiven Substraten durch photolabile Schutzgruppen sowie ihre anschließende *in situ* Freisetzung und der daraus folgenden Wiederherstellung der biologischen Aktivität nach Bestrahlung mit Licht.^[22, 23] Die schnell ablaufende Photolyse, welche ohne die Verwendung von chemischen Reagenzien auskommt, ermöglicht einen nicht-invasiven Eingriff in ein System und ist somit hervorragend geeignet für die *in vivo* Untersuchung von biochemischen und mikrobiologischen Prozessen. Die lichtgesteuerte Freisetzung eines biologisch-aktiven Moleküls kann somit gezielt einen Regulationsprozess anstoßen. Dabei ermöglicht insbesondere der externe und biokompatible Stimulus Licht eine hohe Raumzeitauflösung. Dies stellt ein essenzielles Kriterium für die Erforschung von komplexen, dynamischen Abläufen in lebenden Organismen dar.^[24] Neben der Verwendung der photolabilen Schutzgruppen zur irreversiblen Aktivierung dieser biologischen Prozesse, können auch Photoschalter oder genetisch kodierte Photorezeptoren zur reversiblen Steuerung verwendet werden.^[25]

Eine große wissenschaftliche Herausforderung stellt auch heute noch die simultane Regulation mehrerer biologischer Prozesse innerhalb von komplexen und dynamischen Netzwerken dar.^[26] Hierfür bietet sich die Kombination verschiedenartiger photolabiler Chromophore als exogene Kontrollelemente zur wellenlängenselektiven Steuerung an.^[26]

2 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Synthese und Charakterisierung einer Bibliothek, bestehend aus lichtgesteuerten Werkzeugen, welche die Regelung komplexer biotechnologischer Anwendungen ermöglichen sollen. Diese lichtgesteuerten Werkzeuge bestehen aus biologisch-aktiven Substraten, welche mit photolabilen Schutzgruppen deaktiviert wurden und durch Bestrahlung mit Licht einer definierten Wellenlänge reaktiviert werden können. Im Folgenden werden diese Verbindungen als *photocaged compounds* bezeichnet. Bei den ausgewählten, bioaktiven Substraten handelt es sich um Induktoren, welche zur Regulation der Genexpression in bakteriellen Organismen eingesetzt werden können. Das finale Ziel stellt dabei die Etablierung einer wellenlängenselektiven Genexpression durch Kombination mehrerer dieser *photocaged* Induktoren dar. Durch die selektive Einstrahlung zweier verschiedener Wellenlängen soll wahlweise eine der beiden photolabilen Schutzgruppen in Gegenwart der anderen abgespalten werden, um so in Abhängigkeit der Wellenlänge zeitlich und örtlich aufgelöst verschiedene biologische Prozesse unabhängig voneinander regulieren zu können.

Im ersten Teil der Arbeit liegt der Fokus auf dem Design und der Synthese photolabiler Schutzgruppen. Dabei wird sowohl die Darstellung bereits etablierter als auch neuartiger Schutzgruppen angestrebt, insbesondere mit dem Ziel, die in Vorarbeiten erkannten Limitationen wie Löslichkeit, Hydrolysestabilität und maximale Absorptionswellenlänge zu optimieren. In Bezug auf Letzteres wird aufgrund der intendierten Wellenlängenselektivität eine bathochrome Verschiebung angestrebt. Diese soll nicht nur die selektive Anregung ermöglichen, sondern auch unerwünschte Interaktionen mit endogenen Chromophoren im biologischen Kontext minimieren. Neben der *ortho*-Nitrobenzyl- und (Cumarin-4-yl)methyl-Schutzgruppe, welche zu den etablierten Vertretern zählen, sollen ebenso neuartige Phototrigger wie die Trimethyllock-Schutzgruppe (TML-Schutzgruppe) herangezogen werden (Abbildung 1A). Diese sollen anschließend über verschiedene Funktionalitäten mit biologisch relevanten Effektormolekülen zu *photocaged compounds* verknüpft werden. Dazu wurden bekannte Promotorsysteme sowie die dazugehörigen Induktoren genauer betrachtet und geeignete Effektormoleküle ausgewählt. Zum einen soll weiterhin mit den bisher etablierten Kohlenhydraten Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (**1a**, IPTG), L-Arabinose (**1b**) und D-Glukose (**1c**), gearbeitet werden. Da für eine wellenlängenselektive Genexpression die Kontrolle über mindestens zwei Promotorsysteme benötigt wird, wird zum anderen eine Erweiterung der Bandbreite um zusätzliche Effektormoleküle, wie die Benzoesäure-Derivate Salicylsäure (**2a**), Anthranilsäure (**2b**) und *meta*-Toluylsäure (**2c**) sowie Propionsäure (**3**) angestrebt (Abbildung 1B).

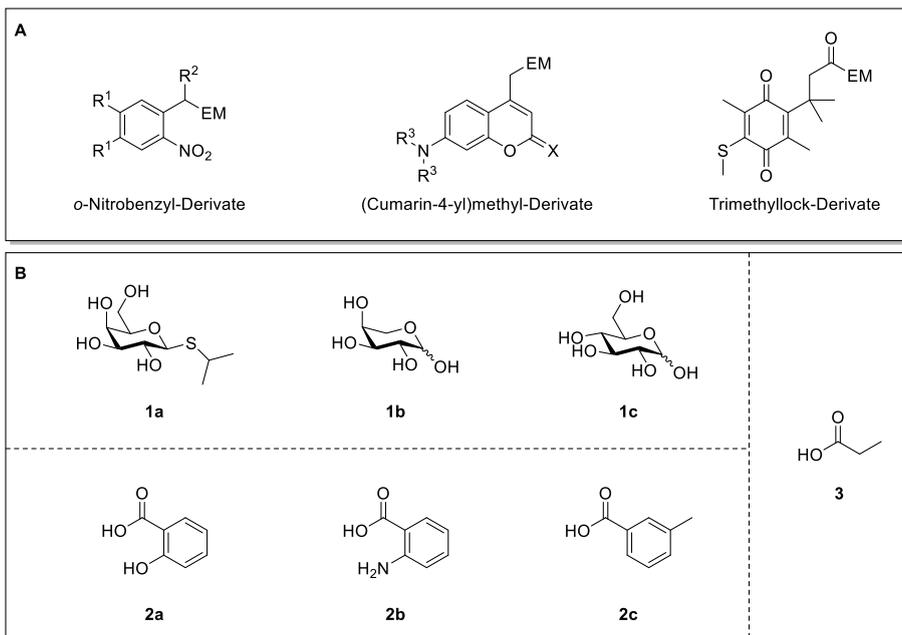


Abbildung 1: A) Photolabile Schutzgruppen auf Basis der *o*-Nitrobenzyl-, (Cumarin-4-yl)methyl- und TML-Struktur motive (R^1 – R^3 = verschiedene Reste; X = O, S, C(CN)₂; EM = Effektmolekül). B) Auswahl der relevanten Effektmoleküle: IPTG (**1a**), L-Arabinose (**1b**), D-Glucose (**1c**), Salicylsäure (**2a**), Anthranilsäure (**2b**), *m*-Toluylsäure (**2c**) und Propionsäure (**3**).

Im Anschluss an die Synthese soll zunächst die *in vitro* Charakterisierung der photochemischen Eigenschaften sowie der Stabilität in wässrigen Medien und der Zerfallskinetik der einzelnen *photocaged compounds* erfolgen, bevor im Anschluss daran die *in vivo* Anwendbarkeit überprüft wird. Die Durchführung der Experimente zur lichtgesteuerten Genexpression wurden in Kooperation mit M. Sc. *Fabienne Hilgers* aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET) der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt. Die aus den *in vivo* Experimenten gewonnenen Erkenntnisse sollen anschließend zum Design neuer, auf die jeweiligen Anforderungen optimierter *photocaged compounds* genutzt werden. Die geeignetsten photoaktivierbaren Induktoren sollen abschließend kombiniert und zur wellenlängenselektiven Steuerung der Genexpression eingesetzt werden.

Im Zuge dieser Kooperation ist die Bearbeitung zusätzlicher Fragestellungen angedacht. Einen Hauptaspekt stellt die Untersuchung der allgemeinen Anwendbarkeit der optimierten *photocaged* Induktoren in Gram-negativen Organismen wie *Escherichia coli* (*E. coli*) und ihre Übertragbarkeit auf weitere Prokaryoten mit biotechnologischer Relevanz, wie *Pseudomonas putida* (*P. putida*) und das Gram-positive Bakterium *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) dar. Ebenso soll das Potential der nicht-invasiven Anwendbarkeit von *photocaged* Induktoren unter anaeroben und phototrophen Bedingungen im Organismus *Rhodobacter capsulatus* (*R. capsulatus*) demonstriert werden.

3 Kenntnisstand

3.1 Photocaged compounds

3.1.1 Grundlegende Funktionsweise

Photocaged compounds besitzen generell einen strukturell ähnlichen Aufbau. Sie bestehen aus zwei Teilstücken: einem Chromophor, bei dem es sich um eine photolabile Schutzgruppe (*photolabile protecting group*, PPG) handelt, und einem Molekül, welches eine biologische Aktivität (Effektormolekül) besitzt (Abbildung 2A). Diese beiden Komponenten sind über eine kovalente Bindung miteinander verknüpft, welche durch Bestrahlung mit Licht eines definierten Wellenlängenbereiches gespalten werden kann (Abbildung 2B). Die vollständige Desaktivierung der biologischen Aktivität des Effektormoleküls durch die Bindung zur photolabilen Schutzgruppe und die Wiederherstellung der Aktivität nach Freisetzung stellen dabei die Grundvoraussetzung dar.^[27]

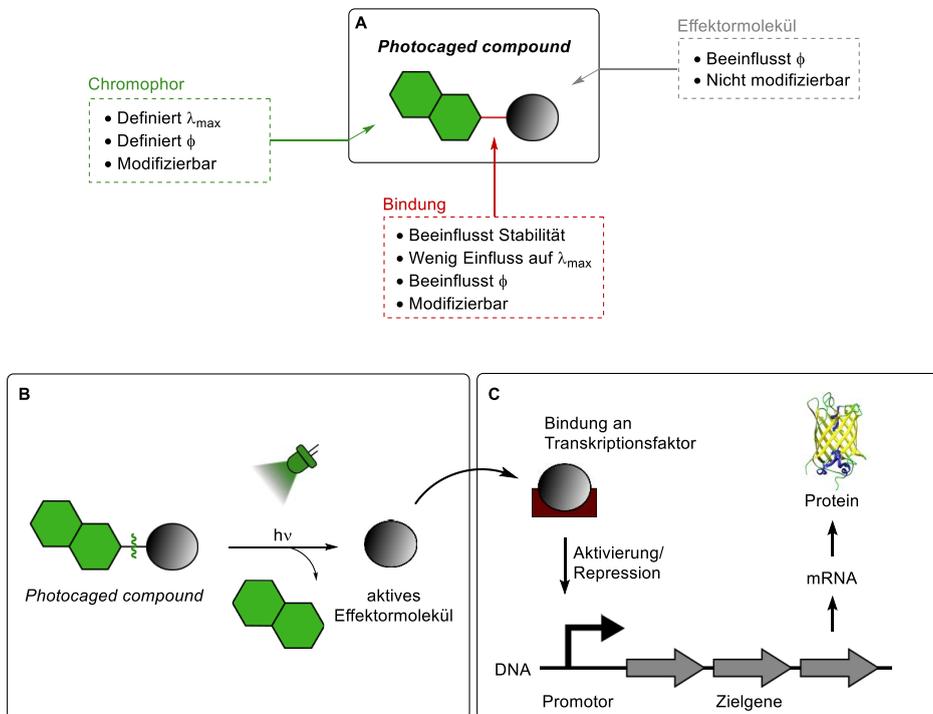


Abbildung 2: Übersicht über Aufbau und Funktionsweise von *photocaged compounds*. **A)** Generelle Strukturelemente eines *photocaged compounds* und ihr Einfluss auf die photochemischen Parameter. **B)** Schematische Darstellung der Photolyse eines *photocaged compounds* unter Freisetzung des Effektormoleküls. **C)** Bindung des freien Effektormoleküls an einen Transkriptionsfaktor und die daraus folgende Aktivierung oder Repression eines Promotors. (PDB: 2QU1)

Dieses Prinzip kann zur Regulierung von biologischen Prozessen eingesetzt werden. Ein relevantes Beispiel stellt die lichtgesteuerte Freisetzung eines Induktors dar, welcher durch Bindung an Transkriptionsfaktoren einen Promotor entweder aktivieren oder reprimieren und somit die Expression eines Gens und die daraus folgende Proteinbiosynthese aktivieren oder deaktivieren kann (Abbildung 2C). Aber auch in vielen anderen Bereichen, wie der Neurobiologie,^[28-30] der Biomedizin^[31-33] und der makromolekularen Chemie^[34] fanden *photocaged compounds* Anwendung. Diese können somit grundsätzlich die raumzeitaufgelöste Steuerung von biologischen Prozessen ermöglichen.^[31, 35]

Für eine erfolgreiche Anwendung existieren noch weitere essenzielle Voraussetzungen.^[36, 37] *Photocaged compounds* müssen nicht nur eine hohe Löslichkeit im verwendeten Medium aufweisen, sondern auch bis zum Zeitpunkt der Freisetzung eine hohe Stabilität in ebendiesem. Gegebenenfalls kann zusätzlich auch eine hohe Membranpermeabilität oder die Fähigkeit zur Anreicherung innerhalb einer Zelle erwünscht sein. Die spektroskopischen Parameter wie der molare Extinktionskoeffizient (ϵ), welcher die Fähigkeit des Chromophors zur Absorption von Photonen bei einer bestimmten Wellenlänge wiedergibt, und die maximale Anregungswellenlänge (λ_{max}), welche die Wellenlänge mit dem höchsten molaren Extinktionskoeffizienten aufzeigt, sind ebenfalls von großer Bedeutung. Beim Einsatz in einem biologischen Kontext ist es unerlässlich, dass die photolabile Schutzgruppe eine starke Absorption oberhalb von 300 nm besitzt, um eine Absorption durch Aminosäuren, Proteine, DNA sowie RNA und eine damit einhergehende Schädigung von Zellen zu vermeiden. Die nach der Absorption der Photonen ablaufende Photoreaktion sollte mit einer hohen Quantenausbeute (ϕ) ablaufen. Diese gibt an, wie viele der absorbierten Photonen die Freisetzung eines Effektormoleküls bewirken und spiegelt somit die intrinsische Qualität der photolytischen Reaktion wider. Die Photoreaktion sollte dabei vollständig und mit minimaler Bildung von Photolyse-Nebenprodukten ablaufen. Um eine kompetitive Absorption durch die abgespaltene Schutzgruppe und somit einen *Inner-Filter*-Effekt zu minimieren, ist es von Vorteil, wenn diese selbst nur eine geringe Absorption im Anregungswellenlängenbereich aufweist. Zusätzlich muss eine ausreichend hohe Biokompatibilität vorliegen, sodass keine unerwünschten Reaktionen Einfluss auf das System nehmen. Daher dürfen weder *photocaged compounds* selbst noch ihre Photolyse-Produkte toxisch auf die Zellen wirken.^[36, 37]

Zur Bildung von *photocaged compounds* existiert eine Vielzahl von unterschiedlichen photolabilen Schutzgruppen, welche alle ihre eigenen Vor- und Nachteile besitzen (siehe Kapitel 3.1.2). Die photochemischen und spektroskopischen Eigenschaften dieser Chromophore können modifiziert werden (Abbildung 2A). Wichtige veränderbare Parameter stellen die Löslichkeit, die Stabilität gegenüber Solvolyse, die maximale Absorptionswellenlänge (λ_{max}), der molare Extinktionskoeffizient (ϵ) und die Quantenausbeute (ϕ) dar. Diese können alle durch Substitutionen am Grundgerüst des Chromophors stark beeinflusst werden. Die Art der Bindung vom Chromophor zum Effektormolekül hingegen nimmt zwar nur geringen Einfluss auf die maximale Absorptionswellenlänge (λ_{max}),

beeinflusst jedoch deutlich die Quantenausbeute (ϕ) und vor allem auch die Stabilität des *photocaged compounds* gegenüber Solvolyse. Hierbei können nicht nur Ester, Ether, Kohlensäureester, Carbamate, etc., sondern auch selbstzerlegende *Spacer* verwendet werden. Das Effektmolekül selbst kann ebenso einen Einfluss auf die Freisetzungsrates haben, bietet jedoch nahezu keinen Raum für Modifikationen an, da durch Veränderungen am Effektmolekül ebenfalls die gewünschte biologische Aktivität verloren gehen kann.

3.1.2 Photolabile Schutzgruppen

Die ersten systematischen Untersuchungen zum Einfluss des Lichtes auf chemische Verbindungen gehen auf die Pioniere der Photochemie *Giacomo Luigi Ciamician* und *Paul Silber* zurück.^[38-40] Dabei entdeckten sie unter anderem die durch Licht induzierte Umwandlung des *o*-Nitrobenzaldehyds in *o*-Nitrosobenzoesäure, welche die Grundlage für die häufig verwendeten *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppen darstellt.^[39] Aber auch die Photoreduktion des *p*-Benzochinon zu Hydrochinon wurde dokumentiert, welche für die Trimethyllock-Schutzgruppe relevant ist.^[40] Mit diesen Studien legten sie den Grundstein für die Entwicklung der photolabilen Schutzgruppen, welche einen essenziellen Bestandteil von *photocaged compounds* darstellen. Über die Jahre wurde eine Vielzahl von unterschiedlichen photolabilen Schutzgruppen entwickelt (Abbildung 3).

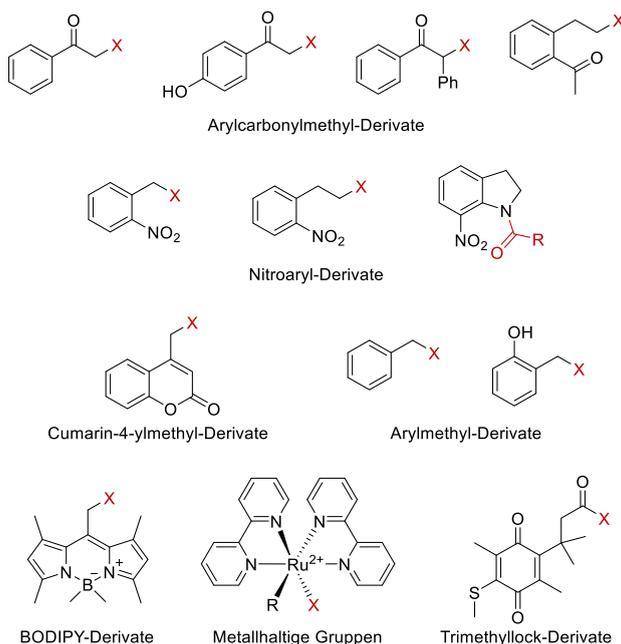


Abbildung 3: Übersicht über die wichtigsten Klassen der photolabilen Schutzgruppen (X = Abgangsgruppe).

Diese Vielzahl ist vor allem auch durch die diversen Themengebiete zu erklären, in denen ebendiese Anwendung finden. Hierfür werden differente Eigenschaften benötigt, die keine Schutzgruppe für sich genommen in der Lage ist gänzlich zu erfüllen. Die photoaktivierbaren Chromophore basieren entweder auf Arylcarbonylmethyl-, Nitroaryl-, (Cumarin-4-yl)methyl-, Arylmethyl-, oder 4,4-Difluor-4-bor-3a,4a-diaza-s-indazen- (BODIPY) Derivaten. Aber auch metallhaltige Verbindungen und verschiedene Benzochinone wie die Trimethyllock-Gruppe (TML-Gruppe) finden Anwendung als photolabile Schutzgruppe.^[36, 37] Im folgenden Teil wird primär auf die in dieser Doktorarbeit verwendeten Klassen Bezug genommen, nämlich die *ortho*-Nitrobenzyl-, die (Cumarin-4-yl)methyl- und die Trimethyllock-Schutzgruppe.

3.1.2.1 *ortho*-Nitrobenzyl-Derivate

Die *ortho*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe und ihre Derivate sind die gebräuchlichsten photolabilen Schutzgruppen.^[41] Der Grundstein dafür wurde in den 1960 Jahren durch die wegweisenden Arbeiten von *Bartrop et al.* und *Patchornik et al.* gelegt.^[18, 42] Nach der initialen Synthese verschiedener photoaktivierbarer Carbonsäuren, wie beispielsweise der *photocaged* Benzoesäure **4**, wurden vor allem die Möglichkeiten zur photosensitiven Schützung von Aminosäuren sowie die Einsatzmöglichkeiten in der Kohlenhydratsynthese erkannt.^[18, 43, 44] Relevante Beispiele dafür stellen das *photocaged* Alanin **5** sowie die *photocaged* Glukose **6** dar (Abbildung 4).

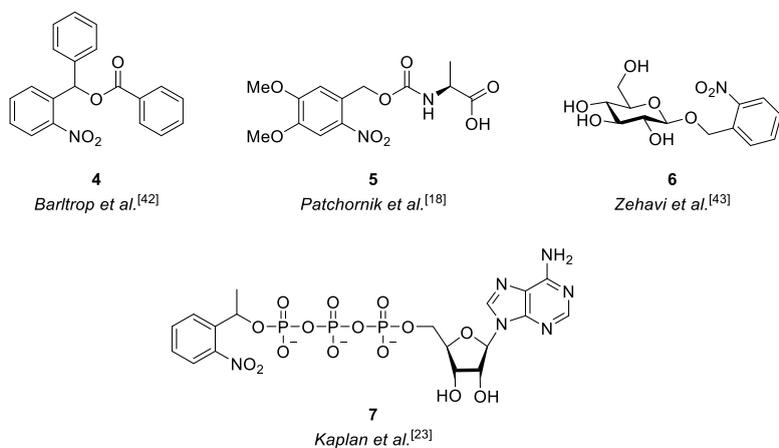


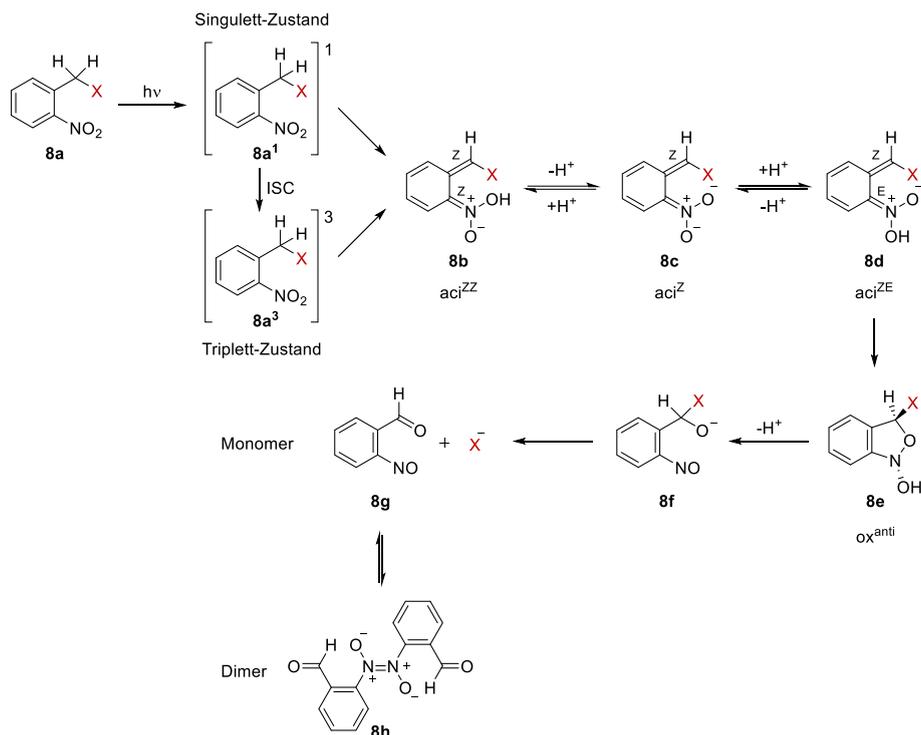
Abbildung 4: Ausgewählte Beispiele der frühen *photocaged compounds*.

Collins et al. etablierten in umfangreichen Arbeiten die *o*-Nitrobenzyl-Gruppe zur temporären Schützung von Diolen in Form von Acetalen in der Synthese von Oligosacchariden.^[45-51] Dabei lieferte die *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe eine neuartige säurefreie Methode zur Entfernung einer Acetal-Schutzgruppe.^[19] Hierbei wurde die grundlegenden Kriterien für eine gute Schutzgruppe erfüllt, wie etwa eine bei Bedarf vollständige Entfernbarkeit. Zusätzlich wurden weder eine Zersetzung noch eine Konfigurationsänderung durch die Bestrahlung des Kohlenhydrates beobachtet.^[43] Die erste Anwendung einer photolabilen Schutzgruppe im Zusammenhang mit einer biologischen Problemstellung erfolgte im Jahr 1978 durch *Kaplan et al.* Dabei wurde der Einfluss des *photocaged* Adenosintriphosphat (**7**, ATP) auf die Na⁺/K⁺-ATPase und daraus folgend auf den Na⁺/K⁺-Transport untersucht.^[23]

Mechanismus der Photolyse

Der Freisetzungsmechanismus der *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe wurde in den vergangenen Jahrzehnten detailliert aufgeklärt.^[52-63] Nach Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge wird das Molekül **8a** angeregt (Schema 1). Dadurch gelangt es in den angeregten Zustand. Bei diesem handelt es sich zunächst um einen Singulett-Zustand **8a**¹ (S₁), welcher jedoch durch Intersystem Crossing (ISC) in den Triplett-Zustand **8a**³ (T₁) übergehen kann. Die intramolekulare H-Abstraktion durch die Nitro-Gruppe führt zur Bildung des *aci*^{ZZ}-Nitrointermediates **8b** und kann aus beiden angeregten Zuständen (S₁ und T₁) erfolgen (Schema 1)¹. Die Beteiligung beider angeregter Zustände konnte am Beispiel von *o*-Nitrobenzylacetat mittels Femtosekunden-Spektroskopie nachgewiesen werden.^[62] Über das *aci*^Z-Nitro-Anion **8c** geht es in die *aci*^{ZE}-Nitro-Form **8d** über. Die anschließende irreversible Zyklisierung führt zum Benzisoxazolin **8e**, welches nach Deprotonierung über das Nitrosoacylal **8f** zum Nitrosobenzaldehyd (**8g**) und dem Produktanion zerfällt. Der Nitrosobenzaldehyd (**8g**) liegt im Gleichgewicht mit seinem Azodioxydimer **8h** vor. Der Zerfall des *aci*^{ZE}-Nitro-Anions **8d** stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar und erfolgt in einer Reaktion erster Ordnung.^[52] Die Zerfallsgeschwindigkeit hängt dabei von den Substituenten, dem Lösungsmittel und dem pH-Wert ab. Die Photolyse benötigt keine externe Protonenquelle und kann in diversen Lösungsmitteln stattfinden.^[64] Für Abgangsgruppen, bei denen die entstehende negative Ladung nicht ausreichend stabilisiert ist, stellt hingegen der Zerfall des Halbacetals **8f** den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Dies gilt beispielsweise für die Freisetzung von Alkoholen.^[57, 58, 65]

¹ Im Sinne der Übersichtlichkeit ist ausschließlich der Verlauf über die anfänglich ZZ-konfigurierte Form **8b** dargestellt. Eine vollständige Abbildung, welche auch den Verlauf über die *aci*^{EZ}-Konfiguration darstellt, ist bei *Schaper et al.* zu finden.^[63]

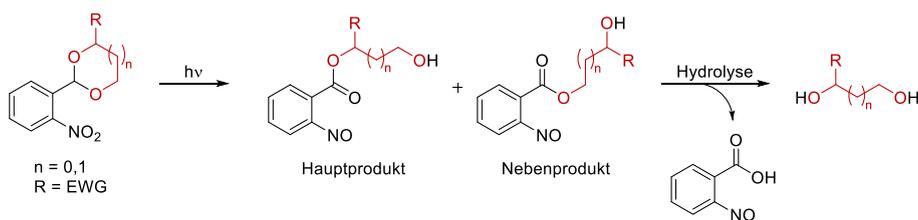


Scheme 1: Allgemeiner Photolyse-Mechanismus für *o*-Nitrobenzyl-geschützte Moleküle. Der Übersichtlichkeit halber ist lediglich der Verlauf über die ZZ-Konfiguration dargestellt. (X = Abgangsgruppe).^[63]

Abgangsgruppen

Die *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe ist in der Lage, eine ganze Reihe von funktionellen Einheiten freizusetzen. Darunter fallen Phosphate,^[22] Carbonsäuren,^[18] Thiole,^[66] Alkohole,^[58] Phenole^[67] und Amine.^[68] Die vier letzteren lassen sich ebenfalls in Form von Kohlensäure-Derivaten wie (Thio-)Carbonaten bzw. Carbamaten an der benzylicischen Position anbringen.^[36] Die Art der Abgangsgruppe hat dabei sowohl auf die Freisetzungsrates als auch auf die Quantenausbeute einen Einfluss.^[69] Im Falle der Kohlensäure-Derivate wird die postphotolytische Decarboxylierung zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt und kann für die Untersuchung biologischer Prozesse, bei welchen eine hohe Raumzeitauflösung relevant ist, zum limitierenden Faktor werden.^[70, 71] Zusätzlich liegt die Quantenausbeute bei der Photolyse von Carbonsäureestern, Kohlensäureestern und Carbamaten zumeist niedriger als bei Ethern.^[58, 69]

Darüber hinaus ist es auch möglich, 1,2- bzw. 1,3-Diole direkt in Form von *o*-Nitrobenzyliden-Acetalen zu schützen. Die zweifache Substitution der benzylichen Position mit Sauerstoffatomen führt dabei zu einer massiven Erhöhung der Quantenausbeute.^[72] Bei der Freisetzung des Diols handelt es sich jedoch um einen zweistufigen Prozess, bestehend aus Photolyse und der nachfolgenden Hydrolyse der entstandenen Ester (Schema 2). Die photolytische Spaltung der C–O-Bindung erfolgt mit moderater bis hoher Regioselektivität benachbart zu der stärker elektronenziehenden bzw. weniger elektronenschiebenden Gruppe, da es sich bei dieser um die bessere Abgangsgruppe handelt. Strukturelle Veränderungen der Substitutionsmuster können bei unsymmetrischen Acetalen zu einer Änderung des Photolyse-Produktverhältnisses führen.^[73]



Schema 2: Regioselektive Photolyse von *o*-Nitrobenzyliden-Acetalen unter Bildung von Konstitutionsisomeren und anschließender Hydrolyse (EWG = *electron withdrawing group*, elektronenziehende Gruppe).^[73]

Modifikationen der *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe

Die ersten Modifikationen der namensgebenden *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe waren schon in den frühen anwendungsbezogenen Publikationen von *Barltrop et al.* und *Patchornik et al.* zu finden.^[18, 42] Im Verlauf der letzten Jahrzehnte hat sich die Zahl der erschlossenen Modifikationen deutlich erhöht. Hierbei standen vor allem die Erhöhung der Freisetzungsrates und damit einhergehend eine verbesserte Quantenausbeute sowie eine bathochrome Verschiebung der maximalen Absorptionswellenlänge, aber auch eine Erhöhung der Löslichkeit in wässrigen Medien im Vordergrund. Diese können auf zwei Arten erfolgen. Zum einen durch Substitution der benzylichen Position und zum anderen durch Modifikationen am aromatischen Grundgerüst entweder durch Substitution mit funktionellen Gruppen oder Erweiterung des aromatischen Ringsystems.

Modifikationen der benzylicchen Position

Obwohl es sich bei den Modifikationen an der benzylicchen Position um eine sinnvolle Möglichkeit handelt, wie im Falle von *Patchornik et al.*^[18] die Bildung von Nebenprodukten zu verhindern oder im Allgemeinen die Quantenausbeute zu erhöhen, existieren auch inhärente Nachteile. Durch Modifikation an der benzylicchen Position kann je nach Substituenten ein zusätzliches Stereozentrum aufgebaut werden, welches bei der photosensitiven Schätzung von chiralen Molekülen zur Ausbildung von Diastereomeren führt.^[36] Der Aufbau eines weiteren Stereozentrums lässt sich nur durch Verwendung symmetrischer photolabiler Schutzgruppen mit einer zweiten *o*-Nitrophenyl-Einheit wie bei den sekundären Alkoholen **9** und **10** verhindern (Abbildung 5).^[53, 74] Bei diesen sollte ergänzend zum elektronischen Einfluss die zusätzliche Nitro-Gruppe eine statistische Erhöhung der H-Abstraktion bewirken und somit die Quantenausbeute erhöhen. Für die Verbindungen **10** und **11** wurden jedoch identische Quantenausbeuten ($\phi = 0.2$) publiziert,^[53] obwohl bei Verbindung **11** die Nitro-Gruppe in der *meta*-Position angebracht ist. Dies impliziert, dass in diesem Fall einzig die Substitution der benzylicchen Position einen Einfluss besitzt und keine signifikante statistische Erhöhung stattfindet, da die Nitro-Gruppe bei Verbindung **11** sich nicht in der für eine H-Abstraktion notwendigen *ortho*-Position befindet.^[64] Allgemein hat eine Substitution der benzylicchen Position nur einen geringen Einfluss auf die Änderung der Absorptionseigenschaften.

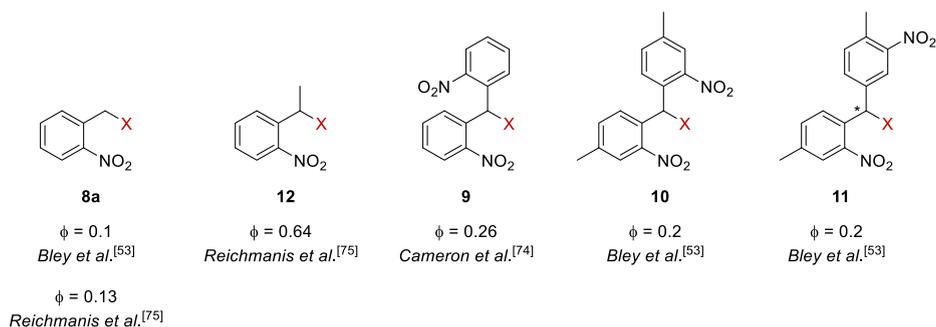


Abbildung 5: Eine Auswahl von Modifikationen der benzylicchen Position und die dazugehörigen publizierten Quantenausbeuten nach Bestrahlung bei 254 nm (X = Abgangsgruppe).²

² Es sollte beachtet werden, dass in diesen Publikationen partiell unterschiedliche Lösungsmittel und Abgangsgruppen verwendet wurden. Diese besitzen einen Einfluss auf die Quantenausbeute. Somit sind die Werte aus verschiedenen Publikationen nur bedingt vergleichbar und können lediglich einen Trend abbilden.

Die generelle Erhöhung der Quantenausbeute durch einen Substituenten in benzyli-scher Position konnte in Beispielen verschiedener Arbeitsgruppen gezeigt werden.^[75-77] Dabei ist das Ausmaß der Steigerung jedoch durchaus verschieden. *Reichmanis et al.* konnten eine fünffache Erhöhung der Quantenausbeute bei der Freisetzung des Pivalinsäureesters des α -Methyl-Derivates **12** ($\phi = 0.64$) in Acetonitril im Vergleich zum Pivalinsäureester des *o*-Nitrobenzyl-Derivates **8a** ($\phi = 0.13$) erreichen. Dahingegen konnte in einer Polymermatrix aufgrund konformerer Restriktionen nur eine Verdopplung der Quantenausbeute beobachtet werden.^[75]

Der Einfluss von Substituenten mit stark elektronenziehenden Eigenschaften auf die Photolyse wurde ebenfalls von mehreren Gruppen untersucht (Abbildung 6). *Pirrung et al.* konnten unter anderem die α -Cyano-substituierte Verbindung **13** darstellen und für diese eine Quantenausbeute im Bereich von $\phi = 0.013$ bestimmen.^[78] *Specht und Goeldner* berichten durch die Einführung einer α -Trifluormethyl-Gruppe eine beträchtliche Steigerung der Quantenausbeute ($\phi = 0.43-0.70$) für die Freisetzung von (Arseno-)Cholin sowie von einem Galactose-Derivat. Die Synthese über eine *Mitsunobu*-Reaktion war jedoch insbesondere für den Zucker von geringen Ausbeuten geprägt.^[79] In einer systematischeren Herangehensweise synthetisierten *Aujard et al.* eine Reihe von Verbindungen mit elektronenziehenden Substituenten in der benzyli-schen Position (**13-16**). Dabei konnte durchweg eine signifikante, aber nur schwache Steigerung beobachtet werden, wodurch sich die zuvor proklamierte Erhöhung um Größenordnungen^[78, 79] nicht reproduzieren ließ. Die α -Cyano-substituierte Verbindung **13** zeigte von den untersuchten Varianten die geringste Quantenausbeute ($\phi = 0.003$). Die höchste Quantenausbeute lieferte die α -Tribrommethyl-substituierte Verbindung **16**, welche allerdings nur viermal so hoch ausfiel wie jene der α -Cyano-substituierten Verbindung **13**. Der Einfluss der elektronenziehenden Substituenten fiel deutlich niedriger aus, als zuvor von *Specht et al.* und *Pirrung et al.* angenommen. Es ist zu beachten, dass der Substituent an der benzyli-schen Position mehrere Parameter beeinflusst, welche die Effizienz des Photolyse-Prozesses betreffen. Zum einen nehmen die elektronischen Effekte Einfluss auf die Stabilität der C-H-Bindung des benzyli-schen Protons. Der Transfer dieses Protons stellt einen zentralen Schritt im Freisetzungsmechanismus dar. Zum anderen kann beispielsweise im Fall der α -Tribrommethyl-substituierten Verbindung **16** ein *Heavy-Atom*-Effekt durch alternative Relaxationswege über den Triplett-Zustand Einfluss auf die Quantenausbeute nehmen. Darüber hinaus können durch die Größe der Substituenten sterische Effekte auftreten.^[67]

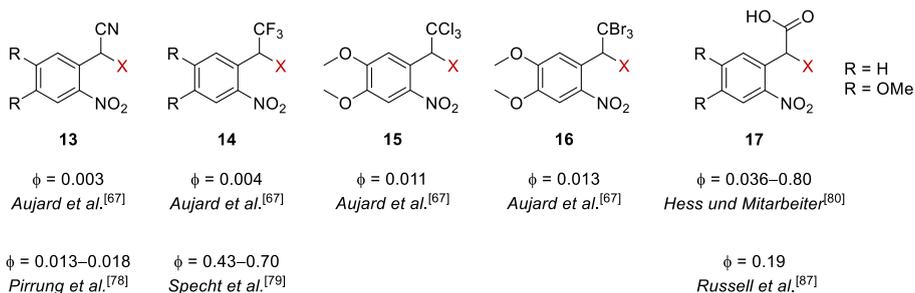


Abbildung 6: Modifikation der benzylicen Position durch elektronenziehende Substituenten (X = Abgangsgruppe).³

Bei der gebräuchlichsten elektronenziehenden Modifikation handelt es sich um die Substitution mit einer Carboxyl-Gruppe. Diese bereits 1989 von *Hess* und Mitarbeitern eingeführte Modifikation besitzt den inhärenten Vorteil, dass sie zusätzlich zur Quantenausbeute auch die Löslichkeit erhöht.^[80] Der somit erleichterte Einsatz in biologischen Systemen wurde in einer Reihe von Publikationen dargelegt.^[81-85] *Corrie et al.* konnten jedoch in einer zeitaufgelösten IR-Studie zeigen, dass ebenfalls eine nicht-produktive Photodecarboxylierung als signifikante Nebenreaktion auftreten kann, welche die Bestimmung der Produktfreisetzung erschwert.^[86] Dennoch wird die α -Carboxy-substituierte Schutzgruppe **17** auch heute noch vielfach verwendet.^[87, 88]

Das Zustandekommen der teilweise deutlichen Abweichungen der publizierten Quantenausbeuten und der damit einhergehenden Widersprüche in der Literatur wurde bei *Klán et al.* auf eine Vielzahl von Faktoren zurückgeführt. Zum einen werden die photolabilen Schutzgruppen zumeist zur Freisetzung unterschiedlicher Abgangsgruppen eingesetzt. Zum anderen werden verschiedene Lichtquellen und Belichtungsbedingungen bezüglich Wellenlänge, Lösungsmittel, Puffer und pH-Wert verwendet, welche alle einen hohen Einfluss auf den Photolyse-Mechanismus besitzen. Dies macht die Quantenausbeute zu einem besonders fehleranfälligen Parameter.^[36] Dennoch zeigt sich grundsätzlich, dass eine Modifikation der benzylicen Position zu einer Erhöhung der Quantenausbeute führt.

³ Es sollte beachtet werden, dass in diesen Publikationen partiell unterschiedliche Lösungsmittel und Abgangsgruppen verwendet wurden. Diese besitzen einen Einfluss auf die Quantenausbeute. Somit sind die Werte aus verschiedenen Publikationen nur bedingt vergleichbar und können lediglich einen Trend abbilden.

Modifikationen des aromatischen Grundgerüsts

Ein Großteil der durchgeführten Modifikationen erfolgte allerdings durch Substitutionen am aromatischen Grundgerüst. Diese bewirken die zeitgleiche Veränderung der Quantenausbeute sowie der Absorptionseigenschaften. Zusätzlich ermöglichen diese eine Verbesserung der Löslichkeit und das Anbringen an einer Festphase.^[36]

Den größten Einfluss auf die Quantenausbeute besitzt die Einführung einer weiteren Nitro-Gruppe in *ortho*-Position. So liegt beispielsweise die Quantenausbeute der *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe **8a** bei $\phi \approx 0.13$, wohingegen die Quantenausbeute der Dinitro-Verbindung **18** ($\phi \approx 0.62$) durch statistische Erhöhung der Wahrscheinlichkeit zur Bildung des *aci*-Nitro-Intermediates signifikant angehoben ist.^[75, 89-91] Die am häufigsten verwendeten *o*-Nitrobenzyl-Analoga stellen jedoch die 6-Nitroveratryl-Schutzgruppe **19** sowie die 6-Nitropiperonyl-Schutzgruppen **20a** und **20b** dar (Abbildung 7).

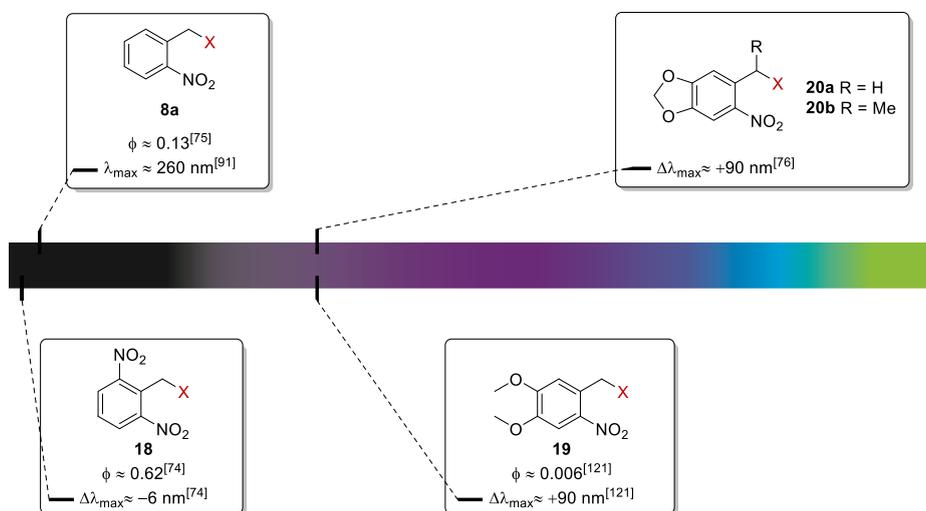


Abbildung 7: Auswahl der häufig verwendeten *o*-Nitrobenzyl-Derivate und Darstellung des Substituenteneinflusses auf deren Absorptionsmaxima und Quantenausbeuten (X = Abgangsgruppe).⁴

Die 6-Nitroveratryl-Schutzgruppe **19** besitzt zwei zusätzliche Methoxy-Gruppen, wohingegen die 6-Nitropiperonyl-Schutzgruppen **20a** und **20b** einen Methylendioxy-Rest besitzt. Beide Alkoxy-Gruppen bewirken sowohl einen hyperchromen Effekt als auch eine bathochrome Verschiebung. Dadurch zeichnen sie sich durch eine deutlich erhöhte Absorption bei längeren Wellenlängen aus. Diese bewirkt allerdings keine deutlich verbesserte Anwendbarkeit im Vergleich zur ursprünglichen

⁴ Es sollte beachtet werden, dass in diesen Publikationen partiell unterschiedliche Lösungsmittel und Abgangsgruppen verwendet wurden. Diese besitzen einen Einfluss auf die Quantenausbeute und das Absorptionsmaximum. Somit sind die Werte aus verschiedenen Publikationen nur bedingt vergleichbar und können lediglich einen Trend abbilden.

o-Nitrobenzyl-Schutzgruppe **8a**, da die Quantenausbeute gleichzeitig um eine Größenordnung verringert ist. Diese inverse Korrelation ist auf andere durch die Modifikation ermöglichte photochemische Prozesse zurückzuführen, welche nicht zur photolytischen Abspaltung der Schutzgruppe führen.^[64] Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass ein zusätzlicher Triplet-Zustand mit *Charge-Transfer*-Charakter auftritt, der nicht zur Bildung des Photolyse-Produktes beiträgt.^[53, 61] Daher stellt die inverse Korrelation der maximalen Absorptionswellenlänge mit der Quantenausbeute ein grundlegendes Problem dar. Insbesondere im Hinblick auf eine biologische Anwendung ist nämlich die maximale Absorptionswellenlänge von hoher Bedeutung, um eine negative Wechselwirkung mit endogenen Chromophoren zu minimieren.

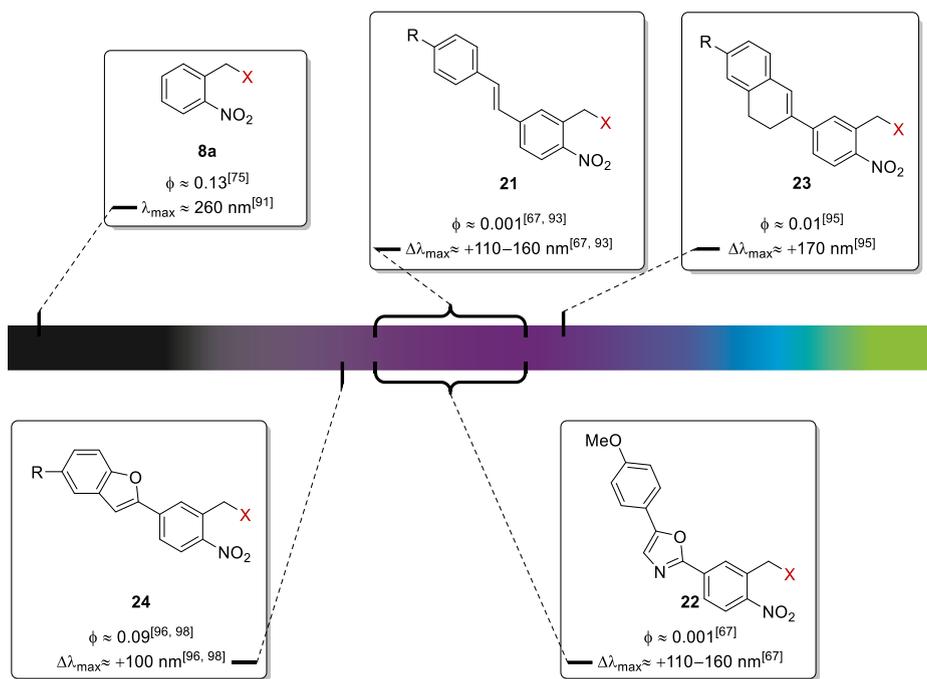


Abbildung 8: Auswahl der relevanten erweiterten π -Donor-Akzeptor-Systeme und Darstellung des Substituenteneinflusses auf deren Absorptionsmaxima und Quantenausbeuten (X = Abgangsgruppe).⁵

Eine systematische Untersuchung von *Aujard et al.* an einer Reihe von substituierten *o*-Nitrobenzyl-Derivaten zeigte, dass bei einer Anbringung von konjugierten, elektronschiebenden Substituenten in *para*-Position zur Nitro-Gruppe bei bathochromer Verschiebung der maximalen

⁵ Es sollte beachtet werden, dass in diesen Publikationen partiell unterschiedliche Lösungsmittel und Abgangsgruppen verwendet wurden. Diese besitzen einen Einfluss auf die Quantenausbeute und das Absorptionsmaximum. Somit sind die Werte aus verschiedenen Publikationen nur bedingt vergleichbar und können lediglich einen Trend abbilden.

Absorptionswellenlänge gleichzeitig die Quantenausbeute und somit auch die Photolyse-Geschwindigkeit abnehmen (Abbildung 8).^[67] Diese Beobachtung wurden zuvor bereits von *Reichmanis et al.* und von *Bochet* dokumentiert.^[75, 92] Die stark konjugierten Verbindungen **21** und **22** zeigen eine signifikant bathochrom verschobene Absorptionsbande ($\lambda_{\max} \approx 370$ nm), welche bis zu 450 nm reicht. Hier konnte die inverse Korrelation von Quantenausbeute und Absorptionsmaximum durch den auch oberhalb von 400 nm hohen Extinktionskoeffizienten ausgeglichen werden.^[67] Besonders für die Nitro-Stilben-Verbindung **21** wurde eine Reihe von Derivaten publiziert. *Bao et al.* funktionalisierten dieses mit elektronenschiebenden Gruppen, welche zusätzlich die Einbindung in *Drug-Delivery*-Systeme ermöglichen.^[93] Die Freisetzung von Produkten erfolgt jedoch auch hier mit geringen Quantenausbeuten ($\phi \approx 0.001$). Einen zusätzlichen inhärenten Nachteil stellt die auftretende photoinduzierte *E/Z*-Isomerisierung dar, da diese als primärer Deaktivierungsprozess des angeregten Zustandes fungiert.^[94, 95] Durch eine Fixierung der Struktur entweder in Form des 1,2-Dihydronaphthalen-Derivates **23**^[95] oder des Benzofuran-Derivates **24**^[96-98] kann die *E/Z*-Isomerisierung vollständig verhindert und somit auch die Quantenausbeute erhöht werden ($\phi \approx 0.01-0.09$). Diese rot-verschobenen *o*-Nitrobenzyl-Derivate ermöglichen zwar eine Photolyse oberhalb von 400 nm und sind ebenfalls gut geeignet für eine Zwei-Photonen-Anregung, erfordern jedoch einen hohen synthetischen Aufwand.

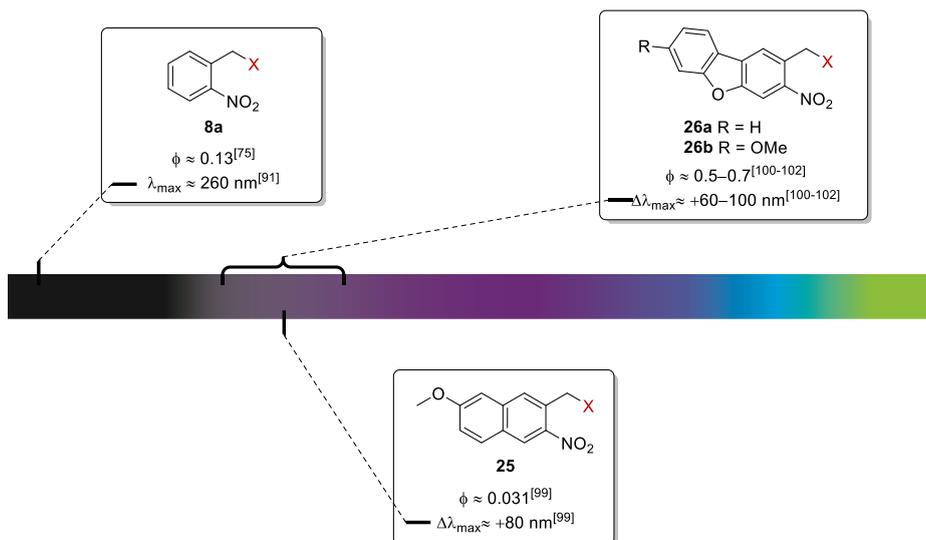


Abbildung 9: Auswahl der relevanten *o*-Nitrobenzyl-Derivate mit erweitertem aromatischem Ringsystem und Darstellung des Substituenteneinflusses auf deren Absorptionsmaxima und Quantenausbeuten (X = Abgangsgruppe).⁶

⁶ Es sollte beachtet werden, dass in diesen Publikationen partiell unterschiedliche Lösungsmittel und Abgangsgruppen verwendet wurden. Diese besitzen einen Einfluss auf das Absorptionsmaximum. Somit sind die Werte aus verschiedenen Publikationen nur bedingt vergleichbar und können lediglich einen Trend abbilden.

Eine weitere Möglichkeit, um eine bathochrome Verschiebung der maximalen Absorptionswellenlänge zu erreichen, stellt die Erweiterung des aromatischen Ringsystems dar (Abbildung 9). In den Arbeiten von *Singh* und *Khade* wurde das Naphthalen-Derivat **25** erfolgreich unter physiologischen Bedingungen getestet.^[99] Die von *Ellis-Davies* und Mitarbeitern sowie von *Distefano* und Mitarbeitern etablierten Nitrodibenzofurane **26a** und **26b** fanden jedoch breitere Akzeptanz.^[100-102] Verschiedene Arbeitskreise konnten die hervorragende Anwendbarkeit in biologischen Fragestellungen demonstrieren, wobei die entsprechenden Verbindungen hohe Quantenausbeuten von $\phi \approx 0.5-0.7$ aufwiesen.^[102-104] Dabei war es möglich, auch mit Anregung bei 400–440 nm eine Freisetzung der Zielmoleküle zu erwirken.^[105, 106]

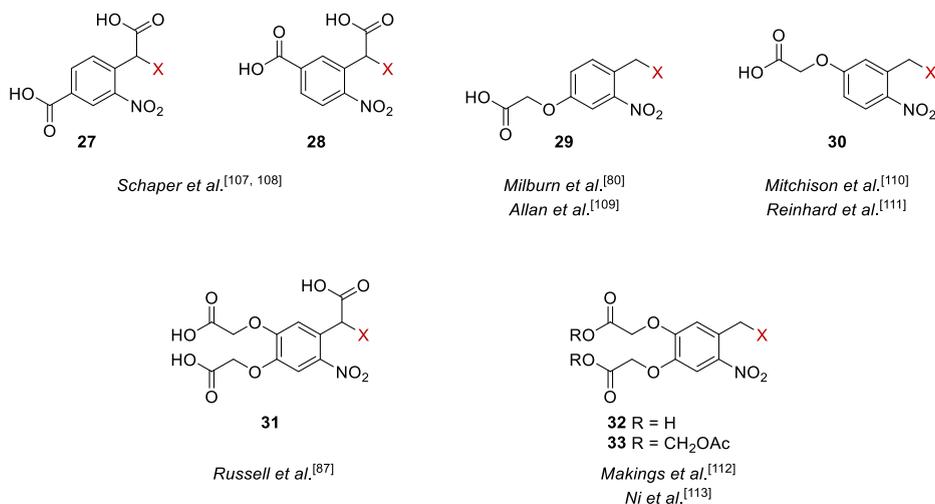


Abbildung 10: Auswahl der häufigsten Modifikationen zur Steigerung der Löslichkeit in wässrigen Medien (X = Abgangsgruppe).

Einen zusätzlich wichtigen Aspekt, gerade im Hinblick auf eine Verwendung in einem biologischen Kontext, stellt die Erhöhung der Löslichkeit in wässrigen Medien dar (Abbildung 10). Um diese zu ermöglichen, wurde sich zumeist derselben Vorgehensweise bedient. Entweder erfolgte eine direkte Einführung einer weiteren Carboxy-Gruppe direkt am Aromaten, wie bei den von *Schaper* und Mitarbeitern publizierten Verbindungen **27** und **28**,^[107, 108] oder es wurde an ein bis zwei phenolischen Hydroxy-Gruppen eine Carboxymethylierung vollzogen, wie bei den Verbindungen **29–32**.^[80, 87, 109-112] *Ni et al.* synthetisierten zwar die Dicarbonsäure **32**, verwendeten diese jedoch nicht direkt, sondern maskierten sie als Acetoxymethylester **33**, mit dem Ziel durch eine erhöhte Membranpermeabilität eine Anreicherung innerhalb der Zelle zu erreichen. In dieser sollte durch intrazelluläre Esterasen die Dicarbonsäure **32** regeneriert und somit eine Diffusion aus der Zelle unterbunden werden.^[113] Im

Allgemeinen finden abseits der simpleren α -Carboxy-substituierten Verbindung **17** die Derivate mit erhöhter Löslichkeit, bedingt durch den größeren Synthesaufwand, nur selten Verwendung.

3.1.2.2 (Cumarin-4-yl)methyl-Derivate

Die (Cumarin-4-yl)methyl-Schutzgruppe besitzt generell viele vorteilhafte Eigenschaften: Einen hohen molaren Absorptionskoeffizienten oberhalb von 350 nm, eine effiziente Photolyse, eine schnelle Freisetzung des Effektormoleküls nach ebendieser sowie eine hohe Stabilität im unbelichteten Zustand.^[37] Darüber hinaus kann das Cumarin-Grundgerüst vielfältig modifiziert werden, wodurch sowohl die spektroskopischen als auch die photochemischen Eigenschaften auf die jeweilige Anwendung abgestimmt werden können. Auch die Löslichkeit und Zellpermeabilität der Schutzgruppe können darüber verändert werden.^[114] Die Entdeckung der (Cumarin-4-yl)methyl-Schutzgruppe geht auf *Givens* und *Matuszewski* zurück. Diese bemerkten, dass das 7-Methoxycumarinyl-4-methyl-Derivat **34** nach Belichtung bei 360 nm das Diethylphosphat (**35**) freisetzt und das dabei entstehende Cumarin-Kation mit einer Reihe von Nucleophilen reagierte (Abbildung 11).^[115]

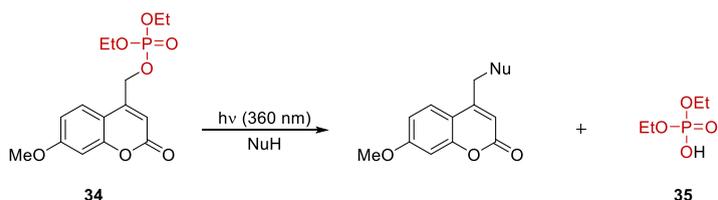


Abbildung 11: Erste Demonstration der Photoreaktivität der (Cumarin-4-yl)methyl-Gruppe.^[115]

Mechanismus der Photolyse

Der Mechanismus der Photolyse von (Cumarin-4-yl)methyl-Derivaten wurde intensiv untersucht.^[116-119] Wie in Abbildung 12 am Beispiel des Cumarins **36** dargestellt, verläuft dieser über einen Photo- S_N1 -Mechanismus.^[116] Nach Absorption des Lichts erfolgt zunächst die Relaxation zum niedrigsten angeregten $^1\pi\pi^*$ Singulett-Zustand (S_1). Dieser ist in der Lage zum einen durch unproduktive nichtstrahlende Desaktivierung oder Fluoreszenz in den Singulett-Grundzustand (S_0) zurückzukehren. Zum anderen kann die heterolytische Spaltung der C–X-Bindung auftreten. Dabei wird zunächst ein enges Ionenpaar als Intermediat durchlaufen, welches aus dem (Cumarin-4-yl)methyl-Kation und der konjugierten Base der Abgangsgruppe besteht. Nach Trennung durch das Lösungsmittel reagiert das Kation mit etwaigen Nucleophilen oder Lösungsmittel-Molekülen zu stabilen Produkten. Eine Rekombination des engen Ionenpaares hingegen stellt einen weiteren unproduktiven strahlungslosen

Pfad hin zum Grundzustand (S_0) dar. Dabei kann die Rekombination des Ionenpaares zehnmal schneller als das Abfangen des Kations durch ein Nukleophil verlaufen.^[118, 119] Bei einigen wenigen Cumarin-Derivaten wird auch die Beteiligung des Triplett-Zustandes (T_1) bei der Photolyse vermutet.^[120-123] Bei den meisten Verbindungen leistet das Intersystem Crossing jedoch keinen signifikanten Beitrag zur Desaktivierung des angeregten Singulett-Zustandes.^[116] Die Geschwindigkeit und Quantenausbeute der Lösungsmittel-unterstützten Photoheterolyse lassen sich primär durch Faktoren beschleunigen, welche das entstehende enge Ionenpaar stabilisieren. Somit führt sowohl eine Erhöhung der Polarität des Lösungsmittels als auch die Verwendung von Abgangsgruppen mit geringem pK_s -Wert sowie die Einführung von elektronenschiebenden Gruppen am Cumarin-Grundgerüst zu einer Steigerung der Photolyserate. Gleichzeitig bewirken diese Faktoren auch eine Herabsetzung der Rekombinationsrate und haben somit einen zweifach positiven Effekt auf Quantenausbeute und Photolyserate.^[116, 119] Die Geschwindigkeit der initialen heterolytischen Spaltung wurde *via* zeitaufgelöster Absorptionsspektroskopie auf $2 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$ für die Freisetzung eines Phosphatesters bestimmt und zählt damit zu den schnellsten photolytischen Prozessen.^[116]

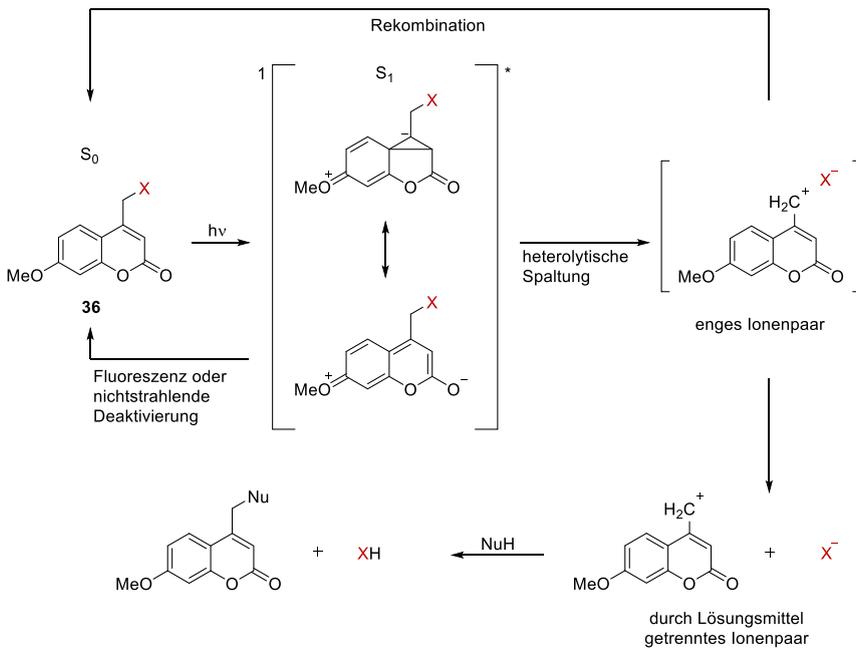


Abbildung 12: Photolyse-Mechanismus für (Cumarin-4-yl)methyl-geschützte Verbindungen ($X =$ Abgangsgruppe) in Anlehnung an Weinstain *et al.*^[37, 116]

Abgangsgruppen

Die (Cumarin-4-yl)methyl-Schutzgruppe ist nur für die direkte Freisetzung von Gruppen geeignet, welche gute Fluchtgruppen-Eigenschaften aufweisen. So verläuft die Photoentschützung von Phosphaten,^[116, 124, 125] Sulfonaten^[118], quaternären Aminen^[120] und Carbonsäuren^[126, 127] mit hohen Quantenausbeuten. Alkohole hingegen sind aufgrund ihres niedrigen pK_s -Wertes nahezu nicht photolysierbar.^[119] Diese können jedoch in Form von Carbonaten an der (Cumarin-4-yl)methyl-Schutzgruppe installiert und effizient freigesetzt werden.^[128, 129] Bei der Bestrahlung von Cumarin-geschützten Phenolen stellt eine Photo-Claisen-Umlagerung die Hauptreaktion dar, wodurch eine effiziente und präzise Freisetzung der Abgangsgruppe verhindert wird. Eine Verknüpfung von Phenol und Cumarin über ein Carbonat kann diese Nebenreaktion vollständig verhindern.^[130] Ebenso tritt bei der direkten Freisetzung von Thiolen eine Photo-Isomerisierung als Nebenreaktion auf,^[131] weshalb sich auch hier die Schützung über ein Thiocarbonat anbietet.^[132] Bei Aminen empfiehlt sich ebenfalls die Verknüpfung mit der (Cumarin-4-yl)methyl-Schutzgruppe über ein Carbamat.^[133]

Die Photolyse von (Thio-)Carbonaten und Carbamaten verläuft dabei identisch. Nach initialer Photoheterolyse des entsprechenden Cumarin-Derivates **37** decarboxyliert die freigesetzte (Thio-)Kohlensäure oder Carbaminsäure und liefert das freie Thiol bzw. den freien Alkohol oder das freie Amin (Abbildung 13).^[129, 132, 133] Die Decarboxylierung verläuft dabei relativ langsam und wird zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Freisetzung.^[71] Dabei ist die Geschwindigkeit sowohl von Säure- und Basen-Katalyse als auch von der Art der freigesetzten Gruppe anhängig.^[134, 135]

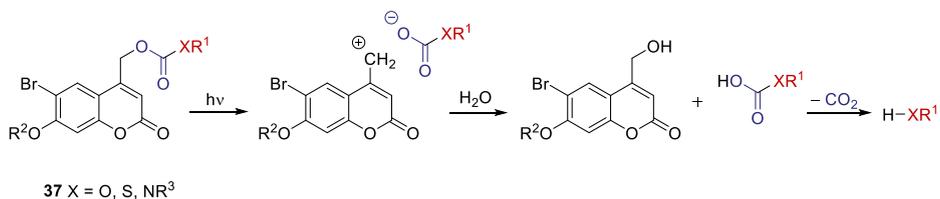


Abbildung 13: Photolytische Freisetzung mit anschließender Decarboxylierung von (Cumarin-4-yl)methyl-geschützten Thiolen, Alkoholen und Aminen.^[36]

Die direkte Freisetzung von primären und sekundären Aminen ist lediglich in einer einzelnen Publikation zu finden. Dabei verläuft die Photolyse nicht über einen Photo-S_N1-Mechanismus, sondern über einen radikalischen Elektronentransfer, welcher nur in Gegenwart eines im Überschuss vorliegenden H-Donors, wie *n*-Decanthiol abläuft.^[136]

Auch die direkte Freisetzung von Diolen aus Acetalen ist bei Verwendung einer (Cumarin-4-yl)methyl-Schutzgruppe möglich. *Lin* und *Lawrence* konnten zeigen, dass jedoch ausschließlich 5-Ring-Acetale bzw. 7-Ring-Acetale photolysierbar sind. Der potenzielle Mechanismus ist am Beispiel des 6-Bromo-7-hydroxycumarin-4-ylmethyl-Derivates **38a** dargestellt und verläuft nach Anregung über ein intramolekulares Ionenpaar **38b**, welches mit Wasser zum Hemiacetal **38c** reagiert. Das instabile Hemiacetal **38c** zerfällt im Anschluss zum Cumarinaldehyd **39** und dem freien Diol **40** (Abbildung 14).^[137] Das bisher einzige Beispiel für ein photolysierbares 6-Ring-Acetal kommt von *Laguerre et al.* und beinhaltet einen Ester, welcher die Elektronendichte des Acetals stark herabsenkt, wodurch eine effiziente Photolyse ermöglicht wird.^[138]

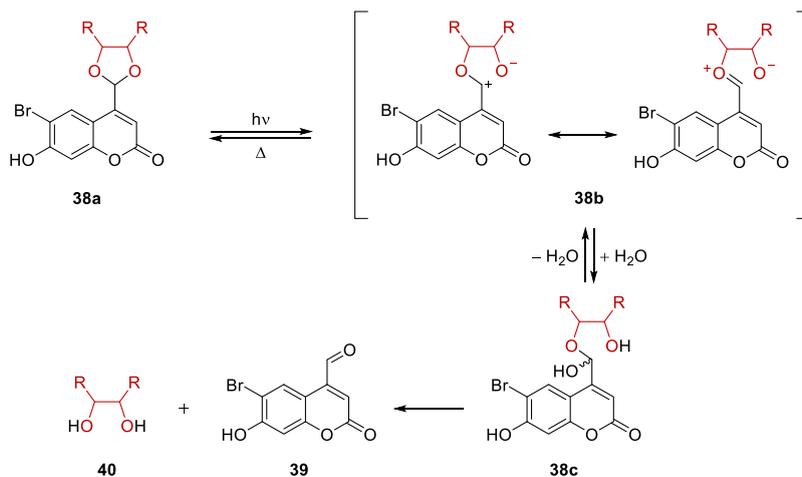
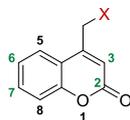


Abbildung 14: Mechanismus der Photolyse von (Cumarin-4-yl)methyl-geschützten Diolen.^[137]

Modifikationen des aromatischen Grundgerüsts

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden die Cumarine durch diverse Modifikationen als eine vielseitige photolabile Schutzgruppe etabliert. Durchgeführte Modifikationen zielten dabei insbesondere auf eine bathochrome Verschiebung der maximalen Absorptionswellenlänge ab, aber auch auf eine Erhöhung der Löslichkeit sowie Membrangängigkeit. Da Cumarine zur Verwendung in Farbstofflasern entwickelt wurden und auch breite Anwendung als Fluoreszenzmarker fanden, konnte bei der Etablierung dieser photolabilen Schutzgruppe auf ein breites Repertoire an Modifikationen zurückgegriffen werden.^[139] Dadurch konnten mit Hilfe geschickter Kombination verschiedener Substitutionen Absorptionsmaxima im grünen Bereich des Lichtes (~ 530 nm) erreicht werden. Im Folgenden soll ein Einblick in die vielfältigen Substitutions-Möglichkeiten gegeben werden. Ein Großteil der publizierten Modifikationen fällt dabei auf die C3-, C6- und C7-Position (Abbildung 15).

Aber auch Substitutionen der Carbonyl-Funktionalität (C2-Position) haben an Bedeutung gewonnen. Modifikationen an der C8-Position wurden hauptsächlich für die Optimierung der Löslichkeit^[132, 140-142] oder zur Immobilisierung verwandt,^[143] da sie nur einen geringen Einfluss auf das Absorptionsmaximum besitzen.^[144]



41

Abbildung 15: Coumarin-Grundgerüst (X = Abgangsgruppe).

Modifikationen der C7-Position

Die Coumarin-Grundstruktur **41** besitzt ein Absorptionsmaximum von $\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$ (Abbildung 16).^[117] Die Substitution der C7-Position mit elektronschiebenden Gruppen führt zu einer Rotverschiebung des Absorptionsmaximums, da dies eine Erhöhung des intramolekularen *Charge-Transfer*-Charakters und ein größeres Übergangsdipolmoment bewirkt.^[145-148] Durch die Variation der Substituenten des (Coumarin-4-yl)methyl-Grundgerüsts kann der $S_0 \rightarrow S_1$ Übergang stark beeinflusst werden.^[119] Dabei hängt das Ausmaß der entstehenden bathochromen Verschiebung von den Elektron-Donor-Eigenschaften des Substituenten ab. Während beim 7-Methylcoumarin **42** die Methyl-Gruppe eine Rotverschiebung des Absorptionsmaximums von $\sim 7 \text{ nm}$ bewirkt,^[149, 150] verursacht eine Alkoxy-Gruppe eine Verschiebung von bis zu $\sim 20 \text{ nm}$.^[117, 121, 125] Die Substitution mit einem Amin ermöglicht eine bathochrome Verschiebung von bis zu $\sim 40 \text{ nm}$ (7-Aminocoumarin **43a**)^[151] und durch alkylierte Amin-Funktionalitäten kann dieser Effekt, wie im Falle der Verbindungen **43b-d**, auf bis zu $\sim 90 \text{ nm}$ potenziert werden.^[152-154] Durch die elektronschiebenden Alkyl-Reste wird die Elektronendichte des Donors weiter erhöht. Somit wird das bei der Photolyse entstehende Coumarin-Kation besser stabilisiert, wodurch zusätzlich die Freisetzungsrates der Abgangsgruppe und damit auch die Quantenausbeute erhöht werden. Daher zählt insbesondere das (7-Diethylaminocoumarin-4-yl)methyl-Derivat **43c** zu den weiterverbreiteten photolabilen Schutzgruppen.^[37] Bei den (7-Hydroxycoumarin-4-yl)methyl-Derivaten **44a-d** ist eine Anregung für gewöhnlich nur im Bereich von $300\text{--}350 \text{ nm}$ möglich.^[37] Das alkylierte Amin-Coumarine **43c** kann hingegen auch weit oberhalb seines Absorptionsmaximums bei $400\text{--}450 \text{ nm}$ einer effizienten Photoreaktion unterzogen werden.^[155-157]

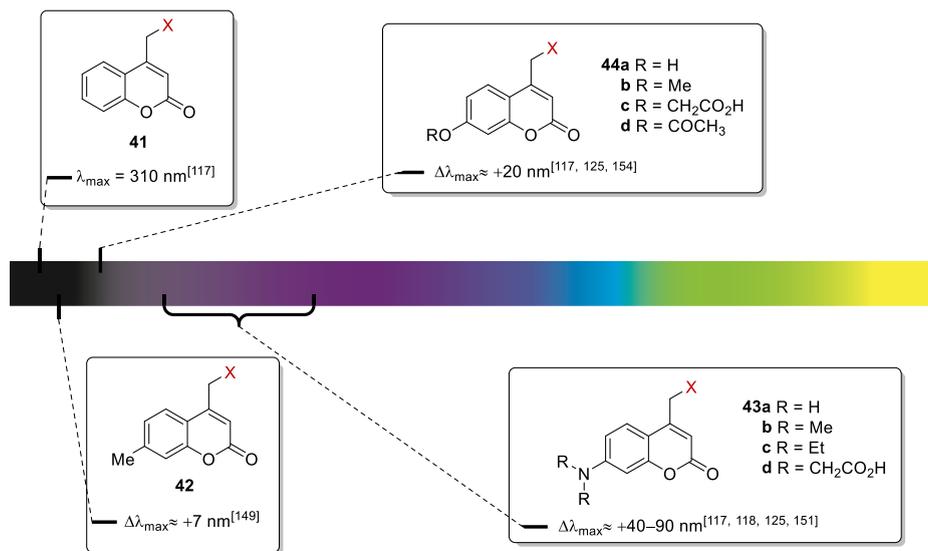


Abbildung 16: An der 7-Position modifizierte (Cumarin-4-yl)methyl-Derivate und der Einfluss auf ihre Absorptionsmaxima (X = Abgangsgruppe).⁷

Aufbauend auf diesen Grundgerüsten kann durch Modifikation der Alkylreste an der Hydroxy- bzw. Amin-Funktionalität zusätzlich eine Erhöhung der Löslichkeit und Membrangängigkeit erreicht werden. Dabei wird kein signifikanter Einfluss auf die übrigen photophysikalischen Eigenschaften genommen.^[158] So erhöhen das 7-Carboxymethoxy-Derivat **44c**^[125, 126] und das Biscarboxymethyl-Derivat **43d**^[132, 159, 160] deutlich die Löslichkeit und erleichtern eine Anwendung in biologischen Systemen. Die Nutzung eines Esters zur Maskierung der freien Hydroxy-Gruppe bei Verbindung **44d** hingegen führt zu einer Erhöhung der Membrangängigkeit.^[161, 162]

Weitere Modifikationen, welche entweder durch Populationsverringering unproduktiver Zustände oder Unterbindung unproduktiver nicht-strahlender Prozesse die Quantenausbeute erhöhen, wurden besonders am 7-Aminocumarin **43a** vorgenommen.^[163] Die Kombination von ebendiesem mit der Julolidine-Struktur liefert das Derivat **45**,^[164, 165] und die Einführung einer Azetidiny-Gruppe die Verbindung **46** (Abbildung 17).^[163] Beide weisen im Vergleich zum 7-Diethylamin-Derivat **43c** etwa 2–5-mal so hohe Quantenausbeuten bei der Freisetzung von substituierten Benzoesäuren auf.^[163] Bei identischer Abgangsgruppe und Lösungsmittel bewirkte die Julolidine-Modifikation zusätzlich eine leichte bathochrome Verschiebung der maximalen Absorptionswellenlänge im direkten Vergleich zum 7-Diethylaminocumarin **43c**.

⁷ Es sollte beachtet werden, dass in diesen Publikationen partiell unterschiedliche Lösungsmittel und Abgangsgruppen verwendet wurden. Diese besitzen einen Einfluss auf das Absorptionsmaximum. Somit sind die Werte aus verschiedenen Publikationen nur bedingt vergleichbar und können lediglich einen Trend abbilden.

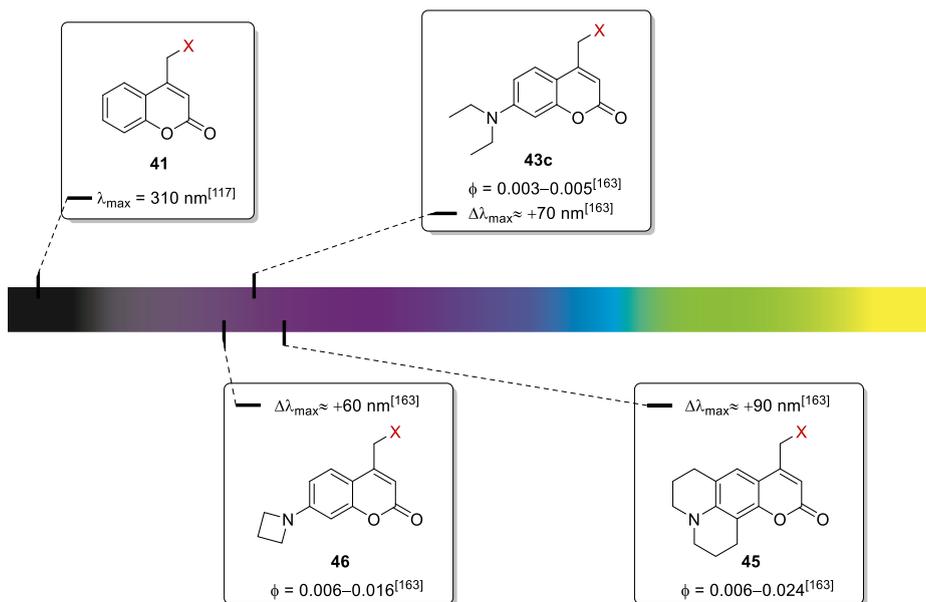


Abbildung 17: Modifikationen der (7-Aminocumarin-4-yl)methyl-Schutzgruppe zur Optimierung der Quantenausbeute (X = Abgangsgruppe).

Modifikationen der C6-Position

Die alleinige Substitution der 6-Position mit einem elektronenschiebenden Substituenten bewirkt zwar eine stärkere Rotverschiebung als an der 7-Position, es sinkt jedoch gleichzeitig die Effizienz der Photolyse aufgrund des deutlich geringeren Extinktionskoeffizienten.^[117, 119] Daher ist in der Literatur zum einen häufig die Substitution der 6- und 7-Position mit identischen Gruppen, wie beim Dimethoxycumarin **47a**, der hochlöslichen Variante **47b**^[125, 166, 167] und der Variante **47c** mit erhöhter Membrangängigkeit zu finden (Abbildung 18).^[168] Hierbei weisen diese die kombinierten Charakteristika der monosubstituierten Verbindungen auf und erreichen somit eine bathochrome Verschiebung von ~30–40 nm bei gleichbleibend effizienter Photolyse. Zum anderen zählt die Kombination einer elektronenziehenden Gruppe in der 6-Position und einer elektronenschiebenden Gruppe in der 7-Position zu den wichtigsten Modifikationen. Insbesondere das von *Furuta et al.* entwickelte (6-Brom-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl-Derivat **48a** erfreut sich einer breiten Anwendung.^[121, 169-173] Bei diesem bewirkt die Bromierung in *ortho*-Position eine Absenkung des pK_s-Wertes der Hydroxy-Gruppe. Somit liegt diese unter physiologischen Bedingungen deprotoniert vor. Dies hat sowohl eine starke Erhöhung der Löslichkeit in wässrigen Medien als auch eine signifikante Rotverschiebung (~60 nm) aufgrund des deutlich stärkeren +M-Effektes zur Folge.^[121] Das verwandte (6-Chlor-7-hydroxycumarin-4-yl)methyl-Derivat **48b** besitzt sehr ähnliche photochemische Eigenschaften,^[121] fand bisher jedoch keine breite Anwendung. Bei der Variante **48c** ist die freie

Hydroxy-Gruppe als Ester maskiert, wodurch eine Diffusion in Zellen ermöglicht wird. Nach intrazellulärer enzymatischer Hydrolyse weist das Molekül die photochemischen Eigenschaften der Verbindung **48a** auf und bleibt aufgrund ihrer Ladung in der Zelle eingeschlossen.^[174]

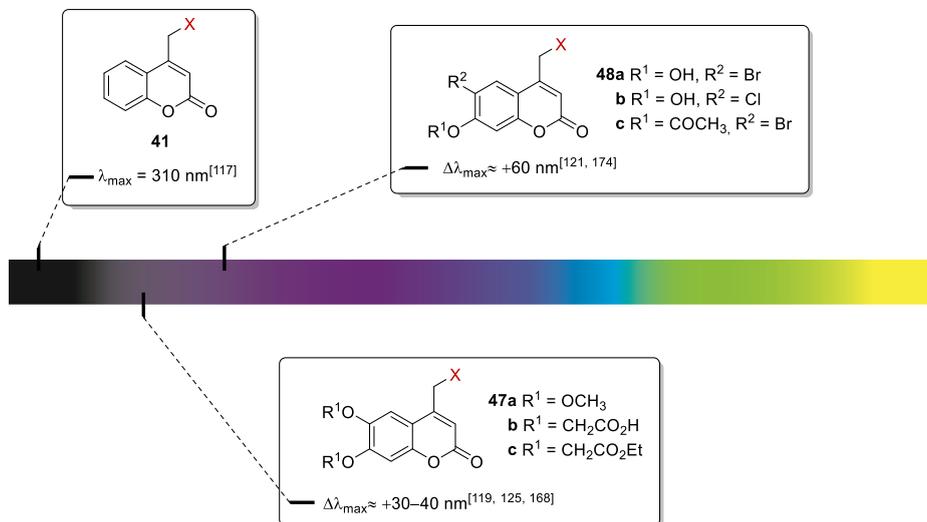


Abbildung 18: An der 6- und 7-Position modifizierte (Cumarin-4-yl)methyl-Derivate und der Einfluss auf ihre Absorptionsmaxima (X = Abgangsgruppe).⁸

Modifikationen der C3-Position

Einen deutlich stärkeren Einfluss auf das Absorptionsmaximum haben Modifikationen der 3-Position. Hierbei kann entweder durch Substitution mit einer elektronenziehenden Gruppe oder durch Erweiterung des π -Systems die signifikante Rotverschiebung erreicht werden. Diese Modifikationen werden in der Regel mit einer Substitution in der 7-Position kombiniert. Schon die einfache Substitution mit einer Nitril-Gruppe bewirkt eine bathochrome Verschiebung von $\sim 50 \text{ nm}$ und zeitgleich eine deutliche Reduktion der Absorption im Bereich von $340-360 \text{ nm}$ (Abbildung 19).^[175] Derselbe Effekt ist bei der synthetisch aufwendigeren DEAC450-Schutzgruppe **49** zu finden, welche besonders in der Neurobiologie angewandt wurde.^[176-179] Diese weist jedoch im Gegensatz zum 3-Cyanocumarin **50** neben einer höheren photolytischen Effizienz auch eine erhöhte Löslichkeit auf.^[176] Klausen *et al.* entwarfen eine Reihe von dipolaren Cumarin-Derivaten mit ausgedehntem π -System, wobei das 2-Vinylbenzothiazol-Derivat **51** die stärkste bathochrome Verschiebung mit bis zu $\sim 80 \text{ nm}$ im Vergleich zum 7-Diethylaminocumarin **43c** besitzt.^[180] Kele und Mitarbeiter konnten

⁸ Es sollte beachtet werden, dass in diesen Publikationen partiell unterschiedliche Lösungsmittel und Abgangsgruppen verwendet wurden. Diese besitzen einen Einfluss auf das Absorptionsmaximum. Somit sind die Werte aus verschiedenen Publikationen nur bedingt vergleichbar und können lediglich einen Trend abbilden.

ebenfalls mehrere, mit verschiedenen Heterocyclen konjugierte Cumarin-Derivate charakterisieren, welche zusätzlich ein quaternäres Amin aufweisen. Das methylierte 2-Vinylbenzothiazol-Derivat **52** wies aufgrund der Ladung nicht nur eine starke Rotverschiebung von bis zu ~150 nm auf sondern auch eine erhöhte Löslichkeit.^[181] Darüber hinaus wurde beobachtet, dass es durch stark elektronenziehende Gruppen in 3-Position, bedingt durch einen stark polarisierten angeregten Zustand, zu einer massiven Abnahme der Photolyse kommen kann.^[181]

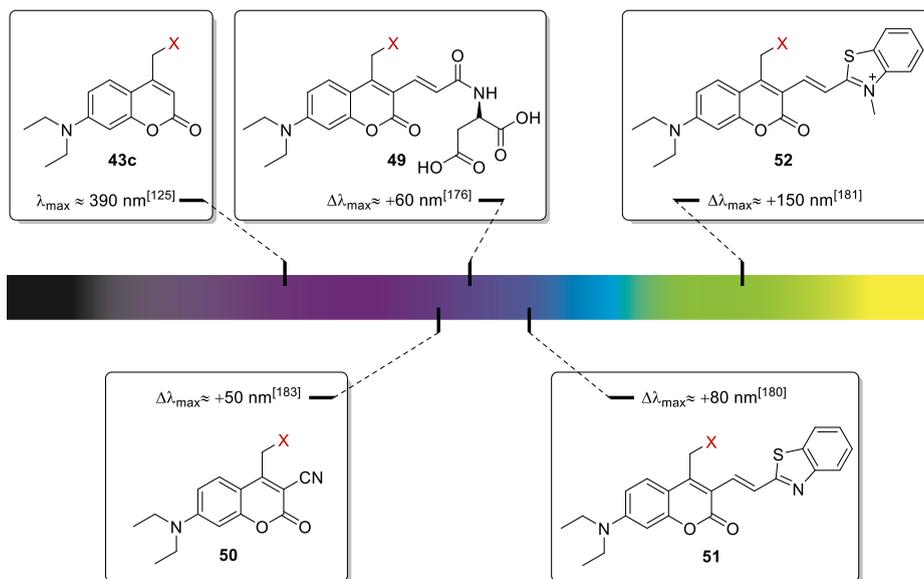


Abbildung 19: An der 3-Position modifizierte (Cumarin-4-yl)methyl-Derivate und der Einfluss auf ihre Absorptionsmaxima (X = Abgangsgruppe).⁹

Modifikationen der C2-Position

Sowohl *Fonseca et al.* als auch *Fournier et al.* konnten zeigen, dass Thiocumarine ebenfalls dazu in der Lage sind, als photolabile Schutzgruppe zu fungieren.^[150, 175, 182, 183] Die Thiocarbonyl-Einheit des Cumarin-Grundgerüsts bewirkt dabei eine Absenkung der angeregten Singulett- sowie Triplett-Zustände, sodass eine Anregung schon im sichtbaren Bereich des Lichtes erfolgen kann.^[184, 185] So zeigte das Thiocumarin **53** sowohl eine bathochrome Verschiebung von etwa ~80 nm als auch eine erhöhte Quantenausbeute ($\phi = 0.09\text{--}0.18$) im direkten Vergleich zu seinem Carbonyl-Analogon **43c** ($\phi = 0.003$) (Abbildung 20).^[175] *Lin et al.* konnten durch Kombination des Thiocumarin-Grundgerüsts

⁹ Es sollte beachtet werden, dass in diesen Publikationen partiell unterschiedliche Lösungsmittel und Abgangsgruppen verwendet wurden. Diese besitzen einen Einfluss auf das Absorptionsmaximum. Somit sind die Werte aus verschiedenen Publikationen nur bedingt vergleichbar und können lediglich einen Trend abbilden.

mit elektronenreichen *p*-Amino-Styryl-Gruppen die stärkste Rotverschiebung mit bis zu ~120 nm im Falle des Julolidin-Derivates **54** erreichen. Die starken Elektronendonoren stabilisieren das bei der Photolyse entstehende Kation und führen zu einer hohen Quantenausbeute ($\phi = 0.7$). Eine intramolekulare Zyklisierung, welche auf die Photolyse folgt, bewirkt eine Aufhebung der Konjugation zum Styryl-Rest, wodurch es zum *Photobleaching* kommt und somit der *Inner-Filter*-Effekt minimiert wird.^[186] Andere stark elektronenziehende Substituenten in der 2-Position wie die Dicyano-Gruppe der Verbindung **55** führen ebenfalls zu einer deutlichen bathochromen Verschiebung von ~100 nm. Darüber hinaus weisen Dicyano-Derivate im Vergleich mit den Thiocumarinen eine verbesserte Stabilität gegenüber sauren und basischen Bedingungen auf und sind somit besser für Anwendungen in biologischen Systemen geeignet.^[187, 188] Eine Verstärkung des bathochromen Effektes durch Erhöhung der elektronenziehenden Eigenschaften des Substituenten kann, wie bei Verbindung **56** durch Austausch der Cyano-Gruppe durch Phenyl-Reste mit unterschiedlichen Substitutionsmustern erreicht werden. Diese weisen jedoch nur noch sehr geringe Quantenausbeuten auf ($\phi = 0.5 \times 10^{-6}$).^[189]

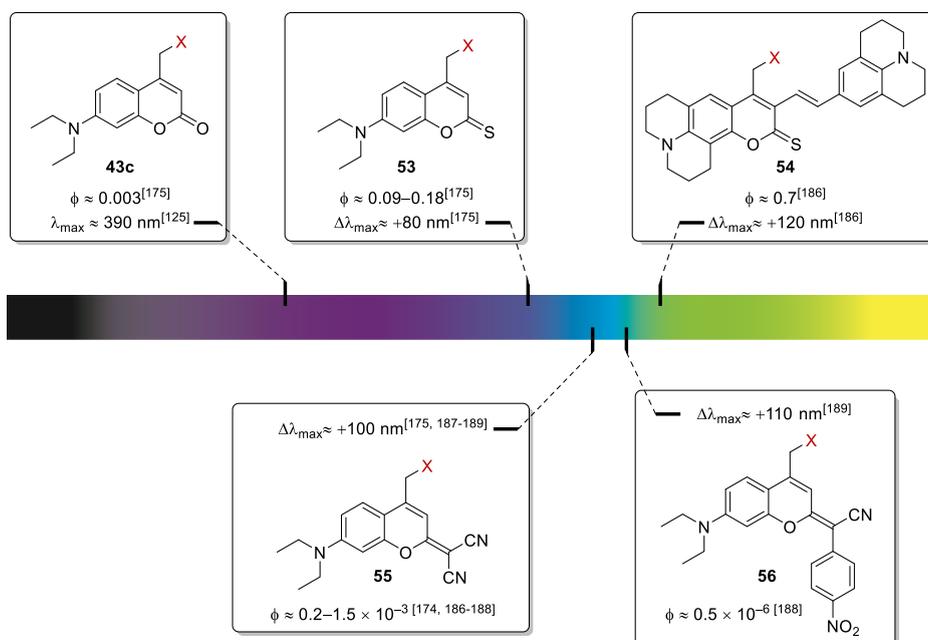


Abbildung 20: An der 2-Position modifizierte (Cumarin-4-yl)methyl-Derivate und der Einfluss auf ihre Absorptionsmaxima (X = Abgangsgruppe).¹⁰

¹⁰ Es sollte beachtet werden, dass in diesen Publikationen partiell unterschiedliche Lösungsmittel und Abgangsgruppen verwendet wurden. Diese besitzen einen Einfluss auf das Absorptionsmaximum. Somit sind die Werte aus verschiedenen Publikationen nur bedingt vergleichbar und können lediglich einen Trend abbilden.

3.1.2.3 Trimethyl-Lock-Derivate

Die Trimethyl-Lock-Gruppe (TML-Gruppe) ist ein Derivat der 2-Hydroxyhydrozimtsäure **57**, welches in der Lage ist, unter Bildung des Dihydrocumarins **58** über eine 6-*exo*-trig-Cyclisierung besonders schnell zu lactonisieren (Abbildung 21). Namensgebend und gleichzeitig Ursprung des außerordentlich schnellen Ringschlusses sind drei benachbarte Methyl-Gruppen, die eine konformative Restriktion der Seitenkette herbeiführen.^[190] Bei diesem System ist der geminale Disubstituenten-Effekt¹¹ besonders ausgeprägt und es wird eine Ratenbeschleunigung des Ringschlusses von bis zu 10^{11} erreicht. Bei den vergleichbaren 2-Hydroxyhydrozimtsäure-Derivaten **59a–d** fehlt diese konformative Einschränkung und die Lactonisierung verläuft signifikant langsamer (Abbildung 21).^[192]

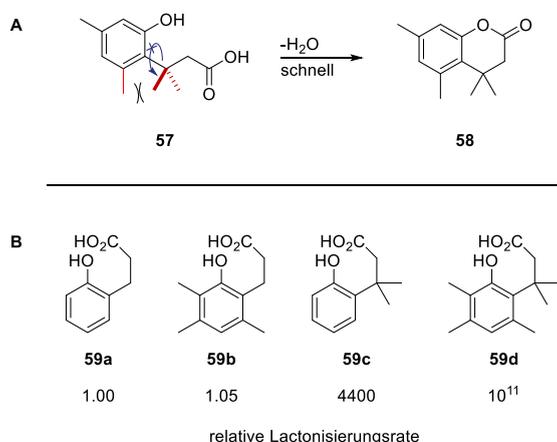


Abbildung 21: A) Trimethyl-Lock Lactonisierung zum Dihydrocumarin **58**. Die für die besondere Reaktivität benötigten Methyl-Gruppen, welche die freie Drehbarkeit einschränken, sind rot hervorgehoben.^[190, 193] B) Relative Reaktivität bezüglich der Lactonisierung von Trimethyl-Lock-Derivaten.^[190, 192]

Von *Cohen et al.* wurde diese hohe Ratenbeschleunigung auf die primäre Begünstigung des für die Lactonisierung zielführenden Konformers zurückgeführt und als *stereopopulation control* betitelt.^[192, 194-196] Aufgrund dieser ungewöhnlich hohen Ratenbeschleunigung wird die *stereopopulation control* als alleinige Ursache angezweifelt.^[191] In einer alternativen Hypothese wird die Ratenbeschleunigung der Lactonisierung zusätzlich auf eine Reduktion der Spannungsenergie im Grundzustand des Produktes zurückgeführt.^[197-200] Durch rechnerische Untersuchungen konnte der energetische Unterschied zwischen den freien Grundzustandsenergien (*free-energy ground-states*) von Trimethyl-Lock-Derivat **57** und Lacton **58** nur für eine 10^6 – 10^7 -fache Beschleunigung der Lactonisierung als

¹¹ Der geminale disubstituenten Effekt ist allgemein eine Bezeichnung für die Beschleunigung einer intramolekularen Zyklisierung, welche durch die Substitution von Wasserstoffatomen mit Alkylgruppen an einem Kohlenstoffatom zwischen den beiden Reaktionspartnern hervorgerufen wird.^[191]

ursächlich befunden werden.^[198, 201] Somit wurde die Ratenbeschleunigung, welche auf *stereopopulation control* zurückgeführt werden kann, auf 10^4 – 10^5 beziffert.^[197, 202]

Eine sofortige Lactonisierung der TML-Gruppe wird nur durch eine Modifikation des phenolischen Sauerstoffs verhindert, z.B. durch Bildung eines Ethers oder eines Esters,^[190] oder alternativ durch Maskierung als Benzochinon-Derivat.^[193] Durch geschickte Wahl der Modifikation kann so eine gezielte enzymatische,^[203, 204] (elektro-)chemische^[205, 206] oder photolytische^[207-209] Aktivierung durchgeführt werden. Dabei können Amine, Thiole und Alkohole freigesetzt werden, welche an der Carbonsäure in Form von Amid- bzw. (Thio-)estern vorliegen (Abbildung 22).^[193] Die TML-Gruppe zeichnet sich dabei nicht nur durch eine einfache Synthese, sondern auch durch vielfältige Anwendungen aus.^[193] Die Freisetzung von Fluorophoren,^[210, 211] Peptiden^[212, 213] und Arzneimitteln^[204, 214, 215] konnte so von verschiedenen Arbeitskreisen demonstriert werden.

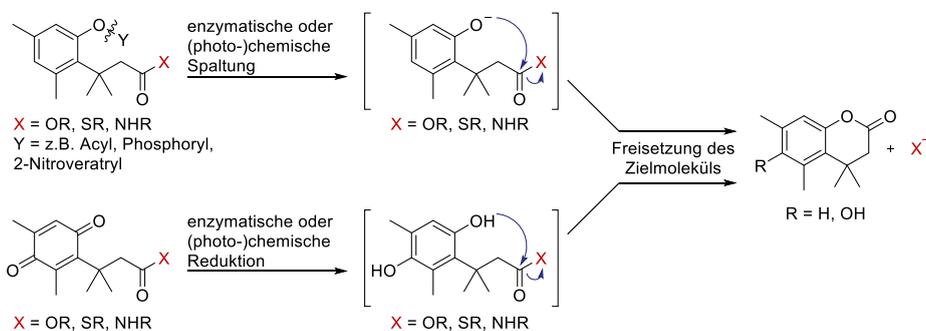
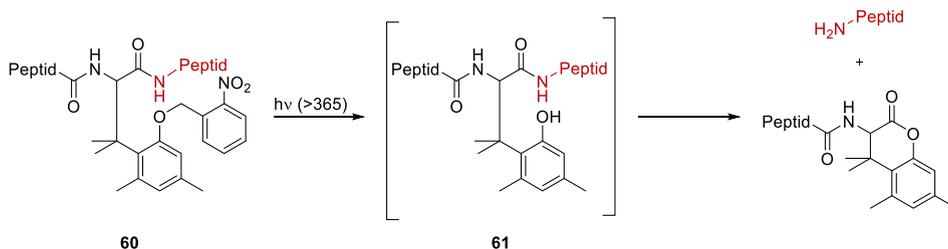


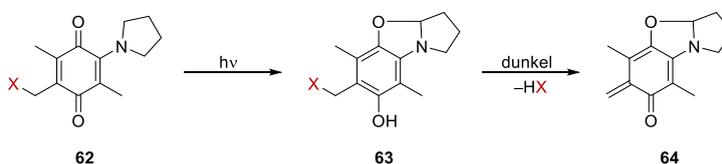
Abbildung 22: Die verschiedenen Prinzipien der Freisetzung von TML-geschützten Molekülen.^[193]

Die erste photosensitive TML-Gruppe wurde 2007 von *Shigenaga et al.* publiziert. Dabei wurde der phenolische Sauerstoff als *o*-Nitrobenzylether geschützt, um eine direkte Lactonisierung zu unterbinden (Schema 3). Durch kurze Bestrahlung des modifizierten Peptids **60** mit UV-Licht (>365 nm) konnte die photolabile *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe entfernt werden. Das N-terminale Peptid-Fragment wird durch Lactonisierung des entstandenen Intermediates **61** freigesetzt.^[207]



Schema 3: Nitrobenzyl-geschützte TML-Gruppe zur selektiven Freisetzung eines Peptids nach Bestrahlung mit UV-Licht (>365 nm).^[207]

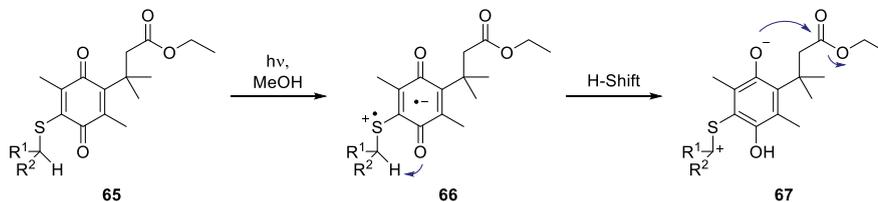
Dougherty und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine direkte photochemische Reduktion der TML-Gruppe zur gezielten Freisetzung von Alkoholen und Aminen genutzt werden kann. Die photochemischen Eigenschaften von *p*-Benzochinonen im Allgemeinen sind zwar schon seit etwa einem Jahrhundert bekannt,^[40, 216, 217] die involvierten Mechanismen werden jedoch auch bis heute noch näher untersucht.^[218, 219] Im Besonderen machten sich *Dougherty* und Mitarbeiter dabei die durch benachbarte Thioalkyl-^[220, 221] oder Aminoalkyl-Reste^[222-224] vermittelte intramolekulare Photoreduktion zu nutze. Von diesem Effekt machten zuvor bereits *Chen* und *Steinmetz* für die Freisetzung von Phenolen und Carbonsäuren aus dem Pyrrolidin-substituierten *p*-Benzochinon-Derivat **62** Gebrauch. Die Freisetzung nach Belichtung mit sichtbarem Licht (450–650 nm) erfolgt hier im Gegensatz zur TML-Gruppe durch eine Photocyclisierung zum Zwischenprodukt **63** mit anschließender Eliminierung im „Dunklen“, welche zusätzlich zur Freisetzung des Produktes das reaktive *o*-Chinonmethid **64** liefert (Schema 4).^[225, 226]



Schema 4: Übersicht über den zweistufigen Photolyse-Mechanismus bestehend aus Photo-Cyclisierung und anschließender Eliminierung.^[226]

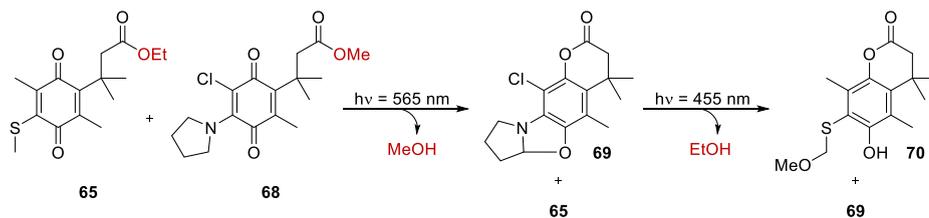
Bei der TML-Gruppe verläuft die Freisetzung ebenfalls in zwei voneinander unabhängigen Schritten, der intramolekularen photochemischen Benzochinon-Reduktion, gefolgt von der Trimethyl-Lock-Lactonisierung. Bei der Lactonisierung handelt es sich um eine thermische Reaktion. Dies ermöglicht eine gezielte Optimierung der Photolyse bezüglich Wellenlänge und Quantenausbeute, ohne die Geschwindigkeit der Freisetzung selbst zu verändern.^[209] Eine genaue Untersuchung des Mechanismus an dem Trimethyllock-Derivat **65** zeigte dabei, dass dieser über die ionische Zwischenstufe **66** abläuft.

Der nachfolgende irreversible H-Shift erfolgt dabei sowohl aus dem Singulett- als auch aus dem Triplett-Zustand und stellt den entscheidenden Schritt dar. Der nukleophile Sauerstoff des Hydrochinon **67** durchläuft die Lactonisierung unter Freisetzung des Produktes.^[227]



Schema 5: Mechanismus der photoinduzierten intramolekularen Reduktion.^[227]

Dabei konnte nicht nur eine effiziente Photolyse weit oberhalb des Absorptionsmaximums, sondern auch die Orthogonalität unterschiedlicher TML-Schutzgruppen demonstriert werden, indem eine Mischung der beiden TML-geschützten Alkohole **65** und **68** nacheinander mit unterschiedlichen Wellenlängen ($\lambda = 565 \text{ nm}$; $\lambda = 455 \text{ nm}$) beleuchtet wurde (Schema 6). Durch Reaktionskontrolle mittels NMR konnte zunächst die kontrollierte Freisetzung von Methanol und anschließend Ethanol sowie die entstehenden Nebenprodukte **69** und **70** beobachtet werden.^[209]



Schema 6: Orthogonale Freisetzung von verschiedenen Alkoholen durch Thiol- und Amin-substituierte TML-Schutzgruppen.^[209]

Bisher konnte die TML-Gruppe zur Bildung einer photosensitiven *Prodrug*,^[209] eines photoaktivierbaren Fluorophors^[209] und zum Aufbau von photolabilen Polymeren genutzt werden.^[228] Die Vorteile der TML-Gruppe sind dabei eine sauber ablaufende Photoreaktion, welche auch in wässrigen Medien die schnelle Freisetzung von schlechten Abgangsgruppen ermöglicht, und die Bildung von hypsochromen Photolyse-Produkten, wodurch im Gegensatz zu *o*-Nitrobenzyl- und Cumarin-4ylmethyl-Derivaten kein *Inner-Filter*-Effekt auftritt.^[209]

3.2 Orthogonale und wellenlängenselektive Anregungssysteme

3.2.1 Grundlagen

Das Konzept Orthogonalität in der Chemie wurde erstmals von *Barany* und *Merrifield* im Jahr 1977 beschrieben.^[229] Dort wurde ein orthogonales System als eine Kombination von Schutzgruppen definiert, bei welchem jede Schutzgruppe selektiv in Gegenwart der anderen abgespalten werden kann. Dabei bedarf es keiner definierten Reihenfolge, in der die Abspaltung zu erfolgen hat.^[229] Bei der Orthogonalität handelt es sich somit um einen Spezialfall der Chemoselektivität.^[230] In Bezug auf photolabile Schutzgruppen wird dieses Konzept als chromatische Orthogonalität bezeichnet und ist definiert als die Möglichkeit zur selektiven Anregung von verschiedenen photosensitiven Gruppen durch Bestrahlung mit Licht.^[231] Dabei wird als Selektionskriterium zumeist der Absorptionsunterschied bei definierten Wellenlängen ausgenutzt.^[26] Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 23 zu finden.

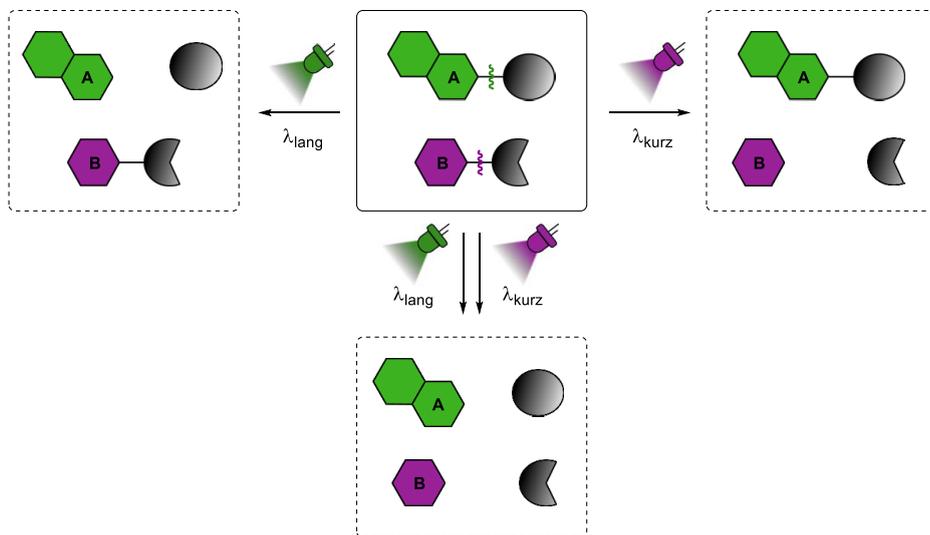


Abbildung 23: Schematische Darstellung der chromatischen Orthogonalität von zwei *photocaged compounds* (A und B) in Anlehnung an *Hansen et al.*^[26] Durch alleinige Belichtung mit der Wellenlänge λ_{lang} wird selektiv *photocaged compound* A adressiert. Alleinige Belichtung mit Wellenlänge λ_{kurz} spricht hingegen selektiv *photocaged compound* B an. Durch Belichtung mit beiden Wellenlängen (λ_{lang} und λ_{kurz}) erfolgt die Zersetzung von beiden *photocaged compounds*. Die Belichtung kann dabei in beliebiger Reihenfolge oder auch simultan erfolgen.

Die chromatische Orthogonalität stellt den Idealfall dar, welcher jedoch in der Realität nur schwer zu erreichen ist, da nahezu alle Chromophore eine signifikante Absorption im UV-Bereich aufweisen.^[26] Da beide photolabilen Schutzgruppen um die eingestrahlenen Photonen konkurrieren, hängt die Selektivität vor allem von der photolytischen Effizienz ($\epsilon\phi$) ab. Die photolytische Effizienz ist definiert als das Produkt von molarem Extinktionskoeffizienten (ϵ) und Quantenausbeute (ϕ). Dadurch werden sowohl die Fähigkeit des Chromophors zur Absorption von Photonen als auch der Anteil der absorbierten Photonen berücksichtigt, welcher zur Photolyse führt.^[232]

Durch Bildung des Quotienten der photolytischen Effizienzen können somit die optimalen Anregungswellenlängen bestimmt werden. Hierbei ergeben sich mehrere Möglichkeiten. In Abbildung 24A ist der Optimalfall der chromatischen Orthogonalität dargestellt. Dieser liegt vor, wenn nur eine minimale Überlappung zweier Absorptionsspektren¹² vorliegt und somit eine vollständige Selektivität erreicht werden kann. Dafür definieren *Kotzur et al.* einen Quotienten der photolytischen Effizienzen von ≥ 100 .^[132] Ist die photolytische Effizienz der Verbindung, welche bei der kürzeren Wellenlänge absorbiert, deutlich höher als die der langwelliger absorbierenden Verbindung ist auch hier eine verbesserte Selektivität erreichbar. Diese kann durch geschickt gewählte Konzentrationsunterschiede und Lichtquellen noch verstärkt werden.^[26] Zusätzlich ist in diesem Fall auch eine sequenzielle Freisetzung bei nur einer einzelnen Wellenlänge möglich (Abbildung 24B). Falls beide Chromophore stark überlappende Absorptionsspektren aufweisen, ist jedoch lediglich eine Photolyse in definierter Reihenfolge möglich, vorausgesetzt einer der Chromophore besitzt eine Absorptionsbande, welche sich zu einer längeren Wellenlänge erstreckt (Abbildung 24C). Wenn jedoch die Absorptionsspektren beider Chromophore nahezu vollständig überlagern, ist keine Wellenlängenselektivität erreichbar und die Kombination dieser Chromophore nicht geeignet für eine Anwendung (Abbildung 24D).^[232] Generell ist eine Selektivität jedoch nur zu erreichen, wenn nach Belichtung keine Interaktion der angeregten Chromophore in Form von beispielsweise Elektronentransfer, Energietransfer oder Bildung eines Exciplex¹³ (*Excited Complex*) erfolgt.^[232] Um dies in einer Anwendung sicherzustellen, muss eine ausreichend hohe Verdünnung gewählt werden, sodass die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion minimiert wird.^[231]

¹² Bei den im Kapitel 3.2.1 vorkommenden schematischen Liniendiagrammen handelt es sich um eine Auftragung des Produktes aus Extinktionskoeffizient ϵ und Quantenausbeute ϕ gegen die Wellenlänge λ . Diese werden im Folgenden als Absorptionsspektren bezeichnet.

¹³ Bei einem Exciplex handelt es sich um einen Komplex, welcher durch Interaktion eines elektronisch angeregten Moleküls und einem Molekül im elektronischen Grundzustand ausgebildet wird.^[233]

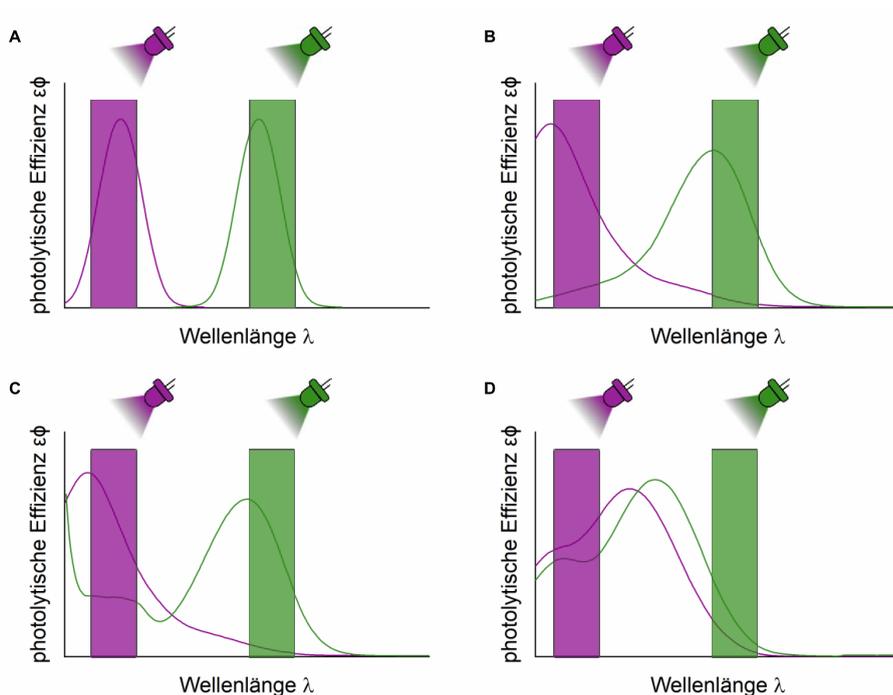


Abbildung 24: Übersicht über die Anregungsmöglichkeiten in Anlehnung an Peterson *et al.*^[232] **A)** Zwei Chromophore mit nicht überlappenden Absorptionsspektren, welche vollständig orthogonal angeregt werden können. **B)** Zwei Chromophore mit überlappenden Absorptionsspektren, welche aufgrund von unterschiedlicher photolytischer Effizienz selektiv angeregt werden können. **C)** Zwei Chromophore mit überlappenden Absorptionsspektren, welche nur sequenziell, angefangen bei der längeren Wellenlänge, adressiert werden können. **D)** Zwei Chromophore mit vollständig überlappenden Absorptionsspektren, welche keine Selektivität ermöglichen.

3.2.2 Wegbereitende Experimente

Die ersten Machbarkeitsnachweise für eine orthogonale Anregung wurden von Bochet *et al.* publiziert. Hierbei wurde zunächst eine 1:1-Mischung des 3',5'-Dimethoxybenzoin-Esters **71** und des 2-Nitroveratryl-Esters **72**, welche unterschiedliche Fettsäuren als Abgangsgruppen besitzen, mit 254 nm oder 420 nm bestrahlt (Abbildung 25). Die Fettsäuren unterscheiden sich dabei nur minimal in ihrer Kettenlänge. Dies hat keinen Einfluss auf die Reaktivität, ermöglichte jedoch eine einfache Analytik *via* GC, nachdem die freigesetzten Säuren durch Trimethylsilyldiazomethan methyliert worden sind. Nach Bestrahlung mit der kürzeren Wellenlänge konnte nach 5 min ein Verhältnis von 90:10 der beiden Ester **73** und **74** detektiert werden. Für die längere Wellenlänge wurde der Trend umgekehrt und nach Belichtung für 24 h ein Verhältnis von 15:85 gemessen.^[234] Hierbei konnte erstmalig demonstriert werden, dass kein intermolekularer Energietransfer auftritt, welcher noch in vorherigen Studien^[92] beobachtet wurde.^[234]

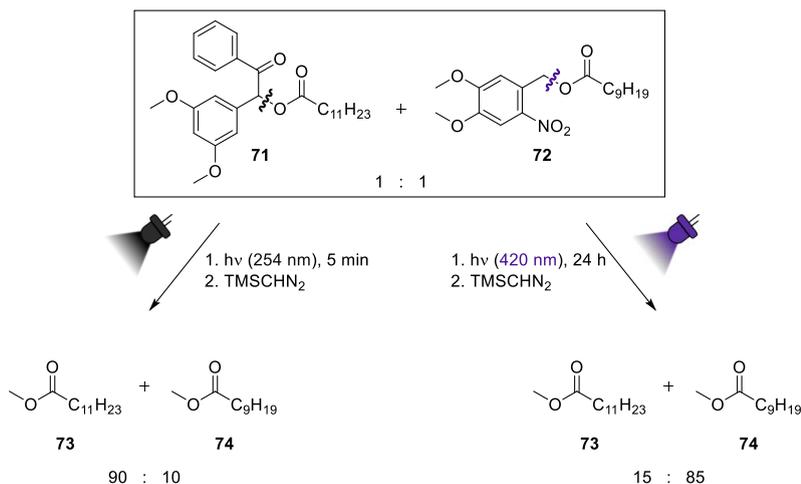


Abbildung 25: Orthogonale Photolyse von verschiedenen Estern zur Untersuchung des intermolekularen Energietransfers.^[234]

Durch die direkte Anbringung der 3',5'-Dimethoxybenzoin- und der 2-Nitroveratryl-Schutzgruppe an derselben α,ω -Dicarbonsäure, welche als flexibler *Spacer* mit unterschiedlichen Kettenlängen fungiert, konnte der intramolekulare Energietransfer untersucht werden (Abbildung 26A). Bei einer graduellen Verringerung der Kettenlänge des Diesters **75** von $n = 5$ auf $n = 0$ trat keine signifikante Reduktion der Selektivität auf. Dies zeigt, dass auch die Wahrscheinlichkeit für einen intramolekularen Energietransfer gering ist und nicht signifikant von der Entfernung abhängt.^[235] Durch eine zeitgleiche Optimierung von spektroskopischen und kinetischen Parametern konnte die Verwendung von zwei Schutzgruppen derselben Chromophor-Klasse anhand des Diesters **76** demonstriert werden (Abbildung 26B). Hierbei wurden sowohl durch Modifikation des *o*-Nitrobenzyl-Grundgerüsts die Absorptionseigenschaften bei 254 nm signifikant erhöht als auch durch Ausnutzung des kinetischen Isotopeneffektes¹⁴ die Quantenausbeute nach Bestrahlung bei 419 nm verringert.^[236]

¹⁴ Der primäre kinetische Isotopeneffekt beschreibt die Änderung der Reaktionsrate einer chemischen Reaktion, wenn einer der an der Reaktion beteiligten Atome durch ein entsprechendes Isotop ausgetauscht wird.

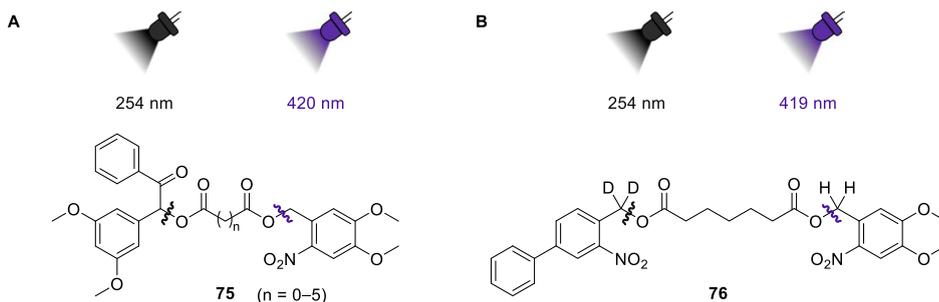


Abbildung 26: A) Wellenlängenselektive Entschützung von Diestern **75** mit unterschiedlichen Kettenlängen ($n = 0-5$) zur Untersuchung des intramolekularen Energietransfers. B) Wellenlängenselektive Entschützung des Diesters **76** unter Ausnutzung des Isotopeneffektes.

3.2.3 Anwendungsbeispiele

Der Nutzen der wellenlängenselektiven Anregung wurde zunächst vor allem in der Peptid-Synthese,^[237, 238] der Polymerchemie^[239, 240] und der Photolithographie^[241, 242] demonstriert. *Del Campo* und Mitarbeiter erreichten als erste die Kombination von mehr als zwei photolabilen Schutzgruppen. Dabei zeigten sie, dass auf einer Oberfläche aus den sieben verschiedenartigen Schutzgruppen, welche untersucht wurden, bis zu vier von ebendiesen mit Wellenlängen im Bereich von 255–435 nm einzeln selektiv adressiert werden können.^[243] Bei diesem Quartett wurde jedoch keine vollständige chromatische Orthogonalität erreicht und die photolabilen Schutzgruppen konnten nur sequenziell, angefangen bei der längsten Wellenlänge, adressiert werden. Zusätzlich wurden indessen auch vier neue Paare von photolabilen Schutzgruppen vorgestellt, welche eine chromatische Orthogonalität aufweisen.^[243] *Heckel* und Mitarbeiter konnten die sequenzielle Freisetzung von bis zu vier Oligonukleotiden nach Bestrahlung mit Wellenlängen im Bereich von 313–505 nm demonstrieren. Dazu wurden vier verschiedene *photocaged* Nukleoside **77a–d** in Oligonukleotide eingebaut (Abbildung 27). Bei der Photolyse der *p*-Hydroxyphenacyl-Schutzgruppe konnte allerdings ein signifikanter Schaden durch Thymin-Dimer-Bildung nach Bestrahlung für 10 min mit 313 nm beobachtet werden.^[244]

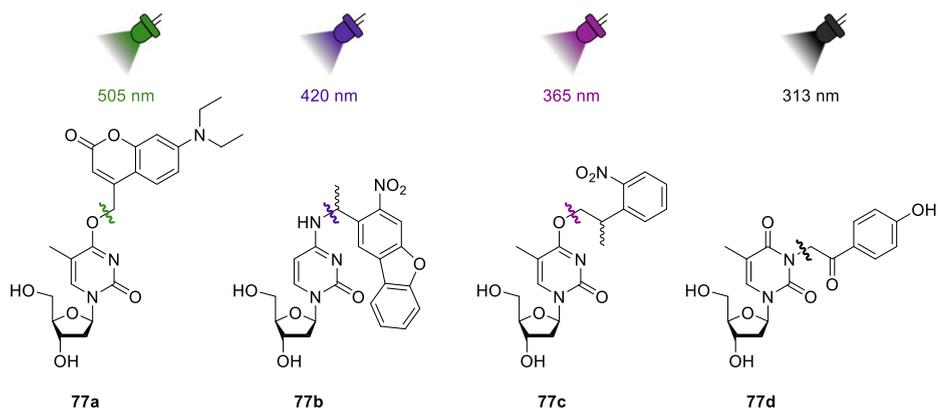


Abbildung 27: Photocaged Nucleoside 77a–d zum Einbau in Oligonukleotiden.^[244]

Für die effiziente Anwendung in einem biologischen Kontext stehen somit nicht alle photolablen Schutzgruppen zur Verfügung, da zum einen sehr lange Belichtungszeiten mit hochenergetischem Licht, wie sie bei *Bochet et al.*^[234-236] zu finden waren, vermieden werden müssen. Dies ist ein häufig gewähltes Mittel, um das langwelliger absorbierende Chromophor selektiv anzusprechen, welches nur einen geringen Extinktionskoeffizienten bei der gewählten Wellenlänge besitzt. Zum anderen kann eine Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge unterhalb von 300 nm zu Schädigung von Zellen führen.^[26] Die Entwicklung neuer photolabiler Schutzgruppen und die Modifikation dieser hin zu Absorptionsmaxima im sichtbaren Bereich des Lichts stellt eine wichtige Voraussetzung für die Diversifizierung der Anwendungen dar.

Die meisten bis heute publizierten Anwendungen beschränken sich aufgrund der genannten Herausforderungen noch immer auf die Kombination von maximal zwei photolablen Schutzgruppen. Für eine sequenzielle Entschützung in biologischen Systemen stellt die Verwendung von *o*-Nitrobenzyl-Derivaten und (Cumarin-4-yl)methyl-Derivaten eine häufig genutzte Kombination dar.^[132, 245, 246] Mit dieser Kombination konnte zum Beispiel die Aktivität der Wip1 Phosphatase moduliert werden, wodurch die Untersuchung von komplexen Phosphorylierungs-Prozessen an Proteinen ermöglicht wird. Die sequenzielle Belichtung der *photocaged* Phosphopeptide erfolgt dabei zunächst bei 420 nm und bewirkt die selektive Freisetzung des zuvor Cumarin-geschützten Phosphopeptids (Abbildung 28). Dieses kann anschließend von der Wip1 Phosphatase hydrolysiert werden. Die nachfolgende Bestrahlung mit 365 nm entschützt den Nitrophenethyl-geschützten Inhibitor, welcher das Enzym Wip1 deaktiviert. Bei diesem System handelt es sich somit um einen photochemischen An/Aus-Schalter der enzymatischen Aktivität der Wip1 Phosphatase.^[247]

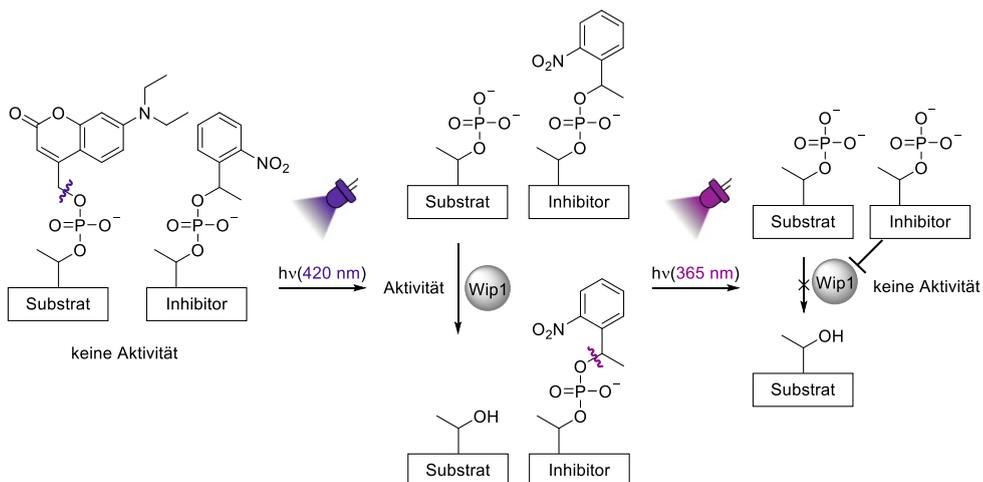


Abbildung 28: Beispiel für eine sequenzielle wellenlängenselektive Anregung, welche die Kombination *o*-Nitrobenzyl- und (Cumarin-4-yl)methyl-Chromophoren nutzt, um die Aktivität über die Wip1 Phosphatase zu modulieren.^[247]

Die Möglichkeit einer sequenziellen Entschützung bei nahezu identischen Absorptionsspektren durch unterschiedlich hohe Quantenausbeuten konnte von *Heckel* und Mitarbeitern demonstriert werden (Abbildung 29A). Die Differenz um mehrere Größenordnungen wird durch die Anbringung der identischen photolablen Schutzgruppe an unterschiedlichen Positionen am Molekül erreicht. Diese erfolgte entweder an einem Sauerstoff- oder einem Stickstoff-Atom.^[248] Der Quotient der photolytischen Effizienzen ($\epsilon\phi$) liegt für die beiden geschützten Nucleoside **77a** und **77e** bei ~ 350 , weshalb eine vollständige Selektivität für die Photolyse des *photocaged* Nucleosides **77a** bei nur einer verwendeten Wellenlänge erreicht werden konnte.

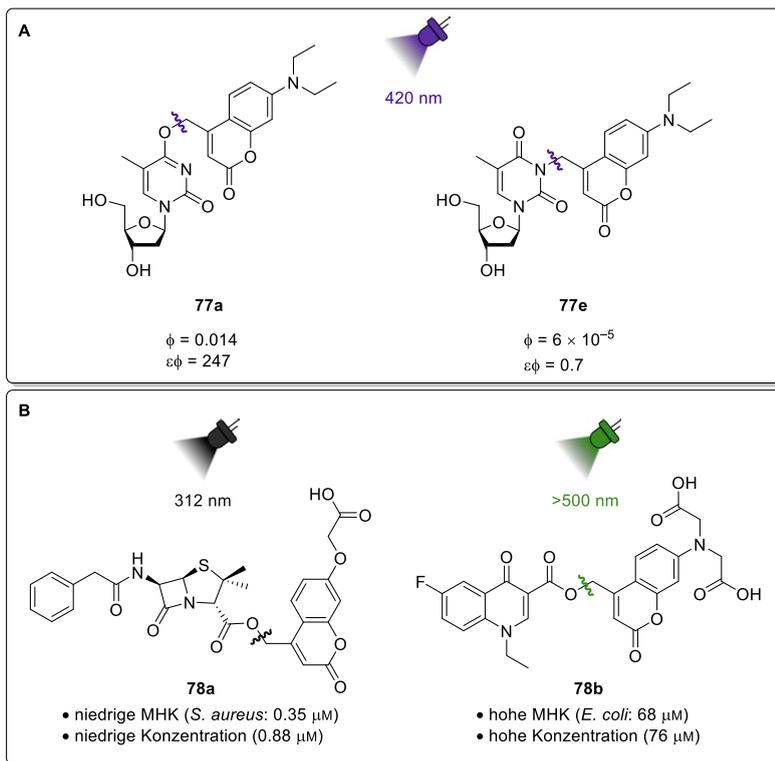


Abbildung 29: Beispiele für ein selektives Anregungssystem trotz überlappender Absorptionsspektren durch unterschiedliche Quantenausbeuten (A) und ein orthogonales Anregungssystem trotz überlappender Absorptionsspektren durch unterschiedliche Konzentrationen sowie Dosis-Wirkungs-Beziehungen (B).

Die Möglichkeit einer orthogonalen Steuerung bei stark überlagernden Absorptionsspektren wurde durch die Verwendung der photoaktivierbaren Antibiotika **78a** und **78b** auf Basis von Benzylpenicillin bzw. Fluorchinolon anhand der Kontrolle über das Wachstum zweier Bakterienstämme demonstriert (Abbildung 29B).^[249] Hierzu wurden ein Benzylpenicillin-resistenter *E. coli* Stamm und ein Fluorchinolon-resistenter *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) Stamm verwendet. Durch Bestrahlung bei >500 nm konnte selektiv das Fluorchinolon-Derivat **78b** adressiert und somit das Wachstum des Bakteriums *E. coli* verhindert werden. Die Anregung bei 312 nm hingegen erfolgte unselektiv aufgrund der signifikanten Absorption beider *photocaged* Antibiotika in diesem Wellenlängenbereich. Dennoch konnte durch Ausnutzung des nicht-linearen Charakters der Dosis-Wirkungs-Kurve selektiv das Wachstum des *S. aureus* Stammes gehemmt werden, da dieser eine niedrige minimale Hemmkonzentration (MHK) besitzt. Der verwendete *E. coli* Stamm hingegen besitzt eine um das ~200-fache höhere MHK, weshalb eine partielle Photolyse des photolabil-geschützten Fluorchinolons **78b** nicht für eine Wachstumsinhibierung ausreicht. Um dies zu gewährleisten, wurden die Konzentrationen der eingesetzten *photocaged* Antibiotika so gewählt, dass für den *E. coli* Stamm ausschließlich eine

nahezu vollständige Photolyse des Fluorchinolon-Derivates **78b** die MHK überschreitet, wohingegen schon ein Zerfall von 40 % der Benzylpenicillin-Verbindung **78a** zu einer Wachstumsinhibierung des *S. aureus* Stammes führt.^[249] Somit kann durch Einbeziehung von systemspezifischen Parametern auch bei überlagernden Absorptionsspektren eine orthogonale Steuerung erreicht werden.

Andere Möglichkeiten, um die Limitierung durch überlagernde Absorptionsspektren zu umgehen sind die Kombination von 1-Photonen- und 2-Photonen-Anregung, welche beispielsweise zur Steuerung der biologischen Entwicklung von Zebrafischen genutzt werden konnte.^[183]

3.3 Lichtgesteuerte Genexpression

Die Genexpression stellt einen zentralen Prozess in allen Lebewesen dar. Dabei werden die in den Genen enthaltenen Informationen zunächst in die messenger-RNA (mRNA) transkribiert, bevor diese zu Proteinen translatiert wird. Dieser Prozess kann auf diversen Ebenen reguliert werden. Die Verwendung von Licht als externer und orthogonaler Stimulus ermöglicht eine hohe Raumzeitauflösung und somit ein hervorragendes Werkzeug, um diese Prozesse zu steuern und zu untersuchen. In den letzten Jahrzehnten konnten sowohl Methoden zur lichtgesteuerten Regulierung der Transkription als auch der Translation etabliert werden. Es ist möglich, diese Schritte sowohl zu aktivieren als auch zu deaktivieren.^[250-252] Dazu können photolabil-geschützte DNA- (Abbildung 30A) oder mRNA-Stränge (Abbildung 30B) durch Belichtung freigesetzt werden, welche anschließend transkribiert bzw. translatiert werden. Alternativ können durch lichtgesteuerte Freisetzung von *photocaged* Effektormolekülen Transkriptionsfaktoren (Abbildung 30C) oder Translationsfaktoren moduliert werden (Abbildung 30D). Darüber hinaus existiert eine Vielzahl von Photorezeptoren.^[251, 252] Im Folgenden wird jedoch ausschließlich auf die lichtgesteuerte Genexpression durch kleine Effektormoleküle eingegangen.

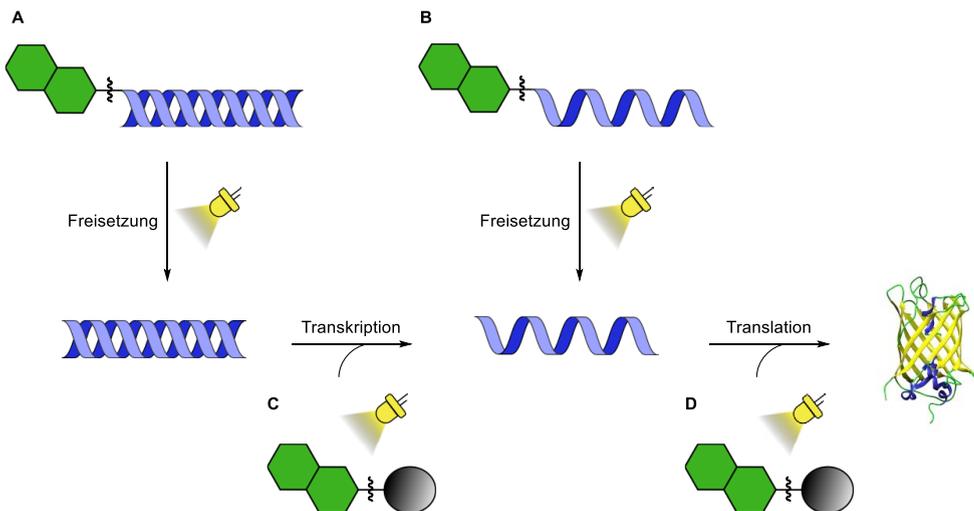


Abbildung 30: Verschiedene Möglichkeiten zur Kontrolle der Genexpression in Anlehnung an *Hartmann et al.*^[252] Freisetzung von *photocaged* DNA (A) bzw. *photocaged* mRNA (B) durch Bestrahlung mit Licht ermöglicht die Aktivierung der Transkription bzw. Translation. *Photocaged* Effektormoleküle ermöglichen eine lichtgesteuerte Regulation der Transkription (C) bzw. der Translation (D). (PDB: 2QU1)

3.3.1 In Eukaryoten

Die lichtgesteuerte Genexpression mittels kleiner organischer Moleküle fand ihren Ursprung in eukaryotischen Zellen mit dem Ziel, komplexe Zellprozesse, Zell-Zell-Kommunikation und die Regulation des Zellzyklus zu untersuchen. Hierbei kann die Kontrolle durch Licht einen Vorteil gegenüber etablierten Methoden bezüglich räumlicher und zeitlicher Auflösung ermöglichen.^[253] Die mit dieser Methode am ausgiebigsten untersuchten Systeme sind der Estrogenrezeptor und das Tetracyclin-on-System (Tet-on).

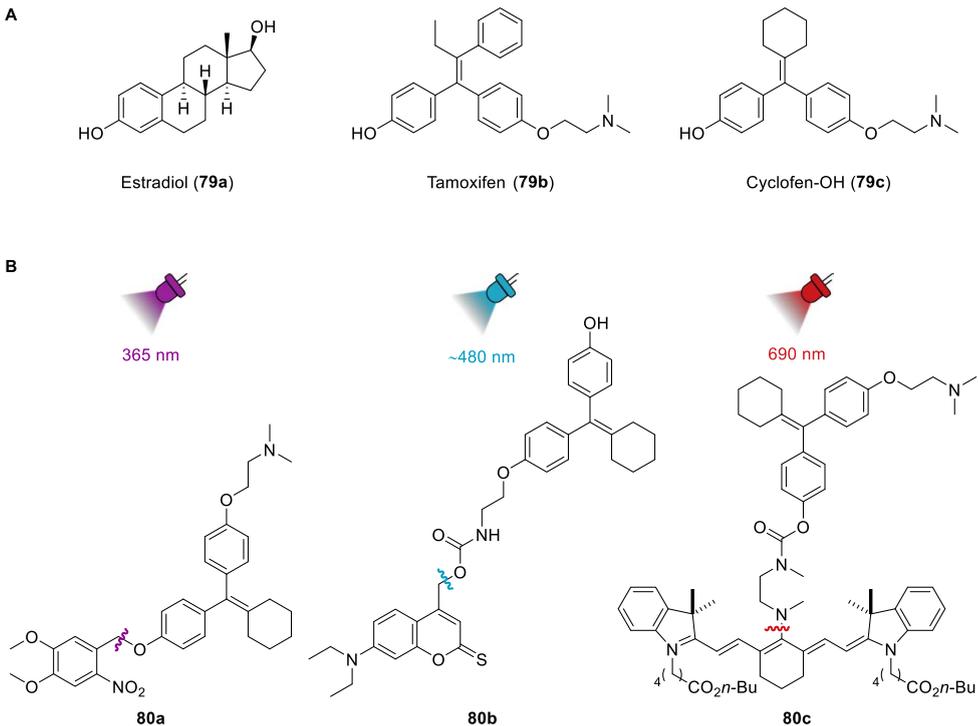


Abbildung 31: **A)** Auswahl der relevantesten Antagonisten des Estrogenrezeptors. **B)** Ausgewählte Beispiele der publizierten *photocaged* Antagonisten, welche in einem Bereich von 365–690 nm adressiert werden können.

Im Falle des Estrogenrezeptors, welcher als Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor die Genexpression aktivieren kann, wurden Antagonisten wie Estradiol (**79a**),^[253] Tamoxifen (**79b**)^[254] und das photochemisch stabilere Tamoxifen-Analogon Cyclofen-OH (**79c**)^[255] (Abbildung 31A) mit photolabilen Schutzgruppen versehen. Die Anwendbarkeit der daraus resultierenden *photocaged compounds* zur Regulation der Genexpression wurde in humanen Zelllinien (HEK293, HeLa),^[253, 254] in Pflanzen (*Arabidopsis*),^[256] in Maus-Fibroblasten (MEF)^[130, 257, 258] sowie in Zebrafischen^[183, 255, 259] demonstriert. Insbesondere Cyclofen-OH findet eine breite Anwendung, da dieses im Gegensatz zu

Estrogen nicht mit dem endogenen Estrogen-Stoffwechselweg interagiert und im Gegensatz zu Tamoxifen nach Bestrahlung weder eine Photoisomerisation noch eine Photodegradation auftritt.^[260] Dabei wurden Varianten publiziert, welche über einen breiten Bereich des Lichtspektrums (365–690 nm) angeregt werden können (Abbildung 31B). Für eine Anregung bei 365 nm eignet sich die 6-Nitroveratryl-Variante **80a**,^[255] wohingegen das Thiocumarin-Derivat **80b** bei 480 nm photolysiert werden kann. Letzteres konnte somit in Kombination mit 13-*cis*-Retinsäure für eine orthogonale Aktivierung von zwei verschiedenen Phänotypen in lebenden Zebrafisch-Embryonen genutzt werden.^[183] Das von *Gorka et al.* publizierte Cyanin-geschützte Cyclofen-OH **80c** ermöglicht sogar eine Adressierung im Nahinfrarot-Bereich (690 nm), wodurch ein tieferes Eindringen in Zellgewebe ermöglicht wird.^[261]

Die Steuerung der Genexpression durch die Regulator/Promotor-Kombination TetR/P_{tet} hingegen erfolgt über das photoaktivierbare Doxycyclin **81** (Abbildung 32) sowie entsprechende Strukturanaloga.^[262-265] Es wurde in Tabakblättern,^[262] in Hamster Zelllinien (CHO),^[262] in Maus-Zelllinien^[264] und Embryonen^[263] sowie Kaulquappen (*Xenopus laevis*)^[263] bereits erfolgreich zur Transgenexpression eingesetzt. Bisher wurde es jedoch nicht in Einzellern wie Bakterien oder Hefen erprobt.

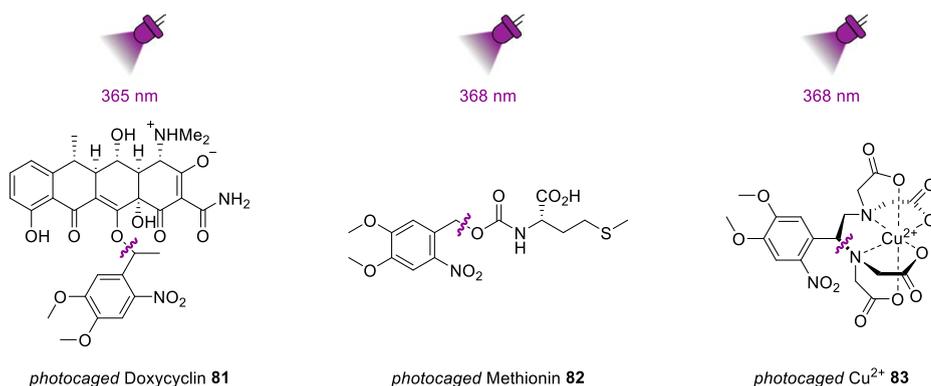


Abbildung 32: Ausgewählte publizierte *photocaged* Effektormoleküle zum Einsatz in Eukaryoten, welche durch UV-A Licht freigesetzt werden können.

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) wurde hingegen das 6-Nitroveratryl-geschützte Methionin **82** zur lichtgesteuerte Genexpression genutzt. Hierbei reprimiert Methionin nach Entschützung vorübergehend die Transkription des *YFP*-Gens unter Kontrolle des P_{MET17}-Promotors. Durch den Abbau des Methionins wird die Repression aufgehoben. Dies wurde genutzt, um ein hohes Maß an Kontrolle über das System zu erreichen, wodurch die Expression eines heterologen Proteins beliebig pausiert, gestoppt oder auch der Start verzögert werden konnte. Darüber hinaus konnten in

einem *Closed-Loop*-Ansatz mithilfe einer automatisierten online Fluoreszenzmessung angestrebte lineare Expressionsraten des *YFP*-Gens umgesetzt werden.^[266, 267] Ebenfalls in *S. cerevisiae* konnte unter Verwendung des *photocaged* Kupferions **83** die graduelle Kontrolle des Cu^{2+} -induzierbaren P_{CUP1} -Promotors demonstriert werden. Dies ermöglichte die Bestimmung des optimalen Induktionszeitpunktes zum Erreichen eines maximalen Expressionslevels.^[268]

3.3.2 In Bakterien

In einer frühen Publikation zur Verwendung von photolabilen Schutzgruppen in der Kohlenhydratchemie formulierten *Patchornik* und Mitarbeiter bereits die gezielte Freisetzung von Kohlenhydraten in einem biologischen System als eine potenzielle Anwendung.^[43] Die erste Umsetzung dieses Konzepts erfolgte 2007 durch *Young* und *Deiters*.^[269] Diese nutzten das 6-Nitropiperonyl *photocaged* IPTG **84a** (NP-cIPTG) zur lichtgesteuerten Freisetzung von IPTG (**1a**) und infolgedessen zur Aktivierung des $\text{LacI}/P_{\text{lac}}$ -Regulator-Promotor-Systems in *E. coli* BL21(DE3) (Abbildung 33, Tabelle 1). Hierbei erfährt der an den Lac-Operator gebundene LacI -Repressor durch eine allosterische Interaktion mit IPTG (**1a**) eine Konformationsänderung, wodurch er von der DNA gelöst wird. Die daraus resultierende Freilegung des P_{lac} -Promotors ermöglicht die Gentranskription durch die RNA-Polymerase und somit die Genexpression.^[270] Da IPTG in seiner photoaktivierbaren Form **84a** als Dioxan geschützt vorliegt, erfolgt die Freisetzung in einem zweistufigen Prozess. Die erste Stufe stellt dabei die Photolyse dar. Das dabei entstehende Ester-Gemisch wird in einem zweiten Schritt von Esterasen hydrolysiert, wodurch es zur Freisetzung des IPTGs (**1a**) kommt. *Binder et al.* nutzten ebenfalls das NP-cIPTG (**84a**), jedoch in einem optimierten $\text{LacI}/P_{\text{T7lac}}$ -Regulator-Promotor-System im Stamm *E. coli* Tuner(DE3), wodurch eine graduelle und homogene Regulation mit einer geringen Hintergrundexpression erreicht werden konnte.^[271] Dabei wurden die durch den zweistufigen Prozess zeitlich verzögerte Freisetzung und die damit einhergehende verringerte Raum-Zeit-Auflösung als Engpass erkannt. In darauffolgenden Publikationen konnte ein *High-Throughput-Screening*-System zur Bestimmung optimaler Expressionsparameter etabliert werden. Dazu wurde die Fluoreszenzsignalintensität des exprimierten Flavinmononukleotid-bindenden Fluoreszenzreporterproteins gemessen. Unter den hierdurch ermittelten Bedingungen stellte die Esterhydrolyse nicht mehr den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar und es konnte ein zum IPTG (**1a**) identisches Induktionsprofil erreicht werden.^[272] Die Anwendbarkeit der lichtgesteuerten Genexpression mittels NP-cIPTG (**84a**) konnte ebenso im biotechnologisch relevanten Organismus *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) demonstriert werden. Dabei wurde das $\text{LacI}/P_{\text{lac}}$ -Regulator-Promotor-System genutzt, um die Produktion des Sesquiterpens (+)-Valencen signifikant zu erhöhen.^[273]

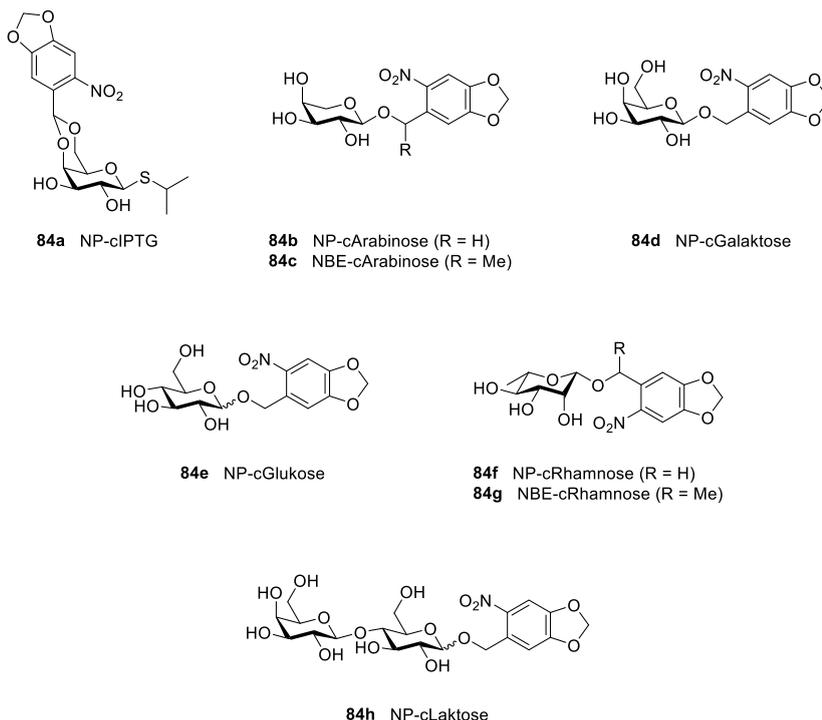


Abbildung 33: Übersicht über in Bakterien angewandte *photocaged* Effektormoleküle.

Bei den von *Binder et al.* entwickelten *photocaged* Arabinose-Derivaten **84b** und **84c** ist die photolabile Schutzgruppe über eine glykosidische Bindung angebracht, wodurch eine einstufige Freisetzung der L-Arabinose (**1b**) mittels Photolyse ermöglicht wird. Diese Verbindung konnte genutzt werden, um eine schnelle, graduell steuerbare und homogene Kontrolle über das AraC/P_{BAD}-Regulator-Promotor-System in *E. coli* LMG194 zu erlangen (Abbildung 33, Tabelle 1).^[77] Ebenso wurden weitere biologisch relevante Kohlenhydrate (Galaktose, Laktose, Glukose, Rhamnose) über eine glykosidische Bindung mit der 6-Nitropiperonyl- (NP) oder der 1-(6-Nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)ethyl-Schutzgruppe (NBE) versehen, woraus die *photocaged* Kohlenhydrate **84d–h** gebildet wurden.^[274] Eine *in vivo* Anwendbarkeit in *E. coli* konnte hierbei für *photocaged* Galaktose **84d**, Glukose **84e** und Rhamnose **84f–g** demonstriert werden. Während die Galaktose **84d** zur Aktivierung des LacI/P_{Tlac}-Regulator-Promotor-Systems genutzt wurde, wurde Glukose **84e** zur temporären Repression ebendieses Systems angewandt. Die photoaktivierbaren Rhamnose-Derivate **84f–g** wurden hingegen zur permanenten Repression des RhaRS/P_{RhaBAD}-Regulator-Promotor-Systems verwendet. Die NP-cLaktose (**84h**) erwies sich aufgrund einer verringerten *in vivo* Stabilität und der damit einhergehenden hohen Expression auch ohne vorherige Bestrahlung mit UV-A Licht als ungeeignet zur Verwendung in *E. coli*. Als ursächlich für die Instabilität wurde die enzymatische Hydrolyse durch

β -Galaktosidase betrachtet.^[274] Somit sind für die lichtgesteuerte Genexpression in Bakterien bisher ausschließlich Kohlenhydrate verwendet worden.

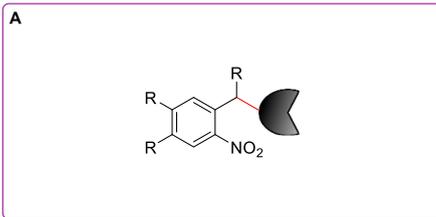
Tabelle 1: *Photocaged* Effektormoleküle zur Verwendung in Bakterien.

Effektor-molekül	<i>Photocaged compound</i>	Expressionswirt	Regulator-Promotor-System	Funktion	Ref.
IPTG	NP-cIPTG (84a)	<i>E. coli</i> BL21(DE3),	LacI/P _{lac}	Aktivierung	[269, 271-273, 275]
		<i>E. coli</i> Tuner(DE3), <i>C. glutamicum</i> ATCC13032	LacI/P _{T7lac} , LacI/P _{lac}		
L-Arabinose	NP-cArabinose (84b), NBE-cArabinose (84c)	<i>E. coli</i> LMG194	AraC/P _{BAD}	Aktivierung	[77, 274]
D-Galaktose	NP-cGalaktose (84d)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	LacI/P _{T7lac}	Aktivierung	[274]
D-Laktose	NP-cLaktose (84h)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	LacI/P _{T7lac}	Aktivierung	[274]
D-Glukose	NP-cGlukose (84e)	<i>E. coli</i> Tuner(DE3)	LacI/P _{T7lac}	Temporäre Repression	[274]
L-Rhamnose	NP-cRhamnose (84f), NBE-cRhamnose (84g)	<i>E. coli</i> Tuner(DE3)	RhaRS/P _{RhaBAD}	Permanente Repression	[274]

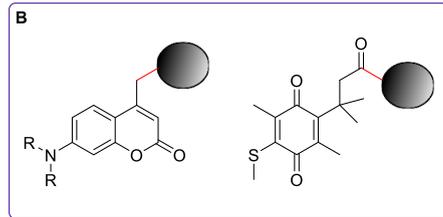
4 Ergebnisse und Diskussion

Im Hinblick auf die Etablierung eines wellenlängenselektiven Expressionssystems wurde zunächst eine Bibliothek verschiedener photolabiler Schutzgruppen angelegt. Zum einen sollten die *o*-Nitrobenzyl-Derivate als eine der am gründlichsten untersuchten photolabilen Schutzgruppen (PPG) die Basis für eine Anregung bei 375 nm bilden (Abbildung 34A).^[26] Zum anderen sollten Cumarinyl-Derivate aufgrund ihrer hohen Biokompatibilität und einfachen Modifizierbarkeit der maximalen Absorptionswellenlänge eine Plattform für die Anregung oberhalb von 400 nm bieten (Abbildung 34B).^[36]

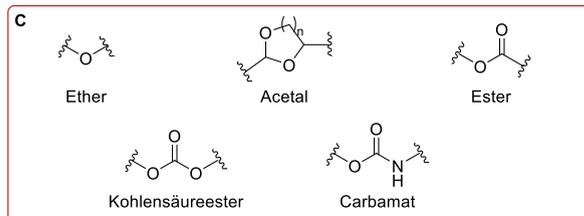
PPG für Belichtung bei ~375 nm



PPG für Belichtung bei >400 nm



Mögliche Verknüpfungen für PPG und Effektmoleküle



Wellenlängenselektive Entschützung

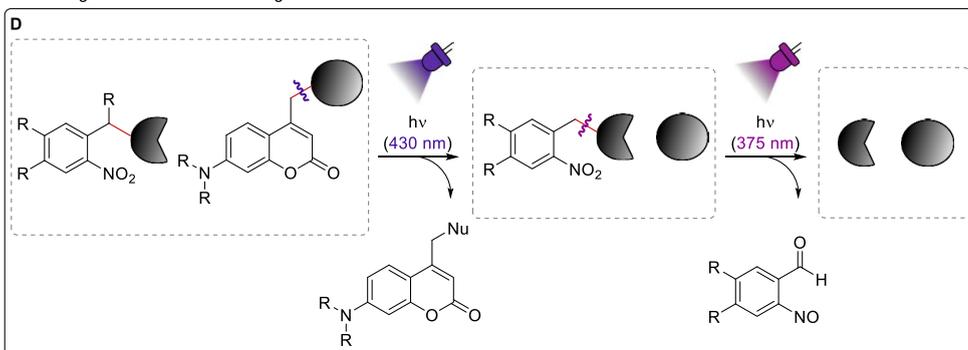


Abbildung 34: Übersicht über die einzelnen relevanten Komponenten zur Etablierung eines wellenlängenselektiven Systems. **A)** Photocaged compounds auf Basis der *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe und ihren Derivaten. **B)** Photocaged compounds auf Basis der (Cumarin-4-yl)methyl-Schutzgruppe und ihren Derivaten bzw. der TML-Schutzgruppe. **C)** Grundsätzlich denkbare Verknüpfungen zwischen photolabiler Schutzgruppe und Effektmolekül. **D)** Beispiel einer möglichen Kombination von photocaged compounds zur wellenlängenselektiven Freisetzung von beliebigen Effektmolekülen.

Die Kombination aus beiden sollte eine wellenlängenselektive Photolyse ermöglichen (Abbildung 34D). Es wurden sowohl bekannte als auch neuartige Derivate der etablierten *o*-Nitrobenzyl- und der (Cumarin-4-yl)methyl-Schutzgruppen hergestellt. Dabei wurden sowohl Derivate mit erhöhter Löslichkeit als auch verbesserter Membrangängigkeit oder größerem sterischen Anspruch synthetisiert. Zusätzlich wurde die TML-Schutzgruppe dargestellt, welche erst seit kurzem über photoaktivierbare Varianten verfügt und in Anbetracht ihrer ausgeprägten Absorption oberhalb von 400 nm eine interessante Alternative zur (Cumarin-4-yl)methyl-Schutzgruppe darstellt (Abbildung 34B). Da auf Seiten der zu schützenden Induktoren verschiedene funktionelle Gruppen wie Alkohole, Carbonsäuren oder Amine vorliegen, werden auch verschiedene funktionelle Gruppen auf Seiten der photolabilen Schutzgruppen benötigt. Hierbei ist theoretisch eine Verknüpfung über Ether, Acetale, Ester, Kohlensäureester und Carbamate (Abbildung 34C) durchführbar und somit eine hohe Flexibilität und Vielfalt bei der Synthese der *photocaged compounds* gewährleistet. Die an die *in vitro* Charakterisierung der synthetisierten *photocaged compounds* angeschlossenen *in vivo* Experimente wurden von M. Sc. Fabienne Hilgers durchgeführt.

4.1 Herstellung photolabiler Schutzgruppen

4.1.1 Synthese von *o*-Nitrobenzyl-Chromophoren

Ausgehend von der *o*-Nitrobenzyl-Grundstruktur **8a** wurde eine Reihe von Modifikationen angestrebt (Abbildung 35). Die 2-Nitroveratryl- und die 6-Nitropiperonyl-Chromophore **19** und **20a** sollten für eine verbesserte Absorption bei 375 nm sorgen. Diese Modifikationen gehen jedoch normalerweise mit einer verringerten Quantenausbeute einher.^[64] Derivate, welche einen Substituenten in α -Position (Struktur **20b**) besitzen, können dies jedoch wieder ausgleichen.^[37] Da die *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppen generell zu einer Verminderung der Löslichkeit der geschützten Effektormoleküle in wässrigen Medien führen, wurde die Synthese der 4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)benzyl-Schutzgruppe **85** anvisiert. Bei dieser sind die Löslichkeit erhöhenden Carbonsäuren zunächst noch als Ethylester maskiert. In dieser Form vermitteln sie eine verbesserte Membrangängigkeit. Nach der Entschützung der Carbonsäuren kann eine hohe Löslichkeit erreicht werden. Auch an dieser Schutzgruppe sollten Substitutionen in α -Position durchgeführt werden mit dem Ziel, sowohl die Quantenausbeute als auch den sterischen Anspruch zu erhöhen (Struktur **86**), um bei der Schützung von Carbonsäuren in Form von Estern eine bessere Stabilität gegenüber Esterasen zu ermöglichen.

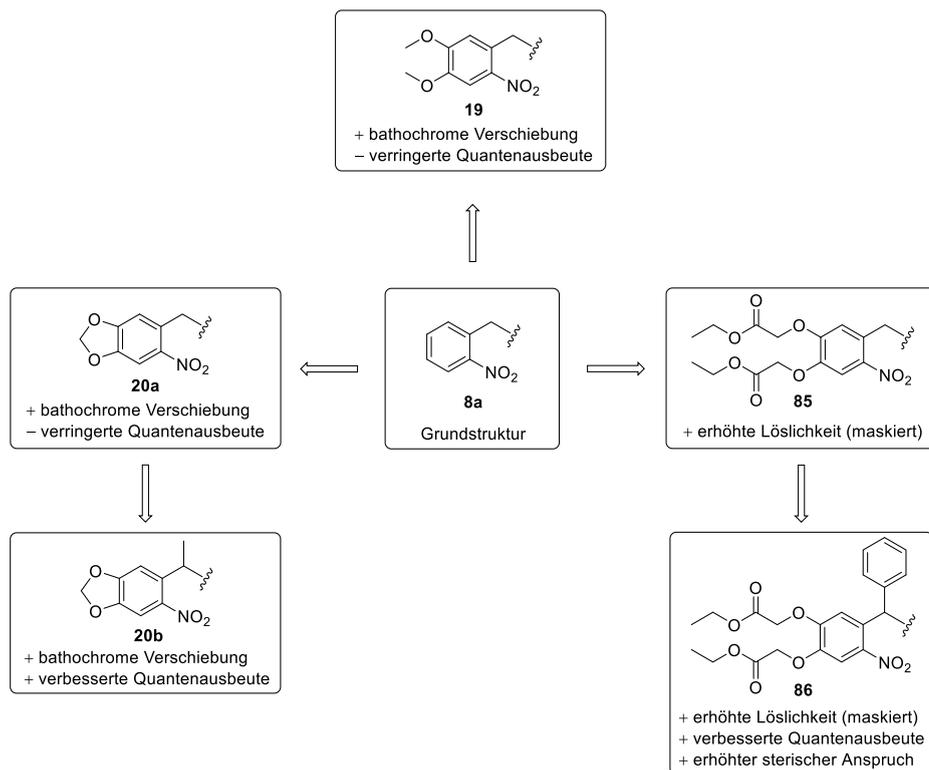


Abbildung 35: Übersicht über die Vor- und Nachteile der einzelnen modifizierten Grundgerüste der Nitrobenzyl-Schutzgruppe, welche zur späteren Anbringung an Effektmolekülen synthetisiert werden sollen.

4.1.1.1 Kommerziell erhältliche und vorrätige o-Nitrobenzyl-Derivate

Zunächst wurde sowohl auf die kommerziell erhältlichen photolabilen Schutzgruppen wie 2-Nitrobenzaldehyd (**87**) und 2-Nitrobenzylalkohol (**88**), als auch auf Verbindungen zurückgegriffen, welche aus der vorausgegangenen Dissertation von Dr. *Claus Bier* stammen. Dabei handelt es sich um 6-Nitropiperonal (**89**), 6-Nitropiperonylalkohol (**90**) und 1-(6-Nitrobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethylalkohol (**91**) (Abbildung 36).

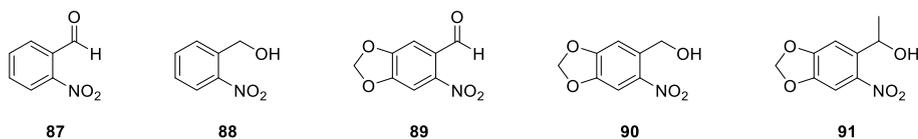
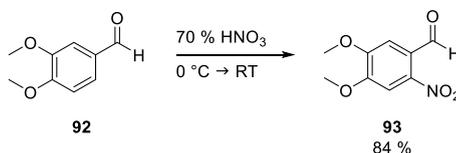


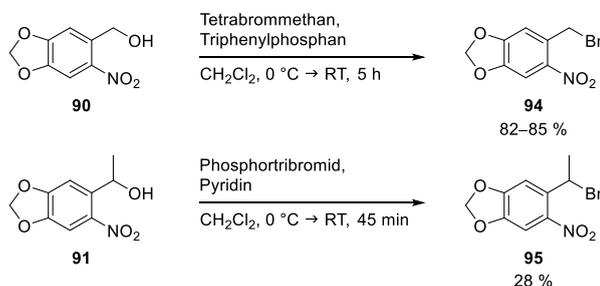
Abbildung 36: Grundstock an photolabilen Schutzgruppen.

Zusätzlich wurde der kommerziell erhältliche 3,4-Dimethoxybenzaldehyd (**92**) nach einer Vorschrift von *Kumar et al.* mit 70 %iger Salpetersäure zum 6-Nitroveratrumaldehyd (**93**) nitriert (Ausbeute: 84 %; Schema 7).^[276] Dieser ähnelt in seinen Eigenschaften stark dem 6-Nitropiperonal (**89**) und stellt eine häufig eingesetzte Alternative dar.



Schema 7: Synthese von 6-Nitroveratrumaldehyd (**93**).

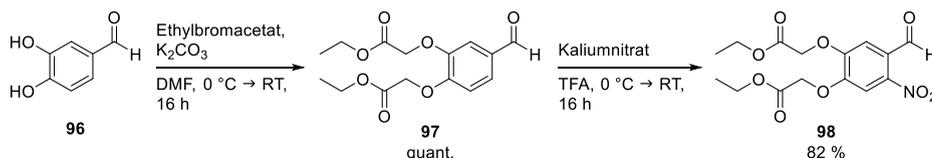
Die Aldehyde **87**, **89**, und **93** sind zur Acetalisierung von Diolen geeignet. Die Alkohole **88**, **90** und **91** hingegen können zur Schützung von Carbonsäuren in Form von Estern verwendet werden. Um Alkohole oder Phenole über Ether schützen zu können, wurden die Bromide **94** und **95** synthetisiert. Um das Bromid **94** des 6-Nitropiperonylalkohols (**90**) zugänglich zu machen, wurde die *Appel*-Reaktion^[277] verwendet, welche das Produkt **94** in sehr guten Ausbeuten (82–85 %) lieferte (Schema 8). Für den 1-(6-Nitrobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethylalkohol (**91**) wurde eine Bromierung mittels Phosphortribromid durchgeführt, welche im Vergleich zur Literatur jedoch nur mit schlechten Ausbeuten von 28 % ablief (Lit.: 85–89 %).^[278, 279] Dies könnte auf eine zu kurze Reaktionsdauer oder ein nicht ausreichend getrocknetes Lösungsmittel zurückzuführen sein.



Schema 8: Synthese von 6-Nitropiperonylbromid (**94**) und 1-(6-Nitrobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethylbromid (**95**).

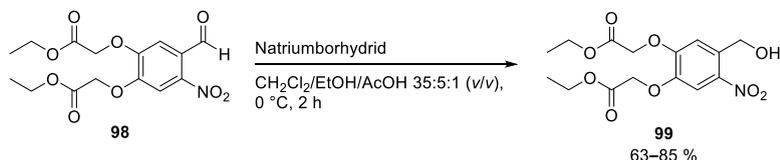
4.1.1.2 *o*-Nitrobenzyl-Derivate mit erhöhter Löslichkeit und Membrangängigkeit

Sowohl die *o*-Nitrobenzyl-, die 2-Nitroveratryl-, als auch die 6-Nitropiperonyl-Chromophore vermitteln bei Verwendung als photolabile Schutzgruppe nur eine geringe Löslichkeit in wässrigen Medien und setzen die Löslichkeit des Effektormoleküls deutlich herab. Nach einer Vorschrift von *Ni et al.* wurde 3,4-Dihydroxybenzaldehyd (**96**) mit Ethylbromacetat in einer *Williamson*-Ethersynthese quantitativ zum 4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)benzaldehyd (**97**) umgesetzt (Schema 9). Die anschließende Nitrierung mittels Kaliumnitrat in Trifluoressigsäure lieferte den 4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzaldehyd (**98**) mit einer Ausbeute von 82 %.^[113]



Schema 9: Syntheseroute zur Darstellung von 4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzaldehyd (**98**).

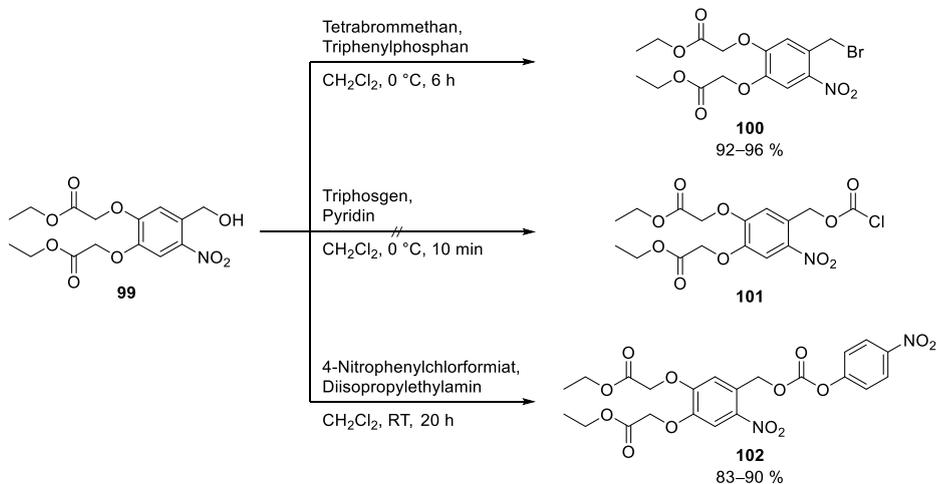
Der Aldehyd **98** kann entweder direkt zur Acetal-Bildung eingesetzt werden oder durch Reduktion mittels Natriumborhydrid nach einer Vorschrift von *Ni et al.* zum 4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzylalkohol (**99**) umgesetzt werden (Ausbeute: 63–85 %; Schema 10). Die Syntheseroute bis hin zum 4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzylalkohol (**99**) konnte mit Ansatzgrößen im ~10 g Bereich bei gleichbleibenden Ausbeuten durchgeführt werden.



Schema 10: Synthese des 4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzylalkohol (**99**).

Dieser primäre Alkohol **99** ist nicht nur zur direkten Schützung von Carbonsäuren geeignet, sondern er stellt auch eine gute Basis für weitere Modifikationen dar (Schema 11). Über eine *Appel*-Reaktion in Anlehnung an eine Vorschrift von *Tietze et al.* konnte die halogenierte Verbindung **100** in zuverlässig hohen Ausbeuten (92–96 %) erhalten werden.^[280] Diese sollte die Anbringung von beliebigen Nucleophilen ermöglichen. Dies sollte ebenso über das Chlorformiat **101** und den aktivierten Kohlensäureester **102** erfolgen. Bei der Umsetzung mit Triphosgen in Pyridin zum Chlorformiat **101** konnte das Produkt jedoch nicht eindeutig identifiziert werden. Die alternative Synthese zum aktivierten Kohlensäureester **102** lief hingegen mit Ausbeuten von bis zu 90 % ab. Der aktivierte

Kohlensäureester besitzt zusätzlich den Vorteil, dass er bei Raumtemperatur lagerstabil ist und somit in großem Maßstab synthetisiert und über mehrere Monate gelagert werden kann.



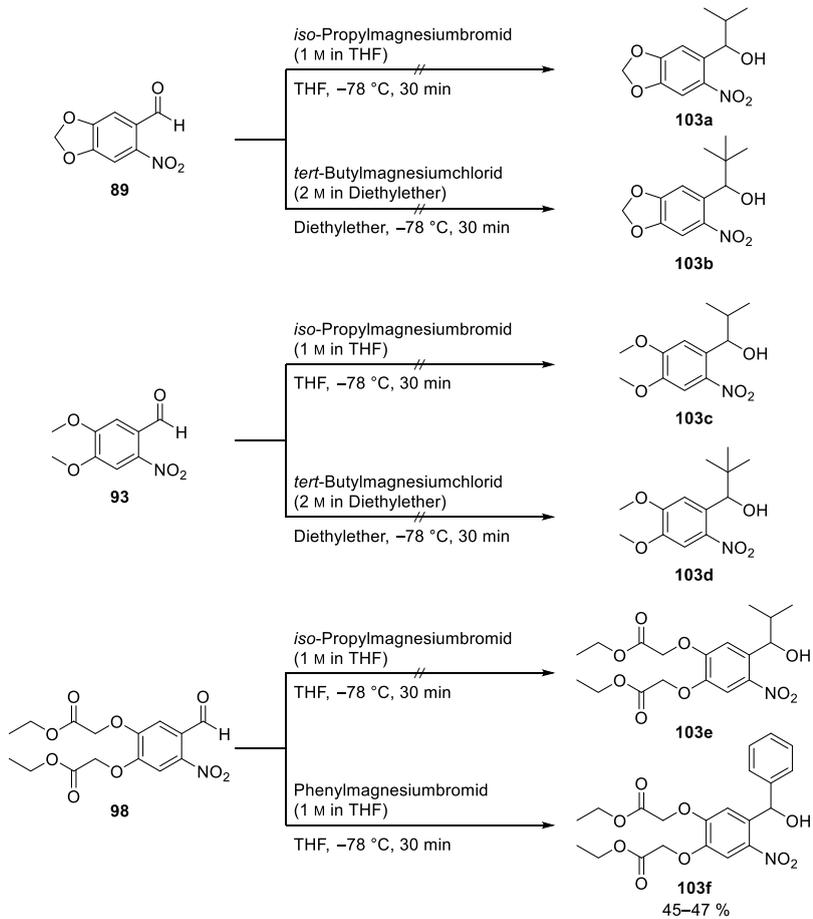
Scheme 11: Synthesen ausgehend von 4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzylalkohol (**99**).

4.1.1.3 *o*-Nitrobenzyl-Derivate mit erhöhtem sterischem Anspruch

Die *o*-Nitrobenzyl-Derivate sollten durch eine Erhöhung des sterischen Anspruchs in α -Position zum einen eine verbesserte Stabilität gegenüber Esterasen ermöglichen. Zum anderen sollte diese Modifikation zu einer vereinfachten H-Abstraktion durch Stabilisierung des benzylichen Radikals beitragen, was einen positiven Effekt auf die Quantenausbeute hat.^[36, 69, 75]

Die Synthese von Derivaten mit erhöhtem sterischem Anspruch verlief jedoch nur mit mäßigem Erfolg (Schema 12). So lieferte die *Grignard*-Reaktion unter Einsatz von Isopropyl- und *tert*-Butylmagnesiumhalogeniden bei 6-Nitropiperonal (**89**) und 6-Nitroveratrumaldehyd (**93**) trotz eines unvollständigen Umsatzes eine Vielzahl von Nebenprodukten. Dabei machten die gewünschten Produkte **103a–e** jeweils nur einen Anteil von weniger als fünf Prozent aus. Dies ist vor allem der Nitro-Gruppe zuzuschreiben, da Nitroarene ebenfalls mit *Grignard*-Reagenzien reagieren können. Dabei verläuft die Reaktion bei Alkylmagnesiumhalogeniden über eine konjugierte 1,4- bzw. 1,6-Addition. *Bartoli et al.* konnten zeigen, dass bei einer kompetitiven Reaktion von Methylmagnesiumbromid mit Nitrobenzol und Benzaldehyd auch bei -70°C kein selektiver Angriff abläuft.^[281] Daher wurde diese Strategie nicht weiterverfolgt. Arylmagnesiumhalogenide hingegen reagieren in einer 1,2-Addition.^[282] Während eine Umsetzung des 4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzaldehyd (**98**) mit Isopropylmagnesiumbromid keine signifikante Produktbildung aufwies,

konnte mittels Phenylmagnesiumbromid der sekundäre Alkohol **103f** immerhin in einer Ausbeute von 45–47 % erhalten werden. Bei dieser Reaktion war es entscheidend, auf eine kurze Reaktionszeit und eine konstante Temperatur von $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu achten, da ansonsten das entstandene Benzhydrol-Derivat **103f** zersetzt wurde.^[283] Eine alternative, erfolgversprechende Synthese^[284] unter Verwendung der entsprechenden Triisopropyl- und Tri-*tert*-butylaluminium Reagenzien wurde nicht mehr durchgeführt.



Schema 12: Erprobte *Grignard*-Reaktionen zur Darstellung von sterisch anspruchsvollen *o*-Nitrobenzyl-Derivaten.

Eine abschließende Übersicht über die synthetisierten photolabilen Schutzgruppen auf Basis des *o*-Nitrobenzyl-Chromophors ist in Abbildung 37 zu finden.

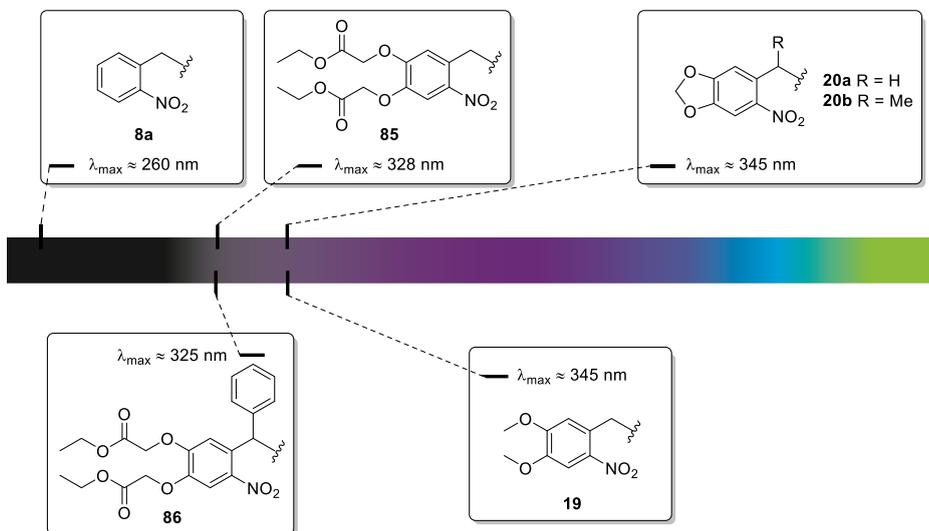


Abbildung 37: Übersicht über die synthetisierten *o*-Nitrobenzyl-Derivate und den Einfluss der Modifikationen auf ihre Absorptionsmaxima.

4.1.2 Synthese von (Cumarin-4-yl)methyl-Chromophoren

Um den Zugang zu einem lichtgesteuerten orthogonalen bzw. wellenlängenselektiven Genexpressions-System zu ermöglichen, wurde zunächst eine Reihe von (Cumarin-4-yl)methyl-Derivaten mit unterschiedlichen Eigenschaften hergestellt. Dabei wurde ein besonderer Fokus auf eine bathochrome Verschiebung im Vergleich zu den *o*-Nitrobenzyl- und 6-Nitropiperonyl-Derivaten gelegt, da dieser eine hinreichende Bedingung für eine orthogonale Freisetzung darstellt. Des Weiteren wurden Derivate mit erhöhter Löslichkeit synthetisiert, sowie eine Variante, bei welcher der Induktor über einen *Spacer* mit der photolabilen Schutzgruppe verknüpft wurde. Zusätzlich wurde eine breite Auswahl an funktionellen Gruppen angestrebt, um dadurch die Kopplung an die unterschiedlichen, biologisch relevanten Moleküle (siehe Kapitel 4.2) zu ermöglichen.

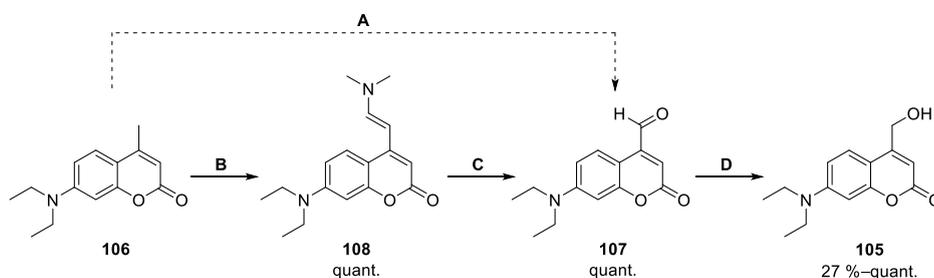
Zu den relevantesten und gebräuchlichsten Vertretern der photolabilen (Cumarin-4-yl)methyl-Schutzgruppen zählen das 6-Brom-7-hydroxy-4-hydroxymethylcumarin (**104**) und das 7-Diethylamino-4-hydroxymethylcumarin (**105**) (Abbildung 38). Letzteres wurde aufgrund seiner besseren spektroskopischen und photochemischen Eigenschaften als Basis für eine Reihe von Modifikationen ausgewählt. Dazu zählen ein bathochrom verschobenes Absorptionsmaximum und eine höhere Quantenausbeute.^[36] Zusätzlich zu seinen hervorragenden Eigenschaften zeichnet es sich auch durch eine kurze und einfach skalierbare Synthese aus.



Abbildung 38: 6-Brom-7-hydroxy-4-hydroxymethylcumarin (**104**) und 7-Diethylamino-4-hydroxymethylcumarin (**105**).

Um das 7-Diethylamino-4-hydroxymethylcumarin (**105**) zu erhalten, würde klassischerweise ausgehend vom kommerziell erhältlichen 7-Diethylamino-4-methylcumarin (**106**) eine Oxidation mittels Selendioxid zum Aldehyd **107** durchgeführt werden (A) (Schema 13).^[285, 286] Diese Reaktion benötigt jedoch nicht nur überstöchiometrische Mengen (2 Äquivalente) Selendioxid, welches stark toxisch ist, sondern verläuft auch generell mit einer geringen Ausbeute (40–50 %), welche bei Skalierung noch weiter abnimmt.^[287] Zusätzlich muss nach der Bildung des Aldehyds **107** eine säulenchromatographische Reinigung durchgeführt werden, da ansonsten im Rohprodukt vorhandene Selenrückstände im nachfolgenden Reaktionsschritt – der Reduktion mit Natriumborhydrid (D) – zur Zersetzung des Reduktionsmittels führen.^[288] Diese Aspekte sind besonders bei einer Reaktionsführung im Multigramm-Maßstab in Betracht zu ziehen. Daher wurde die Syntheseroute

nach Weinrich *et al.* gewählt.^[287] Diese startet ebenfalls vom 7-Diethylamino-4-methylcumarin (**106**), es wird jedoch zunächst unter Einsatz von Dimethylformamid-dimethylacetal (DMF-DMA) in Dimethylformamid (DMF) über Nacht das Enamin **108** gebildet (**B**), welches in einer oxidativen Spaltung mittels Natriumperiodat in einem Wasser/THF-Gemisch zum Aldehyd **107** umgesetzt wird (**C**). Dabei laufen beide Reaktionsschritte quantitativ ab und benötigen nur eine kurze wässrige Aufarbeitung. Die Reduktion erfolgt ebenfalls durch Zugabe von Natriumborhydrid (**C**) und verlief bezogen auf das Rohprodukt quantitativ. Eine anschließende säulenchromatographische Isolation führte zu einer deutlich verminderten Ausbeute (27–41 %), mutmaßlich aufgrund der hohen Affinität des Cumarinylalkohols **105** zum Säulenmaterial (Kieselgel). Die Ausbeute ließ sich zum einen durch Umkristallisation steigern. Zum anderen besaß das Rohprodukt jedoch auch ohne säulenchromatographische Aufreinigung oder Umkristallisation eine ausreichende Reinheit für eine direkte Folgereaktion. Die Syntheseroute zum Cumarinalkohol **105** konnte problemlos im 20 g Maßstab ohne säulenchromatographische Reinigung durchgeführt werden.

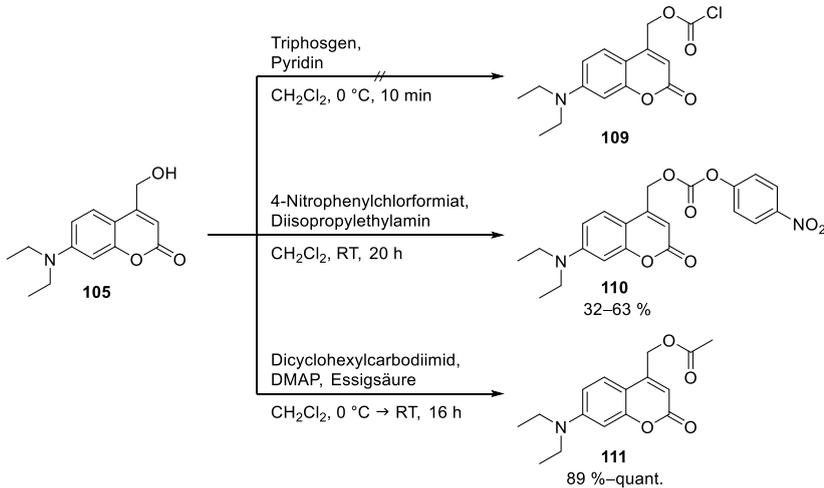


Schema 13: Syntheseroute zur Darstellung von 7-Diethylamino-4-hydroxymethylcumarin (**105**). Folgende Reaktionsbedingungen wurden verwendet: **A**) SeO_2 , *p*-Xylol, Rückfluss, 24 h;^[286] **B**) DMF-DMA, in DMF, Rückfluss, 23 h; **C**) NaIO_4 , in THF/ H_2O 1:1 (v/v), RT, 2 h; **D**) NaBH_4 , in THF, 0 °C → RT, 3 h.

4.1.2.1 Kupplungsmöglichkeiten

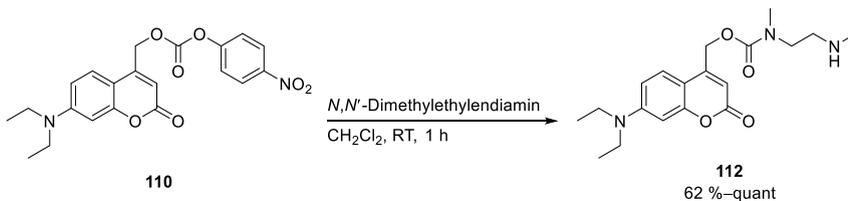
Das Hydroxycumarin **105** kann nicht nur direkt zur Schützung von Säuren und Alkoholen verwendet werden, sondern stellt auch eine hervorragende Basis für weitere Modifikationen dar (Schema 14). Nach Umsetzung mit Triphosgen zum reaktiven Chlorformiat **109** konnte jedoch kein Produkt isoliert werden. Der direkte Anschluss einer Folgereaktion ohne vorherige Isolation wurde nicht durchgeführt. Stattdessen wurde durch Umsetzung des Hydroxycumarins **105** mit 4-Nitrophenylchlorformiat der aktivierte Kohlensäureester **110** in Ausbeuten von 32–63 % erhalten. Ein Vorteil des aktivierten Kohlensäureesters **110** gegenüber dem Chlorformiat **109** liegt darin, dass es lagerstabil ist. Die Reaktion stellte sich darüber hinaus als besser durchführbar heraus und eine erfolgreiche Umsetzung konnte *via* $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie nachvollzogen werden. Zusätzlich konnte auf das toxische Triphosgen verzichtet werden. Die erhaltene Verbindung **110** wurde im Folgenden zur Schützung von

hydroxygruppenhaltigen Induktoren über Carbonate eingesetzt. Die Schützung des Alkohols **105** über eine *Steglich*-Veresterung zum acetylierten Produkt **111** verlief mit bis zu quantitativen Ausbeuten (89 %–quant.). Diese Acetyl-Schützung der Alkohol-Funktionalität war nötig, um weitere Modifikationen hin zu einer bathochromen Verschiebung der maximalen Absorptionswellenlänge zu ermöglichen.



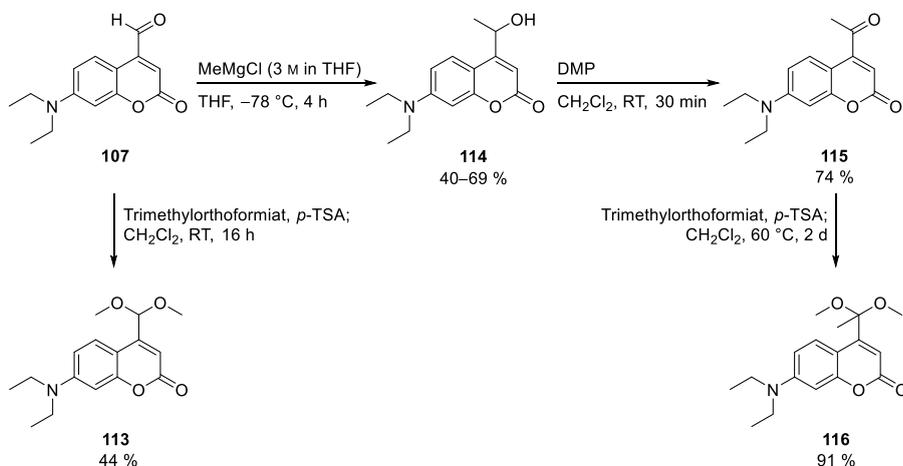
Schema 14: Synthesen ausgehend von 7-Diethylamino-4-hydroxymethylcoumarin (**105**).

Der aktivierte Coumarin-Kohlensäureester **110** konnte mit *N,N'*-Dimethylethylendiamin weiter zum Produkt **112** umgesetzt werden (Ausbeute: 62 %–quant.; Schema 15). Dadurch kann die Schützung von Alkoholen über Carbamate ermöglicht werden, welche im Vergleich zu den Carbonaten eine höhere Stabilität aufweisen. Das *N,N'*-Dimethylethylendiamin fungiert dabei als *Spacer*.



Schema 15: Synthese des Carbamats **112**.

Der Cumarinylaldehyd **107** ist nicht nur für die direkte Schützung von Diolen in Form von Acetalen geeignet, sondern er stellt auch eine Ausgangsverbindung für weitere Modifikationen dar (Schema 16). Durch Umsetzung mit Trimethylorthoformiat wurde das Dimethylacetal **113** (Ausbeute: 44 %) erhalten, welches die Acetalisierung mit Diolen noch erleichtern sollte. Darüber hinaus lieferte eine *Grignard*-Reaktion mit Methylmagnesiumchlorid in Tetrahydrofuran (THF) den sekundären Cumarin-4-ylethylalkohol **114**, wobei erneut nach säulenchromatographischer Reinigung aufgrund der hohen Affinität zum Säulenmaterial trotz vollständigen Umsatzes nur eine mäßige Ausbeute von bis zu 69 % erzielt werden konnte. Die anschließende Oxidation mittels *Dess–Martin*-Periodinan (DMP) zum Keton **115** verlief mit einer Ausbeute von 74 %. Dieses konnte ebenfalls mittels Trimethylorthoformiat in das entsprechende Dimethylketal **116** überführt werden (Ausbeute: 91 %), welches zur Schützung von Diolen in Form von Ketalen eingesetzt werden kann.



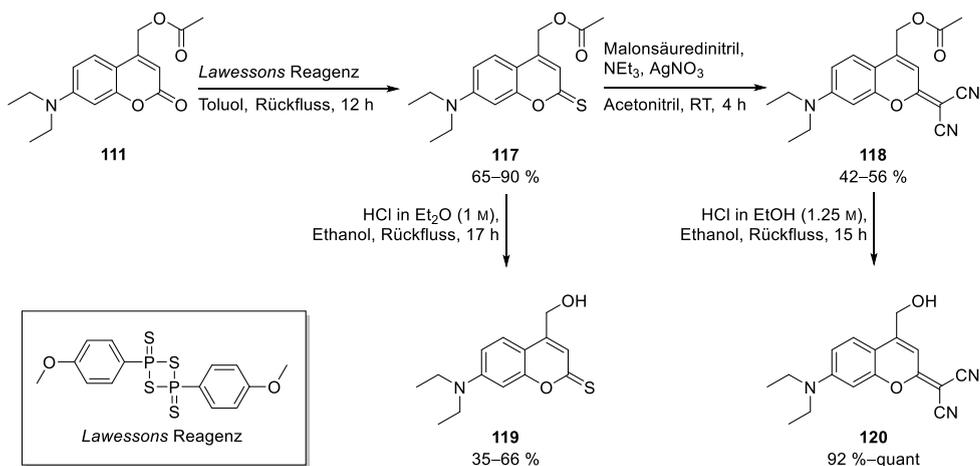
Schema 16: Syntheserouten zur Darstellung von 7-(Diethylamino)-4-(dimethoxymethyl)cumarin (**113**) und 7-(Diethylamino)-4-(1,1-dimethoxyethyl)cumarin (**116**).

4.1.2.2 Gerüstmodifikationen

Bathochrome Verschiebung

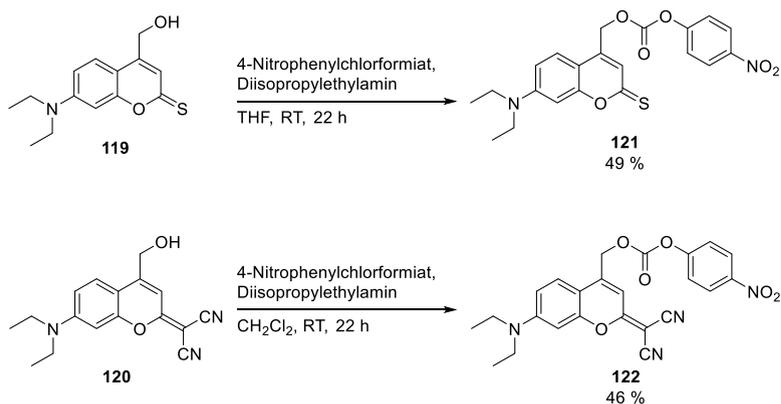
Um eine bathochrome Verschiebung der maximalen Absorptionswellenlänge zu ermöglichen, wurde eine Syntheseroute nach *Fournier et al.* angewandt (Schema 17).^[175] Das Acetyl-geschützte Cumarin **111** wurde mit dem *Lawessons* Reagenz in guten bis ausgezeichneten Ausbeuten (65–90 %) zum geschützten Thiocumarin **117** umgesetzt. Die Reaktion verläuft dabei über ein *Wittig*-artiges Intermediat, wobei die Bildung der P–O-Bindung die Triebkraft zur Thionierung darstellt.^[289] Die vorherige Acetylierung der freien Hydroxy-Gruppen war notwendig, da diese vom *Lawessons*

Reagenz bevorzugt umgesetzt werden.^[289] Anschließend konnte durch Kondensation des Thiocumarins **117** mit Malonsäuredinitril in Gegenwart von Triethylamin und Silbernitrat das Dicyanocumarin **118** erhalten werden (Ausbeute: 42–56 %). Dieses bewirkt eine noch stärkere bathochrome Verschiebung als das Thiocumarin und besitzt darüber hinaus eine erhöhte Stabilität gegenüber sauren und basischen Bedingungen, sowie gegenüber Nucleophilen.^[187] Sowohl das acetylierte Thiocumarin **117** als auch das acetylierte Dicyanocumarin **118** wurden durch Zugabe von HCl in Diethylether bzw. Ethanol entschützt. Somit konnten die Alkohole **119** und **120** in befriedigenden bis hohen Ausbeuten synthetisiert werden.



Schema 17: Syntheseroute zur Darstellung von 7-Diethylamino-4-hydroxymethylthiocumarin (**119**) und der entsprechenden Dicyano-Variante **120**.

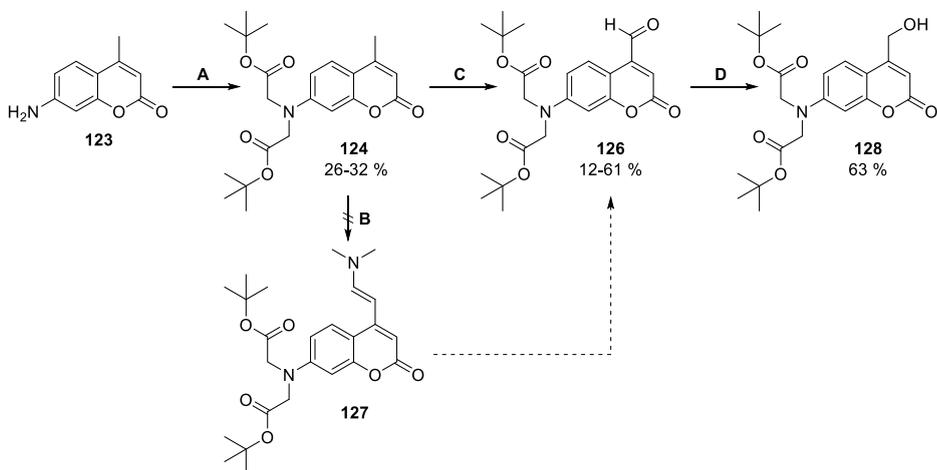
Die Cumarinylalkohole **119** und **120** wurden anschließend mit 4-Nitrophenylchloroformiat in die entsprechenden aktivierten Kohlensäureester **121** und **122** überführt (Schema 18). Dabei erwies sich das Thiocumarin-Derivat **121** als schwer isolierbar und nicht lagerstabil. Die Durchführung einer Säulenchromatographie führte zu einer Verunreinigung des Thiocumarins **121** mit dem entsprechenden Cumarin **110**. Daher wurde das Thiocumarin **121** nur mittels einer wässrigen Aufarbeitung gereinigt, wobei die Rohausbeute 49 % betrug. Zusätzlich wurde es stets zeitnah vor der gewünschten Folgereaktion synthetisiert. Die Instabilität ist vermutlich auf die für Substitution anfällige C–S-Doppelbindung und die besonders hohe Photolabilität zurückzuführen. Die Dicyano-Variante **122** hingegen zeigte keine verringerte Stabilität im Vergleich zum Cumarin-Kohlensäureester **110**.



Schema 18: Synthese der aktivierten Kohlensäureester **121** und **122**.

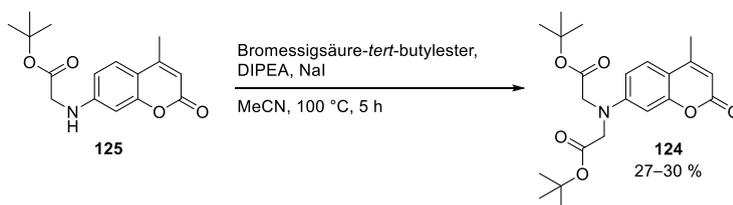
Erhöhte Löslichkeit

Da für die Verwendung von *photocaged compounds* in biologischen Systemen die Löslichkeit in wässrigen Medien eine wichtige Rolle spielt, wurde auch von den Cumarinen eine Variante mit erhöhter Löslichkeit synthetisiert. Gleichzeitig sollten die guten spektroskopischen Eigenschaften des 7-Diethylamino-4-methylcumarins (**106**) erhalten bleiben. Daher wurde 7-Amino-4-methylcumarin (**123**) mit Bromessigsäure-*tert*-butylester nach einer Vorschrift von *Noguchi et al.* umgesetzt,^[290] wobei jedoch trotz vollständigem Umsatz nur schlechte Ausbeuten von 26–32 % des disubstituierten Amins **124** erreicht werden konnten (Schema 19).



Schema 19: Syntheseroute zur Darstellung von 7-Diethylamino-4-hydroxymethylcumarin (**128**). Folgende Reaktionsbedingungen wurden verwendet: **A)** Bromessigsäure-*tert*-butylester, DIPEA, NaI, in MeCN, 100 °C, 6 h; **B)** DMF-DMA, in DMF, Rückfluss, 16 h; **C)** SeO₂, in *p*-Xylol, Rückfluss, 16 h; **D)** NaBH₄, in Ethanol, 0 °C → RT, 1 h.

Die geringe Ausbeute deckte sich dabei gut mit den übrigen in der Literatur zu findenden Angaben, welche im Bereich von 25–35 % liegen.^[159, 291, 292] Als Hauptprodukt der Reaktion wurde das monosubstituierte Amin **125** mit Ausbeuten von ~70 % erhalten. Dieses konnte jedoch unter denselben Reaktionsbedingungen erneut eingesetzt werden, wobei Ausbeuten von 27–30 % erzielt wurden (Schema 20). Anschließend wurde eine Oxidation mittels Selendioxid zum Aldehyd **126** durchgeführt. Diese lief jedoch wie erwartet nur mit schlechten bis mäßigen Ausbeuten (12–61 %) ab. Eine Umgehung dieser Oxidation über das Enamin **127**, wie bei der vorherigen Syntheseroute zum 7-Diethylamino-4-hydroxymethylcumarin (**105**), erwies sich als nicht durchführbar. Hier konnte unter denselben Reaktionsbedingungen kein Produkt isoliert werden. Der Aldehyd **126** wurde abschließend mit NaBH₄ zum Alkohol **128** reduziert (Ausbeute: 63 %). Die maskierten Carbonsäuren der Schutzgruppe **129**, welche die erhöhte Löslichkeit vermitteln sollen, können generell unter sauren Bedingungen freigesetzt werden.^[159]



Schema 20: Synthese von 7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]-4-methylcumarin (**124**) ausgehend vom Nebenprodukt **125**.

Eine abschließende Übersicht über die synthetisierten photolabilen Schutzgruppen auf Basis des (Cumarin-4-yl)methyl-Chromophors ist in Abbildung 39 zu finden.

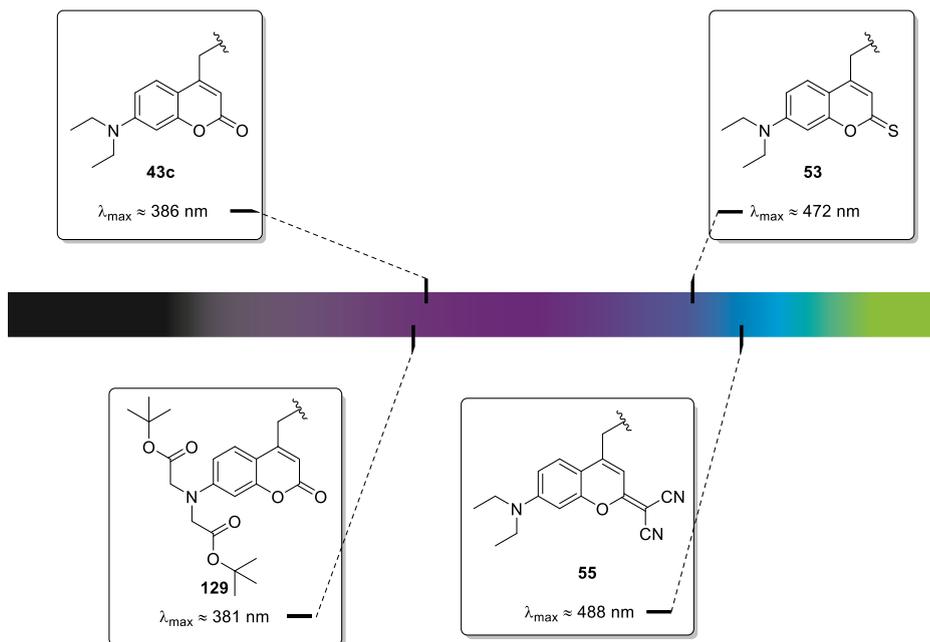
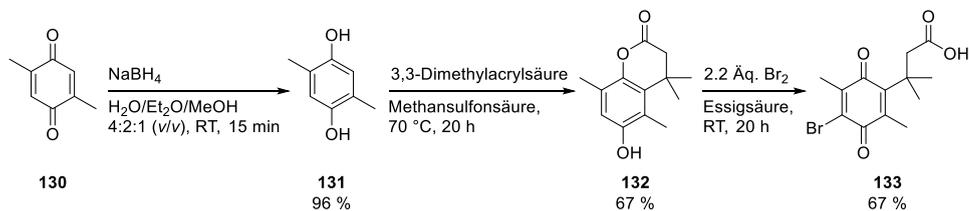


Abbildung 39: Übersicht über die synthetisierten (Cumarin-4-yl)methyl-Derivate und den Einfluss der Modifikationen auf ihre Absorptionsmaxima.

4.1.3 Synthese der Trimethyllock-Schutzgruppe

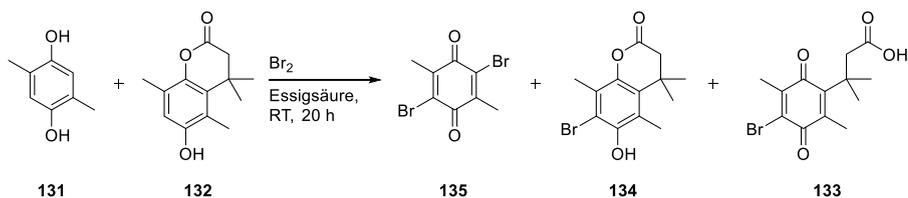
Als alternative Schutzgruppe wurde eine photolabile Variante der Trimethyllock-Gruppe gewählt. Diese zeichnet sich besonders durch eine signifikante Absorption oberhalb von 400 nm, eine quantitativ ablaufende Photoreaktion, eine schnelle Freisetzung auch von schlechten Abgangsgruppen und das Ausbleiben eines *Inner-Filter*-Effektes aus.^[209] Die für die Schützung von Alkoholen relevante, hohe Stabilität des entstehenden Esters gegenüber Esterasen konnte am Beispiel einer *Prodrug* demonstriert werden.^[204] Somit stellt die Trimethyllock-Gruppe eine interessante Ergänzung zur bisherigen Auswahl an photolabilen Schutzgruppen dar. Die Synthese erfolgte ausgehend von kommerziell erhältlichem 2,5-Dimethyl-1,4-benzochinon (**130**) nach einer Vorschrift von *Walton et al.* (Schema 21, Schema 25).^[209] Dieses wurde mittels Natriumborhydrid zu 2,5-Dimethylhydrochinon (**131**) umgesetzt. Die Reduktion verlief mit einer hohen Ausbeute von 96 % und benötigte keine säulenchromatographische Reinigung. Die nachfolgende *Friedel-Crafts*-Alkylierung lieferte das 2-Chromanon **132**. Hierbei konnte jedoch auch bei verlängerter Reaktionszeit kein vollständiger Umsatz erzielt werden. Eine säulenchromatographische Reinigung ergab keine ausreichende Trennung des Edukt-Produkt-Gemisches. Daher wurde eine Umkristallisation nach den

Bedingungen von *Rohde et al.* [Hexan/Ethylacetat 2:1 (v/v)] durchgeführt.^[293] Hierbei konnte eine Ausbeute von 67 % erzielt werden.



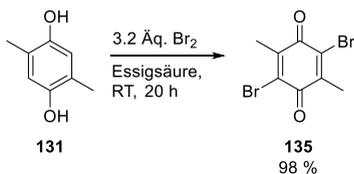
Schema 21: Syntheseroute zur Darstellung von Bromchinon **133**.

Die vollständige Abtrennung des Eduktes **131** war an dieser Stelle essenziell, da ansonsten die nachfolgende Eintopf-Bromierungs-Oxidations-Sequenz zum Bromchinon **133** mit nur mäßigen Ausbeuten von 27–36 % ablief. Die Reaktion verlief dann wie in Schema 22 dargestellt. Aufgrund der von *Shoji et al.* angestellten Untersuchungen zur Oxidation von Hydrochinonen war anzunehmen, dass jedes Äquivalent des unerwünschten 2,5-Dimethylhydrochinon (**131**) mit 3 Äquivalenten Brom reagiert,^[294] wodurch nicht ausreichend viele Äquivalente für die gewünschte Reaktion zur Verfügung stehen. Somit würde das 2-Chromanon **132** zwar zum entsprechenden 7-Brom-2-chromanon **134** bromiert, könnte jedoch nicht vollständig zum Bromchinon **133** oxidiert werden.



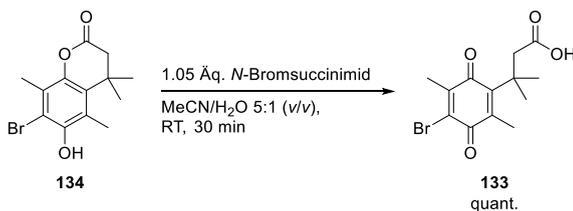
Schema 22: Auswirkungen von verunreinigtem Startmaterial auf die Bromierungs-Oxidations-Sequenz.

Zur Verifizierung des Entstehungsprozesses der Nebenprodukte wurde 2,5-Dimethylhydrochinon (**131**) mit 3.2 Äquivalenten Brom unter denselben Reaktionsbedingungen eingesetzt. Es wurde mit einer Ausbeute von 98 % das erwartete 2,5-Dibrom-3,6-dimethylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dion (**135**) erhalten (Schema 23). Die Struktur konnte mittels 2D-NMR-Analytik bestätigt werden.



Schema 23: Testreaktion zur Verifizierung des Nebenproduktes.

Darüber hinaus konnte das ebenfalls als Nebenprodukt isolierte 7-Brom-2-chromanon **134** durch Zugabe von *N*-Bromsuccinimid (NBS) quantitativ in das gewünschte Bromchinon **133** überführt werden (Schema 24).



Schema 24: Alternative Oxidation zum Bromchinon **133** ausgehend vom Nebenprodukt **134**.

Ausgehend vom Bromchinon **133** konnte abschließend mittels einer 1,4-Addition das Methylthiochinon **136** in quantitativer Ausbeute synthetisiert werden (Schema 25). Dieses kann zur photolabilen Schützung von Alkoholen und Aminen verwendet werden.^[209]



Schema 25: Synthese des Methylthiochinons **136** mittels *Michael*-Addition.

4.1.4 Zusammenfassung des Kapitels

Abbildung 40 gibt eine zusammenfassende Übersicht über die erfolgreich synthetisierten Schutzgruppen und die Verteilung ihrer Absorptionsmaxima im UV und sichtbaren Bereich des Lichtes.

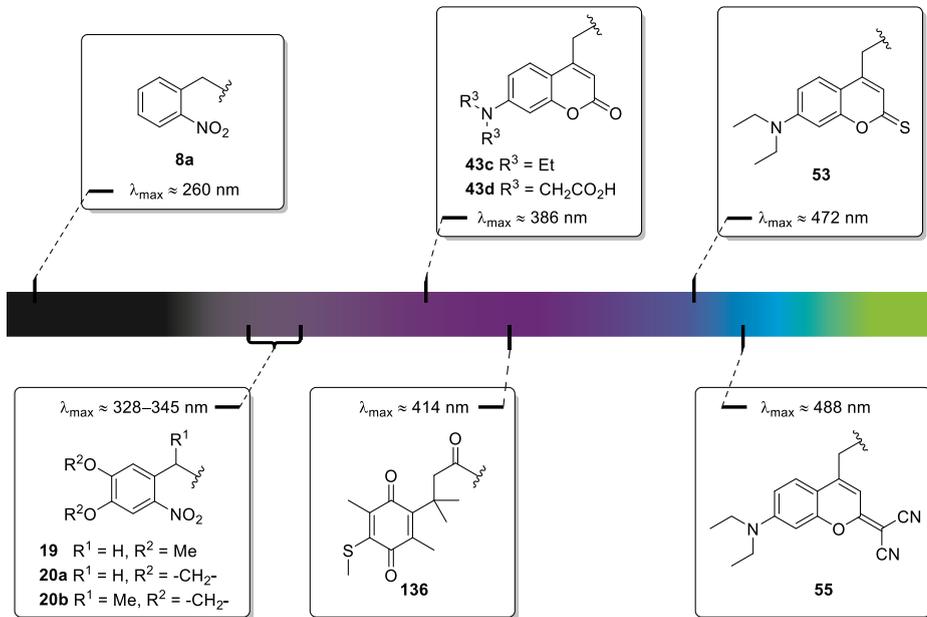


Abbildung 40: Übersicht über die synthetisierten photolabilen Schutzgruppen und den Einfluss der Modifikationen auf ihre Absorptionsmaxima.

- Ein Grundstock von photolabilen Schutzgruppen zur Photolyse bei 375 nm, bestehend aus zehn *o*-Nitrobenzyl-Derivaten zur Schützung von Alkoholen, Diolen, Aminen und Carbonsäuren konnte dargestellt werden.
- Zur Photolyse oberhalb von 400 nm wurden 13 Derivate auf Basis der Cumarinyl-Schutzgruppe synthetisiert, welche für die Schützung von Alkoholen, Diolen, Aminen und Carbonsäuren geeignet sind.
- Eine photoaktivierbare TML-Schutzgruppe (photolysierbar oberhalb von 400 nm) zur Schützung von Alkoholen und Aminen konnte synthetisiert werden.

4.2 Betrachtung der Induktoren

Nach der Synthese einer Vielzahl potenzieller photolabiler Schutzgruppen, bietet sich die genauere Betrachtung der geeigneten Promotoren und ihren zugehörigen Induktoren an. Hierbei wurden sowohl die zur lichtgesteuerten Genexpression genutzten Induktoren als auch bisher nicht etablierte Induktoren verwendet. Diese lassen sich in drei Molekülklassen einteilen: Die Kohlenhydrate, die aliphatischen und die aromatischen Carbonsäuren (Abbildung 41).

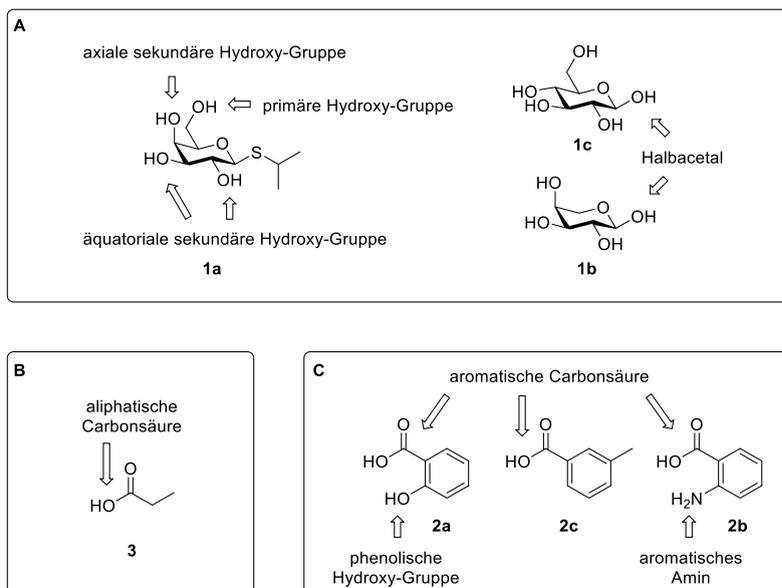


Abbildung 41: Übersicht über die funktionellen Gruppen der ausgewählten Kohlenhydrate **1a–c** (A), der Propionsäure **3** (B) und der Benzoesäure-Derivate **2a–c** (C), über welche die Anbringung einer photolabilen Schutzgruppe möglich ist.

Zu den Kohlenhydraten zählen die wichtigsten und weitverbreitetsten Induktoren, wie IPTG (**1a**) und L-Arabinose (**1b**).^[295, 296] Dabei ermöglicht IPTG (**1a**) als nicht metabolisierbares Laktose-Analogon die Kontrolle über eine Reihe von LacI-regulierten Systemen (P_{lac} , P_{tac} , P_{trc} , P_{grc} , P_{T7}), während L-Arabinose (**1b**) in der Lage ist das AraC/ P_{BAD} -Regulator-Promotor-System zu aktivieren. Glukose (**1c**) hingegen führt temporär zu Katabolitrepression des *lac*- und des *ara*-Operons.^[295, 296] Ihre Anwendbarkeit für die lichtgesteuerte Genexpression wurde, wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, bereits in einer Reihe von Publikationen unter Beweis gestellt.^[177, 271–275] Kohlenhydrate bringen aber aus synthetischer Sicht auch Herausforderungen mit sich. So besitzen sie ausschließlich Hydroxy-Gruppen, wodurch zum einen eine verminderte Auswahl an Bindungen zu den photolabilen Schutzgruppen zur Verfügung steht. Zum anderen wird in vielen Fällen eine individuelle Schutzgruppenstrategie benötigt, um die photolabile Schutzgruppe gezielt anzubringen, wodurch die

Anzahl der Synthesestufen deutlich erhöht wird. Die Hydroxy-Gruppen unterscheiden sich dabei deutlich in ihrer Reaktivität sowie Acidität. Daher muss sinnvoll entschieden werden, welche Position die geeignetste darstellt. Darüber hinaus sollten die *photocaged* Kohlenhydrate bei tiefen Temperaturen unter einem Inertgas gelagert werden, um eine ausreichende Lagerstabilität über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten.

Bei Propionsäure (**3**) handelt es sich um einen sehr günstigen Induktor, welcher die Kontrolle über den Promotor P_{prpB} ermöglicht. Mit diesem kann ein hohes Expressionslevel erreicht werden und es wird ähnlich dem Promotor P_{BAD} eine graduelle Kontrolle über einen hohen Konzentrationsbereich ermöglicht.^[297] Viele über Kohlenhydrate induzierbare Promotoren besitzen dagegen einen *positive-feedback-loop* (*all-or-none*-Phänomen), der eine graduelle Regulation verhindert, da hier der Transporter für den Induktor ebenfalls unter der Kontrolle des Induktors steht.^[297, 298] Einen großen Nachteil stellt jedoch die geringe Flexibilität bei der Synthese der entsprechenden *photocaged* Propionsäuren dar. Die zumeist genutzte Schützung der Carbonsäuren als Ester kann in Gegenwart von Esterasen leicht hydrolysiert werden. Eine mögliche Lösung könnte die Verwendung von sterisch anspruchsvollen photolabilen Schutzgruppen sein, um somit eine Hydrolyse zu unterbinden.

Die Benzoesäure-Derivate stellen die Induktoren für das XylS/ P_m -Regulator/Promotor-System dar. Diese bieten viele Vorteile gegenüber den Kohlenhydraten, da sie zum einen kein komplexes Transportsystem benötigen und über passive Diffusion in die Zellen eindringen. Zum anderen werden diese von den meisten Organismen nicht metabolisiert und weisen eine graduell regulierbare Expressionsantwort sowie eine geringe Basalexpression auf.^[299] Es wurden Salicylsäure (**2a**), Anthranilsäure (**2b**) und *m*-Toluylsäure (**2c**) als geeignete Vertreter dieser Klasse gewählt. Salicylsäure (**2a**) sowie *m*-Toluylsäure (**2c**) zeigten die größten dynamischen Spannen der Induktionsantwort^[299] und Salicylsäure (**2a**) stellte zusätzlich einen geeigneten Induktor für das NagR/ P_{nagAa} -Regulator/Promotor-System dar.^[300-302] Salicylsäure (**2a**) und Anthranilsäure (**2b**) besitzen zusätzlich zur Carbonyl-Funktionalität noch eine phenolische Hydroxy-Gruppe bzw. ein aromatisches Amin in *ortho*-Position. Diese ermöglicht eine größere Flexibilität bei der Anbringung der photolabilen Schutzgruppen. Im Falle der Anthranilsäure (**2b**) kann dieses Amin genutzt werden, um über ein Carbamat eine hohe Stabilität zu garantieren.

Allgemein für alle verwendeten Induktoren gilt, dass eine Schützung mit einer photolabilen Gruppe in der Lage sein muss die Aktivität des Induktors im geschützten Zustand vollständig zu unterbinden. Zusätzlich ist bei der gleichzeitigen Verwendung mehrerer Induktoren relevant, dass diese keinen Crosstalk aufweisen. Bei Crosstalk handelt es sich um die gleichzeitige Aktivierung mehrerer verschiedener Promotoren durch denselben Induktor. Daher bietet sich für eine wellenlängenselektive

bzw. orthogonale Genexpression die kombinierte Nutzung von Kohlenhydraten und Benzoesäure-Derivaten an.

4.3 Herstellung der *photocaged compounds*

In dem folgenden Kapitel wird der Einsatz der synthetisierten photolabilen Schutzgruppen basierend auf *o*-Nitrobenzyl-Derivaten (Kapitel 4.1.1), Cumarinyl-Derivaten (Kapitel 4.1.2) und der Trimethyllock-Schutzgruppe (Kapitel 4.1.3) in Kombination mit den relevanten Induktoren (Kapitel 4.2) zur Herstellung verschiedener *photocaged compounds* beschrieben. Diese wurden anschließend *in vitro* auf ihre Anwendbarkeit hin untersucht und geeignete Kandidaten wurden zur *in vivo* Applikation an das Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET) gegeben. Als essenzielle Kriterien für eine *in vivo* Anwendung wurden in erster Linie eine nahezu vollständige Photolysierbarkeit in unter 30 min bei der gewünschten Bestrahlungswellenlänge unter Freisetzung des funktionsfähigen Induktors, eine geringe Toxizität der Nebenprodukte nach Photolyse, eine zufriedenstellende Löslichkeit in wässrigen Medien und eine hohe Stabilität über 24 h in ebendiesen bestimmt.

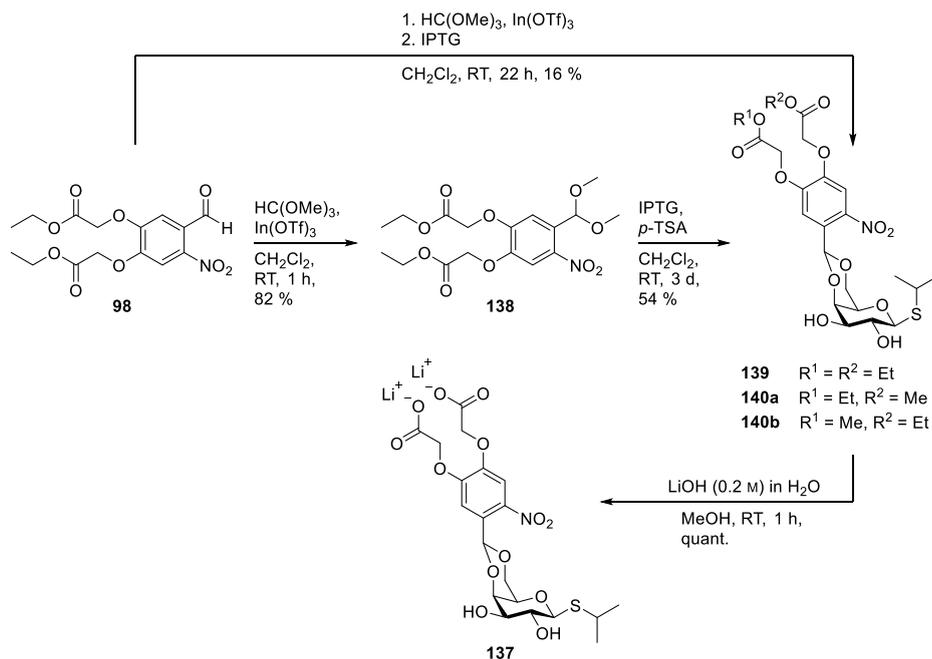
4.3.1 *Photocaged* Kohlenhydrate

4.3.1.1 Komposition des Grundstockes für eine Anregung im langwelligen UV-Bereich

Zunächst sollte ein Grundstock an *photocaged* Kohlenhydraten synthetisiert werden, welche eine gute Photolysierbarkeit durch UV-A Strahlung (~375 nm) aufweisen. Diese Kohlenhydrate sollten, bedingt durch ihre unterschiedliche Löslichkeit, Membrangängigkeit und photolytische Effizienz in der Lage sein, in verschiedenen Mikroorganismen die Basis für eine wellenlängenselektive Genexpression zu bilden. Dazu wurde zum einen auf die unvollendeten Vorarbeiten aus der dieser Doktorarbeit vorausgegangenen Masterarbeit^[303] zurückgegriffen. In dieser konnte eine *o*-Nitrobenzyl-Variante mit erhöhter Löslichkeit hergestellt und anschließend dazu genutzt werden, um IPTG (**1a**) zum hochlöslichen Phototrigger **137** zu funktionalisieren. Die Übertragung dieser löslichkeitsvermittelnden Schutzgruppe auf Glukose (**1c**) wurde ebenfalls begonnen, aber nicht abgeschlossen.^[303] Im Folgenden wurden diese Ergebnisse überarbeitet und ausgebaut. Zum anderen sollten die zuvor etablierten *photocaged* Kohlenhydrate auf Basis von IPTG (**1a**) und L-Arabinose (**1b**) synthetisiert werden.

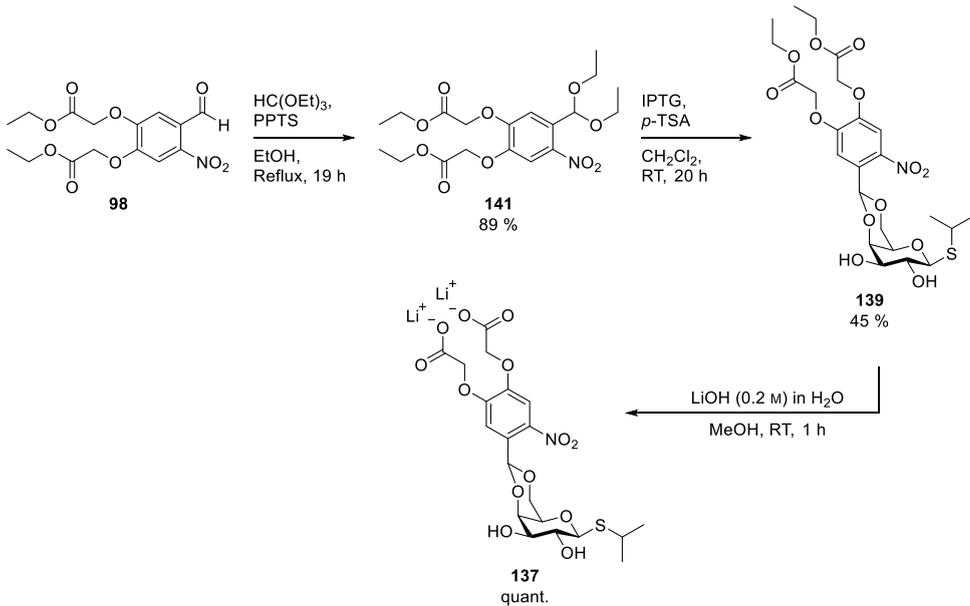
Optimierung des Syntheseweges zu *photocaged* IPTG **137**

Zunächst wurde die bereits in der Masterarbeit etablierte Syntheseroute hin zum 4,6-*O*-[4,5-Bis-(carboxymethoxy)-2-nitrobenzyliden]isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid (**137**, BC-cIPTG) weiter optimiert (Schema 26). Ursprünglich wurde bei diesem Syntheseweg ausgehend vom Aldehyd **98** das Dimethylacetal **138** synthetisiert (Ausbeute: 82 %), welches nach einer Filtration über Aluminiumoxid säurekatalysiert mit IPTG (**1a**) zum 4,6-*O*-[4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzyliden]-isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid (**139**, BEC-cIPTG) umgesetzt wurde. Aufgrund der sauren Reaktionsbedingungen, wurde jedoch ein schwer aufzutrennendes Produktgemisch erhalten.^[303] Alternativ wurde versucht über eine Indiumtriflat-katalysierte Eintopf-Reaktion das Dimethylacetal **138** *in situ* zu erzeugen und direkt zum BEC-cIPTG (**139**) umzusetzen. Diese Eintopfreaktion nach einer Vorschrift von *Smith et al.*^[304, 305] lieferte jedoch nur eine geringe Gesamtausbeute von 16 %. Auch hier wurde ein komplexes Produktgemisch erhalten, welches mittels *medium pressure liquid chromatography* (MPLC) aufgetrennt werden konnte und somit die Aufnahme eines eindeutigen NMR-Spektrums erlaubte. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass es sich bei der auftretenden Nebenreaktion um eine partielle säurekatalysierte Umesterung der Ethylester zu den entsprechenden Methylestern handelt. Dies wird durch das bei der Transacetalisierung freiwerdende Methanol des Dimethylacetals **138** ermöglicht. Es werden pro Äquivalent Dimethylacetal **138** zwei Äquivalente Methanol freigesetzt. Diese geringe Konzentration reichte für die Bildung der Methylethylester **140a** und **140b** aus. Dieses Produktgemisch kann dennoch im nachfolgenden Reaktionsschritt quantitativ zum BC-cIPTG (**137**) umgesetzt werden, da hier unter basischen Bedingungen sowohl Methylester als auch Ethylester gleichermaßen gespalten werden.



Schema 26: Syntheseweg hin zum BC-cIPTG (**137**) ausgehend vom 4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzaldehyd (**98**).

Das BEC-cIPTG (**139**) selbst war jedoch ebenfalls von Interesse, da dieses sowohl eine verbesserte Membrangängigkeit besitzen als auch eine Anreicherung in der Zelle durch intrazelluläre Hydrolyse der Ester ermöglichen sollte.^[113] Somit wurde anstelle von Trimethylorthoformiat das entsprechende Ethyl-Derivat verwendet (Schema 27). Zusätzlich wurde die Reaktion in Ethanol unter Rückflussbedingungen und in Gegenwart eines mit Molsieb (3 Å) gefüllten Wasserabscheiders durchgeführt, um das freiwerdende Wasser aus dem Reaktionsgleichgewicht zu entziehen und dieses somit auf die Produktseite zu verschieben. Somit konnte das Diethylacetal **141** in hohen Ausbeuten (89 %) erhalten werden. Die anschließende, durch *p*-Toluolsulfonsäure (*p*-TSA) katalysierte Transacetalisierung lieferte eine vergleichbar mäßige Ausbeute (45 %), dabei jedoch ausschließlich das gewünschte Produkt **139**. Dieses konnte wie zuvor mit wässriger Lithiumhydroxid-Lösung in Methanol innerhalb von einer Stunde in quantitativen Ausbeuten zum BC-cIPTG (**137**) umgesetzt werden. Daher wurde im Folgenden stets die Zweistufensynthese über das Diethylacetal **141** verwendet.



Schema 27: Optimierter Syntheseweg hin zum BC-cIPTG (**137**) ausgehend vom 4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzaldehyd (**98**).

Zusätzlich zu der in der Masterarbeit^[303] etablierten Entschützung unter basischen Bedingungen mit Lithiumhydroxid wurde eine enzymatische Entschützung mit Novozym® 435 getestet. Dabei handelt es sich um eine immobilisierte Form der Lipase B aus *Candida antarctica* (*C. antarctica*). Eine Überprüfung der Reaktion *via* Dünnschichtchromatographie (DC) zeigte jedoch nur geringe Umsätze, weshalb diesbezüglich keine weiteren Untersuchungen angestellt wurden. In einer später erschienenen Publikation von *Schelkle et al.* wurde gezeigt, dass die Lipase B aus *C. antarctica* nicht in der Lage ist die BEC-Schutzgruppe vollständig zu hydrolysieren. Eine ebenfalls getestete Schweineleberesterase lieferte jedoch einen vollständigen Umsatz.^[306] Dies spricht dafür, dass bei der Verwendung in einem mikrobiologischen Kontext durchaus die erhöhte Membrangängigkeit, welche durch die BEC-Schutzgruppe vermittelt wird, dazu genutzt werden kann, eine Anreicherung innerhalb der Zelle zu bewirken, da intrazelluläre Esterasen durch Hydrolyse die Membrangängigkeit stark herabsetzen.^[112, 113, 306]

Synthese der *photocaged* Glukose (**142**)

Ebenfalls in der Masterarbeit begonnen wurde die Übertragung der löslichkeitsvermittelnden Schutzgruppe auf weitere Zucker. Hierbei sollte die BC-Schutzgruppe am anomeren Zentrum der Glukose (**1c**) angebracht werden, um eine einstufige Freisetzung zu ermöglichen.^[303] Analog zum Vorgehen in der Masterarbeit wurde der Glykosyldonor **143** durch Bromierung des anomeren Zentrums der peracetylierten Glukose (**144**) erhalten.^[307] Dabei entstand aufgrund des anomeren Effektes ausschließlich das α -Anomer **143**. Im nachfolgenden Schritt sollte der Alkohol **99** als Glykosylakzeptor mit dem Glykosylbromid **143** in einer *Koenigs–Knorr*-Reaktion umgesetzt werden. Im Verlauf der Masterarbeit konnte jedoch kein Produkt isoliert werden, da es zu einer intermolekularen Acyl-Migration kam, wobei der acetylierte Alkohol **145** erhalten wurde (Abbildung 42).^[303]

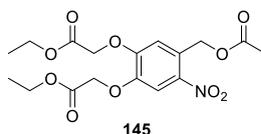
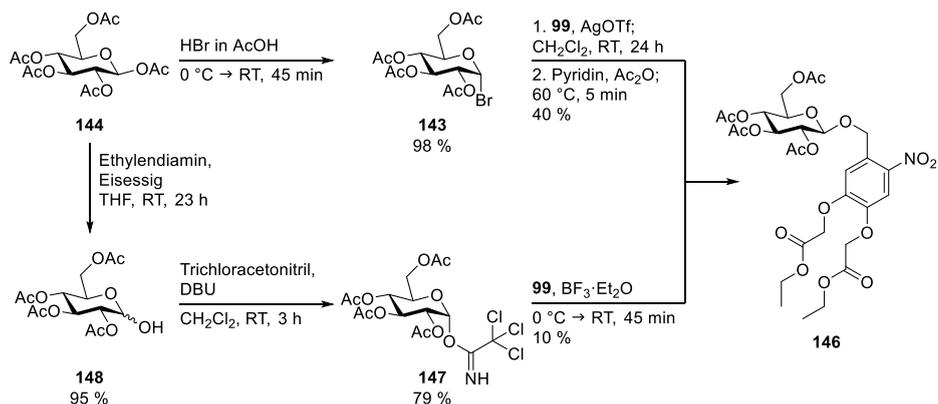


Abbildung 42: Acetyl-geschützter Alkohol **145**.

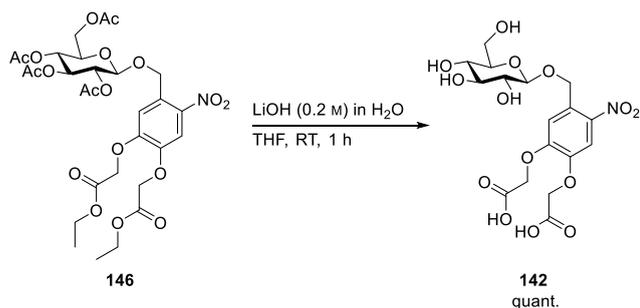
Dieses Problem sollte im Folgenden auf zwei Wegen gelöst werden (Schema 28). Zum einen wurde die bei der *Koenigs–Knorr*-Reaktion verwendete Kombination aus Silbercarbonat und Silbertriflat auf den alleinigen Einsatz des weniger basischen Silbertriflates reduziert. Dadurch konnte erstmalig die Bildung des 1,2-*trans* Glykosides **146** ohne ausschließliche Deaktivierung des Glykosylakzeptors **99** zum Ester **145** beobachtet werden. Es wurde jedoch auch weiterhin ein Gemisch aus Nebenprodukten isoliert, welches auf die Acyl-Migration zurückzuführen ist. Bei diesem handelte es sich um einfach- bzw. zweifach-entschützte Derivate des Glykosides **146**, wobei hier nicht näher zugeordnet wurde, welche der Hydroxy-Gruppen entschützt worden waren. Durch eine fünfminütige Mikrowellenreaktion in Pyridin unter Zusatz von Essigsäureanhydrid sollten die Nebenprodukte in das gewünschte peracetylierte Produkt **146** überführt werden. Dies bewirkte jedoch, dass der im Überschuss (3 Äq.) zugesetzte Alkohol **99** ebenfalls acetyliert wurde. In der nachfolgenden säulenchromatographischen Reinigung ließ dieser sich aufgrund der ähnlichen Laufeigenschaften nur schwer vom Produkt **146** abtrennen. Daher wurde das Rohprodukt direkt in der nachfolgenden Entschützung zur BC-cGlukose **142** eingesetzt. Der dadurch erreichte Polaritätsunterschied erlaubte eine einfache Isolierung des Produktes **142**.



Schema 28: Verschiedene Synthesewege hin zur peracetylierten BEC-cGlucose (**146**) ausgehend von Pentaacetyl- α -D-glucopyranose (**144**).

Zum anderen sollte für die Trichloracetimidat-Methode als Alternative zur *Koenigs–Knorr*-Reaktion der Glykosyldonor **147** synthetisiert werden. Dafür wurde ebenfalls ausgehend von der kommerziell erhältlichen peracetylierten Glukose **144** das anomere Zentrum in Anlehnung an eine Vorschrift von *Duléry et al.*^[308] in hoher Ausbeute (95 %) regioselektiv deacyliert, wobei der Zucker **148** als α/β -Anomerengemisch (3.6:1) erhalten wurde. Eine Auftrennung des Anomerengemisches war nicht nötig, da die nachfolgende Reaktion entweder unter kinetischer Kontrolle das β -Anomer oder unter thermodynamischer Kontrolle das α -Anomer liefert. Dabei besitzt die verwendete Base einen hohen Einfluss, da die langsame basenkatalysierte Epimerisierung durch die Verwendung starker Basen beschleunigt werden kann.^[309] Durch Verwendung von 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) als Base wurde unter thermodynamischer Kontrolle das α -Anomer **147** in einer Ausbeute von 79 % erhalten. Die anschließende Glykosylierung verläuft bedingt durch den Nachbargruppen-Effekt über ein Acyloxonium-Intermediat, sodass ein nukleophiler Angriff bevorzugt *trans* erfolgt und somit selektiv das β -Glykosid liefert.^[309] Die Bortrifluoriddiethyletherat katalysierte Reaktion zur BEC-cGlucose (**146**) lief jedoch nur mit einer geringen Ausbeute von 10 % ab. Daher wurde hier weiterhin der Syntheseweg über die *Koenigs–Knorr*-Reaktion aufgrund der geringeren Anzahl an Reaktionsstufen und der höheren Gesamtausbeute als vorteilhaft erachtet.

Die gleichzeitige Entschützung der Hydroxy- und der Carboxy-Funktionalitäten ließ sich in einem Schritt unter basischen Bedingungen mit wässriger Lithiumhydroxid-Lösung (0.2 M) realisieren und lieferte quantitativ das Produkt **142** (Schema 29). Für eine selektive Entschützung des Zuckers bei gleichzeitiger Beibehaltung der durch Ethylester maskierten Carbonsäuren bietet sich grundsätzlich die Verwendung von Natriumethanolat an.



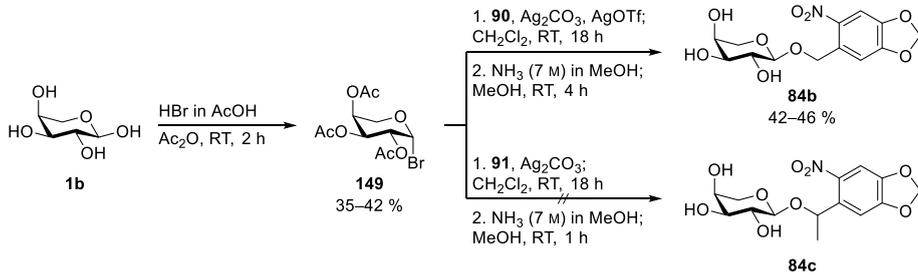
Schema 29: Synthese der BC-cGlucose (**142**) ausgehend von BEC-cGlucose (**146**).

Eine weitere Option zur Verhinderung der Desaktivierung des Glykosylakzeptors während der *Koenigs–Knorr*-Reaktion wäre die Verwendung sterisch anspruchsvollerer Acyl-Schutzgruppen gewesen, wie der Pivaloyl- oder der Benzoyl-Schutzgruppe, da die Bereitschaft zur Acyl-Migration auf freie Hydroxy-Gruppen bei diesen in der folgenden Reihe abnimmt (Acetyl > Benzoyl >> Pivaloyl).^[309] Eine anschließende Entschützung wäre beispielsweise für die Benzoyl-Schutzgruppe unter basischen Bedingungen mit einer wässrigen Kaliumhydroxid-Lösung möglich gewesen.

Synthese der etablierten *photocaged* Kohlenhydrate

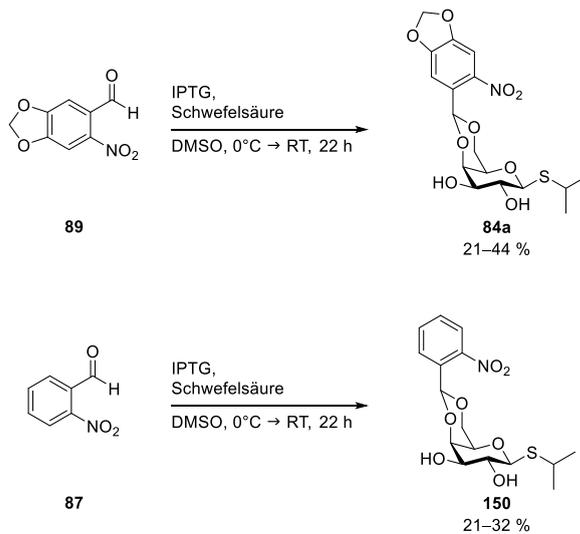
Das Ziel war es, zunächst eine Vielzahl lichtgesteuerter Werkzeuge zur Auswahl zu haben, welche bei 375 nm photolytisch gespalten werden können. Als nächstes sollten somit die bereits etablierten *photocaged compounds* 6-Nitropiperonyl- β -L-arabinopyranose (NP-cArabinose, **84b**), 1-(6-Nitrobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethyl- β -L-arabinopyranose (NBE-cArabinose, **84c**) und NP-cIPTG (**84a**) synthetisiert werden. Wie in Schema 30 dargestellt, wurde ausgehend von L-Arabinopyranose (**1b**) der Glykosyldonor **149** über eine Eintopfreaktion nach *Kartha et al.* erhalten (Ausbeute: 35–42 %).^[310] Aufgrund der geringen thermischen Stabilität und hohen Hydrolyse-Empfindlichkeit der Glykosylhalogene^[311] wurde das Glykosylbromid **149** unter Argon-Atmosphäre in einem dichtverschlossenen Kolben bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und konnte somit über mehrere Wochen hinweg verwendet werden. Eine Zersetzung der kristallinen, farblosen Substanz wurde durch bräunliche Verfärbung angezeigt. Die *Koenigs–Knorr*-Reaktion unter Zuhilfenahme von Silbercarbonat und Silbertriflat sowie die direkt angeschlossene Entschützung durch Zugabe von Ammoniak in MeOH (7 M) zur NP-cArabinose (**84b**) verliefen mit mäßigen Ausbeuten von 42–46 % (Lit.: 50 %).^[77] Die Synthese der NBE-cArabinose (**84c**) scheiterte dagegen. Hier war es nicht möglich, das Produkt in signifikanten Mengen mit ausreichender Reinheit zu synthetisieren. Da bei der Reaktion ohnehin ein Diastereomergemisch entsteht, welches einer aufwendigen Auftrennung bedarf, und der einzige

Mehrwert der Verbindung in einer erhöhten Photolysegeschwindigkeit liegt, wurde die Herstellung dieser *photocaged* Verbindung nicht weiterverfolgt.



Schema 30: Syntheseweg zu NP-cArabinose (**84b**) und NBE-cArabinose (**84c**) nach *Binder et al.*^[77]

Das NP-cIPTG (**84a**) wurde nach einer Vorschrift von Dr. *Claus Bier*^[271, 312] durch Zugabe von IPTG (**1a**) und Schwefelsäure zu einer gekühlten Lösung des 6-Nitropiperonal (**89**) synthetisiert (Ausbeute: 21–44%; Schema 31). Unter den gleichen Reaktionsbedingungen ließ sich auch das Isopropyl-4,6-*O*-(2-nitrobenzyliden)-1-thio- β -D-galactopyranosid (NB-cIPTG, **150**), ausgehend von 2-Nitrobenzaldehyd (**87**), in vergleichbaren Ausbeuten (21–32%) herstellen.



Schema 31: Synthese des NP-cIPTG (**84a**) nach *Binder et al.*^[271] und des NB-cIPTG (**150**).

In vitro Charakterisierung

Im Folgenden wird die Untersuchung der photochemischen Eigenschaften der synthetisierten *photocaged* Kohlenhydrate beschrieben (Abbildung 43). Die Absorptionsmaxima der Verbindungen **84a**, **84b** und **137** lagen im Bereich von 336–352 nm. Für BEC-cIPTG (**139**) liegt das Absorptionsmaximum durch eine zusätzlich überlagernde Bande bei 298 nm. Dennoch besitzen alle Verbindungen einen ausreichend hohen Extinktionskoeffizienten bei 375 nm (Tabelle 2). Einzig das *o*-Nitrobenzyl-geschützte IPTG **150** besaß ein Absorptionsmaximum von 260 nm und nur einen geringen Extinktionskoeffizienten von $126 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Alle untersuchten Verbindungen weisen Halbwertszeiten¹⁵ von <4 min nach Bestrahlung bei 375 nm auf. Für die Verbindungen **84a**, **137** und **139** bestätigte eine Stabilitätsmessung¹⁶ nach 24 h eine hohe Stabilität gegenüber Solvolyse im jeweiligen Lösungsmittel. Für das NP-cIPTG (**84a**) wurde diese Stabilität in vorherigen Anwendungen bereits unter Beweis gestellt.^[271] Für das NB-cIPTG (**150**) wurde die Stabilität nicht bestimmt, konnte jedoch durch anschließende *in vivo* Anwendungen bestätigt werden. Alle Verbindungen zeigen geeignete Eigenschaften für eine Anwendung in biotechnologischen Prozessen.

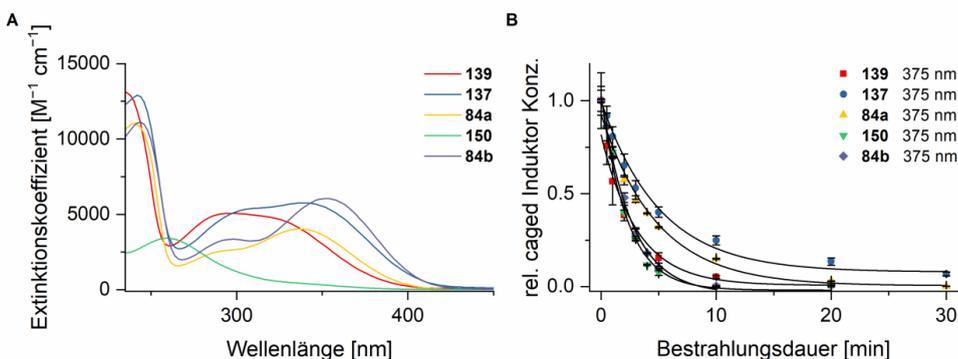


Abbildung 43: Vergleich der *photocaged* Kohlenhydrat-Derivate **84a–b**, **137**, **139** und **150**. **A)** Absorptionsspektren [**84a** und **139**: in MeOH; **137**: in NaP_i-Puffer (100 mM, pH 7.4); **150** und **84b**: in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1]. **B)** *In vitro* Zerfallskurven [**84a** und **139**: 1 mM in MeOH; **137**: 1 mM in NaP_i-Puffer (100 mM, pH 7.4); **150** und **84b**: 1 mM in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1] in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer nach Belichtung bei 375 nm (6.4 mW cm^{-2}). Bei den abgebildeten Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Triplikaten.

¹⁵ Der Begriff Halbwertszeit wird hier und im Folgenden verwendet, auch wenn es sich nicht um eine Reaktion erster Ordnung, sondern um einen komplexeren Zerfallsprozess handelt.

¹⁶ Die Stabilität wurde über den Anteil des verbleibenden Startmaterials nach Lagerung für 24 h im jeweiligen Lösungsmittel unter Ausschluss von Licht bestimmt.

Tabelle 2: Photochemische Eigenschaften der photolabil geschützten Kohlenhydrate **84a–b**, **137**, **139** und **150**.

Verbindung	λ_{\max} ^[a] [nm]	$\epsilon(375)$ ^[b] [M ⁻¹ cm ⁻¹]	$t_{0.5}(375)$ ^[c] [min]	Stabilität nach 24 h ^[d] [%]	S ^[e] [mM]	$\phi_{\text{Zerfall}}(375)$ ^[f]	$\epsilon\phi_{\text{Zerfall}}(375)$ ^[g] [M ⁻¹ cm ⁻¹]
139 ^[h]	298	1774	2.16	84±9	<0.1	6.66×10^{-2}	118
137 ^[i]	340	3564	3.51	96±5	147	4.58×10^{-2}	163
84a ^[h]	336	1690	3.37	—	0.7	4.88×10^{-2}	82
150 ^[j]	260	126	1.55	—	—	4.71×10^{-1}	59
84b ^[j]	352	4452	1.82	96±6 ^[k]	—	5.14×10^{-2}	229

^[a] Maximale Absorptionswellenlänge λ_{\max} ; ^[b] Extinktionskoeffizient ϵ bei 375 nm; ^[c] Halbwertszeit $t_{0.5}$ nach Bestrahlung bei Wellenlänge 375 nm; ^[d] Stabilität gegenüber Solvolyse unter Ausschluss von Licht (angegeben in % der verbleibenden Startverbindung nach 24 h); ^[e] Löslichkeit S gemessen in dest. Wasser; ^[f] Quantenausbeute ϕ des Zerfalls nach Bestrahlung bei 375 nm; ^[g] Photolytische Effizienz $\epsilon\phi$ des Zerfalls nach Bestrahlung bei 375 nm; ^[h] gemessen in MeOH; ^[i] gemessen in NaP_i-Puffer (100 mM, pH 7.4); ^[j] gemessen in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1; ^[k] gemessen nach 15 h.

In vivo Applikation

Mit Blick auf eine spätere wellenlängenselektive Anwendung der synthetisierten *photocaged* Induktoren wurde zunächst ihre Verwendung in verschiedenen biotechnologisch relevanten Organismen geprüft. In Kooperation mit M. Sc. *Fabienne Hilgers* wurden NP-cIPTG (**84a**), BEC-cIPTG (**139**) und BC-cIPTG (**137**) für den Einsatz in Gram-negativen (*E. coli*, *P. putida*) und Gram-positiven Bakterien (*B. subtilis*) miteinander verglichen (Abbildung 44). Im Besonderen wurde auch der Einfluss der unterschiedlichen Löslichkeit und Membrangängigkeit auf die Induzierbarkeit von LacI-kontrollierten Promotoren untersucht. Der Laktosepermease defiziente Stamm *E. coli* Tuner(DE3) (Abbildung 44A) mit eYFP Expressionsvektor pRhotHi-2-lacI-EYFP diente dabei als Bezugswert, da die generelle Anwendbarkeit zur lichtgesteuerten Genexpression für diesen bereits in früheren Publikationen am Beispiel des NP-cIPTG (**84a**) demonstriert werden konnte.^[271, 272] Die erfolgreiche Übertragung auf den Organismus *P. putida* KT2440 (Abbildung 44B) unter Verwendung des Expressionsvektors pVLT33-GFPmut3 und den Organismus *B. subtilis* DB430 (Abbildung 44C) unter Verwendung des Expressionsvektors pHT01-sfGFP ermöglichte die lichtgesteuerte Genexpression in den biotechnologisch relevanten Expressionsstämmen. Für alle verwendeten

Stämme wurde ein LacI-kontrollierter IPTG-induzierbarer Promotor gewählt (*E. coli*: P_{T7}, *P. putida*: P_{tac}, *B. subtilis*: P_{grac}). Alle Verbindungen erwiesen sich als stabil unter den verwendeten Kultivierungsbedingungen (30–37 °C, 20 h) und bewirkten keine erhöhte Basalexpression in den unbelichteten Kontrollen (Dunkelkontrolle). BC-cIPTG (**137**) zeigte aufgrund seiner erhöhten Löslichkeit hierbei die beste Anwendbarkeit. Zum einen konnte dieses direkt im Medium ohne die Beigabe von Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Ethanol in ausreichend hohen Konzentrationen gelöst werden. Zum anderen konnte durch die Verwendung von BC-cIPTG (**137**) sowohl in *P. putida* KT2440 als auch in *B. subtilis* DB430 eine signifikante Erhöhung der Expressionslevel im Vergleich zu NP-cIPTG (**84a**) und BEC-cIPTG (**139**) erreicht werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden im Journal *ChemBioChem* veröffentlicht.^[3]

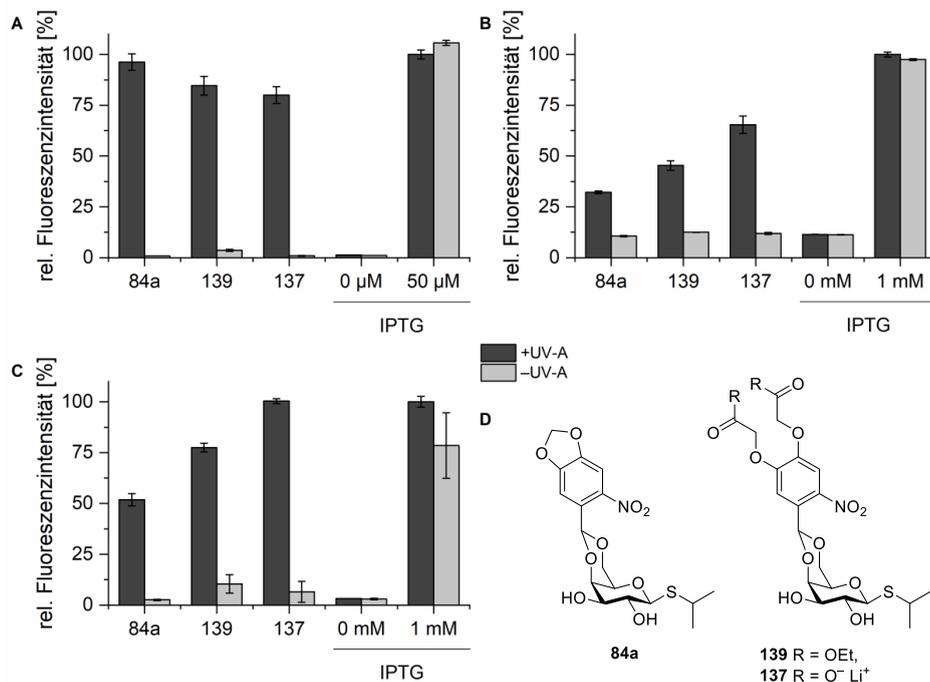


Abbildung 44: Lichtgesteuerte Genexpression in *E. coli* Tuner(DE3)/pRhotHi-2-lacI-EYFP (**A**), *P. putida* KT2440/pVLT33-GFPmut3 (**B**) und *B. subtilis* DB430/pHT01-sfGFP (**C**) unter Verwendung von NP-cIPTG (**84a**), BEC-cIPTG (**139**) und BC-cIPTG (**137**) (**D**). Die relativen Fluoreszenzlevel nach Induktion durch Bestrahlung mit UV-A Licht (365 nm; ~1 mW cm⁻²; 30 min) (+UV-A) oder der Zugabe von IPTG (**1a**) sind im Vergleich zu den unbelichteten Kontrollen (-UV-A) dargestellt. Bei den abgebildeten Werten handelt es sich um Mittelwerte ± Standardabweichung aus Triplikaten.^[3]

Zusätzlich konnte die Anwendbarkeit von NP-cIPTG (**84a**) im fakultativ anoxygenen phototrophen Organismus *R. capsulatus* sowohl unter phototrophen als auch nicht-phototrophen Kultivierungsbedingungen demonstriert werden (Abbildung 45). Dabei wurde der Stamm *R. capsulatus* SB1003 gewählt, da dieser besonders für biotechnologische Anwendungen wie beispielsweise die Produktion von Terpenen geeignet ist.^[313] Unter aeroben und mikroaeroben nicht-phototrophen sowie phototrophen anaeroben Wachstumsbedingungen erwies dieser sich als geeignet.

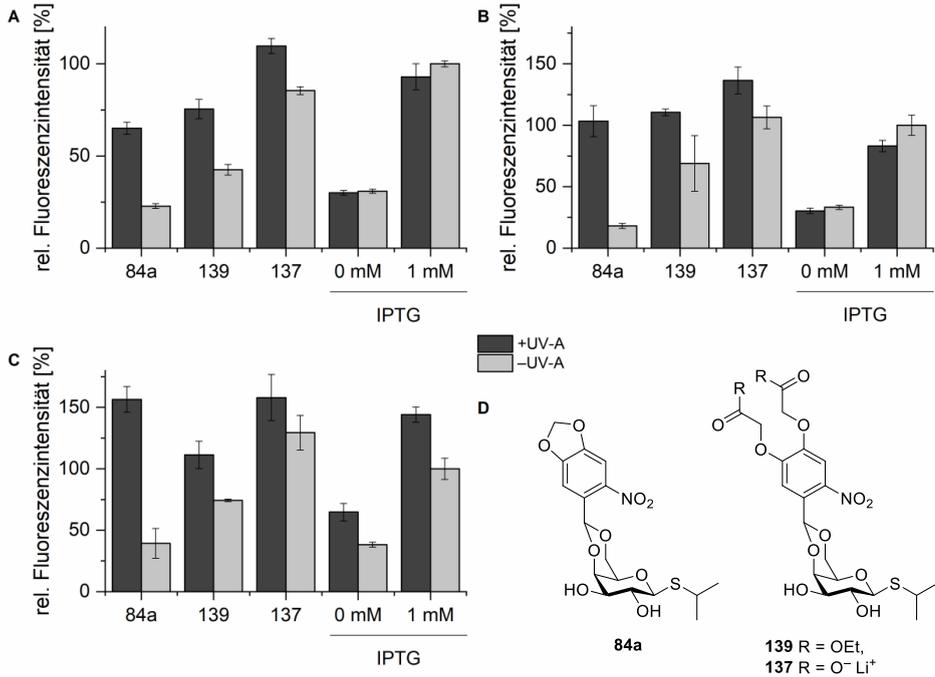


Abbildung 45: Lichtgesteuerte Genexpression in *R. capsulatus* SB1003/pRhoHi-2-eYFP unter nicht-phototrophen aeroben (A), mikroaeroben (B) und phototrophen anaeroben (C) Kultivierungsbedingungen unter Verwendung von NP-cIPTG (**84a**), BEC-cIPTG (**139**) und BC-cIPTG (**137**) (D). Die relativen Fluoreszenzlevel nach Induktion durch Bestrahlung mit UV-A Licht (365 nm; $\sim 1 \text{ mW cm}^{-2}$; 30 min) (+UV-A) oder der Zugabe von IPTG (**1a**) sind im Vergleich zu den unbelichteten Kontrollen (-UV-A) dargestellt. Bei den abgebildeten Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Triplikaten. Die Daten für diese Abbildung wurden von Fabienne Hilgers im Rahmen ihrer Dissertation erhoben und die Abbildung wurde in Anlehnung an einen gemeinsamen Manuskriptentwurf erstellt.

Jedoch bewies ausschließlich das NP-cIPTG (**84a**) eine zufriedenstellende Stabilität unter den gewählten Kultivierungsbedingungen (30 °C, 48 h). Die strukturell verwandten *photocaged* IPTG-Derivate **137** und **139** zeigten eine deutliche Instabilität, welche sich in erhöhten Werten der Dunkelkontrollen bemerkbar machte. Diese Instabilität könnte auf Organismus-spezifische Enzyme zurückzuführen sein, welche eine lichtunabhängige Hydrolyse katalysieren. Es ist bekannt, dass *R. capsulatus* über Dioxygenasen verfügt, welche grundsätzlich in der Lage sind, den aromatischen Ring von Nitrocatecholen oxidativ zu spalten, woraufhin eine Reihe weiterer Abbauschritte entlang des *ortho pathway* erfolgt.^[314] Im Zuge dessen könnte es auch ohne eine Belichtung zu einer Freisetzung des IPTGs (**1a**) kommen. Dies ist jedoch nur unter aeroben bzw. mikroaeroben Bedingungen möglich.^[314] Darüber hinaus könnte ein Abbau über reduktive Stoffwechselwege mittels Nitroreduktasen.^[315-317] erfolgen und dadurch eine Freisetzung erreicht werden. Zusätzlich zur generellen Anwendbarkeit des NP-cIPTG (**84a**) konnte die Kontrolle eines sekundären Stoffwechselweges in *R. capsulatus* SB1003 demonstriert werden. Durch die lichtinduzierte Freisetzung von IPTG (**1a**) konnte nicht-invasiv die intrinsische Carotinoid Biosynthese gesteuert werden. Die breite Anwendbarkeit in diversen Organismen konnte somit etabliert werden. Die Ergebnisse wurden in einem gemeinsamen, sich im Entwurf befindlichen Manuskript zusammengefasst.

Zusammenfassung des Kapitels

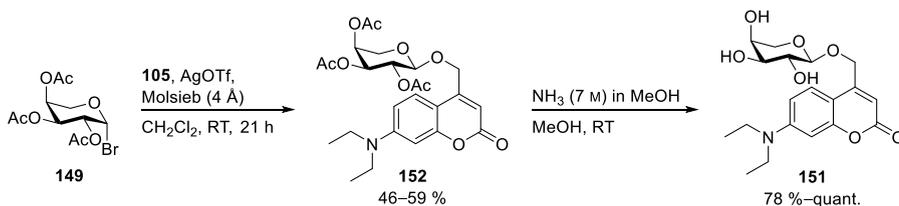
- Insgesamt wurden sechs *photocaged* Effektormoleküle auf Basis von Kohlenhydraten erfolgreich synthetisiert, von denen zwei neuartig waren.
- Die photochemischen Eigenschaften der *photocaged* Kohlenhydrate wurden charakterisiert und verglichen.
- Der Syntheseweg zu BEC-cIPTG (**139**) und BC-cIPTG (**137**) wurde optimiert.
- Die Verwendung der löslichkeitsvermittelnden Schutzgruppe (BC) zur Schützung von Zuckern als Glykosid wurde etabliert.
- In den *in vivo* Untersuchungen konnte die Anwendbarkeit von NP-cIPTG (**84a**), BEC-cIPTG (**139**) und BC-cIPTG (**137**) für den Einsatz in *E. coli* Tuner(DE3), *P. putida* KT2440, *B. subtilis* DB430 demonstriert werden.
- Im Organismus *R. capsulatus* SB1003 erwies sich ausschließlich NP-cIPTG (**84a**) als anwendbar.

4.3.1.2 Erste Generation von bathochrom verschobenen *photocaged* Kohlenhydraten – Ether und Acetale

Nachdem nun ein Grundstock von *photocaged compounds* synthetisiert worden war, welche gut geeignet für eine Photolyse bei 375 nm sind und in mehreren Organismen erfolgreich eingesetzt werden konnten, sollte das Spektrum erweitert werden. Zunächst wurde angestrebt, analog zu den 6-Nitropiperonyl-geschützten Kohlenhydraten die Cumarinyl-Schutzgruppe über eine Ether- bzw. Acetal-Bindung anzubringen. Diese zeichneten sich bisher vor allem durch eine hohe Stabilität in wässrigen Medien ($\text{pH} \geq 7$) und gegenüber enzymatischer Hydrolyse aus.^[77, 271, 274] Die Schützung von Kohlenhydraten mit (Cumarin-4-yl)methyl-Chromophoren wurde bereits von Dr. Claus Bier angestrebt, konnte jedoch nicht erfolgreich abgeschlossen werden.

Synthese und Charakterisierung des Cumarin-Ethers 151

Zur Synthese der Ether wurde erneut der Glykosyldonor **149** verwendet. Dieser lieferte mit dem Cumarinalkohol **105** als Glykosylakzeptor in einer *Koenigs–Knorr*-Reaktion unter den zuvor etablierten Reaktionsbedingungen das Glykosid **152** (Ausbeute: 46–59 %), welches nachfolgend mit Ammoniak in Methanol in guten (78 %) bis quantitativen Ausbeuten entschützt wurde (Schema 32). Bei der *Koenigs–Knorr*-Reaktion war vor allem die Verwendung von aktiviertem Molsieb (4 Å) essenziell, da ohne dieses kein Umsatz detektierbar war.



Schema 32: Syntheseweg zu DC-cArabinose **151**.

Das erhaltene $\{[7-(\text{Diethylamino})-2\text{-oxo-}2H\text{-chromen-4-yl]methyl}\}\text{-}\alpha\text{-L-arabinopyranosid}$ (**151**, DC-cArabinose) wurde auf ihre photochemischen Eigenschaften hin getestet. Die *photocaged* Verbindung besaß ein Absorptionsmaximum von 388 nm (Abbildung 46A) und eine hohe Stabilität gegenüber Solvolyse (Tabelle 3). Nach Bestrahlung bei 405 nm war jedoch nur ein sehr langsamer Zerfall zu beobachten (Abbildung 46B). Dies ist auf den zu geringen pK_b -Wert des Kohlenhydrat-Anions zurückzuführen, welches bei der heterolytischen Photolyse entsteht. Untersuchungen des Photolyse-Mechanismus von *Schmidt et al.* konnten zeigen, dass keine Photoheterolyse stattfindet falls der pK_b -Wert der Fluchtgruppe zu gering ist, wie beispielsweise bei Alkoxyaten oder dem Hydroxidion.^[119]

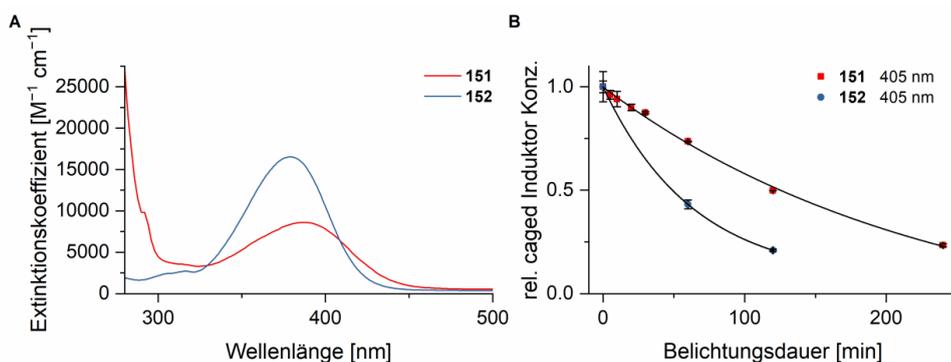


Abbildung 46: Vergleich der *photocaged* L-Arabinose-Derivate **152** und **151**. **A)** Absorptionsspektren (**152**: in MeOH; **151**: in H₂O/DMSO 99:1). **B)** *In vitro* Zerfallskurven (**152**: 1 mM in MeOH; **151**: 1 mM in H₂O/DMSO 99:1) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer nach Belichtung bei 405 nm (44.6 mW cm⁻²). Bei den abgebildeten Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Triplikaten.

Eine vollständige Stabilität gegenüber Bestrahlung liegt bei DC-cArabinose (**151**) nicht vor, dennoch erschien die Photolyse-Geschwindigkeit zu gering für eine erfolgreiche *in vivo* Anwendung, da hierbei Belichtungszeiten die 30-Minuten-Marke nicht überschreiten sollten. In früheren Arbeiten von *Binder et al.* konnte gezeigt werden, dass die Phototoxizität bei Belichtungszeiten >30 min mit UV-A-Licht zu einer Beeinträchtigung der Zellfitness geführt hat.^[77] In der unbedenklichen Zeitspanne wären jedoch lediglich 10 % der DC-cArabinose (**151**) entschützt worden. Die Untersuchung des Photolyse-Mechanismus von *Schmidt et al.* haben gezeigt, dass eine Erhöhung der Stabilität des entstehenden Ionenpaares eine Schwächung der zu spaltenden Bindung bewirkt.^[119] Zuerst wurde eruiert, ob eine bessere Stabilisierung des Kohlenhydrat-Anions zu einer erhöhten Photolysegeschwindigkeit führt. Dazu wurde die acetylierte Vorstufe **152** ebenfalls bei 405 nm über unterschiedliche Zeitspannen belichtet (Abbildung 46B). Durch den elektronenziehenden -M-Effekt der Acetyl-Schutzgruppen wird der pK_b -Wert des Kohlenhydrat-Anions erhöht und die produktbildende Photoheterolyse begünstigt. So waren nach Belichtung bei 405 nm für 1 h von der

geschützten DC-cArabinose-Variante **152** nur noch ~43 % vorhanden, wohingegen von DC-cArabinose (**151**) noch 76 % vorlagen. Aufgrund der geringeren Löslichkeit konnte die Verbindung **152** nicht im gleichen Medium (H₂O/DMSO, 99:1), sondern nur in Methanol gelöst werden. Dabei ist der beobachtete Unterschied der Zerfallsgeschwindigkeiten vermutlich nicht auf die unterschiedlichen verwendeten Lösungsmittel zurückzuführen, da die höhere Polarität des Wassers/DMSO-Gemisches durch bessere Stabilisierung des bei der Photoheterolyse entstehenden Ionenpaares einen Zerfall noch begünstigen sollte.^[116] Dennoch ist auch die acetylierte Vorstufe **152** nicht für eine biologische Anwendung geeignet, da auch hier die Dauer zur vollständigen Photolyse weit oberhalb der 30-Minuten-Marke liegt. Zusätzlich ist es fragwürdig, ob die acetylierte L-Arabinose in einem angemessenen Zeitraum von intrazellulären Esterasen hin zum gewünschten Induktor hydrolysiert werden kann. Ebenso wurde die Löslichkeit in wässrigen Medien durch die Acetylierung der Hydroxy-Gruppen deutlich herabgesetzt. Ein von M. Sc. *Fabienne Hilgers* durchgeführtes *in vivo* Experiment in *E. coli* LMG194 mit dem Expressionsvektor pBTBX-2-mCherry zeigte, dass nach Belichtung für 30 min bei 447 nm (~1 mW cm⁻²) nur eine minimale Steigerung des Expressionslevels erreicht werden konnte.

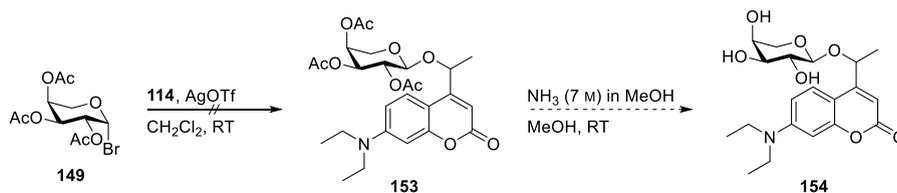
Tabelle 3: Photochemische Eigenschaften der photolabil geschützten L-Arabinose-Derivate **151** und **152**.

Verbindung	λ_{\max} ^[a] [nm]	$\epsilon(405)$ ^[b] [M ⁻¹ cm ⁻¹]	$t_{0.5}(405)$ ^[c] [min]	Stabilität nach 24 h ^[d] [%]	$\phi_{\text{Zerfall}}(405)$ ^[e]	$\epsilon\phi_{\text{Zerfall}}(405)$ ^[f] [M ⁻¹ cm ⁻¹]
152 ^[g]	379	8092	44.2	stabil ^[i]	—	—
151 ^[h]	388	7077	160	94±1	4.51×10^{-4}	3

^[a] Maximale Absorptionswellenlänge λ_{\max} ; ^[b] Extinktionskoeffizient ϵ bei λ_{\max} ; ^[c] Halbwertszeit¹⁷ $t_{0.5}$ nach Bestrahlung bei Wellenlänge 405 nm; ^[d] Stabilität gegenüber Solvolyse unter Ausschluss von Licht (angegeben in % der verbleibenden Startverbindung nach 24 h); ^[e] Quantenausbeute ϕ des Zerfalls nach Bestrahlung bei Wellenlänge 405 nm; ^[f] Photolytische Effizienz $\epsilon\phi$ des Zerfalls nach Bestrahlung bei 405 nm; ^[g] gemessen in MeOH; ^[h] gemessen in H₂O/DMSO 99:1; ^[i] Bestimmung der Stabilität nach 96 h.

¹⁷ Der Begriff Halbwertszeit wird hier und im Folgenden verwendet, auch wenn es sich nicht um eine Reaktion erster Ordnung, sondern um einen komplexeren Zerfallsprozess handelt.

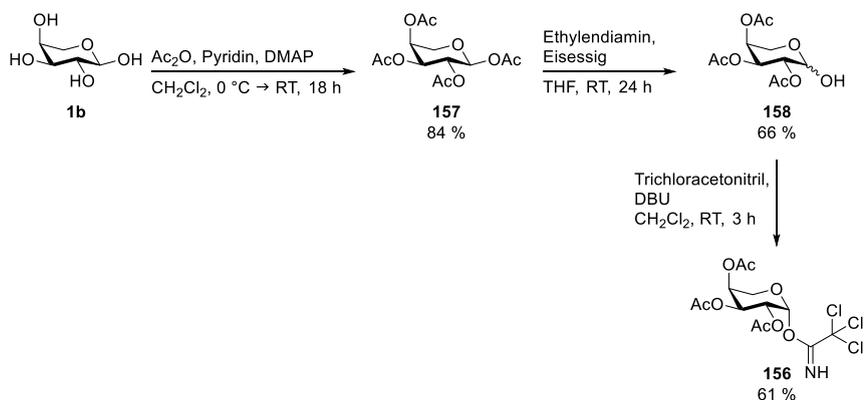
Als nächstes wurden die Möglichkeiten zur Stabilisierung des entstehenden Cumarin-Kations evaluiert. Eine Erhöhung der Elektronendichte an der benzylichen Position durch Verwendung des sekundären Cumarinalkohols **114** sollte eine schnellere Photolyse bewirken.^[119] *Gandioso et al.* konnten anhand mehrerer Beispiele eine Erhöhung der Photolyse-Effizienz um das 2–5-fache beobachten.^[187, 188] Bei der *Koenigs–Knorr*-Reaktion mit dem sekundären Alkohol **114** als Glykosylakzeptor war jedoch kein Umsatz zum Glykosid **153** erkennbar (Schema 33), weshalb die nachfolgende Entschützung zu Verbindung **154** nicht durchgeführt werden konnte.



Schema 33: Synthesansatz zur Darstellung von cArabinose **154**.

Synthese und Charakterisierung des Thiocumarin-Ethers **155**

Eine Alternative stellte die Verwendung eines Thiocumarin dar. Im direkten Vergleich mit den entsprechenden Cumarin-Derivaten zeigen Thiocumarine durchweg deutlich höhere Quantenausbeuten.^[175, 318] Einen weiteren Vorteil stellt die zeitgleiche Rotverschiebung des Absorptionsmaximums dar. Die Herstellung des {[7-(Diethylamino)-2-thio-2*H*-chromen-4-yl]methyl}- α -L-arabinopyranosids (**155**, TC-cArabinose) wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von B. Sc. *Mona Haase* untersucht und im Zuge der vorliegenden Arbeit vervollständigt.^[6] Zusätzlich zum Arabinosebromid **149** wurde der Glykosyldonor **156** synthetisiert. Hierzu wurde α -L-Arabinose (**1b**) durch Zugabe von Essigsäureanhydrid, Pyridin und 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) zum Produkt **157** peracetyliert (Ausbeute: 84 %), bevor unter Verwendung von Ethylendiamin und Eisessig das anomere Zentrum selektiv entschützt wurde.^[308, 319] Der selektiv deacetylierte Zucker **158** wurde in einer Ausbeute von 66 % als α/β -Anomerengemisch (1:3) erhalten. Analog zum Vorgehen bei Glukose **148** wurde erneut durch Umsetzung mit dem Reagenz Trichloracetonitril und DBU als Base selektiv das β -Anomer **156** erhalten (Ausbeute: 61 %; Schema 34).^[320]



Schema 34: Syntheseweg zur Darstellung des Glykosyldonor **156**.

Weder die *Koenigs–Knorr*-Reaktion noch die Trichloracetimidat-Methode konnten das Glykosid **159** liefern. Somit wurde ein alternativer Ansatz gewählt, in dem das acetylierte Glykosid **152** direkt mit dem *Lawessons* Reagenz in Toluol unter Rückflussbedingungen zum Thiocumarin **159** umgesetzt und in einer Ausbeute von 72 % erhalten wurde (Schema 35). Dies war nur mit der geschützten Verbindung möglich, da Hydroxy-Gruppen eine deutlich höhere Reaktivität als Lactone gegenüber dem *Lawessons* Reagenz besitzen.^[289] Der erfolgreiche Ablauf der Reaktion konnte über $^1\text{H-NMR}$ nachgewiesen werden (Abbildung 47). Wie in der Literatur beschrieben, zeigte sich insbesondere das 3-H Proton aufgrund des abschirmenden Effekts der angrenzenden Thiocarbonyl-Funktionalität deutlich tieffeldverschoben (6.17 ppm \rightarrow 7.09 ppm).^[150]

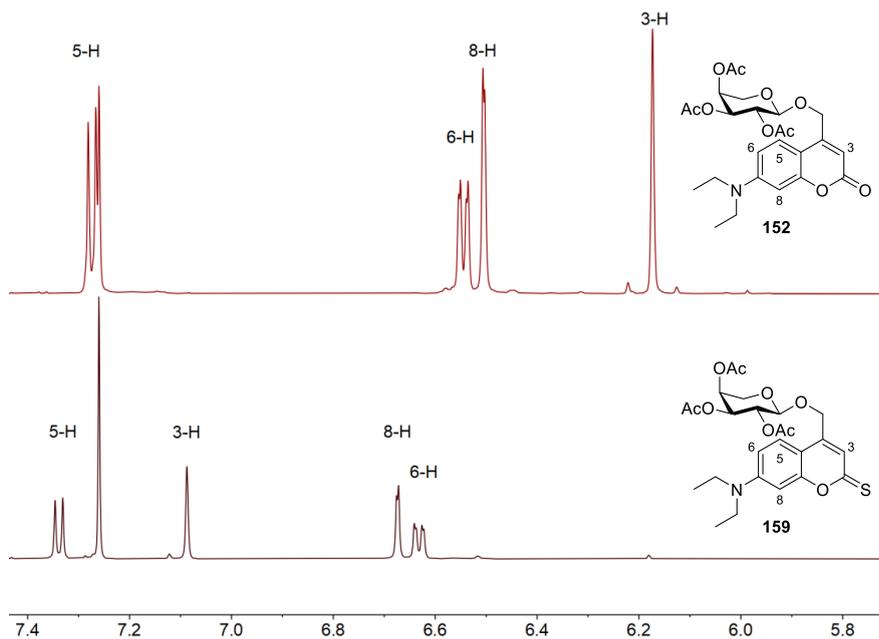
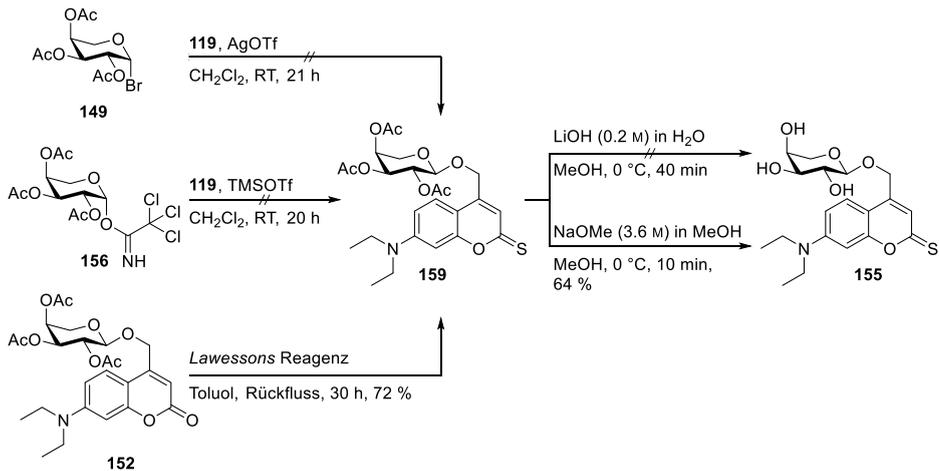


Abbildung 47: Reaktionskontrolle durch Vergleich der chemischen Verschiebung des 3-H Protons anhand der ¹H-NMR-Spektren des Cumarins **152** und des Thiocumarins **159**.

Die anschließende Entschützung mittels Natriummethanolat in Methanol (3.6 M) lieferte TC-cArabinose (**155**) in einer Ausbeute von 64 %. Hierbei war es essenziell, kurze Reaktionszeiten und eine Temperatur von 0 °C einzuhalten. Als Nebenprodukt konnten dennoch Spuren des DC-Äquivalents **151** beobachtet werden. Eine ebenfalls versuchte Entschützung mittels wässriger Lithiumhydroxid-Lösung (0.2 M) in Methanol bei 0 °C lieferte kein identifizierbares Produkt.



Schema 35: Experimente zur Synthese von TC-cArabinose (**155**).

Die in Tabelle 4 zusammengefasste Charakterisierung der TC-cArabinose (**155**) lieferte zunächst die erhofften Ergebnisse in Form einer starken Verschiebung der $\pi\pi^*$ Bande (388 nm \rightarrow 468 nm), eines sehr langsamen Zerfalls bei 375 nm und eines sehr schnellen Zerfalls bei 430 nm (Abbildung 48). Letztere stellen notwendige Bedingungen für die Anwendbarkeit in einem orthogonalen bzw. wellenlängenselektiven System dar. Zusätzlich zeigte sich eine leicht verringerte Stabilität von 85 % gegenüber Solvolyse nach 24 h. Eine Betrachtung der HPLC-Chromatogramme und der UV-Spektren zeigte jedoch, dass das entstehende Photolyse-Produkt die gleiche Retentionszeit und ein identisches UV/Vis-Spektrum aufweist wie DC-cArabinose (**151**). Eine Analyse einer belichteten Probe *via* LC-MS bestätigte dies ebenfalls. Die Möglichkeit der Photooxidation von Thiocumarinen zum entsprechenden Cumarin hatten bereits *Fournier et al.* beobachtet. Hier trat dieser Effekt jedoch erst bei längerer Belichtung nach bereits vollständiger Photolyse der *photocaged* Verbindung auf.^[183] Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen lässt sich bei Betrachtung der austretenden Gruppe finden. Während die entstehende Carbaminsäure bei *Fournier et al.* eine ausgezeichnete Fluchtgruppe darstellt, handelt es sich im vorliegenden Fall um eine eher schlechte Abgangsgruppe. Dadurch wird die zuvor nur im geringen Maße auftretende Nebenreaktion zur Hauptdeaktivierung des angeregten Zustandes und macht eine Verwendung zur Freisetzung von Zuckern unmöglich. Dieser Effekt wurde später von *Tang et al.* genutzt, um gängige Fluorophore mit sichtbarem Licht zu aktivierbaren Fluoreszenz-Schaltern zu transformieren.^[321] Eine Testung des Thiocumarin Glykosid **155** in einem *in vivo* Setting wurde daher als nicht zielführend erachtet.

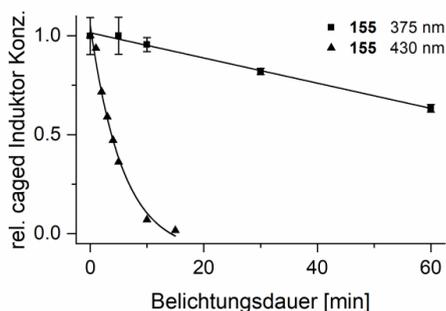


Abbildung 48: Vergleich der *in vitro* Zerfallskurven der photocaged L-Arabinose **155** [0.5 mM in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1] in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer nach Belichtung bei 375 nm (6.4 mW cm⁻²) und 430 nm (45.6 mW cm⁻²). Bei den abgebildeten Werten handelt es sich um Mittelwerte ± Standardabweichung aus Triplikaten.

Tabelle 4: Photochemische Eigenschaften der Thio-cumarin-geschützten L-Arabinose **155**.

Verbindung	λ_{\max} ^[a] [nm]	$\epsilon(430)$ ^[b] [M ⁻¹ cm ⁻¹]	$t_{0.5}(\lambda_{\text{Str}})$ ^[c] [min]	Stabilität nach 24 h ^[d] [%]	$\phi_{\text{Zerfall}}(430)$ ^[e]	$\epsilon\phi_{\text{Zerfall}}(430)$ ^[f] [M ⁻¹ cm ⁻¹]
155 ^[g]	468	9842	80.9 (375)	85±5	1.37 × 10 ⁻²	135
			3.95 (430)			

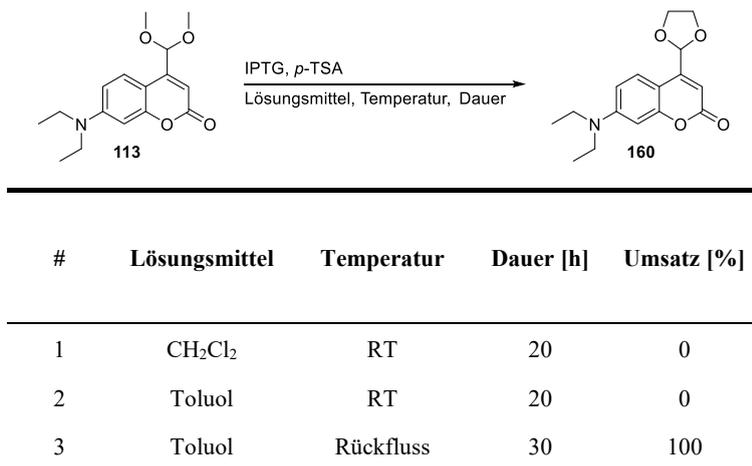
^[a] Maximale Absorptionswellenlänge λ_{\max} ; ^[b] Extinktionskoeffizient ϵ bei 430 nm; ^[c] Halbwertszeit $t_{0.5}$ nach Bestrahlung bei Wellenlänge λ_{Str} ; ^[d] Stabilität gegenüber Solvolyse unter Ausschluss von Licht (angegeben in % der verbleibenden Startverbindung nach 24 h); ^[e] Quantenausbeute ϕ des Zerfalls nach Bestrahlung bei 430 nm; ^[f] Photolytische Effizienz $\epsilon\phi$ des Zerfalls nach Bestrahlung bei 430 nm; ^[g] gemessen in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1.

Synthese von Cumarin-Acetalen

Im Folgenden sollte ebenfalls die Verwendung von Cumarin-Acetalen evaluiert werden. *Lin et al.* konnten zeigen, dass die Photolyse von Acetalen nur bei 5- und 7-Ring-Acetalen erfolgreich war, wohingegen sich 6-Ring-Acetale inert gegenüber Photolyse zeigten.^[137] Erste Untersuchungen zur Synthese von 5-Ring-Acetalen wurden bereits von Dr. *Claus Bier* durchgeführt, führten jedoch nicht zur Bildung der gewünschten Produkte.^[312] Kürzlich konnten *Laguerre et al.* durch Herabsetzen der Elektronendichte im 6-Ring-Acetal mittels eines Esters ein photolysierbares 6-Ring-Cumarinacetal erzeugen.^[138] Da dies bei der Verwendung von Zuckern keine Option darstellt, scheint einzig das 5-Ring-Acetal von Interesse zu sein. Eine erste Testreaktion mit Dimethylacetal **113** zeigte, dass schon eine einfache Transacetalisierung mit dem sterisch wenig anspruchsvollen Ethylenglykol zum 5-Ring-Acetal **160** nur unter hohen Temperaturen abläuft (Tabelle 5, #3). Bei Raumtemperatur konnte weder

in Dichlormethan (#1) noch in Toluol (#2) ein Umsatz mittels Dünnschichtchromatographie detektiert werden. Eine vergleichbare Testreaktion wurde auch schon von Dr. *Claus Bier* durchgeführt, wobei jedoch in einer Eintopf-Reaktion ausgehend von 7-(Benzyloxy)-4-formylcumarin zunächst *in situ* das entsprechende Dimethylacetal gebildet und anschließend zum Produkt transacetalisiert wurde. Dabei wurde das entsprechende 5-Ring-Acetal jedoch nur in einer Ausbeute von 5 % isoliert.^[312]

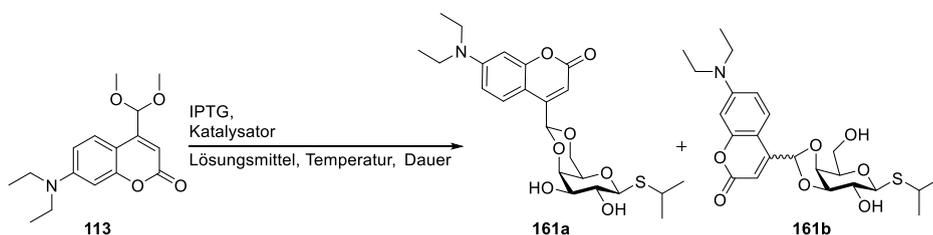
Tabelle 5: Testreaktion zur Bildung von 5-Ring-Cumarin-Acetalen.



Aufgrund des deutlich höheren Umsatzes wurde versucht über eine Transacetalisierung ein geschütztes IPTG-Derivat zu erhalten. IPTG (**1a**) wurde hier ohne Verwendung einer Schutzgruppe eingesetzt. Dadurch sollte die Bildung des 1,3-Dioxan **161a** sowohl kinetisch als auch thermodynamisch bevorzugt sein. Aber auch die Entstehung des gewünschten 1,3-Dioxolan **161b** am 1,2-*cis*-Diol (3-OH und 4-OH) ist nicht vollständig auszuschließen. Hingegen ist die Bildung eines Acetals mit 1,2-*trans*-Diolen aufgrund der hohen Ringspannung des nötigen *trans*-annelierten bicyclischen Dioxolans generell unvorteilhaft.^[322] Somit sollten maximal zwei Regioisomere entstehen können. Bei der Verwendung von *p*-Toluolsulfonsäure konnte in Toluol jedoch nur ein geringer Umsatz beobachtet werden (Tabelle 6, #1). Nach wässriger Aufarbeitung war es lediglich möglich, das 6-Ring-Acetal **161a** in einer Ausbeute von ~2 % in mäßiger Reinheit zu isolieren. IPTG (**1a**) wies eine geringe Löslichkeit in Toluol auf, weshalb ebenfalls die Verwendung von DMF (#2) erprobt wurde. Obwohl IPTG (**1a**) in diesem Lösungsmittel eine gute Löslichkeit aufwies, konnte nur ein geringer Umsatz detektiert werden. Eine Verringerung der Reaktionstemperatur (#3) brachte ebenfalls keine Erhöhung des Umsatzes, ebenso wenig wie die Verwendung von Pyridinium *p*-Toluolsulfonsäure (PPTS) als Katalysator (#4, #5). Im Folgenden wurde getestet, inwiefern sich die einzelnen Parameter auf die Stabilität des Zuckers auswirken (Tabelle 7). Es wurde deutlich, dass die Kombination aus

hoher Temperatur und saurem Katalysator zu einer Zersetzung des Zuckers führte. Dabei schien es keinen Unterschied zu machen, ob *p*-TSA (#1) oder PPTS (#3) als Katalysator verwendet wurden. Des Weiteren zeigte sich, dass in DMF eine geringere Zersetzung zu beobachten war (#4, #5) und insbesondere eine Verringerung der Temperatur auf 80 °C diese auf ein Minimum reduzierte (#6). Daher wurden im Folgenden für die Reaktion mit dem Dimethylacetal **113** mildere Reaktionsbedingungen angewandt, welche schon zur Acetalisierung bei strukturell ähnlichen Zuckern Anwendung fanden.^[323, 324] Reaktionsbedingungen, welche bei einem monobenzylierten IPTG-Derivat selektiv zur Bildung eines 1,3-Dioxans verwendet werden konnten,^[323] bewirkten keine Verbesserung des Umsatzes (Tabelle 6, #6). Ebenso lieferte Indiumtriflat als Katalysator bei 60 °C keinerlei Umsatz (Tabelle 6, #7).^[324]

Tabelle 6: Testung verschiedener Reaktionsparameter zur Steigerung des Umsatzes.



#	Katalysator	Lösungsmittel	Temperatur	Dauer	Umsatz ^[1]
1	<i>p</i> -TSA	Toluol	Rückfluss	1 d	niedrig
2	<i>p</i> -TSA	DMF	Rückfluss	1 d	niedrig
3	<i>p</i> -TSA	DMF	100 °C	1 d	niedrig
4	PPTS	Toluol	Rückfluss	1 d	niedrig
5	PPTS	DMF	120 °C	1 d	niedrig
6	<i>p</i> -TSA	MeCN	50 °C	1 d	niedrig
7	In(OTf) ₃	DMF	60 °C	1 d	niedrig

^[1] Bestimmung mittels Dünnschichtchromatographie.

Tabelle 7: Stabilitätstest unter verschiedenen Reaktionsbedingungen.

#	Edukt	Katalysator	Lösungsmittel	Temperatur	Zeitpunkt der DC-Kontrolle	Zersetzungsgrad des Eduktes ^[a]
1	IPTG (1a)	<i>p</i> -TSA	Toluol	Rückfluss	3 h	vollständig
2	IPTG (1a)	—	Toluol	Rückfluss	3 h	keine Zersetzung
3	IPTG (1a)	PPTS	Toluol	Rückfluss	16 h	vollständig
4	IPTG (1a)	PPTS	DMF	120 °C	5 h	teilweise
5	IPTG (1a)	<i>p</i> -TSA	DMF	120 °C	5 h	teilweise
6	IPTG (1a)	<i>p</i> -TSA	DMF	80 °C	16 h	minimal
7	L-Arabinose (1b)	<i>p</i> -TSA	DMF	120 °C	2 h	vollständig
8	162	<i>p</i> -TSA	Toluol	120 °C	3 h	vollständig

^[a] Bestimmung mittels Dünnschichtchromatographie.

Im Gegensatz zu Acetalen bevorzugen Ketale unter thermodynamischer Reaktionskontrolle die Bildung von 1,3-Dioxolanen gegenüber 1,3-Dioxanen, da hierdurch die sterischen Wechselwirkungen minimiert werden können, welche durch den zusätzlichen Alkyl-Rest entstehen.^[322] Die Verwendung eines Cumarinketons **115** bzw. des entsprechenden Dimethylketals **116** in Kombination mit dem *tert*-Butyldimethylsilyl-geschützten IPTG-Derivat **162** sollte die Entstehung des 1,3-Dioxolans **163** ermöglichen (Schema 36). Doch auch hier war aufgrund der mangelnden Stabilität des Zuckers kein Produkt isolierbar.

4.3.1.3 Zweite Generation von bathochrom verschobenen *photocaged* Kohlenhydraten – Kohlensäureester

Da Cumarin-Ether nicht im benötigten Zeitraum photolysierbar waren und Cumarin-Acetale nicht effizient gebildet werden konnten, wurde die Synthese von Cumarin-Kohlensäureestern angestrebt. Diese versprachen aufgrund der besseren Fluchtgruppen-Eigenschaften des Kohlensäure-Anions eine deutlich beschleunigte Photoheterolyse^[119] und wurden bereits von *Suzuki et al.* unter anderem zur Freisetzung eines Galactose-Derivates verwendet.^[129] Auf Grundlage dieses Konzeptes sollten photolabil geschützte IPTG-Derivate synthetisiert werden. Durch vier freie Hydroxy-Gruppen mit ähnlicher Reaktivität war hierzu eine geeignete Schutzgruppen-Strategie nötig. Dabei war es essenziell Schutzgruppen zu verwenden, welche in der letzten Stufe der Syntheseroute unter sauren Bedingungen abspaltbar waren, um so die Stabilität des Kohlensäureesters zu gewährleisten. IPTG (**1a**) wurde zunächst in Anlehnung an eine Vorschrift von *Du et al.* mit einer Acetonid-Schutzgruppe versehen (Tabelle 8).^[326] Es konnte die Bildung von zwei Produkten beobachtet werden. Zum einen wurde das gewünschte 1,3-Dioxolan **164a** und zum anderen als kinetisches Produkt das 1,3-Dioxan **164b** gebildet. Bei einer Reaktionszeit von 3.5 h wurden diese in einem Verhältnis von 1.5:1 zugunsten des benötigten 1,3-Dioxolan **164a** erhalten. Bei diesem handelt es sich um das thermodynamisch stabilere Produkt, weshalb im Folgenden die Reaktionszeit erhöht wurde. Somit konnte bei einem 5 g Ansatz bei einer Reaktionszeit von 21 h ein Produktverhältnis von ~17:1 erreicht werden. Durch die längere Reaktionszeit konnte so die in der Literatur publizierte Ausbeute von 40 %^[326] deutlich übertroffen werden.

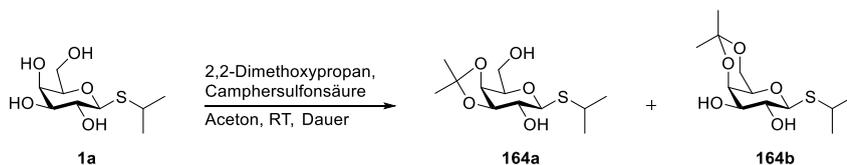
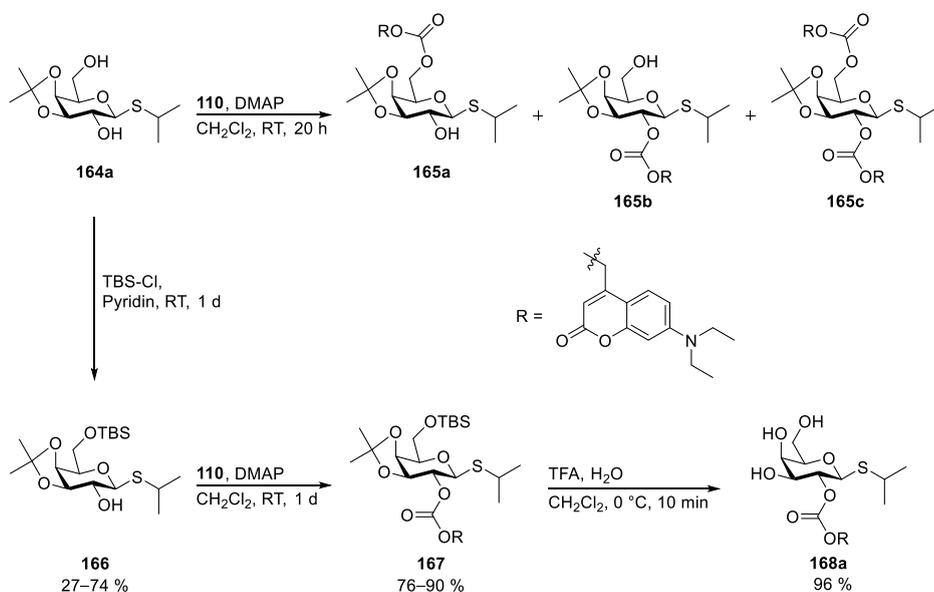


Tabelle 8: Einfluss der Reaktionszeit und der Ansatzgröße auf Umsatz und Selektivität der Produktbildung.

#	Maßstab [g]	Dauer [h]	Umsatz [%]	Ausbeute [%] ^[a]	
				Produkt 164a	Nebenprodukt 164b
1	0.2	3.5	98	58	38
2	3.0	5.5	91	74	17
3	5.0	7	85	70	15
4	5.0	21	88	83	5

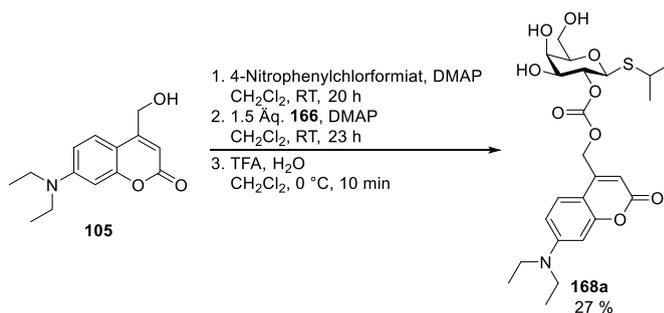
^[a] isolierte Ausbeute

Bei den nun verbleibenden freien Hydroxy-Gruppen handelt es sich um eine sekundäre und eine primäre. Diese unterscheiden sich zwar in ihrer Reaktivität, jedoch nicht ausreichend, um bei der Umsetzung mit dem aktivierten Cumarin-Kohlensäureester **110** unter den von *Suzuki et al.*^[129] publizierten Reaktionsbedingungen eine selektive Schützung der 6-OH-Gruppe zu ermöglichen. Bei Raumtemperatur wurde ein aufwendig aufzutrennendes Produktgemisch der beiden einfach Cumarin-geschützten Zucker **165a** und **165b**, sowie des zweifach Cumarin-geschützten IPTG-Derivates **165c** erhalten (Schema 37). Daher wurde aufgrund der höheren Reaktivität selektiv die 6-OH-Gruppe mit einer *tert*-Butyldimethylsilyl-Schutzgruppe (TBS-Schutzgruppe) versehen.^[326] Bei dieser Schützung mit TBS-Chlorid in Pyridin wurden sehr variable Ausbeuten des IPTG-Derivates **166** im Bereich von 27–74 % erhalten. Die portionsweise Zugabe des TBS-Chlorids führte hierbei zu den höchsten Ausbeuten. Die anschließende Umsetzung mit einem 10%igen Überschuss des aktivierten Cumarin-Kohlensäureesters **110** lieferte nun selektiv das gewünschte Produkt **167** in hohen bis sehr hohen Ausbeuten (76–90 %). Die finale Entschützung zum *photocaged* IPTG **168a** erfolgte durch die Zugabe von Trifluoressigsäure (TFA) bei 0 °C (Ausbeute: 96 %).



Schema 37: Syntheseweg hin zu DC-cIPTG (**168a**).

Um die Anzahl der Reinigungsschritte zu minimieren konnte ausgehend vom Cumarin-Alkohol **105** *in situ* der aktivierte Kohlensäureester **110** erzeugt werden, welcher nach Zugabe des Kohlenhydrates **166** direkt zum Cumarin-geschützten Zucker **167** umgesetzt wurde (Schema 38). Dabei war es jedoch nötig, den Zucker **166** in einem deutlichen Überschuss (1.5 Äquivalente) zu verwenden, um eine erfolgreiche Reaktion zu gewährleisten. Die nach kurzer wässriger Aufarbeitung angeschlossene Entschützung mit TFA und die darauffolgende säulenchromatographische Isolation lieferte das gewünschte Produkt **168a** in einer Ausbeute von 27 % über drei Stufen hinweg. Der eingesetzte Überschuss des Zuckers **166** ließ sich nach der Entschützung leicht abtrennen.

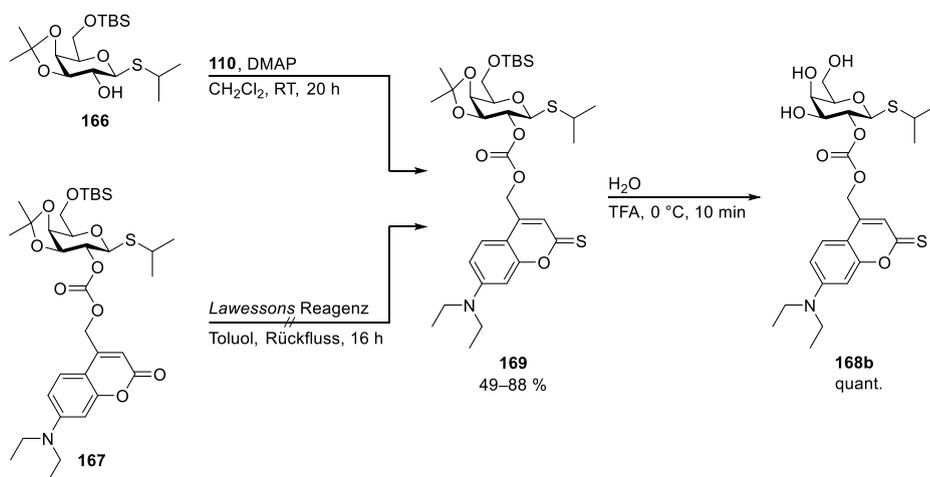


Schema 38: Konsekutive Reaktionssequenz zur Synthese von DC-cIPTG (**168a**).

Synthese von rotverschobenen Derivaten

Mit der etablierten Syntheseroute sollten im Folgenden das Thiocumarin-Derivat **168b** und das Dicyanocumarin-Derivat **168c** synthetisiert werden. Hierzu wurden die zuvor synthetisierten Kohlensäureester **121** und **122** sowie das geschützte IPTG-Derivat **166** verwendet. Zunächst wurde mit der Synthese des Thiocumarin-Derivates **168b** begonnen. Unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie zuvor konnte das Produkt in schwankenden Ausbeuten von 49–88 % isoliert werden (Schema 39). Eine alternative Umsetzung des *photocaged* IPTG-Derivates **167** mit dem *Lawessons* Reagenz war nicht erfolgreich. Hier konnte aufgrund der harschen Reaktionsbedingungen kein definiertes Produkt isoliert werden. Die finale Entschützung zum TC-cIPTG (**168b**) stellte sich ebenfalls als problematisch heraus. Wie bereits von *Gandioso et al.* beobachtet, konnte bei Thiocumarinen unter sauren Reaktionsbedingungen schon bei Raumtemperatur in Kombination mit Wasser als Nukleophil ein Angriff am Thiocarbonyl als Nebenreaktion stattfinden.^[187] Im Fall des Thiocumarins **169** sollte die Verringerung der Reaktionstemperatur auf 0 °C die unerwünschte Nebenreaktion unterbinden. War bei Raumtemperatur noch eine nahezu vollständige Umsetzung zum Cumarin **168a** zu erkennen, konnte die Nebenreaktion bei 0 °C größtenteils unterdrückt, jedoch nicht vollständig verhindert werden (Abbildung 49). Eine weitere

Reduktion der Temperatur auf $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ brachte keine eindeutige Verbesserung. Um die Temperatur weiter verringern zu können, war es nötig die Reaktionslösung mit Dichlormethan zu verdünnen, da der Schmelzpunkt von Trifluoressigsäure bei $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ liegt. Eine mit Dichlormethan verdünnte Reaktionslösung wurde auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Bei dieser Temperatur war kein Umsatz erkennbar. Die Reaktionslösung wurde langsam auf Raumtemperatur aufgewärmt. Nach 100 min bei einer Endtemperatur von $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ konnte der vollständige Umsatz per Dünnschichtchromatographie detektiert werden. Im NMR-Spektrum des Rohproduktes ist zu erkennen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen Reaktion bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ besteht. Eine alternative Entschützung *via* Iod in Methanol sollte sowohl die Entfernung der Acetonid-Schutzgruppe^[327] als auch der TBS-Schutzgruppe^[328] ermöglichen. Zusätzlich zur Entfernung der Schutzgruppen trat jedoch auch die unerwünschte Substitution des Thiocarbonyls als Nebenreaktion auf. Daher wurde die Reaktion weiterhin mit TFA bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Dabei fiel jedoch auf, dass der Anteil des Cumarins **168a** nach der säulenchromatographischen Reinigung höher lag als zuvor, was auf eine Zersetzung, katalysiert durch das ebenfalls saure Kieselgel, zurückzuführen sein könnte. Auch bei Verwendung von CDCl_3 als Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie konnte nach wenigen Stunden eine Zunahme des Cumarins **168a** beobachtet werden. Um dem vorzubeugen, musste deuteriertes Aceton verwendet werden. Ebenfalls zeigte sich, dass die Thiocumarin-Derivate **169** und **168b** eine deutlich verminderte Stabilität bei Raumtemperatur aufwiesen und im Gegensatz zu den Cumarin-Derivaten nur unter Argon bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden konnten.



Schema 39: Syntheseweg hin zu TC-cIPTG (**168b**).

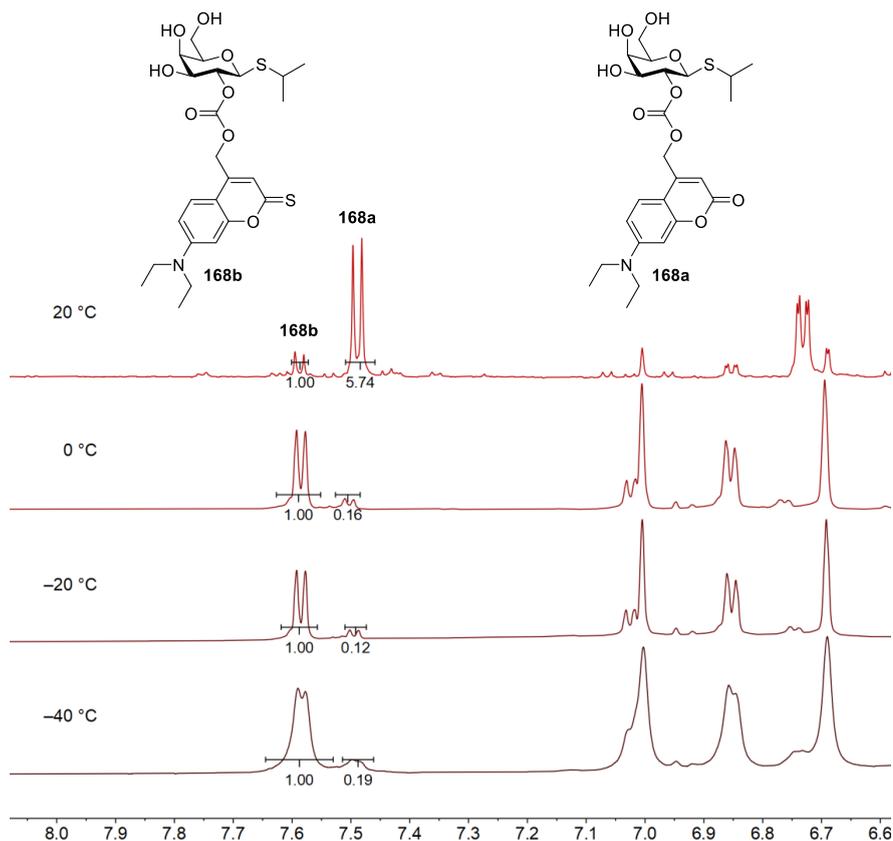
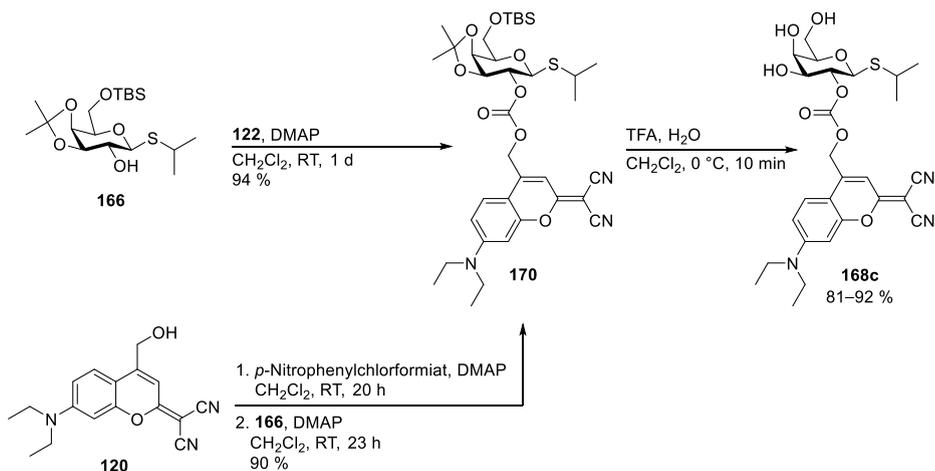


Abbildung 49: Vergleich der NMR-Spektren der Rohprodukte von Verbindung **168b** nach Entschützung bei 0, –10 und –40 °C.

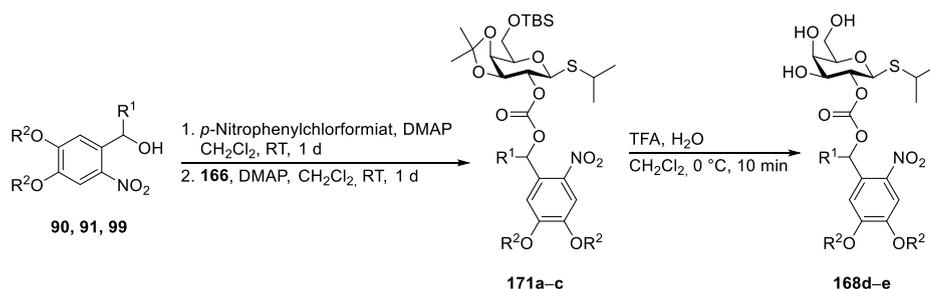
Aufgrund der geringen Stabilität und der dadurch bedingten eingeschränkten Handhabbarkeit sollte das Dicyanocumarin-Derivat **168c** synthetisiert werden. *Gandioso et al.* konnten zeigen, dass die Dicyano-Gruppe stabil gegenüber sauren Reaktionsbedingungen ist.^[187] Nach der bereits etablierten Syntheseroute konnte so zunächst Dicyanocumarin **170** sowohl unter Verwendung des aktivierten Kohlensäureesters **122** als auch in einer Konsektivreaktion ausgehend vom Dicyanocumarin-Alkohol **120** erhalten werden (Schema 40). Beide Wege lieferten die Verbindung **170** in hohen Ausbeuten (90–94 %). Bei der anschließenden Entschützung mit TFA bei 0 °C traten keine Nebenreaktionen auf (Ausbeute: 81–92 %) und das Produkt **168c** zeigte nicht nur eine erhöhte Stabilität gegenüber sauren Reaktionsbedingungen, sondern war auch bei Raumtemperatur lagerstabil.



Schema 40: Syntheseweg hin zu DcC-cIPTG (**168c**).

Synthese von *o*-Nitrobenzyl-Derivaten

Die Syntheseroute sollte auch auf die häufig verwendeten *o*-Nitrobenzyl-Derivate übertragen werden. Abschließend sollte zum einen ein *in vitro* Vergleich der photochemischen Eigenschaften mit den Cumarin-Derivaten erfolgen und zum anderen ein Vergleich mit den zuvor synthetisierten *o*-Nitrobenzyl-geschützten IPTG-Derivaten. Es wurden ausgehend von den entsprechenden Alkoholen **90**, **91** und **99** *in situ* die aktivierten Kohlensäureester generiert und konsekutiv zu den Verbindungen **171a–c** umgesetzt (Tabelle 9). Dabei konnten für die DMAP-katalysierten Umsetzungen der beiden primären Alkohole **90** und **99** vergleichbare Ausbeuten (61–63 %) erzielt werden. Für den sekundären Alkohol **91** war aufgrund des Stereozentrums die Bildung eines Diastereomerenmischs zu erwarten. Es konnte jedoch nur eines der beiden Diastereomere in angemessener Reinheit isoliert werden, weshalb die eigentliche Ausbeute wohl über den isolierten 11 % liegt. Jedoch ist davon auszugehen, dass diese weiterhin deutlich unter den 60 % der übrigen Reaktionen anzusiedeln ist. Die nachfolgende Entschützung mit TFA bei 0 °C wurde für die Verbindung **171b** aufgrund der aufwendigeren Synthese und Reinigung nicht mehr durchgeführt. Während der Zucker **168d** in einer Ausbeute von 78 % isoliert werden konnte, wurde der Zucker **168e** nur in einer Ausbeute von 43 % erhalten. Dies lag an der ebenfalls unter aciden Bedingungen auftretenden Esterhydrolyse der Ethylester.

Tabelle 9: Synthese von *o*-Nitrobenzyl-Derivat-geschützten Kohlenhydraten als Kohlensäureester.

Alkohol	Zwischenstufe	Photocaged compound	R ¹	R ²	Ausbeute [%]	
					Erste Reaktion	Zweite Reaktion
90	171a	168d	H	-CH ₂ -	63	78
91	171b	—	Me	-CH ₂ -	11 ^[a]	—
99	171c	168e	H	CH ₂ CO ₂ Et	61	43

^[a] Es konnte lediglich eines der beiden Diastereomere sauber isoliert werden.

Vergleichende Betrachtung der Kohlensäureester

Die synthetisierten *photocaged* Kohlenhydrate der zweiten Generation wurden im Folgenden auf ihre photochemischen Eigenschaften hin untersucht. Ein Vergleich der Absorptionsspektren zeigte, dass sowohl der erwartete deutliche Unterschied in den Absorptionsmaxima (λ_{max}) als auch in den Extinktionskoeffizienten (ϵ) erreicht werden konnte (Abbildung 50A). Der Cumarin-Kohlensäureester **168a** besitzt nicht nur ein Absorptionsmaximum von 386 nm und den höchsten Extinktionskoeffizienten mit $\sim 25\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, sondern auch noch eine hohe Absorption bei Wellenlängen $>400\text{ nm}$. Der 6-Nitropiperonyl-Kohlensäureester **168d** hingegen verfügt über ein Absorptionsmaximum von 350 nm und einen Extinktionskoeffizienten von $\sim 5000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (Tabelle 10). Hinzu kommt, dass nahezu keine Absorption oberhalb von 400 nm zu verzeichnen ist. Ein Vergleich der Stabilität gegenüber Solvolyse betont ebenfalls die bessere Anwendbarkeit des Cumarin-Derivates **168a** und der bisherigen *o*-Nitrobenzyl-Derivate **84a**, **137**, **139** und **150**, da dieser Stabilitätsunterschied bei einer *in vivo* Anwendung durch die erhöhten Temperaturen noch weiter verstärkt wird. Zusätzlich liegt die Halbwertszeit¹⁸ nach Bestrahlung bei 375 nm für das 6-Nitropiperonyl-Derivat **168d** um den Faktor 10 höher als bei den bisherigen *o*-Nitrobenzyl-Derivaten **84a**, **137**, **139** und **150**, wodurch keine vollständige Photolyse im angestrebten Zeitraum von

¹⁸ Der Begriff Halbwertszeit wird hier und im Folgenden verwendet, auch wenn es sich nicht um eine Reaktion erster Ordnung, sondern um einen komplexeren Zerfallsprozess handelt.

30 min möglich ist (Abbildung 50C). Diese Beobachtungen decken sich gut mit den von *Suzuki et al.* publizierten Ergebnissen.^[129] Die *o*-Nitrobenzyl-Kohlensäureester scheinen somit aufgrund der deutlich schlechteren photochemischen Eigenschaften aller bestimmten Parameter keine geeignete Alternative zu den bisher verwendeten *o*-Nitrobenzyl-Derivaten **84a**, **137**, **139** und **150** zur Anwendung in der lichtgesteuerten Genexpression zu sein.

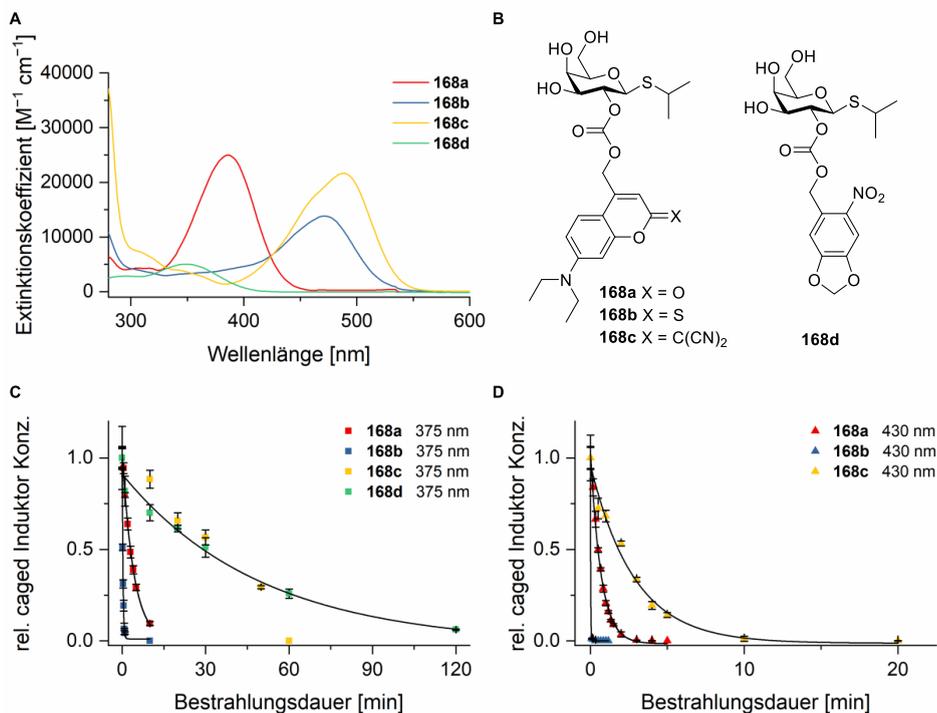


Abbildung 50: Vergleich der *photocaged* Kohlenhydrate der zweiten Generation. **A)** Absorptionsspektren [in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1]. **B)** Strukturformeln. **C)** *In vitro* Zerfallskurven [0.5 mM in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1] in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer nach Belichtung bei 375 nm (6.4 mW cm^{-2}). **D)** *In vitro* Zerfallskurven [0.5 mM in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1] in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer nach Belichtung bei 430 nm (45.6 mW cm^{-2}). Bei den abgebildeten Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Triplikaten.

Die Modifikation des Cumarin-Grundgerüsts hin zu den Thio- und Dicyano-Varianten **168b** und **168c** zeigte die gewünschte bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums, wodurch Maxima von 375 nm bzw. 488 nm erreicht werden konnten. Dabei erwies sich das Dicyano-Derivat **168c** als die in vielerlei Hinsicht überlegene Modifikation. Diese besitzt zusätzlich zum leicht höheren Absorptionsmaximum einen deutlich höheren molaren Extinktionskoeffizienten ($13800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ vs. $21700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Eine Betrachtung des Verhaltens, während der *in vitro* Photolyse legt die weiteren Vorteile dar. Das Thiocumarin-Derivat **168b** zeigte einen eminent schnellen Zerfall bei beiden

Belichtungswellenlängen (375 nm und 430 nm), sodass bei einer fünfsekündigen Belichtung (430 nm) bereits eine vollständige Photolyse vorlag, obwohl hier die Belichtungswellenlänge immer noch ~40 nm vom eigentlichen Absorptionsmaximum entfernt lag. Daher war es nicht möglich eine zuverlässige Zerfallskinetik bei 430 nm aufzunehmen (Abbildung 50D). Eine Anwendung in einem biologischen Kontext war nur unter vollständigem Arbeiten unter Rotlicht möglich, da aufgrund des Absorptionsmaximums im sichtbaren Bereich schon geringe Mengen Tageslicht zur Freisetzung deutlicher Mengen des IPTGs (**1a**) führten. Bei 430 nm waren die Cumarin- und die Dicyanocumarin-Variante **168a** und **168c** *in vitro* in unter 20 min vollständig photolysierbar. Bei letzterer konnte bei 375 nm nur bei Belichtungszeiten von 60 min eine vollständige Freisetzung des IPTGs (**1a**) erreicht werden und ist somit der ideale Kandidat für ein orthogonales bzw. wellenlängenselektives System. Das Cumarin-Derivat **168a** hingegen eignet sich ausschließlich für eine sequenzielle wellenlängenselektive Entschützung. Einzig die Stabilität der vier Kohlensäureester, welche je nach Verbindung zwischen 70–90 % liegt, kann unter *in vivo* Bedingungen ein Problem darstellen, da die Solvolyse durch erhöhte Temperaturen beschleunigt wird und zusätzlich Esterasen zur Spaltung der Kohlensäureester beitragen können.

Tabelle 10: Photochemische Eigenschaften der photolabil geschützten Kohlenhydrate **168a–d** der zweiten Generation.

Verbindung	$\lambda_{\max}^{[a]}$ [nm]	$\varepsilon(\lambda_{\max})^{[b]}$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	$t_{0.5}(\lambda_{\text{Str}})^{[c]}$ [min]	Stabilität nach 24 h ^[d] [%]	$\phi_{\text{Zerfall}}(\lambda_{\text{Str}})^{[e]}$	$\varepsilon\phi_{\text{Zerfall}}(\lambda_{\text{Str}})^{[f]}$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]
168a	386	24984	2.85 (375)	88±3	3.14×10^{-2} (375)	710 (375)
			0.47 (430)			
168b	472	13838	0.19 (375)	85±5	4.65×10^{-1} (375)	1708 (375)
			0.01 (430)			
168c	488	21670	1.97 (430)	70±3	2.35×10^{-2} (430)	185 (430)
168d	350	5038	34.6 (375)	72±2	2.40×10^{-3} (375)	8 (375)

^[a] Maximale Absorptionswellenlänge λ_{\max} gemessen in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1; ^[b] Extinktionskoeffizient ε bei λ_{\max} gemessen in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1; ^[c] Halbwertszeit $t_{0.5}$ nach Bestrahlung bei Wellenlänge λ_{Str} in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1; ^[d] Stabilität gegenüber Solvolyse unter Ausschluss von Licht (angegeben in % der verbleibenden Startverbindung nach 24 h); ^[e] Quantenausbeute ϕ des Zerfalls nach Bestrahlung bei Wellenlänge λ_{Str} gemessen in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1; ^[f] Photolytische Effizienz $\varepsilon\phi$ des Zerfalls nach Bestrahlung bei Wellenlänge λ_{Str} .

Synthese von *photocaged* IPTG 168f

Bei den bisher synthetisierten *photocaged* Kohlenhydraten **168a–e** handelte es sich immer um Kohlensäureester der sekundären 2-OH-Hydroxy-Gruppe des IPTGs. Dabei zeigte sich, dass keine der synthetisierten Verbindungen bei Raumtemperatur vollständig stabil gegen Solvolyse war. Dies stellte jedoch eine der Grundbedingungen für eine spätere Anwendbarkeit dar. Wang *et al.* publizierten im Jahr 2019 das IPTG-Derivat **172** (Abbildung 51). Es wurde als hydrolysestabil bezeichnet und die Einsetzbarkeit *in vivo* wurde demonstriert.^[329] Daher war es von Interesse herauszufinden, ob ein signifikanter Stabilitätsunterschied zwischen dem Kohlensäureester der sekundären Hydroxy-Funktionalität gegenüber dem der primären Hydroxy-Gruppe vorlag.

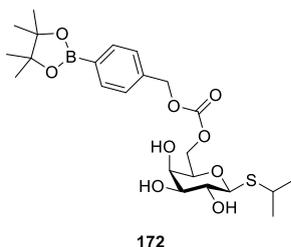
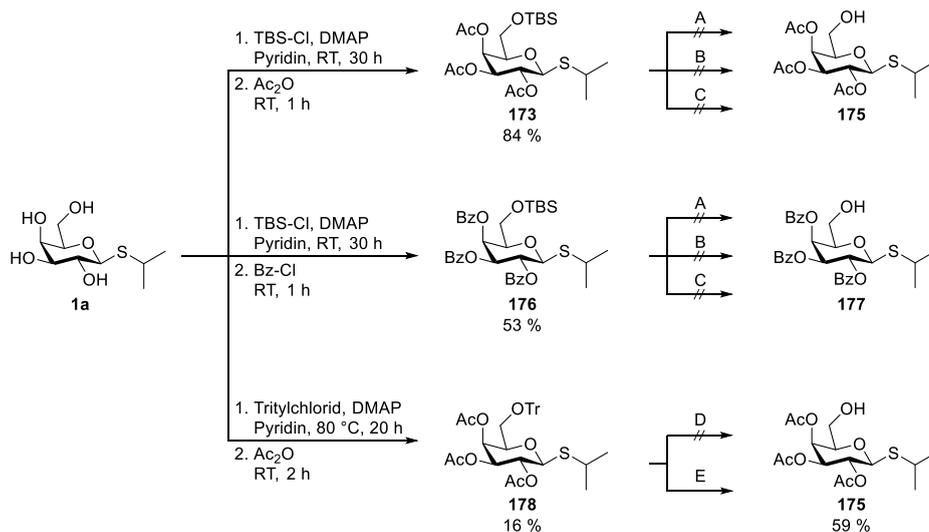


Abbildung 51: Licht-aktivierbares IPTG-Derivat **172**.^[329]

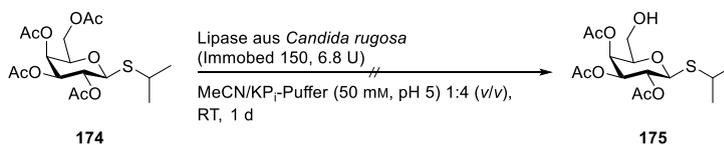
Dazu musste zunächst eine geeignete Schutzgruppen-Strategie gefunden werden, um eine selektive Anbringung der photolabilen Schutzgruppe an der primären Hydroxy-Gruppe zu ermöglichen. Daher sollte als erstes eine selektive Schützung der 6-OH-Gruppe durchgeführt werden, bevor die restlichen Hydroxy-Gruppen mit einer weiteren orthogonal abspaltbaren Schutzgruppe versehen wurden. Ausgehend von IPTG (**1a**) wurde zunächst in einer Eintopfreaktion mit TBS-Cl regioselektiv die primäre Hydroxy-Gruppe silyliert, bevor durch Zugabe von Essigsäureanhydrid die restlichen Hydroxy-Gruppen geschützt wurden (Schema 41). Dabei wurde der Zucker **173** in guten Ausbeuten von 84 % erhalten. Als Nebenprodukt fiel das peracetylierte IPTG (**174**) an, welches sich jedoch leicht säulenchromatographisch abtrennen ließ. Die anschließende selektive Entschützung der primären Hydroxy-Gruppe mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) zum IPTG-Derivat **175** ließ sich jedoch unter verschiedenen Reaktionsbedingungen^[329, 330] nicht realisieren, da es stets zu intramolekularer Acyl-Migration kam und somit ein nicht trennbares Produktgemisch erhalten wurde. Daher wurde versucht die verringerte Acyl-Migrations-Affinität der Benzoat-Schutzgruppe auszunutzen. Die Synthese verlief ebenfalls in einer Eintopfreaktion, jedoch wurde anstelle von Essigsäureanhydrid Benzoylchlorid verwendet. Der so erhaltene, geschützte Zucker **176** konnte in mäßigen Ausbeuten (53 %) isoliert werden. Die Entschützung unter denselben Bedingungen lieferte auch hier stets ein durch intramolekulare Acyl-Migration entstandenes Produktgemisch. Der gewünschte, mono-

entschützte Zucker **177** konnte somit nicht in der benötigten Reinheit erhalten werden. Von *Ding et al.* publizierte Reaktionsbedingungen legten den Austausch der TBS-Schutzgruppe durch eine Trityl-Schutzgruppe nahe.^[331] Dazu wurde nach einer Vorschrift von *Yu et al.* zunächst in einer Eintopfreaktion der geschützte Zucker **178** in einer Ausbeute von 16 % synthetisiert.^[332] Die an gleicher Stelle an Mannose durchgeführte Entschützung mittels HBr in Essigsäure lieferte für IPTG **175** jedoch nur ein Produktgemisch. Das in Anlehnung an *Ding et al.* verwendete Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat hingegen ermöglichte die Isolation des Zucker **175** mit einer Ausbeute von 59 %.



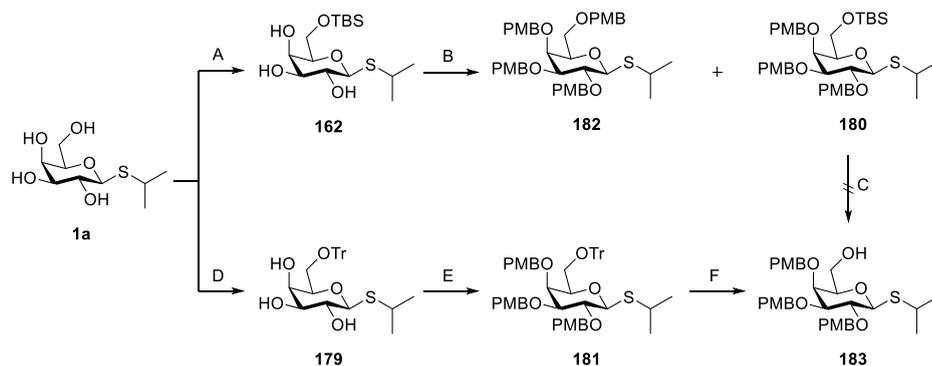
Scheme 41: Syntheseroute zur Darstellung der 2,3,4-Acyl-geschützten IPTG-Derivate **175** und **177**. Folgende Reaktionsbedingungen wurden verwendet: **A)** TBAF (1 M) in THF, THF, RT, 50 min; **B)** TBAF (2.8 M) in THF/K₂HPO₄ (0.1 M, pH 7.1), THF, RT, 24 h; **C)** TBAF (1 M) in THF, THF/KP_i-Puffer (0.2 M, pH 7.1) 9:1, RT, 24 h; **D)** HBr in AcOH, AcOH, 0 °C, 1 min; **E)** Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat, CH₂Cl₂, RT, 21 h.

Der Versuch, das bei der Eintopfreaktion anfallende Nebenprodukt **174** durch eine selektive Entschützung mittels der immobilisierten Lipase aus *Candida rugosa* nach einer Vorschrift von *Callaghan et al.* in das gewünschte Produkt **175** zu überführen, war nicht erfolgreich (Schema 42).^[333] Auch nach Reaktionszeiten von >24 h war kein Umsatz feststellbar.



Scheme 42: Regioselektive enzymatische Entschützung der primären Hydroxy-Gruppe des peracetylierten IPTGs **174**.

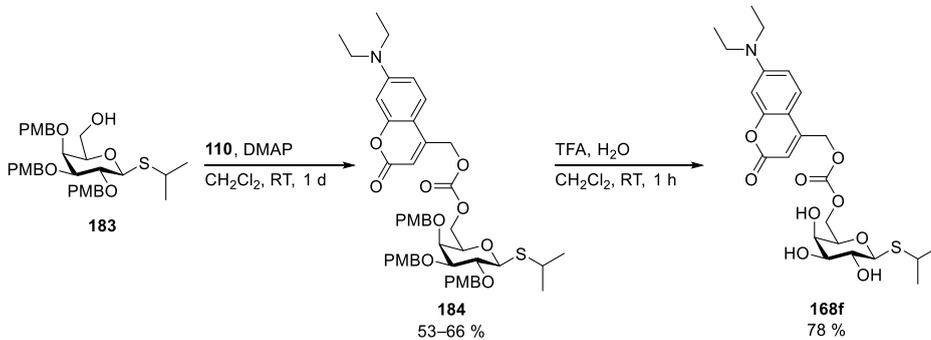
Zusätzlich wurde eine alternative Syntheseroute erprobt, bei welcher zur vollständigen Vermeidung der Migration anstelle von Acyl-Schutzgruppen die *p*-Methoxybenzyl-Schutzgruppe (PMB-Schutzgruppe) verwendet wurde. Diese sollte eine deutlich ausgeprägtere Orthogonalität gegenüber der TBS- sowie der Trityl-Schutzgruppe aufweisen und sich im letzten Schritt unter den bekannten Reaktionsbedingungen mit TFA abspalten lassen. Die regioselektive Schützung der primären Hydroxygruppe verlief sowohl mit TBS-Cl als auch mit Tritylchlorid in guten Ausbeuten (66–76 % bzw. 62–76 %) und lieferte die Zucker **162** und **179** (Schema 43). Bei der nachfolgenden Schützung mit *p*-Methoxybenzylchlorid (PMB-Cl) wurden die Zucker **180** und **181** jedoch mit sehr unterschiedlichen Ausbeuten erhalten. Die TBS-Schutzgruppe schien nicht stabil genug unter den Reaktionsbedingungen, weshalb als Hauptprodukt das vollständig PMB-geschützte IPTG **182** und die gewünschte Verbindung **180** nur in geringen Ausbeuten von 18–20 % erhalten wurde. Die anschließende Entschützung mit TBAF nach Wang *et al.*^[329] lieferte kein Produkt. Die höhere Stabilität der Trityl-Gruppe spiegelte sich in den bis zu quantitativen Ausbeuten wider mit denen der geschützte Zucker **181** erhalten wurde. Die Verwendung von Camphersulfonsäure (CSA) in Methanol^[334] lieferte den Zucker **183** in zufriedenstellenden Ausbeuten. Alternative Entschützung mit Ameisensäure in Diethylether^[335], *p*-TSA in Methanol^[336] und Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat in Dichlormethan^[331] führten hingegen verstärkt zur Bildung von Nebenprodukten bzw. im letzten Fall zur vollständigen Entschützung.



Schema 43: Syntheseroute zur Darstellung des 2,3,4-PMB-geschützten IPTG-Derivates **183**. Folgende Reaktionsbedingungen wurden verwendet: **A)** TBS-Cl, Pyridin, RT, 1 d, 66–76 %; **B)** PMB-Cl, NaH (60 % in Mineralöl), DMF, RT, 1 d, 18–20 %; **C)** TBAF (1 M in THF), THF, RT, X h; **D)** Tritylchlorid, DMAP, Pyridin, 80 °C, 1 d, 62–76 %; **E)** PMB-Cl, NaH (60 % in Mineralöl), DMF, RT, 1 d, 74 %-quant; **F)** CSA, MeOH, CH₂Cl₂, 0 °C → RT, 2 d, 48–73 %.

Ausgehend von dem Zucker **183** konnte nun unter den etablierten Reaktionsbedingungen die Verbindung **184** generiert werden (Schema 44). Die anschließende Entschützung mit TFA lieferte bei 0 °C innerhalb von 10 min jedoch keinen Umsatz. Erst durch Erhöhung der Temperatur auf 23 °C und

der Reaktionszeit auf 1 h konnte der vollständige Umsatz zum *photocaged* IPTG **168f** erreicht werden (Ausbeute: 78 %).



Schema 44: Synthese des DC-cIPTG **168f**.

Vergleich der photochemischen Eigenschaften von *photocaged* IPTG **168a** und **168f**

Ein Vergleich der beiden synthetisierten Kohlen säureester **168a** und **168f** zeigt wie erwartet, dass der Substitutionsgrad des C-Atoms, welches die Hydroxy-Gruppe trägt, weder einen signifikanten Einfluss auf die maximale Absorptionswellenlänge (Abbildung 52A) noch auf die Kinetik der Photolyse hat (Abbildung 52B). Beide besitzen ein Absorptionsmaximum von 386 nm und eine Halbwertszeit von ~3 min bei Belichtung bei 375 nm (Tabelle 11). Für den Kohlen säureester **168f** ist jedoch die erhoffte höhere Stabilität zu beobachten. Somit ist dieser nach Betrachtung der *in vitro* Ergebnisse der geeignetste Kandidat für *in vivo* Studien.

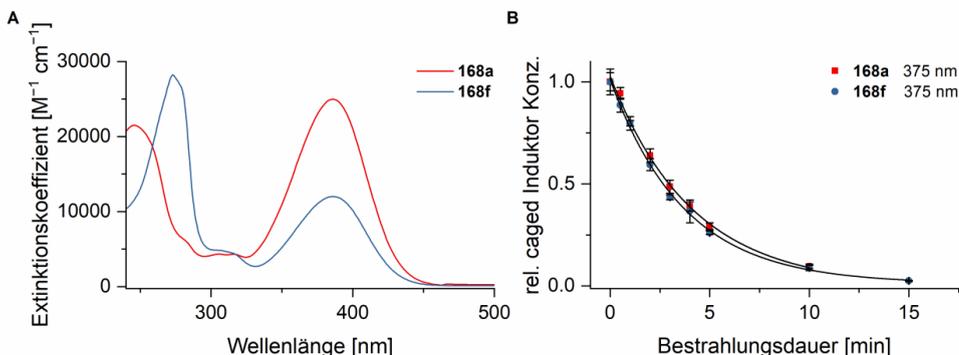


Abbildung 52: Vergleich der *photocaged* IPTG-Derivate **168a** und **168f**. **A**) Absorptionsspektren [in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1]. **B**) *In vitro* Zerfallskurven in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer [0.5 mM in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1; 375 nm, 6.4 mW cm⁻²]. Bei den abgebildeten Werten handelt es sich um Mittelwerte ± Standardabweichung aus Triplikaten.

Tabelle 11: Vergleich der photochemischen Eigenschaften der Verbindung **168a** und **168f**.

Verbindung	$\lambda_{\text{max}}^{[a]}$ [nm]	$\epsilon(375)^{[b]}$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	$t_{0.5}(\lambda_{\text{Str}})^{[c]}$ [min]	Stabilität nach 24 h ^[d] [%]	$\phi_{\text{Zerfall}}(375)^{[e]}$	$\epsilon\phi_{\text{Zerfall}}(375)^{[f]}$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]
168a	386	22620	2.85 (375) 0.47 (430)	88±3	3.14×10^{-2}	710
168f	386	11012	2.57 (375)	100±8	3.40×10^{-2}	374

^[a] Maximale Absorptionswellenlänge λ_{max} gemessen in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1; ^[b] Extinktionskoeffizient ϵ bei 375 nm gemessen in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1; ^[c] Halbwertszeit $t_{0.5}$ nach Bestrahlung bei Wellenlänge λ_{Str} in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1; ^[d] Stabilität gegenüber Solvolyse unter Ausschluss von Licht (angegeben in % der verbleibenden Startverbindung nach 24 h); ^[e] Quantenausbeute ϕ des Zerfalls nach Bestrahlung bei 375 nm gemessen in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1; ^[f] Photolytische Effizienz $\epsilon\phi$ des Zerfalls nach Bestrahlung bei 375 nm.

***In vivo* Applikation der photocaged Kohlenhydrate der zweiten Generation**

Die von M. Sc. *Fabienne Hilgers* durchgeführten *in vivo* Studien untermauerten die Ergebnisse der zuvor durchgeführten *in vitro* Experimente. Zur Testung der *photocaged* IPTG-Derivate **168a**, **168c** und **168f** wurde der etablierte Stamm *E. coli* Tuner(DE3) mit dem Expressionsvektor pRhotHi-lacI-eYFP ausgewählt, welcher das *eYFP* Reportergen unter der Kontrolle des P_{T7}-Promotors trägt. Dieser erwies sich bereits in früheren Studien als graduell regulierbar und wies eine geringe Basaltranskription auf.^[272, 337]

Eine generelle Anwendbarkeit der *photocaged* Kohlenhydrate im Hinblick auf eine schnelle Freisetzung nach Bestrahlung sowie eine geringe Toxizität konnte demonstriert werden. Dabei konnten Expressionslevel von 60–100 % im Vergleich zu Kulturen erreicht werden, welche äquimolar mit IPTG (**1a**) induziert wurden. Einzig die bereits *in vitro* beobachtete geringfügige Freisetzung durch Solvolyse machte sich durch erhöhte Expressionslevel in den unbelichteten Kulturen (Dunkelkontrollen) bemerkbar. Dies wurde noch durch die höheren Temperaturen und die Gegenwart von Esterasen verstärkt. Durch die Wahl einer niedrigen Konzentration (50 μM) konnten diese Effekte minimiert werden (Abbildung 53). So lag das Expressionslevel der Dunkelkontrolle bei der bathochrom verschobenen Variante **168c** bei etwa einem Drittel der vollinduzierten Kultur. Beim Vergleich der Kohlensäureester **168a** und **168f** fiel auf, dass der Kohlensäureester **168f** trotz der höheren *in vitro* Stabilität vergleichbare oder sogar höhere Dunkelkontrollen aufwies. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung liefern die intra- und extrazellulären Esterasen, da diese aufgrund des geringeren sterischen Anspruches bevorzugt den Kohlensäureester an der primären Hydroxy-Gruppe hydrolysieren sollten. Das *o*-Nitrobenzyl-Derivat **168d** wurde aufgrund des langsamen photolytischen

Zerfalls und der mäßigen Stabilität nicht getestet. Das Thiocumarin **168b** hingegen wurde, aufgrund der hohen Empfindlichkeit gegenüber Licht im sichtbaren Bereich und der daraus resultierenden schlechten Handhabbarkeit, nicht weiter untersucht. Von den getesteten Verbindungen besaßen somit die Kohlensäureester **168a** und **168c** die geeignetsten Eigenschaften zur Anwendung in der lichtgesteuerten Genexpression. Die Ergebnisse wurden partiell im Journal *ChemBioChem* veröffentlicht.^[1]

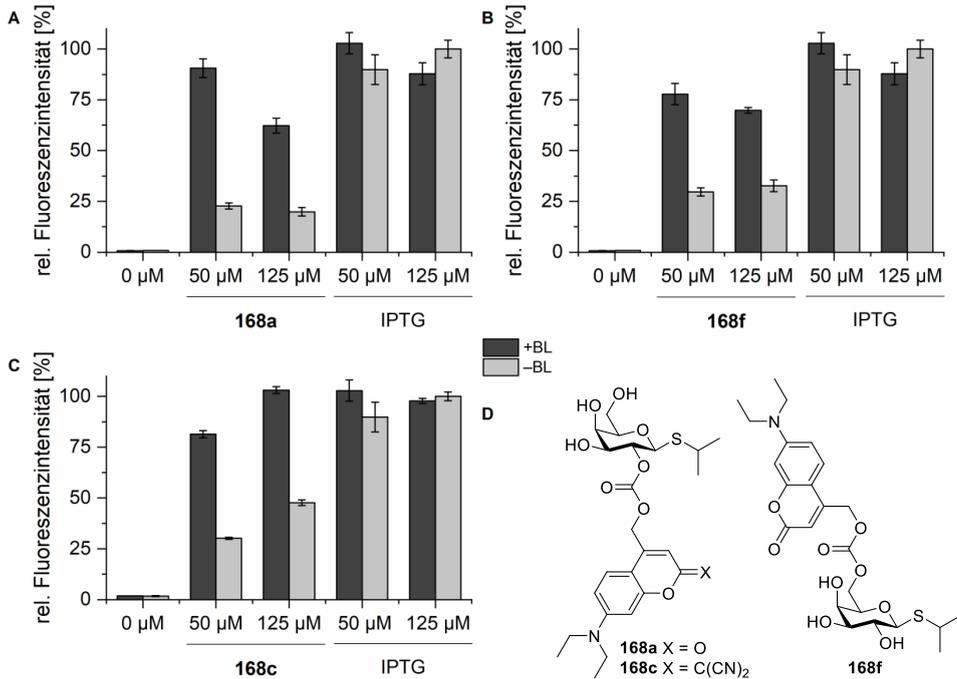


Abbildung 53: Lichtgesteuerte Genexpression unter Verwendung der *photocaged* IPTG-Derivate **168a** (A), **168f** (B) und **168c** (C) in *E. coli* Tuner(DE3)/pRhotHi-2-lacI-eYFP. Die entsprechenden Strukturformeln sind in **D** dargestellt. Die relativen Fluoreszenzlevel nach Induktion durch Bestrahlung mit blauem Licht (447 nm; ~1 mW cm⁻²; 10 min) (+BL) oder der Zugabe von IPTG (**1a**) sind im Vergleich zu den unbelichteten Kontrollen (-BL) dargestellt. Bei den abgebildeten Werten handelt es sich um Mittelwerte ± Standardabweichung aus Triplikaten.^[1]

Zusammenfassung des Kapitels

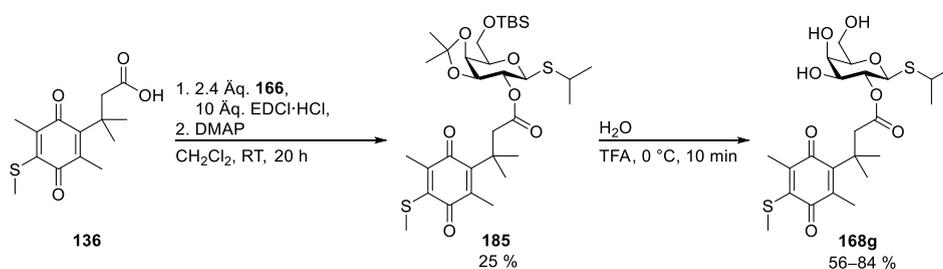
- Insgesamt wurden sechs neuartige *photocaged* Effektormoleküle auf Basis von Kohlenhydraten erfolgreich synthetisiert.
- Die photochemischen Eigenschaften der *photocaged* Kohlenhydrate wurden charakterisiert und verglichen.
- Synthesewege hin zu den selektiv geschützten IPTG-Derivaten **166** und **183** konnten etabliert werden.
- Für Kohlensäureester **168a** und **168c** konnte eine *in vivo* Anwendbarkeit in *E. coli* für geringe Konzentrationen (50 μM) demonstriert werden.

4.3.1.4 Dritte Generation von bathochrom verschobenen *photocaged* Kohlenhydraten – Ester und Carbamate

Bei der dritten Generation der *photocaged* Kohlenhydrate wurde ein verstärkter Fokus auf die Verbesserung der Stabilität gegenüber Solvolyse gesetzt. Dazu wurden zum einen die Trimethyllock-Schutzgruppe, welche in Form eines Esters an die Kohlenhydrate angebracht werden kann, und zum anderen eine formale Verknüpfung des Cumarinalkohols **105** über einen *N,N'*-Dimethylethylendiamin-*Spacer* mit dem entsprechenden Kohlenhydrat gewählt. Dies führt zur Bildung von zwei Carbamat-Funktionalitäten, welche eine deutlich erhöhte Stabilität gegenüber Hydrolyse im Vergleich zu den Carbonaten aufweisen.^[290]

Synthese und Charakterisierung des Trimethyllock-Esters

Die zuvor synthetisierte Trimethyllock-Schutzgruppe sollte nun zur Schützung von IPTG (**1a**) eingesetzt werden. Dabei konnte auf die bereits etablierte Schutzgruppenstrategie zurückgegriffen werden. Somit wurde ein Überschuss von 2.4 Äquivalenten des geschützten Zuckers **166** in einer *Steglich*-Veresterung mit dem Methylthiochinon **136** zum Ester **185** umgesetzt (Schema 45). Die anfänglich geringen Ausbeuten von 7 % konnten durch eine Erhöhung von 2.2 auf 10 Äquivalente 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDCI) und eine zusätzliche verzögerte Zugabe des DMAP auf 25 % erhöht werden. In einer Testreaktion fiel auf, dass eine Umsetzung der Verbindung **136** schon bei der alleinigen Zugabe des DMAP stattfand. Eine Auswertung der NMR-Spektren deutete darauf hin, dass es sich beim isolierten Produkt wahrscheinlich um das Spirolacton **186** handelt (Abbildung 54). Dieses stellt ein in der Literatur bekanntes Nebenprodukt dar. Die Bildung dieses Nebenproduktes wird durch die starke Restriktion der Konformation bedingt durch die drei Methyl-Gruppen ermöglicht.^[196]



Schema 45: Syntheseweg hin zum TML-cIPTG (**168g**).

Des Weiteren war eine direkte Umsetzung der Vorstufe **136** ohne säulenchromatographische Reinigung relevant, da unter sauren Bedingungen in Gegenwart von H₂O ebenfalls die Bildung des Spirolactons **186** erfolgte.

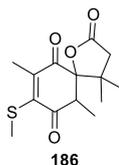


Abbildung 54: Struktur des Spirolacton **186**.

Die finale Entschützung der Verbindung **185** mit TFA bei 0 °C lieferte das TML-cIPTG (**168g**) in Ausbeuten von 56–84 % (Schema 45). Dieses wies ein Absorptionsmaximum bei 414 nm mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $689 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ auf. Damit liegt der molare Extinktionskoeffizient trotz des bathochrom verschobenen Absorptionsmaximums im Vergleich zum Cumarin **168a** ($\epsilon_{414} \approx 12000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) deutlich niedriger. Der Zerfall nach Bestrahlung wurde anhand der Änderung des Absorptionsspektrums verfolgt (Abbildung 55) und eine 0.2 mM Lösung konnte innerhalb von 4 min vollständig entschützt werden.

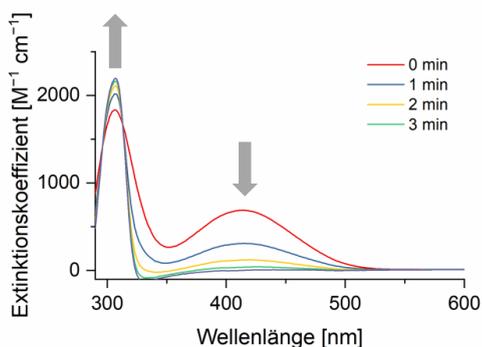


Abbildung 55: Veränderung des Absorptionsspektrums von Verbindung **168g** (in MeOH) nach Bestrahlung bei 430 nm.

In vivo* Applikation des TML-geschützten IPTGs **168g*

Die Anwendbarkeit von TML-geschütztem IPTG **168g** wurde im Stamm *E. coli* Tuner(DE3) mit dem Expressionsvektor pRhotHi-lacI-eYFP getestet, welcher das *eYFP* Reportergen unter der Kontrolle des P_{T7} -Promotors trägt. Die von M. Sc. *Fabienne Hilgers* durchgeführten *in vivo* Experimente, zeigten sowohl bei der belichteten als auch bei der unbelichteten Probe vergleichbar hohe Expressionslevel, was auf eine nicht ausreichende Stabilität hindeutet. Dafür könnten mehrere Aspekte ursächlich sein. Entweder eine Solvolyse unter den Kultivierungsbedingungen oder die Abspaltung des IPTGs (**1a**) durch Esterasen trotz des hohen sterischen Anspruches der Trimethyllock-Schutzgruppe. Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer reduktiven Freisetzung aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des

1,4-Benzochinon-Grundgerüsts der Trimethyllock-Gruppe zu dem in der Atmungskette essenziellen Ubichinon.^[193] Um dies genauer zu untersuchen, wurde in Kooperation mit M. Sc. *Fabienne Hilgers* ein Kontrollexperiment durchgeführt. Hierbei wurde 1 mg der Verbindung **168g** in 20 μL Ethanol vorgelöst. Diese Lösung wurde auf zwei Vials aufgeteilt. Beide Vials wurden mit einem Teil einer in LB-Medium angezogenen *E. coli* Tuner(DE3) Kultur auf 2 mL aufgefüllt, wobei ein Ansatz zuvor sterilfiltriert wurde. Anschließend wurde jeweils 1 mL dieser Lösung in ein weiteres Vial gefüllt. Zur Kontrolle wurde nun die Hälfte der Proben mit 430 nm für 5 min belichtet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 56 zusammengefasst. Daraus wird deutlich, dass in der Gegenwart von *E. coli*-Zellen schon bei der Messung nach 0 h nur noch ein Fünftel des *photocaged* IPTG **168g** vorhanden ist. Dabei ist sogar eine höhere Umsetzung als bei einer Bestrahlung für 5 min zu erkennen. Die Kontrollmessung ohne Belichtung und in Abwesenheit von Zellen zeigt nach 20 h ebenfalls eine nahezu vollständige Umsetzung. Dies spricht für eine Instabilität der Verbindung **168g** im wässrigen Medium. Zusätzlich ist nicht auszuschließen, dass sekretierte Esterasen auch nach Sterilfiltration im Medium vorliegen und die Abspaltung des IPTGs (**1a**) katalysieren. Da durch die Gegenwart der Zellen die Konzentration der Verbindung **168g** zusätzlich abgesenkt wurde, liegt es nahe, dass weitere Prozesse den ungewollten Abbau des *photocaged* IPTG **168g** begünstigen. Daher erweist sich diese Schutzgruppe als ungeeignet zur Steuerung der Genexpression in *E. coli* und fand im Folgenden keine weitere Anwendung.

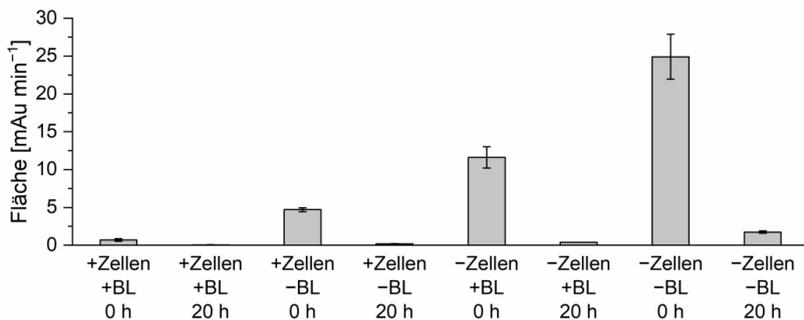
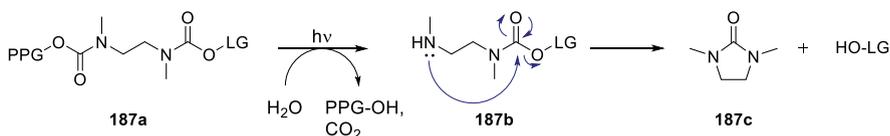


Abbildung 56: Stabilitätsvergleich von TML-cIPTG (**168g**) in Gegenwart von Zellen (+Zellen) und nach Sterilfiltration (-Zellen) entweder nach Belichtung bei 430 nm für 5 min (+BL) oder ohne (-BL) nach 0 h und nach 24 h. Die Proben wurden *via* RP-HPLC gekoppelt mit einem UV-Detektor analysiert. Die Flächen entsprechend der Menge an TML-cIPTG (**168g**). Bei den abgebildeten Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Triplikaten.

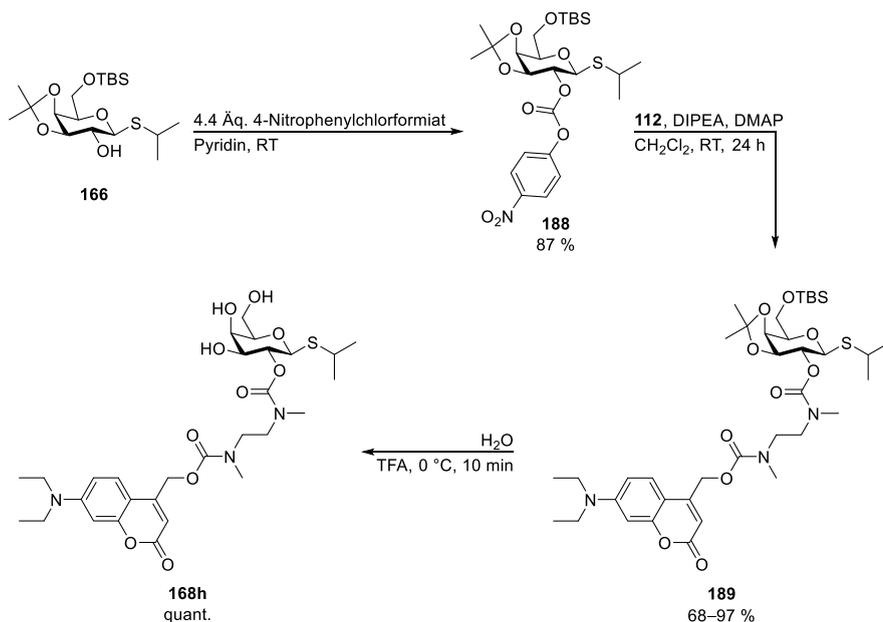
Synthese des Carbamats **168h**

Um das bisher bei allen Verbindungen auftretende Problem der zu geringen Stabilität gegenüber Solvolyse zu lösen, wurden die Kohlenhydrate nicht direkt am Cumarin angebracht, sondern über einen *N,N'*-Dimethylethyldiamin-*Spacer* miteinander verknüpft, welcher erstmalig von *Saari et al.* publiziert wurde.^[338] Dadurch ist es möglich, die deutlich höhere Stabilität der Carbamat-Funktionalität auszunutzen. Nach Belichtung der Verbindung **187a** erfolgt durch einen heterolytischen Bindungsbruch die Freisetzung einer instabilen Carbaminsäure, welche nach Decarboxylierung das sekundäre Amin **187b** liefert (Schema 46). Der nukleophile Angriff des freien Elektronenpaares desamins bewirkt eine intramolekulare 5-*exo-trig* Ringschlussreaktion, wobei das fünfgliedrige Harnstoff-Derivat **187c** gebildet und die Fluchtgruppe freigesetzt wird.^[339] Dabei handelt es sich um einen pH-abhängigen Prozess, da eine Protonierung desamins zu einer Verringerung der Nucleophilie und somit einer Verlangsamung der Zyklisierung führt. Ähnlich wie bei der TML-Schutzgruppe liegt somit eine Trennung der Freisetzung in einen photolytischen und einen thermischen Prozess vor.^[209]



Schema 46: Schematische Funktionsweise des *N,N'*-Dimethylethyldiamin-*Spacer*.^[339]

Zunächst wurde das aktivierte Carbonat **188** des Zucker-Derivats **166** synthetisiert (Schema 47). Bei der Verwendung von 2.2 Äquivalenten 4-Nitrophenylchlorformiat wurden jedoch nur geringe Ausbeuten (21 %) erhalten. Erst eine Verdopplung der Äquivalente auf 4.4 Äq. und eine über mehrere Stunden verteilte portionsweise Zugabe konnte hohe Ausbeuten (87 %) gewährleisten. Die Umsetzung des aktivierten Kohlensäureesters **188** mit dem *Spacer* **112** lieferte das Dicarbat **189** in Ausbeuten von 68–97 %. Das hierbei im Überschuss eingesetzte Cumarin **112** konnte während der säulenchromatographischen Reinigung problemlos zurückgewonnen werden. Die nachfolgende Entschützung mit TFA bei 0 °C lief mit quantitativen Ausbeuten ab.



Schema 47: Syntheseweg hin zu DC-NN-cIPTG (**168h**).

Sowohl das Dicarbat **189** als auch das finale Produkt **168h** wurden als Gemisch aus vier Rotameren erhalten. Carbamate können aufgrund der Amid-Resonanz entweder in der *syn*- oder der *anti*-Konformation vorliegen. Obwohl diese bei Carbamaten im Vergleich zu Amiden um 3–4 kcal mol⁻¹ schwächer ist, genügt der Doppelbindungscharakter der C-N-Bindung, um bei Raumtemperatur die Koexistenz von *syn*- und *anti*-Isomer zu ermöglichen.^[340, 341] Durch die gleichzeitige Anwesenheit von zwei Carbamat-Funktionalitäten sind somit vier verschiedene Rotamere möglich, welche in undefiniertem Verhältnis zueinander vorliegen. Daher zeigten aufgenommene NMR-Spektren schwer zuzuordnende komplexe Signalstrukturen. Um nachweisen zu können, dass die Verbindungen in hoher Reinheit isoliert wurden und nicht durch Nebenprodukte verunreinigt waren, wurde in Kooperation mit *Kevin Bochinsky* (IBI-7) eine dynamische NMR-Messung durchgeführt. Durch schrittweise Erhöhung der Temperatur während der Messung (20–60 °C) und eine damit einhergehende Steigerung der Molekülbewegung, welche die freie Rotation um die C-N-Bindung (rot markiert) ermöglicht, wurde ein Zusammenfallen der einzelnen Peaks bewirkt (Abbildung 57). Dies wird beispielsweise durch Betrachtung des Protons an der 5-Position erkennbar, welches bei 20 °C noch als unsymmetrisches Multiplett vorliegt und durch Erhöhung der Temperatur zu einem eindeutigen Duplett wird. Dadurch konnte bestätigt werden, dass es sich bei der isolierten Verbindung **168h** um einen Reinstoff handelt.

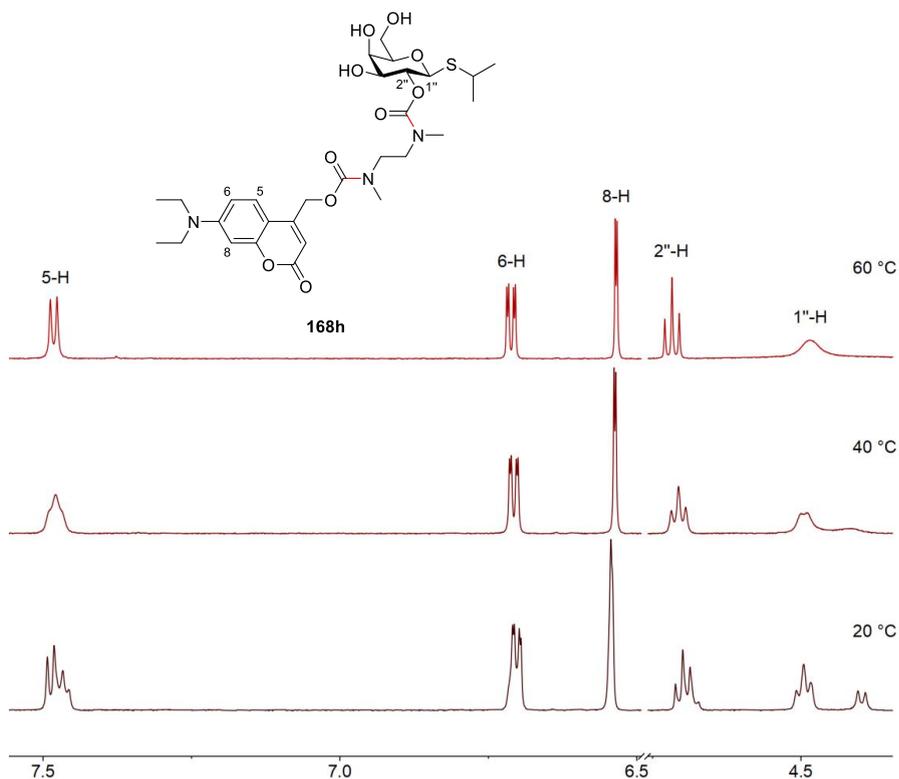


Abbildung 57: Ausschnitt der dynamischen NMR-Messung der Verbindung **168h** bei 20–60 °C durchgeführt von Kevin Bochinsky.

Untersuchung des Selbstzerlegungsmechanismus

Nachdem die Reinheit der Verbindung **168h** bestätigt worden war, sollte die Selbstzerlegung des *Spacer* nach Belichtung untersucht werden. Mit Hilfe der RP-HPLC konnte jedoch ausschließlich die Abnahme des ursprünglichen *photocaged* IPTG **168h** beobachtet werden. Sowohl das Intermediat **190** als auch IPTG (**1a**) liegen außerhalb des Detektionsbereiches des UV/Vis-Detektors, weshalb weder die Bildung des Intermediates **190** noch die nachfolgende Freisetzung des IPTGs (**1a**) durch den Ringschluss nachvollzogen werden konnten. Eine Überprüfung mittels NMR-Spektroskopie sollte diese Frage beantworten. Die Belichtung einer 1 mM NMR-Probe der Verbindung **168h** in einem DMSO- d_6 /D $_2$ O-Gemisch (6:1) lieferte jedoch kein eindeutiges Ergebnis aufgrund der stark überlagernden Signale. Eine Nachverfolgung des Zerfallsprozesses sollte durch ESI-MS Messungen geschehen. Die Messung einer 1 mM Probe in MeOH/H $_2$ O (1:1) vor und nach Bestrahlung ($t = 10$ min, $\lambda = 430$ nm) *via* ESI-MS zeigte ebenso wie die HPLC Messung die vollständige Zersetzung der Ausgangsverbindung **168h**. Dabei wurde jedoch ausschließlich das stabile Intermediat **190** gebildet

(Abbildung 58). Auch nach 19 h war ausschließlich dieses detektierbar und es konnte keine Freisetzung des IPTGs (**1a**) beobachtet werden. Als mögliche Ursache für das Ausbleiben der Selbsterlegung des *Spacer* wurden zunächst mehrere Aspekte, wie ein Einfluss des Puffers bzw. des pH-Wertes auf die Zyklisierung, hinderliche Wechselwirkungen durch die benachbarten freien Hydroxy-Gruppen, sowie eine zu geringe Acidität der Fluchtgruppe in Betracht gezogen. Eine Literaturrecherche ergab, dass eine erfolgreiche Freisetzung in einer Vielzahl unterschiedlicher Medien, wie z.B. PBS-Puffer (pH 7.4)^[172] sowie organischen Lösungsmitteln-Puffer-Gemischen^[342-344] problemlos ablief. Ebenso wurde gezeigt, dass eine Verringerung der Polarität des Lösungsmittels grundsätzlich zur Verlangsamung der Zyklisierung führt.^[342] Da der durchgeführte Versuch in LB-Medium stattfand, sollte hierdurch jedoch keine Einschränkung vorliegen.

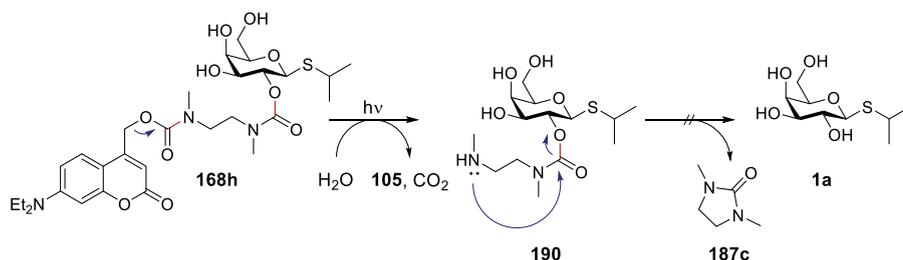
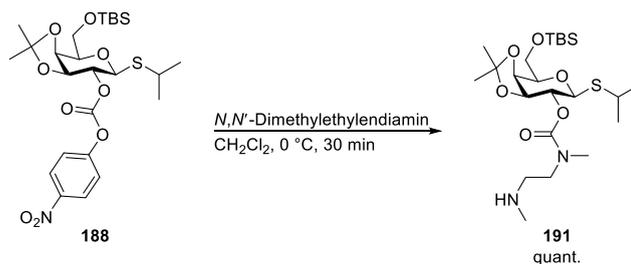


Abbildung 58: Komplikationen beim Freisetzungsmechanismus des *N,N'*-Dimethylethylendiamin-*Spacer* am Beispiel der Verbindung **168h**.

Um einen Einfluss der freien Hydroxy-Gruppen des Zuckergrundgerüsts auszuschließen, wurde der aktivierte Kohlensäureester **188** mit *N,N'*-Dimethylethylendiamin zum Carbamat **191** umgesetzt (Ausbeute: quant.; Schema 48). Dieses sollte als Referenzsubstanz dienen, um die Zyklisierung losgelöst von der Photolyse untersuchen zu können. Doch auch bei der geschützten Verbindung **191** konnte unter den benötigten basischen Bedingungen kein Ringschluss beobachtet werden. Somit konnte eine negative Einflussnahme der freien Hydroxy-Gruppen als entscheidender Faktor ausgeschlossen werden. Im Gegenteil könnten diese sogar einen positiven Einfluss haben, da durch intramolekulare H-Brücken die entstehende negative Ladung besser stabilisiert werden könnte.^[322]



Schema 48: Synthese des Testsubstrates **191**.

Neben der Abhängigkeit von Lösungsmittel, pH-Wert und Temperatur existiert eine Korrelation zwischen dem pK_s -Wert der Fluchtgruppe und der Zyklisierungsrate.^[339] Für den vorliegenden Zyklisierungs-Eliminierungs-Mechanismus ist in der Literatur vor allem die Freisetzung von elektronenarmen aromatischen Systemen zu finden.^[339] Daraus wurde geschlussfolgert, dass der Ringschluss aufgrund der nicht ausreichenden Stabilisierung der negativen Ladung des Kohlenhydrat-Anions verhindert wurde. Es existieren jedoch auch Beispiele, in denen nicht-phenolische Hydroxy-Gruppen beteiligt sind, wie bei Paclitaxel,^[345] Camptothecin^[346] und *N*-Azidacetylmannosamin.^[347] Bei letzterem handelt es sich um ein Derivat der Mannose, welches am anomeren Zentrum mit dem *N,N'*-Dimethylethyldiamin-*Spacer* geschützt wurde. Hierbei konnte nach Aktivierung eine Freisetzung des Zuckers von bis zu 60 % innerhalb von 2 h detektiert werden.^[347]

Die Acidität der jeweiligen Hydroxy-Gruppe eines Zuckers ist von vielen Faktoren abhängig und es ist schwer diese exakt vorherzusagen. Bei Monosacchariden, welche keine freie Hydroxy-Gruppe am anomeren Zentrum besitzen, hält die 2-OH-Gruppe die höchste Acidität inne.^[322] Diese Acidität scheint bei IPTG (**1a**) aufgrund der fehlenden Freisetzung jedoch generell zu gering zu sein. Die sekundären Hydroxy-Gruppen von Kohlenhydraten sind zwar generell acider als die primären,^[348] der pK_s -Wert der anomeren Hydroxy-Gruppe von reduzierenden Zuckern ist allerdings deutlich geringer als jener der alkoholischen Hydroxy-Gruppen.^[322, 349] Daher schien es sinnvoll anstelle des IPTGs (**1a**), welches keine anomere Hydroxy-Gruppe bietet, *L*-Arabinose (**1b**) als Zielmolekül zu wählen.

Synthese des Carbamats 192

Die *photocaged* L-Arabinose **192**, welche eine Verknüpfung zum *Spacer* an der anomeren Hydroxy-Gruppe besitzt, sollte zunächst synthetisiert und nachfolgend auf eine verbesserte Freisetzung hin getestet werden. Hier konnte auf das bereits zuvor synthetisierte mono-entschützte Arabinose-Derivat **158** zurückgegriffen werden. Dabei war es möglich, das erhaltene α/β -Anomerengemisch (1:3) direkt einzusetzen. Da die Wahl der Base und des Lösungsmittels einen entscheidenden Einfluss auf die Selektivität am anomeren Zentrum haben,^[350] sind in der Literatur eine Vielzahl von unterschiedlichen Reaktionsbedingungen für eine Reihe von Mono-^[351-358] und Disacchariden^[350] zu finden, für L-Arabinose (**1a**) selbst jedoch keine. Die umfassendsten Arbeiten wurden von *André et al.* für am Anomer-entschützte Laktose durchgeführt, wobei verschiedenste Bedingungen für die stereoselektive Bildung eines aktivierten Carbonates getestet wurden.^[350] Die vielversprechendsten Reaktionsbedingungen wurden für die mono-entschützte Arabinose **158** getestet (Tabelle 12). Die alleinige Verwendung von Pyridin als Lösungsmittel und Base lieferte ein α/β -Anomerengemisch von 3:1 (Tabelle 12, #1), welches jedoch auch nach säulenchromatographischer Reinigung durch ein Nebenprodukt verunreinigt war. Wurden Dichlormethan als Lösungsmittel und Triethylamin als Base eingesetzt, konnte nur eine sehr geringe Ausbeute mit einem α/β -Anomerenverhältnis von 2:1 erzielt werden (#2). Beim eigentlichen Hauptprodukt handelte es sich um das Carbonatdimer **193** (Abbildung 59).

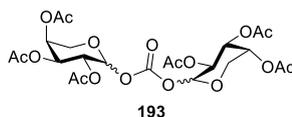
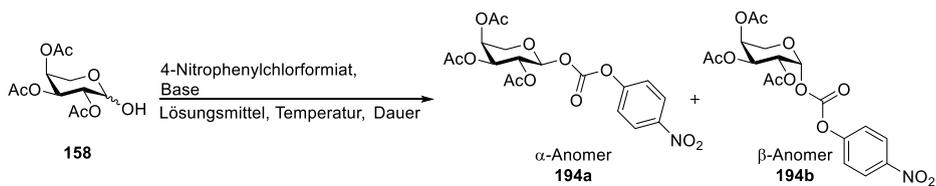


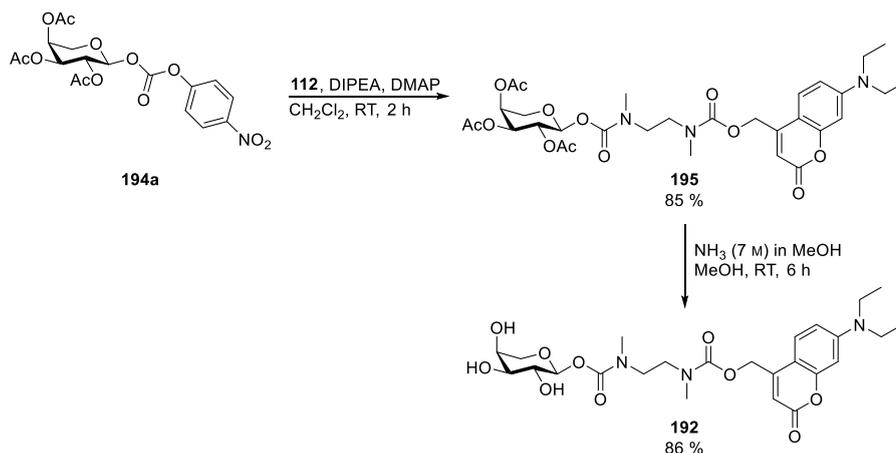
Abbildung 59: Carbonatdimer **193**.

Bei einer kurzen Reaktionszeit von 3 h (#3) wurde hingegen selektiv das α -Anomer **194a** in einer Ausbeute von 21 % erhalten. Die Durchführung der Reaktion in Acetonitril mit 1.5 Äquivalenten DMAP als Base (#4) führte zur stereoselektiven Bildung des β -Anomers **194b**, welches jedoch nur in einer geringen Ausbeute von 14 % isoliert werden konnte. Die Verwendung des sterisch anspruchsvolleren 2,6-Lutidins (#5) lieferte erneut die bevorzugte Bildung des α -Anomers **194a**, wobei ein α/β -Anomerenverhältnis von 9:1 erhalten wurde. Für die weitere Umsetzung wurde das α -Anomer **194a** bevorzugt, da äquatoriale Hydroxy-Gruppen geringfügig acider sind als axiale.^[359] Die stereoselektive Synthese bzw. vollständige Trennung der Anomere war an dieser Stelle besonders relevant, da im nachfolgenden Schritt durch die zwei Carbamat-Funktionalitäten ansonsten ein Gemisch aus zwei Diastereomeren mit je vier Rotameren entstehen würde. Dadurch würde die Isolation eines reinen Produktes deutlich erschwert werden.

Tabelle 12: Testung verschiedener Reaktionsparameter zur selektiven Synthese des α -Anomers **194a**.

#	Lösungsmittel	Base	Temperatur	Dauer	isolierte Ausbeute [%]	
					α	β
1	Pyridin	—	RT	20 h	—	—
2	CH ₂ Cl ₂	NEt ₃	0 °C → RT	20 h	7	—
3	CH ₂ Cl ₂	NEt ₃	0 °C → RT	3 h	21	—
4	MeCN	DMAP	RT	20 h	—	14
5	MeCN	2,6-Lutidin	0 °C → RT	18 h	20	—

Die Synthese des geschützten Arabinose-Derivates **195** durch Umsetzung des α -Anomer **194a** mit Cumarin **112** in Gegenwart von DMAP und *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) verlief innerhalb von 2 h in hohen Ausbeuten (85 %) und lieferte das Produkt wie erwartet als *syn/anti*-Isomerenmischung (Schema 49). Die finale Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppen erfolgte mit Ammoniak in Methanol (7 M) und lieferte die *photocaged* L-Arabinose **192** mit einer Ausbeute von 86 %.



Schema 49: Syntheseweg hin zu *photocaged* L-Arabinose **192**.

Charakterisierung und Vergleich von *photocaged* IPTG **168h** und *photocaged* L-Arabinose **192**

Auch hier wurden erneut die photochemischen Eigenschaften der Verbindung **192** bestimmt und mit dem strukturell ähnlichen IPTG-Derivat **168h** verglichen. Beide zeigten – wie zu erwarten – ein ähnliches Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei ~ 386 nm (Abbildung 60A), vergleichbare Photolyse-Halbwertszeiten¹⁹ von 4–5 min (Abbildung 60B und C) sowie vergleichbare Quantenausbeuten ($\phi \approx 0.01$) nach Belichtung bei 430 nm und aufgrund der Carbamat-Funktionalitäten eine sehr hohe Stabilität gegenüber Solvolyse (Tabelle 13). Insbesondere bei Letzterer war keine signifikante Abnahme nach 24 h feststellbar. Somit waren alle grundlegenden (photo-)chemischen Eigenschaften erfüllt. Entscheidend war also die Beobachtung der Zyklisierung des *Spacer* zur Freisetzung der L-Arabinose (**1b**) nach Belichtung mittels ESI-MS-Messungen. Diese deuteten darauf hin, dass das *Spacer*-Intermediat anfänglich gebildet wurde, aber nach 3 h bereits teilweise zerfallen war. Dies spricht dafür, dass die Zyklisierung und die daraus folgende Freisetzung der L-Arabinose (**1b**) abläuft und der pK_S-Wert bei der äquatorialen anomeren Hydroxy-Gruppe der L-Arabinose (**1b**) ausreichend niedrig ist.

¹⁹ Der Begriff Halbwertszeit wird hier und im Folgenden verwendet, auch wenn es sich nicht um eine Reaktion erster Ordnung, sondern um einen komplexeren Zerfallsprozess handelt.

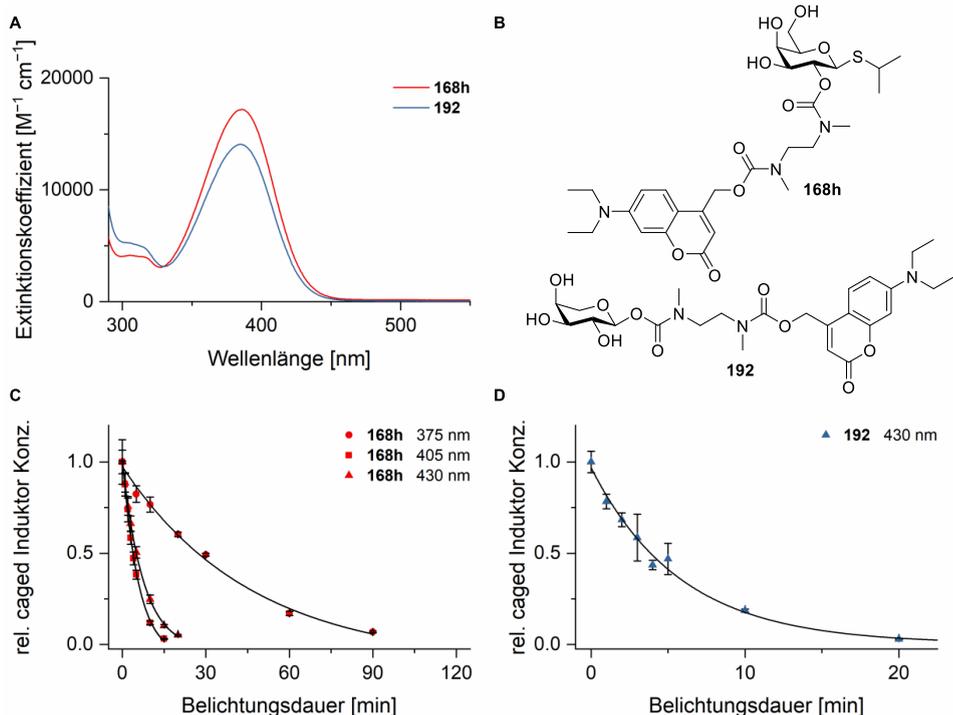


Abbildung 60: Vergleich des *photocaged* IPTG-Derivates **168h** und des *photocaged* L-Arabinose-Derivates **192**. **A)** Absorptionsspektren [in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1]. **B)** Strukturformeln. **C)** *In vitro* Zerfallskurven des *photocaged* IPTG **168h** [0.5 mM in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1] in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer nach Belichtung bei 375 nm (6.4 mW cm⁻²), 405 nm (44.6 mW cm⁻²) und 430 nm (45.6 mW cm⁻²). **D)** *In vitro* Zerfallskurve des *photocaged* L-Arabinose-Derivates **192** [0.5 mM in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1] in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer nach Belichtung bei 430 nm (45.6 mW cm⁻²). Bei den abgebildeten Werten handelt es sich um Mittelwerte ± Standardabweichung aus Triplikaten.

Tabelle 13: Photochemische Eigenschaften des photolabil geschützten IPTG-Derivates **168h** und L-Arabinose-Derivates **192**.

Verbindung	λ_{\max} ^[a] [nm]	$\epsilon(430)$ ^[b] [M ⁻¹ cm ⁻¹]	$t_{0.5}(430)$ ^[c] [min]	Stabilität nach 24 h ^[d] [%]	$\phi_{\text{Zerfall}}(430)$ ^[e]	$\epsilon\phi_{\text{Zerfall}}(430)$ ^[f] [M ⁻¹ cm ⁻¹]
168h	386	2328	4.74	95±6	1.01×10^{-2}	24
192	385	1698	4.02	100±5	1.33×10^{-2}	23

^[a] Maximale Absorptionswellenlänge λ_{\max} gemessen in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1; ^[b] Extinktionskoeffizient ϵ bei 430 nm gemessen in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1; ^[c] Halbwertszeit $t_{0.5}$ nach Bestrahlung bei 430 nm in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1; ^[d] Stabilität gegenüber Solvolyse unter Ausschluss von Licht (angegeben in % der verbleibenden Startverbindung nach 24 h); ^[e] Quantenausbeute ϕ des Zerfalls nach Bestrahlung bei 430 nm gemessen in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1; ^[f] Photolytische Effizienz $\epsilon\phi$ des Zerfalls nach Bestrahlung bei 430 nm.

***In vivo* Applikation der Carbamate**

Auch hier konnten die von M. Sc. *Fabienne Hilgers* und M. Sc. *Nora Bitzenhofer* (IMET) vollzogenen *in vivo* Studien die zuvor aufgenommenen *in vitro* Daten gut reproduzieren. Für das *photocaged* IPTG-Derivate **168h** wurde erneut der Stamm *E. coli* Tuner(DE3) mit dem Expressionsvektor pRhotHi-lacI-eYFP genutzt, welcher das *eYFP* Reportergen unter der Kontrolle des P_{T7}-Promotors trägt. Für das *photocaged* Arabinose-Derivat **192** hingegen wurde der etablierte Stamm *E. coli* LMG194 mit dem Expressionsvektor pBTBX-2-mCherry verwendet. Bei diesem befindet sich das *mcherry* Gen unter der Kontrolle des P_{BAD}-Promotors und eine Verwendung zur lichtgesteuerten Genexpression erfolgte bereits in früheren Publikationen.^[77]

Beide mit *Spacer*-versehenen Verbindungen **168h** und **192** zeigten eine hohe Stabilität, welche an den niedrigen Dunkelkontrollen abgelesen werden kann. Wie bei den ESI-Messungen angedeutet, war der *Spacer* bei dem nach Photolyse freigesetzten IPTG-Intermediat **190** nicht dazu in der Lage durch die 5-*exo*-trig-Zyklisierung den Induktor zu eliminieren. Dies ist an der vollständig ausbleibenden Erhöhung des Fluoreszenzlevels nach Belichtung bei 430 nm zu erkennen (Abbildung 61A). Dagegen ist bei der Verbindung **192** eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenz-Intensität auf 50 % nach Belichtung für 30 min zu erkennen im Vergleich zu Kulturen, welche äquimolar mit L-Arabinose (**1b**) induziert wurden (Abbildung 61B). Somit ist der höhere pK_s-Wert der anomeren Hydroxy-Gruppe ausreichend für eine Freisetzung durch den selbstzerlegenden *N,N'*-Dimethylethylendiamin-*Spacer*.

Für die geringere Expressionsantwort können verschiedene Faktoren verantwortlich sein. Zum einen könnte der Zyklisierungs-Eliminierungs-Mechanismus sehr langsam ablaufen. Eine weitere Verbesserung der Fluoreszenzantwort könnte in diesem Fall durch eine Erhöhung der Temperatur erreicht werden, da es sich bei der Zyklisierung um einen thermischen Prozess handelt. Für andere selbstzerlegende *Spacer* konnte von *Alouane et al.* gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Temperatur um 25 °C eine Verzehnfachung der Abbaurate bewirken kann.^[360] Da die Experimente bereits bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt wurden, ist hier jedoch keine signifikante Temperaturerhöhung möglich. Zum anderen könnte es auf eine zu geringe Photolyserate zurückzuführen sein. Eine stärkere Lichtquelle könnte dann bei gleichbleibender Belichtungsdauer ein signifikant höheres Fluoreszenzlevel bewirken, was jedoch durch den höheren Energieeintrag die Zellviabilität herabsetzen könnte. Generell stellt die Verwendung von *Spacern* zur Verknüpfung von Induktor-Molekülen mit photolabilen Schutzgruppen aufgrund der hohen Stabilität eine gute Alternative zu den Kohlensäureestern dar. Die Ergebnisse wurden ebenfalls im Journal *ChemBioChem* veröffentlicht.^[1]

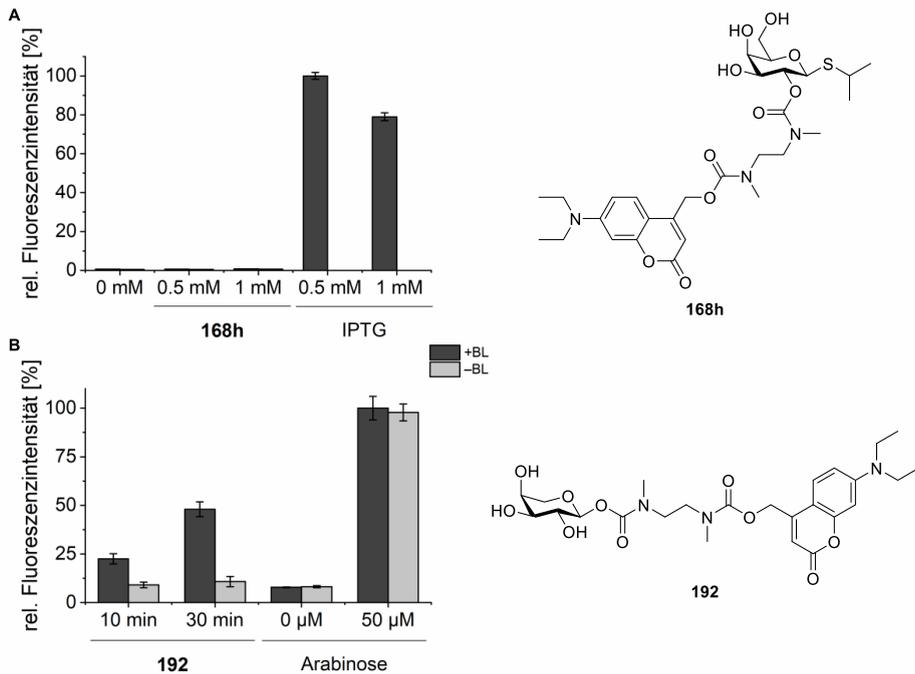


Abbildung 61: Lichtgesteuerte Genexpression unter Verwendung des *photocaged* IPTG-Derivate **168h** in *E. coli* Tuner(DE3)pRhotHi-2-lacI-eYFP (A) und des *photocaged* Arabinose-Derivats **192** in *E. coli* LMG194/pBTBX-2-mCherry (B). Die relativen Fluoreszenzlevel nach Induktion durch Bestrahlung mit blauem Licht (447 nm; $\sim 1 \text{ mW cm}^{-2}$) (+BL) für 10 bzw. 30 min oder der Zugabe des entsprechenden Induktors sind im Vergleich zu den unbelichteten Kontrollen (-BL) dargestellt. Bei den abgebildeten Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Triplikaten.^[1]

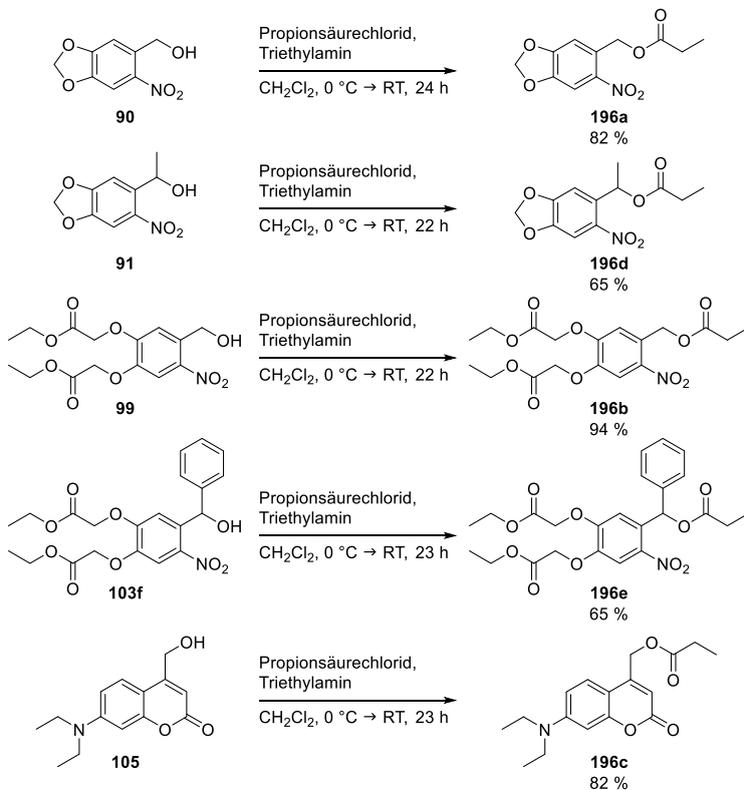
Zusammenfassung des Kapitels

- Insgesamt wurden drei neuartige *photocaged* Effektormoleküle auf Basis von Kohlenhydraten erfolgreich synthetisiert.
- Die photochemischen Eigenschaften der *photocaged* Kohlenhydrate wurden charakterisiert und verglichen.
- Die Untersuchung des Selbstzerlegungsmechanismus des *N,N'*-Dimethylethylendiamin-Spacer zeigte, dass dieser nur bei Verknüpfung mit der anomeren Hydroxy-Gruppe funktioniert.
- Für Carbamat **192** konnte eine *in vivo* Anwendbarkeit in *E. coli* demonstriert werden.

4.3.2 Herstellung der *photocaged* Propionsäuren

4.3.2.1 Synthese

Die zuvor synthetisierten photolabilen Schutzgruppen wurden ebenso verwendet, um eine Reihe verschiedener *photocaged* Propionsäuren zu synthetisieren. Dafür wurden auf Seiten der *o*-Nitrobenzyl-Derivate 6-Nitropiperonylalkohol (**90**) und 4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzylalkohol (**99**) sowie ihre sterisch anspruchsvolleren Varianten **91** und **103f** gewählt. Als Vertreter der Cumarine wurde das 7-Diethylamino-4-hydroxymethylcumarin (**105**) gewählt. Ziel war es zu untersuchen, welchen Einfluss Esterasen sowie Hydrolyse unter physiologischen Bedingungen auf die Esterbindung haben, und ob somit ein Einsatz zur lichtgesteuerten Genexpression generell möglich ist. Dabei ist es von Interesse, ob eine Erhöhung des sterischen Anspruchs in der benzylicchen Position mit einer verbesserten Stabilität gegenüber jenen genannten Faktoren einhergeht.



Schema 50: Synthese der *photocaged* Propionsäuren **196a–e**.

Zur Synthese der *photocaged* Propionsäuren wurden die entsprechenden Alkohole **90**, **91**, **99**, **103f** und **105** mit Propionsäurechlorid und Triethylamin umgesetzt (Schema 50). Da Propionsäurechlorid mit Wasser unter Bildung von Propionsäure (**3**) reagiert, war es notwendig trockene Lösungsmittel zu verwenden und die Synthese unter inerten Bedingungen durchzuführen. Für die Umsetzung der primären Alkohole **90**, **99**, und **105** zu den Estern **196a–c** konnten sehr gute Ausbeuten von 82–94 % erzielt werden. Die auf den sekundären Alkoholen 1-(6-Nitrobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethanol **91** (NBE) und 1-[4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrophenyl]phenylmethanol **103f** (BECPh) basierenden Ester **196d** und **196e** wurden mit einer mäßigen Ausbeute von 65 % erhalten. Dies könnte auf eine langsamere Reaktionsrate zurückzuführen sein und durch eine längere Reaktionszeit oder eine erhöhte Reaktionstemperatur optimiert werden.

4.3.2.2 *In vitro* Charakterisierung

Wie erwartet weisen die mit Nitropiperonyl-Derivaten versehenen *photocaged* Propionsäuren **196a–e** sehr ähnliche Absorptionsspektren auf. So zeigen die NP-cPropionsäure (**196a**) sowie die NBE-cPropionsäure (**196d**) ein Absorptionsmaximum bei 345 nm und die BEC-cPropionsäure (**196b**) sowie die BECPh-cPropionsäure (**196e**) ein Absorptionsmaximum bei 328 nm bzw. 325 nm. DC-cPropionsäure (**196c**) hingegen besitzt ein Maximum bei 381 nm (Abbildung 62). Die Modifikationen in α -Position zeigen dabei nahezu keinen Einfluss auf die Absorptionsspektren.

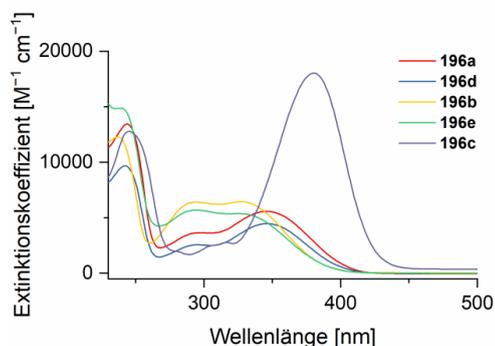


Abbildung 62: Absorptionsspektren der *photocaged* Propionsäuren **196a–e** (in MeOH).

Die Verbindungen zeigten durchweg eine geringe Löslichkeit in wässrigen Medien (Tabelle 14). Eine Erhöhung der Löslichkeit durch die verwendeten Schutzgruppen war dahingegen nicht möglich, da bei der dafür entwickelten Schutzgruppe (BC) die Carbonsäuren durch Ethylester (BEC) maskiert sind. Diese müssten unter basischen Bedingungen entschützt werden, was jedoch zu einer zeitgleichen

Abspaltung der Propionsäure führen würde. Für Experimente unter physiologischen Bedingungen wurden die *photocaged* Propionsäuren daher in DMSO vorgelöst. Um dies zu umgehen, würde sich zukünftig – anstelle von Ethylestern – die Verwendung von *tert*-Butylestern anbieten. Diese können unter sauren Bedingungen selektiv abgespalten werden und würden so die löslichkeitsvermittelnden Carbonsäure-Funktionalitäten der photolabilen Schutzgruppe freisetzen, ohne eine simultane Freisetzung der Propionsäure zu bewirken.

Tabelle 14: Photochemische Eigenschaften der photolabil geschützten Propionsäuren **196a–e**.

Verbindung	λ_{max} ^[a] [nm]	$\epsilon(\lambda_{\text{max}})$ ^[b] [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]	S ^[c] [mM]
196a	345	5578	<0.1
196d	345	4474	<0.1
196b	328	6451	<0.1
196e	325	5381	<0.1
196c	381	18028	<0.1

^[a] Maximale Absorptionswellenlänge λ_{max} gemessen in MeOH; ^[b] Extinktionskoeffizient ϵ bei λ_{max} gemessen in MeOH; ^[c] Löslichkeit S gemessen in dest. H₂O.

Um die Stabilität von NP-cPropionsäure (**196a**), NBE-cPropionsäure (**196d**), BEC-cPropionsäure (**196b**) und BECPh-cPropionsäure (**196e**) gegenüber Esterasen und Hydrolyse in wässrigen Medien zu testen, wurden diese zu 1 mL Zellysats des Stammes *E. coli* Tuner(DE3) entsprechend einer OD₅₈₀ von 0.6 gegeben und für 24 h bei 37 °C und 800 rpm inkubiert. Nach Aufarbeitung wurde der Verlauf der Reaktion mittels NMR und Dünnschichtchromatographie verfolgt. Die NMR-Spektren lieferten keine Erkenntnisse, da aus dem Zellysats stammende Verunreinigungen keine Auswertung zuließen. Die Dünnschichtchromatographie ergab lediglich, dass die NP-cPropionsäure (**196a**) vollständig und die NBE-cPropionsäure (**196d**) zum Großteil abgebaut wurden. Bei BEC-cPropionsäure (**196b**) und BECPh-cPropionsäure (**196e**) konnte ebenfalls ein Abbau beobachtet werden. Hier liegt die Vermutung nahe, dass zusätzlich zur Propionsäure die Ethylester abgespalten wurden. Eine Instabilität der Ethylester der BEC-Schutzgruppe gegenüber Esterasen konnte bereits früher von *Schelkle et al.* gezeigt werden.^[306]

4.3.2.3 *In vivo* Applikation

Erste Versuche zur *in vivo* Anwendbarkeit der *photocaged* Propionsäure wurden von M. Sc. Fabienne Hilgers ausgeführt. Hierfür wurde der Stamm *E. coli* Tuner(DE3) mit dem Expressionsvektor pPro24-eYFP verwendet. Dieser besitzt das *eYFP* Reportergen unter der Kontrolle des P_{ppB} -Promotors. Es konnten jedoch keine Erkenntnisse über die verwendeten *photocaged compounds* gewonnen werden, da eine hohe Basalexpression auch in Abwesenheit von exogenem Induktor und UV-Licht keine Auswertung der Ergebnisse zuließ. Es ist bekannt, dass das Level der Basalexpression in Minimalmedien stark von der Kohlenstoff-Quelle abhängig ist und ein Induktor auch über einen endogenen Stoffwechselweg hergestellt werden kann.^[297] Dieses Problem konnte nicht behoben werden, weshalb keine weitere Generation von *photocaged* Propionsäuren mit optimierten Parametern für die *in vivo* Anwendung synthetisiert wurden. Die synthetisierten *photocaged* Propionsäuren wurden daher auch nicht für eine Verwendung in einem wellenlängenselektiven Anregungssystem in Betracht gezogen.

4.3.2.4 Zusammenfassung des Kapitels

- Insgesamt wurden fünf neuartige *photocaged* Propionsäure-Derivate erfolgreich synthetisiert und ihre photochemischen Eigenschaften charakterisiert.
- In der Untersuchung zum Einfluss der Erhöhung des sterischen Anspruches in α -Position auf die Stabilität der Esterbindung gegenüber Esterasen konnte keine eindeutige Aussage getroffen werden.
- Die hohe Basaltranskription des *E. coli* Tuner(DE3)/pPro24-eYFP Stammes verhinderte eine *in vivo* Testung der *photocaged* Propionsäure-Derivate.

4.3.3 Herstellung der *photocaged* Benzoesäure-Derivate

4.3.3.1 Erste Generation

Zunächst wurden mehrere *photocaged* Benzoesäure-Derivate synthetisiert, welche bereits in der Doktorarbeit von Dr. *Claus Bier* hergestellt, aber nicht vollständig charakterisiert wurden.^[312] Ziel war es, diese auf ihre photochemischen Eigenschaften und ihre Eignung zur lichtgesteuerten Genexpression hin zu testen. Bei dieser ersten Generation von *photocaged* Benzoesäure-Derivaten handelte es sich um die Verbindungen NP-cToluylsäure (**197a**), NBE-cToluylsäure (**197b**), NP-cAnthranilsäure (**197c**), NBE-cAnthranilsäure (**197d**) und NP-cSalicylsäure (**197e**). Ausschließlich von der Verbindung NP-cSalicylsäure (**197e**) waren noch ausreichende Mengen vorhanden, weshalb dieses nicht erneut synthetisiert wurde.

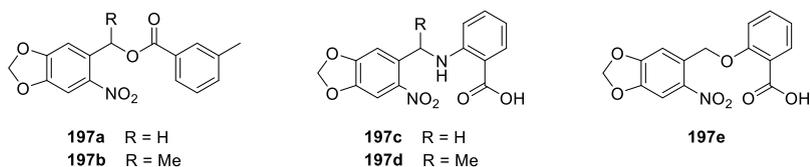
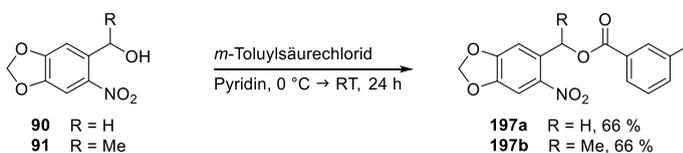


Abbildung 63: *Photocaged* Benzoesäure-Derivate der ersten Generation.

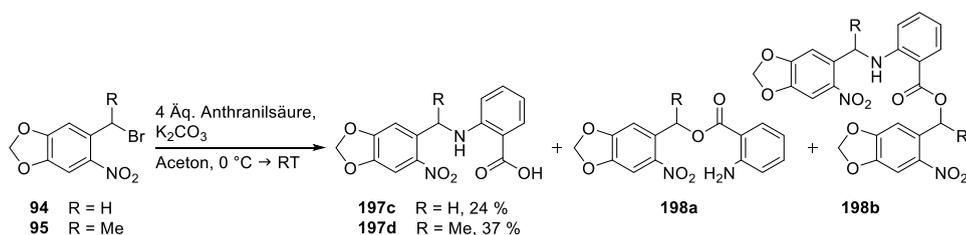
Synthese

Nach Vorschriften von Dr. *Claus Bier* wurde *m*-Toluylsäurechlorid zu den in Pyridin gelösten Alkoholen **90** und **91** gegeben, um NP-cToluylsäure (**197a**) bzw. NBE-cToluylsäure (**197b**) zu erhalten. Dabei konnten die gewünschten Produkte jeweils in einer Ausbeute von 66 % dargestellt werden (Schema 51).



Schema 51: Synthese der *photocaged* *m*-Toluylsäuren **197a** und **197b**.

Ebenfalls nach einer Vorschrift von Dr. *Claus Bier* wurden 6-Nitropiperonylbromid (**94**) und 1-(6-Nitrobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethylbromid (**95**) in einer S_N2-Reaktion mit einem Überschuss Anthranilsäure (**2b**) (4 Äq.) zu NP-cAnthranilsäure (**197c**) und NBE-cAnthranilsäure (**197d**) umgesetzt (Schema 52).^[312] Aufgrund der ungeschützten Carbonyl-Funktionalität wurden als Nebenprodukte der Ester **198a** sowie die doppeltgeschützte Anthranilsäure **198b** erhalten. Diese konnten zwar säulenchromatographisch vom gewünschten Produkt abgetrennt werden, führten jedoch zu einer deutlich verringerten Ausbeute von 24 % bzw. 37 %. Da für die Nebenprodukte **198a** und **198b** keine Verwendung absehbar war, wurden diese nicht in ausreichend hoher Reinheit isoliert, um eine zuverlässige Ausbeute bestimmen zu können. Nach einer ersten säulenchromatographischen Aufreinigung waren diese noch mit überschüssiger Anthranilsäure (**2b**) verunreinigt.



Schema 52: Synthese der *photocaged* Anthranilsäuren **197c** und **197d**.

Da die Reaktion zur NP-cSalicylsäure (**197e**) mit Salicylsäure (**2a**) unter denselben Reaktionsbedingungen abläuft, lag hier die Vermutung nahe, dass dort ebenfalls die Bildung von Nebenprodukten möglich war. Die noch verfügbare NP-cSalicylsäure (**197e**) Probe wurde daher mittels ¹H-NMR auf ihre Reinheit und durch Auswertung der HMBC-Korrelationen (HMBC, engl.: *heteronuclear multiple bond correlation*) (Abbildung 64) auf ihre Struktur hin überprüft. Dabei wurde festgestellt, dass die ursprünglich zugeordnete Struktur **197e**, bei der die Verknüpfung von photolabiler Schutzgruppe und Salicylsäure (**2a**) über eine Etherbindung stattgefunden hatte, nichtzutreffend war. Es war eine klare Kopplung der benzylichen Protonen 1'-H zum Carbonylkohlenstoff C-7'' zu erkennen. Bei der Verbindung handelte es sich somit eindeutig um den Ester **197e***, der forthin als NP-cSalicylsäure* (**197e***) bezeichnet werden wird.

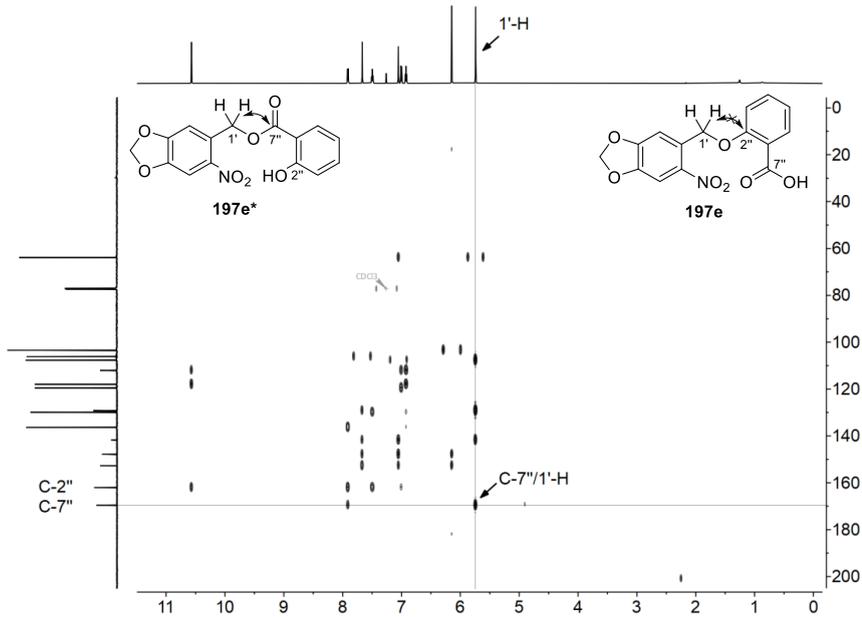
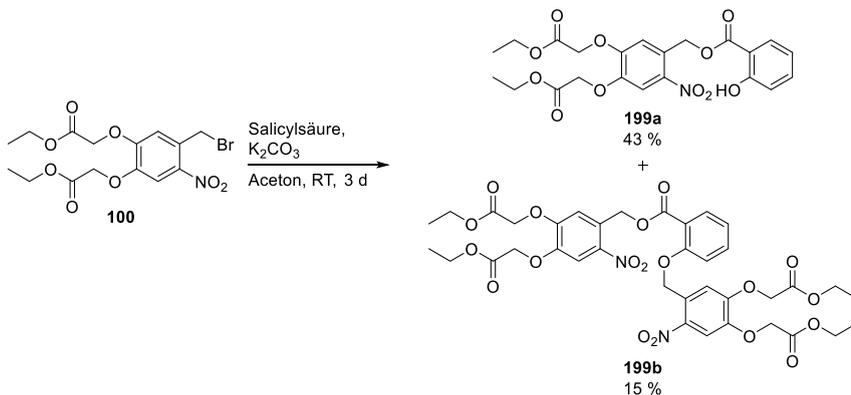


Abbildung 64: HMBC-Spektrum (CDCl_3 , 600 MHz) zur Verifizierung der Struktur als NP-cSalicylsäure* (**197e***).

Unter den gleichen Reaktionsbedingungen wurde 4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzylbromid (**100**) umgesetzt (Schema 53). Dabei wurde ein Produktgemisch aus dem Ester **199a** und der doppelt geschützten Variante **199b** erhalten. Auch hier konnte die Verbindung **199a** mittels Auswertung der HMBC-Korrelationen eindeutig als Ester identifiziert werden (Abbildung 65). Die erhaltenen Produkte bestätigten somit, dass eine Veretherung der phenolischen OH-Gruppe ausschließlich durch eine vorherige Schützung der Carbonsäure möglich ist.



Schema 53: Synthese der *photocaged* Salicylsäuren **199a** und **199b**.

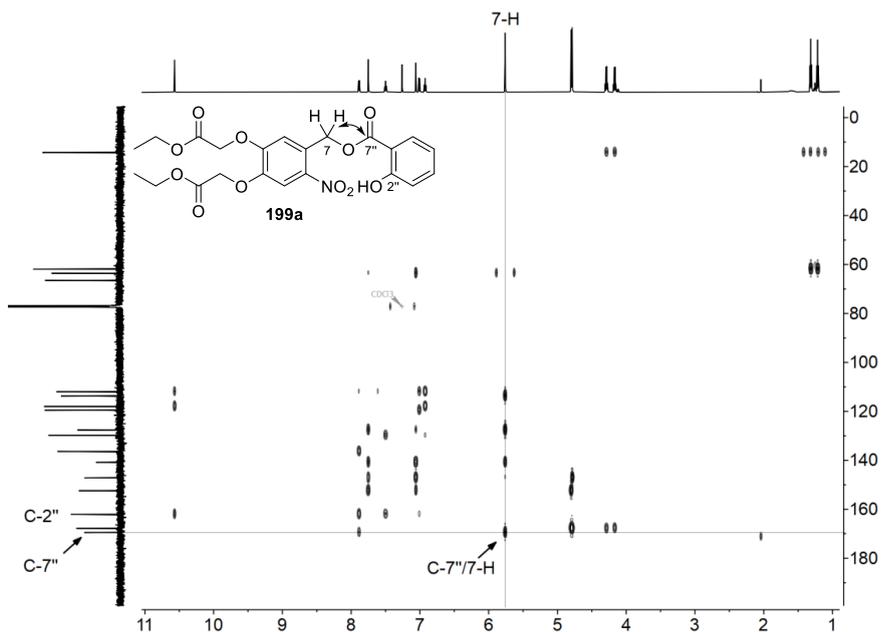
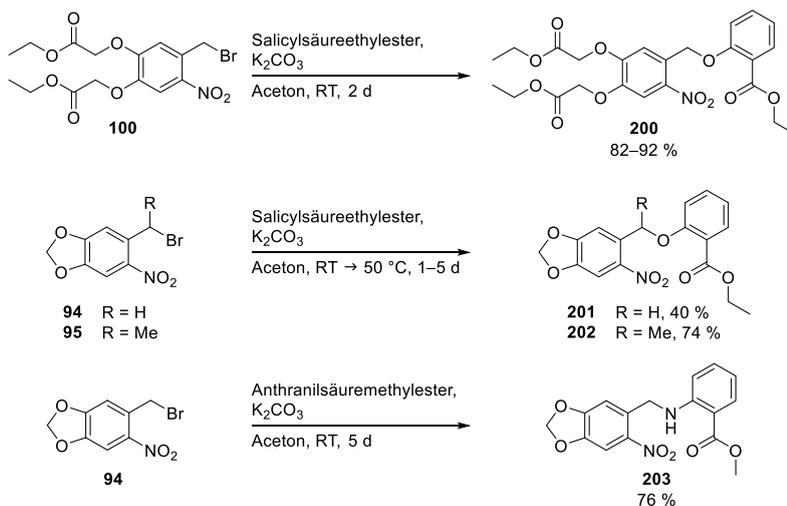


Abbildung 65: HMBC-Spektrum (CDCl₃, 600 MHz) zur Verifizierung der Struktur als BEC-cSalicylsäure (**199a**).

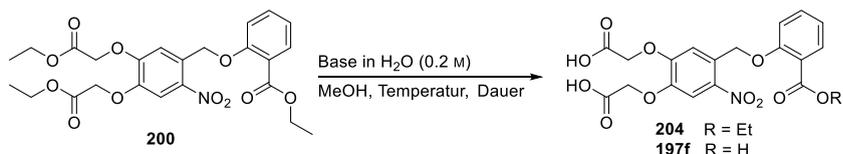
Daher wurde in nachfolgenden Reaktionen anstelle von Salicylsäure (**2a**) der kommerziell erhältliche Salicylsäureethylester verwendet. Dieser wurde gewählt, da er sich bei der finalen Entschützung zur BC-cSalicylsäure (**197f**) unter den gleichen Reaktionsbedingungen abspalten lassen sollte. Die Reaktion mit dem Bromid **100** ergab das gewünschte Produkt **200** in sehr guten Ausbeuten von bis zu 92 % (Schema 54). Bei der Umsetzung von 6-Nitropiperonylbromid (**94**) und 1-(6-Nitrobenzo[*d*][1,3]dioxol-5-yl)ethylbromid (**95**) mit dem Salicylsäureethylester war es bei Raumtemperatur nicht möglich einen vollständigen Umsatz zu erhalten. Daher wurde die Reaktion nach anfänglichem Rühren bei Raumtemperatur auf 50 °C erwärmt. Es konnten für die photolabilgeschützten Salicylsäureethylester **201** und **202** Ausbeuten von 40 % bzw. 74 % erreicht werden. Für hohe Ausbeuten waren jedoch trotz der erhöhten Temperatur lange Reaktionszeiten von mehreren Tagen nötig. Die Reaktion von 6-Nitropiperonylbromid (**94**) mit Anthranilsäuremethylester führte auch schon bei Raumtemperatur in guten Ausbeuten (76 %) zum gewünschten Produkt **203**.



Schema 54: Synthese von geschützten *photocaged* Benzoessäure-Derivaten.

Für die nachfolgende Entschützung des Ethylesters **200** wurden verschiedene Bedingungen getestet (Tabelle 15). Bei der Verwendung von wässriger LiOH-Lösung (0.2 M) konnte bei Reaktion für 4 h bei 0 °C (Tabelle 15, #1) nur Edukt reisoliert werden. Durch Rühren bei Raumtemperatur über mehrere Tage (#2) konnte zwar ein vollständiger Umsatz des Eduktes beobachtet werden, jedoch gelang nur die Isolation eines Produktgemisches. Mit wässriger NaOH-Lösung (0.2 M) konnte bei einer Reaktionszeit von 3 d (#3) die Dicarbonsäure **204** isoliert werden. Der aromatische Ethylester zeigte jedoch gegenüber den aliphatischen Ethylestern eine erhöhte Stabilität, welche erst bei Reaktion mit wässriger KOH-Lösung (0.2 M) überwunden werden konnte (#4). Hier war jedoch auch eine Erhöhung der Temperatur auf 60 °C (#5) nötig, um vollständigen Umsatz in einer angemessenen Zeitspanne zu erhalten. Somit konnte das gewünschte Produkt **197f** abschließend in Ausbeuten von >90 % erhalten werden. Ausbeuteverluste sind hierbei vor allem auf die abschließende Filtration zurückzuführen.

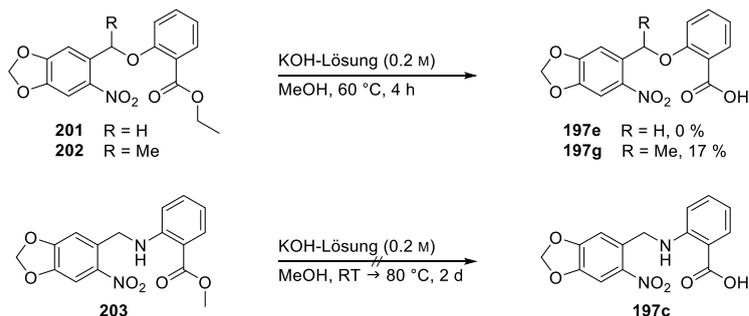
Tabelle 15: Reaktionsoptimierung der Entschützung unter basischen Bedingungen.



#	Base (0.2 M)	Temperatur	Dauer	Umsatz [%]	Ausbeute [%] ^[a]	
					204	197f
1	LiOH	0 °C	4 h	0	0	0
2	LiOH	0 °C → RT	3 d	100	0	0
3	NaOH	0 °C → RT	3 d	100	36	0
4	KOH	0 °C → RT	3 d	100	80 ^b	20 ^b
5	KOH	60 °C	3 h	100	0	92

^[a] Isolierte Ausbeute; ^[b] Produktverhältnis bestimmt mittels NMR.

Diese Reaktionsbedingungen wurden nachfolgend für die Entschützung der Salicylsäureester **201** und **202** verwendet (Schema 55). Für Verbindung **201** konnte jedoch keine NP-cSalicylsäure (**197e**) isoliert werden und für Verbindung **202** die NBE-cSalicylsäure (**197g**) nur in geringen Ausbeuten von 17 %. Ohne Erhitzen war zuvor kein Umsatz erkennbar. Auch beim Anthranilsäureester **203** konnte weder bei Raumtemperatur noch beim schrittweisen Erhöhen der Temperatur auf 80 °C ein Umsatz verzeichnet werden. Hier konnte jedoch das Edukt reisoliert werden, wogegen bei den Salicylsäureestern **201** und **202** das Edukt augenscheinlich zersetzt wurde. Für den Salicylsäureester **201** wurde eine alternative Entschützung nach *Anderson et al.* mit Bariumhydroxid in Methanol getestet, welche jedoch ebenfalls keinen Umsatz zum Produkt lieferte.^[361]



Schema 55: Entschützung unter basischen Bedingungen.

In vitro Charakterisierung

Im Folgenden wurden die photolabil geschützten Benzoesäure-Derivate **197a–g** vergleichend betrachtet. Die Absorptionsspektren zeigten dabei alle einen gleichartigen Verlauf mit Absorptionsmaxima von 340–346 nm (Abbildung 66A). Einzig bei NP-cSalicylsäure* (**197e***) wurde dieses durch ein zweites Maximum überlagert, wodurch der höchste Absorptionswert bei 308 nm vorliegt. Die Extinktionskoeffizienten beim Absorptionsmaximum befinden sich ebenfalls alle in derselben Größenordnung ($4300\text{--}7600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).

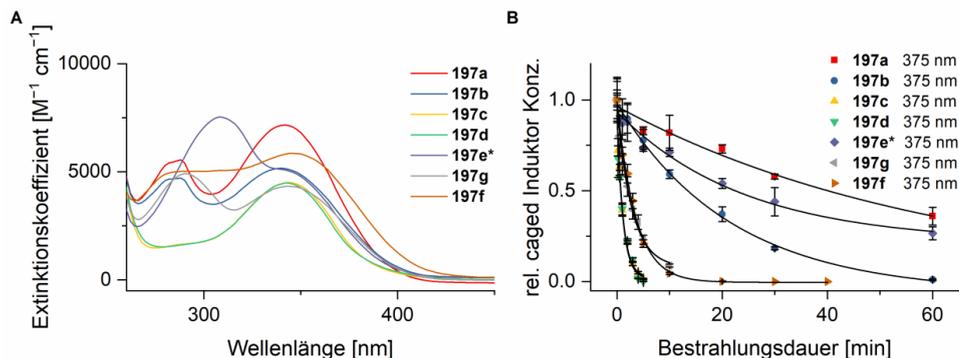


Abbildung 66: Vergleich der *photocaged* Benzoesäure-Derivate der ersten Generation. **A)** Absorptionsspektren [**197a–e*,g:** in MeOH; **197f:** in NaP_i-Puffer (100 mM, pH = 7.4)]. **B)** *In vitro* Zerfallskurven [**197a–e*,g:** 1 mM in MeOH; **197f:** 0.5 mM in NaP_i-Puffer (100 mM, pH = 7.4)] in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer nach Belichtung bei 375 nm (6.4 mW cm^{-2}). Bei den abgebildeten Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Triplikaten.

Beim Vergleich der Halbwertszeiten²⁰ zeigt sich für NP-cToluylsäure (**197a**) und NBE-cToluylsäure (**197b**) der erwartete Effekt der benzyliischen Methyl-Gruppe, nämlich eine verringerte Halbwertszeit (Abbildung 66B). Dies ist bedingt durch die verbesserte Stabilisierung des bei der Photolyse entstehenden benzyliischen Radikals, wodurch eine vereinfachte H-Abstraktion ermöglicht wird.^[69, 75] Bei Betrachtung der Quantenausbeuten spiegelt sich dies ebenfalls wider, da hier NBE-cToluylsäure (**197b**) eine etwa dreimal so hohe Quantenausbeute aufweist (Tabelle 16). Bei Gegenüberstellung von NP-cAnthranilsäure (**197c**) und NBE-cAnthranilsäure (**197d**) ist dieser Effekt jedoch nicht zu beobachten. Hier zeigten beide eine vergleichbare Quantenausbeute und eine ähnliche Halbwertszeit von $t_{0,5} \approx 0.8\text{ min}$, was gleichzeitig die mit Abstand kürzeste Halbwertszeit darstellte. Beide Proben wiesen eine hohe Stabilität gegenüber Solvolyse auf. Auch die NBE-cSalicylsäure (**197g**) wies bei gleichzeitig hoher Stabilität gegenüber Solvolyse einen schnellen photolytischen Zerfall mit einer Halbwertszeit von $t_{0,5} \approx 2.0\text{ min}$ auf. Auch hier ist bedingt durch die Methyl-Gruppe an der benzyliischen Position eine deutlich höhere Quantenausbeute zu finden als bei

²⁰ Der Begriff Halbwertszeit wird hier und im Folgenden verwendet, auch wenn es sich nicht um eine Reaktion erster Ordnung, sondern um einen komplexeren Zerfallsprozess handelt.

der strukturell ähnlichen BC-cSalicylsäure (**197f**). Zuvor wurde einzig für NP-cToluylsäure (**197a**) eine Halbwertszeit von $t_{0.5} \approx 45$ min in einem gepufferten Methanol-Wasser-Gemisch bestimmt.^[312] Diese stimmt sehr gut mit den in dieser Arbeit ermitteltem Ergebnis überein, welches in reinem Methanol ermittelt wurde.

Tabelle 16: Photochemische Eigenschaften der photolabil geschützten Benzoesäure-Derivate **197a–g** der ersten Generation.

Verbindung	$\lambda_{\max}^{[a]}$ [nm]	$\epsilon(375)^{[b]}$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	$t_{0.5}(375)^{[c]}$ [min]	Stabilität nach 24 h ^[d] [%]	S ^[e] [mM]	$\phi_{\text{Zerfall}}(375)^{[f]}$	$\epsilon\phi_{\text{Zerfall}}(375)^{[g]}$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]
197a	342	3193	42.4	89±1	<0.1	3.99×10^{-3}	13
197b	340	2604	15.1	78±25	<0.1	1.21×10^{-2}	32
197c	344	1749	0.79	94±3	<0.1	2.04×10^{-1}	357
197d	342	1625	0.80	100±3	<0.1	1.99×10^{-1}	323
197e*	308	2343	16.8	79±10	<0.1	7.53×10^{-3}	18
197g	344	2437	1.97	100±3	<0.1	7.88×10^{-2}	192
197f^[h]	346	4017	2.44	84±10	3.20	3.59×10^{-2}	144

^[a] Maximale Absorptionswellenlänge λ_{\max} gemessen in MeOH; ^[b] Extinktionskoeffizient ϵ bei 375 nm gemessen in MeOH;

^[c] Halbwertszeit $t_{0.5}$ nach Bestrahlung bei 375 nm in MeOH; ^[d] Stabilität gegenüber Solvolyse unter Ausschluss von Licht (angegeben in % der verbleibenden Startverbindung nach 24 h); ^[e] Löslichkeit S gemessen in dest. Wasser;

^[f] Quantenausbeute ϕ des Zerfalls nach Bestrahlung bei 375 nm gemessen in MeOH; ^[g] Photolytische Effizienz $\epsilon\phi$ des Zerfalls nach Bestrahlung bei 375 nm; ^[h] gemessen in NaP_i-Puffer (100 mM, pH = 7.4).

Es ist zu erkennen, dass bezüglich der Stabilität gegenüber Solvolyse Ether und Amine grundsätzlich geeignete Verbindungsklassen darstellen. Auch Ester zeigen in Methanol eine zufriedenstellende Stabilität, welche jedoch beim Einsatz im biologischen Kontext voraussichtlich niedriger ausfallen würde aufgrund der Anwesenheit von Esterasen. Zusätzlich zeigte die photolabile Schützung an der aromatischen Hydroxy- bzw. Amin-Funktionalität einen deutlich schnelleren photolytischen Zerfall im Vergleich zur Schützung der Carbonyl-Funktionalität. Von den synthetisierten Verbindungen zeigt jedoch nur BC-cSalicylsäure (**197f**) eine zufriedenstellende Löslichkeit in Wasser (3.20 mM). Diese kann durch Überführen in das entsprechende Natriumsalz **197h** auf >100 mM erhöht werden. Die übrigen *photocaged* Benzoesäure-Derivate zeigen Löslichkeiten von <0.1 mM und sind somit nur bedingt für den Einsatz im biologischen Kontext geeignet.

Die ursprünglich getroffene Annahme, dass aufgrund der geringen Löslichkeit der übrigen *photocaged* Benzoesäure-Derivate und der damit einhergehenden verweherten Photolysierbarkeit ein Zwei-Phasen-Kultivierungssystem anzustreben sei, wurde in einer Kooperation mit M. Sc. *Fabienne Hilgers* überprüft. Dieses erwies sich jedoch nicht als anwendbar. Deutlich vielversprechender schien daher die Erhöhung der Löslichkeit in wässrigen Medien, um so gleichermaßen die Photolysierbarkeit zu erhöhen. Somit erwies sich BC-cSalicylsäure (**197f**) als einziger Vertreter der ersten Generation als potenziell anwendbar in einem biologischen Kontext.

4.3.3.2 Zweite Generation

Die zweite Generation der *photocaged* Benzoesäure-Derivate sollte zusätzlich zu einer hohen Stabilität und einer erhöhten Löslichkeit ein bathochrom verschobenes Absorptionsmaximum aufweisen. Hierzu wurde das zuvor synthetisierte Cumarin **110** verwendet. Als Induktoren wurden nur die Anthranilsäure (**2b**) und die Salicylsäure (**2a**) gewählt. Es wurden keine weiteren *m*-Toluylsäure-Derivate synthetisiert. Diese könnten zum einen ausschließlich über einen Ester photolabil-geschützt werden, welche jedoch erfahrungsgemäß von Esterasen gespalten werden können. Zum anderen würde durch die Schützung der Carbonsäurefunktionalität die Löslichkeit weiter herabgesetzt werden und somit einen erfolgreichen Einsatz verhindern. Daher wurden im Folgenden die Verbindungen **197i** und **197j** synthetisiert.

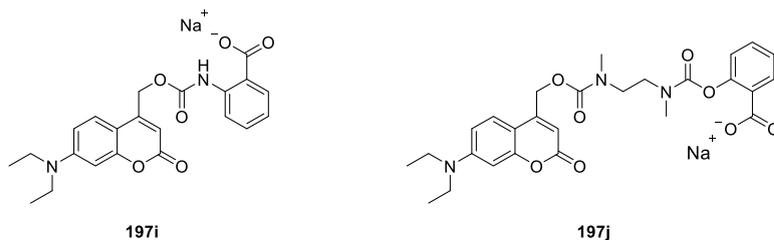
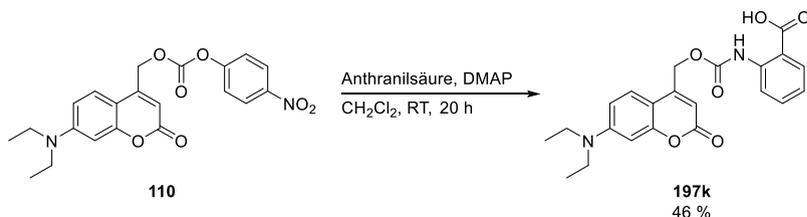


Abbildung 67: Photocaged Benzoensäure-Derivate der zweiten Generation.

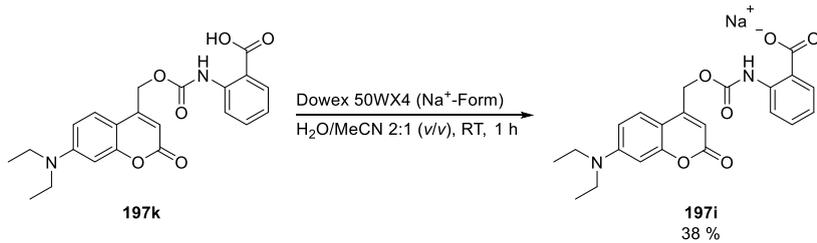
Synthese

Die Synthese erfolgte ausgehend vom aktivierten Coumarin-Kohlensäureester **110** durch Umsetzung mit Anthranilsäure (**2b**) und DMAP in Dichlormethan bei Raumtemperatur. Das gewünschte Produkt **197k** konnte in einer Ausbeute von 46 % erhalten werden (Schema 56). Diese Verbindung ist jedoch schlecht löslich im wässrigen Medium und müsste für eine Anwendung im biologischen Bereich in DMSO vorgelöst werden.



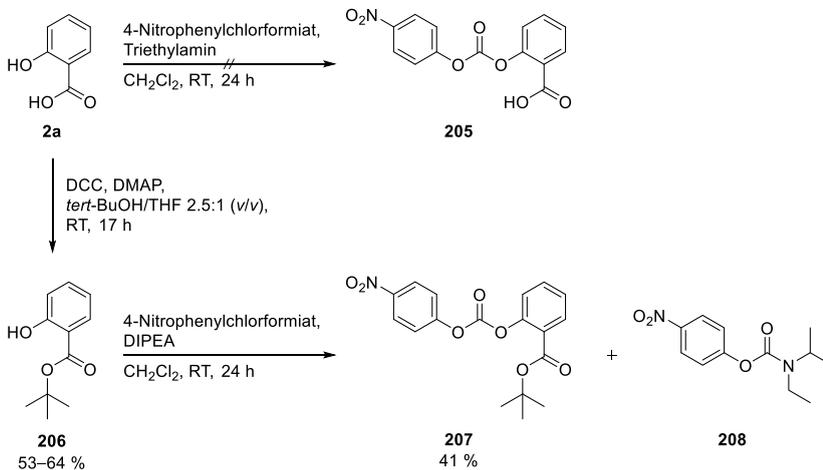
Schema 56: Synthese von DC-cAntranilsäure (**197k**).

Um die Löslichkeit zu steigern, wurde DC-cAntranilsäure (**197k**) mittels Dowex 50WX4 (Na^+ -Form) in das entsprechende Natriumsalz **197i** überführt (Schema 57). Dazu wurde zunächst das kommerziell erhältliche Dowex 50WX4 (H^+ -Form) durch Spülen mit 1 M NaCl-Lösung und anschließendem Waschen mit Wasser in die benötigte Na^+ -Form überführt. Die geringe Ausbeute lässt sich dabei auf eine starke Absorption des Substrates auf der Oberfläche des Ionenaustauschers zurückführen. Da die Reaktion aufgrund der schlechten Löslichkeit im Acetonitril-Wasser-Gemisch unter starker Verdünnung durchgeführt werden musste und das abschließende Entfernen des Acetonitril-Wasser-Gemisches mit einem hohen Zeitaufwand einherging, empfiehlt sich eher die Umsetzung mit einer definierten Menge einer verdünnten NaOH-Lösung.



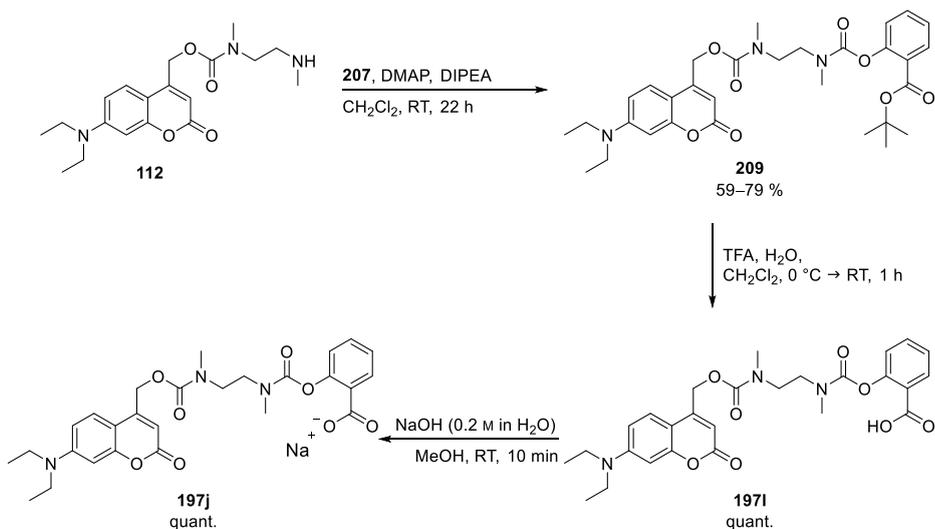
Schema 57: Synthese von DC-cAnthranilsäure⁺ (**197i**).

Die direkte Bildung des aktivierten Kohlensäureesters **205** war nicht möglich (Schema 58). Die freie Carbonsäure führte wie erwartet zur Bildung einer Reihe von Nebenprodukten, wobei das gewünschte Produkt **205** nicht isoliert werden konnte. Daher wurde zunächst das *tert*-Butylsalicylat (**206**) über eine *Steglich*-Veresterung unter Verwendung von *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und DMAP in einem *tert*-Butanol/THF-Gemisch hergestellt (Ausbeute: 53–64). Der *tert*-Butylester lässt sich unter sauren Bedingungen hydrolysieren und besitzt somit eine hervorragende Kompatibilität mit den Carbamat-Gruppen. Im Anschluss an die Schützung verlief die Reaktion hin zum aktivierten Kohlensäureester **207** mit mäßigen Ausbeuten von 41 %. Den Grund dafür stellte eine auftretende Nebenreaktion dar, bei welcher das 4-Nitrophenylchlorformiat und die Aminbase reagieren. Dabei wurde das Carbamat **208** als Nebenprodukt in signifikanten Mengen gebildet. Diese Dealkylierung tertiärer Amine durch Phenylchlorformiate wurde bereits von *Hobson* und *McCluskey* beschrieben.^[362] Somit empfiehlt sich die Verwendung von DMAP oder Pyridin anstelle von Triethylamin oder DIPEA, um die Ausbeute zu erhöhen.



Schema 58: Synthese des aktivierten Salicylsäure-Kohlensäureesters **207**.

Der so erhaltene aktivierte Salicylsäure-Kohlensäureester **207** wurde mit dem Cumarinamin **112** in Gegenwart von DIPEA und DMAP umgesetzt (Schema 59). Die *tert*-Butyl-geschützte *photocaged* Verbindung **209** wurde in Ausbeuten von 59–79 % erhalten. Die anschließende Entschützung unter sauren Bedingungen mittels Trifluoressigsäure verlief quantitativ, benötigte jedoch im Vergleich zu der Entschützung der Kohlenhydrate Raumtemperatur und eine Reaktionszeit von einer Stunde. Um auch hier eine Steigerung der Löslichkeit zu erreichen und somit eine einfache Handhabung zu ermöglichen, wurde die Säure **197i** durch Zugabe von wässriger Natriumhydroxid-Lösung unter quantitativer Ausbeute in das entsprechende Natriumsalz **197j** überführt.



Schema 59: Syntheseweg hin zu den *photocaged* Salicylsäure-Derivaten **197i** und **197j**.

Wie bei der vorherigen Verwendung der *Spacer* konnte erneut, bedingt durch die Amid-Resonanz der Carbamat-Funktionalitäten im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, die Ausbildung von Rotameren beobachtet werden. Auch in diesem Fall wurde, um die Reinheit der Struktur nachweisen zu können, in Kooperation mit *Kevin Bochinsky* eine dynamische NMR-Messung durchgeführt. In dieser Messung wurde die Messtemperatur schrittweise von 20°C auf 70°C erhöht, wodurch ein eindeutig reines Spektrum der Verbindung **197i** erhalten wurde.

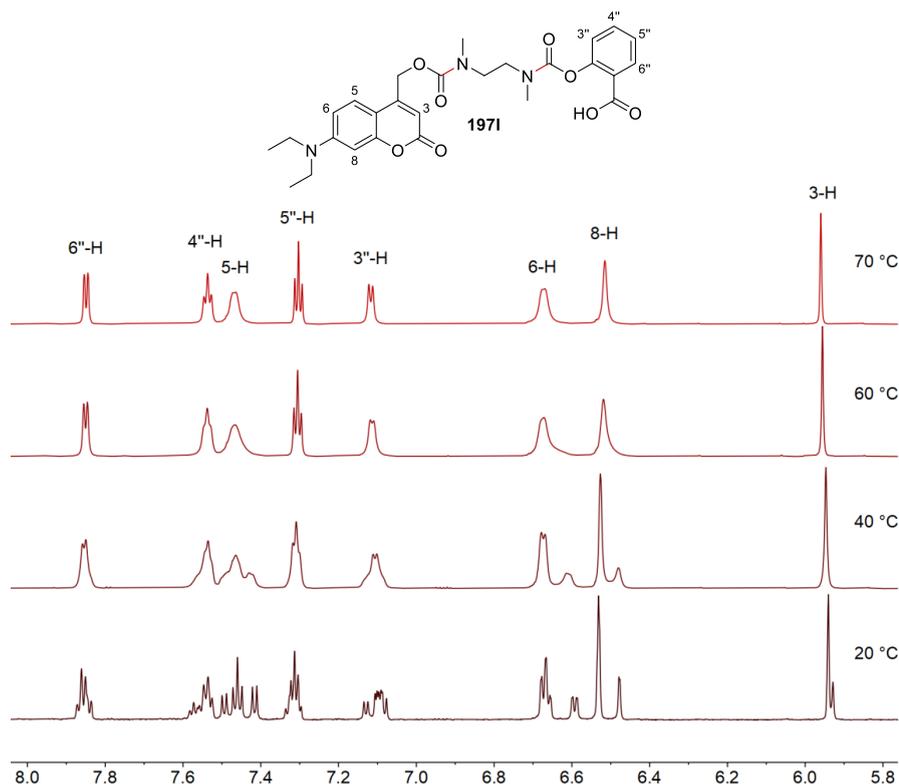


Abbildung 68: Dynamische NMR-Messung der Verbindung **1971** bei 20–70 °C durchgeführt von Kevin Bochinsky.

In vitro Charakterisierung

Die *photocaged* Benzoessäure-Derivate der zweiten Generation zeigen deutlich geeignetere Eigenschaften für eine Anwendung in biologischen Systemen. Sie besitzen ein bathochrom verschobenes Absorptionsmaximum und einen ausreichend hohen Extinktionskoeffizienten bei Wellenlängen zwischen 400 und 450 nm, um eine Entschützung durch Belichtung in einer vertretbaren Zeitspanne (≤ 30 min) zu ermöglichen (Abbildung 69). Die Stabilitätsmessungen nach 24 h deuten auf eine hohe Stabilität hin. Dies ist auf die deutlich höhere Stabilität der Carbamat-Gruppe gegen Solvolyse im Vergleich mit der Carbonat-Gruppe zurückzuführen.^[290] Die Betrachtung der Halbwertszeiten²¹ unterstreicht die Eignung der *photocaged* Salicylsäure (**1971**) für eine wellenlängenselektive Anregung. Nach Belichtung bei 375 nm erfolgt der photolytische Zerfall langsam mit einer Halbwertszeit von $t_{0,5} \approx 20$ min, wohingegen nach Bestrahlung bei 430 nm die Halbwertszeit nur $t_{0,5} \approx 3$ min beträgt.

²¹ Der Begriff Halbwertszeit wird hier und im Folgenden verwendet, auch wenn es sich nicht um eine Reaktion erster Ordnung, sondern um einen komplexeren Zerfallsprozess handelt.

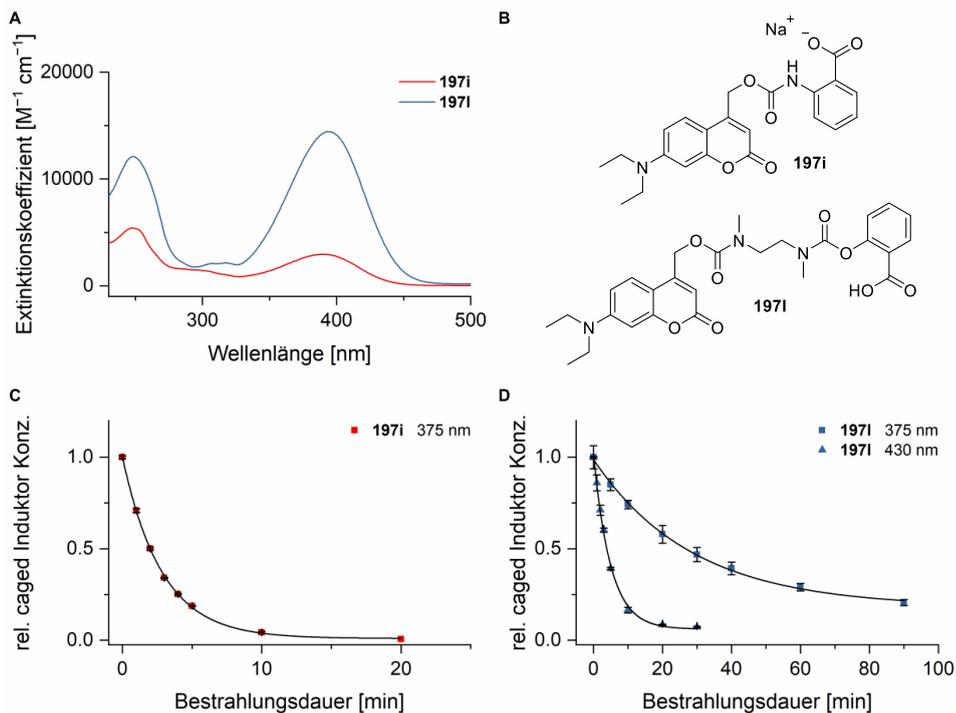


Abbildung 69: Vergleich der *photocaged* Benzoessäure-Derivate der zweiten Generation. **A)** Absorptionsspektren [in NaPi Puffer (20 mM, pH 7.4)/MeOH 9:1]. **B)** Strukturformeln. **C)** *In vitro* Zerfallskurve [1 mM in NaPi Puffer (20 mM, pH 7.4)/MeOH 9:1] in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer nach Belichtung bei 375 nm (6.4 mW cm^{-2}). **D)** *In vitro* Zerfallskurve [1 mM in NaPi Puffer (20 mM, pH 7.4)/MeOH 9:1] in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer nach Belichtung bei 375 nm (6.4 mW cm^{-2}) bzw. 430 nm (45.6 mW cm^{-2}). Bei den abgebildeten Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Triplikaten.

Das zuvor beobachtete Ausbleiben des Selbsterlegungs-Mechanismus des *Spacer* tritt bei der Verbindung **197i** nicht auf, da bei der hier vorliegenden aromatischen Hydroxy-Gruppe das entstehende Anion gut stabilisiert ist und somit eine gute Abgangsgruppe darstellt.

Tabelle 17: Photochemische Eigenschaften der photolabil geschützten Benzoesäure-Derivate **197i** und **197l** der zweiten Generation.

Verbindung	λ_{\max} ^[a] [nm]	$\epsilon(\lambda_{\max})$ ^[b] [M ⁻¹ cm ⁻¹]	$t_{0.5}(\lambda_{\text{Str}})$ ^[c] [min]	Stabilität nach 24 h ^[d] [%]	$\phi_{\text{Zerfall}}(\lambda_{\text{Str}})$ ^[e]	$\epsilon\phi_{\text{Zerfall}}(\lambda_{\text{Str}})$ ^[f] [M ⁻¹ cm ⁻¹]
197i	390	2946	1.96 (375)	98±0.2	9.01×10^{-2} (375)	235 (375)
197l	395	14438	19.9 (375) 3.42 (430)	94±5	2.66×10^{-2} (430)	146 (430)

^[a] Maximale Absorptionswellenlänge λ_{\max} gemessen in NaPi Puffer (20 mM, pH 7.4)/MeOH 9:1; ^[b] Extinktionskoeffizient ϵ bei λ_{\max} gemessen in NaPi Puffer (20 mM, pH 7.4)/MeOH 9:1; ^[c] Halbwertszeit $t_{0.5}$ nach Bestrahlung bei Wellenlänge λ_{Str} gemessen in NaPi Puffer (20 mM, pH 7.4)/MeOH 9:1; ^[d] Stabilität gegenüber Solvolyse unter Ausschluss von Licht (angegeben in % der verbleibenden Startverbindung nach 24 h); ^[e] Quantenausbeute ϕ des Zerfalls nach Bestrahlung bei Wellenlänge λ_{Str} gemessen in NaPi Puffer (20 mM, pH 7.4)/MeOH 9:1; ^[f] Photolytische Effizienz $\epsilon\phi$ des Zerfalls nach Bestrahlung bei Wellenlänge λ_{Str} .

In vivo Applikation

In der von M. Sc. *Fabienne Hilgers* durchgeführten Untersuchung der BC-cSalicylsäure (**197f**) und der DC-cSalicylsäure (**197l**) wurde zunächst der Expressionswirt *E. coli* Tuner(DE3) verwendet. Dabei zeigte sich, dass die verwendeten Expressionssysteme mit den Plasmiden pM117-R45T-GFPmut3 und pM-R45T-GFPmut3, welche beide Varianten des XylS/P_m-Regulator/Promotor-Systems beinhalten, eine Autoinduktion nach Bestrahlung mit UV-A-Licht aufwiesen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Aktivierung von XylS nicht nur durch die Bindung eines Effektormoleküls, sondern auch durch Überproduktion aktiviert werden kann.^[299, 363] Dies liegt daran, dass die Bindung von XylS an den P_m-Promotor als Dimer erfolgt. Der Induktor bewirkt hierbei primär eine Konformationsänderung, welche die Dimerisierung begünstigt.^[364] Die Dimerisierung kann jedoch auch allein durch eine hohe XylS Konzentration erreicht werden.^[365] Es besteht die Möglichkeit, dass es durch die Bestrahlung mit UV-A-Licht zu einer Hyperproduktion von XylS kommt. Aufgrund der daraus resultierenden hohen Basalexpression war eine Anwendung dieser Promotoren zur lichtgesteuerten Genexpression *via photocaged* Induktoren nicht möglich.

Als Alternative wurde der Expressionsvektor pBNTmcs-mCherry unter der Kontrolle des P_{nagAa}-Promotors mit *mCherry* als Reportergen ausgewählt. Im Gegensatz zu den P_m- bzw. P_m^{ML1-17}-Promotoren, welche eine breite Auswahl an Benzoesäure-Derivaten als Induktoren akzeptieren,^[299] ist beim P_{nagAa}-Promotor eine effiziente Aktivierung ausschließlich über Salicylsäure (**2a**) möglich.^[302] Somit fand die *photocaged* Anthranilsäure **197i** keine weitere Anwendung. Sowohl BC-cSalicylsäure (**197f**) als auch DC-cSalicylsäure (**197l**) sowie die entsprechenden

Natriumsalze **197h** und **197j** bewirkten eine signifikante Expressionsantwort (Abbildung 70A). Die unbelichteten Kulturen (Dunkelkontrollen) wiesen niedrige Fluoreszenzlevel analog zu den nicht-induzierten Kontrollen auf. Dies zeigt, dass die getesteten Verbindungen über eine vollständige Stabilität unter den verwendeten Kultivierungsbedingungen (30 °C, 20 h) verfügen. Anschließend sollte die Anwendbarkeit in *P. putida* KT2440 demonstriert werden, welches ebenfalls mit dem Expressionsvektor pBNTmcs-mCherry versehen wurde. Hierbei führten die BC-cSalicylsäure (**197f**) bzw. das entsprechende Natrium Salz **197h** zu stark erhöhten Expressionsleveln in den unbelichteten Kulturen in etwa vergleichbar mit den belichteten Kulturen (Abbildung 70B). Dies deutet darauf hin, dass durch wirtsspezifische Enzyme eine Freisetzung der Salicylsäure (**2a**) erfolgt. Dieser Effekt war bei der DC-cSalicylsäure (**197i**) nicht zu beobachten. Bei dieser wurde nur ein geringfügiger Anstieg des Fluoreszenzlevels in den unbelichteten Kulturen beobachtet.

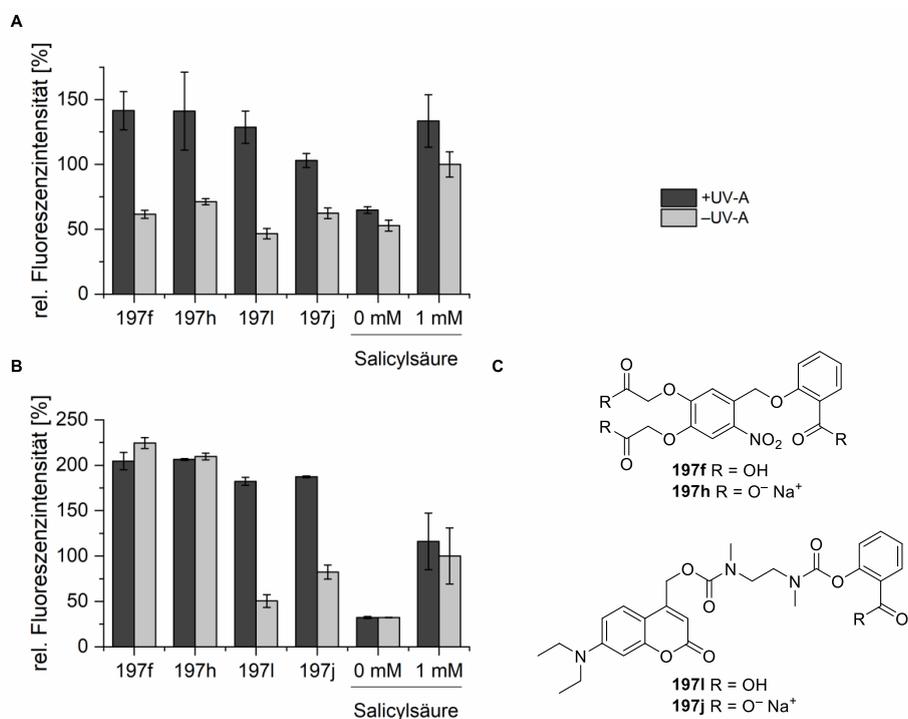


Abbildung 70: Lichtgesteuerte Genexpression unter Verwendung von BC-cSalicylsäure (**197f**), BC-cSalicylsäure⁺ (**197h**), DC-cSalicylsäure (**197i**) und DC-cSalicylsäure⁺ (**197j**) in *E. coli* Tuner(DE3)/pBNTmcs-mCherry (**A**), *P. putida* KT2440/pBNTmcs-mCherry (**B**). Die Strukturformeln sind in **C** dargestellt. Bei den abgebildeten Werten handelt es sich um Mittelwerte ± Standardabweichung aus Triplikaten. Die Daten für diese Abbildung wurden von Fabienne Hilgers im Rahmen ihrer Dissertation erhoben und die Abbildung wurde in Anlehnung an einen gemeinsamen Manuskriptentwurf erstellt.

4.3.3.3 Zusammenfassung des Kapitels

- Insgesamt wurden neun *photocaged* Effektormoleküle auf Basis von Benzoesäure-Derivaten erfolgreich synthetisiert, von denen vier neuartig waren.
- Die photochemischen Eigenschaften der *photocaged* Benzoesäure-Derivate wurden charakterisiert und verglichen.
- Der Selbsterlegungsmechanismus des *N,N'*-Dimethylethylendiamin-*Spacer* erwies sich als geeignet zur Freisetzung von Salicylsäure (**2a**).
- Die Überführung der *photocaged* Benzoesäure-Derivate in die entsprechenden Natriumsalze bewirkte eine ausreichende Steigerung der Löslichkeit zur Anwendung in wässrigen Medien.
- Die optimierten *photocaged compounds* DC-cAnthranilsäure (**197i**) und DC-cSalicylsäure (**197j**) erwiesen sich als geeignet für eine Freisetzung oberhalb von 400 nm.
- In den *in vivo* Untersuchungen konnte für DC-cSalicylsäure (**197j**) eine gute Anwendbarkeit in *E. coli* Tuner(DE3) und *P. putida* KT2440 demonstriert werden.
- BC-cSalicylsäure (**197f**) ist aufgrund der Instabilität in *P. putida* KT2440 nur zur Verwendung in *E. coli* Tuner(DE3) geeignet.

4.4 Werkzeugkasten für wellenlängenselektive Genexpression

Nachdem sowohl ein Grundstock an *photocaged compounds*, welche auf der *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe basieren, als auch eine Reihe von für die Anregung oberhalb von 400 nm, optimierten Cumarin-geschützten Derivaten synthetisiert wurde, sollten beide für die wellenlängenselektive Genexpression kombiniert werden. Aufgrund der vorherigen *in vitro* bzw. *in vivo* Experimente wurden NB-cIPTG (**150**) sowie NP-cArabinose (**84b**) als Vertreter der *o*-Nitrobenzyle und *photocaged* Arabinose (**192**) sowie DC-cSalicylsäure (**197i**) als Vertreter der Cumarine ausgewählt (Abbildung 71).

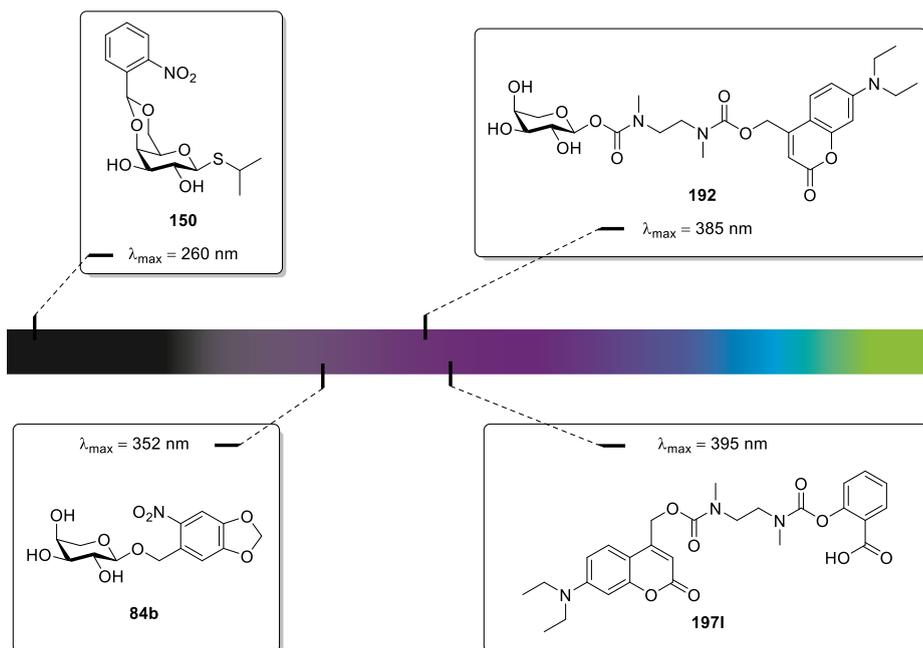


Abbildung 71: Übersicht über die zur wellenlängenselektiven Genexpression ausgewählten *photocaged compounds*.

Da alle Chromophore eine nennenswerte Absorption im Bereich von 300–350 nm besitzen, ist eine vollständig orthogonale Entschützung generell nur schwer zu erreichen (Abbildung 72).^[132] Da dies auch bei den hier vorliegenden *photocaged compounds* der Fall ist und somit eine Überlappung der Absorptionsspektren vorliegt, wurde eine wellenlängenselektive Entschützung angestrebt, bei der zunächst die Schutzgruppe mit dem langwelligen Absorptionsmaximum photolytisch gespalten wird. Um dabei eine möglichst selektive Anregung gewährleisten zu können, sollte das Maximum des Quotienten der photolytischen Effizienzen ($\epsilon_{\lambda} \phi_{\text{Zerfall}}$) bei den entsprechenden Wellenlängen größer als

100 sein.^[132] Dies bedeutet beispielsweise, dass bei gleicher Quantenausbeute eine der Verbindungen 100-mal stärker absorbiert und somit auch 100-mal effizienter photolytisch wird.^[132]

Daraus ergibt sich, dass insbesondere die Kombination aus NB-cIPTG (**150**) ($\epsilon_{430}\phi_{\text{Zerfall}} = 1$) und DC-cSalicylsäure (**1971**) ($\epsilon_{430}\phi_{\text{Zerfall}} = 146$) die größte Eignung für eine sequentielle Entschützung aufzeigt, da diese von den synthetisierten Verbindungen den größtmöglichen Quotienten der photolytischen Effizienzen bei 430 nm aufweisen. Darüber hinaus sollten auch NP-cArabinose (**84b**) ($\epsilon_{430}\phi_{\text{Zerfall}} = 3$) mit DC-cSalicylsäure (**1971**) ($\epsilon_{430}\phi_{\text{Zerfall}} = 146$) sowie NB-cIPTG (**150**) ($\epsilon_{430}\phi_{\text{Zerfall}} = 1$) mit DC-cArabinose (**192**) ($\epsilon_{430}\phi_{\text{Zerfall}} = 23$) nutzbare Kombinationen darstellen (Tabelle 18). Bei letzterer liegt der Quotient der photolytischen Effizienzen bei 23. Dies würde lediglich einer Entschützung von $\sim 4\%$ des NB-cIPTG (**150**) entsprechen. Es ist zu beachten, dass die verwendeten Lichtquellen kein vollständig monochromatisches Emissionsspektrum besitzen.^[312] Die Emissionsspektren weisen eine gewisse Halbwertsbreite auf und die angegebene Belichtungswellenlänge gibt lediglich das Emissionsmaximum wieder. Somit handelt es sich hierbei um eine vereinfachte Betrachtung, um eine Vorselektion zu treffen.

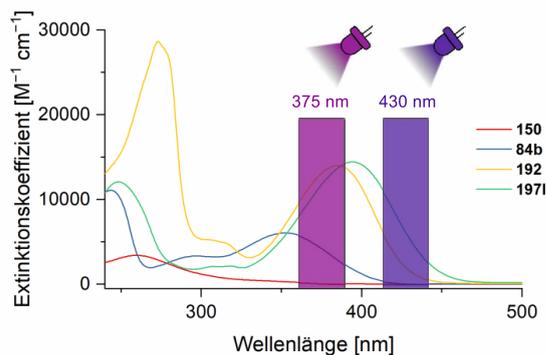


Abbildung 72: Vergleich der Absorptionsspektren der *photocaged* Verbindungen **84b**, **150**, **192** und **1971** mit den schematischen Bestrahlungsbereichen der UV-A Lichtquelle (violette Feld) und der 430 nm-LED des LUMOS 43 (dunkelviolette Feld).

Tabelle 18: Photochemische Eigenschaften der photolabil geschützten Induktoren **84b**, **150**, **192** und **197f**.

Verbindung	λ_{\max} ^[a] [nm]	$\varepsilon(375)$ ^[b] [M ⁻¹ cm ⁻¹]	$\varepsilon(430)$ ^[b] [M ⁻¹ cm ⁻¹]	$t_{0.5}(375)$ ^[c] [min]	$t_{0.5}(430)$ ^[c] [min]	$\phi_{\text{Zerfall}}(430)$ ^[d]	$\varepsilon\phi_{\text{Zerfall}}(430)$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]
150 ^[e]	260	126	22	1.55	38.7	5.30×10^{-2}	1
84b ^[e]	352	4452	90	1.82	14.8	3.08×10^{-2}	3
192 ^[e]	385	13130	1698	—	4.02	1.33×10^{-2}	23
197f ^[f]	395	11774	5478	19.9	3.42	2.66×10^{-2}	146

^[a] Maximale Absorptionswellenlänge λ_{\max} ; ^[b] Extinktionskoeffizient ε ; ^[c] Halbwertszeit $t_{0.5}$; ^[d] Quantenausbeute ϕ des Zerfalls nach Bestrahlung bei 430 nm; ^[e] gemessen in Tris-Puffer (20 mM pH 7.5)/MeCN 1:1; ^[f] gemessen in NaPi-Puffer (100 mM, pH 7.4)/MeOH 9:1.

In Kooperation mit M. Sc. *Fabienne Hilgers* wurde die erfolgversprechende Kombination von NB-clPTG (**150**) und DC-cSalicylsäure (**197f**) *in vivo* untersucht. Der Stamm *P. putida* KT2440 mit den beiden Expressionsplasmiden pBNTmcs-mCherry, welcher unter der Kontrolle des NagR/P_{nagAa}-Regulator/Promotor-Systems liegt, und pVLT33-GFPmut3 wurden verwendet, welcher die LacI/P_{lac}-vermittelte Expression von GFPmut3 ermöglicht. Somit gewährleistet der Stamm eine zweifarbige Expressionsantwort. Dabei aktiviert die Zugabe von IPTG (**1a**) die Expression des grün fluoreszierenden Proteins GFP und durch Salicylsäure (**2a**) wird die Expression des rot fluoreszierenden Proteins mCherry bewirkt. Die Bestrahlung erfolgte jeweils am Rande des jeweiligen Absorptionsspektrums. Hier konnte trotz der geringeren Absorption eine schnelle Photolyse und vor allem eine gute Selektivität erreicht werden. Als Positiv- und Negativkontrollen wurden die Kulturen entweder mit blauem Licht (~447 nm) bzw. UV-A-Licht (365 nm) bestrahlt oder blieben unbelichtet (Abbildung 73). Die unbelichteten Kulturen wiesen keine erhöhten Expressionslevel auf. Es konnte gezeigt werden, dass schon nach einer Belichtungsdauer von 5–10 min mit blauem Licht die alleinige, vollständige Entschützung der DC-cSalicylsäure (**197f**) und dadurch eine mCherry Fluoreszenz von 70 % im Vergleich zur Induktion mit dem herkömmlichen, nicht-photolabil-geschützten Induktor erreicht werden kann. Eine Erhöhung der GFP-Fluoreszenz ist dabei nicht zu beobachten. Daraus geht hervor, dass kein intermolekularer Energietransfer erfolgt und die hohe, bereits *in vitro* beobachtete Selektivität erhalten bleibt. Erst nach Belichtung mit UV-A-Licht für 30 min stieg auch die GFP-Fluoreszenz an, erreichte jedoch nur etwa 40 % im Vergleich zur Verwendung des herkömmlichen Induktors. Dieser Wert könnte in zukünftigen Studien durch die Nutzung von BC-clPTG (**197f**)

optimiert werden, da diese *photocaged* Verbindung bei bisherigen Untersuchungen eine deutlich bessere Expressionsantwort in *P. putida* zeigte.

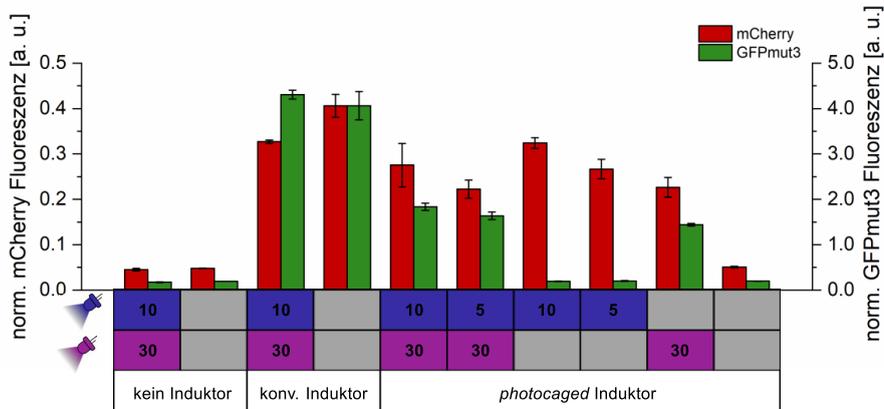


Abbildung 73: Lichtgesteuerte Genexpression unter Verwendung von NB-cIPTG (**150**) ($500 \mu\text{M}$) und DC-NN-cSalicylsäure (**1971**) ($50 \mu\text{M}$) in *P. putida* KT2440 mit den beiden Expressionsplasmiden pBNTmcs-mCherry und pVLT33-GFPmut3. Die normierten Fluoreszenzlevel nach Induktion durch Bestrahlung mit blauem Licht (447 nm ; $\sim 10 \text{ mW cm}^{-2}$; 5 oder 10 min) (+BL) sowie UV-A-Licht (365 nm ; $\sim 1 \text{ mW cm}^{-2}$; 30 min) sind im Vergleich zu der Zugabe der konventionellen Induktoren IPTG (**1a**) ($500 \mu\text{M}$) bzw. Salicylsäure (**2a**) ($50 \mu\text{M}$) oder der Negativkontrolle ohne Induktor dargestellt. Bei den abgebildeten Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Triplikaten. Die Daten für diese Abbildung wurden von *Fabienne Hilgers* im Rahmen ihrer Dissertation erhoben und die Abbildung wurde in Anlehnung an einen gemeinsamen Manuskriptentwurf erstellt.

In einem *Proof of Concept* Experiment, welches von M. Sc. *Fabienne Hilgers* durchgeführt wurde, wurde die Kombination der *photocaged* Verbindungen **150** und **1971** zur Steuerung eines komplexen Biosynthesewegs eingesetzt (Abbildung 74A). Dies konnte am Beispiel der Herstellung von Rhamnolipiden in dem Stamm *P. putida* SK40 demonstriert werden.^[366] Hierbei lagen die chromosomal integrierten Gene *rhlA* und *rhlB*, welche für zwei Proteine (RhlA und RhlB) zur Produktion von Mono-Rhamnolipiden aus aktivierten 3-Hydroxyfettsäuren (HFA) codieren, unter Kontrolle des mit Salicylsäure (**2a**) induzierbaren NagR/*P_{nagAa}*-Regulator-Promotor-Systems (Abbildung 74B). Zusätzlich beinhaltete der Stamm das Plasmid pVLT33-rhIC,^[367] welches das Gen *rhIC* unter Kontrolle des LacI/*P_{lac}*-Regulator-Promotor-Systems aufwies. Das durch *rhIC* codierte Protein (RhIC) ist schließlich für die Synthese von Di-Rhamnolipiden aus Mono-Rhamnolipiden verantwortlich. Durch die lichtgesteuerte Aktivierung der *photocaged* Salicylsäure **1971** konnte die Produktion des Mono-Rhamnolipids im Vergleich zur Induktion mit Salicylsäure (**2a**) deutlich erhöht werden. Die weitere Umsetzung des Mono-Rhamnolipids zum Di-Rhamnolipid, welche durch die UV-A-Licht-vermittelte Freisetzung des IPTGs (**1a**) aus der *photocaged* Verbindung **150** ermöglicht wurde, fand zunächst nur in einem geringen Ausmaß statt. Dies konnte qualitativ mittels Dünnschichtchromatographie bestimmt werden. Die Experimente zur exakten Quantifizierung sind

zum jetzigen Zeitpunkt noch ausstehend. Die Ergebnisse dieses initialen *Proof of Concept* Experiments können in Zukunft durch Optimierung der Kultivierungsbedingungen, sowie eine Verwendung des in *P. putida* besser geeigneten *photocaged* IPTGs (**197f**) aufgewertet werden. Aufgrund der generellen Kombinierbarkeit der *photocaged* Induktoren **150** und **197i** ist ebenfalls eine Übertragung auf weitere komplexe Stoffwechselwege denkbar. Darüber hinaus stehen nun sowohl eine Reihe von *photocaged compounds* zur Verfügung, welche zum Einsatz in bakteriellen Organismen, wie *E. coli*, *P. putida*, *B. subtilis*, und *R. capsulatus* geeignet sind, als auch neue Erkenntnisse, welche in das Design der nächsten Generation von photolabil-geschützten Induktoren einfließen können.

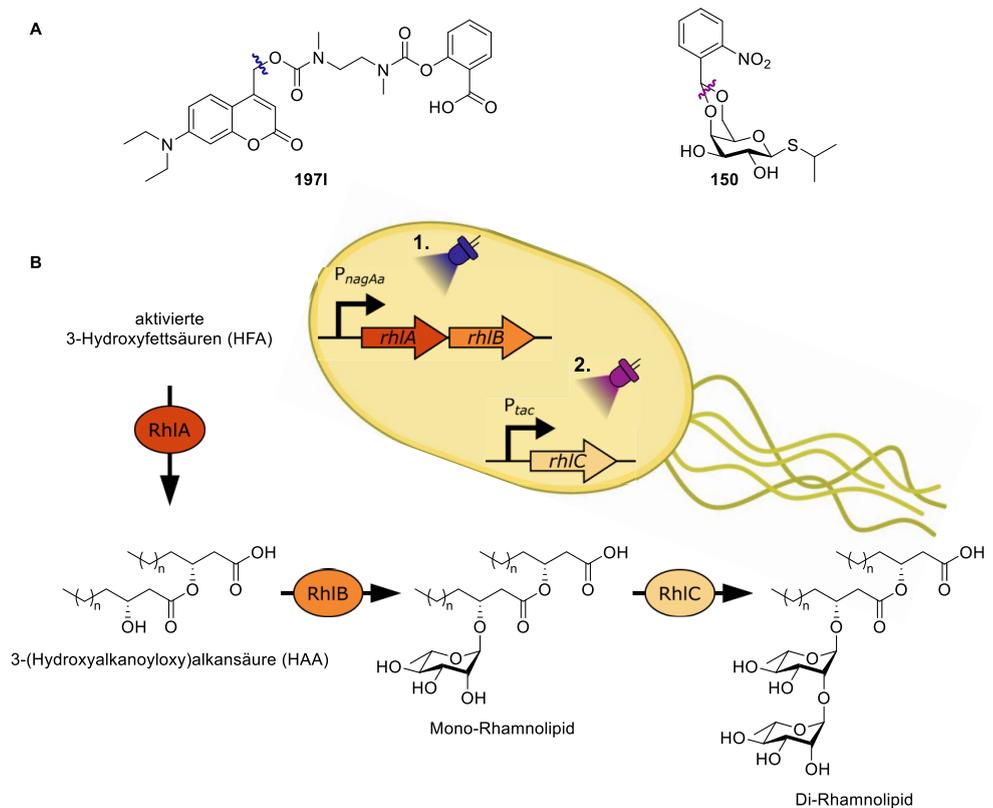


Abbildung 74: A) Strukturformeln der verwendeten *photocaged* Induktoren **150** und **197i**. B) Schematische Darstellung der Produktion von Mono- und Di-Rhamnolipiden durch wellenlängenselektive Genexpression in *P. putida* SK40. Die Herstellung der Mono-Rhamnolipide liegt unter der Kontrolle des NagR/ P_{nagAa} -Regulator-Promotor-Systems, welches durch Salicylsäure (**2a**) induziert werden kann. Die Umwandlung zu den Di-Rhamnolipiden wird durch das mit IPTG (**1a**) induzierbare LacI/ P_{tac} -Regulator-Promotor-System gesteuert. Die Abbildung wurde in Anlehnung an einen gemeinsam mit Fabienne Hilgers erstellten Manuskriptentwurf gestaltet.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe von *photocaged compounds* zur Anwendung in der lichtgesteuerten wellenlängenselektiven Genexpression dargestellt und *in vitro* charakterisiert. Diese *photocaged compounds* bestehen aus einer photolabilen Schutzgruppe und einem Effektormolekül. Zunächst wurden photolabile Schutzgruppen mit unterschiedlichen funktionellen Einheiten hergestellt (Kapitel 4.1), um eine Verknüpfung mit den unterschiedlichen Effektormolekülen (Kohlenhydrate, Benzoessäure-Derivate, Propionsäure) (Kapitel 4.2) zu ermöglichen. Das Hauptaugenmerk bei der Auswahl der photolabilen Schutzgruppen lag dabei auf der bathochromen Verschiebung, aber die Löslichkeit und Stabilität in wässrigen Medien stellten ebenso wichtige Parameter dar. Es wurden sowohl *photocaged* Verbindungen auf Basis von *o*-Nitrobenzyl-Derivaten zur Freisetzung von Effektormolekülen nach Belichtung bei 375 nm als auch *photocaged* Verbindungen zur Freisetzung von Induktoren nach Bestrahlung bei >400 nm hergestellt, welche auf der (Cumarin-4-yl)methyl- oder der Trimethyllock-Schutzgruppe basieren (Kapitel 4.3). Für die wellenlängenselektive nicht-invasive Steuerung von bakteriellen Expressionssystemen wurden sinnvolle Kombinationen der photolabilgeschützten Effektormoleküle evaluiert und ihre Anwendbarkeit demonstriert (Kapitel 4.4).

5.1 Photolabile Schutzgruppen

Bei der Auswahl der photolabilen Schutzgruppen war die Eignung für eine Anwendung in biologischen Systemen essenziell. Daher mussten diese bei Wellenlängen oberhalb von 300 nm schnell photolysierbar sein, um die Belichtungszeit sowie die Absorption durch endogene Chromophore und die damit einhergehende Phototoxizität möglichst gering zu halten.^[36, 37] Die auf Grundlage dessen erfolgreich synthetisierten photolabilen Schutzgruppen **8a**, **19**, **20a**, **20b**, **43c**, **43d**, **53**, **55** und **136** besitzen Absorptionsmaxima im Bereich von 260–488 nm (Abbildung 75) und können zudem bei Wellenlängen oberhalb ihres Absorptionsmaximums effizient angeregt werden. Sowohl das *o*-Nitrobenzyl-Chromophor **8a** mit einem Absorptionsmaximum von lediglich 260 nm als auch die Derivate **19–20b** können bei 375 nm adressiert werden. Bei Bestrahlung oberhalb von 400 nm erfolgt jedoch erst bei langen Belichtungszeiten eine Photolyse. Im Vergleich zu den *o*-Nitrobenzyl-Chromophoren besitzen die synthetisierten (Cumarin-4-yl)methyl-Derivate **43c-d**, **53** und **55** deutlich höhere Extinktionskoeffizienten (ϵ) sowie bathochrom verschobene Absorptionsmaxima und können somit auch oberhalb von 400 nm effektiv angeregt werden. Letzteres gilt ebenso für die Trimethyllock-Schutzgruppe **136**. Somit stellen die *o*-Nitrobenzyl-Derivate und (Cumarin-4-yl)methyl- oder Trimethyllock-Schutzgruppen eine gute Kombination zur wellenlängenselektiven Genexpression dar. Die jeweiligen Chromophore wurden mit verschiedenen funktionellen Einheiten

ausgestattet, um eine Anbringung an Alkohole, Dirole, Phenole, Carbonsäuren und Amine zu ermöglichen.

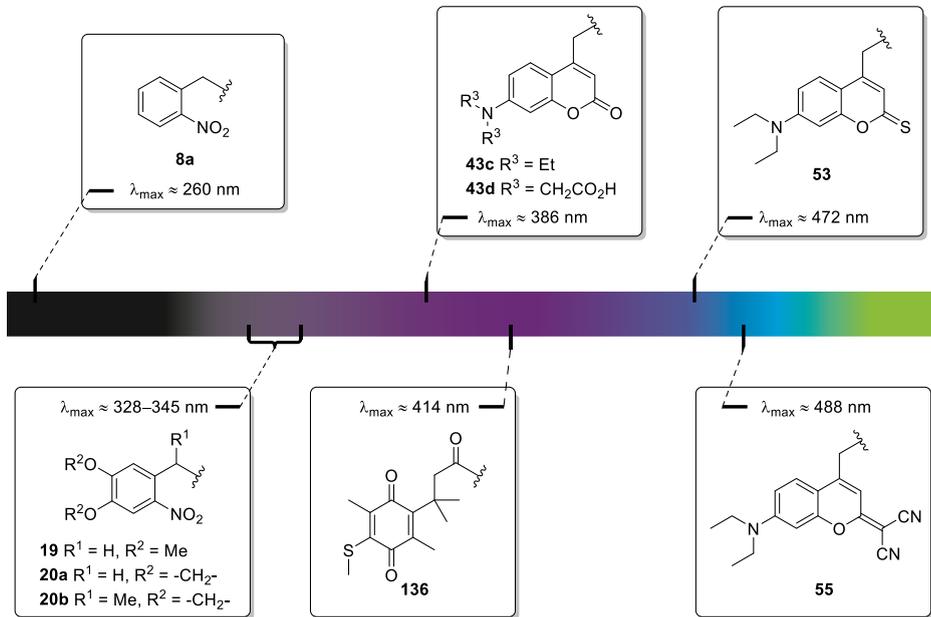


Abbildung 75: Übersicht über die synthetisierten photolabilen Schutzgruppen und den Einfluss der Modifikationen auf ihre Absorptionsmaxima.

Eine zukünftig sinnvolle Ergänzung zu den in dieser Arbeit synthetisierten photolabilen Schutzgruppen stellen die Nitroindolin- und die BODIPY-Chromophore **210** und **211** dar (Abbildung 76). Nitroindoline besitzen Absorptionsmaxima im Bereich von 340–360 nm^[368, 369] und sind somit als Alternative zu den *o*-Nitrobenzyl-Derivaten zu verstehen. Sie sind jedoch besonders gut für die Freisetzung von Carbonsäuren geeignet, da diese nicht in Form von Estern, sondern von Amiden vorliegen und somit sowohl eine hohe Stabilität gegenüber Hydrolyse als auch Esterasen aufweisen. Aber auch Alkohole, Phenole und Amine können in Form von Carbamaten und Kohlensäurediamiden geschützt und erfolgreich freigesetzt werden.^[370] Ebenso existieren auch für die Nitroindoline Modifikationen, welche eine erhöhte Löslichkeit und verbesserte photochemische Eigenschaften bewirken.^[371-373] Die Nitroindolin-Schutzgruppe besitzt somit optimale Eigenschaften für eine zukünftige Anwendung in mikrobiellen Organismen.

BODIPY-Schutzgruppen hingegen besitzen Absorptionsmaxima im Bereich von 512–693 nm und reichen somit bis in den Nahinfrarot-Bereich herein.^[374-376] Sie besitzen zumeist geringe Quantenausbeuten, welche jedoch durch sehr hohe Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 3\text{--}7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

ausgeglichen werden, wodurch photolytische Effizienzen im Bereich der gängigen im UV-Bereich absorbierenden photolabilen Schutzgruppen erreicht werden.^[37] Vielfältige Modifikationsmöglichkeiten erlauben eine genaue Einstellung der spektroskopischen und photophysikalischen Parameter. Die C2- und C6-Positionen können leicht halogeniert werden und die Substitution der C3- und C5-Positionen mit Styryl-Gruppen, welche elektronenschiebende Funktionalitäten besitzen, führt zu einer starken bathochromen Verschiebung. Zusätzlich besteht die Möglichkeit die Fluor-Reste am Bor-Atom durch Methyl-Gruppen zu substituieren, wodurch eine starke Erhöhung der Quantenausbeute erreicht werden kann.^[377] Die *meso*-Methyl-BODIPY-basierten Schutzgruppen können zur Freisetzung diverser funktioneller Gruppen (Amine, Alkohole, Thiole, Carbonsäuren, etc.) eingesetzt werden und die grundsätzliche Anwendbarkeit von BODIPY-Schutzgruppen konnte in verschiedenen biologischen Systemen demonstriert werden.^[37] Aufgrund dieser Eigenschaften stellt die Gruppe der BODIPY-Chromophore einen hervorragenden Kandidaten zur Etablierung einer dritten Wellenlänge dar.

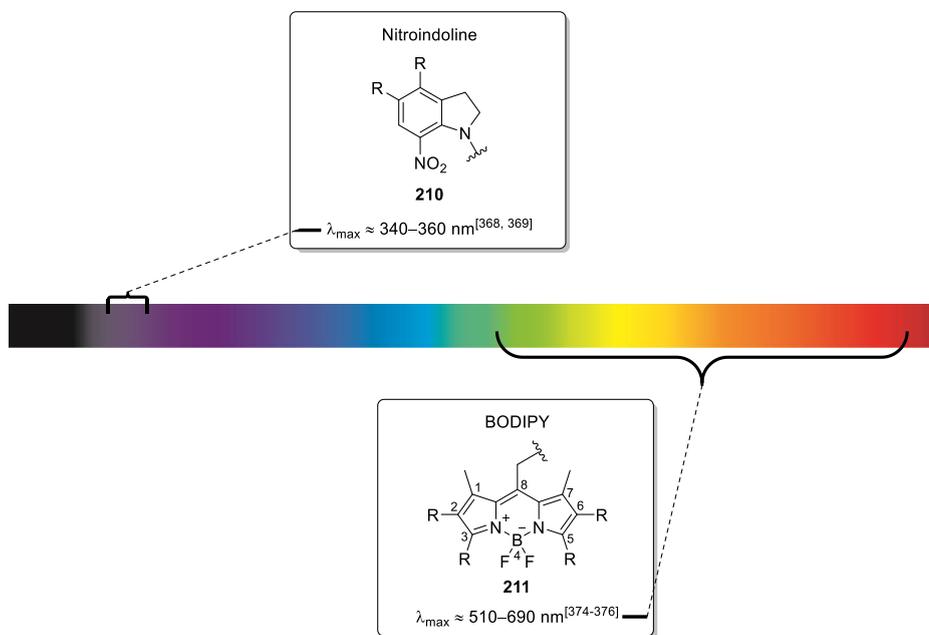


Abbildung 76: Übersicht über potenziell nützliche photolabile Schutzgruppen für eine Anwendung in bakteriellen Organismen.

Als potenzielle Herausforderungen bei der Verwendung der BODIPY-Chromophore sind hierbei zum einen die Löslichkeit und zum anderen die Bildung von Singulett-Sauerstoff zu beachten. In Bezug auf Ersteres ist wichtig, dass eine ausreichende Löslichkeit in wässrigen Medien garantiert wird, da

BODIPYs trotz ihres zwitterionischen Charakters tendenziell hydrophob sind und somit zur Aggregation neigen, was zu einer erheblichen Verschlechterung der spektroskopischen Parameter führen kann.^[378] Darüber hinaus wurden BODIPY-Farbstoffe als Photosensibilisatoren eingesetzt und sind in der Lage Singulett-Sauerstoff zu generieren, wenn langlebige Triplett-Zustände vorliegen. Daher sollten zunächst initiale Tests zur Anwendbarkeit in wässrigen Medien unter Expressionsbedingungen durchgeführt werden, um die Notwendigkeit von löslichkeitsvermittelnden Modifikationen und die Auswirkungen einer potenziellen Bildung des Singulett-Sauerstoffes auf die Zellviabilität zu überprüfen.

5.2 Photocaged Kohlenhydrate

Die auf Basis der zuvor genannten photolabilen Schutzgruppen im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten *photocaged* Kohlenhydrate lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe besteht aus acht Verbindungen, welche zur Freisetzung nach Bestrahlung bei 375 nm konzipiert wurden (Abbildung 77). Dabei handelt es sich um sechs *photocaged* IPTGs und jeweils einer photolabil-geschützten Glukose und L-Arabinose. Die zweite Gruppe beinhaltet neun *photocaged compounds* (sechs *photocaged* IPTG, drei *photocaged* Arabinose), welche eine starke Absorption oberhalb von 400 nm besitzen (Abbildung 78). Die Kohlenhydrate wurden entweder in Form eines 6-Ring-Acetals, Ethers, Esters, Kohlensäureesters oder eines *N,N*-Dimethylethylendiamin-*Spacer* verknüpft. In Kombination mit den Modifikationen an den Chromophoren wurden so photoaktivierbare Werkzeuge erhalten, welche eine Eignung für verschiedene Aufgaben besitzen.

Die 6-Ring-Acetale NB-cIPTG (**150**), NP-cIPTG (**84a**), BEC-cIPTG (**139**) und BC-cIPTG (**137**) konnten in Gesamtausbeuten von 32–44 % über ein bis fünf Synthesestufen dargestellt werden. Dabei setzen sie sich aus verschiedenen Modifikationen des *o*-Nitrobenzyl-Grundgerüsts zusammen. NP-cIPTG (**84a**) besitzt ein bathochrom verschobenes Absorptionsmaximum, BC-cIPTG (**137**) ist zusätzlich hochlöslich und BEC-cIPTG (**139**) besitzt durch Ethylester maskierte Carbonsäuren, welche zunächst eine verbesserte Membranpermeabilität vermitteln und in der Zelle durch Esterasen hydrolysiert werden können. Die freigelegten Carbonsäuren sollten anschließend eine Diffusion aus der Zelle verhindern, wodurch es zu einer Anreicherung kommen kann. In Kooperation mit M. Sc. *Fabienne Hilgers* konnte die Anwendbarkeit der *photocaged* Induktoren **84a**, **137** und **139** zur lichtgesteuerten Genexpression in Gram-negativen (*E. coli*, *P. putida*) und Gram-positiven Bakterien (*B. subtilis*) erfolgreich demonstriert werden. Für eine Anwendung in *R. capsulatus* besaß, vermutlich aufgrund von Organismus-spezifischen Enzymen, lediglich NP-cIPTG (**84a**) eine ausreichende Stabilität. Anhand dieses *photocaged* Induktors konnte der Vorteil der nicht-invasiven Steuerung der Genexpression durch Licht in einem fakultativ anoxygenen phototrophen Organismus sowohl unter

phototrophen als auch nicht-phototrophen Kultivierungsbedingungen demonstriert werden. Hieraus geht jedoch auch hervor, dass nicht jede *photocaged* Verbindung in jedem beliebigen Organismus eingesetzt werden kann und gegebenenfalls Optimierungen bezüglich der Stabilität gegenüber Organismus-spezifischen Enzymen durchgeführt werden müssen. Bei den *photocaged* IPTG-Derivaten **168d** und **168e** führte die Verknüpfung über einen Kohlensäureester zu einer verringerten Stabilität gegenüber Solvolyse und einer langsamen Entschützung nach Belichtung ($t_{0,5} > 30$ min). Daher wurden diese nicht in einer *in vivo* Anwendung getestet. Darüber hinaus wurden für die Induktion von alternativen Promotoren die NP-cArabinose (**84b**) und die BC-cGlukose (**142**) dargestellt.

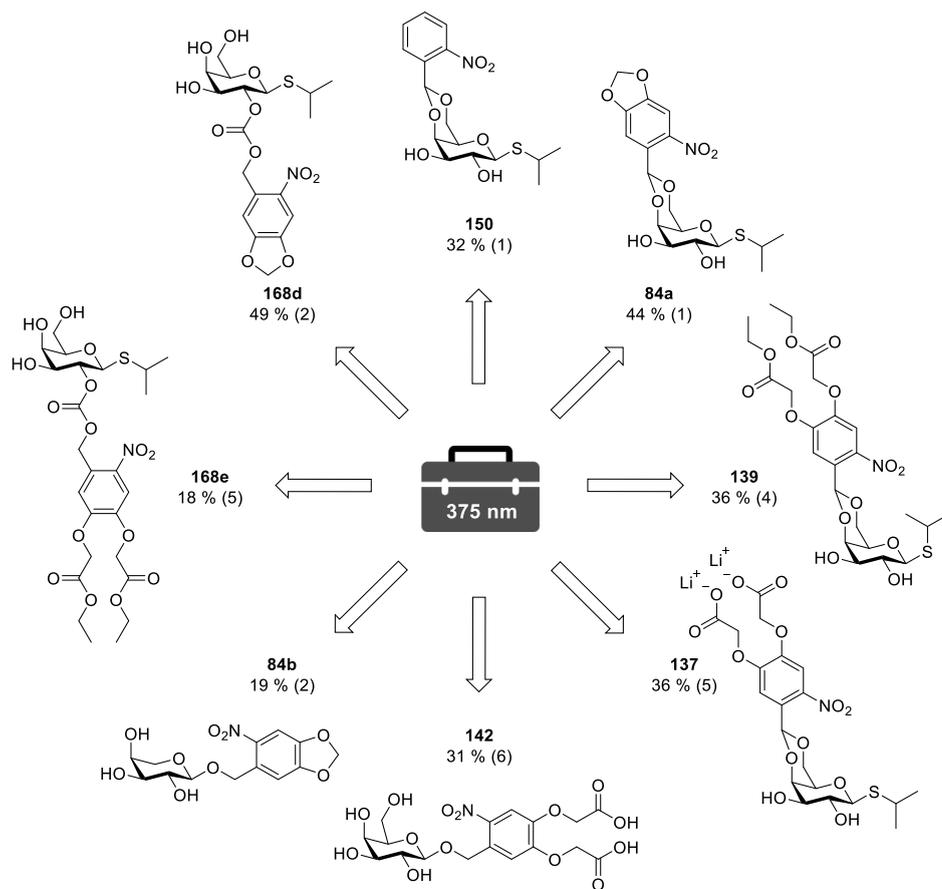


Abbildung 77: Übersicht über alle synthetisierten *photocaged* Kohlenhydrate auf Basis von *o*-Nitrobenzyl-Derivaten. Die maximal erreichten Ausbeuten sind angegeben und in Klammern die Anzahl der Synthesestufen.²²

²² Zur Berechnung der Gesamtausbeuten wurden jeweils die höchsten erreichten Ausbeuten der Einzelschritte herangezogen.

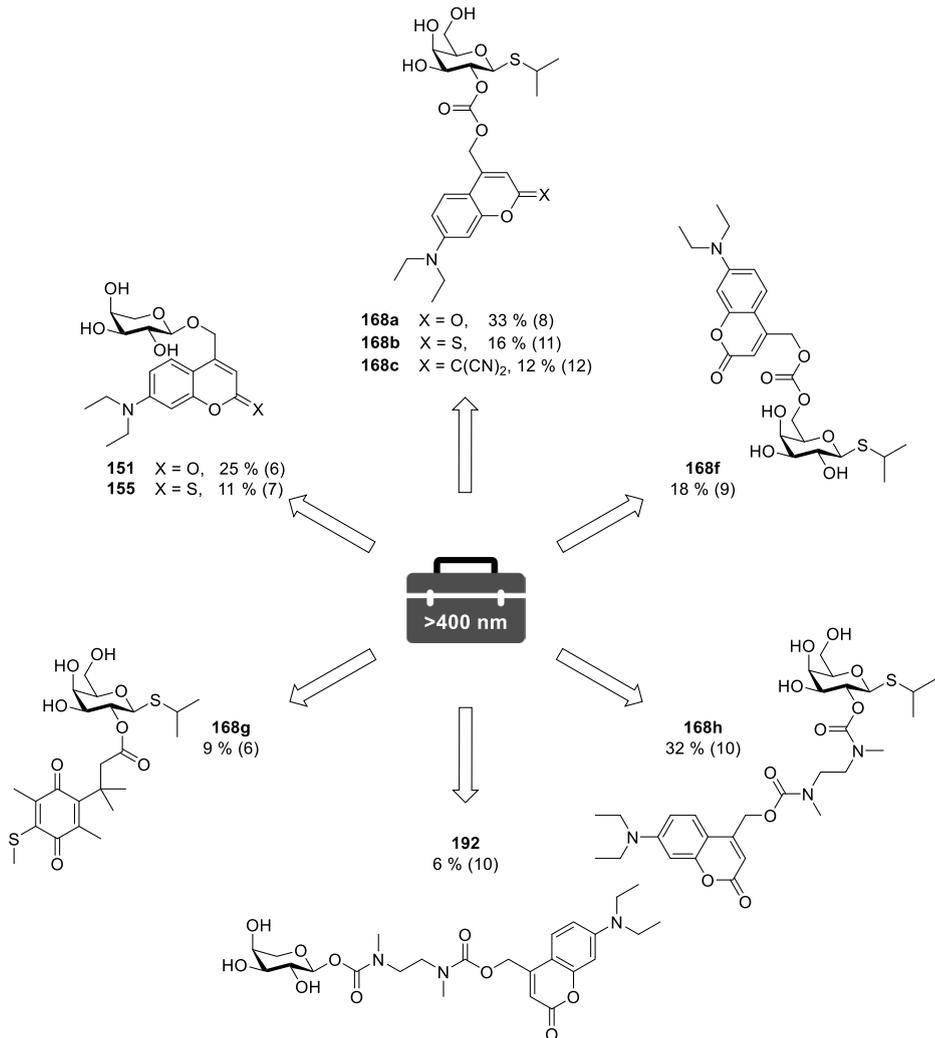


Abbildung 78: Übersicht über alle synthetisierten *photocaged* Kohlenhydrate auf Basis von (Cumarin-4-yl)methyl- und Trimethyllock-Derivaten. Die maximal erreichten Ausbeuten sind angegeben und in Klammern die Anzahl der Synthesestufen.²³

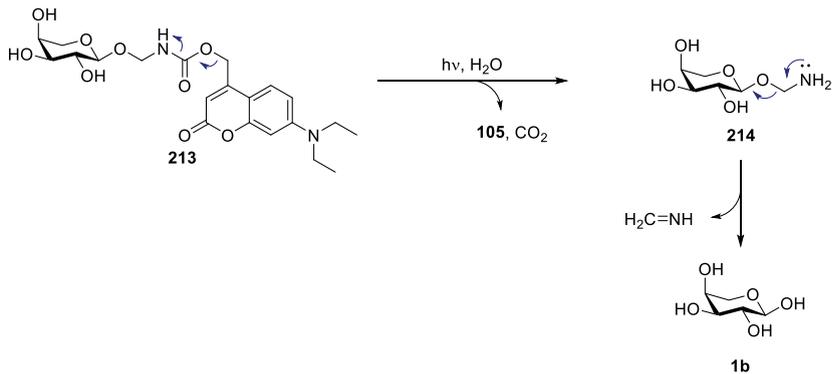
Bei der Darstellung, der für die Anregung oberhalb von 400 nm konzipierten Verbindungen, waren partiell aufwendige Synthesen mit bis zu zwölf Stufen nötig. Hierbei konnten die lichtgesteuerten Werkzeuge in Gesamtausbeuten von 6–33 % erhalten werden und die unterschiedlichen Verknüpfungsarten wurden auf ihre Anwendbarkeit zur Freisetzung von Kohlenhydraten untersucht. Dies erfolgte in einem iterativen Prozess. Das anfänglich synthetisierte Arabinoseglykosid **151** erwies sich als nicht photolysierbar in einem angemessenen Zeitrahmen. Das anschließend erdachte

²³ Zur Berechnung der Gesamtausbeuten wurden jeweils die höchsten erreichten Ausbeuten der Einzelschritte herangezogen.

Thiocumarin-Derivat **155**, welches eine höhere Quantenausbeute besitzen und somit eine beschleunigte Freisetzung ermöglichen sollte, vollzog jedoch anstelle der gewünschten Reaktion eine Photooxidation. Die im Anschluss daran synthetisierten Kohlensäureester **168a–c,f** zeigten eine schnelle und vollständige Photolyse. Durch die Cumarin-Derivate **168a** und **168f** sollte untersucht werden, ob die Wahl der Hydroxy-Gruppe, über welche die Verknüpfung mit der photolabilen Schutzgruppe erfolgt, einen signifikanten Einfluss auf die Stabilität besitzt. Dieser erwies sich im biologischen System als minimal. Die Modifikationen hin zu dem Thiocumarin-Derivat **168b** sowie dem Dicyanocumarin-Derivat **168c** bewirkten eine starke Rotverschiebung. Das Thiocumarin-Derivat **168b** wies jedoch eine signifikante Instabilität auf und konnte somit nicht verwendet werden.

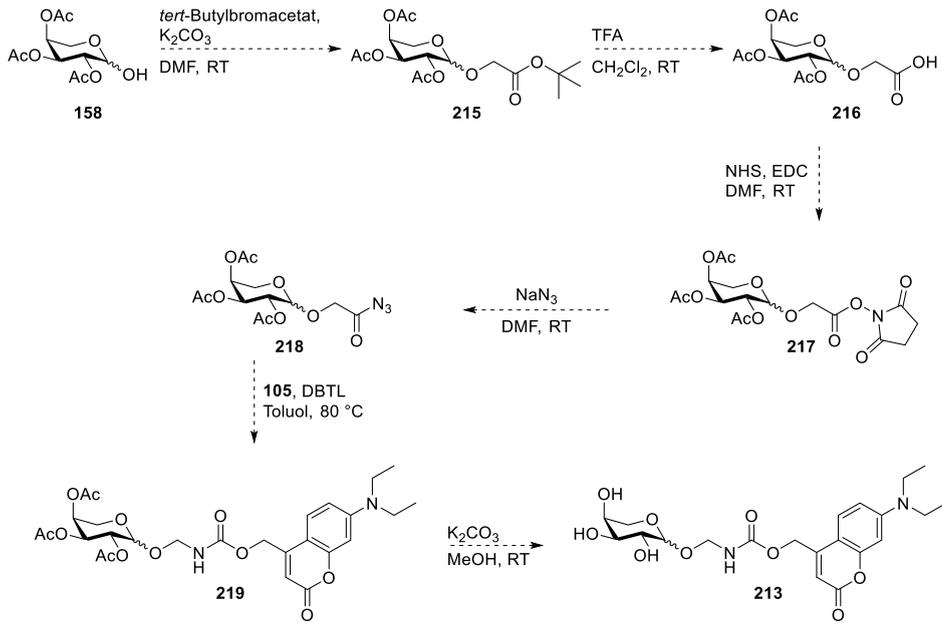
Die Anwendbarkeit der photolabil-geschützten Kohlensäureester **168a**, **168c** und **168f** konnte in Kooperation mit M. Sc. *Fabienne Hilgers* in *E. coli* demonstriert werden. Diese wiesen jedoch keine vollständige Stabilität unter Zellkultivierungsbedingungen auf, sodass es bei *in vivo* Experimenten zu einer Erhöhung der Expressionslevel der Dunkelkontrollen kam. Bei niedrigen Konzentrationen (50 μM) konnte dieser Effekt jedoch auf ein Minimum reduziert werden. Eine höhere Stabilität gegenüber Solvolyse konnte mit dem Trimethyllock-geschützten IPTG **168g** nicht erreicht werden. Dieses war nicht für eine Anwendung in einem biologischen System geeignet, da es auch ohne Belichtung zu einer signifikanten Freisetzung des Induktors kam. Die Verwendung eines *N,N*-Dimethylethylendiamin-*Spacer* lieferte die gegen Hydrolyse besonders stabilen Carbamate **168h** und **192**. Beim Carbamat **168h** kam es nach der Photolyse jedoch nicht zur intramolekularen 5-*exo*-trig-Zyklisierung, weshalb das IPTG (**1a**) nicht freigesetzt werden konnte. Dies ist auf die zu geringe Acidität der Fluchtgruppe zurückzuführen. Daher wurde das Arabinose-Derivat **192** konzipiert. Für dieses konnte eine erfolgreiche Freisetzung der L-Arabinose (**1b**) erreicht werden. Der Zyklisierungs-Eliminierungs-Mechanismus des *Spacer* lief zwar langsam ab, dennoch konnte im Stamm *E. coli* Tuner(DE3), welcher das GFP Reportergen besitzt, eine Fluoreszenz-Intensität von 50 % bezogen auf Kulturen, welche äquimolar mit L-Arabinose (**1b**) induziert wurden, erreicht werden.

Um zukünftig eine bessere Anwendbarkeit gewährleisten zu können, würde sich daher eine Modifikation des *Spacer* anbieten. Um die Geschwindigkeit der Zyklisierung zu erhöhen, könnte der *N,N*-Dimethylethylendiamin-*Spacer* durch einen 2-(Methylamino)ethanthiol-*Spacer* ersetzt werden (Abbildung 79). Hierdurch würde nach der Photolyse der Verbindung **212** anstatt eines Amins ein deutlich nukleophileres Thiol freigesetzt werden.^[379] Eine weitere vielversprechende Alternative stellt ein Hydroxymethylcarbamate-*Spacer* dar. Mit diesem sollte sich eine effiziente Freisetzung von Cumarin-geschützten Kohlenhydraten verwirklichen lassen. Der postulierte Mechanismus ist anhand der photolabil-geschützten Arabinose **213** dargestellt (Schema 60). Nach der initialen Photoheterolyse erfolgt die Decarboxylierung zum instabilen Halbamin **214**, welches nach Eliminierung von Methanimin das Kohlenhydrat **1b** freisetzt.^[380, 381]



Schema 60: Postulierter Freisetzungsmechanismus in Anlehnung an *Karton-Lifshin et al.*^[380, 381]

Den zentralen Aspekt stellt die Synthese des Kohlenhydrat-Bausteins dar (Schema 61). Dabei kann ausgehend vom in dieser Arbeit bereits synthetisierten Arabinose-Derivat **158** in Anlehnung an eine Vorschrift von *Cheab et al.* eine Alkylierung am anomeren Zentrum mit *tert*-Butylbromacetat durchgeführt werden.^[382] Dabei sollte das Produkt **215** als α/β -Anomerengemisch erhalten werden. Vor einer weiteren Umsetzung sollte an dieser Stelle eine Auftrennung der Anomere erfolgen. Eine anschließende selektive Entschützung des Esters **215** sollte die Säure **216** liefern, welche mit *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) zum NHS-Ester **217** umgesetzt werden kann.^[380, 381] Aus diesem wird nach Reaktion mit Natriumazid der Zielbaustein **218** erhalten. In der nachfolgenden *Curtius*-Umlagerung können beliebige Alkohole eingesetzt werden. Bei der dargestellten Umsetzung reagiert das hierbei *in situ* gebildete Isocyanat mit dem Cumarinalkohol **105** und das gewünschte Halbaminale-Carbamat **219** wird gebildet. Die anschließende Entschützung mit katalytischen Mengen Kaliumcarbonat in Methanol sollte das gewünschte Produkt **213** liefern.



Schema 61: Potenzieller Syntheseweg hin zur *photocaged* L-Arabinose **213**.

Anstatt des Cumarinalkohols **105** kann ebenso ein BODIPY-Chromophor eingesetzt werden, um die Verbindung **220** darzustellen. Daher sollte sich dieser *Spacer* ebenso zur Verknüpfung von Kohlenhydraten mit BODIPY-Chromophoren eignen. Auch bei anderen Kohlenhydraten sollte dieser *Spacer* erfolgreich eingesetzt werden können, selbst wenn diese über keine freie Hydroxy-Gruppe am anomeren Zentrum verfügen. Die genannten Zielmoleküle sind in Abbildung 79 dargestellt.

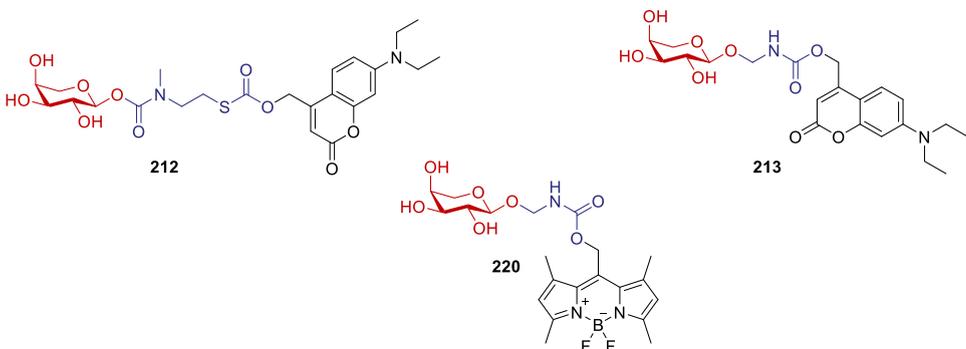


Abbildung 79: Potenzielle Zielmoleküle bei denen ein *Spacer* (blau) die effiziente Freisetzung von L-Arabinose (**1b**) (rot) oberhalb von 400 nm ermöglicht.

5.3 Photocaged Propionsäuren

In dieser Arbeit wurden fünf *photocaged* Propionsäuren erfolgreich synthetisiert und charakterisiert (Abbildung 80). Das Ziel war es, die photolabil-geschützten Propionsäuren zur Regulation des P_{prpB} -Promotors in *E. coli* einzusetzen. Da es bei den von M. Sc. Fabienne Hilgers durchgeführten Versuchen jedoch bereits ohne Zugabe eines exogenen Induktors zu einer hohen Basalexpression kam, konnte die geplante Untersuchung der Anwendbarkeit der synthetisierten *photocaged* Propionsäuren **196a–e** nicht durchgeführt werden und keine Erkenntnis über die Vorteile eines hohen sterischen Anspruchs in der α -Position erlangt werden. Für eine wellenlängenselektive Genexpression konnte somit nicht auf den P_{prpB} Promotor zurückgegriffen werden.

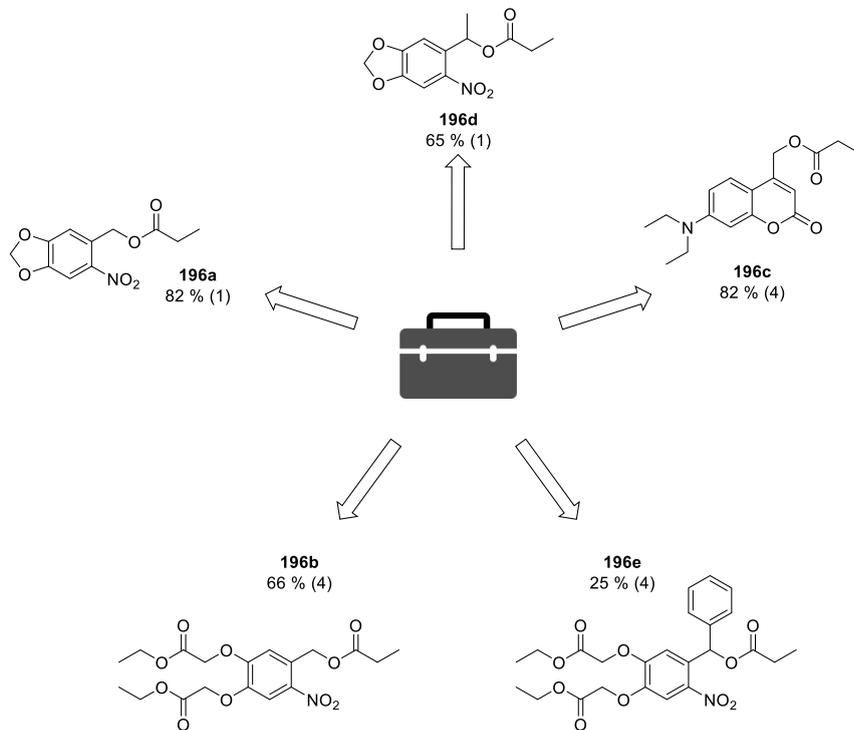
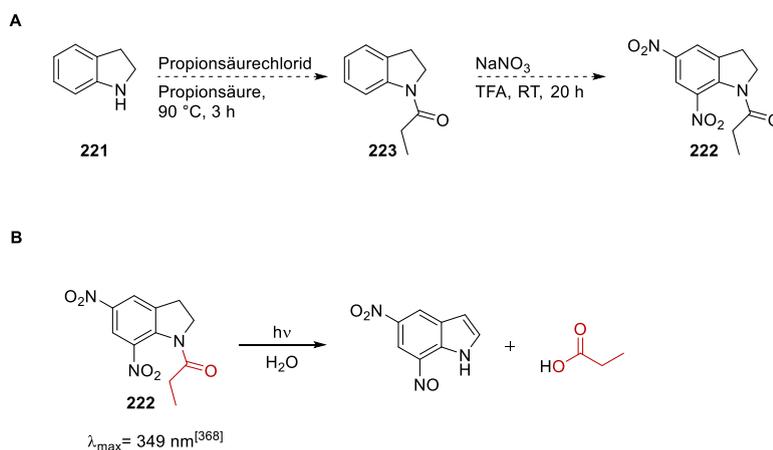


Abbildung 80: Übersicht über alle synthetisierten *photocaged* Propionsäuren. Die maximal erreichten Ausbeuten sind angegeben und in Klammern die Anzahl der Synthesestufen.²⁴

²⁴ Zur Berechnung der Gesamtausbeuten wurden jeweils die höchsten erreichten Ausbeuten der Einzelschritte herangezogen.

Für den Fall, dass der erhöhte sterische Anspruch in α -Position keine signifikante Stabilitätserhöhung bewirkt, würde zukünftig die Verwendung der zuvor genannten Nitroindolin-Schutzgruppe **210** eine sinnhafte Alternative darstellen. Diese ermöglicht in wässrigen Medien die effiziente Freisetzung von Carbonsäuren über eine photoinduzierte Acyl-Migration.^[383, 384] Vorteilhaft ist hierbei, dass die Carbonsäure in Form eines Amids geschützt und somit besonders resistent gegenüber Solvolyse und Esterasen ist. Zusätzlich sind einfache Vertreter der Nitroindoline über eine kurze Syntheseroute darstellbar. So kann beispielsweise ausgehend vom kommerziell erhältlichen Indolin (**221**) in Anlehnung an eine Vorschrift von *Helgen et al.* in zwei Stufen das 1-Propionyl-5,7-dinitroindolin (**222**) erhalten werden. Dabei fungiert das Effektmolekül selbst als Schutzgruppe während der Nitrierung der Zwischenstufe **223**. Das Absorptionsmaximum sollte bei ~ 349 nm^[368] liegen und somit hervorragend geeignet zur Photolyse bei 375 nm. Es sind ebenfalls Nitroindolin-Derivate mit erhöhter Löslichkeit und verbesserten photochemischen Eigenschaften bekannt.^[371-373] Diese benötigen jedoch einen höheren synthetischen Aufwand und sollten lediglich im Falle von Limitationen durch zu geringe Löslichkeit oder zu geringe Quantenausbeute angestrebt werden.



Schema 62: Nitroindolin-geschützte Propionsäure; **A)** Syntheseweg hin zu 1-Propionyl-5,7-dinitroindolin (**222**). **B)** Potenzielle Photolyse-Produkte nach Bestrahlung des 1-Propionyl-5,7-dinitroindolin (**222**) in wässrigen Medien.

5.4 Photocaged Benzoessäure-Derivate

Es konnten acht *photocaged* Benzoessäure-Derivate in Ausbeuten von 10–66 % über ein bis zehn Synthesestufen synthetisiert (Abbildung 81) und anschließend charakterisiert werden. Die Verbindungen **197a–h** und **197f–h** basieren auf der 6-Nitropiperonyl-Schutzgruppe und wurden für die Freisetzung von Induktoren [*m*-Toluylsäure (**2c**), Anthranilsäure (**2b**) und Salicylsäure (**2a**)] bei 375 nm konzipiert.

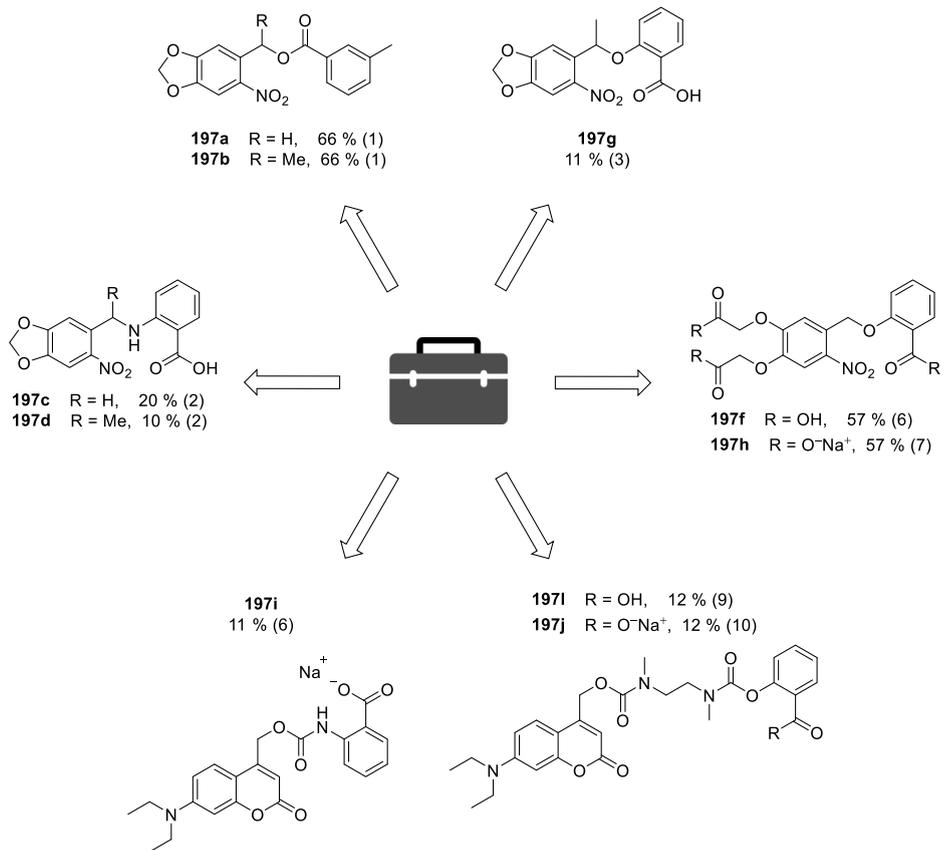


Abbildung 81: Übersicht über alle synthetisierten *photocaged* Benzoessäure-Derivate. Die maximal erreichten Ausbeuten sind angegeben und in Klammern die Anzahl der Synthesestufen.²⁵

²⁵ Zur Berechnung der Gesamtausbeuten wurden jeweils die höchsten erreichten Ausbeuten der Einzelschritte herangezogen.

Die Verbindungen **197a–d** und **197g** zeigten jedoch eine zu geringe Löslichkeit (<0.1 mM) für eine effiziente *in vivo* Anwendung. Die BC-Salicylsäure **197f** hingegen zeigte eine um Größenordnungen höhere Löslichkeit (3.2 mM), welche durch die Überführung in das entsprechende Natriumsalz **197h** noch weiter erhöht werden konnte. Darüber hinaus wurden die zwei Coumarin-geschützten Varianten **197i** und **197l** synthetisiert, welche sowohl bei Wellenlängen oberhalb von 400 nm adressiert werden können als auch über eine ausreichend hohe Löslichkeit in wässrigen Medien verfügen. Diese sollten ursprünglich für die Steuerung des XylS/P_m-Regulator/Promotor-Systems in *E. coli* eingesetzt werden. Dieses wies jedoch eine starke Autoinduktion auf, weshalb auf das alternative NagR/P_{nagAa}-Regulator/Promotor-System zurückgegriffen wurde. Dieses kann jedoch ausschließlich durch Salicylsäure (**2a**) induziert werden. Somit konnten lediglich die beiden löslichen photolabil-geschützten Salicylsäure-Derivate **197f** und **197l** *in vivo* getestet werden. Beide zeigten eine gute Anwendbarkeit in *E. coli*, eine Übertragung auf *P. putida* scheiterte jedoch für BC-cSalicylsäure (**197f**), da bei dieser auch in den unbelichteten Kulturen hohe Expressionslevel beobachtet werden konnten. DC-cSalicylsäure (**197l**) hingegen konnte auch in *P. putida* erfolgreich eingesetzt werden. Für eine Verwendung in einem orthogonalen Anregungssystem besitzt die Verbindung **197l** einen zu hohen Extinktionskoeffizienten bei kurzwelligeren Bestrahlungswellenlängen (~375 nm), jedoch ist eine sequenzielle, wellenlängenselektive Anregung möglich.

Für eine zukünftige Generation von *photocaged compounds* bietet sich die Verwendung von 3-Cyanocumarinen als photolabile Schutzgruppe an. Die zusätzliche Substitution der 3-Position des Coumarins sollte für eine deutliche bathochrome Verschiebung der Absorptionsbande bei gleichzeitiger Reduktion der Absorption im Bereich von 340–360 nm sorgen (Abbildung 82). Dies wurde bereits von *Olson et al.* demonstriert.^[176] Somit sollte die 3-Cyano-Verbindung **224** eine bessere Eignung für eine orthogonale Anwendung besitzen. Darüber hinaus stellt auch in diesem Fall die Nutzung von BODIPY-Farbstoffen eine interessante Alternative dar. Eine direkte Verknüpfung als Ether sollte über eine kurze Syntheseroute erreicht werden können und die Verbindung **225** liefern, welche eine schnelle Freisetzung bei Wellenlängen oberhalb von 500 nm aufweisen sollte.

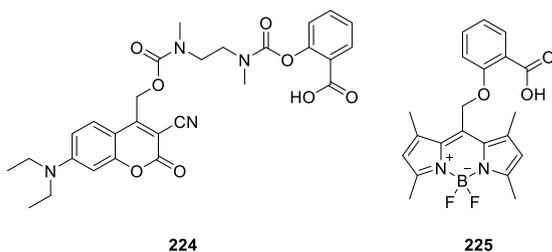


Abbildung 82: Potenzielle Zielmoleküle für die effiziente Freisetzung von Salicylsäure (**2a**) oberhalb von 400 nm.

5.5 Werkzeugkasten für wellenlängenselektive Genexpression

Insgesamt wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Grundstock von 18 *photocaged compounds*, welche für eine Anregung bei 375 nm konzipiert wurden, sowie zwölf *photocaged compounds* für die Anregung oberhalb von 400 nm synthetisiert. Eine Auflistung aller erfolgreich *in vivo* getesteten *photocaged* Effektormoleküle und die entsprechenden Expressionswirte sind in Tabelle 19 zu finden.

Tabelle 19: Übersicht über die erfolgreich *in vivo* getesteten *photocaged* Effektormoleküle sowie die verwendeten Expressionswirte und Regulator-Promotor-Systeme.

Effektormolekül	<i>Photocaged compound</i>	Expressionswirt [Regulator-Promotor-System]	Funktion
IPTG (1a)	150	<i>P. putida</i> KT2440 [LacI/P _{tac}]	Aktivierung
		<i>E. coli</i> Tuner(DE3) [LacI/P _{T7}]	
IPTG (1a)	84a, 139, 137	<i>P. putida</i> KT2440 [LacI/P _{tac}]	Aktivierung
		<i>B. subtilis</i> DB430 [LacI/P _{grac}]	
IPTG (1a)	84a	<i>R. capsulatus</i> SB1003 [LacI/P _{tac}]	Aktivierung
IPTG (1a)	168a, 168f, 168c	<i>E. coli</i> Tuner(DE3) [LacI/P _{T7}]	Aktivierung
L-Arabinose (1b)	192	<i>E. coli</i> LMG194 [AraC/P _{BAD}]	Aktivierung
Salicylsäure (2a)	197f, 197h	<i>E. coli</i> Tuner(DE3) [NagR/P _{nagAa}]	Aktivierung
Salicylsäure (2a)	197i, 197j	<i>E. coli</i> Tuner(DE3) [NagR/P _{nagAa}]	Aktivierung
		<i>P. putida</i> KT2440 [NagR/P _{nagAa}]	

Aus den synthetisierten Verbindungen wurden drei Kombinationen identifiziert, welche für eine wellenlängenselektive Genexpression geeignet sind (Abbildung 83). Als am vielversprechendsten erwies sich die Kombination aus NB-cIPTG (150) und DC-cSalicylsäure (197i), da diese den höchsten Quotienten (146) aus dem Vergleich der photolytischen Effizienzen bei 430 nm aufweisen, wodurch die beste Selektivität zu erwarten ist. Durch die Kombination dieser *photocaged* Verbindungen zur wellenlängenselektiven Genexpression in *P. putida* konnte nicht nur die Expression der Reporterproteine GFP und mCherry, sondern auch die Kontrolle über einen komplexen Biosyntheseweg demonstriert werden. Hierbei konnte die Herstellung von Mono- und Di-Rhamnolipiden gesteuert werden.

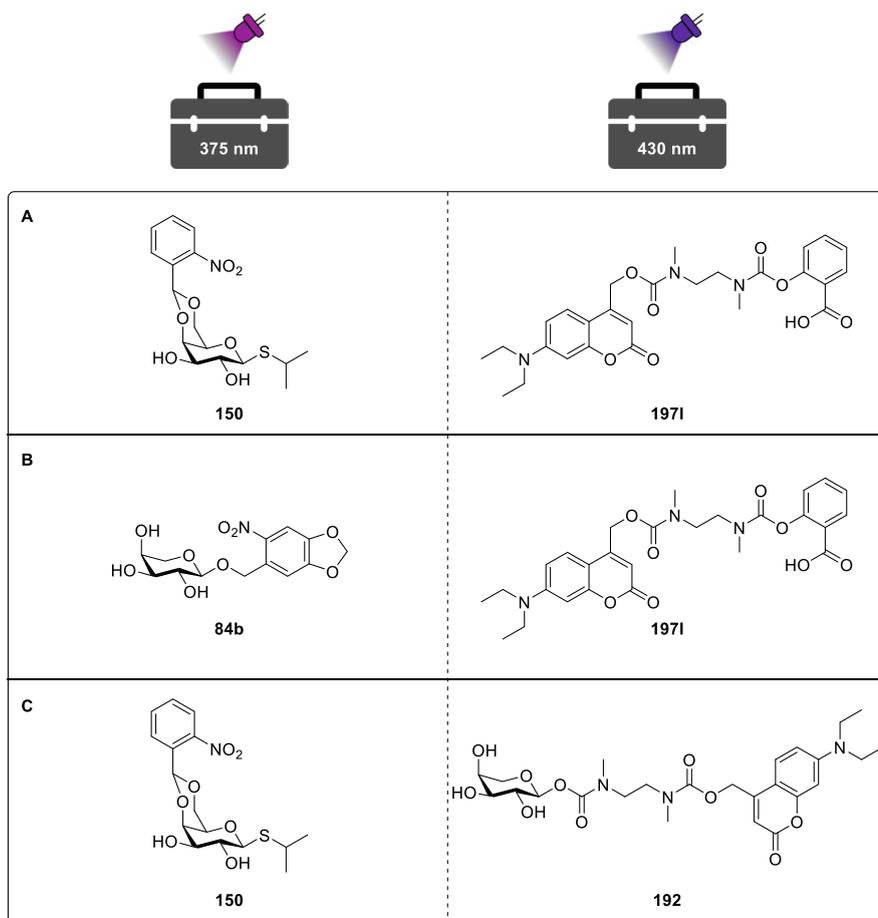
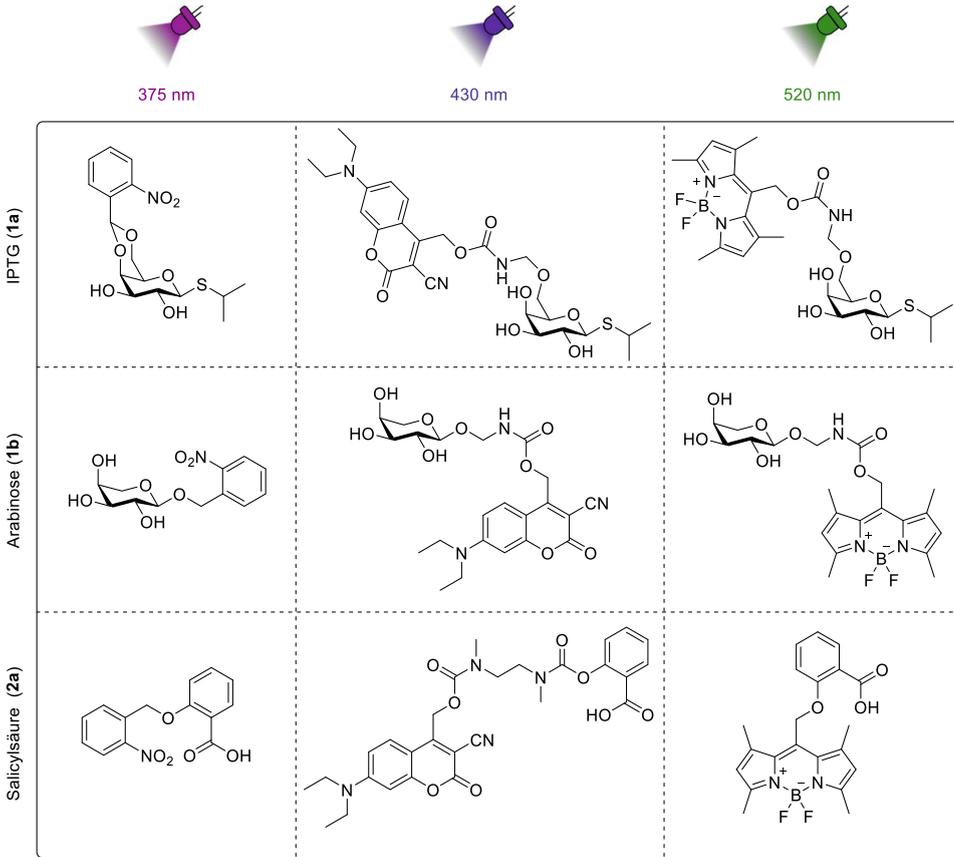


Abbildung 83: Übersicht über die nutzbaren Kombinationen der synthetisierten *photocaged* Induktoren für eine wellenlängenselektive Genexpression, bestehend aus NB-cIPTG (**150**) und DC-cSalicylsäure (**1971**) (A), NP-cArabinose (**84b**) und DC-cSalicylsäure (**1971**) (B) sowie NB-cIPTG (**150**) und DC-cArabinose (**192**) (C).

Für zukünftige Anwendungen erscheint ebenfalls die Kombination aus NP-cArabinose (**84b**) und DC-cSalicylsäure (**1971**) mit einem Quotienten von 49 bei 430 nm, sowie NB-cIPTG (**150**) in Verbindung mit DC-cArabinose (**192**) mit einem Quotienten von 23 bei 430 nm als vielversprechend. Bei vollständiger Photolyse der (Cumarin-4-yl)methyl-geschützten Verbindungen durch Belichtung bei 430 nm sollten lediglich 2 % bzw. 5 % der mit einem *o*-Nitrobenzyl-Derivat versehenen Verbindung freigesetzt werden. Auch hier sollte somit bevorzugt die Cumarin-geschützte Verbindung adressiert werden können. Je nach biologischem System lässt sich die Selektivität durch geschickt gewählte Konzentrationsunterschiede der *photocaged* Induktoren verstärken, sodass auch Kombinationen genutzt werden können, welche einen anderweitig zu niedrigen Quotienten aufweisen würden.

Eine höhere Flexibilität in der Regulierung komplexer Prozesse könnte entweder durch die Möglichkeit einer orthogonalen Anregung oder durch die Verfügbarkeit von *photocaged* Induktoren erreicht werden, welche bei einer dritten Wellenlänge adressiert werden können. Ein zukünftiges System könnte wie in Abbildung 84 dargestellt aussehen und ließe sich mit den in dieser Arbeit etablierten sowie den im Ausblick vorgestellten Verbindungen umsetzen. Als Bestrahlungswellenlängen wurden 375 nm, 430 nm und 520 nm ausgewählt. Bei den photolabilen Schutzgruppen bietet sich die Verwendung eines *o*-Nitrobenzyl- (für 375 nm), eines 3-Cyano-(cumarin-4-yl)methyl- (für 430 nm), sowie eines BODIPY-Chromophors (für 520 nm) an. Bei den Effektormolekülen könnte zunächst auf die bisher etablierten Effektormoleküle, wie IPTG (**1a**), L-Arabinose (**1b**) und Salicylsäure (**2a**) zurückgegriffen werden. Grundsätzlich wären zukünftig jedoch auch andere Induktoren denkbar. Auf Grundlage der bisher erschienen Publikationen^[175, 176, 232] scheint die Kombination von 3-Cyanocumarin-Chromophor und BODIPY-Chromophor für eine orthogonale Anregung sehr vielversprechend. Eine vollständige Orthogonalität zu Vertretern der *o*-Nitrobenzyl-Chromophore ist, bedingt durch die signifikant höheren Extinktionskoeffizienten von Cumarin- und BODIPY-Chromophoren, eher unwahrscheinlich. Dennoch sollte eine wellenlängenselektive Entschützung, angefangen bei der längsten Wellenlänge, möglich sein. Das postulierte System sollte somit eine orthogonale Zwei-Wellenlängen-Anregung (520 nm und 430 nm) bzw. eine wellenlängenselektive Drei-Wellenlängen-Anregung (520 nm, 430 nm und 375 nm) ermöglichen. Darüber hinaus sollten die Verbindungen noch für weitere wellenlängenselektive Zwei-Wellenlängen-Systeme (520 nm und 375 nm; 430 nm und 375 nm) verwendet werden können. Da durch jede zusätzliche Wellenlänge die Komplexität des Systems ansteigt, sind eine Reihe von Faktoren zu beachten, wie dem intermolekularen Energietransfer, den verwendeten LED-Lichtquellen und der im biologischen System verwendeten Konzentrationen. Bei den LED-Lichtquellen ist auf ein besonders enges Emissionsspektrum zu achten, welches notfalls durch einen zusätzlichen Bandbreitenfilter erreicht werden kann. Die Anpassung der verwendeten Konzentrationen kann zu einer verbesserten Selektivität beitragen und sollte daher bei der Konzeptionierung des biologischen Systems bedacht werden. Besonders bei hohen Konzentrationen sollte auf das Auftreten von intermolekularem Energietransfer geachtet werden. An den vorgestellten Verbindungen können, wenn nötig, Modifikationen zur Verbesserung der spektroskopischen Eigenschaften oder zur Erhöhung der Löslichkeit durchgeführt werden. So sollten sich beispielsweise anstelle der *o*-Nitrobenzyl-Schutzgruppe ebenso die NP-, BEC-, oder BC-Schutzgruppe verwenden lassen.



Mögliche Belichtungsreihenfolgen:

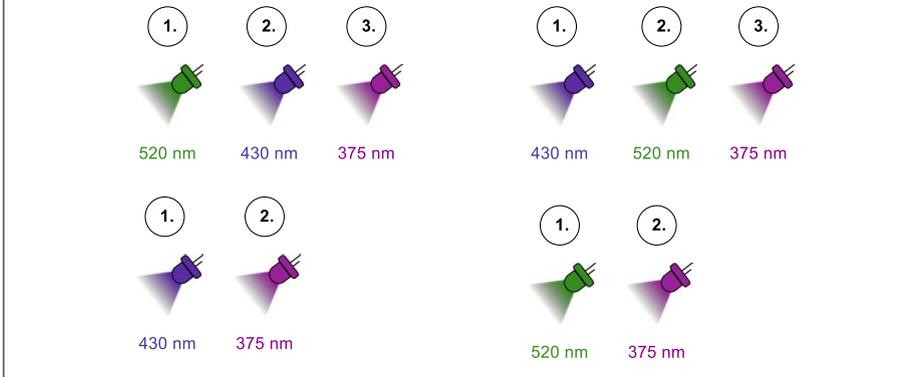


Abbildung 84: Übersicht über ein potenzielles Drei-Wellenlängen Anregungssystem (375 nm, 430 nm, 520 nm) unter Verwendung verschiedener Induktoren [IPTG (**1a**), L-Arabinose (**1b**), Salicylsäure (**2a**)] und die daraus resultierenden Belichtungsreihenfolgen.

Ebenso kann zukünftig aufbauend auf die Arbeiten^[266-268] von Dr. Peter Kusen eine orthogonale Genexpression in *S. cerevisiae* erreicht werden. Dazu ließe sich das bereits etablierte *photocaged* Kupferion **226** zur Aktivierung des P_{CUP1} -Promotors, mit dem neu entwickelten *photocaged* Methionin **227** kombinieren (Abbildung 85A), welches in der Lage ist, den P_{MET17} -Promotor temporär zu reprimieren.

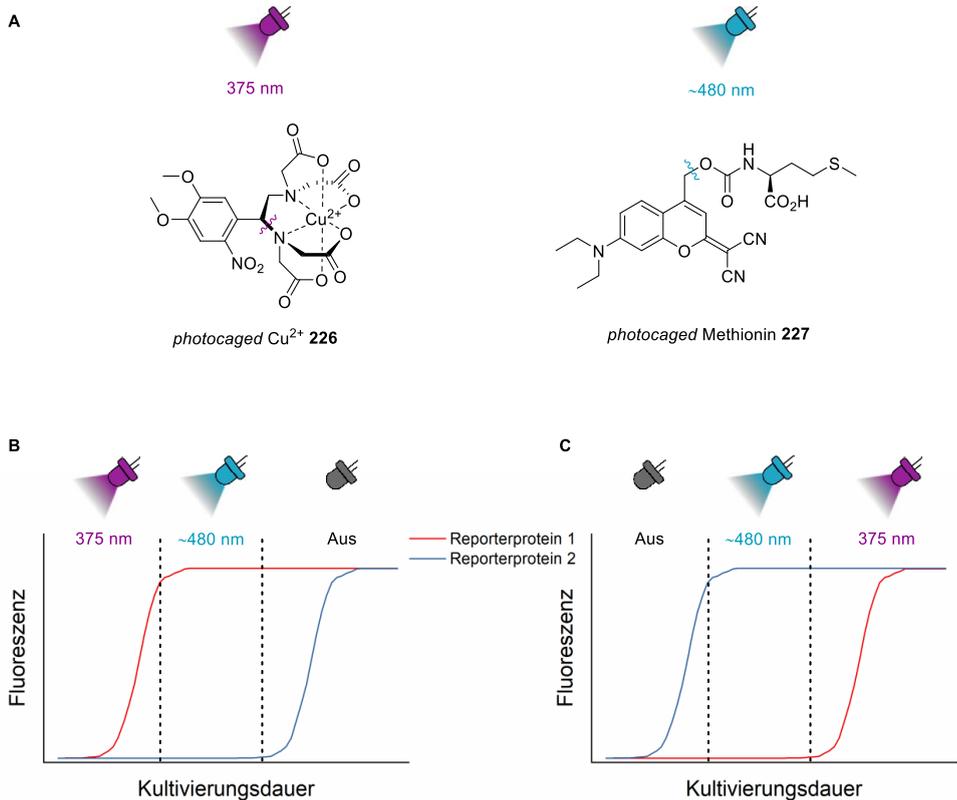


Abbildung 85: A) Abbildung der *photocaged* Induktoren **226** und **227** für eine wellenlängenselektive Genexpression in *S. cerevisiae*. B) Schematische Darstellung der Belichtungsreihenfolge (1. 375 nm, 2. 480 nm, 3. keine Belichtung) und der daraus resultierenden Expression von zwei Reporterproteinen. C) Schematische Darstellung der alternativen Belichtungsreihenfolge (1. keine Belichtung, 2. 480 nm, 3. 375 nm) und der daraus resultierenden Expression von zwei Reporterproteinen.

Hierbei sollte durch zwei definierte Belichtungsreihenfolgen eine orthogonale Steuerung der Genexpression von beispielsweise zwei Reporterproteinen erreicht werden können. Die Belichtung bei 375 nm sollte beide *photocaged* Effektormoleküle aufgrund vergleichbarer Extinktionskoeffizienten photolysieren können. Dadurch würde der P_{CUP1} -Promotor aktiviert werden, was zur Expression des ersten Reporterproteins führt, während der P_{MET17} -Promotor reprimiert wird (Abbildung 85B). Durch Belichtung bei ~480 nm kann selektiv die weitere Freisetzung von Methionin gesteuert werden und der Abstand zur Aktivierung des zweiten Promotors beliebig verlängert werden. Durch das vollständige Ausbleiben der Belichtung kann nach vollständigem Abbau des freigesetzten Repressors Methionin der P_{MET17} -Promotor aktiviert werden und die Expression des zweiten Reporterproteins erfolgen. Durch Änderung der Belichtungsreihenfolge lässt sich die Reihenfolge der Expression umkehren (Abbildung 85C). Dadurch sollte die Kombination der *photocaged* Effektormoleküle **226** und **227** ein graduell regulierbares Zwei-Wellenlängen-Expressionssystem in *S. cerevisiae* ermöglichen können.

6 Experimenteller Teil

6.1 Material und Methoden

Software

Tabelle 20: Verwendete Software.

Name	Verwendung	Hersteller
ChemDraw Professional 16.0	Zeichnen von Strukturformeln	<i>PerkinElmer Informatics</i>
Chrompass	Auswertung von HPLC-Chromatogrammen	<i>Jasco Corporation</i>
ensochemLab 7.0.5	Elektronisches Laborjournal	<i>enso Software GmbH</i>
Inkscape 0.92	Konstruktion von Vektorgrafiken	<i>Open Source Software</i>
MestReNova v14.1.2	Auswertung von NMR-Spektren	<i>Mestrelab Research S.L.</i>
Microsoft Excel 2016	Erstellung und Bearbeitung von Datensätzen	<i>Microsoft Corporation</i>
Microsoft PowerPoint 2016	Erstellung von Präsentationen	<i>Microsoft Corporation</i>
Microsoft Word 2016	Erstellung und Bearbeitung von Textdateien	<i>Microsoft Corporation</i>
Origin 2018b	Auswertung und Darstellung von Datensätzen	<i>OriginLab Corporation</i>

Glasgeräte und Chemikalien

Reaktionen wurden, sofern angegeben, mittels Schlenk- und Septum-Technik unter inerter Atmosphäre (Ar- oder N₂-Atmosphäre) durchgeführt. Die hierfür verwandten Glasgeräte wurden bei 110 °C im Trockenschrank über Nacht ausgeheizt. Alle Chemikalien, welche in den folgenden Experimenten benötigt wurden, wurden von handelsüblichen Herstellern (*Sigma-Aldrich, Roth, Alpha Aesar, Merck, Fluka, TCI International, Fluorochem, Acros Organics etc.*) bezogen und, falls nicht anders angegeben, ohne zusätzliche Reinigung gebraucht. Die verwendeten Lösungsmittel wurden in reiner Form käuflich erworben oder nach laborüblichen Vorschriften getrocknet und von Verunreinigungen befreit. Dichlormethan, Diethylether, Tetrahydrofuran und Toluol wurden mit einer Lösungsmitteltrocknungsanlage (Model MB SPS-800) der Firma *MBraun* (Garching, Deutschland), getrocknet. Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck durch Rotationsverdampfer der Firma *Büchi* (Essen, Deutschland) bei einer Badtemperatur von 40 °C (falls nicht anders beschrieben) und Vakuumpumpen der Firma *Vakuubrand* (Wertheim, Deutschland) entfernt.

Chromatographie

Die Reinigung der Rohprodukte erfolgte durch Säulenchromatographie an Kieselgel 60M (0.040–0.063 mm) der Firma *Macherey-Nagel* (Düren, Deutschland) und neutralem Aluminiumoxid (50–200 μm , 60 \AA) der Firma *Acros Organics* (Geel, Belgien). Die Reaktionen wurden qualitativ durch Dünnschichtchromatographie verfolgt. Dabei wurden Fertigfolien der Firma *Macherey-Nagel* (Düren, Deutschland), POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄ mit Fluoreszenz-Indikator verwendet. Zur Detektion wurde mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt. Zusätzlich wurde eine Cer-Molybdat-Lösung (2.0 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, 5.0 g Molybdatophosphorsäure, 16 mL konz. H_2SO_4 , 200 mL H_2O) mit anschließender Erwärmung durch einen Heißluftfön als Entwicklerreagenz verwendet. Als Eluent für die Säulenchromatographie und die Dünnschichtchromatographie wurden verschiedene Mischungen aus Petrolether und Ethylacetat verwendet. Gegebenenfalls wurden für Trennprobleme auch weitere Lösungsmittel (Dichlormethan, *n*-Pentan, Diethylether, Toluol, Methanol) genutzt.

Achirale Umkehrphasen-HPLC

Untersuchungen mittels RP-HPLC wurden an einem Gerät der Firma *Jasco* (Groß-Umstadt, Deutschland) durchgeführt (Pumpe: *Jasco* PU-2080-Plus; Gradienten-Mischeinheit: *Jasco* LG-2080-025; Entgaser: *Jasco* DG-2080-53; Autosampler: *Jasco* AS-2057-Plus; UV/Vis-Detektor: *Jasco* MD-2010-Plus). Als Chromatographie-Säule wurde eine *Hyperclone* 5 μ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*) (Länge = 125 mm, \varnothing = 4 mm) verwendet. Das verwendete entgaste Laufmittel, Flussraten und Detektionswellenlängen werden bei der jeweiligen Verbindung angegeben. Die Entgasung der Laufmittel erfolgte in Ultraschallbädern (Modell 1210 und 1510) der Firma *Branson Ultrasonics* (Brookfield, CT, USA).

NMR-Spektroskopie

^1H -, ^{13}C -, DEPT-135-, COESY-, HSQC-, HMBC, NOESY-NMR-Spektren wurden auf dem Gerät 600 Ultra Shield™ der Firma *Bruker* (Billerica, MA, USA) aufgenommen (Messfrequenz: ^1H -NMR-Spektren 600 MHz, ^{13}C -NMR-Spektren 151 MHz). Als Lösungsmittel wurden CDCl_3 , Aceton- d_6 , DMSO- d_6 und D_2O verwendet. Die chemischen Verschiebungen sind bei ^1H -Spektren (^1H : δ [CDCl_3] = 7.26 ppm; δ [Aceton- d_6] = 2.05 ppm; δ [DMSO- d_6] = 2.50 ppm; δ [D_2O] = 4.79 ppm) und ^{13}C -Spektren (^{13}C : δ [CDCl_3] = 77.16 ppm; δ [Aceton- d_6] = 29.84 ppm; δ [DMSO] = 39.52 ppm) relativ zur Resonanz des Lösungsmittels angegeben. Die Kopplungskonstanten J sind in Hz und die chemischen Verschiebungen in ppm angegeben. Die Multiplizität der Signale wurde mit den gängigen Abkürzungen bezeichnet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett), m (Multipllett), mc (zentriertes Multipllett), br (breites Signal). Die Zuordnung der quartären Kohlenstoffatome, Methin-,

Methylen- und Methylgruppen wurde mittels Zuhilfenahme von ¹³C-DEPT-, HSQC- und HMBC-Spektren vorgenommen.

Die dynamischen NMR-Messungen wurden an einem Avance III HD 800 Spektrometer der Firma *Bruker* (Billerica, MA, USA) bei Temperaturen zwischen 293.15 K und 343.15 K durchgeführt (Messfrequenz: ¹H-NMR-Spektren 800 MHz, ¹³C-NMR-Spektren 201 MHz).

Qualitative NMR-Messungen wurden zur Kontrolle der Reinheit von Verbindungen mit dem internen Standard Dimethylsulfon oder 1-Brom-3,5-bis(trifluormethyl)benzol durchgeführt. Die Masse des zu messenden Analyten wurde über Formel 1 bestimmt.

$$m_{\text{Produkt}} = m_{\text{Standard}} \cdot \frac{N_{\text{Standard}}}{N_{\text{Produkt}}} \cdot \frac{M_{\text{Produkt}}}{M_{\text{Standard}}} \cdot \frac{I_{\text{Produkt}}}{I_{\text{Standard}}} \cdot \frac{\text{Reinheit}_{\text{Standard}}}{100}$$

Formel 1: Gleichung zur Berechnung der Produktmenge einer Probe. [m = Masse; N = Anzahl der absorbierenden Protonen; M = molare Masse; I = Integral]

Infrarotspektroskopie

Infrarotspektren wurden mittels eines Spektrometers (Spectrum Two™) der Firma *Perkin Elmer* (Waltham, MA, USA) mit ATR-Verfahren (engl.: *attenuated total reflection*, abgeschwächte Totalreflexion) aufgenommen und die Absorptionsbanden wurden in Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) angegeben. Die Proben wurden entweder im Falle von Flüssigkeit direkt vermessen oder im Falle von Feststoffen gelöst, aufgetragen und nach Verdampfen des Lösungsmittels vermessen.

Massenspektrometrie

Zur Aufnahme der Massenspektren wurde der Gaschromatograph (*HP 6890 Series*) der Firma *Hewlett-Packard* (Palo Alto, CA, USA) mit einer HP-5ms Säule (30 m x 0.25 mm, 0.25 μm; *Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA) und dem Massenspektrometer (*HP 5973*) verwendet. Als Trägergas wurde Helium genutzt. Die Ionisation erfolgte durch Elektronenionisation bei 70 eV. Die Fragmente wurden relativ zum Basispeak (100 %) angegeben. Alternativ wurden Massenspektren mit dem Gerät *expression CMS* der Firma *Advion* (Ithaca, NY, USA) aufgenommen. Die Proben wurden in Methanol gelöst und per Elektrosprayionisation (ESI) ionisiert.

Die hochauflösenden Massenspektren wurden an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im *Center of Molecular and Structural Analytics* (HHUCeMSA) an dem Gerät UHR-QTOF maXis 4G der Firma *Bruker Daltonics* (Billerica, MA, USA) aufgenommen. Dazu wurden die Proben in Methanol gelöst und per Elektrosprayionisation (ESI) ionisiert.

Die berechneten und gemessenen Molekülmassen werden für die jeweiligen Verbindungen angegeben.

Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit Hilfe des Geräts *Melting Point B-540* der Firma *Büchi* (Essen, Deutschland) bestimmt.

Drehwertbestimmung

Zur Drehwertmessung wurden die Proben im angegebenen Lösungsmittel gelöst und im Polarimeter (Model 341) der Firma *Perkin Elmer* (Waltham, MA, USA) bei $\lambda = 589 \text{ nm}$ (Natrium-D-Linie) in einer auf $20 \text{ }^\circ\text{C}$ temperierten Messzelle mit einer Schichtdicke von 1 dm vermessen. Der Drehwert wurde nach Formel 2 berechnet.

$$[\alpha]_D^{Temp} = \frac{\alpha}{c \times l} \text{ in } [\text{mL dm}^{-1} \text{ g}^{-1}]$$

Formel 2: Formel zur Bestimmung des Drehwertes. [c = Konzentration (in $\text{g}/100 \text{ mL}$); l = Länge der Messküvette (in dm)]

Gefrierdrocknung

In Wasser gelöste Proben wurden mit flüssigem Stickstoff gefroren und mit einem Lyophilisator (Modell VaCo 2) der Firma *Zirbus* (Bad Grund, Deutschland) lyophilisiert.

Bestrahlung

Bestrahlungsversuche wurden in 3.5 mL großen Makro-Küvetten (100-QS) (*Hellma Analytics*, Müllheim, Deutschland) unter andauerndem Rühren im LUMOS 43 (*Atlas Photonics*, Freiburg im Üechtland, Schweiz) bei verschiedenen Wellenlängen (375 nm , 405 nm , 430 nm) durchgeführt.

Leistungsdichtemessung

Die Leistungsdichte von Leuchtdioden wurde mit dem Powermeter PM100D der Firma *Thor Labs* (Newton, NJ, USA) vermessen.

UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektren wurden mit dem Spektrophotometer *Shimadzu UV-1800* (CPS-240A) (*Shimadzu*, Duisburg, Deutschland) gemessen. Die verwendeten Lösungsmittel werden für die jeweiligen Verbindungen angegeben.

Benennung von Verbindungen

Die Benennung der Verbindungen erfolgte nach der *IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)* Nomenklatur. Die Nummerierung der Atome in Verbindungen erfolgte ausschließlich für die Charakterisierung und kann von der *IUPAC* Nomenklatur abweichen.

6.2 Charakterisierung der Bestrahlungsquellen

Für eine genaue Berechnung der Quantenausbeute und eine allgemeine Vergleichbarkeit der *photocaged* Verbindungen ist es unabdingbar den exakten Photonenfluss $q_{n,p}$ und die exakte Bestrahlungsstärke E der Belichtungsapparatur (LUMOS 43) zu kennen. Daher wurden diese mittels zweier unterschiedlicher Methoden bestimmt. Zum einen durch Zuhilfenahme eines Powermeters und zum anderen durch Verwendung eines chemischen Aktinometers (*Hatchard–Parker*-Aktinometer).

6.2.1 Messung mittels Powermeter

Zur Messung der Bestrahlungsstärke E des LUMOS 43 wurde das Powermeter *PM100D* von *Thor Labs* (Newton, NJ, USA) verwendet. Aufgrund der Beschaffenheit des LUMOS 43, namentlich der geringen Größe der Belichtungskammer, musste dieser für die Messung demontiert werden. Die Bestrahlungsstärke E_{exp} sowie die Strahlungsleistung P_{exp} wurden bei den vier verfügbaren Wellenlängen (300 nm, 375 nm, 405 nm, 430 nm) gemessen (Tabelle 21). Aus der Strahlungsleistung P_{exp} konnte nun mit der Formel 3 der Photonenfluss $q_{n,p}$ bei der jeweiligen Wellenlänge λ ermittelt werden.

$$q_{n,p} = \frac{P_{\text{exp}}}{N_A \cdot \frac{h \cdot c}{\lambda}}$$

Formel 3: Funktion zur Bestimmung des Photonenflusses $q_{n,p}$. [N_A = Avogadro-Konstante ($6.022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$); h = Plancksches Wirkungsquantum ($6.626 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$); c = Lichtgeschwindigkeit ($2.997 \cdot 10^8 \text{ m s}^{-1}$); λ = Wellenlänge].

Tabelle 21: Mit dem Powermeter ermittelte Bestrahlungsstärke E_{exp} und Strahlungsleistung P_{exp} sowie dem daraus berechneten Photonenfluss $q_{n,p}$.

Bestrahlungswellenlänge [nm]	E_{exp} [mW cm ⁻²]	P_{exp} [mW]	$q_{n,p}$ [nmol s ⁻¹]
300	2.4	2.67	6.70
375	6.7	7.62	23.9
405	44.6	50.4	170
430	45.6	51.6	185

Anschließend wurden die ermittelten Bestrahlungsstärken E_{exp} sowohl mit Herstellerangaben als auch mit vorherigen Bestimmungen verglichen (Tabelle 22). Die hohen Abweichungen zu den Herstellerangaben sind darauf zurückzuführen, dass die angegebene Werte vom Hersteller über den Stromverbrauch ermittelt wurden und somit nicht die reale Bestrahlungsstärke widerspiegeln.^[312]

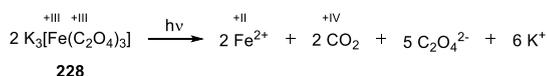
Tabelle 22: Vergleich der ermittelten Bestrahlungsstärke E mit früheren Messungen und Herstellerangaben.

Bestrahlungswellenlänge [nm]	E_{exp} [mW cm ⁻²]	E_{exp} [mW cm ⁻²] ^[312]	$E_{\text{Hersteller}}$ [mW cm ⁻²]
300	2.4	2.4	200
375	6.7	6.4	200
405	44.6	—	200
430	45.6	—	200

6.2.2 Messung mittels chemischer Aktinometrie^[385-388]

6.2.2.1 Hatchard–Parker-Aktinometer

Bei einem chemischen Aktinometer handelt es sich um ein chemisches System, welches eine Licht-induzierte Reaktion durchläuft, bei welcher die Quantenausbeute ϕ für eine bestimmte Wellenlänge λ bekannt ist.^[387] Dies ermöglicht, dass durch Messung der Reaktionsrate der absorbierte Photonenfluss $q_{n,p}$ berechnet werden kann. Aus der Vielzahl von unterschiedlichen potenziellen Aktinometern wurde Kaliumtrioxalatoferrat(III)-Trihydrat (**228**) (Hatchard–Parker-Aktinometer) ausgewählt, da es sich bei diesem um das meistakzeptierte Aktinometer handelt.^[387] Vereinfacht dargestellt wird hierbei nach Bestrahlung ein Oxalat-Ligand am Kaliumtrioxalatoferrat(III)-Trihydrat (**228**) zu Kohlenstoffdioxid oxidiert, wobei im Gegenzug das Eisen von der Oxidationsstufe III zu II reduziert wird (Schema 63). Ein detaillierter mechanistischer Ablauf ist bei *Mangiante et al.* zu finden.^[389]



Schema 63: Reaktionsschema der lichtinduzierten Photoreaktion.^[390]

Zur Komplexierung der Eisenionen wird eine 1.10-Phenantrolin-Lösung verwendet. Eisen(III)-Ionen bilden hierbei einen blauen Ferriin-Komplex (**229**), während aus Eisen(II)-Ionen das rote Ferriin (**230**) entsteht.

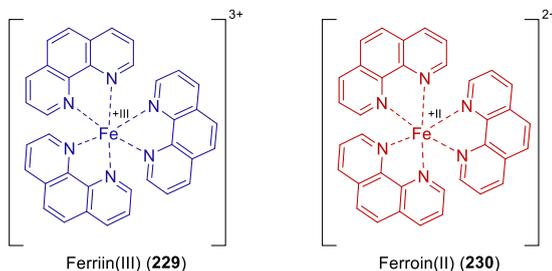


Abbildung 86: Struktur der Chelatkomplexe Ferriin(III) (**229**) und Ferriin(II) (**230**).

Durch Aufnahme von Absorptionsspektren der entwickelten Lösung kann der Stoffumsatz aufgrund der unterschiedlichen Absorptionsspektren photometrisch ermittelt werden. Aus der Belichtungsdauer, dem ermittelten Umsatz und der literaturbekannten Quantenausbeute für die Photoreaktion des Kaliumtrioxalatoferrat(III)-Trihydrat (**228**) kann dann wiederum der Photonenfluss berechnet werden.

6.2.2.2 Synthese von Kaliumtrioxalatoferrat(III)-Trihydrat (228)

Es wurde über die nachfolgende Synthese hergestellt. Eine wässrige 1.50 M di-Kaliumoxalat-Monohydrat-Lösung (500 mL, 750 mmol, 3.00 Äq.) und eine wässrige 1.50 M Eisen(III)-chlorid-Lösung (167 mL, 250 mmol, 1.00 Äq.) wurden in einem 1-L-Rundkolben vorgelegt. Die Reaktionslösung wurde für 24 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Der grüne Niederschlag wurde abfiltriert und dreimalig aus destilliertem Wasser (60 °C) umkristallisiert. Die Trocknung erfolgte in einem Trockenschrank bei 45 °C und einem konstanten Luftstrom. Bei dem erhaltenen grünen, kristallinen Feststoff handelt es sich um Kaliumtrioxalatoferrat(III)-Trihydrat (228), welches unter Lichtausschluss gelagert wurde.

6.2.2.3 Bestimmung der Reinheit

Um die Veränderung des Reinheitsgrades über die Umkristallisierungsschritte hinweg zu verfolgen, wurde nach jeder Umkristallisation eine geringfügige Menge (ca. 100 mg) beiseitegelegt, unter den gleichen Bedingungen getrocknet und ein Absorptionsspektrum aufgezeichnet (Abbildung 87). Eine ausreichende Reinheit liegt vor, wenn nach Umkristallisation keine signifikante Erhöhung des Extinktionskoeffizienten ermittelt wird.^[385]

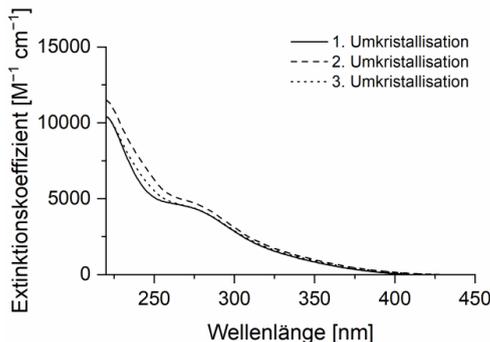


Abbildung 87: Bestimmung des Reinheitsgrades von Kaliumtrioxalatoferrat(III)-Trihydrat (228) (0.05 mM in H₂O, 25 °C) nach jedem Umkristallisationsschritt via UV/Vis-Absorptionsspektroskopie.

6.2.2.4 Voraussetzungen

Um den Photonenfluss $q_{n,p}$ und die Bestrahlungsstärke E der Bestrahlungsquelle exakt vermessen zu können müssen diverse Parameter beachtet werden:

- 1.) Alle arbeiten müssen im Dunkeln unter Rotlicht durchgeführt werden.
- 2.) Bei der längsten Bestrahlungsdauer sollte der Umsatz unter 5 % liegen, um den *Inner-Filter*-Effekt zu minimieren.
- 3.) Die Konzentration der zu bestrahlenden Lösung muss ausreichend hoch sein, um eine Totalabsorption der entsprechenden Wellenlänge zu gewährleisten (6 mM für <405 nm; 150 mM für ≥ 405 nm)
- 4.) Die Linearität der einzelnen Messpunkte muss gegeben sein, da ansonsten eine unvollständige Komplexierung vorliegt.
- 5.) Die Absorption bei 510 nm sollte im Bereich von 0.1–0.8 liegen.^[386]

6.2.2.5 Durchführung

Die Bestimmung des Photonenflusses $q_{n,p}$ erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt wird eine Aktinometer-Lösung belichtet und im zweiten Schritt wird zu dieser Lösung zur Entwicklung ein Propionat-Puffer und eine 1,10-Phenantrolin-Lösung hinzugegeben.

Anfertigung und Bestrahlung der Aktinometer-Lösungen

Für die Bestimmung bei der Wellenlängen 375 nm wurde eine 6 mM Aktinometer-Lösung angesetzt. Dafür wurden Kaliumtrioxalatoferrat(III)-Trihydrat (737 mg, 1.50 mmol) und 0.05 M Schwefelsäure (25 mL, 1.25 mmol) in einem 250-mL-Messkolben vorgelegt und dieser wurde mit dest. H₂O bis zur Eichmarke aufgefüllt. Für die spätere Entwicklung der Aktinometer-Lösung wurde sowohl eine 0.1%ige 1,10-Phenantrolin-Lösung als auch ein Propionat-Puffer [Stammlösung: Natriumpropionat (41 g, 427 mmol), konz. Schwefelsäure (5 mL), in einem 500-mL-Messkolben mit dest. H₂O auffüllen] angesetzt. Von dieser Aktinometer-Lösung wurden nun 3 mL (V_i) in eine Quarzglas-Küvette überführt und diese wurde für eine definierte Zeitspanne im LUMOS 43 belichtet. Während der Belichtung wurde die Probe gerührt. Dies wurde für mindestens vier verschiedene Messpunkte durchgeführt. Jeder Messpunkt wurde als Duplikat gemessen.

Für die Bestimmung bei 405 nm und 430 nm wurden Kaliumtrioxalatoferrat(III)-Trihydrat (7.37 g, 15.0 mmol) und 0.05 M Schwefelsäure (10 mL, 0.50 mmol) in einem 100-mL-Messkolben vorgelegt und dieser wurde mit dest. H₂O bis zur Eichmarke aufgefüllt. Die übrigen Schritte erfolgten äquivalent zur 6 mM Aktinometer-Lösung.

Entwicklung der Aktinometer-Lösung und Messung der Absorptionsspektren

Die Entwicklung der bestrahlten Aktinometer-Lösungen erfolgte, indem je 0.5 mL (V_2) ebendieser in einen 5-mL-Messkolben (V_3) gefüllt, mit 0.25 mL der Propionat-Puffer-Stammlösung und 2 mL der 0.1%igen 1,10-Phenantrolin-Lösung verdünnt wurden. Anschließend wurde mit dest. H_2O bis zur Eichmarke aufgefüllt und die Lösung wurde für 1 h im Dunkeln entwickelt. Anschließend wurde ein UV/Vis-Spektrum der entwickelten Aktinometer-Lösung aufgenommen (Abbildung 88, Abbildung 89, Abbildung 90). Bei 375 nm wurde 250 μL (V_4), bei 405 nm 125 μL (V_4) und bei 430 nm 100 μL (V_4) der entwickelten Aktinometer-Lösung in eine Quarzglas-Küvette gegeben und mit Puffer auf 1 mL aufgefüllt. Die Korrektur der UV/Vis-Spektren erfolgt über eine unbelichtete Probe, welche unter den gleichen Bedingungen vorbereitet und entwickelt wurde.

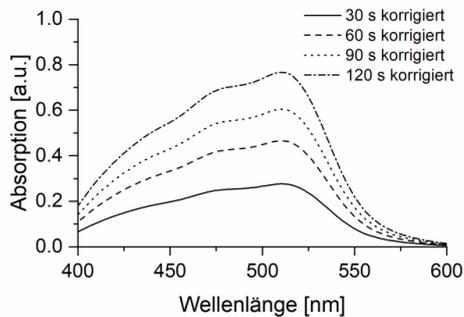


Abbildung 88: Absorptionsspektrum der entwickelten Aktinometer-Lösung nach verschiedenen Belichtungsintervallen mit 375 nm (22 °C).

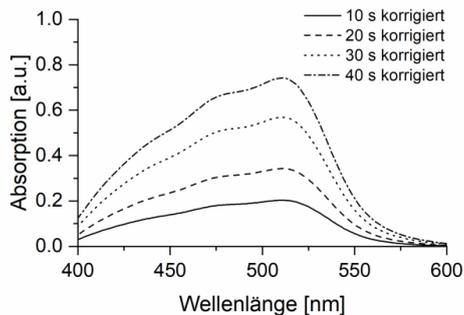


Abbildung 89: Absorptionsspektrum der entwickelten Aktinometer-Lösung nach verschiedenen Belichtungsintervallen mit 405 nm (22 °C).

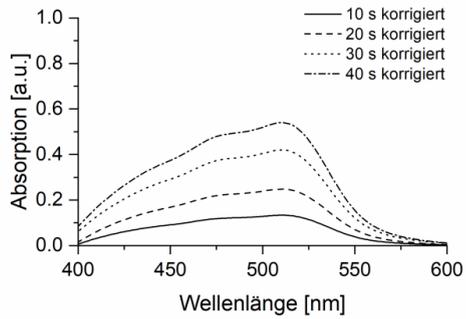


Abbildung 90: Absorptionsspektrum der entwickelten Aktinometer-Lösung nach verschiedenen Belichtungsintervallen mit 430 nm (22 °C).

Die gemittelten Absorptionswerte bei 510 nm A_{510} wurden gegen die Belichtungsdauer t aufgetragen (Abbildung 91, Abbildung 92, Abbildung 93), um die Extinktionsänderung pro Zeit ($\frac{dA_{510}}{dt}$) zu bestimmen (Tabelle 23).

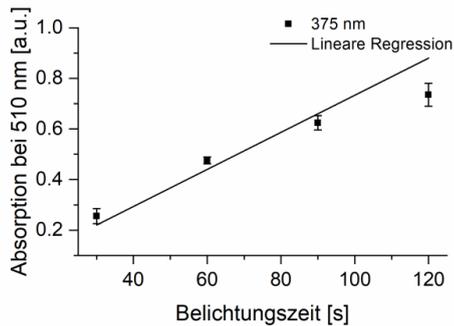


Abbildung 91: Absorption bei 510 nm aufgetragen gegen die Belichtungszeit bei einer Wellenlänge von 375 nm. Bei den abgebildeten Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Triplikaten.

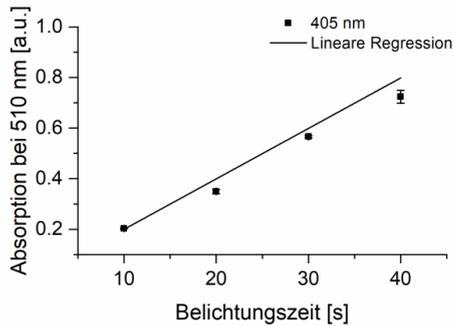


Abbildung 92: Absorption bei 510 nm aufgetragen gegen die Belichtungszeit bei einer Wellenlänge von 405 nm. Bei den abgebildeten Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Triplikaten.

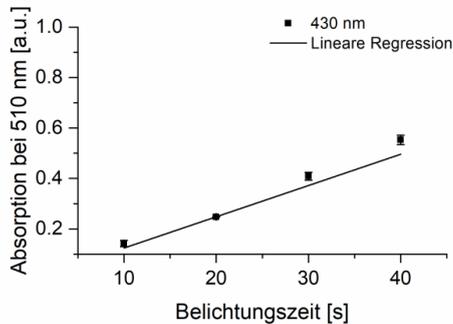


Abbildung 93: Absorption bei 510 nm aufgetragen gegen die Belichtungszeit bei einer Wellenlänge von 430 nm. Bei den abgebildeten Werten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Triplikaten.

6.2.2.6 Berechnung

Die Berechnungen wurden analog zu den von Dr. *Claus Bier* durchgeführten Rechnungen angestellt.^[312]

Um nun aus der Extinktionsänderung pro Zeit ($\frac{dA_{510}}{dt}$) die Bildungsgeschwindigkeit v_{Bildung} des Ferroin-Komplexes (**230**) bestimmen zu können, wird das *Lambert-Beer'sche* Gesetz (Formel 4) zur Hilfe genommen.

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

Formel 4: *Lambert-Beer'sches* Gesetz. [A_{λ} = Absorption bei Wellenlänge λ ; ε_{λ} = molarer Extinktionskoeffizient bei Wellenlänge λ ; c = Konzentration; d = Schichtdicke der Küvette]

Daraus ergibt sich die folgende Funktion:

$$v_{\text{Bildung}} = \frac{dc_{\text{Ferroin}}}{dt} = \frac{dA_{510}}{dt} \cdot \frac{1}{\epsilon_{510} \cdot d}$$

Formel 5: Funktion zur Bestimmung der Bildungsgeschwindigkeit v_{Bildung} . [$\epsilon_{510} = 11000 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $d = 1 \text{ cm}$]

Durch Einsetzen des Extinktionskoeffizienten von Ferroin (**230**) bei 510 nm und der Schichtdicke der Küvette in Formel 5 lässt sich die Konzentrationsänderung des Ferroin (**230**) pro Zeit ($\frac{dc_{\text{Ferroin}}}{dt}$) berechnen (Tabelle 23)

Tabelle 23: Extinktions-, Konzentrations- und Stoffmengenänderung in Abhängigkeit von der Belichtungszeit t für 375 nm, 405 nm und 430 nm.

Bestrahlungswellenlänge [nm]	$\frac{dA_{510}}{dt} [\text{s}^{-1}]$	$\frac{dc_{\text{Ferroin}}}{dt} [\mu\text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}]$	$\frac{dn_{\text{Ferroin}}}{dt} [\text{nmol s}^{-1}]$
375	$7.33 \cdot 10^{-3}$	0.67	80.0
405	$20.0 \cdot 10^{-3}$	1.81	218
430	$12.4 \cdot 10^{-3}$	1.13	135

Daraus kann nun die Stoffmengenänderung pro Zeit ($\frac{dn_{\text{Ferroin}}}{dt}$) ermittelt werden. Dabei werden die verschiedenen Verdünnungsschritte berücksichtigt (Formel 6).

$$\frac{dn_{\text{Ferroin}}}{dt} = \frac{dc_{\text{Ferroin}}}{dt} \cdot \frac{V_1 \cdot V_3}{V_2 \cdot V_4}$$

Formel 6: Funktion zur Bestimmung der Stoffmengenänderung. [V_1 = Gesamtvolumen der bestrahlten Aktinometer-Lösung; V_2 = Entwickeltes Volumen der bestrahlten Aktinometer-Lösung; V_3 = Gesamtvolumen der entwickelten Aktinometer-Lösung; V_4 = Vermessene Volumen der entwickelten Aktinometer-Lösung]

Aus der Stoffmengenänderung pro Zeit kann nun unter Zuhilfenahme der in der Literatur genannten Quantenausbeute der Photonenfluss $q_{n,p}$ bestimmt werden (Formel 7; Tabelle 24).

$$q_{n,p} = \frac{dn_{\text{Ferroin}}}{dt} \cdot \frac{1}{\phi_\lambda}$$

Formel 7: Funktion zur Bestimmung des Photonenflusses $q_{n,p}$. [ϕ_λ = Quantenausbeute bei Wellenlänge λ]

Unter Zuhilfenahme des berechneten Photonenflusses $q_{n,p}$, der Avogadro-Konstante N_A und der Energie eines einzelnen Photons E_{Photon} kann nun die Strahlungsleistung P_{exp} mit der Formel 8 berechnet werden.

$$P_{\text{exp}} = N_A \cdot q_{n,p} \cdot E_{\text{Photon}}$$

Formel 8: Funktion zur Bestimmung der Strahlungsleistung P_{exp} . [N_A = Avogadro-Konstante ($6.022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$); E_{Photon} = Energie eines Photons bei der Wellenlänge λ]

Die Energie eines einzelnen Photons bei einer bestimmten Wellenlänge kann wiederum über die Formel 9 bestimmt werden.

$$E_{\text{Photon}} = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

Formel 9: Funktion zur Bestimmung der Energie eines Photons E_{Photon} . [h = Plancksches Wirkungsquantum ($6.626 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$); ν = Frequenz; c = Lichtgeschwindigkeit ($2.997 \cdot 10^8 \text{ m s}^{-1}$)]

Abschließend wird die Strahlungsleistung P_{exp} auf die bestrahlte Fläche bezogen, um die Bestrahlungsstärke E_{exp} zu erhalten. Eine Übersicht über die berechneten Werte ist in Tabelle 24 zu finden.

Tabelle 24: Literaturbekannte Quantenausbeuten ϕ , ermittelter Photonenfluss $q_{n,p}$, Strahlungsleistung P_{exp} und Bestrahlungsstärke E_{exp}

Bestrahlungswellenlänge [nm]	$\phi^{[386]}$	$q_{n,p}$ [nmol s ⁻¹]	P_{exp} [mW]	E_{exp} [mW cm ⁻²]
375	1.21	66.1	21.1	7.03
405	1.14	191	56.4	18.8
430	1.11	122	33.9	11.3

In der abschließenden Tabelle 25 sind die über das *Hatchard-Parker*-Aktinometer bestimmten Bestrahlungsstärken $E_{\text{exp,Aktinometer}}$ mit den über das Powermeter ermittelten Bestrahlungsstärken $E_{\text{exp,Powermeter}}$ sowie den Herstellerangaben $E_{\text{Hersteller}}$ gegenübergestellt.

Experimenteller Teil

Tabelle 25: Vergleich der über das Powermeter ermittelten Bestrahlungsstärke $E_{\text{exp,Powermeter}}$ mit der über das *Hatchard-Parker*-Aktinometer bestimmten Bestrahlungsstärke $E_{\text{exp,Aktinometer}}$ und Herstellerangaben $E_{\text{Hersteller}}$.

Bestrahlungswellenlänge [nm]	$E_{\text{exp,Powermeter}}$ [mW cm ⁻²]	$E_{\text{exp,Aktinometer}}$ [mW cm ⁻²]	$E_{\text{Hersteller}}$ [mW cm ⁻²]
300	2.4	—	200
375	6.7	7.03	200
405	44.6	18.8	200
430	45.6	11.3	200

Zur Berechnung der Quantenausbeuten wurde der Photonenfluss $q_{n,p}$ verwendet, welcher mittels Aktinometer bestimmt wurde.²⁶

²⁶ Es ist zu beachten, dass die verwendeten Belichtungswellenlängen nicht exakt mit den in der Literatur verwendeten Referenzwerten übereinstimmen und die verwendeten Lichtquellen nicht perfekt monochromatisch sind. Ebenso werden natürliche Schwankungen der Belichtungsstärke aufgrund der kurzen Belichtungsdauern vernachlässigt.

6.3 Charakterisierung der *photocaged compounds*

6.3.1 Absorptionsmessung

Zur Bestimmung der Absorptionsspektren wurde zunächst eine Hintergrundmessung mit dem verwendeten Lösemittel durchgeführt und der ermittelte Wert als neuer Nullwert gesetzt. Es wurden 0.5 mM bzw. 1 mM Lösungen der *photocaged compounds* in entsprechenden Lösungsmitteln hergestellt. Diese wurden verdünnt und am Spektrophotometer *Shimadzu UV-1800 (CPS-240A)* bei 25 °C im Wellenlängenbereich von 200–800 nm vermessen. Die maximale Absorption sollte dabei zwischen 0.5 und 1 liegen. Die Messpunkte wurden im Abstand von 1 nm aufgenommen.

6.3.2 Löslichkeitsmessung

Die Löslichkeitsmessung wurde abgeändert nach der Methode von *Binder et al.* durchgeführt.^[77]

Die Löslichkeit der Verbindung wurde photometrisch bei 25°C an dem Spektrophotometer *Shimadzu UV-1800 (CPS-240A)* bestimmt. Die Absorptionswerte wurden bei der maximalen Absorptionswellenlänge der jeweiligen Verbindung gemessen.

Zunächst wurde eine 1 mM-Lösung der zu untersuchenden Substanz in deionisiertem entgastem Wasser hergestellt. Wenn es nicht möglich war, eine zumindest 0.1 mM-Lösung einer Verbindung herzustellen, wurde die Löslichkeit im Folgenden als <0.1 mM deklariert. Ansonsten wurde mit deionisiertem entgastem Wasser eine Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen erstellt. Nach Durchführung von Absorptionsmessungen konnte durch eine lineare Regressionsanalyse eine Kalibriergrade erhalten werden. Anschließend wurde eine gesättigte Lösung der zu untersuchenden Substanz in deionisiertem entgastem Wasser hergestellt. Um sicherzustellen, dass eine vollständige Sättigung vorlag, wurde die Suspension für 3 min bei 25 °C in ein Ultraschallbad gestellt. Die Suspension wurde im Anschluss daran kurz zentrifugiert, filtriert und so weit verdünnt, dass der Absorptionswert der Lösung im Bereich der Kalibriergrade lag. Unter Verwendung des *Lambert-Beer'schen* Gesetzes konnte die maximale Löslichkeit im unverdünnten Zustand extrapoliert werden.

6.3.3 Zerfallsmessung

Die Zerfallsmessung wurde abgeändert nach der Methode von *Binder et al.* durchgeführt.

Ein Milliliter einer 1 mM Lösung einer *photocaged* Verbindung in deionisiertem Wasser wurde in einer Küvette für eine definierte Zeitspanne bei Raumtemperatur im LUMOS 43 mit 375 nm ($\sim 6.4 \text{ mW/cm}^2$) bestrahlt. Anschließend wurde die Probe auf der HPLC der Firma Jasco (HPLC System) aufgetrennt. Als Chromatographiesäule wurde eine *Hyperclone 5 μ ODS (C18) 120 (Phenomenex)* bei einer Flussrate von 1 mL/min (MeCN : H₂O, 30 : 70, 25 °C, 30 μ L) verwendet. Die Abnahme der Konzentration der *photocaged* Verbindung in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer konnte durch Auftragen der aus den HPLC-Spektren erhaltenen Flächen bestimmt werden. Die graphische Auftragung lieferte einen exponentiellen Zerfall, aus welchem die Halbwertszeit ermittelt werden konnte.

6.3.4 Bestimmung der Halbwertszeit und der Quantenausbeute mittels HPLC-Analytik

Die Bestimmung der Halbwertszeit und der Quantenausbeute der *photocaged compounds* wurde abgeändert nach einer Methode von Dr. *Claus Bier* durchgeführt.^[312]

Zunächst wurde eine 0.5 bzw. 1.0 mM Lösung der jeweiligen *photocaged* Verbindung im entsprechenden Lösungsmittel erstellt. Nachdem eine Makro-Küvette (100-QS) mit 1 mL dieser Lösung befüllt wurde, wurde diese für eine definierte Zeitspanne bei Raumtemperatur im LUMOS 43 mit einer definierten Wellenlänge (375 nm, 405 nm, 430 nm) bestrahlt. Diese Belichtung wurde für verschiedene Belichtungsdauern wiederholt. Die belichteten Proben wurden auf einer HPLC [Säule: *Hyperclone 5 μ ODS (C18) 120 (Phenomenex)*] in Dreifachbestimmung vermessen. Die dabei verwendeten Laufmittel sind für die jeweiligen Verbindungen angegeben. Die Verringerung der Konzentration der *photocaged compounds* wurde über einen UV-Detektor (*Jasco MD-2010-Plus*) beim jeweiligen Absorptionsmaximum detektiert. Für die Datenauswertung wurde die Konzentrationsabnahme gegen die Belichtungsdauer aufgetragen. Die Auswertung der Daten erfolgte in *Origin 2018b (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA)* durch einen exponentiellen Fit erster Ordnung (Formel 10).

$$c(t) = A \cdot e\left(-\frac{t}{\tau}\right) + y_0$$

Formel 10: Exponentielle Zerfallsfunktion erster Ordnung (ExpDec1). [A = Amplitude; τ = Zeitkonstante; y_0 = Offset]

Unter Zuhilfenahme, der durch den exponentiellen Fit ermittelten Parameter, lassen sich die Halbwertszeit und die Quantenausbeute bestimmen. So lässt sich aus der Zeitkonstante τ direkt die Halbwertszeit $t_{0,5}$ ableiten (Formel 11).

$$t_{0,5} = \tau \cdot \ln(2)$$

Formel 11: Gleichung zur Berechnung der Halbwertszeit. [τ = Zeitkonstante]

Die Quantenausbeute für eine photochemische Zerfallsreaktion hingegen ist allgemein definiert als der Quotient aus Zerfallsereignis und Anzahl der absorbierten Photonen (Formel 12).

$$\phi(\lambda) = \frac{\text{Menge des zerfallenen photocaged compounds}}{\text{Anzahl der absorbierten Photonen}}$$

Formel 12: Allgemeine Definition der Quantenausbeute ϕ .^[233]

Die Menge des zerfallenen *photocaged compounds* lässt sich dabei über die Änderungsrate einer beliebigen messbaren Größe beschreiben und die Anzahl der absorbierten Photonen ergibt sich aus dem Photonenfluss $q_{n,p}$ und der Absorption $A(\lambda)$ bei der Anregungswellenlänge λ .

$$\phi(\lambda) = \frac{\left(\frac{dx}{dt}\right)}{q_{n,p} \cdot [1 - 10^{-A(\lambda)}]}$$

Formel 13: Gleichung zur Bestimmung der differentiellen Quantenausbeute ϕ .^[233] [$\left(\frac{dx}{dt}\right)$ = Änderungsrate einer messbaren Größe; $q_{n,p}$ = Photonenfluss; A = Absorption bei Wellenlänge λ]

Als Änderungsrate wird die Abnahme der anfänglichen Stoffmenge n_{Start} des jeweiligen *photocaged compounds* mit zunehmender Bestrahlungsdauer gewählt. Der eingehende Photonenfluss $q_{n,p}$ wurde für die verschiedenen Belichtungswellenlängen mittels chemischer Aktinometrie bestimmt. Eine detaillierte Herleitung der Formel 14 ist in der Dissertationsschrift von Dr. *Claus Bier* zu finden.^[312]

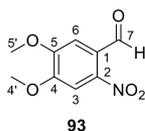
$$\phi_{\text{Abbau}} = \frac{\left(\frac{c_{\text{Start}} \cdot A}{60 \cdot \tau}\right) \cdot V}{q_{n,p} \cdot (1 - 10^{-ecd})}$$

Formel 14: Gleichung zur Bestimmung der differentiellen Quantenausbeute ϕ_{Abbau} . [$q_{n,p}$ = Photonenfluss (in mol s^{-1}); c_{Start} = Startkonzentration (in mol L^{-1}); A = Amplitude; τ = Zeitkonstante (in s); V = Volumen (in L)]

6.4 Synthesevorschriften zur Darstellung der o-Nitrobenzyl-Derivate

4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzaldehyd (**93**)

Nach einer Vorschrift von *Kumar et al.*^[276] wurde Salpetersäure (5.0 mL, 1.2 M) auf 0 °C gekühlt, bevor 3,4-Dimethoxybenzaldehyd (1.00 g, 6.02 mmol, 1.00 Äq.) hinzugegeben wurde. Nach Rühren für 1 h bei Raumtemperatur²⁷ wurde die Reaktionslösung auf 50 mL Eiswasser gegeben. Der entstehende gelbe Feststoff wurde abfiltriert und mit kaltem Wasser und kaltem Ethanol gewaschen. Nach Umkristallisation aus Ethanol wurden 1.06 g (5.04 mmol, 84 %) des gelben Feststoffes **93** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[276]

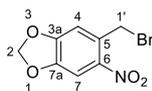


¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4.03 (s, 3 H, 5'-H), 4.04 (s, 3 H, 4'-H), 7.42 (s, 1 H, 6-H), 7.62 (s, 1 H, 3-H), 10.46 (s, 1 H, 7-H); ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 56.7, 56.8 (C-4', C-5'), 107.2 (C-3), 109.8 (C-6), 125.6 (C-1), 143.9 (C-2), 152.4 (C-4), 153.3 (C-5), 187.7 (C-7); IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2942, 2847, 1684, 1604, 1571, 1516, 1463, 1439, 1396, 1325, 1278, 1224, 1188, 1162, 1059, 1020, 982, 878, 794, 737, 592, 503; MS (ESI, positiv-Ion): m/z (%) = 266.1 (100) [M+Na+MeOH]⁺, 282.3 (15) [M+K+MeOH]⁺; **Schmelzpunkt**: 130 °C, Lit.^[391]: 130–132 °C. **6-Nitropiperonylbromid (94)**

Nach einer Vorschrift von *Tietze et al.*^[280] wurden der Alkohol **90**²⁸ (1.50 g, 7.61 mmol, 1.00 Äq.) und Tetrabrommethan (3.15 g, 9.51 mmol, 1.25 Äq.) in trockenem Dichlormethan (38 mL, 0.20 M) in einem sekurierten Schlenk Kolben unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. In einem zweiten sekurierten Schlenk Kolben wurde Triphenylphosphan (2.50 g, 9.51 mmol, 1.25 Äq.) in trockenem Dichlormethan (38 mL, 0.25 M) unter Stickstoff-Atmosphäre gelöst. Beide Lösungen wurden auf 0 °C gekühlt und anschließend wurde die kalte Triphenylphosphan-Lösung tropfenweise zum gelösten Alkohol **90** hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 10 min bei 0 °C und danach 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 80:20), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Nach Zugabe von Kieselgel wurde die Lösung am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 90:10) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 1.63 g (6.27 mmol, 82 %) des hellbraunen Feststoffes **94** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[280]

²⁷ Die Raumtemperatur innerhalb des Labors wurde mittels Temperaturschreiber konstant aufgezeichnet und lag zwischen 19–26 °C.

²⁸ Diese Verbindung wurde von Dr. *Claus Bier* im Rahmen seiner Dissertation synthetisiert und war noch im Arbeitskreis vorrätig.

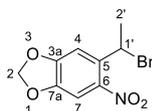


94

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4.79 (s, 2 H, 1'-H), 6.14 (s, 2 H, 2-H), 6.95 (s, 1 H, 4-H), 7.56 (s, 1 H, 7-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 29.8 (C-1'), 103.5 (C-2), 106.4 (C-7), 111.2 (C-4), 129.7 (C-5), 142.3 (C-6), 148.4 (C-7a), 152.0 (C-3a); **R_f** = 0.22 (PE/EtOAc 90:10) **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3057, 2922, 1733, 1610, 1522, 1503, 1488, 1416, 1376, 1323, 1266, 1223, 1188, 1118, 1021, 920, 885, 872, 818, 759, 664, 554; **Schmelzpunkt**: 65 °C.

1-(6-Nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)ethyl bromid (95)

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Nguyen et al.*^[278] wurde der Alkohol **91**²⁹ (0.10 g, 0.47 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem Dichlormethan (1.0 mL, 50 mM) in einem sekurierten Schlenkkolben unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Phosphortribromid (0.11 mL, 1.1 mmol, 2.4 Äq.) tropfenweise hinzugegeben, gefolgt von der Zugabe von Pyridin (38 µL, 0.47 mL, 1.0 Äq.). Die Reaktionslösung wurde 10 min bei 0 °C und danach 45 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 60:40), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Die Reaktionslösung wurde auf Eiswasser gegeben und anschließend mit CH₂Cl₂ (3×) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und bei vermindertem Druck eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/CH₂Cl₂ 80:20) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 36 mg (0.13 mmol, 28 %) des gelben Feststoffes **95** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[278]



95

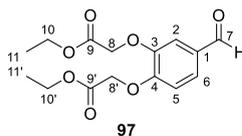
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2.03 (d, ³J_{2',1'} = 6.8 Hz, 3 H, 2'-H), 5.89 (q, ³J_{1',2'} = 6.8 Hz, 1 H, 1'-H), 6.12 (d, ²J_{2a,2b} = 1.2 Hz, 1 H, 2-H_a), 6.12 (d, ²J_{2a,2b} = 1.2 Hz, 1 H, 2-H_b), 7.26 (s, 1 H, 4-H), 7.34 (s, 1 H, 7-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 27.6 (C-2'), 42.8 (C-1'), 103.3 (C-2), 105.1 (C-7), 108.8 (C-4), 134.8 (C-5), 141.6 (C-6), 147.7 (C-7a), 152.1 (C-3a); **R_f** = 0.27 (PE/CH₂Cl₂ 80:20); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3104, 2925, 1733, 1618, 1501, 1489, 1419, 1391, 1325, 1263,

²⁹ Diese Verbindung wurde von Dr. *Claus Bier* im Rahmen seiner Dissertation synthetisiert und war noch im Arbeitskreis vorrätig.

1197, 1156, 1141, 1058, 1027, 960, 920, 873, 813, 763, 742, 728, 686, 663, 622, 574, 524;
Schmelzpunkt: 68 °C, Lit.^[278]: 76.1–77.8 °C.

3,4-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)benzaldehyd (97)

Nach einer Vorschrift von *Ni et al.*^[113] wurde 3,4-Dihydroxybenzaldehyd (**96**) (6.00 g, 43.4 mmol, 1.00 Äq.) in DMF (84 mL, 0.52 M) vorgelegt. Nach der Zugabe von Kaliumcarbonat (24.4 g, 174 mmol, 4.00 Äq.) wurde die entstandene braune Lösung für 30 min gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf 0–5 °C abgekühlt und tropfenweise Bromessigsäureethylester (14.4 mL, 130 mol, 3.00 Äq.) hinzugegeben. Die Lösung wurde für 30 min bei 0–5 °C und anschließend für 16 h bei RT gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 70:30), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von dest. H₂O (120 mL). Im Anschluss daran wurde die Lösung mit EtOAc (500 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 70:30) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 13.5 g (43.5 mmol, quant.) des farblosen Feststoffes **97** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[113]

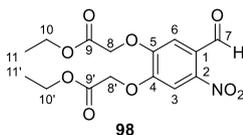


¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.28 (t, ³J_{11,10} oder ^{11',10'} = 7.2 Hz, 3 H, 11-H oder 11'-H), 1.29 (t, ³J_{10,11} oder ^{10',11'} = 7.2 Hz, 3 H, 10-H oder 10'-H), 4.26 (q, ³J<sub>10,11;10',11' = 7.2 Hz, 4 H, 10-H, 10'-H), 4.76 (s, 2 H, 8-H), 4.80 (s, 2 H, 8'-H), 6.92 (d, ³J_{5,6} = 8.3 Hz, 1 H, 5-H), 7.37 (d, ⁴J_{2,6} = 1.9 Hz, 1 H, 2-H), 7.47 (dd, ³J_{6,5} = 8.3 Hz, ⁴J_{6,2} = 1.9 Hz, 1 H, 6-H), 9.83 (s, 1 H, 7-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.3 (C-11; C-11'), 61.6, 61.7 (C-10; C-10'), 66.3 (C-8), 66.3 (C-8'), 113.1 (C-2), 113.7 (C-5), 127.0 (C-6), 131.1 (C-1), 148.4 (C-3), 153.2 (C-4), 168.2 (C-9'), 168.4 (C-9), 190.6 (C-7); **R_f** = 0.27 (PE/EtOAc 70:30); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2977, 1755, 1724, 1687, 1585, 1510, 1429, 1207, 1138, 1054, 1024, 671; **MS** (ESI, positiv-Ion): m/z (%) = 333.2 (100) [M+Na]⁺, 349.1 (40) [M+K]⁺;
Schmelzpunkt: 55 °C, Lit.^[113]: 55–56 °C.</sub>

4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzaldehyd (98)

Nach einer Vorschrift von *Ni et al.*^[113] wurde Kaliumnitrat (5.50 g, 54.4 mmol, 1.25 Äq.) in Trifluoressigsäure (40 mL, 1.4 M) vorgelegt und bei 0–5 °C gerührt. Anschließend erfolgte die langsame tropfenweise Zugabe von 3,4-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)benzaldehyd (**97**) (13.5 g,

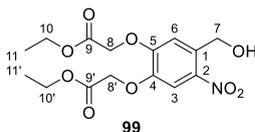
43.5 mmol, 1.00 Äq), gelöst in Trifluoressigsäure (21 mL, 2.1 M). Die Reaktionslösung wurde für 1 h bei 0–5 °C gerührt und anschließend für 16 h bei RT gerührt. Nach Einengen am Rotationsverdampfer wurde der Überstand in EtOAc (400 mL) suspendiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über MgSO₄ wurde die Lösung am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (Toluol/EtOAc 85:15) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 12.7 g (35.6 mmol, 82 %) des gelben Feststoffes **98** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[113]



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.30 (t, ³J_{11,10} oder 11',10' = 7.2 Hz, 3 H, 11-H oder 11'-H), 1.32 (t, ³J_{11,10} oder 11',10' = 7.2 Hz, 3 H, 11-H oder 11'-H), 4.28 (q, ³J_{10,11} oder 10',11' = 7.2 Hz, 2 H, 10-H oder 10'-H), 4.29 (q, ³J_{10,11} oder 10',11' = 7.2 Hz, 2 H, 10-H oder 10'-H), 4.85 (s, 2 H, 8-H oder 8'-H), 4.86 (s, 2 H, 8-H oder 8'-H), 7.34 (s, 1 H, 6-H), 7.58 (s, 1 H, 3-H), 10.41 (s, 1 H, 7-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.2, 14.3 (C-11; C-11'), 62.0, 62.1 (C-10; C-10'), 66.1, 66.4 (C-8; C-8'), 110.4 (C-3), 112.5 (C-6), 126.3 (C-1), 144.2 (C-2), 150.9, 151.9 (C-4; C-5), 167.3, 167.4 (C-9; C-9'), 187.3 (C-7); **R_f** = 0.44 (Toluol/EtOAc 85:15); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2987, 1740, 1687, 1570, 1507, 1283, 1196, 1168, 1070, 1022, 792; **MS** (ESI, positiv-Ion): m/z (%) = 378.2 (50) [M+Na]⁺, 410.2 (100) [M+MeOH+Na]⁺; **Schmelzpunkt**: 94 °C.

4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzylalkohol (**99**)

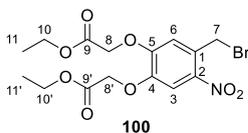
Nach einer Vorschrift von *Ni et al.*^[113] wurde in einem CH₂Cl₂/Ethanol/Essigsäure-Gemisch (35:5:1, 10 mL) 4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzaldehyd (**98**) (881 mg, 2.48 mmol, 1.00 Äq) vorgelegt. Nach Kühlung auf 0–5 °C erfolgte die Zugabe von NaBH₄ (188 mg, 4.96 mmol, 2.00 Äq.) und die Reaktionslösung wurde für 3 h bei 0–5 °C gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (Toluol/EtOAc 80:20), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 1 N wässriger HCl-Lösung (2 mL). Im Anschluss daran wurde die Lösung mit EtOAc (50 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (Toluol/EtOAc 80:20) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 649 mg (1.82 mmol, 73 %) des gelben Feststoffes **99** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[113]



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.30 (t, $^3J_{11,10}$ oder $11',10' = 7.2$ Hz, 3 H, 11-H oder 11'-H), 1.31 (t, $^3J_{11,10}$ oder $11',10' = 7.2$ Hz, 3 H, 11-H oder 11'-H), 2.13 (br, 1 H, OH), 4.28 (q, $^3J_{10,11}$ oder $10',11' = 7.2$ Hz, 2 H, 10-H oder 10'-H), 4.28 (q, $^3J_{10,11}$ oder $10',11' = 7.2$ Hz, 2 H, 10-H oder 10'-H), 4.77 (s, 2 H, 8-H oder 8'-H), 4.83 (s, 2 H, 8-H oder 8'-H), 4.94 (s, 2 H, 7-H), 7.17 (s, 1 H, 3-H oder 6-H), 7.70 (s, 1 H, 3-H oder 6-H); **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.3 (C-11 oder C-11'), 14.3 (C-11 oder C-11'), 61.8 (C-10 oder C-10'), 61.9 (C-10 oder C-10'), 62.5 (C-7), 66.2 (C-8'), 66.6 (C-8), 112.0 (C-3 oder C-6), 113.5 (C-3 oder C-6), 133.6 (C-1 oder C-2), 140.4 (C-1 oder C-2), 146.5 (C-5), 152.7 (C-4), 167.8 (C-9'), 168.1 (C-9); **R_f** = 0.32 (Toluol/EtOAc 80:20); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2992, 1742, 1580, 1507, 1282, 1193, 1072, 1019, 792; **MS** (ESI, positiv-Ion): m/z (%) = 380.2 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 737.3 (5) $[2\text{M}+\text{Na}]^+$; **Schmelzpunkt**: 76 °C.

4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzylbromid (**100**)

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Tietze et al.*^[280] wurden der Alkohol **99** (1.00 g, 2.80 mmol, 1.00 Äq.) und Tetrabrommethan (1.16 g, 3.50 mmol, 1.25 Äq.) in trockenem Dichlormethan (14 mL, 0.20 M) in einem sekurierten Schlenkcolben unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. In einem zweiten sekurierten Schlenkcolben wurde Triphenylphosphan (918 mg, 3.50 mmol, 1.25 Äq.) in trockenem Dichlormethan (14 mL, 0.25 M) unter Stickstoff-Atmosphäre gelöst. Beide Lösungen wurden auf 0 °C gekühlt und anschließend wurde die kalte Triphenylphosphan-Lösung tropfenweise zum gelösten Alkohol **99** hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 10 min bei 0 °C und danach 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 80:20), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Nach Zugabe von Kieselgel wurde die Lösung am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 65:35) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 1.13 g (2.69 mmol, 96 %) des farblosen Feststoffes **100** erhalten.

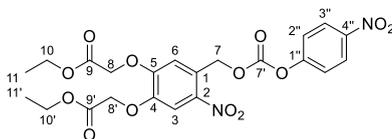


$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.31 (t, $^3J_{11,10} = 7.1$ Hz, 3 H, 11-H), 1.31 (t, $^3J_{11',10'} = 7.1$ Hz, 3 H, 11'-H), 4.29 (q, $^3J_{10,11;10',11'} = 7.1$ Hz, 4 H, 10-H, 10'-H), 4.78 (2, 2 H, 8'-H), 4.81 (s, 2 H, 7-H), 4.83 (s, 2 H, 8-H), 6.94 (s, 1 H, 6-H), 7.65 (s, 1 H, 3-H); **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] =

14.3 (C-11), 14.3 (C-11'), 29.7 (C-7), 61.9 (C-10), 62.0 (C-10'), 66.5 (C-8), 66.5 (C-8'), 112.1 (C-3), 117.2 (C-6), 128.5 (C-2), 141.2 (C-1), 147.6 (C-5), 151.9 (C-4), 167.7 (C-9), 167.8 (C-9'); $R_f = 0.62$ (PE/EtOAc 60:40); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2992, 1739, 1616, 1581, 1522, 1479, 1449, 1409, 1380, 1356, 1339, 1289, 1264, 1202, 1184, 1120, 1080, 1043, 1025, 930, 881, 798, 758, 732, 672; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_8\text{NBrNa}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 442.0108; gef. 442.0108; **Schmelzpunkt**: 118°C.

4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzyl-(4-nitrophenyl)carbonate (102)

In einem sekurierten Schlenkkolben wurde 4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzylalkohol **99** (950 mg, 2.66 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem Dichlormethan (5.0 mL, 0.53 M) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Es wurde Diisopropylethylamin (975 μL , 5.60 mmol, 2.11 Äq.) hinzugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. In einem zweiten sekurierten Schlenkkolben wurde 4-Nitrophenylchlorformiat (1.13 g, 5.61 mmol, 2.11 Äq.) in trockenem Dichlormethan (5.0 mL, 1.1 M) unter Stickstoff-Atmosphäre gelöst. Die 4-Nitrophenylchlorformiat-Lösung wurde tropfenweise zum gelösten Alkohol **99** hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 70:30), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Anschließend wurde die Lösung nacheinander mit 0.01 M wässriger HCl-Lösung und gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO_4 getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingeeengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 70:30) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 1.16 g (2.22 mmol, 83 %) des gelben Feststoffes **102** erhalten.



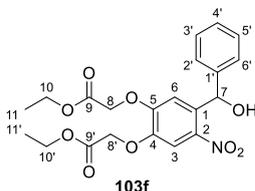
102

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.27 (t, $^3J_{11,10}$ oder $11',10' = 7.1$ Hz, 3 H, 11-H oder 11'-H), 1.31 (t, $^3J_{11,10}$ oder $11',10' = 7.1$ Hz, 3 H, 11-H oder 11'-H), 4.25 (q, $^3J_{10,11}$ oder $10',11' = 7.1$ Hz, 2 H, 10-H oder 10'-H), 4.29 (q, $^3J_{10,11}$ oder $10',11' = 7.1$ Hz, 2 H, 10-H oder 10'-H), 4.80 (s, 2 H, 8'-H), 4.85 (s, 2 H, 8-H), 5.67 (s, 2 H, 7-H), 7.10 (s, 1 H, 6-H), 7.42 (mc, 2 H, 2''-H) 7.74 (s, 1 H, 3-H), 8.29 (mc, 2 H, 3''-H); **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.2, 14.3 (C-11, C-11'), 61.9 (C-10, C-10'), 66.5 (C-8'), 66.7 (C-8), 67.3 (C-7), 112.1 (C-3), 114.4 (C-6), 121.9 (C-2''), 125.5 (C-3''), 126.4 (C-1), 140.9 (C-2), 145.7 (C-4''), 147.5 (C-4), 152.2 (C-7'), 152.5 (C-5), 155.5 (C-1''), 167.8, 167.8 (C-9, C-9'); $R_f = 0.29$ (PE/EtOAc 70:30); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2925, 2855, 1754, 1617, 1583, 1523, 1444, 1379,

1345, 1289, 1203, 1083, 1013, 859, 797, 753, 716, 665, 496; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $C_{22}H_{26}N_3O_{13}^+$ $[M+NH_4]^+$: 540.1460; gef. 540.1466; **Schmelzpunkt**: 113–114 °C.

1-[4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrophenyl]phenylmethanol (**103f**)

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Lankalapalli et al.*^[283] wurde 4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzaldehyd (**98**) (1.00 g, 2.81 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem THF (40 mL, 70 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt und auf -78 °C gekühlt. Anschließend wurde Phenylmagnesiumbromid (6.0 mL, 1.0 M in THF, 5.6 mmol, 2.00 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 30 min bei -78 °C gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 70:30). Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch die portionsweise Zugabe von 1 N wässriger HCl-Lösung (40 mL). Im Anschluss daran wurde die Lösung mit Diethylether (2×50 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 75:25) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 550 mg (1.27 mmol, 45 %) des gelben Öles **103f** erhalten.

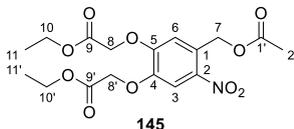


1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 1.26 (t, $^3J_{11,10} = 7.1$ Hz, 3 H, 11-H), 1.30 (t, $^3J_{11',10'} = 7.1$ Hz, 3 H, 11'-H), 2.67 (brs, 1 H, 7-OH), 4.21 (q, $^3J_{10,11} = 7.1$ Hz, 2 H, 10-H), 4.28 (q, $^3J_{10',11'} = 7.1$ Hz, 2 H, 10'-H), 4.76 (s, 4 H, 8-H, 8'-H), 6.48 (s, 1 H, 7-H), 7.18 (s, 1 H, 6-H), 7.26–7.35 (m, 5 H, 2'-H, 3'-H, 4'-H), 7.59 (s, 1 H, 3-H); **^{13}C -NMR** (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 14.3, 14.3 (C-11, C-11'), 61.8, 61.9 (C-10, C-10'), 66.1, 66.6 (C-8, C-8'), 71.4 (C-7), 111.8 (C-3), 113.6 (C-6), 127.1, 128.2, 128.7 (C-2', C-3', C-4'), 135.1 (C-1), 141.1 (C-1'), 141.6 (C-2), 146.6 (C-4), 152.1 (C-5), 167.8, 168.1 (C-9, C-9'); **R_f** = 0.07 (PE/EtOAc 75:25); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3455, 2970, 1739, 1518, 1443, 1366, 1217, 1126, 1069, 525; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $C_{21}H_{27}N_2O_9^+$ $[M+NH_4]^+$: 451.1711; gef. 451.1707.

4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzylacetat (**145**)

Zu einer Lösung von 4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzylalkohol (**99**) (155 mg, 433 μ mol, 1.00 Äq.) in Essigsäureanhydrid (1.03 mL, 420 mM) in einem Mikrowellengefäß wurde Pyridin (35 μ L, 0.43 mmol, 1.0 Äq.) gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 5 min bei 60 °C in einem Mikrowellenreaktor unter Rühren erhitzt. Der vollständige Umsatz wurde mittels DC (PE/EtOAc 70:30) ermittelt. Die Reaktionslösung wurde mit CH_2Cl_2 verdünnt. Die organische Phase wurde mit

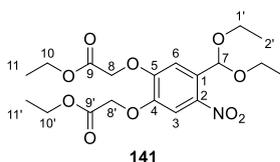
gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über MgSO₄ wurde die Lösung am Rotationsverdampfer eingeengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 70:30) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 140 mg (351 μmol, 81 %) des gelben Feststoffes **145** erhalten.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.29 (t, ³J_{11,10} oder 11',10' = 7.1 Hz, 3 H, 11-H oder 11'-H), 1.31 (t, ³J_{11,10} oder 11',10' = 7.1 Hz, 3 H, 11-H oder 11'-H), 2.16 (s, 3 H, 2'-H), 4.27 (q, ³J_{10,11} oder 10',11' = 7.1 Hz, 2 H, 10-H oder 10'-H), 4.28 (q, ³J_{10,11} oder 10',11' = 7.1 Hz, 2 H, 10-H oder 10'-H), 4.77 (s, 2 H, 8'-H), 4.82 (s, 2 H, 8-H), 5.47 (s, 2 H, 7-H), 6.98 (s, 1 H, 6-H), 7.71 (s, 1 H, 3-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.3 (C-11, C-11'), 21.0 (C-2'), 61.9, 61.9 (C-10, C-10'), 63.0 (C-7), 66.5 (C-8'), 66.6 (C-8), 111.9 (C-3), 113.9 (C-6), 128.3 (C-1), 140.8 (C-2), 146.9 (C-4), 152.3 (C-5), 167.9, 167.9 (C-9, C-9'), 170.3 (C-1'); **R_f** = 0.24 (PE/EtOAc 70:30); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2984, 1741, 1521, 1583, 1521, 1443, 1379, 1333, 1287, 1191, 1081, 1030, 872, 820, 797, 756, 608; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₇H₂₅N₂O₁₀⁺ [M+NH₄]⁺: 417.1504; gef. 417.1509; **Schmelzpunkt**: 89 °C.

4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzaldehyd-diethylacetal (141)

In einem sekurierten Schlenk Kolben wurde 4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzaldehyd (**98**) (3.00 g, 8.44 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem Ethanol (50 mL, 0.17 M) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Nach der Zugabe von Triethylorthoformiat (1.88 g, 12.6 mmol, 1.50 Äq.) und Pyridinium-*p*-toluolsulfonat (424 mg, 1.69 mmol, 20.0 mol%) wurde die Reaktionslösung für 19 h zum Rückfluss erhitzt, wobei ein mit Molekularsieb (3 Å) gefüllter Wasserabscheider für eine konstante Entfernung des entstehenden Wassers verwendet wurde. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 80:20), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Anschließend wurde die Lösung mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet. Die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingeeengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 85:15) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 3.22 g (7.51 mmol, 89 %) des gelben Feststoffes **141** erhalten.

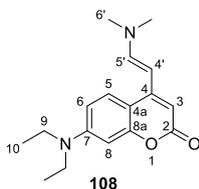


¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.12 (t, ³*J*_{2',1'} = 7.1 Hz, 6 H, 2'-H), 1.22 (t, ³*J*_{11,10;11',10'} = 7.1 Hz, 6 H, 11-H; 11'-H), 3.50 (dq, ²*J*_{1'a,1'b} = 9.3 Hz, ³*J*_{1'a,2'} = 7.1 Hz, 2 H, 1'-H_a), 3.62 (dq, ²*J*_{1'b,1'a} = 9.3 Hz, ³*J*_{1'b,2'} = 7.1 Hz, 2 H, 1'-H_b), 4.18 (q, ³*J*_{10,11} oder ³*J*_{10',11'} = 7.1 Hz, 2 H, 10-H oder 10'-H), 4.19 (q, ³*J*_{10,11} oder ³*J*_{10',11'} = 7.1 Hz, 2 H, 10-H oder 10'-H), 4.96 (s, 2 H, 8'-H), 4.99 (s, 2 H, 8-H), 5.88 (s, 1 H, 7-H), 7.09 (s, 1 H, 6-H), 7.57 (s, 1 H, 3-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 14.0 (C-11; C-11'), 14.9 (C-2'), 60.8, 60.9 (C-10, C-10'), 65.5, 65.6 (C-8; C-8'), 97.7 (C-7), 110.6 (C-3), 111.5 (C-6), 127.9 (C-1), 141.4 (C-2), 146.5 (C-4), 150.2 (C-5), 168.1, 168.1 (C-9; C-9'); **R_f** = 0.25 (PE/EtOAc 80:20); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2981, 1755, 1692, 1581, 1526, 1446, 1346, 1291, 1196, 1176, 1080, 878, 796; **HRMS** (ESI): *m/z* ber. für C₁₉H₂₇NO₁₀⁺ [M+NH₄]⁺: 447.1973; gef. 447.1972; **Schmelzpunkt**: 62.1 °C.

6.5 Synthesevorschriften zur Darstellung der (Cumarin-4-yl)methyl-Derivate

(E)-7-(Diethylamino)-4-(2-(dimethylamino)vinyl)cumarin (108)

Nach einer Vorschrift von *Weinrich et al.*^[287] wurde Cumarin **106** (15.0 g, 64.9 mmol, 1.00 Äq.) in DMF (150 mL, 433 mM) gelöst. Nach der Zugabe von DMF-DMA (17.2 mL, 130 mmol, 2.00 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 23 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt, mit CH₂Cl₂ verdünnt und mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Es wurden 18.4 g (64.3 mmol, 99 %) des braunen Feststoffes **108** erhalten. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung in den nachfolgenden Reaktionen eingesetzt. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[287]

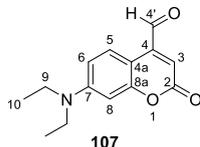


¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.18 (t, ³J_{10,9} = 7.2 Hz, 6 H, 10-H), 2.98 (s, 6 H, 6'-H), 3.38 (q, ³J_{9,10} = 7.2 Hz, 4 H, 9-H), 5.21 (d, ³J_{4',5'} = 13 Hz, 1 H, 4'-H), 5.84 (s, 1 H, 3-H), 6.47 (d, ⁴J_{8,6} = 2.6 Hz, 1 H, 8-H), 6.54 (dd, ³J_{6,5} = 9.0 Hz, ⁴J_{6,8} = 2.6 Hz, 1 H, 6-H), 7.20 (d, ³J_{5',4'} = 13.0 Hz, 1 H, 5'-H), 7.51 (d, ³J_{5,6} = 9.0 Hz, 1 H, 5-H); ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.6 (C-10), 41.0 (C-6'), 44.7 (C-9), 87.5 (C-4'), 93.5 (C-3), 98.2 (C-8), 108.0 (C-6), 108.2 (C-4a), 124.9 (C-5), 146.7 (C-5'), 150.2 (C-7), 152.4 (C-4), 156.5 (C-8a), 163.5 (C-2); **R_f** = 0.33 (CH₂Cl₂/EtOAc 70:30); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 1676, 1606, 1566, 1375, 1234, 1114, 1054, 974, 772, 625; **MS** (ESI, positiv-ion): m/z (%) = 287.3 (100) [M+H]⁺; **Schmelzpunkt**: 183 °C, Lit.^[392]: 184–187 °C.

7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-carbaldehyd (107)

Nach einer Vorschrift von *Weinrich et al.*^[287] wurde Cumarin **108** (18.4 g, 64.3 mmol, 1.00 Äq.) in THF/H₂O (1:1, 110 mL, 585 mM) gelöst. Nach der Zugabe von NaIO₄ (41.3 g, 193 mmol, 3.00 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 50:50), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Der im Verlauf der Reaktion ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert und mit Ethylacetat gewaschen. Die Lösung wurde eingengt bis THF vollständig entfernt wurde und mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die

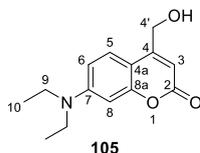
vereinten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Es wurden 15.7 g (64.1 mmol, quant.) des braunen Feststoffes **107** erhalten. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung in den nachfolgenden Reaktionen eingesetzt. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[287]



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.22 (t, $^3J_{10,9} = 7.1$ Hz, 6 H, 10-H), 3.43 (q, $^3J_{9,10} = 7.1$ Hz, 4 H, 9-H), 6.45 (s, 1 H, 3-H), 6.53 (d, $^4J_{8,6} = 2.6$ Hz, 1 H, 8-H), 6.63 (dd, $^3J_{6,5} = 9.2$ Hz, $^4J_{6,8} = 2.6$ Hz, 1 H, 6-H), 8.31 (d, $^3J_{5,6} = 9.2$ Hz, 1 H, 5-H), 10.03 (s, 1 H, 4'-H); **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 12.5 (C-10), 45.0 (C-9), 97.9 (C-8), 104.0 (C-4a), 109.8 (C-6), 117.6 (C-3), 127.2 (C-5), 144.0 (C-8a), 151.0 (C-7), 157.5 (C-4), 162.0 (C-2), 192.6 (C-4'); **R_f** = 0.29 (PE/EtOAc 50:50); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2972, 1703, 1607, 1582, 1518, 1424, 1376, 1354, 1267, 1228, 1196, 1142, 1111, 1077, 1053, 901, 822, 780, 732, 640, 475; **MS** (ESI, positiv-Ion): m/z (%) = 278.3 (100) [$\text{M} + \text{CH}_3\text{OH} + \text{H}$] $^+$; **Schmelzpunkt**: 77.7 °C, Lit.^[393]: 78–80 °C.

7-(Diethylamino)-4-(hydroxymethyl)cumarin (**105**)

Nach einer Vorschrift von Weinrich *et al.*^[287] wurde Cumarin **107** (19.0 g, 77.4 mmol, 1.00 Äq.) in THF (90 mL, 0.86 M) gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und NaBH_4 (5.86 g, 155 mmol, 2.00 Äq.) wurde bei 0 °C portionsweise hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 3 h gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 50:50), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Die Reaktion wurde durch langsame Zugabe von ges. NaHCO_3 -Lösung abgebrochen. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingengt. Es wurden 18.7 g (75.4 mmol, 97 %) des Feststoffes **105** erhalten. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung in den nachfolgenden Reaktionen eingesetzt. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[287]

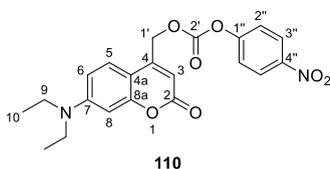


$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.20 (t, $^3J_{10,9} = 7.1$ Hz, 6 H, 10-H), 1.93 (t, $^3J_{\text{OH},4'} = 5.8$ Hz, 1 H, 4'-OH), 3.41 (q, $^3J_{9,10} = 7.1$ Hz, 4 H, 9-H), 4.83 (dd, $^3J_{4',\text{OH}} = 5.8$ Hz, $^4J_{4',3} = 1.3$ Hz, 2 H, 4'-H),

6.25 (t, $^4J_{3,4'} = 1.3$ Hz, 1 H, 3-H), 6.51 (d, $^4J_{8,6} = 2.6$ Hz, 1 H, 8-H), 6.56 (dd, $^3J_{6,5} = 9.0$ Hz, $^4J_{6,8} = 2.6$ Hz, 1 H, 6-H), 7.32 (d, $^3J_{5,6} = 9.0$ Hz, 1 H, 5-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 12.5 (C-10), 44.8 (C-9), 60.8 (C-4'), 97.7 (C-8), 105.2 (C-3), 106.4 (C-4a), 108.7 (C-6), 124.5 (C-5), 150.6 (C-7), 155.6 (C-4), 156.1 (C-8a), 163.2 (C-2); $R_f = 0.36$ (PE/EtOAc 50:50); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2013, 2001, 1000; **MS** (ESI, positiv-Ion): m/z (%) = 254.3 (100) $[\text{M}+\text{Li}]^+$; **Schmelzpunkt**: 139.9 °C, Lit.^[394, 395]: 127.8–148 °C.

[7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl]methyl-(4-nitrophenyl)carbonat (110)

In Anlehnung an Vorschriften von *Fomina et al.*^[396] und *Gao et al.*^[397] wurde in einem sekurierten Schlenkcolben Cumarin **105** (2.00 g, 8.09 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem Dichlormethan (10 mL, 0.80 M) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Es wurde Diisopropylethylamin (2.82 mL, 16.2 mmol, 2.00 Äq.) hinzugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. In einem zweiten sekurierten Schlenkcolben wurde 4-Nitrophenylchlorformiat (3.26 g, 16.2 mmol, 2.00 Äq.) in trockenem Dichlormethan (10 mL, 1.6 M) unter Stickstoff-Atmosphäre gelöst. Die 4-Nitrophenylchlorformiat-Lösung wurde mittels einer Spritzenpumpe tropfenweise über einen Zeitraum von 2 h zum gelösten Alkohol **105** hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 19 h unter Ausschluss von Licht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 60:40), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Anschließend wurde die Lösung nacheinander mit 1 M wässriger HCl-Lösung (20 mL) und gesättigter NaHCO_3 -Lösung (3×20 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO_4 getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingengt. Die säulenchromatographische Isolation ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/n$ -Pentan 98:2) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 1.48 g (3.60 mmol, 44 %) des gelben Feststoffes **110** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[397]

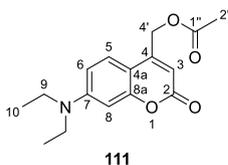


$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.22 (t, $^3J_{10,9} = 7.1$ Hz, 6 H, 10-H), 3.43 (q, $^3J_{9,10} = 7.1$ Hz, 4 H, 9-H), 5.40 (s, 2 H, 1'-H) 6.22 (s, 1 H, 3-H), 6.54 (d, $^4J_{8,6} = 2.6$ Hz, 1 H, 8-H), 6.61 (dd, $^3J_{6,5} = 9.0$ Hz, $^4J_{6,8} = 2.6$ Hz, 1 H, 6-H), 7.31 (d, $^3J_{5,6} = 9.0$ Hz, 1 H, 5-H), 7.42 (d, $^3J_{2'',3''} = 8.6$ Hz, 2 H, 2''-H), 8.30 (d, $^3J_{3'',2''} = 8.6$ Hz, 2 H, 3''-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 12.5 (C-10), 44.9 (C-9), 65.9 (C-1'), 98.0 (C-8), 105.7 (C-4a), 107.0 (C-3), 108.9 (C-6), 121.8 (C-2''), 124.4 (C-5), 125.5 (C-3''), 145.7 (C-4''), 147.9 (C-4), 151.0 (C-7), 152.3 (C-2'), 155.3 (C-1''), 156.5 (C-8a), 161.7 (C-2); $R_f = 0.10$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/n$ -Pentan 98:2); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2968, 1772, 1708, 1591, 1520, 1489, 1446, 1423, 1335, 1268, 1218, 1194, 1142, 1109, 1090, 1040, 986, 956, 856, 838, 816, 792, 750, 704,

679, 567, 528, 493, 467; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $C_{21}H_{21}N_2O_7^+$ $[M+H]^+$: 413.1343; gef. 413.1340; **Schmelzpunkt**: 159.9 °C.

[7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl]methylacetat (111)

Nach einer Vorschrift von *Gandioso et al.*^[188] wurde Cumarin **105** (500 mg, 2.02 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem CH_2Cl_2 (35 mL, 58 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre gelöst. DMAP (299 mg, 2.43 mmol, 1.20 Äq.) und Essigsäure (139 μ L, 2.43 mmol, 1.20 Äq.) wurden hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt. DCC (501 mg, 2.43 mmol, 1.20 Äq.) wurde bei 0 °C hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde zunächst für 10 min bei 0 °C und anschließend für 20 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 50:50), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Die Reaktionslösung wurde filtriert und das Filtrat wurde nachfolgend mit 1 M HCl-Lösung und gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Die vereinten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingeeengt. Die säulenchromatographische Isolation (CH_2Cl_2) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 518 mg (1.79 mmol, 89 %) des roten Feststoffes **111** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[188]

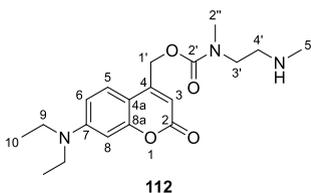


¹H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 1.19 (t, $^3J_{10,9} = 7.1$ Hz, 6 H, 10-H), 2.18 (s, 3 H, 2''-H), 3.40 (q, $^3J_{9,10} = 7.1$ Hz, 4 H, 9-H), 5.20 (d, $^4J_{4,3} = 1.3$ Hz, 2 H, 4'-H) 6.11 (t, $^4J_{3,4'} = 1.3$ Hz, 1 H, 3-H), 6.50 (d, $^4J_{8,6} = 2.6$ Hz, 1 H, 8-H), 6.56 (dd, $^3J_{6,5} = 9.0$ Hz, $^4J_{6,8} = 2.6$ Hz, 1 H, 6-H), 7.27 (d, $^3J_{5,6} = 9.0$ Hz, 1 H, 5-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 12.5 (C-10), 20.9 (C-2''), 44.9 (C-9), 61.4 (C-4'), 97.9 (C-8), 106.1 (C-4a), 106.5 (C-3), 108.8 (C-6), 124.5 (C-5), 149.5 (C-4), 150.8 (C-7), 156.4 (C-8a), 162.0 (C-2), 170.3 (C-1''); **R_f** = 0.57 (PE/EtOAc 50:50); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2974, 1748, 1706, 1597, 1527, 1440, 1415, 1376, 1337, 1272, 1240, 1196, 1140, 1074, 1013, 933, 841, 823, 811, 666, 598, 560; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $C_{16}H_{20}NO_4^+$ $[M+H]^+$: 290.1387; gef. 290.1389; **Schmelzpunkt**: 108.3 °C, Lit.^[398]: 111–113 °C.

{[7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl]methyl}methyl-[2-(methylamino)ethyl]-carbamat (112)

Nach einer Vorschrift von *Fomina et al.*^[396] wurde Cumarin **110** (50 mg, 0.12 mmol, 1.0 Äq.) in CH_2Cl_2 (1.3 mL, 92 mM) vorgelegt. Anschließend erfolgte die tropfenweise Zugabe zu einer 0 °C kalten Lösung von *N,N'*-Dimethylethylendiamin (0.14 mL, 1.2 mmol, 10 Äq.) in CH_2Cl_2 (2.6 mL,

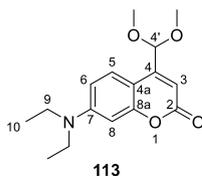
0.47 M) über einen Zeitraum von 30 min. Die Reaktionslösung wurde für weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 60:40), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat gelöst und nacheinander mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Die säulenchromatographische Isolation (EtOAc/MeOH/ NEt_3 87:10:3) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 27 mg (75 μmol , 62 %) des viskosen, gelben Öles **112** erhalten.



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.19 (t, $^3J_{10,9} = 7.1$ Hz, 6 H, 10-H), 2.42–2.51 (m, 4 H, 5'-H, NH), 2.80 (m, 2 H, 4'-H), 2.95–3.04 (m, 3 H, 2''-H), 3.39 (q, $^3J_{9,10} = 7.1$ Hz, 4 H, 9-H), 3.44–3.49 (m, 2 H, 3'-H), 5.23 (s, 2 H, 1'-H), 6.10 (s, 1 H, 3-H), 6.49 (d, $^4J_{8,6} = 2.6$ Hz, 1 H, 8-H), 6.55 (dd, $^3J_{6,5} = 9.0$ Hz, $^4J_{6,8} = 2.6$ Hz, 1 H, 6-H), 7.27–7.31 (m, 1 H, 5-H); **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 12.5 (C-10), 34.8, 35.5 (C-2''), 36.1, 36.4 (C-5'), 44.8 (C-9), 48.6, 48.9 (C-3'), 49.3, 49.7 (C-4'), 62.5, 62.6 (C-1'), 97.9 (C-8), 105.8 (C-4a), 106.1, 106.2 (C-3), 108.7 (C-6), 124.4, 124.5 (C-5), 150.6, 150.7 (C-4, C-7), 155.6, 155.9 (C-2'), 156.3 (C-8a), 162.2 (C-2); $R_f = 0.15$ (EtOAc/MeOH/ NEt_3 87:10:3); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2960, 2926, 2859, 1709, 1605, 1526, 1422, 1358, 1275, 1197, 1143, 1078, 821, 767; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_4^+$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 362.2074; gef. 362.2077.

7-(Diethylamino)-4-(dimethoxymethyl)cumarin (**113**)

Cumarin **107** (50 mg, 0.20 mmol, 1.0 $\text{\AA}q.$) wurde in trockenem CH_2Cl_2 (1.0 mL, 0.20 M) unter Stickstoff-Atmosphäre gelöst. Trimethylorthoformiat (34 μL , 0.31 mmol, 1.5 $\text{\AA}q.$) und *p*-Toluolsulfonsäure Monohydrat (7.8 mg, 41 μmol , 0.20 $\text{\AA}q.$) wurden hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 16 h unter Ausschluss von Licht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert und die vereinten organischen Phasen wurden über NaSO_4 getrocknet. Die säulenchromatographische Isolation (CH_2Cl_2) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 26 mg (89 μmol , 44 %) des rotbraunen Feststoffes **113** erhalten.

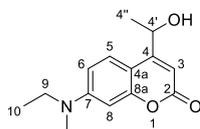


113

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Aceton- d_6): δ [ppm] = 1.20 (t, $^3J_{10,9} = 7.1$ Hz, 6 H, 10-H), 3.37 (s, 6 H, OCH $_3$), 3.50 (q, $^3J_{9,10} = 7.1$ Hz, 4 H, 9-H), 5.54 (s, 1 H, 4'-H), 6.13 (s, 1 H, 3-H), 6.50 (d, $^4J_{8,6} = 2.6$ Hz, 1 H, 8-H), 6.70 (dd, $^3J_{6,5} = 9.1$ Hz, $^4J_{6,8} = 2.6$ Hz, 1 H, 6-H), 7.69 (d, $^3J_{5,6} = 9.1$ Hz, 1 H, 5-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, Aceton- d_6): δ [ppm] = 12.7 (C-10), 45.2 (C-9), 53.4 (OCH $_3$), 98.0 (C-8), 100.9 (C-4'), 106.6 (C-4a), 108.3 (C-3), 109.4 (C-6), 127.6 (C-5), 151.1 (C-4), 151.4 (C-7), 157.7 (C-8a), 161.6 (C-2); $R_f = 0.35$ (PE/EtOAc 80:20); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm $^{-1}$] = 2967, 2922, 1709, 1599, 1523, 1417, 1354, 1332, 1270, 1230, 1191, 1145, 1112, 1052, 996, 905, 848, 811, 783, 741, 704, 683, 641, 622, 535, 478; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C $_{16}$ H $_{22}$ NO $_4^+$ [M+H] $^+$: 292.1543; gef. 292.1547; **Schmelzpunkt**: 91 °C.

7-(Diethylamino)-4-(1-hydroxyethyl)cumarin (114)

Nach einer Vorschrift von *Gandioso et al.*^[187] wurde Cumarin **107** (1.00 g, 4.08 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem THF (20 mL, 0.20 M) unter Stickstoff-Atmosphäre gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf -78 °C gekühlt und Methylmagnesiumchlorid in THF (3.0 M) (2.3 mL, 6.9 mmol, 1.7 Äq.) wurde bei -78 °C tropfenweise hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 2 h gerührt, bevor erneut Methylmagnesiumchlorid in THF (3.0 M) (2.3 mL, 6.9 mmol, 1.7 Äq.) bei -78 °C tropfenweise hinzugegeben wurde. Die Reaktionslösung wurde für weitere 2 h bei -78 °C gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 70:30), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Die Reaktion wurde durch langsame Zugabe von ges. NH $_4$ Cl-Lösung (20 mL) abgebrochen. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur aufgetaut und mit Ethylacetat (3×50 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO $_4$ getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingeeengt. Die säulenchromatographische Isolation (CH $_2$ Cl $_2$ → CH $_2$ Cl $_2$ /MeOH 95:5) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 737 mg (2.82 mmol, 69 %) des braunen Feststoffes **114** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[187]

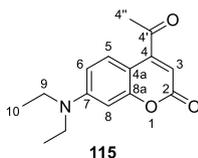


114

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.20 (t, ³J_{10,9} = 7.1 Hz, 6 H, 10-H), 1.57 (d, ³J_{4',4''} = 6.6 Hz, 3 H, 4''-H), 2.14 (brs, 1 H, 4'-OH), 3.41 (q, ³J_{9,10} = 7.1 Hz, 4 H, 9-H), 5.15 (q, ³J_{4',4''} = 6.6 Hz, 2 H, 4'-H), 6.28 (s, 1 H, 3-H), 6.53 (s, 1 H, 8-H), 6.60 (d, ³J_{6,5} = 9.0 Hz, 1 H, 6-H), 7.43 (d, ³J_{5,6} = 9.0 Hz, 1 H, 5-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.5 (C-10), 23.7 (C-4''), 44.7 (C-9), 65.8 (C-4'), 97.8 (C-8), 104.3 (C-3), 106.3 (C-4a), 108.6 (C-6), 125.2 (C-5), 150.4 (C-7), 156.4 (C-8a), 160.2 (C-4), 163.2 (C-2); **R_f** = 0.34 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3407, 2972, 2924, 1704, 1612, 1524, 1417, 1377, 1356, 1271, 1233, 1199, 1120, 1077, 1023, 825, 753; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₅H₂₀NO₃⁺ [M+H]⁺: 262.1438; gef. 262.1442; **Schmelzpunkt**: 104–105 °C.

4-Acetyl-7-(diethylamino)cumarin (115)

Cumarin **114** (630 mg, 2.41 mmol, 1.00 Äq.) wurde in trockenem CH₂Cl₂ (53 mL, 45 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre gelöst. Dess-Martin-Periodinan (1.23 g, 2.89 mmol, 1.20 Äq.) wurde hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 45 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 60:40), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Die Reaktionslösung wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ extrahiert und die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 70:30) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 460 mg (1.77 mmol, 74 %) des orangenen Feststoffes **115** erhalten.

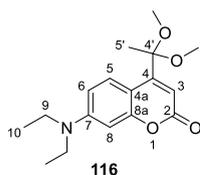


¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.21 (t, ³J_{10,9} = 7.1 Hz, 6 H, 10-H), 2.57 (s, 3 H, 4''-H), 3.42 (q, ³J_{9,10} = 7.1 Hz, 4 H, 9-H), 6.26 (s, 1 H, 3-H), 6.52 (d, ³J_{8,6} = 2.6 Hz, 1 H, 8-H), 6.59 (dd, ³J_{6,5} = 9.2 Hz, ⁴J_{6,8} = 2.6 Hz, 1 H, 6-H), 7.69 (d, ³J_{5,6} = 9.2 Hz, 1 H, 5-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.5 (C-10), 29.6 (C-4''), 45.1 (C-9), 98.3 (C-8), 104.5 (C-4a), 109.1 (C-3), 109.6 (C-6), 127.7 (C-5), 150.0 (C-4), 150.8 (C-7), 157.3 (C-8a), 162.0 (C-2), 200.0 (C-4'); **R_f** = 0.60 (PE/EtOAc 60:40); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2962, 2925, 2862, 1720, 1615, 1583, 1521, 1417, 1355, 1267, 1221, 1125, 1076, 1023, 824, 618; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₅H₁₈NO₃⁺ [M+H]⁺: 260.1281; gef. 260.1287; **Schmelzpunkt**: 81–82 °C.

7-(Diethylamino)-4-(1,1-dimethoxyethyl)cumarin (116)

In Anlehnung an eine Vorschrift von Wang *et al.*^[399] wurde Cumarin **115** (300 mg, 1.16 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem MeOH (5.0 mL, 0.23 M) unter Stickstoff-Atmosphäre gelöst.

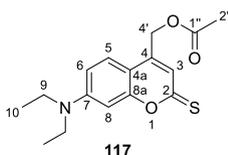
Trimethylorthoformiat (1.27 mL, 11.6 mmol, 10.0 Äq.) und *p*-Toluolsulfonsäure Monohydrat (44 mg, 0.23 mmol, 0.20 Äq.) wurden hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde auf 60 °C erhitzt. Anschließend wurde für 2 d unter Ausschluss von Licht bei 60 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat extrahiert und die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 90:10 → 70:30) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 323 mg (1.06 mmol, 91 %) des Feststoffes **116** erhalten. Darüber hinaus wurden 27 mg (0.10 mmol, 9 %) des Eduktes **115** reisoliert.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.20 (t, ³J_{10,9} = 7.1 Hz, 6 H, 10-H), 1.63 (s, 3 H, 5'-H), 3.22 (s, 6 H, OCH₃), 3.40 (q, ³J_{9,10} = 7.1 Hz, 4 H, 9-H), 6.44 (s, 1 H, 3-H), 6.52 (s, 1 H, 8-H), 6.58 (d, ³J_{6,5} = 9.1 Hz, 1 H, 6-H), 7.95 (d, ³J_{5,6} = 9.1 Hz, 1 H, 5-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.6 (C-10), 24.3 (C-5'), 44.9 (C-9), 49.2 (OCH₃), 98.1 (C-8), 100.5 (C-4'), 105.9 (C-4a), 108.9 (C-6), 109.3 (C-3), 127.4 (C-5), 150.0 (C-7), 155.3 (C-4), 156.9 (C-8a), 162.5 (C-2); **R_f** = 0.59 (PE/EtOAc 70:30); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2970, 2931, 2832, 1712, 1614, 1590, 1520, 1409, 1372, 1357, 1271, 1251, 1231, 1199, 1183, 1159, 1123, 1043, 1020, 905, 862, 825, 807, 791, 716, 679, 641, 537, 481; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₇H₂₄NO₄⁺ [M+H]⁺: 306.1700; gef. 306.1706.

[7-(Diethylamino)-2-thio-2H-chromen-4-yl]methylacetat (117)

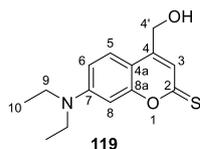
Nach einer Vorschrift von *Gandioso et al.*^[188] wurde Cumarin **111** (2.00 g, 6.91 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem Toluol (237 mL, 29.1 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre gelöst. *Lawessons* Reagenz (1.82 g, 4.49 mmol, 0.650 Äq.) wurde hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 12 h unter Ausschluss von Licht zum Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung wurde bei vermindertem Druck eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (CH₂Cl₂) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 1.78 g (5.83 mmol, 84 %) des orangen Feststoffes **117** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[188]



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.22 (t, ³J_{10,9} = 7.1 Hz, 6 H, 10-H), 2.19 (s, 3 H, 2''-H), 3.43 (q, ³J_{9,10} = 7.1 Hz, 4 H, 9-H), 5.18 (d, ⁴J_{4,3} = 1.3 Hz, 2 H, 4'-H), 6.66 (dd, ³J_{6,5} = 9.0 Hz, ⁴J_{6,8} = 2.6 Hz, 1 H, 6-H), 6.68 (d, ³J_{8,6} = 2.6 Hz, 1 H, 8-H), 7.06 (t, ⁴J_{3,4'} = 1.3 Hz, 1 H, 3-H), 7.34 (d, ³J_{5,6} = 9.0 Hz, 1 H, 5-H); ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.5 (C-10), 20.9 (C-2''), 45.1 (C-9), 61.1 (C-4'), 97.6 (C-8), 108.3 (C-4a), 110.4 (C-6), 120.7 (C-3), 124.6 (C-5), 142.0 (C-4), 151.2 (C-7), 159.1 (C-8a), 170.4 (C-1''), 197.3 (C-2); *R*_f = 0.60 (CH₂Cl₂); IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2971, 1743, 1625, 1574, 1516, 1432, 1399, 1376, 1354, 1290, 1250, 1217, 1197, 1180, 1147, 1071, 1029, 967, 855, 822, 795, 652; HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₁₆H₂₀NO₃S⁺ [M+H]⁺: 306.1158; gef. 306.1160; **Schmelzpunkt**: 137.9 °C.

7-(Diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-thion (119)

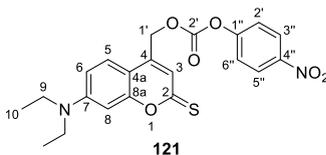
In Anlehnung an eine Vorschrift von *Fournier et al.*^[183] wurde Cumarin **117** (984 mg, 3.22 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem Ethanol (684 mL, 4.71 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre gelöst. HCl in Diethylether (1.0 M) (8.1 mL, 8.1 mmol, 2.5 Äq.) wurde hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 17 h unter Ausschluss von Licht zum Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung wurde bei vermindertem Druck eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (CH₂Cl₂ → CH₂Cl₂/Aceton 95:5) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 564 mg (2.14 mmol, 66 %) des orangegelben Feststoffes **119** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[183]



¹H-NMR (600 MHz, Aceton-*d*₆): δ [ppm] = 1.23 (t, ³*J*_{10,9} = 7.1 Hz, 6 H, 10-H), 3.55 (q, ³*J*_{9,10} = 7.1 Hz, 4 H, 9-H), 4.62 (brs, 1 H, 4'-OH), 4.81 (s, 2 H, 4'-H), 6.66 (d, ³*J*_{8,6} = 2.5 Hz, 1 H, 8-H), 6.81 (dd, ³*J*_{6,5} = 9.0 Hz, ⁴*J*_{6,8} = 2.5 Hz, 1 H, 6-H), 7.12 (s, 1 H, 3-H), 7.53 (d, ³*J*_{5,6} = 9.0 Hz, 1 H, 5-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, Aceton-*d*₆): δ [ppm] = 12.7 (C-10), 45.3 (C-9), 60.2 (C-4'), 97.4 (C-8), 109.0 (C-4a), 111.1 (C-6), 120.2 (C-3), 125.8 (C-5), 149.2 (C-4), 151.9 (C-7), 159.7 (C-8a), 198.3 (C-2); **R_f** = 0.36 (CH₂Cl₂/Aceton 95:5); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3375, 2966, 1626, 1571, 1513, 1425, 1356, 1296, 1247, 1179, 1076, 821, 800, 636; **MS** (ESI, negativ-Ion): *m/z* (%) = 262.4 (100) [M-H]⁻; **Schmelzpunkt**: 115.6 °C.

[7-(Diethylamino)-2-thio-2*H*-chromen-4-yl]methyl-(4-nitrophenyl)carbonat (**121**)

In Anlehnung an Vorschriften von *Fomina et al.*^[396] und *Gao et al.*^[397] wurde in einem sekurierten Schlenkkolben Cumarin **119** (400 mg, 1.52 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem THF (4.00 mL, 380 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Es wurde Diisopropylethylamin (529 µL, 3.04 mmol, 2.00 Äq.) hinzugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 4-Nitrophenylchlorformiat (612 mg, 3.04 mmol, 2.00 Äq.) portionsweise hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 22 h unter Ausschluss von Licht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 60:40). Die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingengt, anschließend mit CH₂Cl₂ verdünnt und abschließend mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (3×) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingengt. Als Rohprodukt wurden 320 mg (747 µmol, 49 %) des gelben Feststoffes **121** erhalten. Dieser wurde nach Möglichkeit direkt weiter umgesetzt oder für den zeitnahen Gebrauch bei -20 °C gelagert.

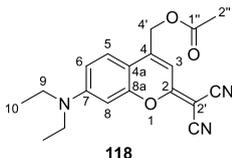


¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.23 (t, ³*J*_{10,9} = 7.1 Hz, 6 H, 10-H), 3.44 (q, ³*J*_{9,10} = 7.1 Hz, 4 H, 9-H), 5.37 (s, 2 H, 1'-H), 6.64–6.72 (m, 2 H, 6-H, 8-H), 7.13 (s, 1 H, 3-H), 7.37 (d, ³*J*_{5,6} = 9.1 Hz, 1 H, 5-H), 7.42 (m_c, 2 H, 2''-H), 8.30 (m_c, 2 H, 3''-H); **R_f** = 0.62 (PE/EtOAc 60:40); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$

$[\text{cm}^{-1}] = 2972, 2924, 2853, 1773, 1708, 1609, 1581, 1521, 1424, 1336, 1258, 1217, 1088, 838, 792, 747, 677, 565, 528, 493.$

[2-(Dicyanomethylen)-7-(diethylamino)-2H-chromen-4-yl]methylacetat (**118**)

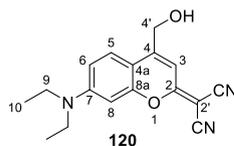
Nach einer Vorschrift von *Gandioso et al.*^[188] wurde Cumarin **117** (1.00 g, 3.27 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem Acetonitril (100 mL, 32.7 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre gelöst. Nach der Zugabe von Malonsäuredinitril (1.09 g, 16.5 mmol, 5.03 Äq.) und Triethylamin (9.13 mL, 65.5 mmol, 20.0 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 20 min bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Lösung färbte sich dabei intensiv rot. Silbernitrat (1.12 g, 6.58 mmol, 2.01 Äq.) wurde hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für weitere 4 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 70:30), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Die Reaktionslösung wurde filtriert und das Filtrat wurde bei vermindertem Druck eingeengt. Die säulenchromatographische Isolation (CH_2Cl_2) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 616 mg (1.83 mmol, 56 %) des orangefarbenen Feststoffes **118** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[188]



¹H-NMR (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.24 (t, $^3J_{10,9} = 7.1$ Hz, 6 H, 10-H), 2.21 (s, 3 H, 2''-H), 3.45 (q, $^3J_{9,10} = 7.1$ Hz, 4 H, 9-H), 5.24 (d, $^4J_{4',3} = 1.2$ Hz, 2 H, 4'-H), 6.62 (d, $^3J_{8,6} = 2.6$ Hz, 1 H, 8-H), 6.70 (dd, $^3J_{6,5} = 9.0$ Hz, $^4J_{6,8} = 2.6$ Hz, 1 H, 6-H), 6.75 (t, $^4J_{3,4'} = 1.2$ Hz, 1 H, 3-H), 7.34 (d, $^3J_{5,6} = 9.0$ Hz, 1 H, 5-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 12.5 (C-10), 20.9 (C-2''), 45.3 (C-9), 55.9 (C-2'), 61.2 (C-4'), 97.9 (C-8), 106.2 (C-3), 107.4 (C-4a), 111.1 (C-6), 113.9 (CN), 114.6 (CN), 125.0 (C-5), 146.1 (C-4), 151.6 (C-7), 155.1 (C-8a), 170.3 (C-1''), 171.9 (C-2); **R_f** = 0.57 (PE/EtOAc 50:50); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2969, 2924, 2215, 1750, 1638, 1586, 1524, 1430, 1358, 1320, 1259, 1224, 1148, 1079, 816, 687; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_3^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 338.1499; gef. 338.1495; **Schmelzpunkt**: 202–203 °C.

2-[7-(Diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-yliden]malononitril (120)

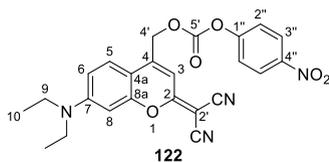
Nach einer Vorschrift von *Fournier et al.*^[183] wurde Cumarin **118** (500 mg, 1.48 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem Ethanol (316 mL, 4.68 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre gelöst. HCl in Ethanol (1.25 M) (2.96 mL, 3.71 mmol, 2.50 Äq.) wurde hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 15 h unter Ausschluss von Licht zum Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung wurde bei vermindertem Druck eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (CH₂Cl₂/Aceton 95:5) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 403 mg (1.36 mmol, 92 %) des orangefarbenen Feststoffes **120** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[183]



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.24 (t, ³J_{10,9} = 7.1 Hz, 6 H, 10-H), 3.45 (q, ³J_{9,10} = 7.1 Hz, 4 H, 9-H), 4.89 (s, 2 H, 4'-H), 6.63 (d, ³J_{8,6} = 2.6 Hz, 1 H, 8-H), 6.71 (dd, ³J_{6,5} = 9.0 Hz, ⁴J_{6,8} = 2.6 Hz, 1 H, 6-H), 6.98 (s, 1 H, 3-H), 7.36 (d, ³J_{5,6} = 9.0 Hz, 1 H, 5-H); ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.6 (C-10), 45.4 (C-9), 54.9 (C-2'), 60.8 (C-4'), 97.8 (C-8), 105.4 (C-3), 107.7 (C-4a), 111.2 (C-6), 114.2 (CN), 115.0 (CN), 125.0 (C-5), 151.4 (C-4), 151.6 (C-7), 154.9 (C-8a), 172.3 (C-2); **R_f** = 0.44 (CH₂Cl₂/Aceton 95:5); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3431, 2972, 2918, 2199, 1741, 1634, 1575, 1504, 1418, 1355, 1319, 1254, 1189, 1144, 1085, 821, 686, 508; **MS** (ESI, positiv-Ion): m/z (%) = 296.3 (100) [M+H]⁺; **Schmelzpunkt**: 179–180 °C.

{[2-(Dicyanomethylen)-7-(diethylamino)-2H-chromen-4-yl]methyl}(4-nitrophenyl)carbonat (122)

In Anlehnung an Vorschriften von *Fomina et al.*^[396] und *Gao et al.*^[397] wurde in einem sekurierten Schlenkkolben Cumarin **120** (250 mg, 846 μmol, 1.00 Äq.) in trockenem Dichlormethan (15.0 mL, 56.4 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Es wurde Diisopropylethylamin (295 μL, 1.69 mmol, 2.00 Äq.) hinzugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 4-Nitrophenylchlorformiat (341 mg, 1.69 mmol, 2.00 Äq.) portionsweise hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 22 h unter Ausschluss von Licht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 60:40), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Anschließend wurde die Lösung mit CH₂Cl₂ verdünnt und nacheinander mit 1 M wässriger HCl-Lösung (1×) und gesättigter NaHCO₃-Lösung (3×) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 70:30) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 179 mg (389 μmol, 46 %) des roten Feststoffes **122** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[397]



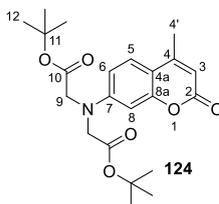
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.25 (t, ³J_{10,9} = 7.1 Hz, 6 H, 10-H), 3.46 (q, ³J_{9,10} = 7.1 Hz, 4 H, 9-H), 5.42 (s, 2 H, 4'-H), 6.61 (d, ³J_{8,6} = 2.5 Hz, 1 H, 8-H), 6.69 (dd, ³J_{6,5} = 9.0 Hz, ⁴J_{6,8} = 2.5 Hz, 1 H, 6-H), 6.80 (s, 1 H, 3-H), 7.35 (d, ³J_{5,6} = 9.0 Hz, 1 H, 5-H), 7.43 (mc, 2 H, 2''-H), 8.31 (mc, 2 H, 3''-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.6 (C-10), 45.2 (C-9), 56.5 (C-2'), 65.5 (C-4'), 97.6 (C-8), 106.3 (C-3), 106.7 (C-4a), 110.9 (C-6), 113.7 (CN), 114.5 (CN), 121.9 (C-2''), 124.9 (C-5), 125.6 (C-3''), 144.2 (C-4), 145.9 (C-4''), 152.0 (C-7), 152.2 (C-5'), 155.2, 155.2 (C-8a, C-1''), 171.7 (C-2); **R_f** = 0.28 (PE/EtOAc 60:40); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2215, 1774, 1638, 1584, 1548, 1523, 1489, 1432, 1350, 1321, 1259, 1216, 1148, 1083, 860; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₂₄H₂₁N₄O₆⁺ [M+H]⁺: 461.1456; gef. 461.1457; **Schmelzpunkt**: 209–211 °C.

7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]-4-methylcumarin (**124**)

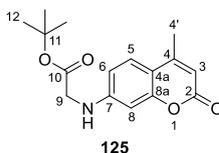
In Anlehnung an eine Vorschrift von *Noguchi et al.*^[290] wurden 7-Amino-4-methylcumarin (**123**) (150 mg, 856 μmol, 1.00 Äq.), Bromessigsäure-*tert*-butylester (1.26 mL, 8.57 mmol, 10.0 Äq.), Natriumiodid (128 mg, 856 μmol, 1.00 Äq.), DIPEA (731 μL, 4.28 mmol, 5.00 Äq.) und Acetonitril (5.00 mL) in einem Mikrowellengefäß vorgelegt. Die Reaktionslösung wurde für 6 h bei 100 °C in der Mikrowelle unter Rühren erhitzt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 75:25). Anschließend wurde die Reaktionslösung filtriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Nach der Zugabe von EtOAc (35 mL) wurde die organische Phase mit Wasser (35 mL) und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatographische Isolation erfolgte über Kieselgel (PE/EtOAc 75:25). Es wurden 99 mg (0.24 mmol, 28 %) des orangen Feststoffes **124** erhalten. Darüber hinaus konnten 181 mg (626 μmol, 73 %) des einfachsubstituierten Nebenproduktes **125** isoliert werden. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[290]

Alternative Synthese:

7-*tert*-Butoxycarbonylmethylamino-4-methylcumarin (**125**) (249 mg, 861 μmol , 1.00 Äq.), Bromessigsäure-*tert*-butylester (1.27 mL, 8.60 mmol, 10.0 Äq.), Natriumiodid (129 mg, 860 μmol , 1.00 Äq.), DIPEA (734 μL , 4.30 mmol, 5.00 Äq.) und Acetonitril (5.00 mL) in einem Mikrowellengefäß vorgelegt. Die Reaktionslösung wurde für 4 h bei 100 °C in der Mikrowelle unter Rühren erhitzt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 75:25). Anschließend wurde die Reaktionslösung filtriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Nach der Zugabe von EtOAc (35 mL) wurde die organische Phase mit Wasser (35 mL) und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatographische Isolation erfolgte über Kieselgel (PE/EtOAc 75:25). Es wurden 105 mg (260 μmol , 30 %) des orangen Feststoffes **124** erhalten.



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.47 (s, 18 H, 12-H), 2.34 (d, $^4J_{4',3} = 1.0$ Hz, 3 H, 4'-H), 4.05 (s, 4 H, 9-H), 6.01 (d, $^4J_{3,4'} = 1.0$ Hz, 1 H, 3-H), 6.44 (d, $^3J_{8,6} = 2.6$ Hz, 1 H, 8-H), 6.52 (dd, $^3J_{6,5} = 8.9$ Hz, $^4J_{6,8} = 2.6$ Hz, 1 H, 6-H), 7.41 (d, $^4J_{5,6} = 8.9$ Hz, 1 H, 5-H); **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 18.6 (C-4'), 28.2 (C-12), 54.5 (C-9), 82.6 (C-11), 99.2 (C-8), 109.1 (C-6), 110.5 (C-3), 111.3 (C-4a), 125.7 (C-5), 151.2 (C-7), 152.8 (C-4), 155.6 (C-8a), 162.0 (C-2), 169.1 (C-10); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2979, 2931, 1718, 1609, 1526, 1454, 1403, 1369, 1148, 1083, 1045, 985, 842, 749; **MS** (ESI, positiv-Ion): m/z (%) = 829.3 (100) $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 442.2 (40) $[\text{M}+\text{K}]^+$; **Schmelzpunkt**: 149.6 °C, Lit.^[159]: 151 °C.

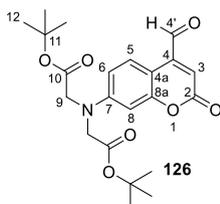
7-(*tert*-Butoxycarbonylmethylamino)-4-methylcumarin (125**)**


$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.50 (s, 9 H, 12-H), 2.34 (d, $^4J_{4',3} = 1.0$ Hz, 3 H, 4'-H), 3.83 (s, 2 H, 9-H), 5.99 (d, $^4J_{3,4'} = 1.0$ Hz, 1 H, 3-H), 6.38 (d, $^3J_{8,6} = 2.3$ Hz, 1 H, 8-H), 6.53 (dd, $^3J_{6,5} =$

8.7 Hz, $^4J_{6,8} = 2.3$ Hz, 1 H, 6-H), 7.36 (d, $^4J_{5,6} = 8.7$ Hz, 1 H, 5-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 18.7 (C-4'), 28.2 (C-12), 45.8 (C-9), 82.9 (C-11), 98.5 (C-8), 110.0 (C-3), 110.8 (C-6), 111.2 (C-4a), 125.7 (C-5), 150.4 (C-7), 153.1 (C-4), 156.0 (C-8a), 162.0 (C-2), 169.4 (C-10); $R_f = 0.22$ (PE/EtOAc 70:30); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3366, 2979, 2924, 1716, 1610, 1565, 1534, 1396, 1269, 1218, 1153, 1068, 969, 841, 748; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{NO}_4^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 290.1387; gef. 290.1390; **Schmelzpunkt**: 149–150 °C, Lit.^[159]: 154.7 °C.

7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]-4-(formyl)cumarin (**126**)

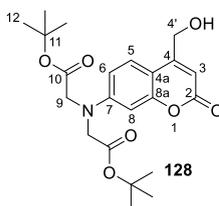
Nach einer Vorschrift von *Noguchi et al.*^[290] wurde 7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]-4-methylcumarin (**124**) (734 mg, 1.82 mmol, 1.00 Äq.) in *p*-Xylol (20 mL, 91 mM) vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Selendioxid (404 mg, 3.64 mmol, 2.00 Äq.) und es wurde für 24 h zum Rückfluss erhitzt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels NMR. Die Reaktionslösung wurde heiß über Celite filtriert und es wurde mit wenig *p*-Xylol nachgespült. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt und es wurden 462 mg (1.11 mmol, 61 %) des orangen Feststoffes **126** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[290]



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.48 (s, 18 H, 12-H), 4.07 (s, 4 H, 9-H), 6.48 (d, $^4J_{8,6} = 2.6$ Hz, 1 H, 8-H), 6.56 (dd, $^3J_{6,5} = 9.1$ Hz, $^4J_{6,8} = 2.6$ Hz, 1 H, 6-H), 6.56 (s, 1 H, 3-H), 8.38 (d, $^3J_{5,6} = 9.1$ Hz, 1 H, 5-H), 10.03 (s, 1 H, 4'-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 28.2 (C-12), 54.4 (C-9), 82.8 (C-11), 99.2 (C-8), 105.9 (C-4a), 110.1 (C-6), 119.9 (C-3), 127.4 (C-5), 143.9 (C-4), 151.8 (C-7), 156.9 (C-8a), 161.5 (C-2), 168.8 (C-10), 192.3 (C-4'); $R_f = 0.50$ (PE/EtOAc 70:30); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2979, 2924, 1732, 1618, 1525, 1427, 1394, 1369, 1293, 1252, 1227, 1150, 1077, 1037, 988, 847, 743; **Schmelzpunkt**: 152–153 °C, Lit.^[159]: 156 °C.

7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]-4-(hydroxymethyl)cumarin (128)

Nach einer Vorschrift von *Noguchi et al.*^[290] wurde 7-[Bis(*tert*-butoxycarbonylmethyl)amino]-4-(formyl)cumarin (**126**) (466 mg, 1.12 mmol, 1.00 Äq.) in Ethanol (33 mL, 34 mM) vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe von NaBH₄ (63 mg, 1.7 mmol, 1.5 Äq.) bei 0°C, bevor für 3 h bei RT gerührt wurde. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels NMR. Nach der Zugabe von 1 M HCl-Lösung (22 mL) wurde mit Wasser verdünnt und das Ethanol wurde bei vermindertem Druck entfernt. Nach der Extraktion mit EtOAc wurden die vereinten organischen Phasen mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Darauffolgend wurde die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 75:25 → 20:80) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 293 mg (699 µmol, 63 %) des orangen Feststoffes **128** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[290]

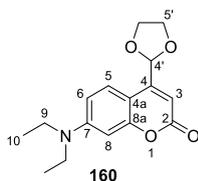


¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.48 (s, 18 H, 12-H), 4.04 (s, 4 H, 9-H), 4.76 (d, ⁴J_{4,3} = 1.4 Hz, 2 H, 4'-H), 6.32 (t, ⁴J_{3,4'} = 1.4 Hz, 1 H, 3-H), 6.44 (d, ⁴J_{8,6} = 2.6 Hz, 1 H, 8-H), 6.47 (dd, ³J_{6,5} = 8.9 Hz, ⁴J_{6,8} = 2.6 Hz, 1 H, 6-H), 7.48 (d, ³J_{5,6} = 8.9 Hz, 1 H, 5-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 28.2 (C-12), 54.4 (C-9), 60.9 (C-4'), 82.8 (C-11), 99.3 (C-8), 107.2 (C-3), 108.6 (C-4a), 109.2 (C-6), 124.4 (C-5), 151.2 (C-7), 154.5 (C-4), 155.6 (C-8a), 162.2 (C-2), 169.2 (C-10); **R_f** = 0.03 (PE/EtOAc 70:30); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3443, 2977, 2931, 2855, 1731, 1612, 1526, 1374, 1389, 1229, 1151, 1099, 992, 855, 740; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₂₂H₃₀NO₇⁺ [M+H]⁺: 420.2017; gef. 420.2017; **Schmelzpunkt**: 173 °C, Lit.^[159]: 176 °C.

7-(Diethylamino)-4-(1,3-dioxolan-2-yl)cumarin (160)

Cumarin **113** (50 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem Toluol (2.0 mL, 0.10 M) unter Stickstoff-Atmosphäre gelöst. Ethylenglycol (12 µL, 0.21 mmol, 1.5 Äq.) und *p*-Toluolsulfonsäure Monohydrat (7 mg, 0.04 mmol, 0.2 Äq.) wurden hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 22 h unter Ausschluss von Licht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion aufgrund der nur geringen Umsetzung für 2 d zum Rückfluss erhitzt. Der vollständige Umsatz wurde mittels DC (PE/EtOAc 80:20) ermittelt. Die Reaktionslösung wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat extrahiert und die vereinten organischen Phasen

wurden über NaSO_4 getrocknet Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 70:30) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 19 mg (66 μmol , 39 %) des braunen Feststoffes **160** erhalten.

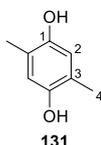


$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.19 (t, $^3J_{10,9} = 7.1$ Hz, 6 H, 10-H), 3.40 (q, $^3J_{9,10} = 7.1$ Hz, 4 H, 9-H), 4.07 (brs, 4 H, 5'-H), 6.06 (s, 1 H, 4'-H), 6.27 (s, 1 H, 3-H), 6.50 (d, $^4J_{8,6} = 2.6$ Hz, 1 H, 8-H), 6.58 (dd, $^3J_{6,5} = 9.0$ Hz, $^4J_{6,8} = 2.6$ Hz, 1 H, 6-H), 7.58 (d, $^3J_{5,6} = 9.0$ Hz, 1 H, 5-H); **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 12.6 (C-10), 44.9 (C-9), 65.5 (C-5'), 97.8 (C-8), 99.9 (C-4'), 105.9 (C-3), 106.2 (C-4a), 108.8 (C-6), 126.3 (C-5), 150.6 (C-7), 150.7 (C-4), 156.9 (C-8a), 162.5 (C-2); **R_f** = 0.33 (PE/EtOAc 70:30); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2970, 1737, 1602, 1526, 1422, 1365, 1217, 1114, 525; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{NO}_4^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 290.1387; gef. 290.1394; **Schmelzpunkt**: 128.9 °C.

6.6 Synthesevorschriften zur Darstellung der Trimethyl-Lock-Derivate

2,5-Dimethylhydrochinon (**131**)

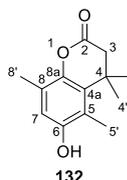
Nach einer Vorschrift von *Walton et al.*^[209] wurde 2,5-Dimethyl-1,6-benzochinon (**130**) (4.00 g, 29.4 mmol) in einem MeOH/Diethylether/Wasser-Gemisch (1:2:4, 280 mL) gelöst. Nach portionsweiser Zugabe von Natriumborhydrid (5.56 g, 147 mmol, 5.00 Äq.) färbt sich die gelbe Lösung im Verlauf von 15 min zunächst braun und wird anschließend farblos. Nachdem durch Reaktionskontrolle mittels DC (PE/EtOAc 50:50) der vollständige Umsatz bestätigt wurde, wurde umgehend die Reaktionslösung mit Diethylether (3×50 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Es wurden 3.91 g (28.3 mmol, 96 %) des farblosen Feststoffes **131** erhalten. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufarbeitung in der nachfolgenden Reaktion umgesetzt. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[209]



¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 2.00 (s, 6 H, 4-H), 6.46 (s, 2 H, 2-H), 8.31 (s, 2 H, 1-OH);
¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 15.8 (C-4), 116.9 (C-2), 121.1 (C-3), 147.5 (C-1); **R_f** = 0.49 (PE/EtOAc 70:30); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3233, 1422, 1263, 1185, 988, 868, 827, 688, 586;
HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₈H₉O₂⁻ [M-H]⁻: 137.0608; gef. 137.0609; **Schmelzpunkt**: 210–212 °C, Lit.^[400]: 212–217 °C.

6-Hydroxy-4,4,5,8-tetramethylchroman-2-on (132)

Nach einer Vorschrift von *Walton et al.*^[209] wurden in einem Schlenk Kolben 2,5-Dimethylhydrochinon (**131**) (3.59 g, 26.0 mmol, 1.00 Äq.) und 3,3-Dimethylacrylsäure (2.92 g, 29.2 mmol, 1.12 Äq.) in Methansulfonsäure (106 mL, 245 mM) gelöst und über Nacht unter Stickstoff-Atmosphäre auf 70 °C erhitzt. Nachdem durch Reaktionskontrolle mittels DC (PE/EtOAc 50:50) der vollständige Umsatz bestätigt wurde, wurde die rote Reaktionslösung auf Eiswasser gegeben und anschließend mit EtOAc (4×90 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer eingeengt. Der erhaltene hellbraune Feststoff wurde aus PE/EtOAc (2:1) umkristallisiert. Es wurden 3.81 g (17.3 mmol, 67 %) des Feststoffes **132** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[209]

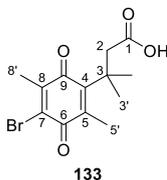


¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.34 (s, 6 H, 4'-H), 2.10 (s, 3 H,), 2.21 (s, 3 H,), 2.59 (s, 2 H, 3-H), 6.60 (s, 1 H, 7-H), 9.15 (s, 1 H, 6-OH); ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 13.8 (C-5'), 15.9 (C-8'), 27.1 (C-4'), 35.1 (C-4), 45.0 (C-3), 115.1 (C-7), 119.5 (C-5), 122.9 (C-8), 131.0 (C-4a), 142.2 (C-8a), 151.6 (C-6), 168.1 (C-2); **R_f** = 0.57 (PE/EtOAc 70:30); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3522, 3304, 2972, 2948, 1725, 1615, 1465, 1405, 1292, 1242, 1185, 1159, 1120, 1040, 1022, 979, 953, 919, 865, 847, 735, 659, 633, 605, 465; **HRMS** (ESI): *m/z* ber. für C₁₃H₁₇O₃⁺ [M+H]⁺: 221.1172; gef. 221.1176; **Schmelzpunkt**: 195 °C, Lit.^[401]: 194–196 °C.

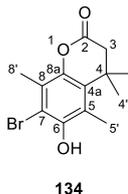
3-(4-Brom-2,5-dimethyl-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dien-1-yl)-3-methylbutansäure (133)

Nach einer Vorschrift von *Walton et al.*^[209] wurde 2-Chromanon **132** (2.80 g, 12.7 mmol, 1.00 Äq.) in Essigsäure (123 mL, 103 mM) gelöst. Nach Zugabe von Brom (1.44 mL, 28.1 mmol, 2.21 Äq.) in Essigsäure (17.0 mL, 1.65 M) wurde die entstandene rote Lösung offen, aber geschützt vor Licht, über Nacht gerührt. Nachdem durch Reaktionskontrolle mittels DC (PE/EtOAc 90:10) der vollständige Umsatz bestätigt wurde, wurde die Reaktionslösung auf Wasser gegeben und anschließend mit Dichlormethan extrahiert, bis die wässrige Phase farblos wurde. Die vereinten organischen Phasen wurden so oft mit ges. NaHCO₃-Lösung extrahiert, bis die NaHCO₃-Phase farblos ist. Die vereinigten NaHCO₃-Phasen wurden mit Dichlormethan gewaschen, anschließend mit konzentrierter HCl-Lösung sauer gestellt und mit EtOAc extrahiert, bis die saure wässrige Phase farblos wurde. Die gelbe

organische Phase (EtOAc) wurde über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Es wurden 2.67 g (8.47 mmol, 67 %) des gelben Feststoffes **133** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[209]



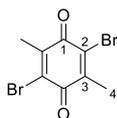
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.44 (s, 6 H, 3'-H), 2.12 (s, 3 H,), 2.20 (s, 3 H,) 3.00 (s, 2 H, 2-H); **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 15.3 (C-5'), 17.2 (C-8'), 28.7 (C-3'), 38.2 (C-3), 47.2 (C-2), 132.0 (C-7), 138.9 (C-5), 148.7 (C-8), 152.9 (C-4), 178.7 (C-1), 180.0 (C-6), 187.7 (C-9); R_f = 0.37 (PE/EtOAc 90:10); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2972, 2924, 1794, 1697, 1658, 1589, 1430, 1402, 1386, 1367, 1342, 1315, 1239, 1198, 1131, 1045, 949, 898, 874, 817, 797, 755, 720, 686, 623, 581, 509; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{BrO}_4^+$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 315.0226; gef. 315.0228; **Schmelzpunkt**: 107 °C. Die erste organische Phase (Dichlormethan) wurde über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Es wurden 1.20 g (4.00 mmol, 31 %) des Nebenproduktes **134** erhalten.



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.45 (s, 6 H, 4'), 2.36 (3 H, 8'-H), 2.41 (s, 3 H, 5'-H), 2.55 (s, 2 H, 3-H); **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 15.3 (C-5'), 16.8 (C-8'), 27.6 (C-4'), 35.8 (C-4), 45.9 (C-3), 112.6 (C-7), 120.7 (C-5), 124.2 (C-8), 130.8 (C-4a), 143.4 (C-8a), 147.4 (C-6), 168.0 (C-2); R_f = 0.58 (PE/EtOAc 90:10); **MS** (ESI, positiv-Ion): m/z (%) = 321.2 (100) [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

2,5-Dibrom-3,6-dimethylcyclohexa-2,5-dien-1,4-dion (135)

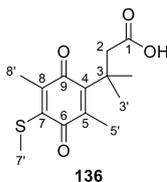
In einem Einhalskolben wurde 2,5-Dimethylhydrochinon (**131**) (50 g, 0.36 mmol, 1.0 Äq.) in Essigsäure (3.5 mL, 0.10 M) gelöst. Nach Zugabe von Brom (59 μ L, 1.2 mmol, 3.2 Äq.) in Essigsäure (0.50 mL, 1.4 M) wurde die Reaktionslösung offen, aber geschützt vor Licht, über Nacht gerührt. Nachdem durch Reaktionskontrolle mittels DC (PE/EtOAc 90:10) der vollständige Umsatz bestätigt wurde, wurde die Reaktionslösung auf Wasser gegeben und anschließend mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Es wurden 0.10 g (0.35 mmol, 98 %) des gelben Feststoffes **135** erhalten.

**135**

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 2.29 (s, 6 H, 4-H); **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 18.0 (C-4), 135.8 (C-2), 145.7 (C-3), 176.8 (C-1), **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 1658, 1604, 1367, 1269, 1179, 1038, 878, 750, 701; **MS** (ESI, positiv-Ion): m/z (%) = 335.8 (100) [$\text{M}+\text{MeCN}+\text{H}$] $^+$; **Schmelzpunkt**: 177–178 $^\circ\text{C}$, Lit.^[402]: 173–175 $^\circ\text{C}$.

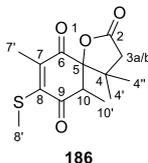
3-[2,5-Dimethyl-4-(methylthio)-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dien-1-yl]-3-methylbutansäure (136)

Nach einer Vorschrift von *Walton et al.*^[209] wurde **133** (200 mg, 634 μ mol, 1.00 Äq.) in einem Schraubdeckelgläschen in einem Dichlormethan/Wasser-Gemisch (1:1, 4.50 mL) gelöst. Nach Zugabe von Tetrabutylammoniumbromid (9 mg, 0.03 mmol, 4 mol%) und Natriumthiomethoxid (89 mg, 1.3 mmol, 2.0 Äq.) wurde das Schraubdeckelgläschen luftdicht verschlossen und für 2 min stark geschüttelt. Anschließend wurde gewartet bis die Phasen sich trennen, ein Rührfisch hinzugegeben und langsam unter Rühren eine 1 M HCl-Lösung hinzuge tropft. Die Lösung wurde gerührt, bis sich die wässrige Phase vollständig entfärbt hat. Die gelbe organische Phase wurde abgetrennt und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Es wurden 184 mg (652 μ mol, quant.) des orangenen Öles **136** erhalten. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufarbeitung in der nachfolgenden Reaktion umgesetzt. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[209]



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.43 (s, 6 H, 3'-H), 2.09 (s, 3 H, 8'-H), 2.16 (s, 3 H, 5'-H), 2.47 (s, 3 H, 7'-H), 3.01 (s, 2 H, 2-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.7 (C-5' oder C-8'), 14.7 (C-5' oder C-8'), 17.3 (C-7'), 28.8 (C-3'), 38.1 (C-3), 47.2 (C-2), 140.2 (C-5), 142.0 (C-7), 146.2 (C-8), 152.4 (C-4), 177.8 (C-1), 183.5 (C-6), 188.3 (C-9); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2960, 2929, 1789, 1699, 1644, 1580, 1434, 1368, 1317, 1247, 1197, 1127, 1053, 973, 878, 831, 803, 770, 725, 624, 474; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₄H₁₉O₄S⁺ [M+H]⁺: 283.0999; gef. 283.0999.

4,4,7,10-Tetramethyl-8-(methylthio)-1-oxaspiro[4.5]dec-7-en-2,6,9-trion (186)

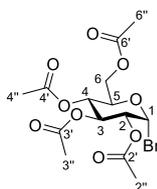


¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.98 (s, 3 H, 4'-H oder 4''-H), 1.16 (s, 3 H, 4'-H oder 4''-H), 1.37 (d, ³J_{10',10} = 7.0 Hz, 3 H, 10'), 2.16 (s, 3 H, 7'-H), 2.41 (d, ²J_{3a,3b} = 17.5 Hz, 1 H, 3-H_a), 2.54 (d, ²J_{3b,3a} = 17.5 Hz, 1 H, 3-H_b), 2.56 (s, 3 H, 8'-H), 3.44 (q, ³J_{10,10'} = 7.0 Hz, 1 H, 10-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 10.6 (C-10'), 14.9 (C-7'), 16.7 (C-8'), 24.3 (C-4' oder C-4''), 27.1 (C-4' oder C-4''), 43.3 (C-4), 44.4 (C-3), 51.7 (C-10), 92.6 (C-5), 143.7 (C-7), 152.1 (C-8), 173.8 (C-2), 191.1 (C-6), 192.6 (C-9).

6.7 Synthesevorschriften zur Darstellung der Kohlenhydrate

2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosylbromid (**143**)

Nach einer Vorschrift aus dem Buch Carbohydrates^[307] wurde Pentaacetyl- α -D-glucopyranose (**144**) (3.00 g, 7.53 mmol, 1.00 Äq.) bei 0 °C portionsweise zu rührender 33 % HBr-Lösung in Essigsäure (3.69 mL, 21.1 mmol, 2.80 Äq.) gegeben. Nach dem die Reaktionslösung auf RT aufgewärmt war, wurde für 1 h gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 50:50). Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch Zugabe von Eiswasser. Im Anschluss daran wurde die Lösung mit Dichlormethan (3×100 mL) extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Es wurden 3.05 g (7.41 mmol, 98 %) des farblosen Feststoffes **143** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[307]



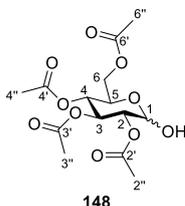
143

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2.03 (s, 3 H, 3''-H), 2.04 (s, 3 H, 4''-H), 2.09 (s, 3 H, 6''-H), 2.09 (s, 3 H, 2''-H), 4.12 (dd, ²J_{6a,6b} = 12.4 Hz, ³J_{6,5} = 1.9 Hz, 1 H, 6-H_a), 4.27–4.34 (m, 2 H, 5-H und 6-H_b), 4.83 (dd, ³J_{2,3} = 9.9 Hz, ³J_{2,1} = 4.0 Hz, 1 H, 2-H), 5.15 (dd, ³J_{4,5} = 9.8 Hz, ³J_{4,3} = 9.7 Hz, 4-H), 5.55 (t, ³J_{3,2} = 9.9 Hz, ³J_{3,4} = 9.7 Hz, 3-H), 6.60 (d, ³J_{1,2} = 4.0 Hz, 1-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 20.6 (CH₃), 20.7 (CH₃), 20.7 (CH₃), 20.8 (CH₃), 61.0 (C-6), 67.3 (C-4), 70.3 (C-3), 70.7 (C-2), 72.2 (C-5), 86.7 (C-1), 169.5 (C-4'), 169.9 (C-3'), 169.9 (C-2'), 170.6 (C-6'); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3129, 3038, 1737, 1601, 1525, 1401, 1360, 1221, 1103, 1072, 1037; **Schmelzpunkt**: 82 °C, Lit.^[403]: 86–87 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_D^{20}$ = +194 (c = 1.0, CHCl₃), Lit.^[404]: $[\alpha]$ = +182 (c = 1.0, CHCl₃).

2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α,β -D-glucopyranose (**148**)

Nach einer Vorschrift von Duléry *et al.*^[308] wurde Eisessig (201 μ L, 3.51 mmol, 1.40 Äq.) tropfenweise zu einer Lösung von Ethylendiamin (201 μ L, 15.1 mmol, 1.20 Äq.) in THF (62 mL) gegeben, wobei sich direkt ein Niederschlag bildete. Pentaacetyl- α -D-glucopyranose (**144**) (1.00 g, 2.51 mmol, 1.00 Äq.) wurde hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 23 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/Aceton 60:40). Nach der Zugabe von Wasser wurde die Lösung mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde mit 1 M HCl-Lösung,

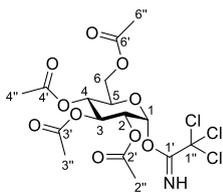
gesättigter NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen. Im Anschluss daran wurde die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatographische Isolation erfolgte über SiO₂ (PE/Aceton 60:40). Es wurden 830 mg (2.38 mmol, 95 %) des farblosen Feststoffes **148** in einem α/β -Anomerengemisch von 3.6:1 erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[405]



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2.00 (s, 3 H, CH₃), 2.02 (s, 3 H, CH₃), 2.07 (s, 3 H, CH₃), 2.08 (s, 3 H, 2''-H), 4.11 (dd, ²J_{6a,6b} = 12.3 Hz, ³J_{6a,5} = 2.2 Hz, 1 H, 6-H_a), 3.74 (ddd, ³J_{5,4} = 10.1 Hz, ³J_{5,6a} = 4.8 Hz, ³J_{5,6b} = 2.4 Hz, 1 H, 5-H_β), 4.09–4.16 (m, 2 H, 6-H_{b α/β}), 4.18–4.29 (m, 3 H, 5-H_α, 6-H_{α α/β}), 4.73 (d, ³J_{1,2} = 8.0 Hz, 1 H, 1-H_β), 4.84–4.91 (m, 2 H, 2-H_{α/β}), 5.03–5.09 (m, 2 H, 4-H_{α/β}), 5.23 (t, ³J_{3,2} = 9.6 Hz, ³J_{3,4} = 9.6 Hz, 1 H, 3-H_β), 5.44 (d, ³J_{1,2} = 3.7 Hz, 1 H, 1-H_α), 5.52 (t, ³J_{3,2} = 9.8 Hz, ³J_{3,4} = 9.8 Hz, 3-H_α); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 20.7 (CH₃), 20.8 (CH₃), 20.8 (CH₃), 20.9 (CH₃), 62.1 (C-6_{α/β}), 67.3 (C-5_α), 68.5, 68.6 (C-4_{α/β}), 70.0 (C-3_α), 71.2 (C-2_α), 72.2 (C-2_β), 72.4 (C-5_β), 73.3 (C-3_β), 90.2 (C-1_α), 95.6 (C-1_β) 169.8 (C-4'), 170.4, 170.4 (C-2', C-3'), 171.0 (C-6'); **R_f** = 0.53 (PE/Aceton 60:40); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3466, 1747, 1438, 1369, 1216, 1149, 1038, 751, 668; **MS** (APCI, negativ-Ion): m/z (%) = 347.1 (100) [M+H]⁻; **Schmelzpunkt**: 82.3 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_D^{20}$ = 84 (c = 0.55, CHCl₃).

O-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl)trichloroacetimidat (**147**)

Nach einer Vorschrift von *Gorityala et al.*^[320] wurde der Zucker **148** (830 mg, 2.38 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem CH₂Cl₂ (13 mL, 0.18 M) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Trichloroacetonitril (0.96 mL, 9.5 mmol, 4.0 Äq.) und DBU (71 μ L, 0.48 mmol, 0.20 Äq.) wurden hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 21 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 50:50). Die Reaktionslösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatographische Isolation erfolgte über SiO₂ (PE/EtOAc 50:50). Es wurden 927 mg (1.88 mmol, 79 %) des farblosen Öles **147** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[320]

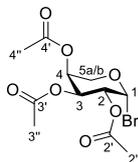


147

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2.01 (s, 3 H, CH₃), 2.03 (s, 3 H, CH₃), 2.05 (s, 3 H, CH₃), 2.07 (s, 3 H, 2''-H), 4.13 (dd, ²J_{6a,6b} = 12.4 Hz, ³J_{6a,5} = 2.2 Hz, 1 H, 6-H_a), 4.21 (ddd, ³J_{5,4} = 10.4 Hz, ³J_{5,6b} = 4.2 Hz, ³J_{5,6a} = 2.2 Hz, 1 H, 5-H), 4.27 (dd, ²J_{6a,6b} = 12.4 Hz, ³J_{6a,5} = 4.2 Hz, 1 H, 6-H_b), 5.13 (dd, ³J_{2,3} = 10.2 Hz, ³J_{2,1} = 3.7 Hz, 1 H, 2-H), 5.18 (dd, ³J_{4,5} = 10.4 Hz, ³J_{4,3} = 9.9 Hz, 4-H), 5.56 (dd, ³J_{3,2} = 10.2 Hz, ³J_{3,4} = 9.9 Hz, 3-H), 6.56 (d, ³J_{1,2} = 3.7 Hz, 1-H), 8.69 (s, 1 H, NH); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 20.6 (CH₃), 20.7 (CH₃), 20.8 (CH₃), 20.8 (CH₃), 61.5 (C-6), 67.9 (C-4), 69.9 (C-2), 70.0 (C-3), 70.1 (C-5), 90.8 (C-1''), 93.0 (C-1), 160.9 (C-1'), 169.6 (C-4'), 170.0, 170.1 (C-2', C-3'), 170.7 (C-6'); **R_f** = 0.84 (PE/EtOAc 50:50); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3328, 2954, 1752, 1679, 1368, 1221, 1152, 1076, 1039, 969, 931, 900, 839, 801, 648, 603; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₆H₂₀Cl₃NNaO₁₀⁺ [M+Na]⁺: 514.0045; gef. 514.0044; **Drehwert**: [α]_D²⁰ = 84 (c = 0.2, CHCl₃).

2,3,4-Tri-O-acetyl-β-L-arabinopyranosylbromid (149)

Nach einer Vorschrift von Kartha *et al.*^[310] wurde L-Arabinopyranose (**1b**) (1.00 g, 6.66 mmol, 1.00 Äq.) in Essigsäureanhydrid (5.04 mL, 53.3 mmol, 8.00 Äq.) vorgelegt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von 33 % HBr-Lösung in Essigsäure (1.50 mL, 8.57 mmol, 1.29 Äq.) wurde die Suspension gerührt bis der Zucker **1b** vollständig gelöst war (1 h). Anschließend wurde zusätzliche 33 % HBr-Lösung in Essigsäure (7.50 mL, 42.9 mmol, 6.44 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingengt. Der Rückstand wurde mit Toluol (3×20 ml) überschichtet und bei vermindertem Druck eingengt. Das Rohprodukt wurde aus Et₂O umkristallisiert. Es wurden 926 mg (2.73 mmol, 41 %) des farblosen Feststoffes **149** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[77]

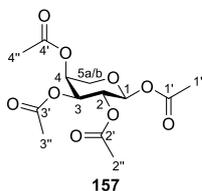


149

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2.03 (s, 3 H, CH₃), 2.11 (s, 3 H, CH₃), 2.15 (s, 3 H, CH₃), 3.93 (dd, ²J_{5a,5b} = 13.3 Hz, ³J_{5a,4} = 1.7 Hz, 1 H, 5-H_a), 4.21 (d, ²J_{5b,5a} = 13.3 Hz, 1 H, 5-H_b), 5.09 (ddd, ³J_{2,3} = 11.8 Hz, ³J_{2,1} = 3.9 Hz, ³J_{2,4} = 1.6 Hz, 1 H, 2-H), 5.37–5.43 (m, 2 H, 3-H, 4-H), 6.70 (d, ³J_{1,2} = 3.9 Hz, 1 H, 1-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 20.8, 20.9, 21.0 (C-2'', C-3'', C-4''), 64.9 (C-5), 67.8, 68.0 (C-3, C-4), 68.1 (C-2), 89.8 (C-1), 169.9, 170.2, 170.2 (C-2', C-3', C-4'); **R_f** = 0.70 (PE/EtOAc 1:1); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 1734, 1375, 1211, 1098, 1069, 1043, 992, 929, 891, 685, 577, 601, 539, 473; **Schmelzpunkt**: 115.6 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = 153.3 (c = 1.0, CHCl₃).

Tetraacetyl- α -L-arabinopyranose (**157**)

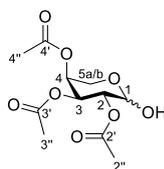
Nach einer Vorschrift von *Wahler et al.*^[319] wurde L-Arabinopyranose (**1b**) (1.00 g, 6.66 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem Pyridin (5.00 mL, 1.33 M) gelöst und mittels eines Eisbades auf 0 °C gekühlt. Nach der Zugabe von Essigsäureanhydrid (5.04 mL, 53.3 mmol, 8.00 Äq.) und DMAP (325 mg, 2.66 mmol, 40.0 mol%) wurde das Eisbad entfernt und die Reaktionslösung für 18 h gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 50:50). Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser abgebrochen und mit Ethylacetat verdünnt. Die organische Phase wurde mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Im Anschluss daran wurde die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Durch mehrmalige Koevaporation mit Toluol unter vermindertem Druck wurden 1.77 g (5.58 mmol, 84 %) des farblosen Feststoffes **157** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[319]



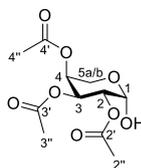
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2.01, 2.01, 2.13, 2.14 (s, 12 H, 1''-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H), 3.81 (dd, ²J_{5a,5b} = 13.2 Hz, ³J_{5a,4} = 2.0 Hz, 1 H, 5-H_a), 4.05 (dd, ²J_{5b,5a} = 13.2 Hz, ³J_{5a,4} = 1.5 Hz, 1 H, 5-H_b), 5.28–5.39 (m, 3 H, 2-H, 3-H, 4-H), 6.33 (d, ³J_{1,2} = 3.1 Hz, 1 H, 1-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 20.7, 20.8, 21.0, 21.0 (C-1'', C-2'', C-3'', C-4''), 62.9 (C-5), 66.8 (C-3 oder C-4), 67.1 (C-2), 68.5 (C-3 oder C-4), 90.3 (C-1), 169.2 (C-1'), 170.0, 170.2, 170.4 (C-2', C-3', C-4'); **R_f** = 0.63 (PE/EtOAc 1:1); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 1736, 1372, 1212, 1137, 1113, 1065, 1010, 942, 894, 755, 602, 552, 471; **MS** (ESI, positiv-Ion): m/z (%) = 341.0 (100) [M+Na]⁺, 357.0 (15) [M+K]⁺; **Schmelzpunkt**: 94.4 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = 151.8 (c = 0.5, CHCl₃).

2,3,4-Tri-O-acetyl- α,β -L-arabinopyranose (158)

Nach einer Vorschrift von *Duléry et al.*^[308] wurde Eisessig (1.00 mL, 17.6 mmol, 1.40 Äq.) tropfenweise zu einer Lösung von Ethylendiamin (1.01 mL, 15.1 mmol, 1.20 Äq.) in THF (250 mL) gegeben, wobei sich direkt ein Niederschlag bildete. Tetraacetyl- α -L-arabinopyranose (**157**) (4.00 g, 12.6 mmol, 1.00 Äq.) wurde hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 50:50). Nach der Zugabe von Wasser wurde die Lösung mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde mit 1 M HCl-Lösung, gesättigter NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen. Im Anschluss daran wurde die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatographische Isolation erfolgte über SiO₂ (PE/EtOAc 55:45). Es wurden 2.28 g (8.26 mmol, 66 %) des farblosen Öles **158** in einem α/β -Anomerengemisch von 1:3 erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[406]

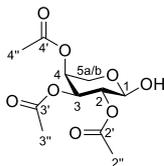
**158** **α/β -anomeren Gemisch:**

R_f = 0.18 (PE/EtOAc 1:1); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3455, 1739, 1371, 1216, 1139, 1057, 1007, 936, 889, 765, 736, 603, 465; **MS** (ESI, positiv-Ion): m/z (%) = 299.0 (100) [M+Na]⁺; **Drehwert**: $[\alpha]_D^{20}$ = 91.4 (c = 1.0, CHCl₃).

 **β -Anomer:**

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2.00 (s, 3 H, 4''-H), 2.08 (s, 3 H, 2''-H oder 3''-H), 2.12 (s, 3 H, 2''-H oder 3''-H), 3.59 (brs, 1 H, 1-OH), 3.68 (dd, ²J_{5a,5b} = 13.1 Hz, ³J_{5a,4} = 2.3 Hz, 1 H, 5-H_a), 4.18 (dd, ²J_{5b,5a} = 13.1 Hz, ³J_{5a,4} = 1.5 Hz, 1 H, 5-H_b), 5.16 (dd, ³J_{3,2} = 10.5 Hz, ³J_{3,4} = 3.4 Hz, 1 H, 3-H), 5.33–5.36 (m, 1 H, 4-H), 5.38 (dd, ³J_{2,3} = 10.5 Hz, ³J_{2,1} = 3.5 Hz, 1 H, 2-H), 5.45 (d, ³J_{1,2} = 3.5 Hz, 1 H, 1-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 20.8 (C-4''), 20.9 (C-2'' oder C-3''), 21.0

(C-2'' oder C-3''), 60.4 (C-5), 67.0 (C-2), 68.8 (C-3), 69.2 (C-4), 91.0 (C-1), 170.3 (C-4'), 170.6 (C-2'), 170.6 (C-3').

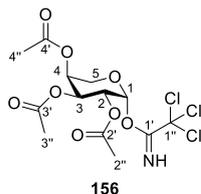


α -Anomer:

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 2.00 (s, 3 H, CH_3), 2.08 (s, 3 H, CH_3), 2.13 (s, 3 H, CH_3), 3.66 (dd, $^2J_{5a,5b} = 13.4$ Hz, $^3J_{5a,4} = 1.1$ Hz, 1 H, 5- H_a), 4.01 (dd, $^2J_{5b,5a} = 13.4$ Hz, $^3J_{5b,4} = 2.5$ Hz, 1 H, 5- H_b), 4.60 (d, $^3J_{1,2} = 6.7$ Hz, 1 H, 1-H), 5.03–5.09 (m, 2 H, 2-H und 3-H), 5.24–5.27 (m, 1 H, 4-H); **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 20.7, 20.9, 21.0 (C-2'', C-3'', C-4''), 64.2 (C-5), 68.1 (C-4), 70.2 (C-2), 71.3 (C-3), 96.2 (C-1), 170.2, 170.5, 171.2 (C-2', C-3', C-4').

O-(2,3,4-Tri-O-acetyl- β -L-arabinopyranosyl)trichloroacetimidat (156)

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Gorityala et al.*^[320] wurde der Zucker **158** (86 mg, 0.31 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem CH_2Cl_2 (1.7 mL, 0.18 M) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Trichloroacetonitril (0.13 mL, 1.3 mmol, 4.0 Äq.) und DBU (9.0 μL , 62 μmol , 0.20 Äq.) wurden hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 50:50). Die Reaktionslösung wurde am Rotationsverdampfer (Badtemperatur: 20 °C) eingengt. Die säulenchromatographische Isolation erfolgte über SiO_2 (PE/EtOAc 50:50). Es wurden 80 mg (0.19 mmol, 61 %) des farblosen Feststoffes **156** (β -Anomer) erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[407]

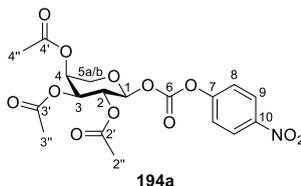


$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 2.02, 2.03 (s, 6 H, 2''-H, 3''-H), 2.15 (s, 3 H, 4''-H), 3.88 (dd, $^2J_{5a,5b} = 13.3$ Hz, $^3J_{5a,4} = 2.0$ Hz, 1 H, 5- H_a), 4.16 (dd, $^2J_{5b,5a} = 13.3$ Hz, $^3J_{5b,4} = 1.3$ Hz, 1 H, 5- H_b), 5.37–5.45 (m, 3 H, 2-H, 3-H, 4-H), 6.55 (d, $^3J_{1,2} = 3.2$ Hz, 1-H), 8.64 (s, 1 H, NH); **$^{13}\text{C-NMR}$**

(151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 20.7, 20.9 (C-2'', C-3''), 21.0 (C-4''), 63.0 (C-5), 67.3, 67.3 (C-2, C-3), 68.5 (C-4), 91.0 (C-1''), 94.2 (C-1), 161.2 (C-1'), 170.1, 170.2 (C-2', C-3'), 170.4 (C-4'); R_f = 0.78 (PE/EtOAc 1:1); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3292, 1740, 1673, 1368, 1246, 1222, 1059, 1010, 968, 939, 796, 642, 476, 455; **MS** (ESI, positiv-Ion): m/z (%) = 441.8 (100) [M+Na]⁺; **Schmelzpunkt**: 91.6 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_D^{20}$ = 50.4 (c = 1.0, CHCl₃).

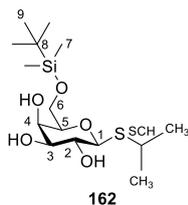
2,3,4-Tri-O-acetyl-1-O-(4-nitrophenyloxycarbonyl)- α -L-arabinopyranosid (194a)

In Anlehnung an eine Vorschrift von *André et al.*^[350] wurde das Anomerengemisch des Zuckers **158** (408 mg, 1.48 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem Acetonitril (49 mL, 30 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Nach der Zugabe von 4-Nitrophenylchlorformiat (316 mg, 1.57 mmol, 1.06 Äq.) und 2,6-Lutidin (182 μ L, 1.57 mmol, 1.06 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 70:30). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser abgebrochen und mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatographische Isolation erfolgte über SiO₂ (PE/EtOAc 60:40). Es wurden 133 mg (301 μ mol, 20 %) des farblosen Schaumes **194a** (α -Anomer) erhalten. Darüber hinaus wurden 23 mg (52 μ mol, 3 %) eines α/β -Anomerengemisch (1:2.1) erhalten. Nicht umgesetztes Edukt (203 mg, 735 μ mol, 50 %) wurde reisoliert als α/β -Anomerengemisch (1:1.8).



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2.10 (s, 3 H, 3''-H), 2.14 (s, 3 H, 4''-H), 2.14 (s, 3 H, 2''-H), 3.83 (dd, ² $J_{5a,5b}$ = 12.5 Hz, ³ $J_{5a,4}$ = 2.8 Hz, 1 H, 5-H_a), 4.18 (dd, ² $J_{5b,5a}$ = 12.5 Hz, ³ $J_{5a,4}$ = 5.1 Hz, 1 H, 5-H_b), 5.19 (dd, ³ $J_{3,2}$ = 7.8 Hz, ³ $J_{3,4}$ = 3.4 Hz, 1 H, 3-H), 5.31–5.36 (m, 2 H, 2-H, 4-H), 5.69 (d, ³ $J_{1,2}$ = 5.6 Hz, 1 H, 1-H), 7.41 (d, ³ $J_{8,9}$ = 9.1 Hz, 2 H, 8-H), 8.29 (d, ³ $J_{9,8}$ = 9.1 Hz, 2 H, 9-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 20.8, 20.9, 21.0 (C-2'', C-3'', C-4''), 62.8 (C-5), 66.3 (C-4), 67.9 (C-2), 69.0 (C-3), 96.1 (C-1), 121.8 (C-8), 125.5 (C-9), 145.8 (C-10), 151.1 (C-6), 155.1 (C-7), 169.3 (C-2'), 170.0 (C-3'), 170.1 (C-4'); R_f = 0.28 (PE/EtOAc 70:30); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 1746, 1594, 1527, 1492, 1370, 1346, 1217, 1173, 1087, 1055, 965, 913, 860, 729, 599, 504; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₈H₂₃N₂O₁₂⁺ [M+NH₄]⁺: 459.1246; gef. 459.1247; **Schmelzpunkt**: 52–58 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_D^{20}$ = -3 (c = 1.0, CHCl₃).

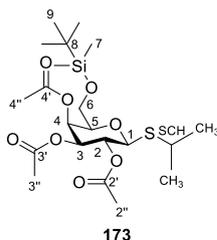
2,3,4-Tri-O-acetyl-1-O-(4-nitrophenyloxycarbonyl)- β -L-arabinopyranosid (194b)



¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 0.03 (s, 3 H, 7-H), 0.03 (s, 3 H, 7-H), 0.85 (s, 9 H, 9-H), 1.21 (d, ³*J*_{CH₃,SCH} = 6.6 Hz, 3 H, CH₃), 1.22 (d, ³*J*_{CH₃,SCH} = 6.6 Hz, 3 H, CH₃), 3.13 (septett, ³*J*_{SCH,CH₃} = 6.6 Hz, 1 H, SCH), 3.26–3.32 (m, 2 H, 2-H, 3-H), 3.40 (t, ³*J* = 6.5 Hz, 1 H, 5-H), 3.59–3.69 (m, 3 H, 4-H, 6-H), 4.28 (d, ³*J*_{1,2} = 8.7 Hz, 1 H, 1-H), 4.39 (d, ³*J*_{4-OH,4} = 4.4 Hz, 1 H, 4-OH), 4.80 (d, ³*J*_{3-OH,3} = 5.0 Hz, 1 H, 3-OH), 4.87 (d, ³*J*_{2-OH,2} = 5.2 Hz, 1 H, 2-OH); **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = -5.4 (C-7), -5.3 (C-7), 17.9 (C-8), 23.8 (CH₃), 23.8 (CH₃), 25.7 (C-9), 33.5 (SCH), 62.7 (C-6), 68.5 (C-4), 69.9 (C-2), 74.6 (C-3), 78.9 (C-5), 84.9 (C-1); **R_f** = 0.27 (PE/EtOAc 40:60); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3392, 2956, 2928, 2857, 1463, 1362, 1250, 1142, 1093, 1061, 939, 834, 775, 747, 659, 575, 527; **HRMS** (ESI): *m/z* ber. für C₁₅H₃₃O₅SSi⁺ [M+NH₄]⁺: 353.1812; gef. 353.1813; **Schmelzpunkt**: 44.8 °C; **Drehwert**: [α]_D²⁰ = -36.4 (c = 1.0, CHCl₃).

Isopropyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-1-thio-β-*D*-galactopyranosid (**173**)

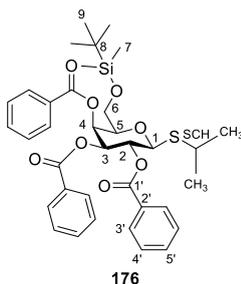
IPTG (**1a**) (1.00 g, 4.20 mmol, 1.00 Äq.) wurde in trockenem Pyridin (10.0 mL, 420 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre gelöst. Nach der Zugabe von DMAP (51 mg, 0.42 mmol, 0.10 Äq.) wurde portionsweise TBS-Cl (1.15 g, 7.62 mmol, 1.81 Äq.) hinzugegeben. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 30:70). Nach vollständigem Umsatz wurde Essigsäureanhydrid (3.17 mL, 33.6 mmol, 8.00 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 30:70). Nach vollständigem Umsatz wurde Wasser hinzugegeben und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde wiederholt mit Toluol überschichtet und unter vermindertem Druck eingengt, um Rückstände des Pyridin zu entfernen. Die säulenchromatographische Isolation erfolgte über SiO₂ (PE/EtOAc 70:30). Es wurden 1.69 g (3.52 mmol, 84 %) des farblosen Feststoffes **173** erhalten.



¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 0.00 (s, 3 H, 7-H), 0.02 (s, 3 H, 7-H), 0.83 (s, 9 H, 9-H), 1.21 (d, ³*J*_{CH₃,SCH} = 6.9 Hz, 3 H, CH₃), 1.24 (d, ³*J*_{CH₃,SCH} = 6.9 Hz, 3 H, CH₃), 1.90 (s, 3 H, 3''-H), 2.01 (s, 3 H, 2''-H), 2.10 (s, 3 H, 4''-H), 3.11 (septett, ³*J*_{SCH,CH₃} = 6.9 Hz, 1 H, SCH), 3.49 (dd, ²*J*_{6a,6b} = 10.0 Hz, ³*J*_{6a,5} = 7.5 Hz, 1 H, 6-H_a), 3.60 (dd, ²*J*_{6b,6a} = 10.0 Hz, ³*J*_{6b,5} = 6.2 Hz, 1 H, 6-H_b), 4.04 (ddd, ³*J*_{5,6a} = 7.5 Hz, ³*J*_{5,6b} = 6.2 Hz, ³*J*_{5,4} = 1.2 Hz, 1 H, 5-H), 4.89–4.97 (m, 2 H, 1-H, 2-H), 5.18 (ddd, ³*J*_{3,2} = 7.9 Hz, ³*J*_{3,4} = 3.6 Hz, ⁴*J*_{3,a} = 2.0 Hz, 1 H, 3-H), 5.34 (dd, ³*J*_{4,3} = 3.6 Hz, ³*J*_{4,5} = 1.2 Hz, 1 H, 4-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = -5.8 (C-7), -5.7 (C-7), 17.7 (C-8), 20.4, 20.4, 20.6 (C-2'', C-3'', C-4''), 23.6 (CH₃), 23.9 (CH₃), 25.6 (C-9), 34.7 (SCH), 60.4 (C-6), 67.1 (C-4), 67.5 (C-2), 71.5 (C-3), 75.6 (C-5), 81.9 (C-1), 169.2 (C-2'), 169.5 (C-3'), 169.7 (C-4'); **R_f** = 0.73 (PE/EtOAc 70:30); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2959, 2924, 2855, 1746, 1471, 1366, 1220, 1152, 1112, 1081, 1052, 1008, 983, 948, 916, 837, 806, 775, 721, 668, 625, 599, 558, 512, 522, 495; **HRMS** (ESI): *m/z* ber. für C₂₁H₄₂NO₈SSi⁺ [M+NH₄]⁺: 496.2395; gef. 496.2401; **Schmelzpunkt**: 59.8 °C; **Drehwert**: [α]_D²⁰ = -16.8 (c = 1.0, CHCl₃).

Isopropyl-2,3,4-tri-*O*-benzoyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-1-thio-β-D-galactopyranosid (176)

IPTG (**1a**) (1.00 g, 4.20 mmol, 1.00 Äq.) wurde in trockenem Pyridin (10 mL, 0.42 M) unter Stickstoff-Atmosphäre gelöst. Nach der Zugabe von DMAP (51 mg, 0.42 mmol, 0.10 Äq.) wurde portionsweise TBS-Cl (1.15 g, 7.62 mmol, 1.81 Äq.) hinzugegeben. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 50:50). Nach vollständigem Umsatz wurde Benzoylchlorid (1.95 mL, 16.8 mmol, 4.00 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 50:50). Nach vollständigem Umsatz wurde Wasser hinzugegeben und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde wiederholt mit Toluol überschichtet und unter vermindertem Druck eingengt, um Rückstände des Pyridin zu entfernen. Die säulenchromatographische Isolation erfolgte über SiO₂ (PE/EtOAc 95:5). Es wurden 1.48 g (2.23 mmol, 53 %) des farblosen Feststoffes **176** erhalten.

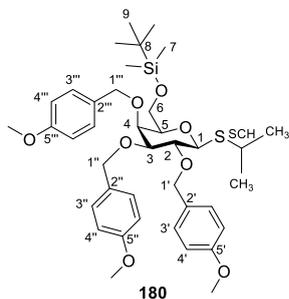


¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = -0.09 (s, 3 H, 7-H), -0.02 (s, 3 H, 7-H), 0.79 (s, 9 H, 9-H), 1.24 (d, ³*J*_{CH₃,SCH} = 6.9 Hz, 3 H, CH₃), 1.29 (d, ³*J*_{CH₃,SCH} = 6.9 Hz, 3 H, CH₃), 3.24 (septett, ³*J*_{SCH,CH₃} = 6.9 Hz, 1 H, SCH), 3.64 (dd, ²*J*_{6a,6b} = 10.0 Hz, ³*J*_{6a,5} = 7.7 Hz, 1 H, 6-H_a), 3.76 (dd, ²*J*_{6b,6a} = 10.0 Hz, ³*J*_{6b,5} = 6.1 Hz, 1 H, 6-H_b), 4.36 (dd, ³*J*_{5,6a} = 7.7 Hz, ³*J*_{5,6b} = 6.1 Hz, 1 H, 5-H), 5.31 (d, ³*J*_{1,2} = 10.0 Hz, 1 H, 1-H), 5.52 (dd, ³*J*_{2,1} = 10.0 Hz, ³*J*_{2,3} = 9.6 Hz, 1 H, 2-H), 5.78–5.85 (m, 2 H, 3-H, 4-H), 7.35 (t, ³*J* = 7.8 Hz, 2 H, 4'-H), 7.48 (t, ³*J* = 7.8 Hz, 2 H, 4'-H), 7.54 (m_c, 1 H, 1'-H), 7.58–7.67 (m, 5 H, 1'-H, 3'-H, 4'-H), 7.72 (m_c, 1 H, 1'-H), 7.86 (m_c, 2 H, 3'-H), 7.93 (m_c, 2 H, 3'-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = -5.8 (C-7), -5.7 (C-7), 17.8 (C-8), 23.5 (CH₃), 24.1 (CH₃), 25.6 (C-9), 34.6 (SCH), 60.5 (C-6), 68.3 (C-4), 68.6 (C-2), 72.6 (C-3), 75.8 (C-5), 81.8 (C-1), 128.6 (arom. C), 128.6 (arom. C), 128.6 (arom. C), 128.8 (arom. C), 128.8 (arom. C), 128.9 (arom. C), 129.0 (arom. C), 129.1 (arom. C), 129.1 (arom. C), 133.6 (C-5'), 133.7 (C-5'), 133.8 (C-5'), 164.6 (C-1'), 164.8 (C-1'), 165.0 (C-1'); **R_f** = 0.18 (PE/EtOAc 95:5); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2948, 2928, 2856, 1729, 1717, 1602, 1452, 1313, 1283, 1257, 1177, 1149, 1093, 1065, 1026, 873, 840, 775, 732, 706, 683, 642, 594, 509; **HRMS** (ESI): *m/z* ber. für C₃₆H₄₈NO₈SSi⁺ [M+NH₄]⁺: 682.2864; gef. 682.2866; **Schmelzpunkt**: 153.8 °C; **Drehwert**: [α]_D²⁰ = 133.7 (c = 1.0, CHCl₃).

Isopropyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2,3,4-tri-*O*-(4-methoxybenzyl)-1-thio-β-*D*-galactopyranosid (180)

In Anlehnung an eine Vorschrift von Ruda *et al.*^[408] wurden in einem sekurierten Schlenkkolben Zucker **162** (100 mg, 284 μmol, 1.00 Äq.) und 4-Methoxybenzylchlorid (172 μL, 1.28 mmol, 4.50 Äq.) in trockenem DMF (1.70 mL, 167 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. In einem zweiten sekurierten Schlenkkolben wurde NaH (60%ige Dispersion in Mineralöl) (51 mg, 1.3 mmol, 4.50 Äq.) in trockenem DMF (1.70 mL, 765 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Die Lösung der Edukte wurde mittels einer Spritzenpumpe tropfenweise über einen Zeitraum von 30 min zur NaH-Lösung hinzugegeben. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 80:20). Die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt und die Reaktion wurde durch Zugabe von MeOH bei 0 °C abgebrochen. Anschließend wurde Ethylacetat hinzugegeben und die organische Phase wurde nacheinander mit Wasser (3×) und gesättigter NaCl-Lösung (1×) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄

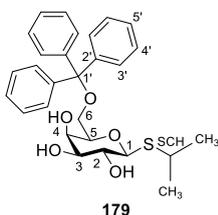
getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 90:10) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 40 mg (56 μmol , 20 %) des farblosen Öles **180** erhalten.



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 0.01 (s, 3 H, 7-H), 0.01 (s, 3 H, 7-H), 0.84 (s, 9 H, 9-H), 1.22 (d, $^3J_{\text{CH}_3,\text{SCH}} = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 1.24 (d, $^3J_{\text{CH}_3,\text{SCH}} = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 3.13 (septett, $^3J_{\text{SCH},\text{CH}_3} = 6.8$ Hz, 1 H, SCH), 3.44 (dd, $^3J_{2,1} = 9.6$ Hz, $^3J_{2,3} = 9.3$ Hz, 1 H, 2-H), 3.45 (dd, $^2J_{6a,6b} = 9.6$ Hz, $^3J_{6a,5} = 5.5$ Hz, 1 H, 6- H_a), 3.49 (dd, $^3J_{5,6b} = 6.3$ Hz, $^3J_{5,6a} = 5.5$ Hz, 1 H, 5-H), 3.56 (dd, $^2J_{6b,6a} = 9.6$ Hz, $^3J_{6b,5} = 6.3$ Hz, 1 H, 6- H_b), 3.64 (dd, $^3J_{3,2} = 9.3$ Hz, $^3J_{3,4} = 2.9$ Hz, 1 H, 3-H), 3.74 (s, 9 H, OCH_3), 3.88 (d, $^3J_{4,3} = 2.9$ Hz, 1 H, 4-H), 4.41 (d, $^2J_{1''a,1''b} = 11.0$ Hz, 1 H, 1''- H_a), 4.50 (d, $^3J_{1,2} = 9.6$ Hz, 1 H, 1-H), 4.58–4.62 (m, 3 H, 1'-H, 1''- H_a), 4.66 (d, $^2J_{1''b,1''a} = 11.0$ Hz, 1 H, 1''- H_b), 4.74 (d, $^2J_{1''b,1''a} = 11.0$ Hz, 1 H, 1''- H_b), 6.84–6.92 (m, 6 H, 4'-H, 4''-H, 4'''-H), 7.23 (d, $^3J_{3',4'} = 8.4$ Hz, 2 H, 3'-H), 7.23 (d, $^3J_{3'',4''} = 8.4$ Hz, 2 H, 3''-H), 7.31 (d, $^3J_{3''',4'''} = 8.4$ Hz, 2 H, 3'''-H); **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = -5.6 (C-7), -5.4 (C-7), 17.8 (C-8), 23.7 (CH_3), 23.9 (CH_3), 25.7 (C-9), 34.2 (SCH), 55.0 (OCH_3), 55.0 (OCH_3), 55.0 (OCH_3), 62.2 (C-6), 71.3 (C-1''), 73.5, 73.5 (C-4, C-1'''), 74.1 (C-1'), 78.0, 78.0 (C-5, C-2), 82.8 (C-3), 83.4 (C-1), 113.4, 113.5, 113.6 (C-4', C-4'', C-4'''), 129.3, 129.4, 129.4 (C-3', C-3'', C-3'''), 130.5, 130.6, 130.8 (C-2', C-2'', C-2'''), 158.7, 158.7, 158.7 (C-5', C-5'', C-5'''); $R_f = 0.51$ (PE/EtOAc 80:20); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2954, 2928, 2853, 1612, 1586, 1513, 1463, 1361, 1302, 1247, 1173, 1149, 1097, 1036, 837, 777, 518; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{39}\text{H}_{60}\text{NO}_8\text{SSi}^+$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 730.3803; gef. 730.3819; **Drehwert**: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 8.8$ ($c = 1.0$, CHCl_3).

Isopropyl-6-O-trityl-1-thio- β -D-galactopyranosid (179)

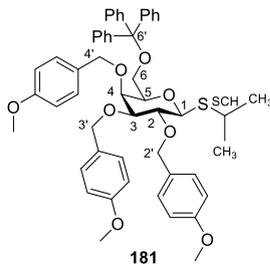
In Anlehnung an eine Vorschrift von *Du et al.*^[409] wurde IPTG (**1a**) (5.00 g, 21.0 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem Pyridin (7.00 mL, 3.00 M) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Nach der portionsweisen Zugabe von Tritylchlorid (11.7 g, 42.0 mmol, 2.00 Äq.) und DMAP (256 mg, 2.10 mmol, 10.0 mol%) wurde die Reaktionslösung für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 50:50). Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktionslösung mit Ethylacetat verdünnt und mit Wasser (3 \times), gesättigter NaHCO₃-Lösung (1 \times) und gesättigter NaCl-Lösung (1 \times) gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Die säulenchromatographische Isolation erfolgte über SiO₂ (PE/EtOAc 50:50 \rightarrow 30:70). Es wurden 7.68 g (16.0 mmol, 76 %) des farblosen Feststoffes **179** erhalten.



¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.28 (d, $^3J_{\text{CH}_3,\text{SCH}} = 6.8$ Hz, 3 H, CH₃), 1.31 (d, $^3J_{\text{CH}_3,\text{SCH}} = 6.8$ Hz, 3 H, CH₃), 2.93 (dd, $^2J_{6a,6b} = 9.7$ Hz, $^3J_{6a,5} = 3.7$ Hz, 1 H, 6-H_a), 3.20–3.28 (m, 2 H, SCH, 6-H_b), 3.28–3.32 (m, 2 H, 2-H, 3-H), 3.56 (brs, 1 H, 4-H), 3.61 (dd, $^3J = 7.7$ Hz, $^3J_{5,6a} = 3.7$ Hz, 1 H, 5-H), 4.36–4.39 (mc, 1 H, 1-H), 4.42 (d, $^3J_{4,\text{OH},4} = 4.5$ Hz, 1 H, 4-OH), 4.82 (d, $^3J_{3,\text{OH},3} = 4.6$ Hz, 1 H, 3-OH), 4.92 (d, $^3J_{2,\text{OH},2} = 5.2$ Hz, 1 H, 2-OH), 7.25 (t, $^3J_{5',4'} = 7.2$ Hz, 3 H, 5'-H), 7.32 (t, $^3J_{4',5'} = 7.6$ Hz, 6 H, 4'-H), 7.41 (d, $^3J_{3',4'} = 7.4$ Hz, 6 H, 3'-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 23.7 (CH₃), 23.8 (CH₃), 33.6 (SCH), 64.0 (C-6), 69.3 (C-4), 69.8 (C-2), 74.5 (C-3), 77.6 (C-5), 84.8 (C-1), 85.7 (C-1'), 126.9 (C-5'), 127.8 (C-4'), 128.3 (C-3'), 143.9 (C-2'); **R_f** = 0.11 (PE/EtOAc 50:50); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3400, 3062, 2925, 2870, 1736, 1594, 1490, 1448, 1368, 1240, 1152, 1060, 1030, 899, 872, 833, 766, 746, 701, 650, 632, 584; **HRMS** (ESI): *m/z* ber. für C₂₈H₃₆NO₅⁺ [M+NH₄]⁺: 498.2309; gef. 498.2311; **Schmelzpunkt**: 68.8 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -23.5$ (c = 1.0, CHCl₃).

Isopropyl-2,3,4-tri-O-(4-methoxybenzyl)-6-O-trityl-1-thio-β-D-galactopyranosid (181)

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Ruda et al.*^[408] wurden in einem sekurierten Schlenkkolben Zucker **179** (100 mg, 208 μmol, 1.00 Äq.) und 4-Methoxybenzylchlorid (126 μL, 936 μmol, 4.50 Äq.) in trockenem DMF (2.00 mL, 104 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. In einem zweiten sekurierten Schlenkkolben wurde NaH (60%ige Dispersion in Mineralöl) (38 mg, 0.94 mmol, 4.5 Äq.) in trockenem DMF (2.00 mL, 0.47 M) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Die Lösung der Edukte wurde mittels einer Spritzenpumpe tropfenweise über einen Zeitraum von 30 min zur NaH-Lösung hinzugegeben. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 90:10). Die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt und die Reaktion wurde durch Zugabe von MeOH bei 0 °C abgebrochen. Anschließend wurde Ethylacetat hinzugegeben und die organische Phase wurde nacheinander mit Wasser (3×) und gesättigter NaCl-Lösung (1×) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 90:10 → EtOAc/MeOH 90:10) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 129 mg (153 μmol, 74 %) des farblosen Feststoffes **181** erhalten.

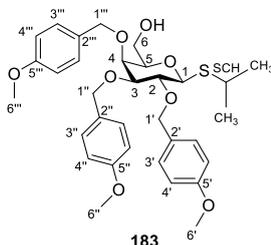


¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.27 (d, ³J_{CH₃,SCH} = 6.8 Hz, 3 H, CH₃), 1.30 (d, ³J_{CH₃,SCH} = 6.8 Hz, 3 H, CH₃), 2.82 (dd, ²J_{6a,6b} = 9.5 Hz, ³J_{6a,5} = 4.5 Hz, 1 H, 6-H_a), 3.17–3.28 (m, 2 H, 6-H_b, SCH), 3.40 (t, ³J_{2,3} = 9.4 Hz, 1 H, 2-H), 3.63 (dd, ³J_{3,2} = 9.4 Hz, ³J_{3,4} = 2.9 Hz, 1 H, 3-H), 3.70–3.74 (m, 1 H, 5-H), 3.72 (s, 3 H, OCH₃), 3.73 (s, 3 H, OCH₃), 3.74 (s, 3 H, OCH₃), 3.88 (d, ³J_{4,3} = 2.9 Hz, 1 H, 4-H), 4.23 (d, ²J_{4a,4b} = 11.0 Hz, 1 H, 4-H_a), 4.53–4.62 (m, 5 H, 1-H, 2'-H, 3'-H_a, 4'-H_b), 4.67 (d, ²J_{3'b,3'a} = 11.4 Hz, 1 H, 3'-H_b), 6.72–6.79 (m, 2 H, arom. H), 6.85–6.92 (m, 6 H, arom. H), 7.20–7.25 (m, 2 H, arom. H), 7.25–7.41 (m, 17 H, arom. H); ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 23.7 (CH₃), 23.7 (CH₃), 34.3 (SCH), 55.0 (OCH₃), 63.6 (C-6), 71.2 (C-3'), 73.3 (C-4'), 73.9 (C-4), 74.1 (C-2'), 76.7 (C-5), 77.8 (C-2), 82.8 (C-3), 83.3 (C-1), 85.9 (C-1'), 113.4 (arom. C), 113.6 (arom. C), 127.0 (arom. C), 127.9 (arom. C), 128.2 (arom. C), 129.3 (arom. C), 129.3 (arom. C), 129.4 (arom. C), 130.4 (arom. C), 130.5 (arom. C), 130.6 (arom. C), 143.7 (arom. C), 158.6 (arom. C), 158.7 (arom. C), 158.7 (arom. C); **R**_f = 0.05 (PE/EtOAc 90:10); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3038, 2931, 2835, 1612, 1586, 1512, 1449, 1360, 1302, 1245, 1173, 1152, 1078, 1031, 899, 820, 747, 705, 650, 632, 600, 515;

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{52}H_{60}NO_8S^+$ $[M+NH_4]^+$: 858.4034; gef. 858.4031; **Schmelzpunkt**: 53.4 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_D^{20} = 6.4$ ($c = 1.0$, $CHCl_3$).

Isopropyl-2,3,4-tri-O-(4-methoxybenzyl)-1-thio- β -D-galactopyranosid (**183**)

In Anlehnung an eine Vorschrift von Ruda *et al.*^[408] wurde der Zucker **181** (1.28 g, 1.52 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem CH_2Cl_2 (63 mL, 24 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach der Zugabe von CSA (38 mg, 0.16 mmol, 0.11 Äq.) gelöst in Methanol (6.3 mL, 25 mM) wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und für 48 h gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 70:30). Nach vollständigem Umsatz wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Isolation erfolgte über SiO_2 (PE/EtOAc 70:30 \rightarrow 30:70). Es wurden 662 mg (1.11 mmol, 73 %) des farblosen Feststoffes **183** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[329]

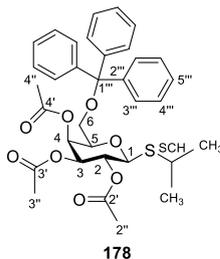


¹H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 1.32 (d, $^3J_{CH_3,SCH} = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 1.33 (d, $^3J_{CH_3,SCH} = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 3.21 (septett, $^3J_{SCH,CH_3} = 6.8$ Hz, 1 H, SCH), 3.34–3.38 (m, 1 H, 5-H), 3.40 (ddd, $^2J_{6a,6b} = 11.1$ Hz, $^3J_{6a,5} = 8.2$ Hz, $^3J_{6a,6-OH} = 5.1$ Hz, 1 H, 6- H_a), 3.53 (dd, $^3J_{3,2} = 9.3$ Hz, $^3J_{3,4} = 2.8$ Hz, 1 H, 3-H), 3.70–3.79 (m, 3 H, 2-H, 4-H, 6- H_b), 3.80 (s, 6 H, OCH_3), 3.82 (s, 3 H, OCH_3), 4.46 (d, $^3J_{1,2} = 9.7$ Hz, 1 H, 1-H), 4.59 (d, $^2J_{1''a,1''b} = 11.7$ Hz, 1 H, 1''- H_a), 4.68 (d, $^2J_{1''a,1''b} = 11.4$ Hz, 1 H, 1''- H_a), 4.71 (d, $^2J_{1'a,1'b} = 9.8$ Hz, 1 H, 1'- H_a), 4.72 (d, $^2J_{1''b,1''a} = 11.4$ Hz, 1 H, 1''- H_b), 4.82 (d, $^2J_{1'b,1'a} = 9.8$ Hz, 1 H, 1'- H_b), 4.87 (d, $^2J_{1''b,1''a} = 11.7$ Hz, 1 H, 1''- H_b), 6.86 (d, $^3J_{4',3'} = 8.5$ Hz, 2 H, 4'-H), 6.86 (d, $^3J_{4'',3''} = 8.5$ Hz, 2 H, 4''-H), 6.89 (d, $^3J_{4',3'} = 8.5$ Hz, 2 H, 4'-H), 7.25 (d, $^3J_{3'',4''} = 8.5$ Hz, 2 H, 3''-H), 7.31 (d, $^3J_{3'',4''} = 8.5$ Hz, 2 H, 3''-H), 7.33 (d, $^3J_{3',4'} = 8.5$ Hz, 2 H, 3'-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 24.1 (CH_3), 35.4 (CH_3), 55.4 (SCH), 55.4, 55.4 (C-6', C-6'', C-6'''), 62.4 (C-6), 72.6 (C-4), 73.0 (C-1'''), 73.6 (C-1'''), 75.6 (C-1'), 78.6 (C-2), 78.7 (C-5), 84.1 (C-3), 85.2 (C-1), 113.8, 113.9, 114.0 (C-4', C-4'', C-4'''), 129.4 (C-3''), 130.1 (C-3'''), 130.2 (C-3'), 130.5, 130.6, 130.7 (C-2', C-2'', C-2'''), 159.4, 159.4, 159.5 (C-5', C-5'', C-5'''); $R_f = 0.09$ (PE/EtOAc 70:30); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3355, 2948, 2910, 2864, 2841, 1614, 1585, 1513, 1462, 1360, 1302, 1249, 1169, 1136, 1097, 1081, 1050, 1028, 996, 875, 819, 776, 700, 636, 603, 568, 515; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $C_{33}H_{46}NO_8S^+$

$[M+NH_4]^+$: 616.2939; gef. 616.2945; **Schmelzpunkt**: 137.2 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_D^{20} = -12.7$ ($c = 1.0$, $CHCl_3$).

Isopropyl-2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-trityl-1-thio- β -D-galactopyranosid (**178**)

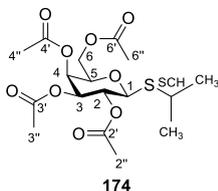
IPTG (**1a**) (1.00 g, 4.20 mmol, 1.00 Äq.) wurde in trockenem Pyridin (10.0 mL, 420 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre gelöst. Nach der Zugabe von Tritylchlorid (1.21 g, 4.32 mmol, 1.03 Äq.) und DMAP (51 mg, 0.42 mmol, 0.10 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 21 h bei 80 °C gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 50:50). Nach vollständigem Umsatz wurde Essigsäureanhydrid (2.38 mL, 25.2 mmol, 6.00 Äq.) zur heißen Reaktionslösung hinzugegeben und diese wurde für 1 h gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 50:50). Nach vollständigem Umsatz wurde Wasser hinzugegeben und mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung und gesättigter $NaCl$ -Lösung gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über $MgSO_4$ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde wiederholt mit Toluol überschichtet und unter vermindertem Druck eingengt, um Rückstände des Pyridin zu entfernen. Die säulenchromatographische Isolation erfolgte über SiO_2 (PE/EtOAc 90:10). Es wurden 417 mg (678 μ mol, 16 %) des farblosen Feststoffes **178** erhalten. Darüber hinaus wurden 947 mg (2.33 mmol, 55 %) des peracetylierten IPTG (**174**) als Nebenprodukt isoliert.



1H -NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$): δ [ppm] = 1.20 (d, $^3J_{CH_3,SCH} = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 1.24 (d, $^3J_{CH_3,SCH} = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 1.87 (s, 3 H, 4''-H), 1.91 (s, 3 H, 3''-H), 2.01 (s, 3 H, 2''-H), 2.78 (dd, $^2J_{6a,6b} = 8.9$ Hz, $^3J_{6a,5} = 7.2$ Hz, 1 H, 6-H_a), 3.06–3.16 (m, 2 H, SCH, 6-H_b), 4.32 (t, $^3J_{5,6a} = 7.2$ Hz, 1 H, 5-H), 4.89 (d, $^3J_{2,1} = 10.1$ Hz, $^3J_{2,3} = 9.7$ Hz, 1 H, 2-H), 4.93 (d, $^3J_{1,2} = 10.1$ Hz, 1 H, 1-H), 5.22 (dd, $^3J_{3,2} = 9.7$ Hz, $^3J_{3,4} = 3.6$ Hz, 1 H, 3-H), 5.44 (d, $^3J_{4,3} = 3.6$ Hz, 1 H, 4-H), 7.24–7.30 (m, 3 H, 5''-H), 7.30–7.39 (m, 12 H, 2''-H, 3''-H, 4''-H); **^{13}C -NMR** (151 MHz, $DMSO-d_6$): δ [ppm] = 20.2, 20.4, 20.6 (C-2'', C-3'', C-4''), 23.6 (CH_3), 23.8 (CH_3), 34.8 (SCH), 60.9 (C-6), 67.4 (C-2), 67.6 (C-4), 71.3 (C-3), 74.2 (C-5), 82.0 (C-1), 86.1 (C-1''), 127.2 (C-5''), 127.9, 128.1 (C-3'', C-4''), 143.2 (C-2''), 169.2 (C-2'), 169.5 (C-3'), 169.6 (C-4'); $R_f = 0.41$ (PE/EtOAc 80:20); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2960, 2924, 2870, 1743, 1491, 1448, 1369, 1267, 1251, 1220, 1153, 1097, 1080, 1044, 990, 950, 917, 901, 825,

780, 764, 755, 738, 700, 650, 632, 589, 566, 490; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $C_{34}H_{42}NO_8S^+$ $[M+NH_4]^+$: 624.2626; gef. 624.2624; **Schmelzpunkt**: 172.3 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_D^{20} = -39.2$ ($c = 1.0$, $CHCl_3$).

Isopropyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio- β -D-galactopyranosid (174)

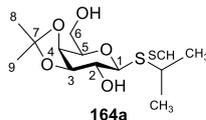


¹H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 1.23 (d, $^3J_{CH_3,SCH} = 6.9$ Hz, 3 H, CH_3), 1.25 (d, $^3J_{CH_3,SCH} = 6.9$ Hz, 3 H, CH_3), 1.92 (s, 3 H, 3''-H), 1.99 (s, 3 H, 6''-H), 2.01 (s, 3 H, 2''-H), 2.12 (s, 3 H, 4''-H), 3.11 (septett, $^3J_{SCH,CH_3} = 6.9$ Hz, 1 H, SCH), 3.99 (dd, $^2J_{6a,6b} = 11.4$ Hz, $^3J_{6a,5} = 5.4$ Hz, 1 H, 6-H_a), 4.04 (dd, $^2J_{6b,6a} = 11.4$ Hz, $^3J_{6b,5} = 7.2$ Hz, 1 H, 6-H_b), 4.23 (dd, $^3J_{5,6b} = 7.2$ Hz, $^3J_{5,6a} = 5.4$ Hz, 1 H, 5-H), 4.90–5.00 (m, 2 H, 1-H, 2-H), 5.20 (dd, $^3J_{3,2} = 8.8$ Hz, $^3J_{3,4} = 3.6$ Hz, 1 H, 3-H), 5.30 (d, $^3J_{4,3} = 3.6$ Hz, 1 H, 4-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 20.3, 20.4, 20.4, 20.6 (C-2'', C-3'', C-4'', C-6''), 23.7 (CH_3), 23.8 (CH_3), 35.0 (SCH), 61.6 (C-6), 67.3 (C-2), 67.6 (C-4), 71.1 (C-3), 73.3 (C-5), 82.0 (C-1), 169.2 (C-2'), 169.4 (C-3'), 169.8 (C-6'), 170.0 (C-4'); $R_f = 0.24$ (PE/EtOAc 80:20); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2977, 2864, 1742, 1432, 1366, 1215, 1159, 1080, 1050, 951, 919, 901, 823, 717, 671, 646, 600, 557, 497; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $C_{17}H_{30}NO_9S^+$ $[M+NH_4]^+$: 424.1636; gef. 424.1640; **Schmelzpunkt**: 71.3 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_D^{20} = -6.2$ ($c = 1.0$, $CHCl_3$).

Isopropyl-3,4-O-(1-methylethyliden)-1-thio- β -D-galactopyranosid (164a)

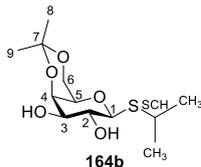
In Anlehnung an eine Vorschrift von *Du et al.*^[326] wurde IPTG (**1a**) (5.00 g, 19.9 mmol, 1.00 Äq.) in Aceton (147 mL, 135 mM) vorgelegt. Nach der Zugabe von CSA (945 mg, 3.99 mmol, 20.0 mol%) und 2,2-Dimethoxypropan (3.66 mL, 29.9 mmol, 1.50 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 50:50). Die Reaktion wurde durch Zugabe von $NaHCO_3$ abgebrochen und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in CH_2Cl_2 gelöst und mit gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 (3 \times) extrahiert und die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter $NaCl$ -Lösung gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über $MgSO_4$ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die säulenchromatographische Isolation erfolgte über SiO_2 (PE/EtOAc 50:50). Es wurden 3.90 g (14.0 mmol, 70 %) des farblosen

Feststoffes **164a** und zusätzlich 814 mg (2.92 mmol, 15 %) des farblosen Feststoffes **164b** als Nebenprodukt erhalten.



¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.22 (d, ³*J*_{CH₃,SCH} = 6.9 Hz, 3 H, CH₃), 1.23 (d, ³*J*_{CH₃,SCH} = 6.9 Hz, 3 H, CH₃), 1.25 (s, 3 H, 7-H oder 8-H), 1.38 (s, 3 H, 7-H oder 8-H), 3.14 (septett, ³*J*_{SCH,CH₃} = 6.9 Hz, 1 H, SCH), 3.23 (ddd, ³*J*_{2,1} = 9.9 Hz, ³*J*_{2,3} = 6.6 Hz, ³*J*_{2,-OH} = 6.1 Hz, 1 H, 2-H), 3.51 (m, 2 H, 6-H), 3.73 (td, ³*J*_{5,6} = 6.3 Hz, ³*J*_{5,4} = 2.0 Hz, 1 H, 5-H), 3.92 (dd, ³*J*_{3,2} = 6.6 Hz, ³*J*_{3,4} = 5.6 Hz, 1 H, 3-H), 4.14 (dd, ³*J*_{4,3} = 5.6 Hz, ³*J*_{4,5} = 2.0 Hz, 1 H, 4-H), 4.35 (d, ³*J*_{1,2} = 9.9 Hz, 1 H, 1-H), 4.73 (t, ³*J*_{6,-OH,6} = 5.6 Hz, 1 H, 6-OH), 5.29 (d, ³*J*_{2,-OH,2} = 6.1 Hz, 1 H, 2-OH); **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 23.7 (CH₃), 23.8 (CH₃), 26.4, 28.2 (C-7, C-8), 33.4 (SCH), 60.6 (C-6), 71.8 (C-2), 73.4 (C-4), 76.5 (C-5), 79.5 (C-3), 83.9 (C-1), 108.4 (C-7); **R_f** = 0.23 (PE/EtOAc 50:50); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3301, 2990, 2924, 2864, 1460, 1369, 1239, 1215, 1141, 1073, 1020, 962, 872, 840, 725, 641, 570, 536, 504; **HRMS** (ESI): *m/z* ber. für C₁₂H₂₆NO₅S⁺ [M+NH₄]⁺: 296.1526; gef. 296.1527; **Schmelzpunkt**: 89.8 °C; **Drehwert**: [α]_D²⁰ = 3.4 (c = 1.0, CHCl₃).

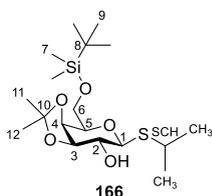
Isopropyl-4,6-O-(1-methylethyliden)-1-thio-β-D-galactopyranosid (**164b**)



¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.21 (d, ³*J*_{CH₃,SCH} = 6.8 Hz, 3 H, CH₃), 1.26 (d, ³*J*_{CH₃,SCH} = 6.8 Hz, 3 H, CH₃), 1.27 (s, 3 H, 7-H oder 8-H), 1.36 (s, 3 H, 7-H oder 8-H), 3.15 (septett, ³*J*_{SCH,CH₃} = 6.8 Hz, 1 H, SCH), 3.32 (m, 1 H, 5-H), 3.37 (m, 2 H, 2-H, 3-H), 3.62 (dd, ²*J*_{6a,6b} = 12.7 Hz, ³*J*_{6a,5} = 1.6 Hz, 1 H, 6-H_a), 3.95 (dd, ²*J*_{6b,6a} = 12.7 Hz, ³*J*_{6b,5} = 2.0 Hz, 1 H, 6-H_b), 4.05 (d, ³*J*_{4,3} = 2.8 Hz, 1 H, 4-H), 4.31 (d, ³*J*_{1,2} = 8.6 Hz, 1 H, 1-H), 4.73 (d, ³*J*_{3,-OH,3} = 6.9 Hz, 1 H, 3-OH), 4.91 (d, ³*J*_{2,-OH,2} = 5.1 Hz, 1 H, 2-OH); **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 8.7 (C-7 oder C-8), 23.6 (CH₃), 24.0 (CH₃), 29.4 (C-7 oder C-8), 33.1 (SCH), 62.4 (C-6), 68.8 (C-4), 68.9 (C-5), 68.9 (C-2), 73.2 (C-3), 84.4 (C-1), 97.7 (C-7); **R_f** = 0.05 (PE/EtOAc 50:50); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3408, 2972, 2910, 2864, 1361, 1368, 1281, 1192, 1165, 1139, 1090, 1062, 1051, 975, 888, 861, 827, 705, 642, 609, 550, 518; **HRMS** (ESI): *m/z* ber. für C₁₂H₂₆NO₅S⁺ [M+NH₄]⁺: 296.1526; gef. 296.1532; **Schmelzpunkt**: 132.5 °C; **Drehwert**: [α]_D²⁰ = -50.9 (c = 1.0, CHCl₃).

Isopropyl-6-O-tert-butyldimethylsilyl-3,4-O-(1-methylethyliden)-1-thio-β-D-galactopyranosid (166)

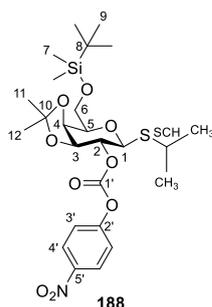
In Anlehnung an eine Vorschrift von *Du et al.*^[326] wurde Zucker **164a** (1.00 g, 3.59 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem Pyridin (20.0 mL, 180 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Nach der portionsweisen Zugabe von TBS-Cl (1.14 g, 7.54 mmol, 1.20 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 60:40). Nach vollständigem Umsatz wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in CH₂Cl₂ gelöst und mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Die säulenchromatographische Isolation erfolgte über SiO₂ (PE/EtOAc 85:15). Es wurden 1.05 g (2.67 mmol, 74 %) des farblosen Feststoffes **166** erhalten.



¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 0.04 (s, 3 H, 7-H), 0.05 (s, 3 H, 7-H), 0.86 (s, 9 H, 9-H), 1.22 (d, ³J_{CH₃,SCH} = 6.8 Hz, 3 H, CH₃), 1.23 (d, ³J_{CH₃,SCH} = 6.8 Hz, 3 H, CH₃), 1.24 (s, 3 H, 11-H oder 12-H), 1.38 (s, 3 H, 11-H oder 12-H), 3.13 (septett, ³J_{SCH,CH₃} = 6.8 Hz, 1 H, SCH), 3.23 (dd, ³J_{2,1} = 9.9 Hz, ³J_{2,3} = 7.0 Hz, 1 H, 2-H), 3.66 (dd, ²J_{6a,6b} = 10.4 Hz, ³J_{6a,5} = 7.2 Hz, 1 H, 6-H_a), 3.71 (dd, ²J_{6b,6a} = 10.4 Hz, ³J_{6b,5} = 5.4 Hz, 1 H, 6-H_b), 3.81 (ddd, ³J_{5,6a} = 7.2 Hz, ³J_{5,6b} = 5.4 Hz, ³J_{5,4} = 2.0 Hz, 1 H, 5-H), 3.93 (dd, ³J_{3,2} = 7.0 Hz, ³J_{3,4} = 5.4 Hz, 1 H, 3-H), 4.14 (dd, ³J_{4,3} = 5.4 Hz, ³J_{4,5} = 2.0 Hz, 1 H, 4-H), 4.37 (d, ³J_{1,2} = 9.9 Hz, 1 H, 1-H), 5.28 (brs, 1 H, 2-OH); **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = -5.6 (C-7), -5.4 (C-7), 17.9 (C-8), 23.7 (CH₃), 23.8 (CH₃), 25.6 (C-9), 26.3, 28.1 (C-11, C-12), 33.5 (SCH), 62.3 (C-6), 71.7 (C-2), 73.2 (C-4), 76.0 (C-5), 79.5 (C-3), 83.8 (C-1), 108.5 (C-10); **R_f** = 0.62 (PE/EtOAc 60:40); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3407, 2954, 2929, 2857, 1472, 1385, 1358, 1223, 1241, 1141, 1110, 1075, 1025, 962, 876, 836, 772, 714, 582, 532, 477; **HRMS** (ESI): *m/z* ber. für C₁₈H₃₇O₅SSi⁺ [M+H]⁺: 393.2125; gef. 393.2121; **Schmelzpunkt**: 45.3 °C; **Drehwert**: [α]_D²⁰ = -15.5 (c = 1.0, CHCl₃).

Isopropyl-6-O-tert-butylidimethylsilyl-3,4-O-(1-methylethyliden)-2-(4-nitrophenoxy-carbonyl)-1-thio-β-D-galactopyranosid (188)

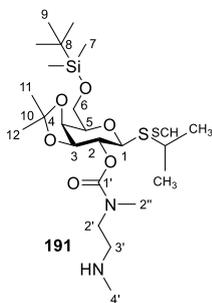
Der Zucker **166** (1.00 g, 2.55 mmol, 1.00 Äq.) wurde in trockenem Pyridin (20.0 mL, 128 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Nach der portionsweisen Zugabe von 4-Nitrophenylchlorformiat (2.26 g, 11.2 mmol, 4.39 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 70:30). Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktionslösung mit CH₂Cl₂ verdünnt und mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatographische Isolation erfolgte über SiO₂ (PE/EtOAc 85:15). Es wurden 1.23 g (2.21 mmol, 87 %) des farblosen Feststoffes **188** erhalten.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.08 (s, 6 H, 7-H), 0.89 (s, 9 H, 9-H), 1.33 (d, ³J_{CH₃,SCH} = 6.8 Hz, 3 H, CH₃), 1.33 (d, ³J_{CH₃,SCH} = 6.8 Hz, 3 H, CH₃), 1.36 (s, 3 H, 11-H oder 12-H), 1.56 (s, 3 H, 11-H oder 12-H), 3.21 (septett, ³J_{SCH,CH₃} = 6.8 Hz, 1 H, SCH), 3.81–3.93 (m, 3 H, 5-H, 6-H), 4.27 (dd, ³J_{3,2} = 7.3 Hz, ³J_{3,4} = 5.2 Hz, 1 H, 3-H), 4.32 (dd, ³J_{4,3} = 5.2 Hz, ³J_{4,5} = 1.4 Hz, 1 H, 4-H), 4.53 (d, ³J_{1,2} = 10.4 Hz, 1 H, 1-H), 4.85 (dd, ³J_{2,1} = 10.4 Hz, ³J_{2,3} = 7.3 Hz, 1 H, 2-H), 7.37–7.45 (m, 2 H, 2'-H), 8.21–8.31 (m, 2 H, 3'-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -5.4 (C-7), -5.2 (C-7), 18.4 (C-8), 24.1 (CH₃), 24.2 (CH₃), 25.9 (C-9), 26.5, 28.0 (C-11, C-12), 35.8 (SCH), 62.1 (C-6), 73.6 (C-4), 76.8 (C-3), 77.3 (C-5), 77.8 (C-2), 82.4 (C-1), 110.8 (C-10), 122.0 (C-2'), 125.4 (C-3'), 145.6 (C-4'), 152.1 (C-2'), 155.7 (C-1'); **R_f** = 0.73 (PE/EtOAc 70:30); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2954, 2929, 2853, 1768, 1617, 1594, 1519, 1492, 1464, 1374, 1345, 1307, 1247, 1215, 1164, 1117, 1072, 989, 957, 878, 836, 774, 751, 707, 674, 641, 573, 536, 499; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₂₅H₄₀NO₉SSi⁺ [M+H]⁺: 558.2188; gef. 558.2186; **Schmelzpunkt**: 135.0 °C; **Drehwert**: [α]_D²⁰ = 48.8 (c = 1.0, CHCl₃).

Isopropyl-6-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2-O-[[methyl]aminoethyl][methyl]carbamoyl)-3,4-O-(1-methylethyliden)-1-thio- β -D-galactopyranosid (191)

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Fomina et al.*^[396] wurde Zucker **188** (100 mg, 179 μ mol, 1.00 Äq.) in CH_2Cl_2 (2.00 mL, 89.5 mM) vorgelegt. Anschließend erfolgte die tropfenweise Zugabe zu einer 0 °C kalten Lösung von *N,N'*-Dimethylethylendiamin (206 μ L, 1.79 mmol, 10.0 Äq.) in CH_2Cl_2 (4.00 mL, 448 mM) über einen Zeitraum von 30 min. Die Reaktionslösung wurde für weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 70:30), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat gelöst und nacheinander mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (EtOAc/MeOH/ NEt_3 87:10:3) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 90 mg (0.18 mmol, 99 %) des leichtgelben Öles **191** erhalten.

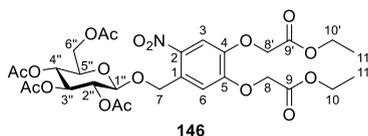


$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.06 (s, 6 H, 7-H), 0.88 (s, 9 H, 9-H), 1.25–1.31 (m, 6 H, CH_3), 1.33 (s, 3 H, 11-H oder 12-H), 1.56 (s, 3 H, 11-H oder 12-H), 2.42–2.50 (m, 3 H, 4'-H), 2.50–2.67 (brs, 1 H, NH), 2.72–2.88 (m, 2 H, 3'-H), 2.88–3.01 (m, 3 H, 2''-H), 3.11–3.22 (m, 1 H, SCH), 3.22–3.41 (m, 1 H, 2'-H_a), 3.48–3.68 (m, 1 H, 2'-H_b), 3.76–3.81 (m, 1 H, 5-H), 3.81–3.90 (m, 2 H, 6-H), 4.18–4.23 (m, 1 H, 3-H), 4.23–4.29 (m, 1 H, 4-H), 4.51 (mc, 1 H, 1-H), 4.79–4.94 (m, 1 H, 2-H); **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = –5.4 (C-7), –5.3 (C-7), 18.4 (C-8), 23.9 (CH_3), 24.0 (CH_3), 24.2 (CH_3), 24.3 (CH_3), 25.9 (C-9), 26.5, 28.0 (C-11, C-12), 35.0 (C-2''), 35.0 (SCH), 35.5 (C-2''), 35.8 (C-4'), 36.3 (C-4'), 48.3 (C-2'), 48.6 (C-2'), 49.1 (C-3'), 49.7 (C-3'), 62.2 (C-6), 73.5, 73.6, 73.6, 73.6, (C-2, C-4), 77.2 (C-5), 77.6 (C-3), 82.8 (C-1), 83.0 (C-1), 110.4 (C-10), 155.4 (C-1'), 155.9 (C-1'); R_f = 0.23 (EtOAc/MeOH/ NEt_3 87:10:3); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2962, 2929, 2857, 1704, 1463, 1401, 1382, 1242, 1220, 1184, 1154, 1109, 1080, 875, 835, 777, 667, 538; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{23}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_6\text{SSi}^+$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 507.2919; gef. 507.2924.

6.8 Synthesevorschriften zur Darstellung der *photocaged* Kohlenhydrate

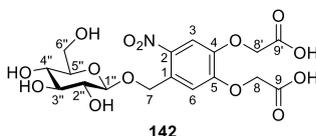
2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-O-[4,5-bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzyl]- α -D-glucopyranosid (146)

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Binder et al.*^[77] wurden in einem sekurierten Schlenkkolben 250 mg Molsieb (3 Å) und Zucker **143** (100 mg, 243 μ mol, 1.00 Äq.) in trockenem CH_2Cl_2 (5.00 mL, 48.6 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. In einem zweiten sekurierten Schlenkkolben wurden 250 mg Molsieb (3 Å) und Alkohol **105** (261 mg, 730 μ mol, 3.00 Äq.) in trockenem CH_2Cl_2 (5.00 mL, 146 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Die Lösungen wurden für 1 h gerührt bevor der Zucker **149** zum gelösten Alkohol gegeben wurde. Silbertriflat (75 mg, 0.29 mmol, 1.2 Äq.) wurde hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 24 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 50:50). Die Reaktionslösung wurde über Celite filtriert, um das Molsieb abzutrennen. Anschließend wurde das Filtrat unter vermindertem Druck bei 20 °C eingeeengt. Die säulenchromatographische Isolation erfolgte über Kieselgel (PE/EtOAc 50:50). Es wurden 67 mg (97 μ mol, 40 %) des farblosen Feststoffes erhalten. Dieser wurde direkt in der Folgereaktion eingesetzt.



1-O-[4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzyl]- α -D-glucopyranosid – BC-cGlukose (142)

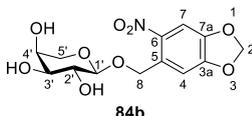
Der geschützte Zucker **146** (24 mg, 37 μ mol, 1.0 Äq.) in THF (0.40 mL, 93 mM) vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe einer 0.20 M Lithiumhydroxid-Lösung (1.8 mL, 0.37 mmol, 2.0 Äq.) und es wurde für 1 h bei RT gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (EtOAc), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt und über Nacht lyophilisiert. Anschließend wurde der Rückstand in Wasser gelöst und für 10 min mit Dowex 50WX4 gerührt. Es wurden 18 mg (39 μ mol, quant.) des farblosen Feststoffes **142** erhalten.



¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ [ppm] = 3.32–3.46 (m, 3 H, 2''-H, 3''-H, 5''-H), 3.49 (t, ³J = 8.6 Hz, 1 H, 4''-H), 3.72 (dd, ²J_{6''a,6''b} = 12.4 Hz, ³J_{6''a,5} = 5.0 Hz, 1 H, 6''-H_a), 3.90 (d, ²J_{6''b,6''a} = 12.4 Hz, 1 H, 6''-H_b), 4.53 (d, ³J_{1'',2''} = 7.9 Hz, 1 H, 1''-H), 4.63 (s, 2 H, 8'-H), 4.68 (s, 2 H, 8-H), 5.14 (d, ²J_{7a,7b} = 14.6 Hz, 1 H, 7-H_a), 5.21 (d, ²J_{7b,7a} = 14.6 Hz, 1 H, 7-H_b), 7.25 (s, 1 H, 6-H), 7.68 (s, 1 H, 3-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, D₂O): δ [ppm] = 60.7 (C-6''), 67.3, 67.4 (C-8, C-8'), 68.1 (C-7), 69.6 (C-5''), 73.2 (C-2''), 75.7 (C-4''), 76.0 (C-3''), 101.8 (C-1''), 109.7 (C-3), 112.2 (C-6), 129.0 (C-1), 139.6 (C-2), 146.0 (C-4), 152.0 (C-5), 175.3 (C-9), 175.6 (C-9').

1-O-(6-Nitropiperonyl)-α-L-arabinopyranosid – NP-cArabinose (**84b**)

Nach einer Vorschrift von *Binder et al.*^[77] wurden in einem sekurierten Schlenk Kolben 770 mg Molsieb (3 Å) und Zucker **149** (260 mg, 766 μmol, 1.00 Äq.) in trockenem CH₂Cl₂ (5.00 mL, 153 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. In einem zweiten sekurierten Schlenk Kolben wurden 770 mg Molsieb (3 Å) und 6-Nitropiperonylalkohol (**90**) (291 mg, 1.48 mmol, 2.00 Äq.) in trockenem CH₂Cl₂ (5.00 mL, 296 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Die Lösungen wurden für 1 h gerührt bevor der Zucker **149** zum gelösten Cumarin gegeben wurde. Silbertriflat (114 mg, 443 μmol, 0.580 Äq.) und Silbercarbonat (123 mg, 446 μmol, 0.580 Äq.) wurden hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 18 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 70:30). Die Reaktionslösung wurde über Celite filtriert, um das Molsieb abzutrennen. Das Filtrat wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (2×30 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (2×20 mL) gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde in MeOH (4.5 mL) gelöst und mit Ammoniak (7 N in MeOH) (2.50 mL, 10.3 mmol, 13.4 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 4 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 70:30), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Die Reaktionslösung wurde unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und mit CH₂Cl₂ (3×) extrahiert, um überschüssigen 6-Nitropiperonylalkohol (**90**) zu entfernen. Die wässrige Phase wurde lyophilisiert und es wurden 108 mg (328 μmol, 43 %) des schwach gelben Feststoffes **84b** erhalten.



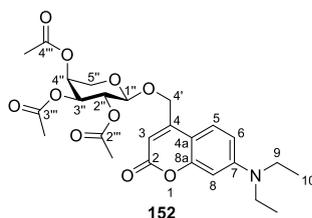
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.33–3.51 (m, 3 H, 2-H, 4-H, 5-H_a), 3.62–3.66 (m, 1 H, 3-H), 3.70 (dd, ²J_{5''b,5''a} = 12.1 Hz, ³J_{5''a,4} = 3.3 Hz, 1 H, 5''-H_b), 4.23 (d, ³J_{1,2} = 6.7 Hz, 1 H, 1-H), 4.58 (d,

$^3J_{3\text{-OH},3} = 4.5$ Hz, 1 H, 3-OH), 4.72 (d, $^3J_{4\text{-OH},4} = 5.6$ Hz, 1 H, 4-OH), 4.86 (d, $^2J_{8a,8b} = 16.0$ Hz, 1 H, 8-H_a), 5.01 (d, $^2J_{8b,8a} = 16.0$ Hz, 1 H, 8-H_b), 5.23 (d, $^3J_{2\text{-OH},2} = 4.8$ Hz, 1 H, 2-OH), 6.24 (s, 2 H, 2-H), 7.56 (s, 1 H, 4-H), 7.70 (s, 1 H, 7-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 65.5 (C-5'), 66.5 (C-8), 67.6 (C-3'), 70.7 (C-2'), 72.4 (C-4'), 103.0 (C-1'), 103.5 (C-2), 105.1 (C-7), 107.3 (C-4), 133.1 (C-5), 140.3 (C-6), 146.7 (C-7a), 152.6 (C-3a); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3412, 2924, 2855, 1752, 1679, 1610, 1519, 1488, 1374, 1328, 1260, 1229, 1145, 1061, 1037, 931, 794, 778, 755, 641; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NNaO}_9^+$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 352.0639; gef. 352.0640; **Schmelzpunkt**: 174 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -4$ (c = 0.1, CHCl_3); **UV/Vis-Absorption** [Tris-Puffer (20 mM, pH = 7.5)/MeCN 1:1]: λ_{max} (ϵ) = 244 nm (11106 $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 352 (6051).

Achirale Umkehrphasen-HPLC: $t_{\text{R}} = 5.4$ min; Säule: *HyperClone* 5 μ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*); Detektion (UV): 352 nm; Eluent: MeOH : H₂O (40:60); Flussrate: 0.5 mL/min; Säulentemperatur: 25 °C; Probenlösungsmittel: Tris-Puffer (20 mM, pH = 7.5)/MeCN 1:1.

2,3,4-Tri-O-acetyl-1-O-[[7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl]methyl]- α -L-arabino-pyranosid (**152**)

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Binder et al.*^[77] wurden in einem sekurierten Schlenkkolben 500 mg Molsieb (3 Å) und Zucker **149** (200 mg, 589 μmol , 1.00 Äq.) in trockenem CH_2Cl_2 (10.0 mL, 58.9 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. In einem zweiten sekurierten Schlenkkolben wurden 500 mg Molsieb (3 Å) und Cumarin **105** (438 mg, 1.77 mmol, 3.00 Äq.) in trockenem CH_2Cl_2 (10.0 mL, 177 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Die Lösungen wurden für 1 h gerührt bevor der Zucker **149** zum gelösten Cumarin gegeben wurde. Silbertriflat (182 mg, 708 μmol , 1.20 Äq.) wurde hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 21 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 50:50). Die Reaktionslösung wurde über Celite filtriert, um das Molsieb abzutrennen. Anschließend wurde das Filtrat unter vermindertem Druck eingeeengt. Die säulenchromatographische Isolation erfolgte über Aluminiumoxid (neutral) (PE/EtOAc 50:50). Es wurden 176 mg (348 μmol , 59 %) des gelben Feststoffes **152** erhalten.

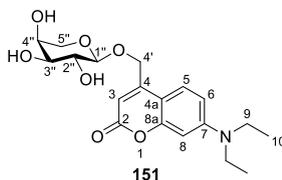


¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.18 (t, ³J_{10,9} = 7.1 Hz, 6 H, 10-H), 2.00 (s, 3 H, CH₃), 2.04 (s, 3 H, CH₃), 2.13 (s, 3 H, CH₃), 3.39 (q, ³J_{9,10} = 7.1 Hz, 4 H, 9-H), 3.65 (dd, ²J_{5''a,5''b} = 12.8 Hz, ³J_{5''a,4''} = 2.1 Hz, 1 H, 5''-H_a), 4.04 (dd, ²J_{5''b,5''a} = 12.8 Hz, ³J_{5''b,4''} = 4.0 Hz, 1 H, 5''-H_b), 4.58 (d, ³J_{1'',2''} = 6.4 Hz, 1 H, 1''-H), 4.67 (dd, ²J_{4'a,4'b} = 14.7 Hz, ⁴J_{4'a,3} = 1.3 Hz, 1 H, 4'-H_a), 4.93 (dd, ²J_{4'b,4'a} = 14.7 Hz, ⁴J_{4'b,3} = 1.3 Hz, 1 H, 4'-H_b), 5.07 (dd, ³J_{3'',2''} = 8.8 Hz, ³J_{3'',4''} = 3.5 Hz, 1 H, 3''-H), 5.24 (dd, ³J_{2'',3''} = 8.8 Hz, ³J_{2'',1''} = 6.4 Hz, 1 H, 2''-H), 5.27 (ddd, ³J_{4'',5''b} = 4.0 Hz, ³J_{4'',3''} = 3.5 Hz, ³J_{4'',5''a} = 2.1 Hz, 1 H, 4''-H), 6.17 (t, ⁴J_{3,4'} = 1.3 Hz, 1 H, 3-H), 6.51 (d, ⁴J_{8,6} = 2.6 Hz, 1 H, 8-H), 6.56 (dd, ³J_{6,5} = 8.9 Hz, ⁴J_{6,8} = 2.6 Hz, 1 H, 6-H), 7.27 (d, ³J_{5,6} = 8.9 Hz, 1 H, 5-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.5 (C-10), 20.8, 20.8, 21.0 (CH₃), 45.0 (C-9), 62.8 (C-5''), 65.9 (C-4'), 67.3 (C-4''), 69.1 (C-2''), 69.8 (C-3''), 98.1 (C-8), 99.6 (C-1''), 106.5 (C-4a), 107.1 (C-3), 108.8 (C-6), 124.8 (C-5), 150.5 (C-4), 150.6 (C-7), 156.4 (C-8a), 162.0 (C-2), 169.5 (C-2'''), 170.2 (C-3'''), 170.4 (C-4'''); **R_f** = 0.51 (PE/EtOAc 50:50); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2972, 1744, 1710, 1602, 1527, 1419, 1358, 1217, 1138, 1062, 1022, 601, 530; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₂₅H₃₂NO₁₀⁺ [M+NH₄]⁺: 506.2021; gef. 506.2028; **Schmelzpunkt**: 113.6 °C; **Drehwert**: [α]_D²⁰ = 36.4 (c = 0.25, CHCl₃); **UV/Vis-Absorption** (MeOH): λ_{max} (ε) = 246 nm (11206 ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹), 379 (16536).

Achirale Umkehrphasen-HPLC: t_R = 10.8 min; Säule: *HyperClone* 5 μ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*); Detektion (UV): 388 nm; Eluent: Methanol : H₂O (60:40); Flussrate: 0.5 mL/min; Säulentemperatur: 25 °C; Probenlösungsmittel: H₂O.

[[7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl]methyl]-α-L-arabinopyranosid – DC-cArabinose (151)

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Bier et al.*^[274] wurde Cumarin **152** (135 mg, 267 μmol, 1.00 Äq.) in MeOH (0.60 mL, 445 mM) gelöst und bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Ammoniak (7 N in MeOH) (230 μL, 1.61 mmol, 6.03 Äq.) wurde hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde bis zum vollständigen Umsatz gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 50:50), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Die Reaktionslösung wurde unter vermindertem Druck eingengt. Es wurden 100 mg (264 μmol, quant.) des gelben Feststoffes **151** erhalten.

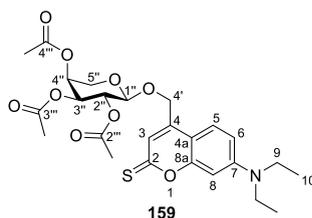


¹H-NMR (600 MHz, Aceton-*d*₆): δ [ppm] = 1.20 (t, ³*J*_{10,9} = 7.1 Hz, 6 H, 10-H), 3.50 (q, ³*J*_{9,10} = 7.1 Hz, 4 H, 9-H), 3.59 (dd, ²*J*_{5^a,5^b} = 12.4 Hz, ³*J*_{5^a,4^a} = 1.9 Hz, 1 H, 5^a-H_a), 3.59–3.64 (m, 1 H, 3^a-H), 3.68 (d, ³*J*_{4^a-OH,4^a} = 4.3 Hz, 1 H, 4^a-OH), 3.71 (ddd, ³*J*_{2^a,3^a} = 8.4 Hz, ³*J*_{2^a,1^a} = 6.7 Hz, ³*J*_{2^a,2^a-OH} = 4.1 Hz, 1 H, 2^a-H), 3.82–3.86 (m, 1 H, 4^a-H), 3.91 (dd, ²*J*_{5^b,5^a} = 12.4 Hz, ³*J*_{5^b,4^a} = 3.3 Hz, 1 H, 5^b-H_b), 3.98 (d, ³*J*_{3^a-OH,3^a} = 5.5 Hz, 1 H, 3^a-OH), 4.41 (d, ³*J*_{1^a,2^a} = 6.7 Hz, 1 H, 1^a-H), 4.47 (d, ³*J*_{2^a-OH,2^a} = 4.1 Hz, 1 H, 2^a-OH), 4.76 (dd, ²*J*_{4^a,4^b} = 15.2 Hz, ⁴*J*_{4^a,3} = 1.4 Hz, 1 H, 4^a-H_a), 4.98 (dd, ²*J*_{4^b,4^a} = 15.2 Hz, ⁴*J*_{4^b,3} = 1.4 Hz, 1 H, 4^b-H_b), 6.26 (t, ⁴*J*_{3,4^a} = 1.4 Hz, 1 H, 3-H), 6.49 (d, ⁴*J*_{8,6} = 2.6 Hz, 1 H, 8-H), 6.69 (dd, ³*J*_{6,5} = 9.0 Hz, ⁴*J*_{6,8} = 2.6 Hz, 1 H, 6-H), 7.47 (d, ³*J*_{5,6} = 9.0 Hz, 1 H, 5-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, Aceton-*d*₆): δ [ppm] = 12.7 (C-10), 45.1 (C-9), 66.3 (C-5^a), 66.4 (C-4^a), 68.9 (C-4^b), 72.3 (C-2^a), 73.9 (C-3^a), 98.0 (C-8), 104.1 (C-1^a), 106.9 (C-3), 107.1 (C-4a), 109.4 (C-6), 126.0 (C-5), 151.5 (C-7), 152.9 (C-4), 157.2 (C-8a), 161.8 (C-2); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3443, 2954, 2921, 2847, 1706, 1623, 1527, 1441, 1360, 1328, 1138, 1088, 1011, 855, 824, 794, 763, 610, 511; **HRMS** (ESI): *m/z* ber. für C₁₉H₂₆NO₇⁺ [M+H]⁺: 380.1704; gef. 380.1697; **Schmelzpunkt**: 129–130 °C; **Drehwert**: [α]_D²⁰ = –18.6 (c = 0.5, MeOH); **UV/Vis-Absorption** (MeOH): λ_{max} (ε) = 272 nm (60914 ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹), 388 (17236).

Achirale Umkehrphasen-HPLC: *t*_R = 4.5 min; Säule: *HyperClone* 5 μ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*); Detektion (UV): 388 nm; Eluent: Methanol : H₂O (60:40); Flussrate: 0.5 mL/min; Säulentemperatur: 25 °C; Probenlösungsmittel: H₂O.

2,3,4-Tri-O-acetyl-1-O-[[7-(diethylamino)-2-thio-2H-chromen-4-yl]methyl]-α-L-arabino-pyranosid (**159**)

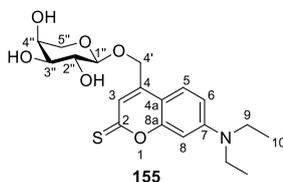
In Anlehnung an eine Vorschrift von *Gandioso et al.*^[188] wurde **Cumarin 152** (317 mg, 608 μmol, 1.00 Äq.) in trockenem Toluol (22.0 mL, 27.6 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre gelöst. *Lawessons* Reagenz (165 mg, 408 μmol, 0.650 Äq.) wurde hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 30 h unter Ausschluss von Licht zum Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung wurde bei vermindertem Druck eingeeengt. Die säulenchromatographische Isolation (CH₂Cl₂) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 229 mg (439 μmol, 72 %) des orangefarbenen Feststoffes **159** erhalten.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.22 (t, ³J_{10,9} = 7.1 Hz, 6 H, 10-H), 2.06 (s, 3 H, CH₃), 2.08 (s, 3 H, CH₃), 2.14 (s, 3 H, CH₃), 3.42 (q, ³J_{9,10} = 7.1 Hz, 4 H, 9-H), 3.65 (dd, ²J_{5''a,5''b} = 12.8 Hz, ³J_{5''a,4''} = 2.2 Hz, 1 H, 5''-H_a), 4.05 (dd, ²J_{5''b,5''a} = 12.8 Hz, ³J_{5''b,4''} = 4.3 Hz, 1 H, 5''-H_b), 4.58 (d, ³J_{1'',2''} = 6.2 Hz, 1 H, 1''-H), 4.67 (dd, ²J_{4'a,4'b} = 15.0 Hz, ⁴J_{4'a,3} = 1.2 Hz, 1 H, 4'-H_a), 4.90 (dd, ²J_{4'b,4'a} = 15.0 Hz, ⁴J_{4'b,3} = 1.2 Hz, 1 H, 4'-H_b), 5.08 (dd, ³J_{3'',2''} = 8.6 Hz, ³J_{3'',4''} = 3.5 Hz, 1 H, 3''-H), 5.24 (dd, ³J_{2'',3''} = 8.6 Hz, ³J_{2'',1''} = 6.2 Hz, 1 H, 2''-H), 5.28 (ddd, ³J_{4'',5''b} = 4.3 Hz, ³J_{4'',3''} = 3.5 Hz, ³J_{4'',5''a} = 2.2 Hz, 1 H, 4''-H), 6.63 (dd, ³J_{6,5} = 9.0 Hz, ⁴J_{6,8} = 2.6 Hz, 1 H, 6-H), 6.67 (d, ⁴J_{8,6} = 2.6 Hz, 1 H, 8-H), 7.09 (t, ⁴J_{3,4'} = 1.2 Hz, 1 H, 3-H), 7.34 (d, ³J_{5,6} = 9.0 Hz, 1 H, 5-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.6 (C-10), 20.9, 21.0, 21.1 (CH₃), 45.1 (C-9), 62.7 (C-5''), 65.5 (C-4'), 67.2 (C-4''), 69.1 (C-2''), 69.7 (C-3''), 97.6 (C-8), 99.5 (C-1''), 108.6 (C-4a), 110.3 (C-6), 121.1 (C-3), 124.9 (C-5), 143.1 (C-4), 151.0 (C-7), 159.2 (C-8a), 169.7 (C-2''), 170.3 (C-4''), 170.4 (C-3''), 197.4 (C-2); **R_f** = 0.30 (PE/EtOAc 60:40); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2969, 2928, 2862, 1748, 1627, 1581, 1519, 1436, 1372, 1294, 1253, 1222, 1182, 1146, 1070; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₂₅H₃₂NO₆S⁺ [M+H]⁺: 522.1792; gef. 522.1792; **Schmelzpunkt**: 71–72 °C; **Drehwert**: [α]_D²⁰ = 21.8 (c = 0.22, CHCl₃).

{[7-(Diethylamino)-2-thio-2H-chromen-4-yl]methyl}-α-L-arabinopyranosid – TC-cArabinose (155)

Cumarin **159** (79 mg, 0.15 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem Methanol (8.0 mL, 18 mM) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Bei 0 °C erfolgte die Zugabe von NaOMe (3.6 M in Methanol) (44 µL, 0.16 mmol, 1.1 Äq.) und die Reaktionslösung wurde für 10 min bei 0 °C gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 30:70), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Anschließend wurde Dowex 650C hinzugegeben und die Lösung für wenige Minuten gerührt, bevor sie filtriert wurde. Die Lösung wurde unter vermindertem Druck eingeeengt. Es wurden 38 mg (96 µmol, 64 %) des orangefarbenen Feststoffes **155** erhalten.

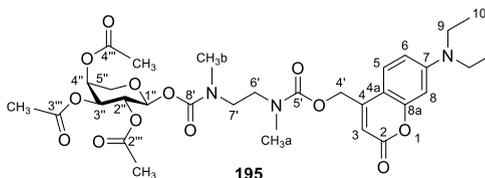


¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.22 (t, ³J_{10,9} = 7.1 Hz, 6 H, 10-H), 3.49 (q, ³J_{9,10} = 7.1 Hz, 4 H, 9-H), 3.56 (dd, ³J_{3'',2''} = 9.0 Hz, ³J_{3'',4''} = 3.4 Hz, 1 H, 3''-H), 3.60 (dd, ²J_{5''a,5''b} = 12.5 Hz, ³J_{5''a,4''} = 1.2 Hz, 1 H, 5''-H_a), 3.68 (dd, ³J_{2'',3''} = 9.0 Hz, ³J_{2'',1''} = 7.0 Hz, 1 H, 2''-H), 3.81–3.86 (m, 1 H, 4''-H), 3.92 (dd, ²J_{5''b,5''a} = 12.5 Hz, ³J_{5''b,4''} = 2.9 Hz, 1 H, 5''-H_b), 4.37 (d, ³J_{1'',2''} = 7.0 Hz, 1 H, 1''-H), 4.76 (d, ²J_{4'a,4'b} = 15.1 Hz, 1 H, 4'-H_a), 4.98 (d, ²J_{4'b,4'a} = 15.1 Hz, 1 H, 4'-H_b), 6.65 (d, ⁴J_{8,6} = 1.4 Hz, 1 H, 8-H), 6.80 (dd, ³J_{6,5} = 9.0 Hz, ⁴J_{6,8} = 2.6 Hz, 1 H, 6-H), 7.19 (s, 1 H, 3-H), 7.57 (d, ³J_{5,6} = 9.0 Hz, 1 H, 5-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.7 (C-10), 45.7 (C-9), 66.9 (C-4'), 67.2 (C-5''), 69.7

(C-4''), 72.4 (C-2''), 74.2 (C-3''), 97.6 (C-8), 104.7 (C-1''), 109.7 (C-4a), 111.8 (C-6), 121.4 (C-3), 126.6 (C-5), 146.6 (C-4), 152.6 (C-7), 160.3 (C-8a), 198.9 (C-2); $R_f = 0.06$ (PE/EtOAc 30:70); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2974, 2920, 2848, 1739, 1625, 1572, 1512, 1434, 1351, 1297, 1220, 1065, 999, 784, 641; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{NO}_6\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 396.1475; gef. 396.1478; **Schmelzpunkt**: 97–98 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_D^{20} = -10$ ($c = 0.1$, CHCl_3); **UV/Vis-Absorption** [Tris-Puffer (20 mM, pH = 7.5)/MeCN 1:1]: λ_{max} (ϵ) = 248 nm (18026 $\epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), 272 (15214), 468 (17682). **Achirale Umkehrphasen-HPLC**: $t_R = 6.0$ min; Säule: *HyperClone* 5 μ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*); Detektion (UV): 468 nm; Eluent: MeOH : H₂O (60:40); Flussrate: 0.5 mL/min; Säulentemperatur: 25 °C; Probenlösungsmittel: Tris-Puffer (20 mM, pH = 7.5)/MeCN 1:1.

2,3,4-Tri-O-acetyl-1-O-({2-[[{7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl]methoxy}-carbonyl](methyl)amino]ethyl}{methyl}carbamoyl)- α -L-arabinopyranosid (**195**)

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Wang et al.*^[347] wurde in einem sekurierten Schlenk Kolben Cumarin **112** (57 mg, 0.16 μmol , 1.8 Äq.) in trockenem Dichlormethan (3.0 mL, 53 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Nach der Zugabe von DMAP (2.0 mg, 16 μmol , 0.18 Äq.), dem Zucker **194a** (40 mg, 91 μmol , 1.00 Äq.) und DIPEA (277 μL , 1.59 mmol, 17.5 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 2 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 30:70), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Anschließend wurde die Lösung mit CH_2Cl_2 verdünnt und nacheinander mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO_4 getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingeeengt und auf Kieselgel aufgezogen. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 30:70 \rightarrow EtOAc/MeOH/ NEt_3 87:10:3) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 51 mg (77 μmol , 85 %) des gelben Schaumes **195** erhalten. Das Produkt wurde als *syn/anti*-Isomerenmischung aufgrund der Carbamat-Bindungen erhalten.

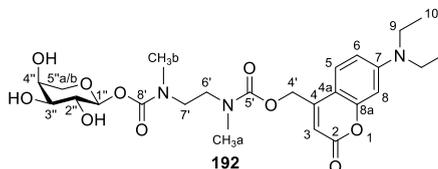


¹H-NMR (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.19 (t, $^3J_{10,9} = 7.1$ Hz, 6 H, 10-H), 1.99–2.07 (m, 6 H, CH_3), 2.09–2.16 (m, 3 H, CH_3), 2.88–2.98 (m, 3 H, CH_3b), 2.98–3.07 (m, 3 H, CH_3a), 3.18–3.68 (m, 4 H, 6'-H, 7'-H), 3.40 (q, $^3J_{9,10} = 7.1$ Hz, 4 H, 9-H), 3.77 (mc, 1 H, 5''-H_a), 3.98 (dd, $^2J_{5b,5a} = 12.9$ Hz, $^3J_{5b,4} = 3.7$ Hz, 1 H, 5''-H_b), 5.06–5.33 (m, 5 H, 2''-H, 3''-H, 4''-H, 4'-H), 5.52–5.61 (m, 1 H, 1''-H), 6.01–6.13

(m, 1 H, 3-H), 6.50 (s, 1 H, 8-H), 6.57 (d, $^3J_{6,5} = 9.0$ Hz, 1 H, 6-H), 7.26–7.34 (m, 1 H, 5-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 12.5 (C-10), 20.7 (CH_3), 20.7 (CH_3), 20.8 (CH_3), 20.9 (CH_3), 21.0 (CH_3), 34.7, 34.7, 34.8, 35.2, 35.5, 35.5, 35.6, 35.8 (CH_3a , CH_3b), 44.9 (C-9), 46.3, 46.4, 46.9, 46.9, 47.1, 47.3, 47.6 (C-6', C-7'), 62.4 (C-4'), 62.5 (C-4'), 62.7 (C-4'), 63.5 (C-5''), 63.6 (C-5''), 64.4 (C-5''), 64.5 (C-5''), 67.2, 67.6, 67.7, 68.2, 68.3 (C-2'', C-4''), 69.7 (C-3''), 69.8 (C-3''), 70.3 (C-3''), 70.4 (C-3''), 93.5 (C-1''), 93.6 (C-1''), 93.9 (C-1''), 94.1 (C-1''), 98.0 (C-8), 105.8, 105.9, 106.2, 106.4 (C-3, C-4a), 108.8 (C-6), 124.4 (C-5), 124.5 (C-5), 124.6 (C-5), 150.3, 150.4, 150.5, 150.7 (C-4, C-7), 153.9 (C-8'), 154.1 (C-8'), 154.4 (C-8'), 155.2 (C-5'), 155.3 (C-5'), 155.6 (C-5'), 155.7 (C-5'), 156.3 (C-8a), 162.0 (C-2), 162.1 (C-2), 169.5, 169.7, 169.8, 169.9, 169.9, 169.9, 170.0, 170.2, 170.3, 170.3 (C-2'', C-3'', C-4''); $R_f = 0.25$ (PE/EtOAc 30:70); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2972, 2930, 1746, 1713, 1605, 1528, 1422, 1371, 1221, 1137, 1088, 1055, 760; **Schmelzpunkt**: 82.7 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 10.6$ ($c = 1.0$, CHCl_3).

1-O-({2-([([7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl]methoxy)carbonyl)(methyl)amino]ethyl}{methyl}carbamoyl)- α -L-arabinopyranosid – DC-NN-cArabinose (192)

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Bier et al.*^[274] wurde Cumarin **195** (40 mg, 60 μmol , 1.0 Äq.) in MeOH (0.20 mL, 0.30 M) gelöst und bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Ammoniak (7 N in MeOH) (54 μL , 0.38 mmol, 6.3 Äq.) wurde hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde bis zum vollständigen Umsatz gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (EtOAc/MeOH 95:5), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Die Reaktionslösung wurde unter vermindertem Druck eingeeengt. Es wurden 28 mg (52 μmol , quant.) des gelben Feststoffes **192** erhalten. Das Produkt wurde als *syn/anti*-Isomerengemisch aufgrund der Carbamat-Bindungen erhalten.

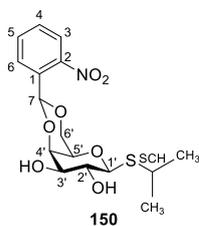


$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.20 (t, $^3J_{10,9} = 7.1$ Hz, 6 H, 10-H), 2.92–2.98 (m, 3 H, CH_3b), 2.99–3.05 (m, 3 H, CH_3a), 3.05–3.99 (m, 4 H, 6'-H, 7'-H), 3.41 (q, $^3J_{9,10} = 7.1$ Hz, 4 H, 9-H), 3.63–3.70 (m, 1 H, 5''-H_a), 3.70–3.78 (m, 1 H, 3''-H), 3.78–3.92 (m, 1 H, 2''-H), 3.92–3.99 (m, 1 H, 4''-H), 3.99–4.09 (m, 1 H, 5''-H_b), 5.14–5.32 (m, 2 H, 4'-H), 5.32–5.46 (m, 1 H, 1''-H), 6.03–6.17 (m, 1 H, 3-H), 6.52 (s, 1 H, 8-H), 6.57–6.68 (m, 1 H, 6-H), 7.27–7.36 (m, 1 H, 5-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 12.5 (C-10), 34.5, 34.6, 34.9, 35.4, 35.8, 36.2 (CH_3a , CH_3b), 45.0 (C-9), 46.5, 46.7, 47.1, 47.4, 47.5, 47.5 (C-6', C-7'), 62.4 (C-4'), 62.5 (C-4'), 62.9 (C-4'), 63.1 (C-4'), 66.6 (C-5''), 66.8 (C-5''), 66.8 (C-5''), 68.2 (C-4''), 70.6 (C-2''), 70.8 (C-2''), 71.0 (C-2''), 73.3 (C-3''), 73.4 (C-3''), 73.6

(C-3''), 96.4 (C-1''), 96.5 (C-1''), 96.6 (C-1''), 98.0 (C-8), 105.9, 106.0 (C-3, C-4a), 109.1 (C-6), 124.5 (C-5), 124.6 (C-5), 150.4, 150.5, 151.4 (C-4, C-7), 154.6 (C-8'), 154.7 (C-8'), 156.0, 156.0, 156.2, 156.3, 156.6 (C-5', C-8a), 162.6 (C-2), 162.7 (C-2); $R_f = 0.08$ (EtOAc/MeOH 95:5); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3423, 2966, 2927, 1703, 1603, 1528, 1490, 1423, 1357, 1275, 1216, 1131, 1080, 827, 761; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_{10}^+$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 538.2395; gef. 538.2397; **Schmelzpunkt**: 67–73 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_D^{20} = 5.0$ ($c = 1.0$, CHCl_3); **UV/Vis-Absorption** [Tris-Puffer (20 mM, pH = 7.5)/MeCN 1:1]: λ_{max} (ϵ) = 273 nm ($28656 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 385 (14070). **Achirale Umkehrphasen-HPLC**: $t_R = 18.3$ min; Säule: *HyperClone* 5 μ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*); Detektion (UV): 385 nm; Eluent: $\text{H}_2\text{O} : \text{MeOH}$ (55:45); Flussrate: 0.5 mL/min; Säulentemperatur: 25 °C; Probenlösungsmittel: Tris-Puffer (20 mM, pH = 7.5)/MeCN 1:1.

Isopropyl-4,6-O-(2-nitrobenzyliden)-1-thio- β -D-galactopyranosid – NB-clPTG (**150**)

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Binder et al.*^[271] wurden IPTG (**1a**) (300 mg, 1.26 mmol, 1.00 Äq.) und 2-Nitrobenzaldehyd (**87**) (571 mg, 3.78 mmol, 3.00 Äq.) in DMSO (3.00 mL, 420 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Anschließend erfolgte die tropfenweise Zugabe von Schwefelsäure (450 μL , 8.40 mmol, 6.67 Äq.), wobei die Reaktionslösung während der Zugabe mit einem Eisbad gekühlt wurde. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht für 22 h gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (EtOAc/MeOH 90:10). Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Eiswasser abgebrochen und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO_4 getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingedunstet. Die säulenchromatographische Isolation (*n*-Pentan/EtOAc 40:60) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 152 mg (409 μmol , 32 %) des farblosen Feststoffes **150** erhalten.

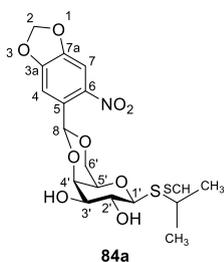


¹H-NMR (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.33 (d, $^3J_{\text{CH}_3,\text{SCH}} = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 1.35 (d, $^3J_{\text{CH}_3,\text{SCH}} = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 2.51 (brs, 1 H, 3'-OH), 2.58 (brs, 1 H, 2'-OH), 3.25 (septett, $^3J_{\text{SCH},\text{CH}_3} = 6.8$ Hz, 1 H, SCH), 3.53 (s, 1 H, 5'-H), 3.67–3.74 (m, 2 H, 2'-H, 3'-H), 4.08 (dd, $^2J_{6'a,6'b} = 12.5$ Hz, $^3J_{6'a,5'} = 1.9$ Hz, 1 H, 6'-H_a), 4.28–4.34 (m, 2 H, 4'-H, 6'-H_b), 4.41 (d, $^3J_{1',2'} = 9.2$ Hz, 1'-H), 6.17 (s, 1 H, 7-H), 7.51 (ddd, $^3J_{4,3} = 8.1$ Hz, $^3J_{4,5} = 7.8$ Hz, $^4J_{4,6} = 1.3$ Hz, 1 H, 4-H), 7.63 (ddd, $^3J_{5,6} = 7.8$ Hz, $^3J_{5,4} = 7.8$ Hz, $^4J_{5,3} = 1.3$ Hz, 1 H, 5-H), 7.86 (dd, $^3J_{3,4} = 8.1$ Hz, $^4J_{3,5} = 1.3$ Hz, 1 H, 3-H), 7.92 (dd, $^3J_{6,5} = 7.8$ Hz, $^4J_{6,4}$

= 1.3 Hz, 1 H, 6-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 24.1 (CH_3), 24.3 (CH_3), 35.5 (SCH), 69.8 (C-6'), 70.1 (C-5'), 70.3 (C-2'), 74.0 (C-3'), 76.2 (C-4'), 85.7 (C-1'), 96.9 (C-7), 124.1 (C-3), 128.3 (C-6), 130.0 (C-4), 131.6 (C-1), 133.1 (C-5), 148.3 (C-2); $R_f = 0.17$ (n-Pentan/EtOAc 40:60); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3387, 2910, 1738, 1524, 1445, 1360, 1340, 1237, 1202, 1165, 1104, 1037, 991, 971, 944, 909, 876, 851, 815, 789, 736, 703, 685, 597, 541; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}^+ [\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 389.1377; gef. 389.1379; **Schmelzpunkt**: 130.2 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -45$ ($c = 0.12$, CHCl_3); **UV/Vis-Absorption** (MeOH/ H_2O 3:7): λ_{max} (ϵ) = 260 nm ($3415 \text{ } \epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). **Achirale Umkehrphasen-HPLC**: $t_R = 9.7$ min; Säule: *HyperClone* 5 μ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*); Detektion (UV): 260 nm; Eluent: MeOH : H_2O (30:70); Flussrate: 1.0 mL/min; Säulentemperatur: 25 °C; Probenlösungsmittel: MeOH/ H_2O 3:7.

Isopropyl-4,6-O-(6-nitropiperonyliden)-1-thio- β -D-galactopyranosid – NP-clPTG (**84a**)

Nach einer Vorschrift von *Binder et al.*^[271] wurden IPTG (**1a**) (100 mg, 420 μmol , 1.00 Äq.) und 6-Nitropiperonal (**89**) (246 mg, 1.26 mmol, 3.00 Äq.) in DMSO (1.00 mL, 420 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Anschließend erfolgte die tropfenweise Zugabe von Schwefelsäure (150 μL , 2.80 mmol, 6.67 Äq.), wobei die Reaktionslösung während der Zugabe mit einem Eisbad gekühlt wurde. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht für 22 h gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (n-Pentan/EtOAc 30:70). Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Eiswasser abgebrochen und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO_4 getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (n-Pentan/EtOAc 30:70) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 77 mg (0.19 μmol , 44 %) des leichtgelben Feststoffes **84a** erhalten.



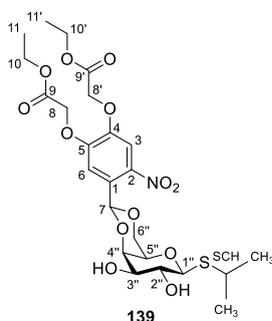
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.31 (d, $^3J_{\text{CH}_3,\text{SCH}} = 6.7$ Hz, 3 H, CH_3), 1.33 (d, $^3J_{\text{CH}_3,\text{SCH}} = 6.7$ Hz, 3 H, CH_3), 2.90 (brs, 2 H, 2-OH, 3-OH), 3.23 (septett, $^3J_{\text{SCH},\text{CH}_3} = 6.7$ Hz, 1 H, SCH), 3.49 (s, 1 H, 5'-H), 3.64–3.74 (m, 2 H, 2'-H, 3'-H), 4.04 (dd, $^2J_{6'a,6'b} = 12.6$ Hz, $^3J_{6'a,5'} = 1.9$ Hz, 1 H, 6'-H_a), 4.25 (dd, $^2J_{6'b,6'a} = 12.6$ Hz, $^3J_{6'a,5'} = 1.5$ Hz, 1 H, 6'-H_b), 4.27 (d, $^3J_{4',3'} = 3.1$ Hz, 1 H, 4'-H), 4.40 (d, $^3J_{1',2'} = 8.6$ Hz, 1'-H), 6.07–6.11 (m, 2 H, 2-H), 6.13 (s, 1 H, 8-H), 7.33 (s, 1 H, 4-H), 7.38 (s, 1 H,

7-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 24.0 (CH_3), 24.2 (CH_3), 35.3 (SCH), 69.7 (C-6'), 70.0 (C-5'), 70.1 (C-2'), 73.8 (C-3'), 76.2 (C-4'), 85.5 (C-1'), 96.7 (C-8), 103.2 (C-2), 105.3 (C-7), 107.7 (C-4), 128.9 (C-5), 142.3 (C-6), 148.2 (C-7a), 151.7 (C-3a); R_f = 0.32 (*n*-Pentan/EtOAc 30:70); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3389, 2962, 2921, 2870, 1610, 1526, 1506, 1488, 1434, 1335, 1269, 1143, 1098, 1034, 992, 880, 838, 757; **HRMS** (ESI): *m/z* ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}^+$ [$\text{M}+\text{NH}_4$] $^+$: 433.1275; gef. 433.1283; **Schmelzpunkt**: 163.2 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_D^{20}$ = -82.9 (c = 0.55, CHCl_3); **UV/Vis-Absorption** (MeOH): λ_{max} (ϵ) = 241 nm (11078 $\epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), 336 (4027).

Achirale Umkehrphasen-HPLC: t_R = 22.0 min; Säule: *HyperClone* 5 μ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*); Detektion (UV): 352 nm; Eluent: MeOH : H_2O (30:70); Flussrate: 1.0 mL/min; Säulentemperatur: 25 °C; Probenlösungsmittel: MeOH.

4,6-O-[4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzyliden]isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid – BEC-clPTG (**139**)

In einem Schlenk Kolben wurden 4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzylaldehyddiethylacetal (**141**) (1.00 g, 2.33 mmol, 1.50 Äq.) in trockenem Dichlormethan (6.17 mL, 377 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe von IPTG (**1a**) (370 mg, 1.55 mmol, 1.00 Äq.) und *p*-Toluolsulfonsäure (12 mg, 69 μmol , 4.0 mol%). Die Lösung wurde bei RT für 20 h gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 20:80). Die Reaktion wurde abgebrochen, nachdem kein weiterer Umsatz zu erkennen war. Es wurden wenige Tropfen Triethylamin hinzugegeben, bevor die Lösung am Rotationsverdampfer eingengt wurde. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 30:70) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 403 mg (700 μmol , 45 %) des farblosen Feststoffes **139** erhalten.



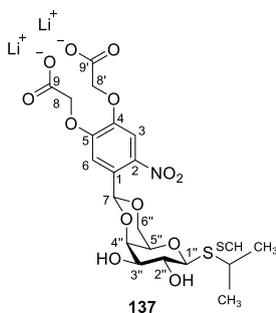
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.31 (t, $^3J_{11,10;11',10'} = 7.2$ Hz, 6 H, 11-H, 11'-H), 1.35 (d, $^3J_{\text{CH}_3,\text{SCH}} = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 1.36 (d, $^3J_{\text{CH}_3,\text{SCH}} = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 2.56 (br, 2 H, 2''-OH, 3''-OH), 3.25 (septett, $^3J_{\text{SCH},\text{CH}_3} = 6.8$ Hz, 1 H, SCH), 3.52 (dt, $^3J_{5'',6''} = 1.7$ Hz, $^3J_{5'',4''} = 1.2$ Hz, 1 H, 5''-H), 3.64–

3.70 (m, 2 H, 2''-H, 3''-H), 4.08 (dd, $^2J_{6''b,6''a} = 12.5$ Hz, $^3J_{6''b,5''} = 1.7$ Hz, 1 H, 6''-H_b), 4.24–4.31 (m, 6 H, 10-H, 10'-H, 4''-H, 6''-H_a), 4.41 (d, $^3J_{1'',2''} = 8.7$ Hz, 1 H, 1''-H), 4.77 (s, 2 H, 8-H), 4.82 (s, 2 H, 8'-H), 6.21 (s, 1 H, 7-H), 7.35 (s, 1 H, 6-H), 7.54 (s, 1 H, 3-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.3, 14.3 (C-11, C-11'), 24.1 (CH_3), 24.3 (CH_3), 35.5 (SCH), 61.8, 61.9 (C-10, C-10'), 66.4, 66.6 (C-8, C-8'), 69.8 (C-6''), 70.1 (C-5''), 70.3 (C-3''), 73.9 (C-2''), 76.2 (C-4''), 85.7 (C-1''), 96.6 (C-7), 111.5 (C-3), 112.8 (C-6), 127.7 (C-1), 141.3 (C-2), 147.6 (C-4), 151.7 (C-5), 167.9, 167.9 (C-9, C-9'); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3478, 2967, 2916, 2866, 1747, 1520, 1287, 1176, 1097, 1077, 1027, 989; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{S}$ [$\text{M}+\text{NH}_4$] $^+$: 593.2011; gef. 593.2011; **Schmelzpunkt**: 104.5 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -68$ ($c = 1.0$, CHCl_3); **UV/Vis-Absorption** (MeOH): λ_{max} (ϵ) = 298 nm (8006 $\epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

Achirale Umkehrphasen-HPLC: $t_{\text{R}} = 33.3$ min; Säule: *HyperClone* 5 μ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*); Detektion (UV): 298 nm; Eluent: MeOH : H₂O (60:40); Flussrate: 1.0 mL/min; Säulentemperatur: 25 °C; Probenlösungsmittel: MeOH.

Dilithium-4,6-O-[4,5-Bis(carboxymethoxy)-2-nitrobenzyliden]isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid – BC cIPTG (137)

In einem Einhalskolben wurde *BEC-photocaged-IPTG* **139** (150 mg, 261 μmol , 1.00 Äq.) in Methanol (2.61 mL, 100 mM) vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe einer 0.20 M Lithiumhydroxid-Lösung (2.61 mL, 0.52 mmol, 2.00 Äq.) und es wurde für 1 h bei RT gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (EtOAc), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt und über Nacht lyophilisiert. Es wurden 135 mg (260 μmol , quant.) des farblosen Feststoffes **137** erhalten.



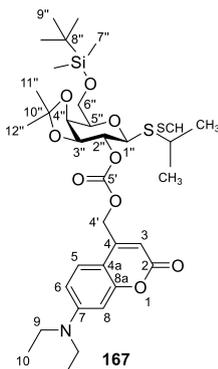
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ [ppm] = 1.29 (d, $^3J_{\text{CH}_3,\text{SCH}} = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 1.31 (d, $^3J_{\text{CH}_3,\text{SCH}} = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 3.26 (septett, $^3J_{\text{SCH},\text{CH}_3} = 6.8$ Hz, 1 H, SCH), 3.66 (t, $^3J_{2'',1''} = 9.8$ Hz, 1 H, 2''-H), 3.71–3.82 (m, 2 H, 3''-H, 5''-H), 4.18 (m, 2 H, 6''-H), 4.37 (d, $^3J_{4'',3''} = 3.6$ Hz, 1 H, 4''-H), 4.60 (s, 2 H,

8'-H), 4.62 (d, $^3J_{1'',2''} = 9.8$ Hz, 1 H, 1''-H), 4.67 (d, $J = 2.6$ Hz, 2 H, 8-H), 6.20 (s, 1 H, 7-H), 7.32 (s, 1 H, 6-H), 7.55 (s, 1 H, 3-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, D_2O): δ [ppm] = 22.9 (CH_3), 23.3 (CH_3), 35.0 (SCH), 67.3 (C-8'), 67.4 (C-8), 69.1 (C-2''), 69.3 (C-6''), 69.6 (C-5''), 72.8 (C-3''), 76.5 (C-4''), 84.8 (C-1''), 96.4 (C-7), 109.2 (C-3), 110.8 (C-6), 126.3 (C-1), 140.0 (C-2), 147.2 (C-4), 151.5 (C-5), 175.1 (C-9), 175.4 (C-9'); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3124, 3043, 1605, 1522, 1398, 1335, 1277, 1077, 1047, 1024, 824; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{S}^+$ [$\text{M}+\text{NH}_4$] $^+$: 537.1385; gef. 537.1382; **Schmelzpunkt**: 190 °C (Zersetzung); **Drehwert**: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -92$ ($c = 1.0$, H_2O); **UV/Vis-Absorption**: λ_{max} (H_2O) = 245 nm ($5008 \text{ } \epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 342 (3191); λ_{max} [NaP_i -Puffer (100 mM, pH = 7.4)] = 242 nm ($12907 \text{ } \epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 340 (5759).

Achirale Umkehrphasen-HPLC: $t_{\text{R}} = 14.4$ min; Säule: *HyperClone* 5 μ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*); Detektion (UV): 340 nm; Eluent: MeOH : NaP_i -Puffer (100 mM, pH = 7.4) (10:90); Flussrate: 1.0 mL/min; Säulentemperatur: 25 °C; Probenlösungsmittel: NaP_i -Puffer (100 mM, pH = 7.4).

Isopropyl-6-O-(tert-butylidimethylsilyl)-2-O-[[7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl]methoxy(carbonyl)]-3,4-O-(1-methylethylidene)-1-thio- β -D-galactopyranosid (167)

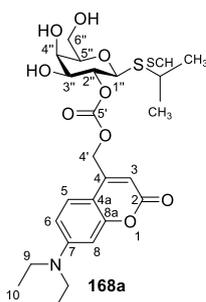
In Anlehnung an eine Vorschrift von *Suzuki et al.*^[129] wurde in einem sekurierten Schlenkkolben Cumarin **110** (98 mg, 0.24 mmol, 1.1 Äq.) in trockenem Dichlormethan (1.7 mL, 0.14 M) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Nach der Zugabe von DMAP (30 mg, 0.24 mmol, 1.1 Äq.) und dem Zucker **166** (85 mg, 0.22 mmol, 1.0 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 20 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 80:20), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Anschließend wurde die Lösung mit CH_2Cl_2 verdünnt und nacheinander mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO_4 getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingeeengt und auf Kieselgel aufgezogen. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 80:20) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 0.11 g (0.17 mmol, 77 %) des gelben Feststoffes **167** erhalten.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.07 (s, 6 H, 7''-H), 0.89 (s, 9 H, 9''-H), 1.19 (t, ³J_{10,9} = 7.1 Hz, 6 H, 10-H), 1.29 (d, ³J_{CH₃,SCH} = 6.8 Hz, 3 H, CH₃), 1.30 (d, ³J_{CH₃,SCH} = 6.8 Hz, 3 H, CH₃), 1.35 (s, 3 H, 11''-H oder 12''-H), 1.56 (s, 3 H, 11''-H oder 12''-H), 3.17 (septett, ³J_{SCH,CH₃} = 6.8 Hz, 1 H, SCH), 3.40 (q, ³J_{9,10} = 7.1 Hz, 4 H, 9-H), 3.79–3.91 (m, 3 H, 5''-H, 6''-H), 4.22 (dd, ³J_{3'',2''} = 7.3 Hz, ³J_{3'',4''} = 5.3 Hz, 1 H, 3''-H), 4.29 (d, ³J_{4'',3''} = 5.2 Hz, ³J_{4'',5''} = 1.9 Hz, 1 H, 4''-H), 4.48 (d, ³J_{1'',2''} = 10.4 Hz, 1 H, 1''-H), 4.80 (dd, ³J_{2'',1''} = 10.4 Hz, ³J_{2'',3''} = 7.3 Hz, 1 H, 2''-H), 5.23 (d, ³J_{4'a,4'b} = 14.9 Hz, 1 H, 4'-H_a), 5.38 (d, ³J_{4'b,4'a} = 14.9 Hz, 1 H, 4'-H_b), 6.21 (s, 1 H, 3-H), 6.50 (d, ⁴J_{8,6} = 2.6 Hz, 1 H, 8-H), 6.56 (dd, ³J_{6,5} = 9.0 Hz, ⁴J_{6,8} = 2.6 Hz, 1 H, 6-H), 7.25 (d, ³J_{5,6} = 9.0 Hz, 1 H, 5-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -5.4 (C-7''), -5.3 (C-7''), 12.5 (C-10), 18.3 (C-8''), 24.0 (CH₃), 24.1 (CH₃), 25.9 (C-9''), 26.5, 28.0 (C-11'', C-12''), 35.7 (SCH), 44.9 (C-9), 62.1 (C-6''), 65.0 (C-4'), 73.5 (C-4''), 76.9 (C-3''), 77.1 (C-5''), 77.1 (C-2''), 82.5 (C-1''), 98.0 (C-8), 106.0 (C-4a), 106.7 (C-3), 108.8 (C-6), 110.6 (C-10''), 124.4 (C-5), 148.7 (C-4), 150.7 (C-7), 154.3 (C-5'), 156.4 (C-8a), 162.0 (C-2); **R_f** = 0.24 (PE/EtOAc 80:20); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2969, 2931, 2870, 1745, 1713, 1603, 1527, 1420, 1356, 1336, 1217, 1139, 1094, 1064, 1023, 841, 751, 667, 601, 510; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₃₃H₅₂NO₉SSi⁺ [M+H]⁺: 666.3127; gef. 666.3124; **Schmelzpunkt**: 69 °C; **Drehwert**: [α]_D²⁰ = 16 (c = 0.1, CHCl₃).

Isopropyl-2-O-[[7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl]methoxy(carbonyl)]-1-thio- β -D-galactopyranosid – DC-cIPTG (168a)

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Suzuki et al.*^[129] wurde Cumarin **167** (159 mg, 239 μ mol, 1.00 Äq.) in Dichlormethan (1.00 mL, 239 mM) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Nach der Zugabe von TFA (1.70 mL, 22.2 mmol, 93.0 Äq.) und Wasser (68.8 μ L, 3.82 mmol, 16.0 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 10 min bei 0 °C unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (EtOAc), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Die Reaktionslösung wurde bei vermindertem Druck bei 0 °C eingeeengt. Die säulenchromatographische Isolation (EtOAc) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 117 mg (229 μ mol, 96 %) des gelben Feststoffes **168a** erhalten.

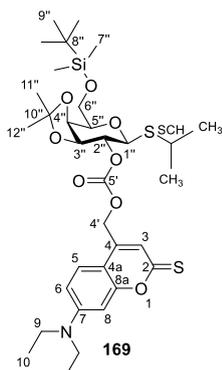


¹H-NMR (600 MHz, Aceton-*d*₆): δ [ppm] = 1.21 (t, $^3J_{10,9}$ = 7.1 Hz, 6 H, 10-H), 1.25 (d, $^3J_{\text{CH}_3,\text{SCH}}$ = 6.7 Hz, 3 H, CH₃), 1.29 (d, $^3J_{\text{CH}_3,\text{SCH}}$ = 6.7 Hz, 3 H, CH₃), 3.21 (septett, $^3J_{\text{SCH},\text{CH}_3}$ = 6.7 Hz, 1 H, SCH), 3.51 (q, $^3J_{9,10}$ = 7.1 Hz, 4 H, 9-H), 3.67 (t, $^3J_{5'',4''}$ = 5.6 Hz, 1 H, 5''-H), 3.77 (m, 2 H, 6''-H), 3.84 (dd, $^3J_{3'',2''}$ = 9.3 Hz, $^3J_{3'',4''}$ = 3.4 Hz, 1 H, 3''-H), 4.08 (d, $^3J_{4'',3''}$ = 3.4 Hz, 1 H, 4''-H), 4.65 (d, $^3J_{1'',2''}$ = 10.1 Hz, 1 H, 1''-H), 4.87 (dd, $^3J_{2'',1''}$ = 10.1 Hz, $^3J_{2'',3''}$ = 9.3 Hz, 1 H, 2''-H), 5.33 (d, $^3J_{4a,4b}$ = 15.2 Hz, 1 H, 4'-H_a), 5.45 (d, $^3J_{4b,4a}$ = 15.2 Hz, 1 H, 4'-H_b), 6.09 (s, 1 H, 3-H), 6.52 (d, $^4J_{8,6}$ = 2.6 Hz, 1 H, 8-H), 6.72 (dd, $^3J_{6,5}$ = 9.0 Hz, $^4J_{6,8}$ = 2.6 Hz, 1 H, 6-H), 7.48 (d, $^3J_{5,6}$ = 9.0 Hz, 1 H, 5-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, Aceton-*d*₆): δ [ppm] = 12.7 (C-10), 24.2 (CH₃), 24.6 (CH₃), 35.6 (SCH), 45.2 (C-9), 62.3 (C-6''), 65.4 (C-4'), 70.4 (C-4''), 73.5 (C-3''), 77.0 (C-2''), 79.9 (C-5''), 83.8 (C-1''), 98.1 (C-8), 106.5 (C-4a), 106.7 (C-3), 109.5 (C-6), 125.9 (C-5), 150.5 (C-4), 151.8 (C-7), 155.4 (C-5'), 157.3 (C-8a), 161.4 (C-2); **R_f** = 0.24 (EtOAc); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3405, 2962, 2925, 2862, 1755, 1679, 1603, 1528, 1424, 1357, 1255, 1200, 1139, 1054, 984, 800, 725; **HRMS** (ESI): *m/z* ber. für C₂₄H₃₄NO₉S⁺ [M+H]⁺: 512.1949; gef. 512.1952; **Schmelzpunkt**: 96.0 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_D^{20}$ = 28 (c = 0.1, CHCl₃); **UV/Vis-Absorption** [Tris-Puffer (20 mM, pH = 7.5)/MeCN 1:1]: λ_{max} (ϵ) = 246 nm (21496 $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 386 (24984).

Achirale Umkehrphasen-HPLC: $t_R = 9.8$ min; Säule: *HyperClone* 5μ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*); Detektion (UV): 392 nm; Eluent: $H_2O : MeOH$ (40:60); Flussrate: 0.5 mL/min; Säulentemperatur: 25 °C; Probenlösungsmittel: Tris-Puffer (20 mM, pH = 7.5)/MeCN 1:1.

Isopropyl-6-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2-O-[[7-(diethylamino)-2-thio-2*H*-chromen-4-yl]methoxy(carbonyl)]-3,4-O-(1-methylethylidene)-1-thio- β -D-galactopyranosid (169**)**

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Suzuki et al.*^[129] wurde in einem sekurierten Schlenkcolben Cumarin **121** (0.28 g, 0.64 mmol, 1.1 Äq.) in trockenem Dichlormethan (4.0 mL, 64 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Nach der Zugabe von DMAP (80 mg, 0.66 mmol, 1.1 Äq.) und dem Zucker **166** (0.23 g, 0.59 mmol, 1.0 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 20 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 90:10), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Anschließend wurde die Lösung mit CH_2Cl_2 verdünnt und nacheinander mit gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung und gesättigter $NaCl$ -Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit $MgSO_4$ getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingengt und auf Kieselgel aufgezogen. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 90:10) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 0.20 g (0.29 mmol, 49 %) des roten Feststoffes **169** erhalten.

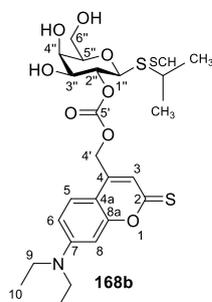


¹H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 0.07 (s, 3 H, 7''-H), 0.07 (s, 3 H, 7''-H), 0.88 (s, 9 H, 9''-H), 1.20 (t, $^3J_{10,9} = 7.1$ Hz, 6 H, 10-H), 1.30 (d, $^3J_{CH_3,SCH} = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 1.30 (d, $^3J_{CH_3,SCH} = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 1.33 (s, 3 H, 11''-H oder 12''-H), 1.55 (s, 3 H, 11''-H oder 12''-H), 3.18 (septett, $^3J_{SCH,CH_3} = 6.8$ Hz, 1 H, SCH), 3.41 (q, $^3J_{9,10} = 7.1$ Hz, 4 H, 9-H), 3.81–3.87 (m, 3 H, 5''-H, 6''-H), 4.22 (dd, $^3J_{3'',2''} = 7.3$ Hz, $^3J_{3'',4''} = 5.3$ Hz, 1 H, 3''-H), 4.29 (dd, $^3J_{4'',3''} = 5.3$ Hz, $^3J_{4'',5''} = 1.9$ Hz, 1 H, 4''-H), 4.48 (d, $^3J_{1'',2''} = 10.4$ Hz, 1 H, 1''-H), 4.79 (dd, $^3J_{2'',1''} = 10.4$ Hz, $^3J_{2'',3''} = 7.3$ Hz, 1 H, 2''-H), 5.18 (dd, $^3J_{4'a,4'b} = 15.1$ Hz, $^4J_{4'a,3} = 1.2$ Hz, 1 H, 4'-H_a), 5.34 (dd, $^3J_{4'b,4'a} = 15.1$ Hz, $^4J_{4'b,3} = 1.2$ Hz, 1 H, 4'-H_b), 6.61–6.68

(m, 2 H, 6-H, 8-H), 7.12 (mc, 1 H, 3-H), 7.30 (d, $^3J_{5,6} = 8.9$ Hz, 1 H, 5-H); $R_f = 0.10$ (PE/EtOAc 90:10).

Isopropyl-2-O-[[7-(diethylamino)-2-thio-2H-chromen-4-yl]methoxy(carbonyl)]-1-thio- β -D-galactopyranosid – TC-clPTG (168b)

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Suzuki et al.*^[129] wurde Cumarin **169** (0.10 g, 0.15 mmol, 1.0 Äq.) in Dichlormethan (1.0 mL, 0.10 M) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Nach der Zugabe von TFA (1.1 mL, 14 mmol, 93 Äq.) und Wasser (42 μ L, 2.4 mmol, 16 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 10 min bei 0 °C unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (EtOAc), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Die Reaktionslösung wurde bei vermindertem Druck bei 0 °C eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (EtOAc/MeOH 95:5) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 85 mg (0.16 mmol, quant.) des roten Feststoffes **168c** erhalten. Dieser war jedoch stets mit kleinen Mengen des Cumarins **168a** verunreinigt.

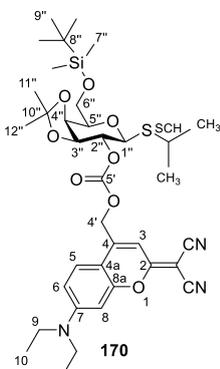


$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Aceton- d_6): δ [ppm] = 1.21–1.31 (m, 12 H, 10-H, CH_3), 3.21 (septett, $^3J_{\text{SCH},\text{CH}_3} = 6.8$ Hz, 1 H, SCH), 3.56 (q, $^3J_{9,10} = 7.1$ Hz, 4 H, 9-H), 3.65 (t, $^3J_{5'',4''} = 5.8$ Hz, 1 H, 5''-H), 3.72–3.78 (m, 2 H, 6''-H), 3.82 (m, 1 H, 3''-H), 4.03–4.06 (m, 1 H, 4''-H), 4.65 (d, $^3J_{1'',2''} = 9.9$ Hz, 1 H, 1''-H), 4.86 (dd, $^3J_{2'',1''} = 9.9$ Hz, $^3J_{2'',3''} = 8.9$ Hz, 1 H, 2''-H), 5.30 (d, $^3J_{4a,4b} = 15.4$ Hz, 1 H, 4'-H_a), 5.44 (d, $^3J_{4b,4a} = 15.4$ Hz, 1 H, 4'-H_b), 6.68 (d, $^4J_{8,6} = 2.6$ Hz, 1 H, 8-H), 6.85 (dd, $^3J_{6,5} = 9.1$ Hz, $^4J_{6,8} = 2.6$ Hz, 1 H, 6-H), 7.00 (s, 1 H, 3-H), 7.58 (d, $^3J_{5,6} = 9.1$ Hz, 1 H, 5-H); $R_f = 0.25$ (EtOAc); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3403, 2970, 2923, 2870, 1753, 1628, 1580, 1519, 1438, 1356, 1292, 1256, 1196, 1183, 1148, 1079, 1050, 1026, 983, 866, 823; **MS** (ESI, positiv-Ion): m/z (%) = 528.3 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 550.3 (40) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; **UV/Vis-Absorption** [Tris-Puffer (20 mM, pH = 7.5)/MeCN 1:1]: λ_{max} (ϵ) = 248 nm (17258 $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 272 (13270), 472 (13838).

Achirale Umkehrphasen-HPLC: $t_R = 15.0$ min; Säule: *HyperClone* 5 μ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*); Detektion (UV): 472 nm; Eluent: MeOH : H₂O (60:40); Flussrate: 0.5 mL/min; Säulentemperatur: 25 °C; Probenlösungsmittel: Tris-Puffer (20 mM, pH = 7.5)/MeCN 1:1.

Isopropyl-6-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2-O-[[2-(Dicyanomethylen)-7-(diethylamino)-2H-chromen-4-yl]methoxy(carbonyl)]-3,4-O-(1-methylethylidene)-1-thio- β -D-galactopyranosid (170)

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Suzuki et al.*^[129] wurde in einem sekurierten Schlenkcolben Cumarin **122** (0.12 g, 0.25 mmol, 1.1 Äq.) in trockenem Dichlormethan (4.0 mL, 63 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Nach der Zugabe von DMAP (31 mg, 0.26 mmol, 1.1 Äq.) und dem Zucker **166** (90 mg, 0.23 mmol, 1.0 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 20 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 80:20), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Anschließend wurde die Lösung mit CH₂Cl₂ verdünnt und nacheinander mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingengt und auf Kieselgel aufgezogen. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 80:20) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 0.15 g (0.22 mmol, 96 %) des roten Feststoffes **170** erhalten.

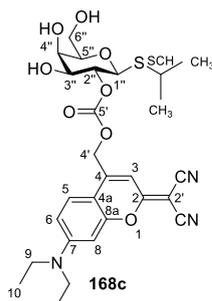


¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.07 (s, 3 H, 7''-H), 0.07 (s, 3 H, 7''-H), 0.89 (s, 9 H, 9''-H), 1.23 (t, ³J_{10,9} = 7.1 Hz, 6 H, 10-H), 1.29 (d, ³J_{CH₃,SCH} = 6.8 Hz, 3 H, CH₃), 1.30 (d, ³J_{CH₃,SCH} = 6.8 Hz, 3 H, CH₃), 1.35 (s, 3 H, 11''-H oder 12''-H), 1.55 (s, 3 H, 11''-H oder 12''-H), 3.19 (septett, ³J_{SCH,CH₃} = 6.8 Hz, 1 H, SCH), 3.44 (q, ³J_{9,10} = 7.1 Hz, 4 H, 9-H), 3.80–3.89 (m, ³J_{5'',4''} = 5.6 Hz, 3 H, 5''-H, 6''-H), 4.23 (dd, ³J_{3'',2''} = 7.3 Hz, ³J_{3'',4''} = 5.3 Hz, 1 H, 3''-H), 4.29 (dd, ³J_{4'',3''} = 5.3 Hz, ³J_{4'',5''} = 1.9 Hz, 1 H, 4''-H), 4.49 (d, ³J_{1'',2''} = 10.4 Hz, 1 H, 1''-H), 4.79 (dd, ³J_{2'',1''} = 10.4 Hz, ³J_{2'',3''} = 7.3 Hz, 1 H, 2''-H), 5.25 (dd, ³J_{4'a, 4'b} = 15.5 Hz, ⁴J_{4'a,3} = 1.2 Hz, 1 H, 4'-H_a), 5.39 (dd, ³J_{4'b, 4'a} = 15.5 Hz, ⁴J_{4'b,3} = 1.2 Hz, 1 H, 4'-H_b), 6.58 (d, ⁴J_{8,6} = 2.6 Hz, 1 H, 8-H), 6.64 (dd, ³J_{6,5} = 9.1 Hz, ⁴J_{6,8} = 2.6 Hz, 1 H, 6-H), 6.81 (mc, 1 H, 3-H), 7.29 (d, ³J_{5,6} = 9.1 Hz, 1 H, 5-H); ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -5.4 (C-7''), -5.3 (C-7''), 12.6 (C-10), 18.3 (C-8''), 24.0 (CH₃), 24.1 (CH₃), 25.9 (C-9''), 26.5, 28.0 (C-11'', C-12''), 35.8 (SCH), 45.1 (C-9), 55.9 (C-2'), 62.1 (C-6''), 64.7 (C-4'), 73.6 (C-4''), 77.0 (C-3''), 77.2 (C-5''), 77.3 (C-2''), 82.4 (C-1''), 97.5 (C-8), 106.0 (C-3), 106.8 (C-4a), 110.6 (C-10''), 110.8 (C-6), 114.0

(CN), 114.5 (CN), 124.9 (C-5), 145.4 (C-4), 151.8 (C-7), 154.2 (C-5'), 155.0 (C-8a), 171.9 (C-2); $R_f = 0.24$ (PE/EtOAc 80:20); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2955, 2929, 2859, 2216, 1756, 1639, 1586, 1548, 1525, 1432, 1383, 1356, 1319, 1257, 1223, 1196, 1148, 1111, 1078, 1047, 983, 871, 839, 760; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_3\text{O}_8\text{SSi}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 714.3239; gef. 714.3237; **Schmelzpunkt**: 79–81 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_D^{20} = -18.0$ ($c = 0.1$, CHCl_3).

Isopropyl-2-O-[[2-(Dicyanomethylen)-7-(diethylamino)-2H-chromen-4-yl]methyl-oxy(carbonyl)]-1-thio- β -D-galactopyranosid – DcC-clPTG (168c)

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Suzuki et al.*^[129] wurde Cumarin **170** (100 mg, 140 μmol , 1.00 Äq.) in Dichlormethan (1.00 mL, 140 mM) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Nach der Zugabe von TFA (1.00 mL, 13.0 mmol, 93.0 Äq.) und Wasser (40.0 μL , 2.24 mmol, 16.0 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 10 min bei 0 °C unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (EtOAc), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Die Reaktionslösung wurde bei vermindertem Druck bei 0 °C eingeeengt. Die säulenchromatographische Isolation (EtOAc) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 72 mg (0.13 mmol, 92 %) des roten Feststoffes **168c** erhalten.



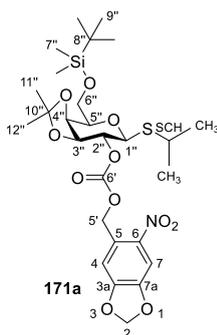
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Aceton- d_6): δ [ppm] = 1.18–1.28 (m, 12 H, 10-H, CH_3), 3.20 (septett, $^3J_{\text{SCH},\text{CH}_3} = 6.8$ Hz, 1 H, SCH), 3.59 (q, $^3J_{9,10} = 7.1$ Hz, 4 H, 9-H), 3.67 (t, $^3J_{5',4'} = 5.6$ Hz, 1 H, 5''-H), 3.77 (m, 2 H, 6''-H), 3.86 (dd, $^3J_{3'',2''} = 9.3$ Hz, $^3J_{3'',4''} = 3.4$ Hz, 1 H, 3''-H), 4.10 (d, $^3J_{4'',3''} = 3.4$ Hz, 1 H, 4''-H), 4.65 (d, $^3J_{1'',2''} = 10.1$ Hz, 1 H, 1''-H), 4.88 (dd, $^3J_{2'',1''} = 10.1$ Hz, $^3J_{2'',3''} = 9.3$ Hz, 1 H, 2''-H), 5.43 (d, $^3J_{4a,4b} = 15.5$ Hz, 1 H, 4'-H_a), 5.53 (d, $^3J_{4b,4a} = 15.5$ Hz, 1 H, 4'-H_b), 6.74–6.79 (m, 2 H, 3-H, 8-H), 6.91 (dd, $^3J_{6,5} = 9.1$ Hz, $^4J_{6,8} = 2.6$ Hz, 1 H, 6-H), 7.63 (d, $^3J_{5,6} = 9.1$ Hz, 1 H, 5-H); **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, Aceton- d_6): δ [ppm] = 12.7 (C-10), 24.2 (CH_3), 24.6 (CH_3), 35.5 (SCH), 45.5 (C-9), 55.1 (C-2'), 62.3 (C-6''), 65.4 (C-4'), 70.4 (C-4''), 73.4 (C-3''), 77.3 (C-2''), 79.8 (C-5''), 83.5 (C-1''), 97.6 (C-8), 106.0 (C-3), 107.7 (C-4a), 111.9 (C-6), 114.3 (CN), 115.2 (CN), 126.8 (C-5), 147.9 (C-4), 153.0 (C-7), 155.1 (C-5'), 155.9 (C-8a), 172.6 (C-2); $R_f = 0.23$ (EtOAc); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3359, 2954, 2924, 2855, 2216, 1748, 1672, 1638, 1584, 1522, 1433, 1381, 1320, 1258, 1193, 1139,

1076, 1053, 984, 800, 725; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $C_{27}H_{34}N_3O_8S^+$ $[M+NH_4]^+$: 560.2061; gef. 560.2055; **Schmelzpunkt**: 153.8 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_D^{20} = 74$ ($c = 0.1$, $CHCl_3$); **UV/Vis-Absorption** [Tris-Puffer (20 mM, pH = 7.5)/MeCN 1:1]: λ_{max} (ϵ) = 252 nm ($18618 \text{ } \epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 276 (14338), 488 (18938).

Achirale Umkehrphasen-HPLC: $t_R = 14.6$ min; Säule: *HyperClone* 5 μ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*); Detektion (UV): 488 nm; Eluent: $H_2O : MeOH$ (40:60); Flussrate: 0.5 mL/min; Säulentemperatur: 25 °C; Probenlösungsmittel: Tris-Puffer (20 mM, pH = 7.5)/MeCN 1:1.

Isopropyl-6-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2-O-(6-nitropiperonyloxycarbonyl)-3,4-O-(1-methylethylidene)-1-thio- β -D-galactopyranosid (**171a**)

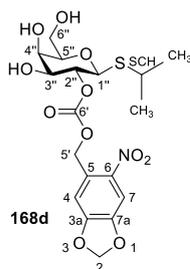
In Anlehnung an eine Vorschrift von *Suzuki et al.*^[129] wurde in einem sekurierten Schlenkcolben Alkohol **90** (50 mg, 0.25 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem Dichlormethan (6.0 mL, 41 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. 4-Nitrophenylchlorformiat (92 mg, 0.46 mmol, 1.8 Äq.) und DMAP (102 mg, 838 μ mol, 3.30 Äq.) wurden hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 22 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Bildung des Intermediat wurde mittels DC (PE/EtOAc 90:10) verfolgt. Anschließend wurden DMAP (50 mg, 0.41 mmol, 1.6 Äq.) und der Zucker **166** (149 mg, 379 μ mol, 1.50 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 25 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 90:10), welche den vollständigen Umsatz des Intermediats anzeigte. Anschließend wurde die Lösung mit CH_2Cl_2 verdünnt und nacheinander mit gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung und gesättigter $NaCl$ -Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit $MgSO_4$ getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingeeengt und auf Kieselgel aufgezogen. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 90:10) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 98 mg (0.16 mmol, 63 %) des Feststoffes **171a** erhalten.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.07 (s, 6 H, 7''-H), 0.89 (s, 9 H, 9''-H), 1.30 (d, ³J_{CH₃,SCH} = 6.8 Hz, 3 H, CH₃), 1.31 (d, ³J_{CH₃,SCH} = 6.8 Hz, 3 H, CH₃), 1.35 (s, 3 H, 11''-H oder 12''-H), 1.55 (s, 3 H, 11''-H oder 12''-H), 3.18 (septett, ³J_{SCH,CH₃} = 6.8 Hz, 1 H, SCH), 3.78–3.90 (m, 3 H, 5''-H, 6''-H), 4.23 (dd, ³J_{3'',2''} = 7.3 Hz, ³J_{3'',4''} = 5.3 Hz, 1 H, 3''-H), 4.29 (dd, ³J_{4'',3''} = 5.3 Hz, ³J_{4'',5''} = 1.7 Hz, 1 H, 4''-H), 4.50 (d, ³J_{1'',2''} = 10.4 Hz, 1 H, 1''-H), 4.79 (dd, ³J_{2'',1''} = 10.4 Hz, ³J_{2'',3''} = 7.3 Hz, 1 H, 2''-H), 5.51 (d, ²J_{5'a,5'b} = 15.7 Hz, 1 H, 5'-H_a), 5.68 (d, ²J_{5'b,5'a} = 15.7 Hz, 1 H, 5'-H_b), 6.12 (mc, 2 H, 2-H), 7.14 (s, 1 H, 4-H), 7.66 (s, 1 H, 7-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -5.4 (C-7''), -5.3 (C-7''), 18.4 (C-8''), 24.0 (CH₃), 24.1 (CH₃), 25.9 (C-9''), 26.5, 28.0 (C-11'', C-12''), 35.7 (SCH), 62.1 (C-6''), 66.8 (C-5'), 73.6 (C-4''), 76.8 (C-2''), 77.0 (C-3''), 77.2 (C-5''), 82.6 (C-1''), 103.3 (C-2), 106.0 (C-7), 107.1 (C-4), 110.7 (C-10''), 130.0 (C-5), 141.1 (C-6), 147.5 (C-7a), 153.0 (C-3a), 154.3 (C-6'); **R_f** = 0.14 (PE/EtOAc 90:10); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2954, 2930, 2858, 1758, 1619, 1524, 1488, 1394, 1383, 1378, 1329, 1262, 1217, 1110, 1077, 1038, 986, 933, 874, 839, 780; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₂₇H₄₅N₂O₁₁SSi⁺ [M+NH₄]⁺: 633.2508; gef. 633.2509; **Schmelzpunkt**: 118–120 °C; **Drehwert**: [α]_D²⁰ = 44 (c = 0.1, CHCl₃).

Isopropyl-2-O-(6-nitropiperonyloxycarbonyl)-1-thio-β-D-galactopyranosid (168d)

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Suzuki et al.*^[129] wurde Kohlensäureester **171a** (65 mg, 0.11 mmol, 1.0 Äq.) in Dichlormethan (1.0 mL, 0.11 M) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Nach der Zugabe von TFA (0.75 mL, 9.8 mmol, 93 Äq.) und Wasser (30 µL, 1.7 mmol, 16 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 10 min bei 0 °C unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (EtOAc), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Die Reaktionslösung wurde bei vermindertem Druck bei 0 °C eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (EtOAc) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 38 mg (82 µmol, 78 %) des farblosen Feststoffes **168d** erhalten.

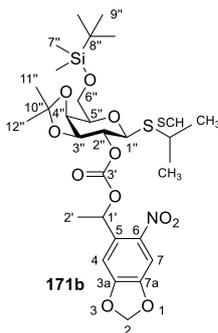


¹H-NMR (600 MHz, Aceton-*d*₆): δ [ppm] = 1.24 (d, ³J_{CH₃,SCH} = 6.8 Hz, 3 H, CH₃), 1.30 (d, ³J_{CH₃,SCH} = 6.8 Hz, 3 H, CH₃), 3.20 (septett, ³J_{SCH,CH₃} = 6.8 Hz, 1 H, SCH), 3.65 (mc, 1 H, 5''-H) 3.71–3.78 (m, 2 H, 6''-H), 3.78–3.88 (m, 2 H, 3''-H, 6''-OH), 4.05 (mc, 1 H, 4''-H), 4.10 (brs, 1 H, 4''-OH), 4.35 (brs,

1 H, 3''-OH), 4.65 (d, $^3J_{1'',2''} = 10.1$ Hz, 1 H, 1''-H), 4.85 (dd, $^3J_{2'',1''} = 10.1$ Hz, $^3J_{2'',3''} = 9.3$ Hz, 1 H, 2''-H), 5.47 (d, $^2J_{5a,5b} = 15.1$ Hz, 1 H, 5'-H_a), 5.59 (d, $^2J_{5b,5a} = 15.1$ Hz, 1 H, 5'-H_b), 6.28 (s, 2 H, 2-H), 7.15 (s, 1 H, 4-H), 7.66 (s, 1 H, 7-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, Aceton- d_6): δ [ppm] = 24.2 (CH₃), 24.6 (CH₃), 35.5 (SCH), 62.2 (C-6''), 66.7 (C-5''), 70.3 (C-4''), 73.6 (C-3''), 76.9 (C-2''), 80.0 (C-5''), 83.7 (C-1''), 104.7 (C-2), 106.1 (C-7), 107.8 (C-4), 130.5 (C-5), 142.2 (C-6), 148.6 (C-7a), 153.7 (C-3a), 155.5 (C-6'); $R_f = 0.30$ (EtOAc); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3412, 2954, 2924, 2870, 1753, 1618, 1522, 1511, 1488, 1397, 1326, 1262, 1032, 962, 923, 870, 757; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{S}^+ [\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 479.1330; gef. 479.1333; **Schmelzpunkt**: 122 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 12$ (c = 0.1, CHCl_3); **UV/Vis-Absorption** [Tris-Puffer (20 mM, pH = 7.5)/MeCN 1:1]: λ_{max} (ϵ) = 296 nm (2846 $\epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), 350 (5038). **Achirale Umkehrphasen-HPLC**: $t_{\text{R}} = 5.1$ min; Säule: *HyperClone* 5 μ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*); Detektion (UV): 350 nm; Eluent: H₂O : MeOH (40:60); Flussrate: 0.5 mL/min; Säulentemperatur: 25 °C; Probenlösungsmittel: Tris-Puffer (20 mM, pH = 7.5)/MeCN 1:1.

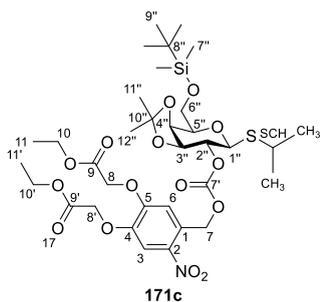
Isopropyl-6-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2-O-[1-(6-Nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)ethyl]-3,4-O-(1-methylethylidene)-1-thio- β -D-galactopyranosid (**171b**)

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Suzuki et al.*^[129] wurde in einem sekurierten Schlenkcolben Alkohol **91** (50 mg, 0.24 μmol , 1.0 $\text{\AA}q.$) in trockenem Dichlormethan (6.0 mL, 40 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. 4-Nitrophenylchlorformiat (86 mg, 0.43 μmol , 1.8 $\text{\AA}q.$) und DMAP (96 mg, 0.78 mmol, 3.3 $\text{\AA}q.$) wurden hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 24 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Bildung des Intermediat wurde mittels DC (PE/EtOAc 80:20) verfolgt. Anschließend wurden DMAP (46 mg, 0.38 μmol , 1.6 $\text{\AA}q.$) und der Zucker **166** (0.14 g, 0.35 mmol, 1.5 $\text{\AA}q.$) hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 27 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 80:20), welche den vollständigen Umsatz des Intermediates anzeigte. Anschließend wurde die Lösung mit CH_2Cl_2 verdünnt und nacheinander mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO_4 getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingeeengt und auf Kieselgel aufgezogen. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 90:10) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 17 mg (27 μmol , 11 %) des Feststoffes **171b** erhalten. Dabei konnte nur eines der beiden Diastereomere in gewünschter Reinheit isoliert werden.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.00 (s, 6 H, 7''-H), 0.82 (s, 9 H, 9''-H), 1.14 (d, ³J_{CH₃,SCH} = 6.8 Hz, 3 H, CH₃), 1.22 (d, ³J_{CH₃,SCH} = 6.8 Hz, 3 H, CH₃), 1.27 (s, 3 H, 11''-H oder 12''-H), 1.46 (s, 3 H, 11''-H oder 12''-H), 1.58 (d, ³J_{2',1'} = 6.5 Hz, 3 H, 2'-H), 3.05 (septett, ³J_{SCH,CH₃} = 6.8 Hz, 1 H, SCH), 3.69–3.82 (m, 3 H, 5''-H, 6''-H), 4.12 (dd, ³J_{3'',2''} = 7.3 Hz, ³J_{3'',4''} = 5.3 Hz, 1 H, 3''-H), 4.20 (dd, ³J_{4'',3''} = 5.3 Hz, ³J_{4'',5''} = 2.0 Hz, 1 H, 4''-H), 4.35 (d, ³J_{1'',2''} = 10.4 Hz, 1 H, 1''-H), 4.62 (dd, ³J_{2'',1''} = 10.4 Hz, ³J_{2'',3''} = 7.3 Hz, 1 H, 2''-H), 6.02 (d, ²J_{2a,2b} = 17.0 Hz, 1 H, 5'-H_a), 6.02 (d, ²J_{2b,2a} = 17.0 Hz, 1 H, 5'-H_b), 6.22 (q, ³J_{1',2'} = 6.5 Hz, 1 H, 1'-H), 7.05 (s, 1 H, 4-H), 7.48 (s, 1 H, 7-H); **R_f** = 0.10 (PE/EtOAc 80:20); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3427, 2962, 2926, 2862, 1752, 1618, 1524, 1486, 1339, 1260, 1145, 1065, 1035, 987, 929, 877, 760; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₂₈H₄₇N₂O₁₁SSi⁺ [M+NH₄]⁺: 647.2664; gef. 647.2650; **Schmelzpunkt**: 129–130 °C **Isopropyl-6-O-(tert-butylidimethylsilyl)-2-O-[4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzyloxycarbonyl]-3,4-O-(1-methylethylidene)-1-thio-β-D-galactopyranosid (171c)**

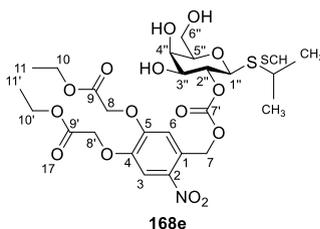
In Anlehnung an eine Vorschrift von *Suzuki et al.*^[129] wurde in einem sekurierten Schlenkcolben Alkohol **99** (50 mg, 0.14 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem Dichlormethan (3.5 mL, 40 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. 4-Nitrophenylchlorformiat (51 mg, 0.25 mmol, 1.8 Äq.) und DMAP (56 mg, 0.46 mmol, 3.3 Äq.) wurden hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 21 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Bildung des Intermediats wurde mittels DC (PE/EtOAc 75:25) verfolgt. Anschließend wurden DMAP (27 mg, 0.22 mmol, 1.6 Äq.) und der Zucker **166** (82 mg, 0.21 mmol, 1.5 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 22 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 75:25), welche den vollständigen Umsatz des Intermediats anzeigte. Anschließend wurde die Lösung mit CH₂Cl₂ verdünnt und nacheinander mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingedampft und auf Kieselgel aufgezogen. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 75:25) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 66 mg (85 μmol, 61 %) des Öles **171c** erhalten.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.07 (s, 3 H, 7''-H), 0.07 (s, 3 H, 7''-H), 0.89 (s, 9 H, 9''-H), 1.26–1.32 (m, 12 H, CH₃, 11-H, 11'-H), 1.34 (s, 3 H, 11''-H oder 12''-H), 1.53 (s, 3 H, 11''-H oder 12''-H), 3.19 (septett, ³J_{SCH,CH₃} = 6.8 Hz, 1 H, SCH), 3.79–3.90 (m, 3 H, 5''-H, 6''-H), 4.23 (dd, ³J_{3'',2''} = 7.4 Hz, ³J_{3'',4''} = 5.2 Hz, 1 H, 3''-H), 4.25–4.31 (m, 5 H, 4''-H, 10-H, 10'-H), 4.51 (d, ³J_{1'',2''} = 10.4 Hz, 1 H, 1''-H), 4.77 (s, 2 H, 8'-H), 4.80 (dd, ³J_{2'',1''} = 10.4 Hz, ³J_{2'',3''} = 7.4 Hz, 1 H, 2''-H), 4.83 (d, ²J = 1.0 Hz, 2 H, 8-H), 5.58 (d, ²J_{7a,7b} = 15.5 Hz, 1 H, 7-H_a), 5.63 (d, ²J_{7b,7a} = 15.5 Hz, 1 H, 7-H_b), 7.04 (s, 1 H, 6-H), 7.74 (s, 1 H, 3-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -5.4 (C-7''), -5.3 (C-7''), 14.3, 14.3 (C-11, C-11'), 24.0 (CH₃), 24.1 (CH₃), 25.9 (C-9''), 26.5, 28.0 (C-11'', C-12''), 35.3 (SCH), 61.9, 61.9 (C-10, C-10'), 62.1 (C-6''), 66.3 (C-8), 66.5 (C-7), 66.6 (C-8'), 73.6 (C-4''), 76.8 (C-2''), 77.1 (C-3''), 77.2 (C-5''), 82.1 (C-1''), 110.7 (C-10''), 112.0 (C-3), 112.3 (C-6), 128.4 (C-1), 140.1 (C-2), 146.8 (C-4), 152.6 (C-5), 154.2 (C-7'), 167.7 (C-9), 168.0 (C-9'); **R_f** = 0.57 (PE/EtOAc 75:25); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2982, 2955, 2931, 2859, 1756, 1583, 1525, 1446, 1383, 1335, 1247, 1197, 1082, 1042, 986, 876, 838, 779; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₃₄H₅₇N₂O₁₅SSi⁺ [M+NH₄]⁺: 793.3243; gef. 793.3249; **Drehwert**: [α]_D²⁰ = 11 (c = 0.1, CHCl₃).

Isopropyl-2-O-[4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzyloxycarbonyl]-1-thio-β-D-galactopyranosid (**168e**)

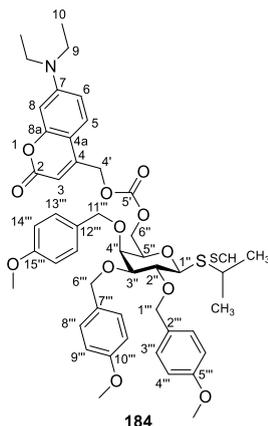
In Anlehnung an eine Vorschrift von *Suzuki et al.*^[129] wurde Kohlensäureester **171c** (55 mg, 71 μmol, 1.0 Äq.) in Dichlormethan (1.0 mL, 71 mM) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Nach der Zugabe von TFA (0.51 mL, 6.6 mmol, 93 Äq.) und Wasser 20 μL, 1.1 mmol, 16 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 10 min bei 0 °C unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (EtOAc), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Die Reaktionslösung wurde bei vermindertem Druck bei 0 °C eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (EtOAc) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 19 mg (31 μmol, 43 %) des farblosen Feststoffes **168e** erhalten.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.23 (d, ³J_{CH₃,SCH} = 6.8 Hz, 3 H, CH₃), 1.24–1.32 (m, 9 H, CH₃, 11-H, 11'-H), 3.21 (septett, ³J_{SCH,CH₃} = 6.8 Hz, 1 H, SCH), 3.65 (mc, 1 H, 5''-H) 3.71–3.77 (m, 2 H, 6''-H), 3.79 (ddd, ³J_{3'',2''} = 9.3 Hz, ³J_{3'',3''-OH} = 7.4 Hz, ³J_{3'',4''} = 3.4 Hz, 1 H, 3''-H), 3.84 (mc, 1 H, 6''-OH), 4.05 (mc, 1 H, 4''-H), 4.13 (d, ³J_{4''-OH,4''} = 4.4 Hz, 1 H, 4''-OH), 4.19–4.29 (m, 5 H, 3''-OH, 10-H, 10'-H), 4.64 (d, ³J_{1'',2''} = 10.0 Hz, 1 H, 1''-H), 4.86 (dd, ³J_{2'',1''} = 10.0 Hz, ³J_{2'',3''} = 9.3 Hz, 1 H, 2''-H), 4.95 (s, 2 H, 8'-H), 5.00 (d, ²J = 3.6 Hz, 2 H, 8-H), 5.53 (d, ²J = 3.1 Hz, 1 H, 7-H), 7.20 (s, 1 H, 6-H), 7.81 (s, 1 H, 3-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.5, 14.5 (C-11, C-11'), 24.2 (CH₃), 24.6 (CH₃), 35.3 (SCH), 61.7, 61.9 (C-10, C-10'), 62.3 (C-6''), 66.6 (C-7), 66.8 (C-8), 67.1 (C-8'), 70.3 (C-4''), 73.8 (C-3''), 76.9 (C-2''), 80.0 (C-5''), 83.5 (C-1''), 112.9 (C-3), 114.2 (C-6), 128.3 (C-1), 141.3 (C-2), 147.9 (C-4), 153.4 (C-5), 155.3 (C-7'), 168.6 (C-9), 168.9 (C-9'); **R_f** = 0.33 (EtOAc); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3450, 2962, 2925, 2870, 1753, 1588, 1525, 1442, 1381, 1336, 1254, 1198, 1083, 1030, 984, 870; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₂₅H₃₅NNaO₁₅S⁺ [M+Na]⁺: 644.1620; gef. 644.1623; **Schmelzpunkt**: 138–139 °C; **Drehwert**: [α]_D²⁰ = 54 (c = 0.1, CHCl₃).

Isopropyl-6-O-[[7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl]methoxy(carbonyl)]-2,3,4-tri-O-(4-methoxybenzyl)-1-thio-β-D-galactopyranosid (**184**)

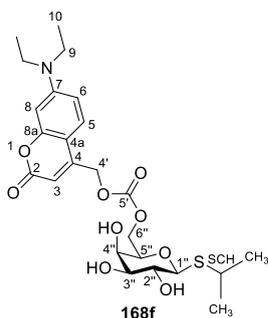
In Anlehnung an eine Vorschrift von *Suzuki et al.*^[129] wurde in einem sekurierten Schlenkcolben Cumarin **110** (60 mg, 0.15 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem Dichlormethan (1.0 mL, 0.15 M) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Nach der Zugabe von DMAP (20 mg, 0.16 mmol, 1.1 Äq.) und dem Zucker **183** (96 mg, 0.16 mmol, 1.1 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 20 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 60:40), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Anschließend wurde die Lösung mit CH₂Cl₂ verdünnt und nacheinander mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingengt und auf Kieselgel aufgezogen. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 60:40) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 84 mg (96 μmol, 66 %) des gelben Schaumes **184** erhalten.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.20 (t, ³J_{10,9} = 7.1 Hz, 6 H, 10-H), 1.31 (d, ³J_{CH₃,SCH} = 6.8 Hz, 6 H, CH₃), 3.20 (septett, ³J_{SCH₃,CH₃} = 6.8 Hz, 1 H, SCH), 3.41 (q, ³J_{9,10} = 7.1 Hz, 4 H, 9-H), 3.52–3.58 (m, 2 H, 3''-H, 5''-H), 3.74–3.84 (m, 11 H, 2''-H, 4''-H, OCH₃), 4.03 (dd, ²J_{6''a,6''b} = 10.9 Hz, ³J_{6''a,5''} = 5.9 Hz, 1 H, 6''-H_a), 4.29 (dd, ²J_{6''b,6''a} = 10.9 Hz, ³J_{6''b,5''} = 6.6 Hz, 1 H, 6''-H_b), 4.47 (d, ³J_{1,2} = 9.7 Hz, 1 H, 1-H), 4.58 (d, ²J_{11''a,11''b} = 11.5 Hz, 1 H, 11''-H_a), 4.67–4.74 (m, 3 H, 1'''-H_a, 6'''-H), 4.81 (d, ²J_{1''b,1''a} = 9.8 Hz, 1 H, 1'''-H_b), 4.90 (d, ²J_{11''b,11''a} = 11.5 Hz, 1 H, 11''-H_b), 5.21 (mc, 2 H, 4'-H), 6.12 (t, ⁴J_{3,4'} = 1.3 Hz, 1 H, 3-H), 6.51 (d, ⁴J_{8,6} = 2.6 Hz, 1 H, 8-H), 6.57 (dd, ³J_{6,5} = 9.0 Hz, ⁴J_{6,8} = 2.6 Hz, 1 H, 6-H), 6.84 (d, ³J_{14'',13''} = 8.5 Hz, 2 H, 14'''-H), 6.86 (d, ³J_{4'',3''} = 8.5 Hz, 2 H, 4'''-H), 6.89 (d, ³J_{9'',8''} = 8.5 Hz, 2 H, 9'''-H), 7.24 (d, ³J_{13'',14''} = 8.5 Hz, 2 H, 13'''-H), 7.26 (d, ³J_{5,6} = 9.0 Hz, 1 H, 5-H), 7.31 (d, ³J_{8'',9''} = 8.5 Hz, 2 H, 8'''-H), 7.32 (d, ³J_{3'',4''} = 8.5 Hz, 2 H, 3'''-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.6 (C-10), 24.0 (CH₃), 35.6 (SCH), 44.9 (C-9), 55.4, 55.4, 55.4 (OCH₃), 64.8 (C-4'), 67.2 (C-6''), 72.3 (C-4''), 73.0 (C-6'''), 73.8 (C-11'''), 75.6 (C-1'''), 75.6 (C-5''), 78.3 (C-2''), 83.9 (C-3''), 85.2 (C-1''), 98.0 (C-8), 105.9 (C-4a), 106.7 (C-3), 108.8 (C-6), 113.8, 113.9, 114.0 (C-4''', C-9''', C-14'''), 124.4 (C-5), 129.4 (C-8'''), 130.1 (C-3'''), 130.2 (C-13'''), 130.4, 130.5, 130.7 (C-2''', C-7''', C-12'''), 148.7 (C-4), 150.9 (C-7), 154.3 (C-5'), 156.4 (C-8a), 159.4, 159.4, 159.4 (C-5''', C-10''', C-15'''), 161.8 (C-2); **R_f** = 0.31 (PE/EtOAc 60:40); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2966, 2930, 2906, 2864, 2835, 1753, 1715, 1604, 1513, 1422, 1357, 1244, 1173, 1078, 1032, 822, 570, 519; **HRMS** (ESD): m/z ber. für C₄₈H₆₁N₂O₁₂S⁺ [M+NH₄]⁺: 889.3940; gef. 889.3929; **Schmelzpunkt**: 93.6 °C; **Drehwert**: [α]_D²⁰ = -18.8 (c = 1.0, CHCl₃).

Isopropyl-6-O-[[7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl]methoxy(carbonyl)]-1-thio- β -D-galactopyranosid (168f)

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Suzuki et al.*^[129] wurde in einem sekurierten Schlenkcolben Cumarin **110** (40 mg, 46 μ mol, 1.0 Äq.) in Dichlormethan (1.0 mL, 46 mM) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Nach der Zugabe von TFA (0.33 mL, 4.3 mmol, 93 Äq.) und Wasser (13 μ L, 0.73 mmol, 16 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 10 min bei 0 °C unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (EtOAc), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Die Reaktionslösung wurde bei vermindertem Druck bei 0 °C eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 50:50 \rightarrow 10:90) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 20 mg (39 μ mol, 78 %) des gelben Feststoffes **168f** erhalten.

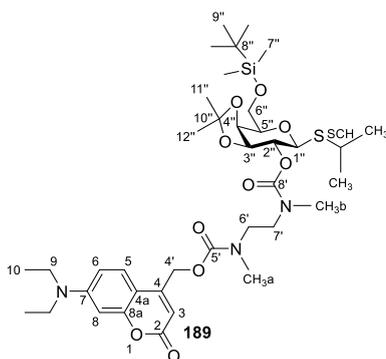


¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.19 (t, ³J_{10,9} = 7.1 Hz, 6 H, 10-H), 1.31 (d, ³J_{CH₃,SCH} = 6.7 Hz, 3 H, CH₃), 1.32 (d, ³J_{CH₃,SCH} = 6.7 Hz, 3 H, CH₃), 3.15–3.25 (m, 2 H, SCH, 2''-OH), 3.31 (s, 1 H, 4''-OH), 3.40 (q, ³J_{9,10} = 7.1 Hz, 4 H, 9-H), 3.62–3.71 (m, 2 H, 2''-H, 3''-H), 3.74 (s, 1 H, 3''-OH), 3.80 (mc, 1 H, 5''-H), 4.04 (brs, 1 H, 4''-H), 4.40 (dd, ³J_{6a'',6b''} = 11.4 Hz, ³J_{6a'',5''} = 5.0 Hz, 1 H, 6''-H_a), 4.42 (mc, 1 H, 1''-H), 4.48 (dd, ³J_{6b'',6a''} = 11.4 Hz, ³J_{6b'',5''} = 7.2 Hz, 1 H, 6''-H_b), 5.23 (dd, ³J_{4'a,4'b} = 15.2 Hz, ⁴J_{4'a,3} = 1.3 Hz, 1 H, 4'-H_a), 5.27 (dd, ³J_{4'b,4'a} = 15.2 Hz, ⁴J_{4'b,3} = 1.3 Hz, 1 H, 4'-H_b), 6.12 (dd, ³J_{3,4'a} = 1.3 Hz, ⁴J_{3,4'b} = 1.3 Hz, 1 H, 3-H), 6.49 (d, ⁴J_{8,6} = 2.6 Hz, 1 H, 8-H), 6.56 (dd, ³J_{6,5} = 9.0 Hz, ⁴J_{6,8} = 2.6 Hz, 1 H, 6-H), 7.26 (d, ³J_{5,6} = 9.0 Hz, 1 H, 5-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.6 (C-10), 24.1 (CH₃), 24.3 (CH₃), 36.1 (SCH), 44.9 (C-9), 64.9 (C-4'), 67.4 (C-6''), 68.8 (C-4''), 70.4 (C-2''), 74.6 (C-3''), 75.9 (C-5''), 86.1 (C-1''), 97.9 (C-8), 105.9 (C-4a), 106.5 (C-3), 108.9 (C-6), 124.5 (C-5), 148.9 (C-4), 150.9 (C-7), 154.7 (C-5'); **R_f** = 0.35 (EtOAc); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3424, 2971, 2923, 2870, 1751, 1720, 1605, 1528, 1423, 1356, 1266, 1196, 1143, 1100, 1080, 1052, 1031, 967, 871, 828, 791, 743; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₂₄H₃₄NO₉S⁺ [M+H]⁺: 512.1949; gef. 512.1953; **Schmelzpunkt**: 85–87 °C; **Drehwert**: [α]_D²⁰ = 22.0 (c = 0.1, CHCl₃); **UV/Vis-Absorption** [Tris-Puffer (20 mM, pH = 7.5)/MeCN 1:1]: λ_{max} (ϵ) = 273 nm (28210 $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 386 (12004). **Achirale Umkehrphasen-HPLC**: t_R = 8.0 min; Säule: *HyperClone* 5 μ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*); Detektion (UV): 386 nm; Eluent: MeOH : H₂O

(60:40); Flussrate: 0.5 mL/min; Säulentemperatur: 25 °C; Probenlösungsmittel: Tris-Puffer (20 mM, pH = 7.5)/MeCN 1:1.

Isopropyl-6-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2-O-({2-[[{7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl]methoxy}carbonyl(methyl)amino]ethyl}{methyl}carbamoyl)-3,4-O-(1-methylethylidene)-1-thio- β -D-galactopyranosid (189**)**

In Anlehnung an eine Vorschrift von Wang *et al.*^[347] wurde in einem sekurierten Schlenkkolben Cumarin **112** (227 mg, 628 μ mol, 1.75 Äq.) in trockenem Dichlormethan (11.0 mL, 57.1 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Nach der Zugabe von DMAP (6 mg, 0.06 mmol, 0.2 Äq.), dem Zucker **188** (200 mg, 359 μ mol, 1.00 Äq.) und DIPEA (1.10 mL, 6.29 mmol, 17.5 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 24 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 50:50), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Anschließend wurde die Lösung mit CH₂Cl₂ verdünnt und nacheinander mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingengt und auf Kieselgel aufgezogen. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 50:50 \rightarrow EtOAc/MeOH/NEt₃ 87:10:3) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 270 mg (346 μ mol, 97 %) des leicht gelben Schaumes **189** erhalten. Das Produkt wurde als *syn/anti*-Isomerengemisch aufgrund der Carbamat-Bindungen erhalten.

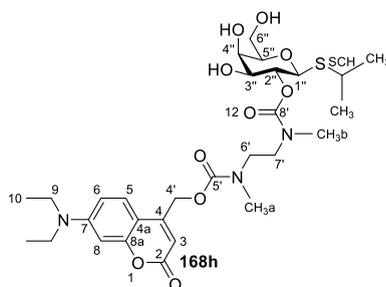


¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.06 (s, 6 H, 7''-H), 0.88 (s, 9 H, 9''-H), 1.20 (t, ³J_{10,9} = 7.1 Hz, 6 H, 10-H), 1.23–1.33 (m, 9 H, CH₃, 11-H oder 12-H), 1.55 (s, 3 H, 11-H oder 12-H), 2.86–3.07 (m, 6 H, CH_{3a}, CH_{3b}), 3.17 (septett, ³J_{SCH,CH₃} = 6.8 Hz, 1 H, SCH), 3.28–3.62 (m, 4 H, 6'-H, 7'-H), 3.41 (q, ³J_{9,10} = 7.1 Hz, 4 H, 9-H), 3.75–3.90 (m, 3 H, 5''-H, 6''-H), 4.13–4.22 (m, 1 H, 3''-H), 4.22–4.28 (m, 1 H, 4''-H), 4.44–4.55 (m, 1 H, 1''-H), 4.79–4.91 (m, 1 H, 2''-H), 5.20–5.30 (m, 2 H, 4'-H), 6.03–6.13 (m, 1 H, 3-H), 6.50 (d, ³J_{8,6} = 2.6 Hz, 1 H, 8-H), 6.57 (d, ³J_{6,5} = 9.0 Hz, 1 H, 6-H),

7.27–7.36 (m, 1 H, 5-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -5.4 (C-7''), -5.3 (C-7''), 12.6 (C-10), 18.4 (C-8''), 23.9 (CH_3), 24.0 (CH_3), 25.9 (C-9''), 26.5, 28.0 (C-11'', C-12''), 34.9 (SCH), 35.0 ($\text{CH}_3\text{a/b}$), 35.3 ($\text{CH}_3\text{a/b}$), 35.6 ($\text{CH}_3\text{a/b}$), 35.9 ($\text{CH}_3\text{a/b}$), 36.0 ($\text{CH}_3\text{a/b}$), 36.1 ($\text{CH}_3\text{a/b}$), 44.9 (C-9), 46.7, 46.8, 47.2, 47.3, 47.5, 48.0, 48.1 (C-6', C-7'), 62.2 (C-4'), 62.5 (C-6''), 62.7 (C-6''), 73.6, 73.6, 73.7 (C-2'', C-4''), 77.1 (C-5''), 77.5 (C-3''), 77.6 (C-3''), 77.6 (C-3''), 82.6 (C-1''), 82.7 (C-1''), 82.8 (C-1''), 82.9 (C-1''), 97.9 (C-8), 105.9, 106.1, 106.4 (C-3, C-4a), 108.8 (C-6), 110.4 (C-10''), 124.4 (C-5), 124.5 (C-5), 124.6 (C-5), 124.7 (C-5), 150.5, 150.6, 150.8 (C-4, C-7), 155.1, 155.3, 155.5, 155.6 (C-5', C-8'), 156.3 (C-8a), 156.4 (C-8a), 162.1 (C-2); $R_f = 0.31$ (PE/EtOAc 50:50); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2960, 2930, 2859, 1710, 1606, 1529, 1466, 1422, 1358, 1219, 1125, 1081, 874, 839, 779; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{38}\text{H}_{62}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{SSi}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 780.3920; gef. 780.3935; **Schmelzpunkt**: 68.0 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_D^{20} = 0.4$ ($c = 1.0$, CHCl_3).

Isopropyl-2-O-({2-({{[7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl]methoxy}-carbonyl}(methyl)amino)ethyl}{methyl}carbamoyl)-1-thio- β -D-galactopyranosid – DC-NN-cIPTG (168h)

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Suzuki et al.*^[129] wurde Cumarin **189** (112 mg, 144 μmol , 1.00 Äq.) in TFA (1.03 mL, 13.4 mmol, 93.0 Äq.) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Nach der Zugabe von Wasser (41.0 μL , 2.30 mmol, 16.0 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 10 min bei 0 °C unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (EtOAc/MeOH 95:5), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Die Reaktionslösung wurde bei vermindertem Druck bei 0 °C eingeeengt. Die säulenchromatographische Isolation (EtOAc/MeOH 95:5) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 89 mg (0.14 mmol, quant.) des gelben Feststoffes **168h** erhalten. Das Produkt wurde als *syn/anti*-Isomerengemisch aufgrund der Carbamat-Bindungen erhalten.

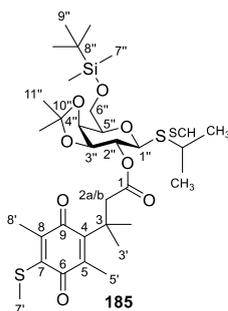


$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 60 °C): δ [ppm] = 1.15 (t, $^3J_{10,9} = 7.0$ Hz, 6 H, 10-H), 1.19 (d, $^3J_{\text{CH}_3,\text{SCH}} = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 1.22 (d, $^3J_{\text{CH}_3,\text{SCH}} = 6.8$ Hz, 3 H, CH_3), 2.85 (s, 3 H, CH_3a oder CH_3b), 2.95 (brs, 3 H, CH_3a oder CH_3b), 3.07–3.12 (m, 1 H, SCH), 3.34–3.47 (m, 9 H, 9-H, 6'-H, 7'-H, 5''-H), 3.50 (dd, $^2J_{6''\text{a},6''\text{b}} = 10.9$ Hz, $^3J_{6''\text{a},5''} = 6.0$ Hz, 1 H, 6''-H_a), 3.54 (dd, $^2J_{6''\text{b},6''\text{a}} = 10.9$ Hz, $^3J_{6''\text{b},5''} = 6.0$ Hz,

1 H, 6''-H_b), 3.56 (brs, 1 H, 3''-H), 3.78 (d, $^3J_{4'',3''} = 3.3$ Hz, 1 H, 4''-H), 4.48 (brs, 1 H, 1''-H), 4.72 (dd, $^3J_{2'',1''} = 10.1$ Hz, $^3J_{2'',3''} = 9.3$ Hz, 1 H, 2''-H), 5.25 (s, 2 H, 4'-H), 5.95 (s, 1 H, 3-H), 6.53 (d, $^4J_{8,6} = 2.6$ Hz, 1 H, 8-H), 6.71 (dd, $^3J_{6,5} = 9.0$ Hz, $^4J_{6,8} = 2.6$ Hz, 1 H, 6-H), 7.48 (d, $^3J_{5,6} = 9.0$ Hz, 1 H, 5-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (201 MHz, DMSO-*d*₆, 60 °C): δ [ppm] = 12.0 (C-10), 23.4 (CH₃), 23.8 (CH₃), 33.7 (SCH), 34.7, 34.9 (CH₃a/b), 43.7 (C-9), 45.9, 46.1 (C-6', C-7'), 60.3 (C-6''), 61.9 (C-4'), 68.4 (C-4''), 72.1 (C-2''), 72.6 (C-3''), 78.9 (C-5''), 82.7 (C-1''), 96.8 (C-8), 104.6 (C-3), 105.3 (C-4a), 108.7 (C-6), 125.0 (C-5), 150.4 (C-7), 151.0 (C-4), 154.5 (C-5'), 155.1 (C-8'), 155.6 (C-8a), 160.3 (C-2); $R_f = 0.15$ (PE/MeOH 95:5); IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3406, 2966, 2928, 2870, 1697, 1603, 1526, 1484, 1423, 1357, 1274, 1200, 1133, 1078, 862, 825, 803, 759; HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₂₉H₄₄N₃O₁₀S⁺ [M+H]⁺: 626.2742; gef. 626.2753; **Schmelzpunkt**: 95.5 °C; **Drehwert**: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -22.6$ (*c* = 1.0, CHCl₃); **UV/Vis-Absorption** [Tris-Puffer (20 mM, pH = 7.5)/MeCN 1:1]: λ_{max} (ϵ) = 272 nm (17662 $\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 305 (4142), 386 (17184). **Achirale Umkehrphasen-HPLC**: *t_R* = 8.2 min; Säule: HyperClone 5 μ ODS (C18) 120 (Phenomenex); Detektion (UV): 386 nm; Eluent: MeOH : H₂O (60:40); Flussrate: 0.5 mL/min; Säulentemperatur: 25 °C; Probenlösungsmittel: Tris-Puffer (20 mM, pH = 7.5)/MeCN 1:1.

Isopropyl-6-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2-O-{3-[2,5-Dimethyl-4-(methylthio)-3,6-dioxo-cyclohexa-1,4-dien-1-yl]-3-methylbutyryl}-3,4-O-(1-methylethylidene)-1-thio- β -D-galactopyranosid (185)

In Anlehnung an eine Vorschrift von Walton *et al.*^[209] wurde Methylthiochinon **136** (200 mg, 708 μmol , 1.00 Äq.) in Dichlormethan (4.00 mL, 177 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre in einem Schlenkcolben vorgelegt. Nach Zugabe des geschützten Zuckers **166** (667 mg, 1.70 mmol, 2.40 Äq.) wurden EDC (1.36 g, 7.08 mmol, 10.0 Äq.) und DMAP (15 mg, 0.12 mmol, 17 mol%) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem durch Reaktionskontrolle mittels DC (PE/EtOAc 80:20) der vollständige Umsatz bestätigt wurde, wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingeengt. Der verbleibende Rest wurde auf Kieselgel aufgezogen. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 92:8) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 115 mg (175 μmol , 25 %) des orangen Öles **185** erhalten.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.06 (s, 6 H, 7''-H), 0.88 (s, 9 H, 9''-H), 1.25 (d, ³J_{CH₃,SCH} = 6.7 Hz, 3 H, CH₃), 1.26 (d, ³J_{CH₃,SCH} = 6.7 Hz, 3 H, CH₃), 1.29 (s, 3 H, 11''-H), 1.44 (s, 3 H, 3'-H), 1.46 (s, 6 H, 3'-, 11''-H), 2.13 (s, 3 H, 8'-H), 2.16 (s, 3 H, 5'-H), 2.46 (s, 3 H, 7'-H), 2.88 (d, ²J_{2a,2b} = 16.1 Hz, 1 H, 2-H_a), 3.07 (d, ²J_{2b,2a} = 16.1 Hz, 1 H, 2-H_b), 3.11 (septett, ³J_{SCH,CH₃} = 6.7 Hz, 1 H, SCH), 3.72–3.78 (m, 1 H, 5''-H), 3.78–3.89 (m, 2 H, 6''-H), 4.02 (dd, ³J_{3'',2''} = 7.3 Hz, ³J_{3'',4''} = 5.2 Hz, 1 H, 3''-H), 4.20 (dd, ³J_{4'',3''} = 5.2 Hz, ³J_{4'',5''} = 2.1 Hz, 1 H, 4''-H), 4.34 (d, ³J_{1'',2''} = 10.3 Hz, 1 H, 1''-H), 4.87 (dd, ³J_{2'',1''} = 10.3 Hz, ³J_{2'',3''} = 7.3 Hz, 1 H, 2''-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -5.4 (C-7''), -5.2 (C-7''), 14.6 (C-5'), 14.8 (C-8'), 17.3 (C-7'), 18.4 (C-8''), 23.9 (CH₃), 24.1 (CH₃), 25.9 (C-9''), 26.5 (C-11''), 27.9 (C-11''), 29.0 (C-3'), 29.1 (C-3'), 35.1 (SCH), 38.5 (C-3), 47.8 (C-2), 62.2 (C-6''), 72.0 (C-2''), 73.4 (C-4''), 77.2 (C-5''), 77.2 (C-3''), 82.5 (C-1''), 110.3 (C-10''), 140.0 (C-5), 141.7 (C-7), 146.5 (C-8), 152.7 (C-4), 171.3 (C-1), 183.6 (C-6), 188.2 (C-9); **R_f** = 0.68 (PE/EtOAc 80:20); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2960, 2929, 2859, 1737, 1648, 1581, 1472, 1440, 1371, 1244, 1220, 1182, 1109, 1080, 1048, 877, 837, 778, 737; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₃₂H₅₆NO₈S₂Si⁺ [M+NH₄]⁺: 674.3211; gef. 674.3220; **Drehwert**: [α]_D²⁰ = 11.4 (c = 1.0, CHCl₃).

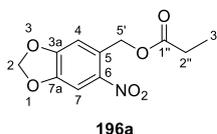
Isopropyl-2-O-{3-[2,5-Dimethyl-4-(methylthio)-3,6-dioxocyclohexa-1,4-dien-1-yl]-3-methylbutyryl}-1-thio-β-D-galactopyranosid – TML-clPTG (**168g**)

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Ley et al.*^[410] wurde Methylthiochinon **185** (100 mg, 152 μmol, 1.00 Äq.) in einem Rundkolben vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Nach der Zugabe von kalter Trifluoressigsäure (1.09 mL, 139 mM) wurde sofort Wasser (44.0 μL, 2.44 mmol, 16.0 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 10 min bei 0 °C gerührt. Nachdem durch Reaktionskontrolle mittels DC (PE/EtOAc 80:20) der vollständige Umsatz bestätigt wurde, wurde das Lösungsmittel unverzüglich *in vacuo* über eine Kühlfalle entfernt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 50:50 bis hin zu 100 % EtOAc) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 64 mg (0.13 mmol, 84 %) des orangenen Schaumes **168g** erhalten.

6.9 Synthesevorschriften zur Darstellung der *photocaged* Propionsäuren

6-Nitropiperonylpropionat – NP-cPropionsäure (196a)

6-Nitropiperonylalkohol (**90**) (200 mg, 1.01 mmol, 1.00 Äq.) wurde in trockenem Dichlormethan (6.00 mL, 168 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Propionsäurechlorid (115 µL, 1.32 mmol, 1.30 Äq.) und Triethylamin (184 µL, 1.32 mmol, 1.30 Äq.) wurden hinzugegeben und die Lösung wurde für 15 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 70:30), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Anschließend wurde die Lösung nacheinander mit Wasser, gesättigter NaHCO₃-Lösung und 1 M wässriger HCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingeeengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 75:25) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 211 mg (833 µmol, 82 %) des gelben Feststoffes **196a** erhalten.

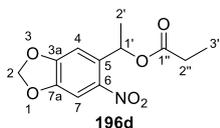


¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.20 (³J_{3'',2''} = 7.6 Hz, 3 H, 3''-H), 2.45 (q, ³J_{2'',3''} = 7.6 Hz, 2 H, 2''-H) 5.46 (s, 2 H, 5'-H), 6.13 (s, 2 H, 2-H), 6.99 (s, 1 H, 4-H), 7.63 (s, 1 H, 7-H); ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.2 (C-3''), 27.7 (C-2''), 63.2 (C-5'), 103.3 (C-2), 106.0 (C-7), 107.7 (C-4), 130.0 (C-5), 141.7 (C-6), 147.5 (C-7a), 152.6 (C-3a), 173.9 (C-1''); **R_f** = 0.46 (PE/EtOAc 80:20); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2989, 2949, 2924, 1744, 1618, 1507, 1492, 1443, 1425, 1398, 1359, 1333, 1317, 1268, 1201, 1166, 1119, 1084, 1033, 996, 979, 924, 903, 874, 816, 804, 755, 610, 515; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₁H₁₅N₂O₆⁺ [M+NH₄]⁺: 271.0925; gef. 271.0928; **Schmelzpunkt**: 74 °C; **UV/Vis-Absorption** (MeOH): λ_{max} (ε) = 345 nm (4474 ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹), 295 (2262), 243 (9670).

1-(6-Nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)ethylpropionat – NBE-cPropionsäure (196d)

Alkohol **91** (200 mg, 947 µmol, 1.00 Äq.) wurde in trockenem Dichlormethan (6.00 mL, 158 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Propionsäurechlorid (107 µL, 1.23 mmol, 1.30 Äq.) und Triethylamin (172 µL, 1.23 mmol, 1.30 Äq.) wurden hinzugegeben und die Lösung wurde für 15 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 70:30). Anschließend wurde die Lösung nacheinander mit Wasser, gesättigter NaHCO₃-Lösung und 1 M wässriger HCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet

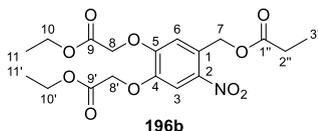
und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingeeengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 75:25) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 165 mg (617 μmol , 65 %) des gelben Feststoffes **196d** erhalten.



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.12 (t, $^3J_{3'',2''} = 7.5$ Hz, 3 H, 3''-H), 1.58 (d, $^3J_{2',1'} = 6.4$ Hz, 3 H, 2'-H), 2.35 (mc, 2 H, 2''-H), 6.08–6.12 (m, 2 H, 2-H), 6.35 (q, $^3J_{1',2'} = 6.4$ Hz, 1-H, 1'-H), 7.00 (s, 1 H, 4-H), 7.46 (s, 1 H, 7-H); **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 9.1 (C-3''), 22.1 (C-2'), 27.8 (C-2''), 68.3 (C-1'), 103.1 (C-2), 105.3 (C-7), 105.8 (C-4), 135.8 (C-5), 141.7 (C-6), 147.2 (C-7a), 152.4 (C-3a), 173.3 (C-1''); **R_f** = 0.50 (PE/EtOAc 80:20); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2983, 2931, 1736, 1618, 1521, 1505, 1483, 1422, 1337, 1255, 1179, 1141, 1066, 1033, 983, 929, 876, 820, 759, 728, 665, 610, 533; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_6^+$ [$\text{M}+\text{NH}_4$] $^+$: 285.1081; gef. 285.1085; **Schmelzpunkt**: 58–59 $^\circ\text{C}$; **UV/Vis-Absorption** (MeOH): λ_{max} (ϵ) = 345 nm (5578 $\epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), 296 (3647), 244 (13441).

4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzylpropionat – BEC-cPropionsäure (**196b**)

Alkohol **99** (0.30 g, 0.84 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem Dichlormethan (3.0 mL, 0.28 M) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt und auf 0 $^\circ\text{C}$ gekühlt. Propionsäurechlorid (88 μL , 1.0 mmol, 1.2 Äq.) und Triethylamin (0.15 mL, 1.1 mmol, 1.3 Äq.) wurden hinzugegeben und die Lösung wurde für 15 min bei 0 $^\circ\text{C}$ gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 70:30), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Anschließend wurde die Lösung nacheinander mit Wasser, gesättigter NaHCO_3 -Lösung und 1 M wässriger HCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO_4 getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingeeengt. Es wurden 0.33 g (0.79 mmol, 94 %) des gelben Feststoffes **196b** erhalten.

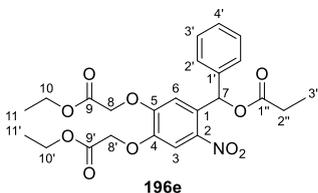


$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.20 (t, $^3J_{3'',2''} = 7.5$ Hz, 3 H, 3''-H) 1.29 (t, $^3J_{11,10}$ oder $11',10'$ = 7.1 Hz, 3 H, 11-H oder 11'-H), 1.31 (t, $^3J_{11,10}$ oder $11',10'$ = 7.1 Hz, 3 H, 11-H oder 11'-H), 2.44 (q, $^3J_{2'',3''} = 7.5$ Hz, 2 H, 2''-H), 4.27 (q, $^3J_{10,11}$ oder $10',11'$ = 7.1 Hz, 2 H, 10-H oder 10'-H), 4.28 (q, $^3J_{10,11}$ oder $10',11'$ =

7.1 Hz, 2 H, 10-H oder 10'-H), 4.77 (s, 2 H, 8'-H), 4.81 (s, 2 H, 8-H), 5.48 (s, 2 H, 7-H), 6.99 (s, 1 H, 6-H), 7.71 (s, 1 H, 3-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 9.2 (C-3''), 14.3, 14.3 (C-11, C-11'), 27.7 (C-2''), 61.9, 61.9 (C-10, C-10'), 62.9 (C-7), 66.5 (C-8, C-8'), 111.9 (C-3), 113.7 (C-6), 128.5 (C-1), 140.8 (C-2), 146.9 (C-4), 152.3 (C-5), 167.9 (C-9), 167.9 (C-9'), 173.7 (C-1''); R_f = 0.47 (PE/EtOAc 70:30); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2985, 2925, 2855, 1739, 1580, 1522, 1442, 1374, 1334, 1287, 1171, 1083, 1024, 870, 797, 755, 603; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_{10}^+$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 431.1660; gef. 431.1666; **Schmelzpunkt**: 90 °C; **UV/Vis-Absorption** (MeOH): λ_{max} (ϵ) = 328 nm (6451 $\epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), 295 (6422), 237 (12278).

1-[4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrophenyl]phenylmethylpropionat – BECPH-cPropionsäure (196e)

Alkohol **103f** (400 mg, 923 μmol , 1.00 Äq.) wurde in trockenem Dichlormethan (3.50 mL, 264 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Propionsäurechlorid (105 μL , 1.20 mmol, 1.30 Äq.) und Triethylamin (167 μL , 1.20 mmol, 1.30 Äq.) wurden hinzugegeben und die Lösung wurde für 15 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 23 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 70:30). Anschließend wurde die Lösung nacheinander mit Wasser, gesättigter NaHCO_3 -Lösung und 1 M wässriger HCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO_4 getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 75:25) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 292 mg (597 μmol , 65 %) des gelben Feststoffes **196e** erhalten.

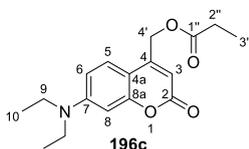


$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.15 (t, $^3J_{3',2'} = 7.6$ Hz, 3 H, 3'-H), 1.25 (t, $^3J_{11,10} = 7.1$ Hz, 3 H, 11-H), 1.31 (t, $^3J_{11',10'} = 7.1$ Hz, 3 H, 11'-H), 2.40 (mc, 2 H, 2''-H), 4.21 (qd, $^3J_{10,11} = 7.1$ Hz, $^2J = 2.0$ Hz, 2 H, 10-H), 4.28 (q, $^3J_{10',11'} = 7.1$ Hz, 2 H, 10'-H), 4.76 (s, 2 H, 8'-H), 4.77 (d, $^2J = 2.4$ Hz, 2 H, 8-H), 7.05 (s, 1 H, 6-H), 7.27–7.36 (m, 5 H, 2'-H, 3'-H, 4'-H), 7.57 (s, 1 H, 7-H), 7.60 (s, 1 H, 3-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 9.1 (C-3''), 14.3, 14.3 (C-11, C-11'), 27.8 (C-2''), 61.8 (C-10), 61.9 (C-10'), 66.5, 66.6 (C-8, C-8'), 72.1 (C-7), 111.5 (C-3), 113.7 (C-6), 127.8, 128.5, 128.7 (C-2', C-3', C-4'), 131.4 (C-1), 138.4 (C-1'), 141.5 (C-2), 147.0 (C-4), 151.9 (C-5), 167.9, 167.9 (C-9, C-9'), 172.9 (C-1''); R_f = 0.59 (PE/EtOAc 70:30); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2983, 2939, 1740, 1583,

1521, 1447, 1339, 1286, 1187, 1078, 1017, 966, 859, 799, 757, 699, 610; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $C_{24}H_{31}N_2O_{10}^+$ $[M+NH_4]^+$: 507.1973; gef. 507.1981; **Schmelzpunkt**: 95–96 °C; **UV/Vis-Absorption** (MeOH): λ_{max} (ϵ) = 325 nm ($5381 \text{ } \epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 293 (5674), 240 (14898).

7-(Diethylamino)-4-methylcumarinpropionat – DC-cPropionsäure (196c)

Cumarin **105** (0.10 g, 0.40 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem Dichlormethan (2.0 mL, 0.20 M) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Propionsäurechlorid (53 μL , 0.61 μmol , 1.5 Äq.) und Triethylamin (85 μL , 0.61 μmol , 1.5 Äq.) wurden hinzugegeben und die Lösung wurde für 15 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 23 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 70:30). Anschließend wurde die Lösung nacheinander mit Wasser, gesättigter NaHCO_3 -Lösung und 1 M wässriger HCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO_4 getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingeeengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 75:25) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 0.10 g (0.33 mmol, 82 %) des gelben Feststoffes **196c** erhalten.

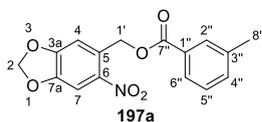


$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.18–1.23 (m, 9 H, 10-H, 3''-H), 2.47 (q, $^3J_{2'',3''} = 7.5$ Hz, 2 H, 2''-H), 3.41 (q, $^3J_{9,10} = 7.1$ Hz, 4 H, 9-H), 5.22 (d, $^4J_{4',3} = 1.3$ Hz, 2 H, 4'-H) 6.13 (t, $^4J_{3,4'} = 1.3$ Hz, 1 H, 3-H), 6.51 (d, $^4J_{8,6} = 2.6$ Hz, 1 H, 8-H), 6.58 (dd, $^3J_{6,5} = 9.0$ Hz, $^4J_{6,8} = 2.6$ Hz, 1 H, 6-H), 7.29 (d, $^3J_{5,6} = 9.0$ Hz, 1 H, 5-H); **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 9.2 (C-3''), 12.6 (C-10), 27.6 (C-2''), 44.9 (C-9), 61.3 (C-4'), 98.0 (C-8), 106.2 (C-4a), 106.5 (C-3), 108.8 (C-6), 124.5 (C-5), 149.7 (C-4), 150.8 (C-7), 156.4 (C-8a), 162.1 (C-2), 173.8 (C-1''); $R_f = 0.59$ (PE/EtOAc 70:30); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2973, 2939, 1712, 1599, 1527, 1418, 1377, 1356, 1335, 1271, 1230, 1197, 1166, 1140, 1078, 1007, 900, 847, 824, 797, 460; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $C_{17}H_{22}NO_4^+$ $[M+H]^+$: 304.1543; gef. 304.1549; **Schmelzpunkt**: 86 °C; **UV/Vis-Absorption** (MeOH): λ_{max} (ϵ) = 245 nm ($12786 \text{ } \epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 381 (18028).

6.10 Synthesevorschriften zur Darstellung der *photocaged* Benzoessäure-Derivate

6-Nitropiperonyl-3-methylbenzoat – NP-cToluylsäure (197a)

Nach einer Vorschrift von Dr. *Claus Bier*^[312] wurde 6-Nitropiperonylalkohol (**90**) (500 mg, 2.54 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem Pyridin (1.50 mL, 1.69 M) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Unter starkem Rühren wurde *m*-Toluylsäurechlorid (401 µL, 3.04 mmol, 1.20 Äq.) tropfenweise hinzugegeben und bis zum vollständigen Umsatz unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 50:50), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch Zugabe von Wasser. Anschließend wurde die Lösung mit Ethylacetat (3×) extrahiert und die vereinten organischen Phasen wurden mit Wasser (2×) und 1 M HCL-Lösung (1×) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 60:40) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 527 mg (1.67 mmol, 66 %) des farblosen Feststoffes **197a** erhalten.

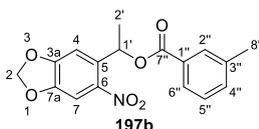


¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2.42 (s, 3 H, 8''-H), 5.72 (s, 2 H, 1'-H), 6.13 (s, 2 H, 2-H), 7.07 (s, 1 H, 4-H), 7.36 (dd, ³J_{5'',6''} = 7.6 Hz, ³J_{5'',4''} = 7.6 Hz, 5''-H), 7.41 (d, ³J_{4'',5''} = 7.6 Hz, 4''-H), 7.66 (s, 1 H, 7-H), 7.88–7.93 (m, 2 H, 2''-H, 6''-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 21.4 (C-8''), 63.6 (C-1'), 103.3 (C-2), 106.1 (C-7), 107.6 (C-4), 127.0 (C-6''), 128.6 (C-5''), 129.6 (C-1''), 130.2 (C-5), 130.4 (C-2''), 134.3 (C-4''), 138.6 (C-3''), 141.7 (C-6), 147.6 (C-7a), 152.7 (C-3a), 166.2 (C-7''); **R_f** = 0.71 (PE/EtOAc 50:50); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2918, 1721, 1617, 1522, 1506, 1486, 1433, 1392, 1325, 1263, 1195, 1104, 1031, 1035, 999, 929, 875, 817, 744; **HRMS** (ESI, positiv-Ion): m/z ber. für C₁₆H₁₇N₂O₆ [M+NH₄]⁺: 333.1081; gef. 333.1086; **Schmelzpunkt**: 109–110 °C; **UV/Vis-Absorption** (MeOH): λ_{max} (ε) = 288 nm (5554 ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹), 342 (7162).

Achirale Umkehrphasen-HPLC: t_R = 5.3 min; Säule: *HyperClone* 5 µ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*); Detektion (UV): 342 nm; Eluent: H₂O : MeOH (30:70); Flussrate: 1.0 mL/min; Säulentemperatur: 25 °C; Probenlösungsmittel: MeOH; Konzentration: 1 mM.

1-(6-Nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)ethyl-3-methylbenzoat – NBE-cToluylsäure (197b)

Nach einer Vorschrift von Dr. *Claus Bier*^[312] wurde Alkohol **91** (400 mg, 1.89 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem Pyridin (2.00 mL, 945 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Unter starkem Rühren wurde *m*-Toluylchlorid (324 µL, 2.46 mmol, 1.30 Äq.) tropfenweise hinzugegeben und für 24 h unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 80:20), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch Zugabe von Wasser. Anschließend wurde die Lösung mit Ethylacetat (3×) extrahiert und die vereinten organischen Phasen wurden mit Wasser (2×) und 1 M HCL-Lösung (1×) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 80:20) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 409 mg (1.24 mmol, 66 %) des farblosen Feststoffes **197b** erhalten.

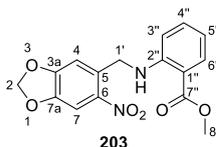


¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.74 (d, ³J_{2',1'} = 6.4 Hz, 3 H, 2'-H), 2.41 (s, 3 H, 8''-H), 6.06 (d, ³J_{2a,2b} = 1.2 Hz, 1 H, 2-H_a), 6.10 (d, ³J_{2b,2a} = 1.2 Hz, 1 H, 2-H_b), 6.58 (q, ³J_{1',2'} = 6.4 Hz, 1 H, 1'-H), 7.09 (s, 1 H, 4-H), 7.34 (dd, ³J_{5'',4''} = 7.8 Hz, 1 H, 5''-H), 7.39 (d, ³J_{4'',5''} = 7.8 Hz, 1 H, 4''-H), 7.50 (s, 1 H, 7-H), 7.83–7.87 (m, 2 H, 2''-H, 6''-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 21.4 (C-8''), 22.2 (C-2'), 69.1 (C-1'), 103.1 (C-2), 105.4 (C-7), 105.8 (C-4), 126.9 (C-6''), 128.5 (C-5''), 129.9 (C-1''), 130.3 (C-2''), 134.2 (C-4''), 135.9 (C-5), 138.4 (C-3''), 141.8 (C-6), 147.3 (C-7a), 152.5 (C-3a), 165.7 (C-7''); **R_f** = 0.47 (PE/EtOAc 80:20); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3121, 2991, 2926, 1725, 1614, 1589, 1527, 1508, 1487, 1449, 1422, 1390, 1377, 1338, 1307, 1278, 1260, 1201, 1142, 1112, 1072, 1031, 984, 929, 880, 861, 816, 804, 758, 745, 685, 672, 660; **HRMS** (ESI, positiv-Ion): m/z ber. für C₁₇H₁₅NO₆ [M+NH₄]⁺: 347.1238; gef. 347.1237; **Schmelzpunkt**: 103 °C; **UV/Vis-Absorption** (MeOH): λ_{max} (ε) = 288 nm (4714 ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹), 340 (5163).

Achirale Umkehrphasen-HPLC: t_R = 5.5 min; Säule: *HyperClone* 5 µ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*); Detektion (UV): 340 nm; Eluent: H₂O : MeOH (30:70); Flussrate: 1.0 mL/min; Säulentemperatur: 25 °C; Probenlösungsmittel: MeOH; Konzentration: 1 mM.

Methyl-2-[[[6-Nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)methyl]amino]benzoat (203)

Nach einer Vorschrift von Dr. *Claus Bier*^[312] wurde Anthranilsäuremethylester (200 μL , 1.54 mmol, 4.00 Äq.) in trockenem Aceton (4.00 mL, 96.0 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Nach der Zugabe von Kaliumcarbonat (243 mg, 1.73 mmol, 4.50 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 10 min gerührt. Anschließend wurde 6-Nitropiperonylbromid (**94**) (100 mg, 385 μmol , 1.00 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 5 d unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 80:20). Die Lösung wurde unter vermindertem Druck eingengt. Anschließend wurde der Rückstand in Ethylacetat gelöst und mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung (3 \times) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 90:10 \rightarrow 50:50) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 96 mg (0.29 mmol, 76 %) des gelben Feststoffes **203** erhalten.

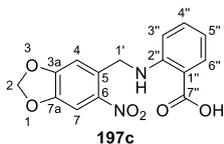


¹H-NMR (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 3.90 (s, 3 H, 8''-H), 4.83 (s, 2 H, 1'-H), 6.08 (s, 2 H, 2-H), 6.51 (dd, ³ $J_{3'',4''}$ = 8.6 Hz, ⁴ $J_{3'',5''}$ = 1.1 Hz, 1 H, 3''-H), 6.70 (ddd, ³ $J_{5'',6''}$ = 8.0 Hz, ³ $J_{5'',4''}$ = 7.1 Hz, ⁴ $J_{5'',3''}$ = 1.1 Hz, 1 H, 5''-H), 7.04 (s, 1 H, 4-H), 7.30 (ddd, ³ $J_{4'',3''}$ = 8.6 Hz, ³ $J_{4'',5''}$ = 7.1 Hz, ⁴ $J_{4'',6''}$ = 1.7 Hz, 1 H, 4''-H), 7.66 (s, 1 H, 7-H), 7.96 (dd, ³ $J_{6'',5''}$ = 8.0 Hz, ⁴ $J_{6'',4''}$ = 1.7 Hz, 1 H, 6''-H); ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 45.8 (C-1'), 52.0 (C-8''), 103.1 (C-2), 106.3 (C-7), 108.2 (C-4), 111.7 (C-1''), 112.5 (C-3''), 116.8 (C-5''), 131.9 (C-6''), 132.9 (C-5), 134.9 (C-4''), 142.0 (C-6), 147.3 (C-7a), 149.6 (C-2''), 152.9 (C-3a), 169.1 (C-7''); R_f = 0.47 (PE/EtOAc 80:20).

2-[[[6-Nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)methyl]amino]benzoesäure – NP-cAnthranilsäure (197c)

Nach einer Vorschrift von Dr. *Claus Bier*^[312] wurde Anthranilsäure (211 mg, 1.54 mmol, 4.00 Äq.) in trockenem Aceton (4.00 mL, 385 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Nach der Zugabe von Kaliumcarbonat (243 mg, 1.73 mmol, 4.50 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 10 min gerührt. Anschließend wurde 6-Nitropiperonylbromid (**94**) (100 mg, 385 μmol , 1.00 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 5 h unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (Toluol/EtOAc/MeOH/TFA 80:15:4:1), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Die Lösung wurde unter vermindertem Druck eingengt. Anschließend wurde der Rückstand in Ethylacetat gelöst und mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung (3 \times) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Die

säulenchromatographische Isolation (Toluol/EtOAc/MeOH/TFA 80:15:4:1) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 29 mg (92 μmol , 24 %) des farblosen Feststoffes **197c** erhalten.

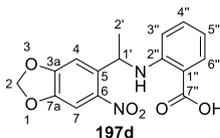


¹H-NMR (600 MHz, Aceton-*d*₆): δ [ppm] = 4.87 (d, $^3J_{1',\text{NH}}$ = 5.0 Hz, 2 H, 1'-H), 6.20 (s, 2 H, 2-H), 6.60–6.66 (m, 2 H, 3''-H, 5''-H), 7.06 (s, 1 H, 4-H), 7.31 (ddd, $^3J_{4',3''}$ = 7.7 Hz, $^3J_{4',5''}$ = 7.7 Hz, $^4J_{4',6''}$ = 1.7 Hz, 1 H, 4''-H), 7.64 (s, 1 H, 7-H), 7.96 (dd, $^3J_{6'',5''}$ = 8.0 Hz, $^4J_{6'',4'}$ = 1.7 Hz, 1 H, 6''-H), 8.49 (t, $^3J_{\text{NH},1'}$ = 5.0 Hz, 1 H, NH), 11.29 (brs, 1 H, 7''-OH); **¹³C-NMR** (151 MHz, Aceton-*d*₆): δ [ppm] = 45.2 (C-1'), 104.4 (C-2), 106.4 (C-7), 108.5 (C-4), 111.5 (C-1''), 112.4 (C-3''), 116.1 (C-5''), 133.0 (C-6''), 134.0 (C-5), 135.5 (C-4''), 142.9 (C-6), 148.1 (C-7a), 151.7 (C-2''), 153.5 (C-3a), 170.5 (C-7''); **R_f** = 0.64 (Tol/EtOAc/MeOH/TFA 80:15:4:1); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3369, 3068, 2906, 2552, 1663, 1617, 1579, 1515, 1498, 1479, 1446, 1431, 1372, 1313, 1286, 1237, 1163, 1121, 1036, 1008, 980, 866, 836, 818, 780, 767, 736, 699, 683, 659; **HRMS** (ESI, positiv-Ion): *m/z* ber. für C₁₅H₁₂N₂O₆ [M+H]⁺: 317.0768; gef. 317.0773; **Schmelzpunkt**: 211 °C (Zersetzung); **UV/Vis-Absorption** (MeOH): λ_{max} (ϵ) = 248 nm (7656 $\epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), 344 (4507).

Achirale Umkehrphasen-HPLC: t_{R} = 4.4 min; Säule: *HyperClone* 5 μ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*); Detektion (UV): 344 nm; Eluent: MeOH : NaP₁-Puffer (20 mM, pH = 7.4) (40:60); Flussrate: 1.0 mL/min; Säulentemperatur: 25 °C; Probenlösungsmittel: MeOH; Konzentration: 1 mM.

2-([1-(6-Nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)ethyl]amino)benzoesäure – NBE-cAnthranilsäure (**197d**)

Nach einer Vorschrift von Dr. *Claus Bier*^[312] wurde Anthranilsäure (**2b**) (400 mg, 2.92 mmol, 4.00 Äq.) in trockenem Aceton (8.00 mL, 365 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Nach der Zugabe von Kaliumcarbonat (460 mg, 3.28 mmol, 4.50 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 10 min gerührt. Anschließend wurde Bromid **95** (200 mg, 730 μmol , 1.00 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 24 h unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (Toluol/EtOAc/MeOH/TFA 80:15:4:1). Die Lösung wurde unter vermindertem Druck eingengt. Anschließend wurde der Rückstand in Ethylacetat gelöst und mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (3 \times) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (Toluol/EtOAc/MeOH/TFA 80:15:4:1) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 90 mg (0.27 mmol, 37 %) des gelben Feststoffes **197d** erhalten.

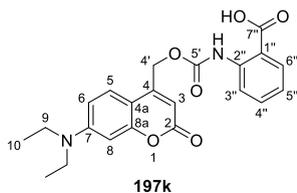


¹H-NMR (600 MHz, Aceton-*d*₆): δ [ppm] = 1.62 (d, ³*J*_{2',1'} = 6.6 Hz, 3 H, 2'-H), 5.26–5.33 (m, 1 H, 1'-H), 6.16 (d, ²*J*_{2a,2b} = 1.0 Hz, 1 H, 2-H_a), 6.19 (d, ²*J*_{2b,2a} = 1.0 Hz, 1 H, 2-H_b), 6.38 (dd, ³*J*_{3'',4''} = 8.5 Hz, ⁴*J*_{3'',5''} = 1.0 Hz, 1 H, 3''-H), 6.61 (ddd, ³*J*_{5'',6''} = 8.0 Hz, ³*J*_{5'',4''} = 7.1 Hz, ⁴*J*_{5'',3''} = 1.0 Hz, 1 H, 5''-H), 7.08 (s, 1 H, 4-H), 7.24 (ddd, ³*J*_{4'',3''} = 8.5 Hz, ³*J*_{4'',5''} = 7.1 Hz, ⁴*J*_{4'',6} = 1.7 Hz, 1 H, 4''-H), 7.53 (s, 1 H, 7-H), 7.94 (dd, ³*J*_{6'',5''} = 8.0 Hz, ⁴*J*_{6'',4''} = 1.7 Hz, 1 H, 6''-H), 8.46 (d, ³*J*_{NH,1'} = 5.4 Hz, 1 H, NH); **¹³C-NMR** (151 MHz, Aceton-*d*₆): δ [ppm] = 23.9 (C-2'), 49.3 (C-1'), 104.4 (C-2), 105.8 (C-7), 106.5 (C-4), 111.4 (C-1''), 112.8 (C-3''), 116.3 (C-5''), 132.9 (C-6''), 135.5 (C-4''), 138.8 (C-5), 143.5 (C-6), 148.1 (C-7a), 150.6 (C-2''), 153.6 (C-3a), 170.7 (C-7''); **R_f** = 0.26 (Toluol/EtOAc/MeOH/TFA 80:15:4:1); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3368, 2917, 1739, 1664, 1617, 1578, 1515, 1498, 1482, 1457, 1443, 1412, 1381, 1330, 1246, 1186, 1168, 1144, 1031, 993, 926, 875, 856, 843, 819, 795, 745, 700, 666, 615, 566, 511; **MS** (APCI, positiv-Ion): *m/z* (%) = 331.2 (100) [M+H]⁺; **Schmelzpunkt**: 274.1 °C (Zersetzung); **UV/Vis-Absorption** (MeOH): λ_{max} (ε) = 246 nm (8422 ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹), 342 (4478).

Achirale Umkehrphasen-HPLC: *t_R* = 5.8 min; Säule: *HyperClone* 5 μ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*); Detektion (UV): 342 nm; Eluent: MeOH : NaP_i-Puffer (20 mM, pH = 7.4) (40:60); Flussrate: 1.0 mL/min; Säulentemperatur: 25 °C; Probenlösungsmittel: MeOH; Konzentration: 1 mM.

2-[[[7-(Diethylamino)-2-oxo-2*H*-chromen-4-yl]methoxy]carbonyl]amino]benzoesäure – DC-cAnthranilsäure (**197k**)

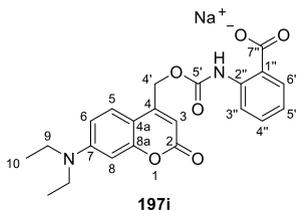
Cumarin **110** (1.00 g, 2.42 mmol, 1.00 Äq.) wurde in einem sekurierten Schlenkkolben in trockenem Dichlormethan (20.0 mL, 121 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Nach der Zugabe von Anthranilsäure (**2b**) (665 mg, 4.85 mmol, 2.00 Äq.) und DMAP (332 mg, 2.72 mmol, 1.12 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 20 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 60:40), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Anschließend wurde die Lösung mit CH₂Cl₂ verdünnt und nachfolgend mit Wasser (1×) und 1 M HCl-Lösung (3×) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingengt und auf Kieselgel aufgezogen. Die säulenchromatographische Isolation (EtOAc → EtOAc/MeOH 80:20) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 459 mg (1.12 mmol, 46 %) des gelben Feststoffes **197k** erhalten.



¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.12 (t, ³*J*_{10,9} = 7.0 Hz, 6 H, 10-H), 3.43 (q, ³*J*_{9,10} = 7.0 Hz, 4 H, 9-H), 5.38 (s, 2 H, 4'-H), 6.02 (s, 1 H, 3-H), 6.55 (d, ⁴*J*_{8,6} = 2.5 Hz, 1 H, 8-H), 6.71 (dd, ³*J*_{6,5} = 9.1 Hz, ⁴*J*_{6,8} = 2.5 Hz, 1 H, 6-H), 7.15 (ddd, ³*J*_{5'',6''} = 7.9 Hz, ³*J*_{5'',4''} = 7.2 Hz, ⁴*J*_{5'',3''} = 1.0 Hz, 1 H, 5''-H), 7.50 (d, ³*J*_{5,6} = 9.1 Hz, 1 H, 5-H), 7.62 (ddd, ³*J*_{4'',3''} = 8.4 Hz, ³*J*_{4'',5''} = 7.2 Hz, ⁴*J*_{4'',6} = 1.6 Hz., 1 H, 4''-H), 7.99 (dd, ³*J*_{6'',5''} = 7.9 Hz, ⁴*J*_{6'',4''} = 1.6 Hz, 1 H, 6''-H), 8.24 (dd, ³*J*_{3'',4''} = 8.4 Hz, ⁴*J*_{3'',5''} = 1.0 Hz, 1 H, 3''-H), 10.93 (s, 1 H, NH), 13.72 (s, 1 H, 7''-OH); **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 12.3 (C-10), 44.0 (C-9), 61.9 (C-4'), 96.9 (C-8), 105.0 (C-3), 105.2 (C-4a), 108.8 (C-6), 116.2 (C-1''), 118.5 (C-3''), 122.3 (C-5''), 125.4 (C-5), 131.3 (C-6''), 134.3 (C-4''), 140.5 (C-2''), 150.5 (C-7), 150.8 (C-4), 152.1 (C-5'), 155.8 (C-8a), 160.6 (C-2), 169.6 (C-7''); **R_f** = 0.43 (EtOAc/MeOH 90:10); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2966, 2920, 2853, 1731, 1672, 1591, 1516, 1442, 1387, 1352, 1294, 1213, 1145, 1104, 1084, 1042, 862, 818, 797, 752, 699, 678, 529, 456; **HRMS** (ESI): *m/z* ber. für C₂₂H₂₃N₂O₆⁺ [M+H]⁺: 411.1551; gef. 411.1554; **Schmelzpunkt**: 199–202 °C.

Natrium-2-([7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl]methoxy)-carbonylamino]benzoat – DC-cAnthranilsäure⁺ (197i)

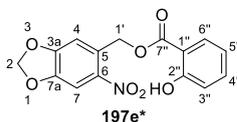
In Anlehnung an eine Vorschrift von Gilbert *et al.*^[411] wurde Coumarin **197k** (90 mg, 0.22 mmol, 1.0 Äq.) in Acetonitril (0.10 L, 0.73 mM) vorgelöst, bevor Wasser (0.20 L) hinzugegeben wurde. Nach der Zugabe von Dowex 50WX4 (Na⁺-Form) wurde die Reaktionslösung für 1 h gerührt. Anschließend wurde die Lösung filtriert und mit Acetonitril und Wasser nachgespült. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt und danach lyophilisiert. Es wurden 36 mg (83 μmol, 38 %) des gelben Feststoffes **197i** erhalten.



¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.12 (t, ³*J*_{10,9} = 7.0 Hz, 6 H, 10-H), 3.43 (q, ³*J*_{9,10} = 7.0 Hz, 4 H, 9-H), 5.36 (s, 2 H, 4'-H), 6.00 (s, 1 H, 3-H), 6.55 (d, ⁴*J*_{8,6} = 2.5 Hz, 1 H, 8-H), 6.71 (dd, ³*J*_{6,5} = 9.1 Hz, ⁴*J*_{6,8} = 2.5 Hz, 1 H, 6-H), 7.07 (ddd, ³*J*_{5'',6''} = 7.9 Hz, ³*J*_{5'',4''} = 7.2 Hz, ⁴*J*_{5'',3''} = 1.0 Hz, 1 H, 5''-H), 7.45–7.55 (m, 2 H, 5-H, 4''-H), 7.99 (dd, ³*J*_{6'',5''} = 7.9 Hz, ⁴*J*_{6'',4''} = 1.6 Hz, 1 H, 6''-H), 8.20 (dd, ³*J*_{3'',4''} =

8.4 Hz, $^4J_{3'',5''} = 1.0$ Hz, 1 H, 3''-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 12.3 (C-10), 44.0 (C-9), 61.6 (C-4'), 96.9 (C-8), 105.0 (C-3), 105.3 (C-4a), 108.8 (C-6), 117.8 (C-3''), 119.2 (C-1''), 121.8 (C-5''), 125.4 (C-5), 131.3 (C-6''), 132.8 (C-4''), 140.5 (C-2''), 150.5 (C-7), 151.1 (C-4), 152.2 (C-5'), 155.8 (C-8a), 160.7 (C-2), 169.7 (C-7''); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2970, 1740, 1589, 1515, 1423, 1376, 1295, 1216, 1143, 1097, 1080, 1012, 841, 817, 760, 666, 565, 527, 478; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{NaO}_6^+$ [$\text{M-Na}+2\text{H}$] $^+$: 411.1551; gef. 411.1552; **Schmelzpunkt**: 204.2 °C; **UV/Vis-Absorption** [NaP_i -Puffer (20 mM, pH = 7.4)/MeOH 9:1]: λ_{max} (ϵ) = 248 nm ($5421 \text{ } \epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 390 (2946). **Achirale Umkehrphasen-HPLC**: $t_R = 7.0$ min; Säule: *HyperClone* 5 μ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*); Detektion (UV): 390 nm; Eluent: MeOH : NaP_i -Puffer (20 mM, pH = 7.4) (50:50); Flussrate: 1.0 mL/min; Säulentemperatur: 25 °C; Probenlösungsmittel: NaP_i -Puffer (20 mM, pH = 7.4)/MeOH 9:1; Konzentration: 1 mM.

(6-Nitropiperonyl)salicylat – NP-cSalicylsäure* (197e*)

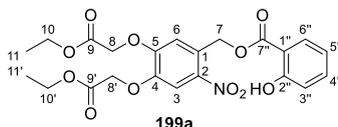


$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.74 (s, 2 H, 1'-H), 6.15 (s, 2 H, 2-H), 6.93 (ddd, $^3J_{5'',6''} = 7.6$ Hz, $^3J_{5'',4''} = 7.6$ Hz, $^4J_{5'',3''} = 1.1$ Hz, 1 H, 5''-H), 7.00 (dd, $^3J_{3'',4''} = 8.5$ Hz, $^4J_{3'',5''} = 1.1$ Hz, 1 H, 3''-H), 7.05 (s, 1 H, 4-H), 7.50 (ddd, $^3J_{4'',3''} = 8.5$ Hz, $^3J_{4'',5''} = 7.6$ Hz, $^4J_{4'',6''} = 1.7$ Hz, 1 H, 4''-H), 7.67 (s, 1 H, 7-H), 7.91 (dd, $^3J_{6'',5''} = 7.6$ Hz, $^4J_{6'',4''} = 1.7$ Hz, 1 H, 6''-H), 10.58 (s, 1 H, OH); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 63.9 (C-1'), 103.4 (C-2), 106.2 (C-7), 107.7 (C-4), 112.0 (C-1''), 118.0 (C-3''), 119.5 (C-5''), 129.2 (C-5), 129.9 (C-6''), 136.4 (C-4''), 141.7 (C-6), 147.8 (C-7a), 152.7 (C-3a), 162.0 (C-2''), 169.6 (C-7''); $R_f = 0.61$ (PE/EtOAc 50:50); **UV/Vis-Absorption** (MeOH): λ_{max} (ϵ) = 240 nm ($21475 \text{ } \epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 308 (7533).

Achirale Umkehrphasen-HPLC: $t_R = 12.0$ min; Säule: *HyperClone* 5 μ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*); Detektion (UV): 308 nm; Eluent: MeOH : H_2O (60:40); Flussrate: 1.0 mL/min; Säulentemperatur: 25 °C; Probenlösungsmittel: MeOH; Konzentration: 1 mM.

4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzylsalicylat (199a)

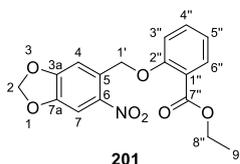
Salicylsäure (**2a**) (99 mg, 0.71 mmol, 3.0 Äq.) wurde in trockenem Aceton (3.0 mL, 0.24 M) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Nach der Zugabe von Kaliumcarbonat (55 mg, 0.39 mmol, 1.6 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 10 min gerührt. Anschließend wurde Bromid **100** (0.10 g, 0.24 mmol, 1.0 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 3 d bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels NMR. Die Lösung wurde unter vermindertem Druck eingeeengt. Anschließend wurde der Rückstand mit 1 M HCl-Lösung überschichtet und mit Ethylacetat (3×) extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 65:35) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 49 mg (0.10 mmol, 43 %) des farblosen Feststoffes **199a** erhalten. Darüber hinaus wurden 30 mg (37 µmol, 15 %) des Nebenproduktes **199b** isoliert.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.22 (t, ³J_{11,10} = 7.1 Hz, 3 H, 11-H), 1.32 (t, ³J_{11',10'} = 7.1 Hz, 3 H, 11'-H), 4.17 (q, ³J_{10,11} = 7.1 Hz, 2 H, 10-H), 4.29 (q, ³J_{10',11'} = 7.1 Hz, 2 H, 10'-H), 4.79 (s, 2 H, 8'-H), 4.80 (s, 2 H, 8-H), 5.76 (s, 2 H, 7-H), 6.93 (ddd, ³J_{5',4''} = 7.5 Hz, ³J_{5'',6''} = 7.5 Hz, ⁴J_{5'',3''} = 1.0 Hz, 1 H, 5''-H), 7.01 (dd, ³J_{3'',4''} = 8.4 Hz, ⁴J_{3'',5''} = 1.0 Hz, 1 H, 3''-H), 7.06 (s, 1 H, 6-H), 7.50 (ddd, ³J_{4'',3''} = 8.4 Hz, ³J_{4'',5''} = 7.5 Hz, ⁴J_{4'',6''} = 1.6 Hz, 1 H, 4''-H), 7.75 (s, 1 H, 3-H), 7.93 (dd, ³J_{6'',5''} = 7.5 Hz, ⁴J_{6'',4''} = 1.6 Hz, 1 H, 6''-H), 10.57 (s, 1 H, 7''-OH); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.2 (C-11), 14.3 (C-11'), 61.9, 61.9 (C-10, C-10'), 63.6 (C-7), 66.5, 66.5 (C-8, C-8'), 112.0, 112.0 (C-3, C-1''), 113.8 (C-6), 118.0 (C-3''), 119.6 (C-5''), 127.6 (C-1), 129.8 (C-6''), 136.4 (C-4''), 140.8 (C-2), 147.2 (C-4), 152.4 (C-5), 162.1 (C-2''), 167.8 (C-9), 167.9 (C-9'); **R_f** = 0.46 (PE/EtOAc 65:35); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3215, 3090, 2994, 1743, 1673, 1615, 1583, 1511, 1484, 1446, 1421, 1378, 1340, 1323, 1290, 1250, 1228, 1196, 1174, 1157, 1140, 1088, 1072, 1033, 1021, 969, 886, 867, 858, 844, 796, 758, 738, 705; **MS** (ESI, positiv-Ion): m/z (%) = 500.2 (100) [M+Na]⁺, 516.2 (40) [M+K]⁺; **Schmelzpunkt**: 106 °C.

Ethyl-2-O-(6-Nitropiperonyl)salicylat (201)

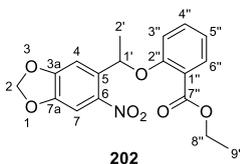
Salicylsäureethylester (1.36 mL, 9.23 mmol, 4.00 Äq.) wurde in trockenem Aceton (12.0 mL, 769 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Nach der Zugabe von Kaliumcarbonat (1.46 g, 10.4 mmol, 4.50 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 10 min gerührt. Anschließend wurde 6-Nitropiperonylbromid (**94**) (600 mg, 2.31 mmol, 1.00 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 24 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 90:10). Um vollständigen Umsatz zu erreichen, wurde die Reaktionslösung auf 50 °C erhitzt und für 5 h bei 50 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Lösung unter vermindertem Druck eingeengt. Anschließend wurde der Rückstand in Ethylacetat gelöst und mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (3×) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck eingeengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 90:10 → 70:30) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 315 mg (912 μmol, 40 %) des gelben Feststoffes **201** erhalten.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.41 (t, ³J_{9'',8''} = 7.2 Hz, 3 H, 9''-H), 4.41 (q, ³J_{8'',9''} = 7.2 Hz, 2 H, 8''-H), 5.47 (s, 2 H, 1'-H), 6.13 (s, 2 H, 2-H), 7.03 (ddd, ³J_{5'',6''} = 7.6 Hz, ³J_{5'',4''} = 7.6 Hz, ⁴J_{5'',3''} = 1.0 Hz, 1 H, 5''-H), 7.08 (dd, ³J_{3'',4''} = 8.5 Hz, ⁴J_{3'',5''} = 1.0 Hz, 1 H, 3''-H), 7.49 (ddd, ³J_{4'',3''} = 8.5 Hz, ³J_{4'',5''} = 7.4 Hz, ⁴J_{4'',6''} = 1.8 Hz, 1 H, 4''-H), 7.68 (s, 1 H, 7-H), 7.82 (s, 1 H, 4-H), 7.89 (dd, ³J_{6'',5''} = 7.6 Hz, ⁴J_{6'',4''} = 1.8 Hz, 1 H, 6''-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.5 (C-9''), 61.1 (C-8''), 67.8 (C-1'), 103.2 (C-2), 105.5 (C-7), 107.9 (C-4), 113.4 (C-3''), 121.0 (C-5''), 132.3 (C-6''), 133.9 (C-4''), 140.4 (C-6), 147.2 (C-7a), 153.3 (C-3a), 157.5 (C-2''), 166.1 (C-7''); **R_f** = 0.24 (PE/EtOAc 90:10); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3074, 2992, 2918, 1699, 1617, 1596, 1581, 1505, 1484, 1437, 1390, 1318, 1257, 1239, 1160, 1076, 1034, 933, 897, 860, 829, 815, 752, 698, 666, 622, 509; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₇H₁₆O₇N⁺ [M+H]⁺: 346.0921; gef. 346.0922; **Schmelzpunkt**: 153 °C.

Ethyl-2-[[1-(6-Nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)ethyl]hydroxy]benzoat (202)

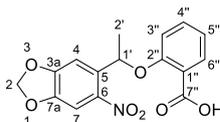
Salicylsäureethylester (215 μL , 1.46 mmol, 4.00 Äq.) wurde in trockenem Aceton (4.00 mL, 365 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Nach der Zugabe von Kaliumcarbonat (230 mg, 1.64 mmol, 4.50 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 10 min gerührt. Anschließend wurde Bromid **95** (100 mg, 365 μmol , 1.00 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 5 d bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 90:10). Um vollständigen Umsatz zu erreichen, wurde die Reaktionslösung auf 50 °C erhitzt und für 24 h bei 50 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Lösung unter vermindertem Druck eingengt. Anschließend wurde der Rückstand in Ethylacetat gelöst und mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung (3 \times) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 90:10) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 95 mg (0.26 mmol, 74 %) des gelben Feststoffes **202** erhalten.



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.43 (t, $^3J_{9'',8''} = 7.1$ Hz, 3 H, 9''-H), 1.70 (d, $^3J_{2',1'} = 6.2$ Hz, 3 H, 2'-H), 4.41 (q, $^3J_{8'',9''} = 7.1$ Hz, 2 H, 8''-H), 6.06 (d, $^2J_{2a,2b} = 1.2$ Hz, 1 H, 2-H_a), 6.09 (d, $^2J_{2b,2a} = 1.2$ Hz, 1 H, 2-H_b), 6.19 (q, $^3J_{1',2'} = 6.2$ Hz, 1 H, 1'-H), 6.72 (dd, $^3J_{3'',4''} = 8.4$ Hz, $^4J_{3'',5''} = 1.0$ Hz, 1 H, 3''-H), 6.93 (ddd, $^3J_{5'',4''} = 7.6$ Hz, $^3J_{5'',6''} = 7.6$ Hz, $^4J_{5'',3''} = 1.0$ Hz, 1 H, 5''-H), 7.30 (ddd, $^3J_{4'',3''} = 7.6$ Hz, $^3J_{4'',5''} = 7.6$ Hz, $^4J_{4'',6''} = 1.8$ Hz, 1 H, 4''-H), 7.45 (s, 1 H, 4-H), 7.54 (s, 1 H, 7-H), 7.76 (dd, $^3J_{5'',6''} = 7.6$ Hz, $^4J_{6'',4''} = 1.8$ Hz, 1 H, 6''-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.5 (C-9''), 23.3 (C-2), 61.0 (C-8''), 72.1 (C-1'), 103.1 (C-2), 105.3 (C-7), 106.9 (C-4), 114.0 (C-3''), 120.8 (C-5''), 121.6 (C-1''), 131.8 (C-6''), 133.3 (C-4''), 137.0 (C-5), 141.3 (C-6), 147.4 (C-7a), 153.1 (C-3a), 156.4 (C-2''), 166.6 (C-7''); $R_f = 0.32$ (PE/EtOAc 90:10) **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2987, 2916, 1717, 1597, 1522, 1479, 1448, 1371, 1321, 1281, 1241, 1137, 1075, 1029, 994, 931, 889, 819, 761, 703, 667, 527; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_7\text{NNa}^+$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 382.0897; gef. 382.0898; **Schmelzpunkt**: 77 °C

2-[[1-(6-Nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)ethyl]hydroxy]benzoesäure – NBE-cSalicylsäure (197g)

Zu einer Lösung von Salicylat **202** (50 mg, 0.14 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH (4.2 mL, 33 mM) wurde eine 0.2 M KOH-Lösung (4.2 mL, 0.83 mmol, 6.0 Äq.) gegeben. Die Reaktionslösung wurde auf 60 °C erhitzt und für 4 h bei 60 °C unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 80:20), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Anschließend wurde 1 M HCl-Lösung hinzugegeben und der entstehende Niederschlag wurde abfiltriert, gewaschen und lyophilisiert. Es wurden 8 mg (0.02 mmol, 17 %) des Feststoffes **197g** erhalten.

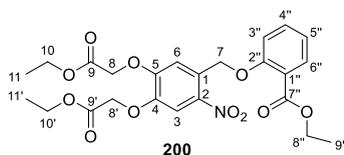
**197g**

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.85 (d, ³J_{2',1'} = 6.2 Hz, 3 H, 2'-H), 6.10 (d, ²J_{2a,2b} = 1.2 Hz, 1 H, 2-H_a), 6.13 (d, ²J_{2b,2a} = 1.2 Hz, 1 H, 2-H_b), 6.35 (q, ³J_{1',2'} = 6.2 Hz, 1 H, 1'-H), 6.69 (d, ³J_{3'',4''} = 8.4 Hz, ⁴J_{3'',5''} = 0.8 Hz, 1 H, 3''-H), 7.07 (s, 1 H, 4-H), 7.10 (ddd, ³J_{5'',6''} = 7.9 Hz, ³J_{5'',4''} = 7.5 Hz, ⁴J_{5'',3''} = 0.8 Hz, 1 H, 5''-H), 7.39 (ddd, ³J_{4'',5''} = 7.5 Hz, ³J_{4'',3''} = 7.5 Hz, ⁴J_{4'',6''} = 1.8 Hz, 1 H, 4''-H), 7.60 (s, 1 H, 7-H), 8.17 (dd, ³J_{6'',5''} = 7.9 Hz, ⁴J_{6'',4''} = 1.8 Hz, 1 H, 6''-H), 10.76 (brs, 1 H, 7''-OH); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 23.6 (C-2'), 74.5 (C-1'), 103.5 (C-2), 105.7 (C-4), 105.9 (C-7), 113.8 (C-3''), 118.4 (C-1''), 122.7 (C5''), 134.2 (C-6''), 134.5 (C-5), 135.2 (C-4''), 141.3 (C-6), 148.1 (C-7a), 153.5 (C-3a), 156.1 (C-2''), 165.5 (C-7''); **R_f** = 0.13 (PE/EtOAc 80:20) **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3080, 2969, 2916, 1684, 1600, 1506, 1485, 1421, 1311, 1245, 1164, 1085, 1068, 1041, 988, 898, 820, 755, 657, 622, 566; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₆H₁₃O₇NNa⁺ [M+Na]⁺: 354.0584; gef. 354.0586; **Schmelzpunkt**: 175 °C; **UV/Vis-Absorption** (MeOH): λ_{max} (ε) = 290 nm (4914 ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹), 344 (4332).

Achirale Umkehrphasen-HPLC: t_R = 3.2 min; Säule: *HyperClone* 5 μ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*); Detektion (UV): 344 nm; Eluent: MeOH : NaP_i-Puffer (20 mM, pH = 7.4) (40:60); Flussrate: 1.0 mL/min; Säulentemperatur: 25 °C; Probenlösungsmittel: MeOH; Konzentration: 1 mM.

Ethyl-2-O-[4,5-Bis(ethoxycarbonylmethoxy)-2-nitrobenzyl]salicylat (200)

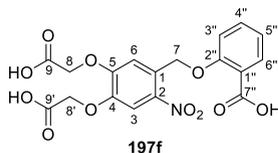
Salicylsäureethylester (105 μL , 714 μL , 3.00 Äq.) wurde in trockenem Aceton (1.00 mL, 71.4 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Nach der Zugabe von Kaliumcarbonat (56 mg, 0.40 mmol, 1.6 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 10 min gerührt. Anschließend wurde Bromid **100** (100 mg, 238 μmol , 1.00 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 2 d bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 80:20). Die Lösung wurde unter vermindertem Druck eingeeengt. Anschließend wurde der Rückstand in Wasser gelöst und mit Ethylacetat (3 \times) extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung (3 \times) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 80:20 \rightarrow EtOAc) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 110 mg (218 μmol , 92 %) des farblosen Feststoffes **200** erhalten.



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.25 (t, $^3J_{11,10} = 7.1$ Hz, 3 H, 11-H), 1.31 (t, $^3J_{11',10'} = 7.1$ Hz, 3 H, 11'-H), 1.40 (t, $^3J_{9'',8''} = 7.1$ Hz, 3 H, 9''-H), 4.23 (q, $^3J_{10,11} = 7.1$ Hz, 2 H, 10-H), 4.29 (q, $^3J_{10',11'} = 7.1$ Hz, 2 H, 10'-H), 4.38 (q, $^3J_{8'',9''} = 7.1$ Hz, 2 H, 8''-H), 4.81 (s, 2 H, 8'-H), 5.05 (s, 2 H, 8-H), 5.52 (s, 2 H, 7-H), 7.03 (dd, $^3J_{5'',4''} = 7.5$ Hz, $^3J_{5'',6''} = 7.5$ Hz, 1 H, 5''-H), 7.14 (d, $^3J_{3'',4''} = 8.4$ Hz, 1 H, 3''-H), 7.53 (dd, $^3J_{4'',3''} = 8.4$ Hz, $^3J_{4'',5''} = 7.5$ Hz, 1 H, 4''-H), 7.82 (s, 1 H, 3-H), 7.93 (d, $^3J_{6'',5''} = 7.5$ Hz, 1 H, 6''-H), 8.23 (s, 1 H, 6-H); **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.2 (C-11), 14.3 (C-11'), 14.5 (C-9''), 60.7 (C-8''), 61.6 (C-10), 61.7 (C-10'), 65.8 (C-8), 66.8 (C-8'), 67.3 (C-7), 111.9 (C-3), 112.8 (C-6), 113.2 (C-3''), 119.8 (C-1''), 120.8 (C-5''), 130.8 (C-1), 132.1 (C-6''), 134.2 (C-4''), 138.9 (C-2), 146.1 (C-4), 153.4 (C-5), 158.0 (C-2''), 165.2 (C-7''), 168.0 (C-9), 168.3 (C-9'); $R_f = 0.23$ (PE/EtOAc 70:30); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3104, 2992, 1771, 1743, 1713, 1582, 1524, 1488, 1449, 1425, 1377, 1329, 1291, 1242, 1195, 1112, 1080, 1020, 895, 859, 826, 803, 753, 700, 683, 661; **HRMS** (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{O}_{11}\text{NNa}^+$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 528.1476; gef. 528.1476; **Schmelzpunkt**: 133 $^\circ\text{C}$.

2-O-[4,5-Bis(carboxymethoxy)-2-nitrobenzyl]salicylsäure – BC-cSalicylsäure (197f)

Zu einer Lösung von Salicylat **200** (200 mg, 396 μmol , 1.00 Äq.) in MeOH (12.0 mL, 33.0 mM) wurde eine 0.2 M KOH-Lösung (11.9 mL, 2.37 mmol, 6.00 Äq.) gegeben. Die Reaktionslösung wurde auf 60 °C erhitzt und für 4 h bei 60 °C unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels NMR, welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Anschließend wurde 1 M HCl-Lösung hinzugegeben und der entstehende Niederschlag wurde abfiltriert, gewaschen und lyophilisiert. Es wurden 153 mg (363 μmol , 92 %) des farblosen Feststoffes **197f** erhalten.

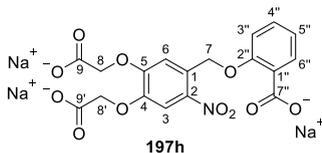


¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 4.89 (s, 2 H, 8'-H), 4.91 (s, 2 H, 8-H), 5.49 (s, 2 H, 7-H), 7.06 (dd, ³*J*_{5'',6''} = 7.0 Hz, ³*J*_{5'',4''} = 6.9 Hz, 1 H, 5''-H), 7.22 (d, ³*J*_{3'',4''} = 7.9 Hz, 1 H, 3''-H), 7.56 (dd, ³*J*_{4'',3''} = 7.9 Hz, ³*J*_{4'',5''} = 6.9 Hz, 1 H, 4''-H), 7.72 (s, 1 H, 3-H), 7.79 (d, ³*J*_{6'',5''} = 7.0 Hz, 1 H, 6''-H), 7.80 (s, 1 H, 6-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 65.0 (C-8), 65.5 (C-8'), 66.7 (C-7), 110.4 (C-3), 112.2 (C-6), 113.7 (C-3''), 120.7 (C-1''), 120.7 (C-5''), 128.7 (C-1), 131.6 (C-6''), 133.7 (C-4''), 139.0 (C-2), 145.9 (C-4), 152.2 (C-5), 157.1 (C-2''), 166.9 (C-7''), 169.1 (C-9), 169.8 (C-9'); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2923, 1708, 1801, 1585, 1525, 1490, 1428, 1380, 1331, 1285, 1245, 1214, 1079, 1027, 900, 849, 821, 750, 698, 671; **HRMS** (ESI): *m/z* ber. für C₁₈H₁₅O₁₁NK⁺ [M+K]⁺: 460.0276; gef. 460.0276; **Schmelzpunkt**: 264 °C (Zersetzung); **UV/Vis-Absorption** [NaPi-Puffer (100 mM, pH = 7.4)]: λ_{max} (ϵ) = 290 nm (5027 $\epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), 346 (5852).

Achirale Umkehrphasen-HPLC: *t_R* = 9.6 min; Säule: *HyperClone* 5 μ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*); Detektion (UV): 346 nm; Eluent: MeOH : NaPi-Puffer (100 mM, pH = 7.4) (15:85); Flussrate: 0.5 mL/min; Säulentemperatur: 25 °C; Probenlösungsmittel: NaPi-Puffer (100 mM, pH = 7.4); Konzentration: 0.5 mM.

Trinatrium-2-O-[4,5-Bis(carboxymethoxy)-2-nitrobenzyl]salicylat – BC-cSalicylsäure⁺ (197h)

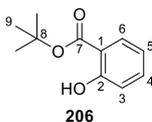
Zu einer Lösung von Salicylsäure **197f** (60 mg, 0.14 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH (2.5 mL, 56 mM) wurde eine 0.20 M NaOH-Lösung (2.1 mL, 0.43 mmol, 3.0 Äq.) gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 5 min gerührt und anschließend über Nacht lyophilisiert. Es wurden 69 mg (0.14 mmol, quant.) des Feststoffes **197h** erhalten.



¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ [ppm] = 4.56 (s, 2 H, 8'-H), 4.62 (s, 2 H, 8-H), 5.43 (s, 2 H, 7-H), 7.03 (d, ³J_{3'',4''} = 8.2 Hz, 1 H, 3''-H), 7.06 (ddd, ³J_{5'',6''} = 7.5 Hz, ³J_{5'',4''} = 7.4 Hz, ⁴J_{5'',3''} = 1.0 Hz, 1 H, 5''-H), 7.36 (ddd, ³J_{4'',3''} = 8.2 Hz, ³J_{4'',5''} = 7.4 Hz, ⁴J_{4'',6''} = 1.8 Hz, 1 H, 4''-H), 7.41 (s, 1 H, 3-H), 7.46 (dd, ³J_{6'',5''} = 7.5 Hz, ³J_{6'',4''} = 1.8 Hz, 1 H, 6''-H), 7.74 (s, 1 H, 6-H); ¹³C-NMR (151 MHz, D₂O): δ [ppm] = 67.3, 67.3 (C-8, C-8'), 67.6 (C-7), 109.4 (C-3), 111.4 (C-6), 113.8 (C-3''), 121.4 (C-5''), 128.3 (C-6''), 129.5 (C-1), 129.7 (C-4''), 130.2 (C-1''), 139.0 (C-2), 145.7 (C-4), 152.1 (C-5), 154.1 (C-2''), 174.9 (C-9), 175.4 (C-9'), 176.0 (C-7''); IR (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3216, 1603, 1553, 1521, 1425, 1382, 1329, 1273, 1214, 1100, 1070, 1020, 855, 818, 753, 695, 663; **Schmelzpunkt**: 245 °C (Zersetzung).

tert-Butyl-2-Hydroxybenzoat (206)

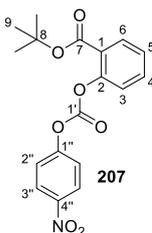
Nach einer Vorschrift von Kluger *et al.*^[412] wurden Salicylsäure (**2a**) (3.00 g, 21.7 mmol, 1.00 Äq.) und DMAP (107 mg, 876 µmol, 4.00 mol%) in trockenem *tert*-Butylalkohol (75.0 mL, 289 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. DCC (4.84 g, 23.5 mmol, 1.08 Äq.) gelöst in trockenem THF (30.0 mL, 783 mM) wurde über 30 min tropfenweise zur Lösung hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 70:30), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Die Reaktionslösung wurde unter vermindertem Druck eingeeengt und der Rückstand wurde in Et₂O gelöst. Anschließend wurde portionsweise Oxalsäure hinzugegeben (3.17 g, 35.3 mmol) und der entstehende Niederschlag wurde abfiltriert. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Die säulenchromatographische Isolation (*n*-Pentan/CH₂Cl₂ 60:40) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 2.22 g (11.4 mmol, 53 %) des farblosen Öles **206** erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den in der Literatur genannten überein.^[412]



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.61 (s, 9 H, 9-H), 6.85 (ddd, ³J_{5,6} = 8.0 Hz, ³J_{5,4} = 7.2 Hz, ⁴J_{5,3} = 1.2 Hz, 1 H, 5-H), 6.95 (dd, ³J_{3,4} = 8.4 Hz, ⁴J_{3,5} = 1.2 Hz, 1 H, 3-H), 7.42 (ddd, ³J_{4,3} = 8.4 Hz, ³J_{4,5} = 7.2 Hz, ⁴J_{4,6} = 1.7 Hz, 1 H, 4-H), 7.78 (dd, ³J_{6,5} = 8.0 Hz, ⁴J_{6,4} = 1.7 Hz, 1 H, 6-H), 11.04 (s, 1 H, 2-OH); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 28.4 (C-9), 82.9 (C-8), 114.0 (C-1), 117.6 (C-3), 119.0 (C-5), 130.3 (C-6), 135.3 (C-4), 161.9 (C-2), 170.0 (C-7); **R_f** = 0.70 (*n*-Pentan/CH₂Cl₂ 60:40); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3151, 2980, 1667, 1613, 1586, 1477, 1370, 1331, 1307, 1247, 1217, 1170, 1149, 1136, 1090, 1033, 879, 845, 821, 802, 754, 700, 667, 564, 531, 516; **HRMS** (ESI): *m/z* ber. für C₁₁H₁₄NaO₃⁺ [M+Na]⁺: 217.0835; gef. 217.0835.

tert-Butyl-2-[(4-nitrophenoxycarbonyl)oxy]benzoat (207)

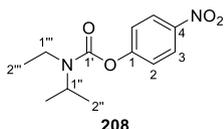
Das Benzoessäure-Derivat **206** (300 mg, 1.54 mmol, 1.00 Äq.) wurde in trockenem CH₂Cl₂ (3.80 mL, 405 mM) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. DIPEA (671 µL, 3.85 mmol, 2.50 Äq.) wurde hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 15 min gerührt. Anschließend wurde 4-Nitrophenylchloroformiat (776 mg, 3.85 mmol, 2.50 Äq.) portionsweise hinzugefügt und die Reaktionslösung wurde für 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (*n*-Pentan/CH₂Cl₂ 50:50). Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktionslösung mit CH₂Cl₂ (5 mL) verdünnt, mit 1 M HCl (20 mL) und gesättigter NaHCO₃-Lösung (3×20 mL) gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde zweifach säulenchromatographisch über Kieselgel (1. PE/EtOAc 90:10; 2. *n*-Pentan/CH₂Cl₂ 50:50) aufgereinigt. Es wurden 226 mg (629 µmol, 41 %) des farblosen Feststoffes **207** erhalten. Darüber hinaus wurden 202 mg (801 µmol) des Carbamats **208** als Nebenprodukt erhalten.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.59 (s, 9 H, 9-H), 7.25 (dd, ³J_{3,4} = 8.1 Hz, ⁴J_{3,5} = 1.2 Hz, 1 H, 3-H), 7.37 (ddd, ³J_{5,6} = 7.8 Hz, ³J_{5,4} = 7.8 Hz, ⁴J_{5,3} = 1.2 Hz, 1 H, 5-H), 7.54 (mc, 2 H, 3''-H), 7.58 (ddd, ³J_{4,3} = 8.1 Hz, ³J_{4,5} = 7.8 Hz, ⁴J_{4,6} = 1.7 Hz, 1 H, 4-H), 8.01 (dd, ³J_{6,5} = 7.8 Hz, ⁴J_{6,4} = 1.7 Hz, 1 H,

6-H), 8.31 (m_c, 2 H, 2''-H); ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 28.3 (C-9), 82.4 (C-8), 122.0 (C-3''), 123.0 (C-3), 124.6 (C-1), 125.5 (C-2''), 126.9 (C-5), 132.2 (C-6), 133.8 (C-4), 145.7 (C-4''), 150.4 (C-2), 150.9 (C-1'), 155.8 (C-1''), 163.6 (C-7); **R_f** = 0.13 (*n*-Pentan/CH₂Cl₂ 50:50); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2972, 1716, 1613, 1594, 1520, 1493, 1474, 1412, 1369, 1341, 1304, 1279, 1224, 1204, 1160, 1117, 1011, 941, 886, 858, 816, 749, 686, 660, 527, 493; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₁₈H₂₁N₂O₇⁺ [M+NH₄]⁺: 377.1343; gef. 377.1341; **Schmelzpunkt**: 110.3 °C.

O-(4-Nitrophenyl)-N-ethyl(isopropyl)carbammat (208)

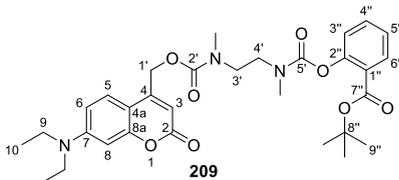


¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.27 (m, 9 H, 2''-H, 2'''-H), 3.33 (m, 2 H, 1'''-H), 4.34 (septett, ³J_{1'',2''} = 6.9 Hz, 1 H, 1''-H), 7.31 (m_c, 2 H, 3-H), 8.25 (m_c, 2 H, 2-H); ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.9, 16.2, 20.6, 21.4 (C-2'', C-2'''), 37.9 (C-1'''), 38.6 (C-1''), 48.7 (C-1''), 122.4 (C-3), 125.2 (C-2), 144.8, 153.0 (C-1'), 156.7; **R_f** = 0.03 (*n*-Pentan/CH₂Cl₂ 50:50); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2977, 2938, 1715, 1613, 1594, 1520, 1493, 1474, 1412, 1341, 1304, 1279, 1223, 1224, 1160, 1117, 1011, 941, 886, 858, 816, 749, 686, 660, 493; **MS** (APCI, positiv-Ion): m/z (%) = 253.2 (100) [M+H]⁺.

tert-Butyl-2-[(2-[[[7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl]methoxy]-carbonyl](methyl)amino]ethyl][methyl]carbamoyloxy]benzoat (209)

In Anlehnung an eine Vorschrift von *Fomina et al.*^[396] wurde in einem sekurierten Schlenkkolben Cumarin **112** (176 mg, 486 μmol, 1.75 Äq.) in trockenem Dichlormethan (8.80 mL, 55.2 M) unter Stickstoff-Atmosphäre vorgelegt. Nach der Zugabe von DMAP (6 mg, 0.05 mmol, 0.2 Äq.), dem Benzoessäure-Derivat **207** (100 mg, 278 μmol, 1.00 Äq.) und DIPEA (850 μL, 4.88 mmol, 17.5 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 22 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 50:50), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Anschließend wurde die Lösung mit CH₂Cl₂ verdünnt und nacheinander mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (3×7.5 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (1×7.5 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO₄ getrocknet und die Lösung wurde bei vermindertem Druck eingeeengt und auf Kieselgel aufgezogen. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 50:50) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 129 mg (221 μmol, 79 %) des gelben

Feststoffes **209** erhalten. Das Produkt wurde als *syn/anti*-Isomerengemisch aufgrund der Carbamat-Bindungen erhalten.



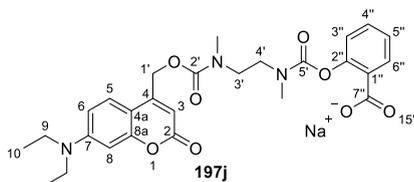
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.19 (t, ³J_{10,9} = 7.0 Hz, 6 H, 10-H), 1.54 (s, 9 H, 9''-H), 2.95–3.20 (m, 6 H, CH₃), 3.39 (q, ³J_{9,10} = 7.0 Hz, 4 H, 9-H), 3.47–3.70 (m, 4 H, 3'-H, 4'-H), 5.19–5.30 (m, 2 H, 1'-H), 6.04–6.14 (m, 1 H, 3-H), 6.45–6.52 (m, 1 H, 8-H), 6.52–6.58 (m, 1 H, 6-H), 7.04–7.12 (m, 1 H, 3''-H), 7.19–7.25 (m, 1 H, 5''-H), 7.26–7.34 (m, 1 H, 5-H) 7.41–7.49 (m, 1 H, 4''-H), 7.81–7.87 (m, 1 H, 6''-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.5 (C-10), 28.2 (C-9''), 28.2 (C-9''), 35.0 (CH₃), 35.2 (CH₃), 35.5 (CH₃), 35.6 (CH₃), 35.6 (CH₃), 35.7 (CH₃), 35.7 (CH₃), 35.8 (CH₃), 44.8 (C-9), 46.5, 47.0, 47.1, 47.1, 47.2, 47.6, 47.7, 47.9 (C-3', C-4'), 62.5 (C-1'), 62.7 (C-1'), 62.8 (C-1'), 81.4 (C-8''), 81.5 (C-8''), 97.8 (C-8), 97.9 (C-8), 105.9, 106.1, 106.1, 106.3, 106.3 (C-3, C-4a), 108.7 (C-6), 108.8 (C-6), 108.8 (C-6), 123.8 (C-3''), 123.9 (C-3''), 123.9 (C-3''), 123.9 (C-3''), 124.4 (C-5), 124.5 (C-5), 124.6 (C-5), 125.4 (C-5''), 125.4 (C-5''), 125.5 (C-5''), 125.9 (C-1''), 126.0 (C-1''), 126.1 (C-1''), 131.3 (C-6''), 131.3 (C-6''), 131.3 (C-6''), 132.8 (C-4''), 132.9 (C-4''), 133.0 (C-4''), 150.4, 150.4, 150.5, 150.6, 150.7, 150.7, 150.8 (C-2'', C-4, C-7), 154.3, 154.7, 154.8, 155.3, 155.4, 155.6, 155.7, 156.3 (C-2', C-5', C-8a), 162.0 (C-2), 162.1 (C-2), 162.1 (C-2), 164.2 (C-7''), 164.3 (C-7''), 164.3 (C-7''); **R_f** = 0.24 (PE/EtOAc 50:50); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2975, 2932, 1715, 1602, 1528, 1420, 1395, 1358, 1306, 1277, 1201, 1158, 1126, 1081, 844, 824, 749, 702, 530, 466; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₃₁H₄₀N₃O₈⁺ [M+H]⁺: 582.2810; gef. 582.2817; **Schmelzpunkt**: 63–64 °C.

2-[[[2-[[[7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl]methoxy]carbonyl](methyl-amino)ethyl][methyl]carbamoyloxy]benzoesäure – DC-NN-cAnthranilsäure (1971)

Cumarin **209** (166 mg, 285 μmol, 1.00 Äq.) wurde in Dichlormethan (4.00 mL, 71.3 mM) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Nach der Zugabe von TFA (2.00 mL, 26.5 mmol, 93.0 Äq.) und Wasser (82.0 μL, 4.57 mmol, 16.0 Äq.) wurde die Reaktionslösung für 10 min bei 0 °C und für 1 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (PE/EtOAc 30:70), welche den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Die Reaktionslösung wurde bei vermindertem Druck eingeeengt. Die säulenchromatographische Isolation (PE/EtOAc 30:70 → EtOAc/MeOH 95:5) erfolgte über Kieselgel. Es wurden 151 mg (287 μmol, 99 %) des gelben

Natrium-2-[(2-[[[7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-yl]methoxy]carbonyl](methylamino)ethyl][methyl]carbamoyloxy]benzoat – DC-NN-cSalicylsäure⁺ (197j)

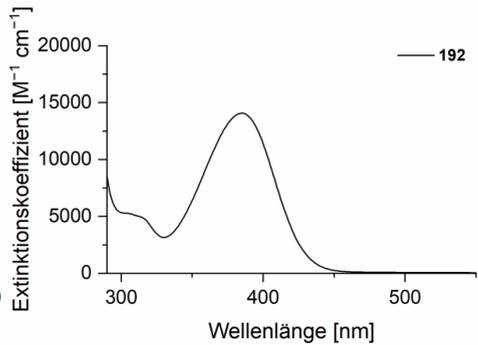
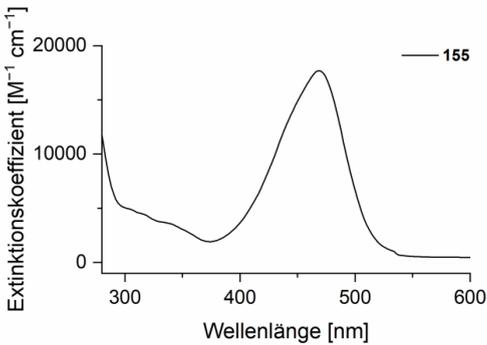
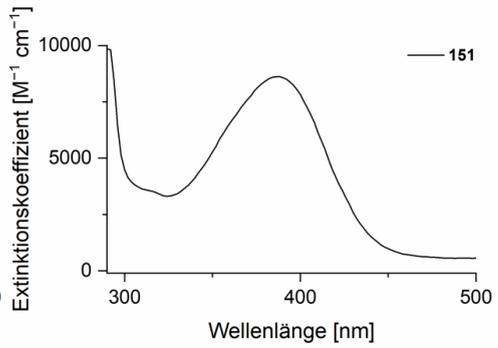
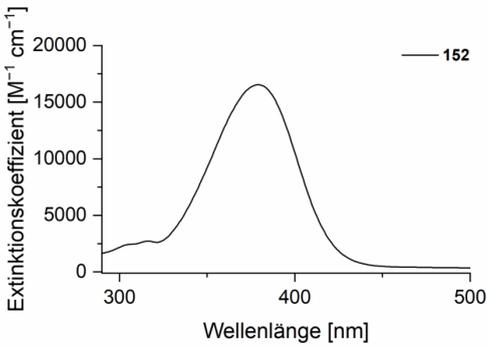
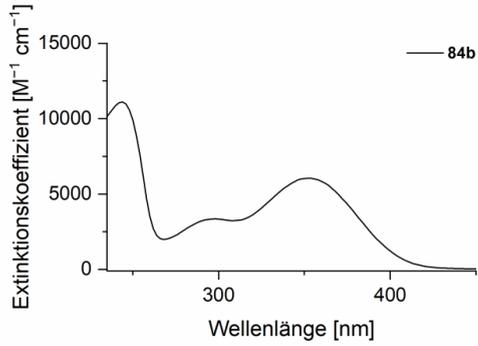
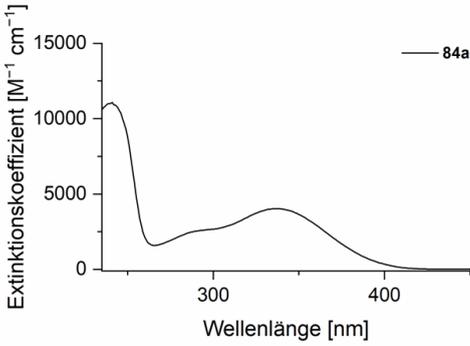
Zu einer Lösung von Salicylsäure **197i** (29 mg, 55 μ mol, 1.0 \ddot{A} q.) in MeOH (1.0 mL, 55 mM) wurde eine 0.20 M NaOH-Lösung (0.28 mL, 55 μ mol, 1.0 \ddot{A} q.) gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 5 min gerührt und anschließend über Nacht lyophilisiert. Es wurden 31 mg (55 μ mol, quant.) des Feststoffes **197h** erhalten.

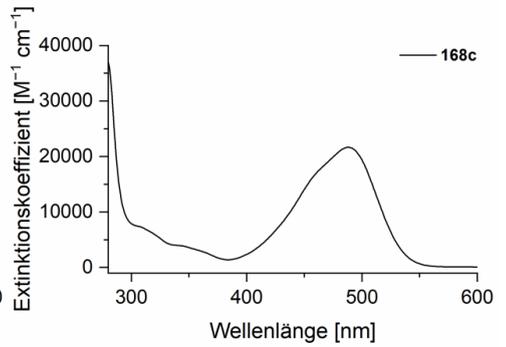
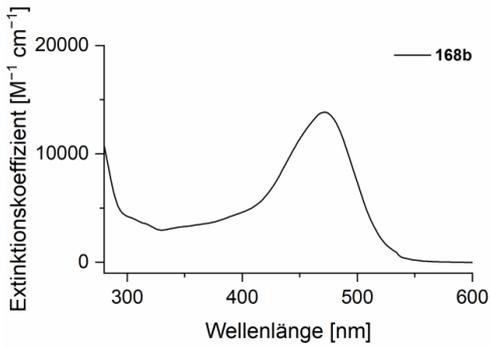
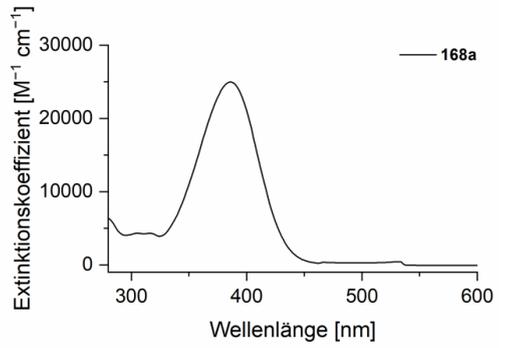
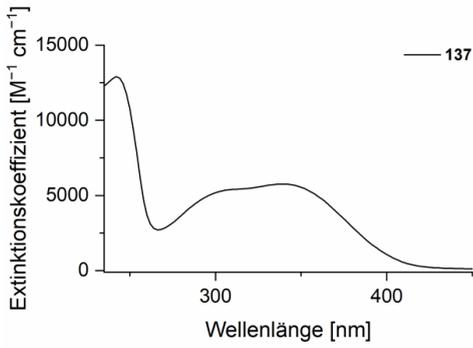
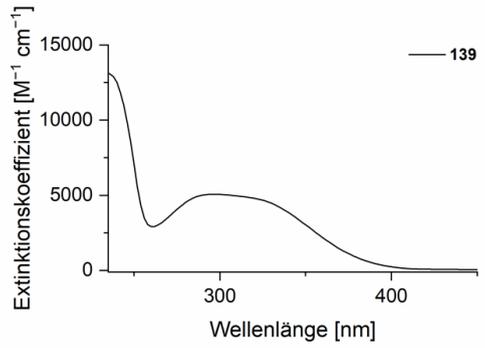
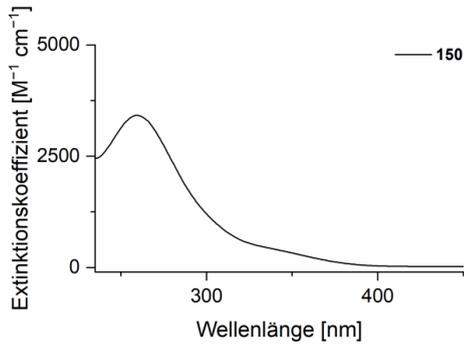


¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.10–1.19 (m, 6 H, 10-H), 2.66–2.96 (m, 6 H, CH₃), 3.10–3.50 (m, 8 H, 3'-H, 4'-H, 9-H), 4.99–5.18 (m, 2 H, 1'-H), 5.87–6.05 (m, 1 H, 3-H), 6.32–6.50 (m, 2 H, 6-H, 8-H), 6.60–7.20 (m, 4 H, arom. H), 7.55–7.77 (m, 1 H, arom. H); **IR** (ATR, Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3448, 2970, 2927, 1702, 1603, 1571, 1528, 1469, 1422, 1356, 1276, 1207, 1174, 1126, 1088, 836, 799, 756; **HRMS** (ESI): m/z ber. für C₂₇H₃₀N₃NaO₈⁺ [M-Na+2H]⁺: 526.2184; gef. 526.2194; **Schmelzpunkt**: 155–156 °C.

7 Anhänge

7.1 Absorptionsspektren





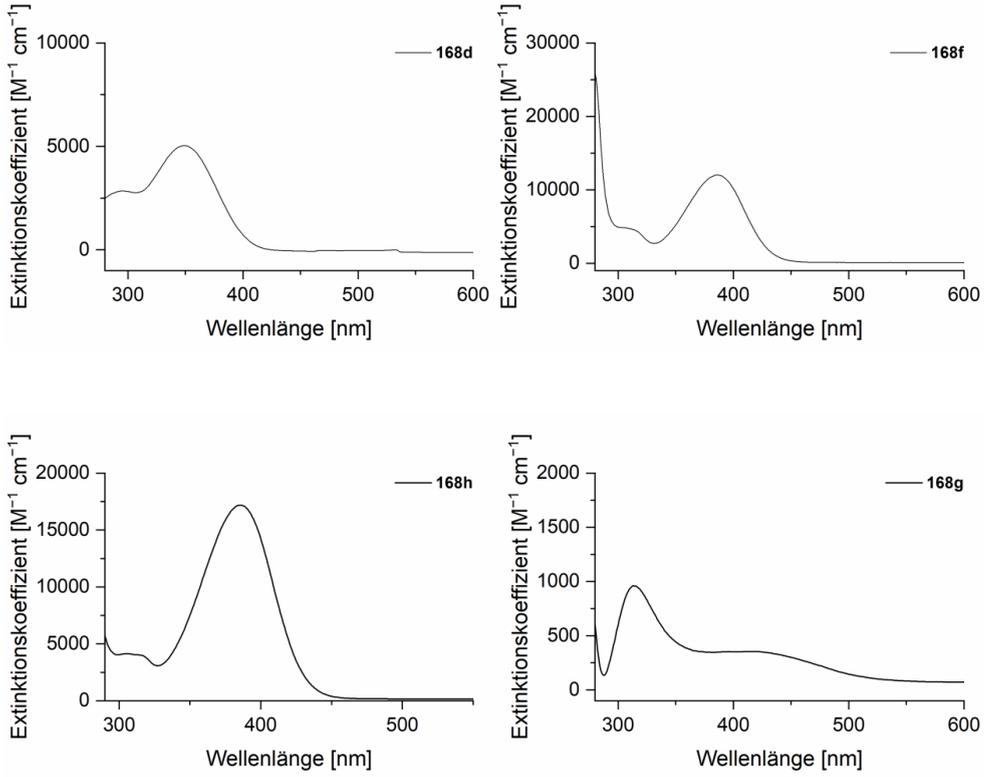


Abbildung 94: Absorptionsspektren der *photocaged* Kohlenhydrate.

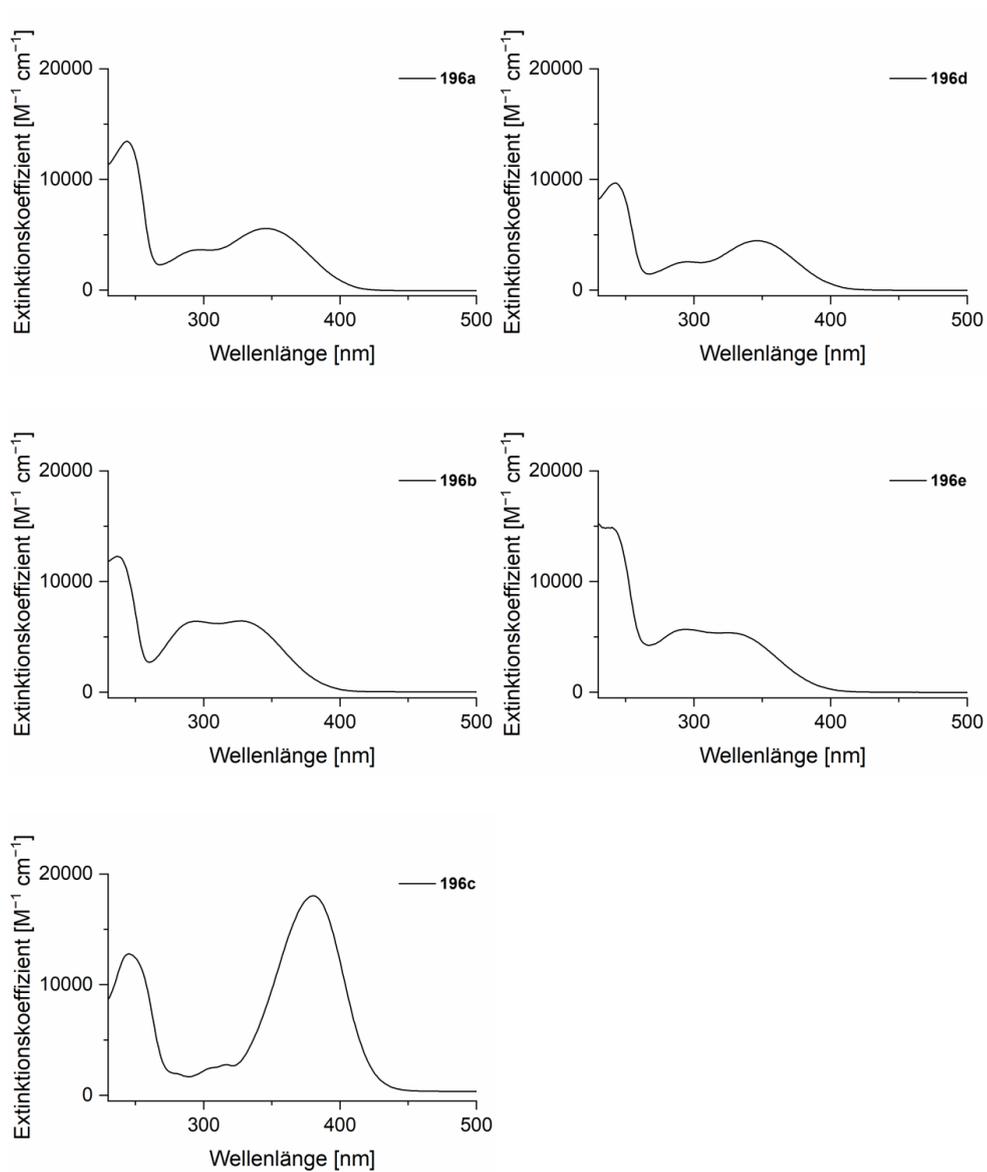
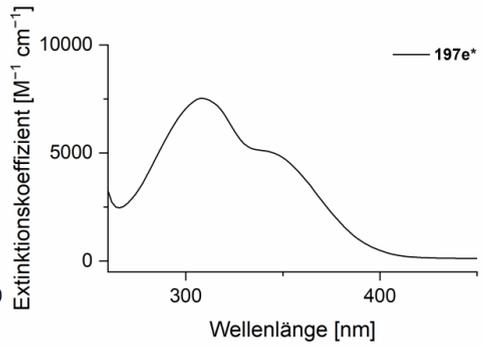
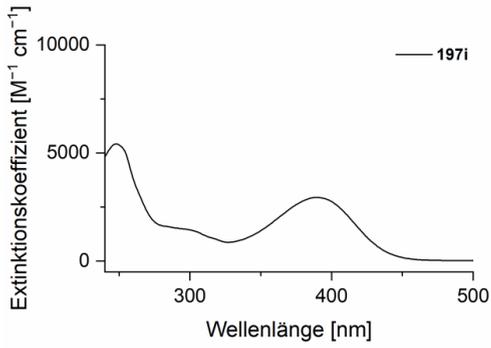
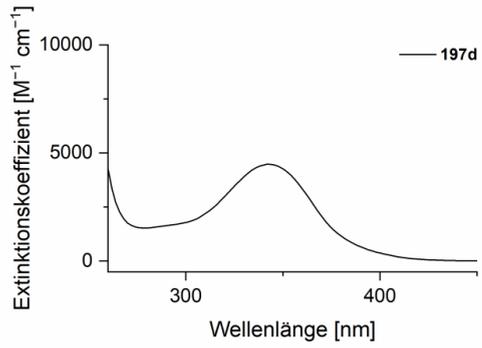
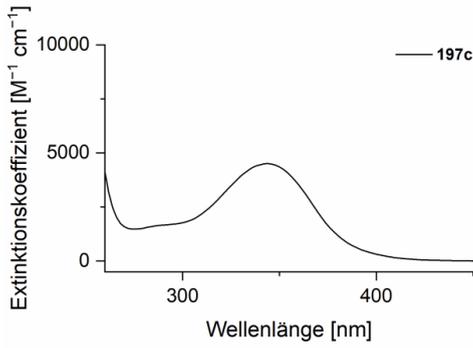
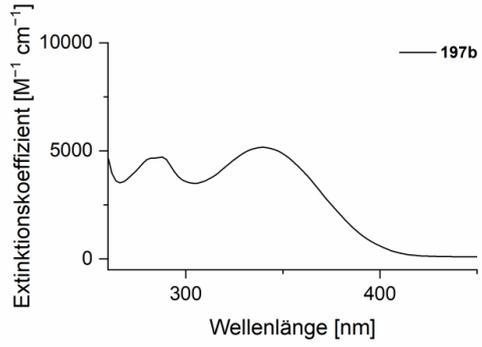
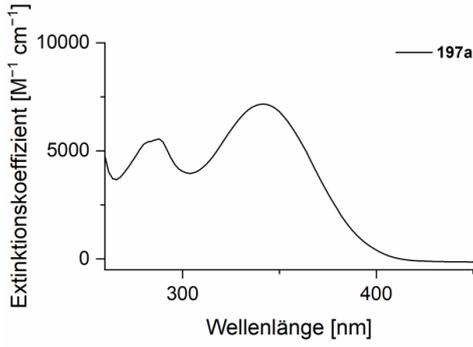


Abbildung 95: Absorptionsspektren der *photocaged* Propionsäuren 196a–e.



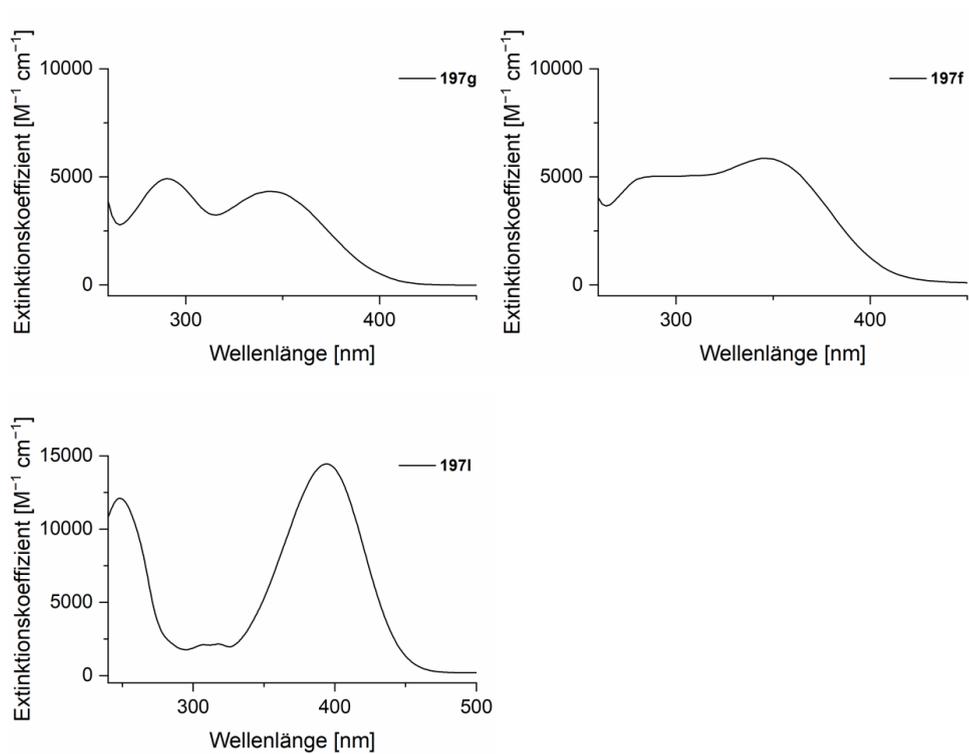
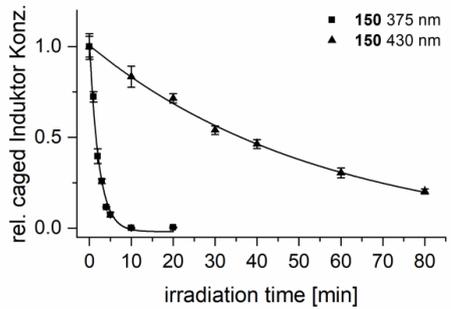
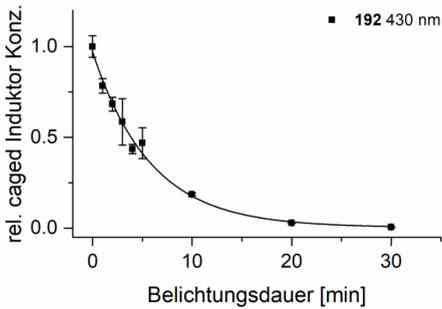
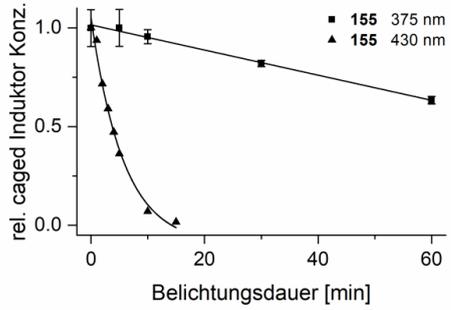
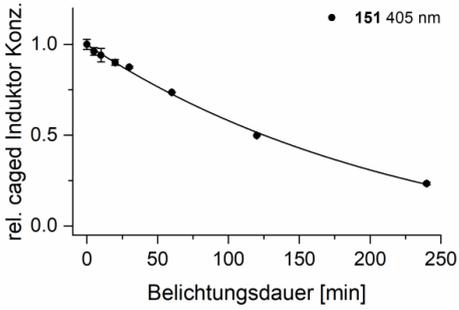
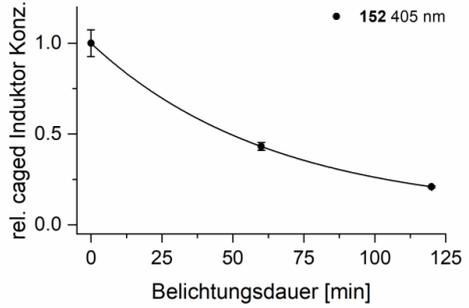
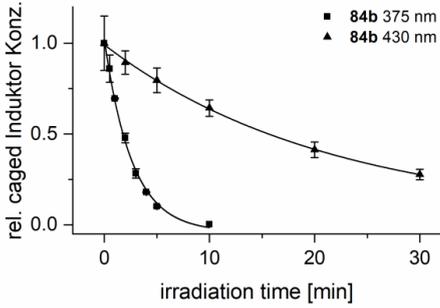
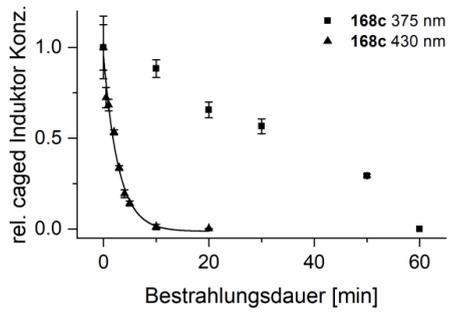
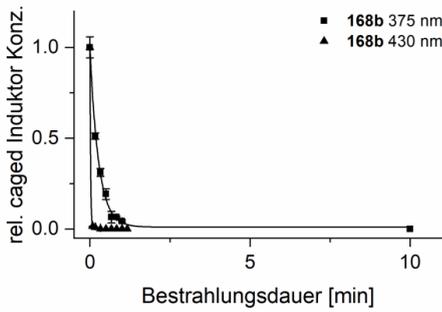
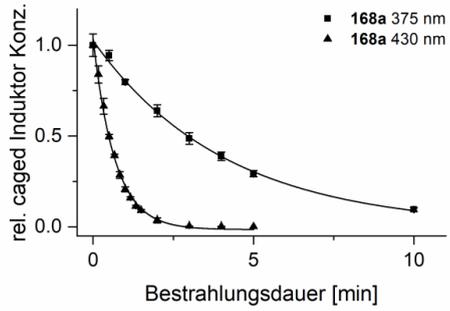
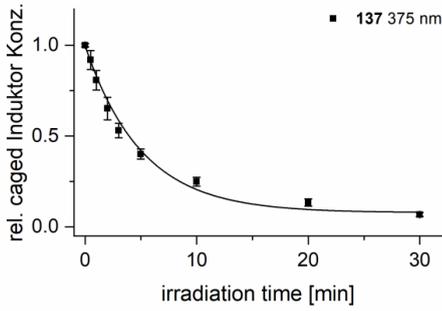
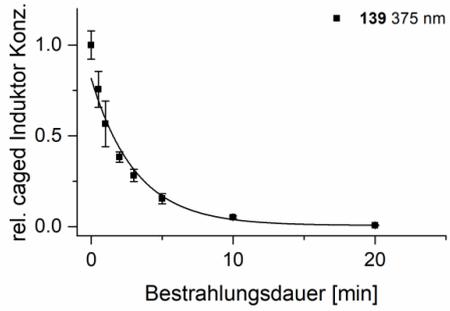
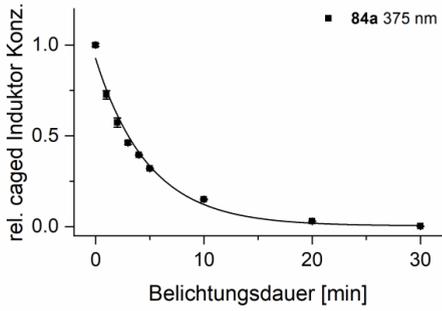


Abbildung 96: Absorptionsspektren der *photocaged* Benzoesäure-Derivate 197a–g,i,l.

7.2 Zerfallskurven





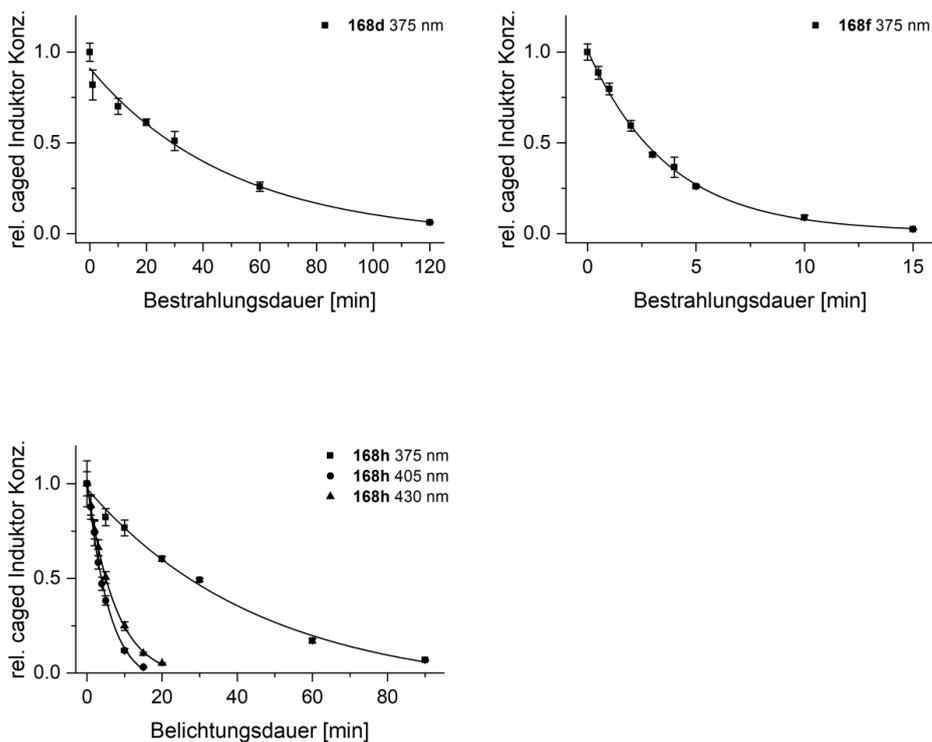
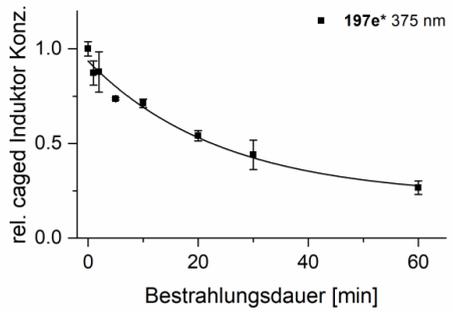
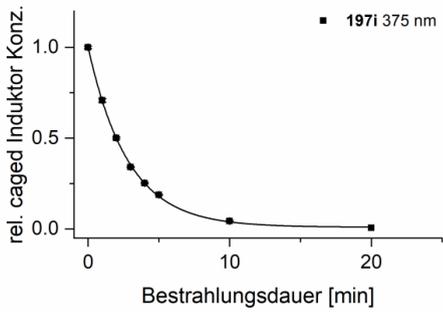
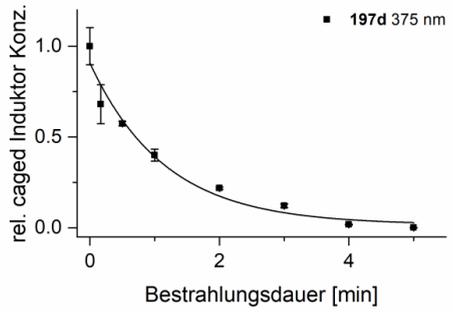
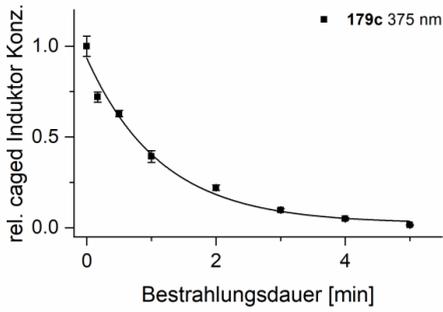
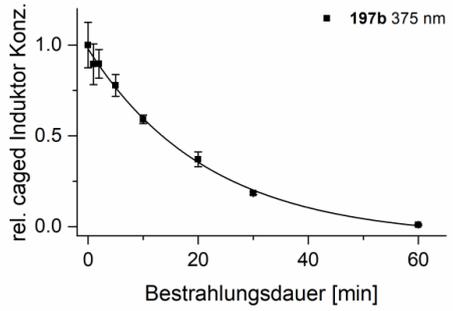
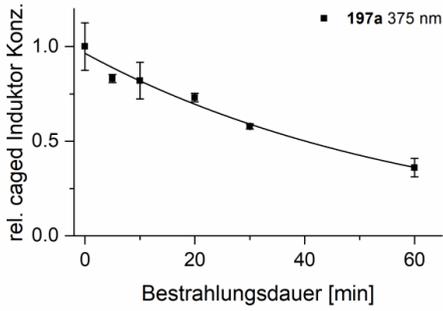


Abbildung 97: *In vitro* Photolyse der *photocaged* Kohlenhydrate untersucht mittels HPLC [Jasco HPLC System; Säule: *Hyperclone* 5 μ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*)]. Die exakten Bedingungen sind in Kapitel 6.8 unter der jeweiligen Verbindung aufgelistet.



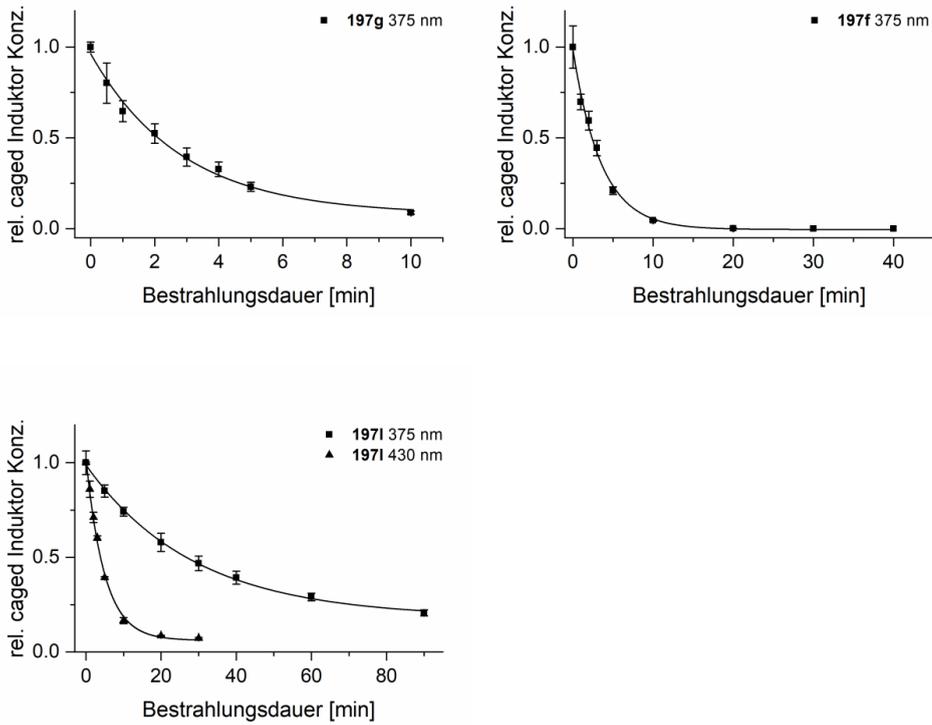
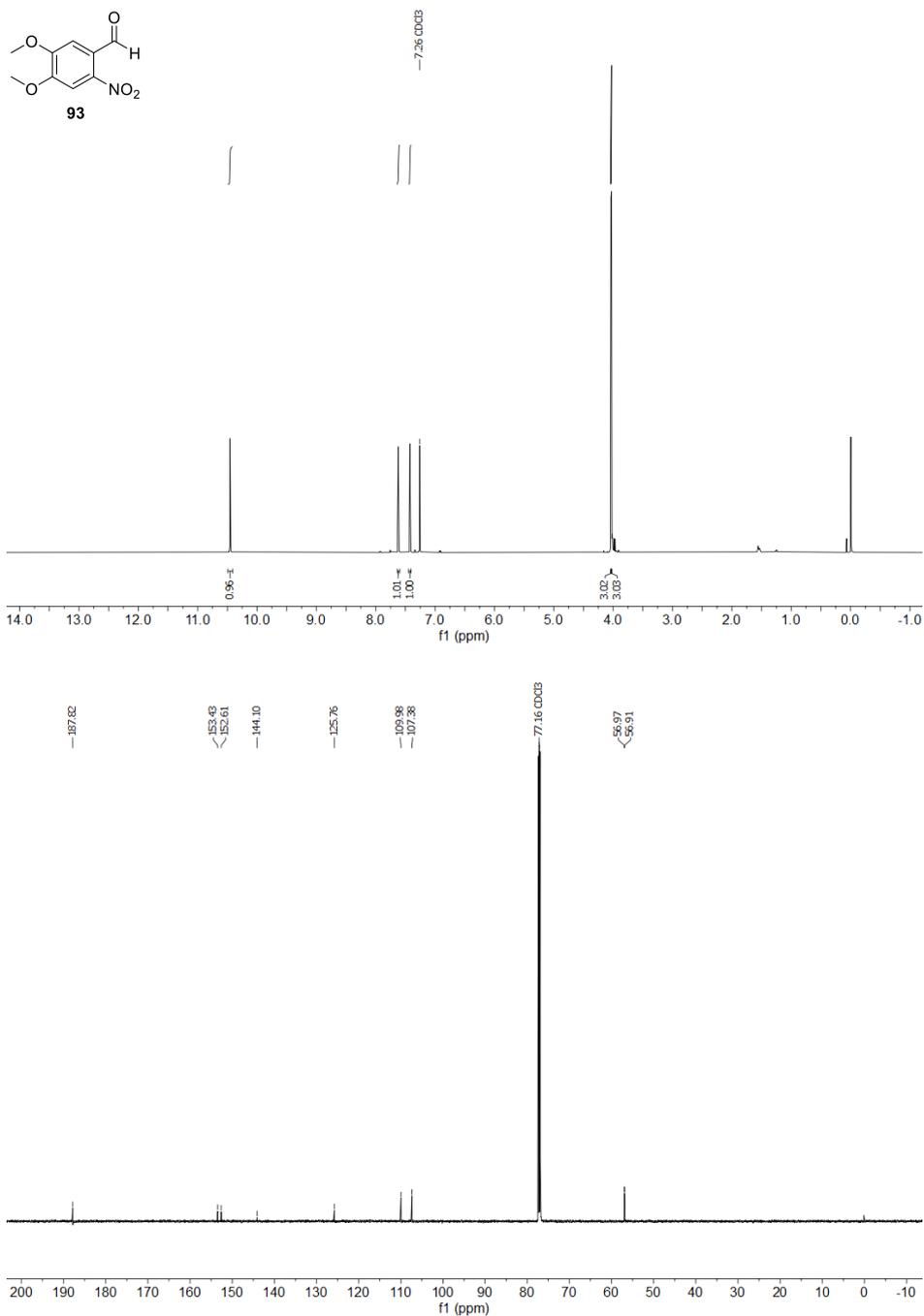


Abbildung 98: *In vitro* Photolyse der *photocaged* Benzoesäure-Derivate untersucht mittels HPLC [Jasco HPLC System; Säule: *Hyperclone* 5 μ ODS (C18) 120 (*Phenomenex*)]. Die exakten Bedingungen sind in Kapitel 6.10 unter der jeweiligen Verbindung aufgelistet.

7.3 NMR-Spektren

Abbildung 99: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **93** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

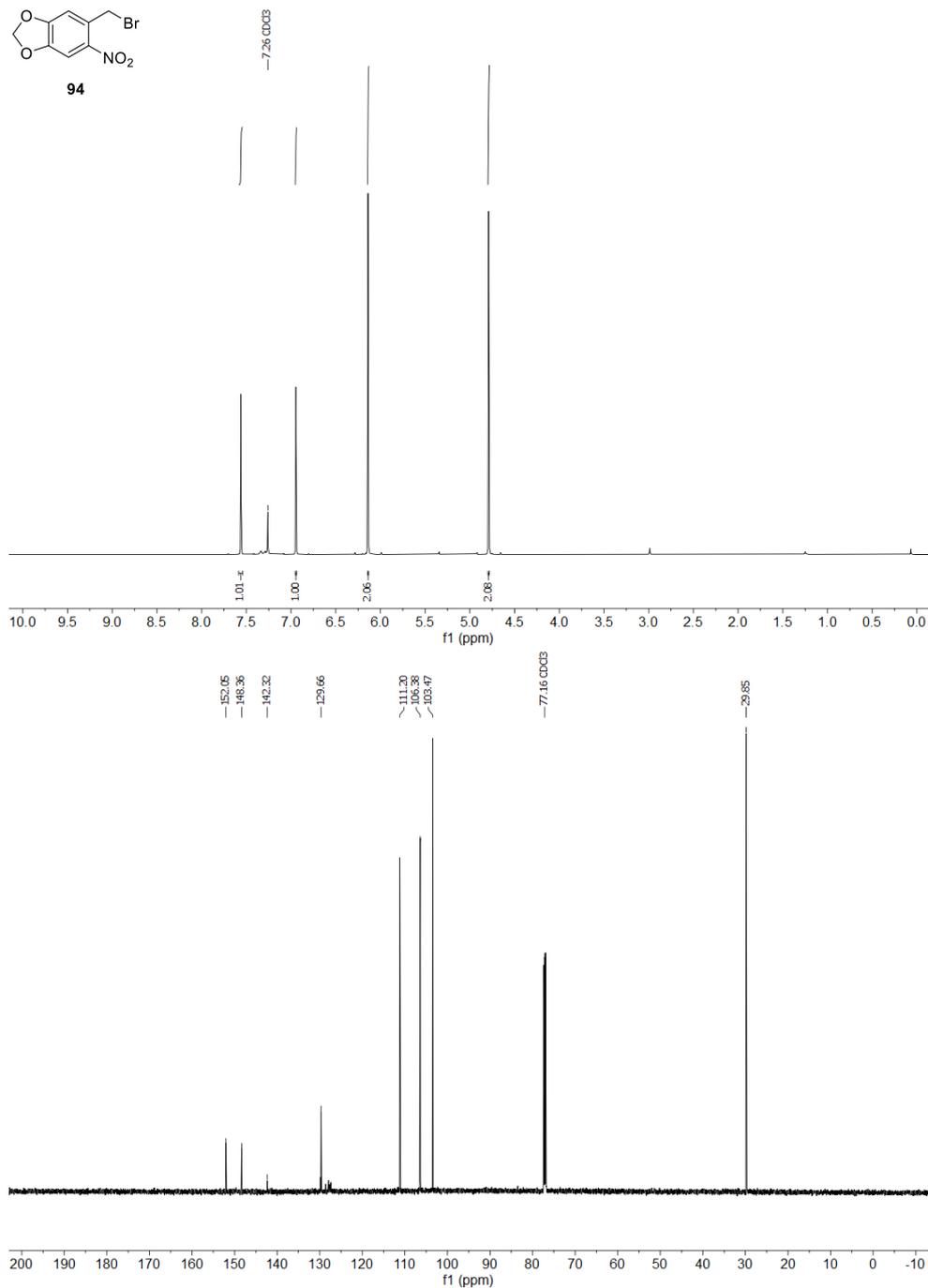


Abbildung 100: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **94** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

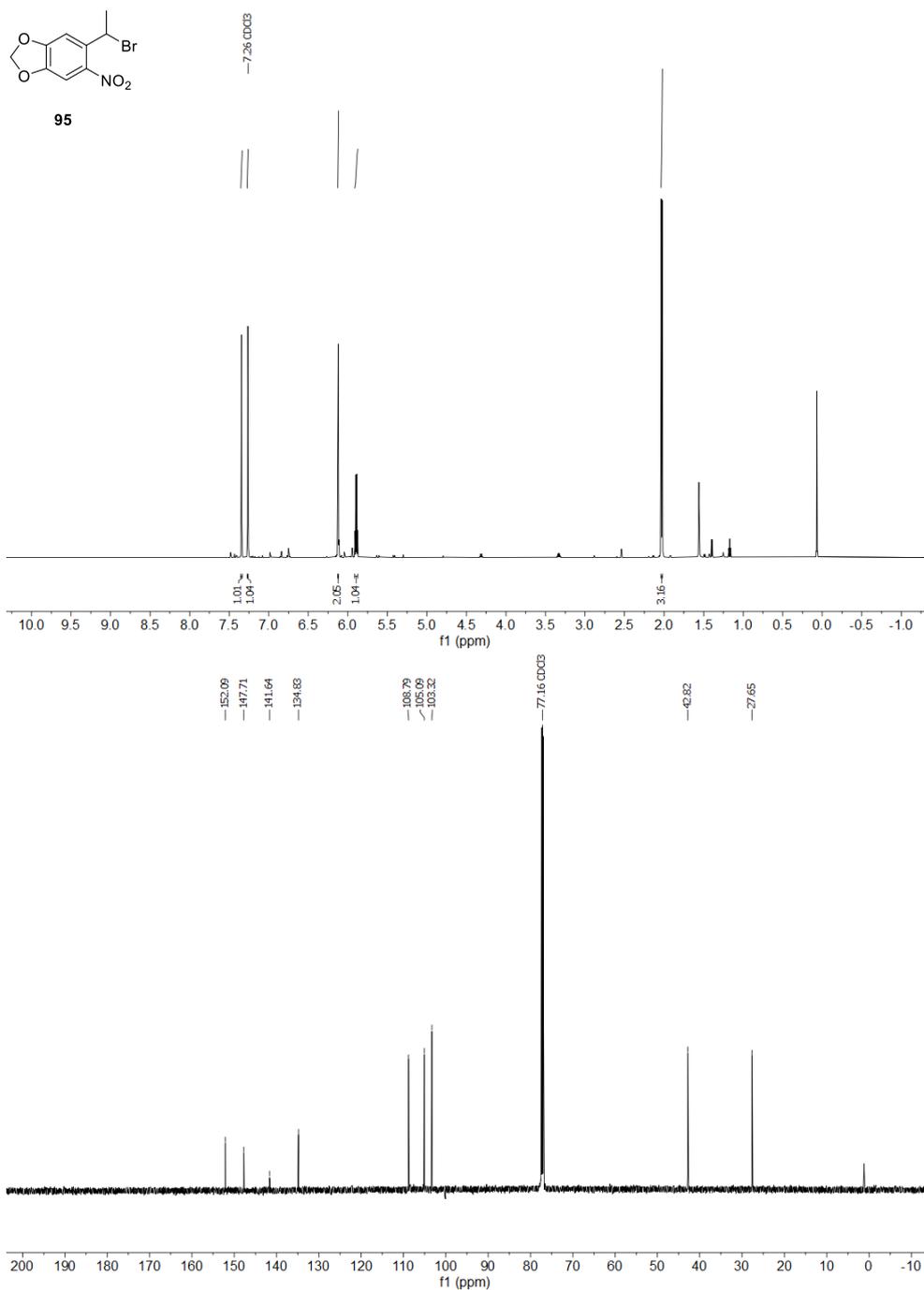


Abbildung 101: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **95** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

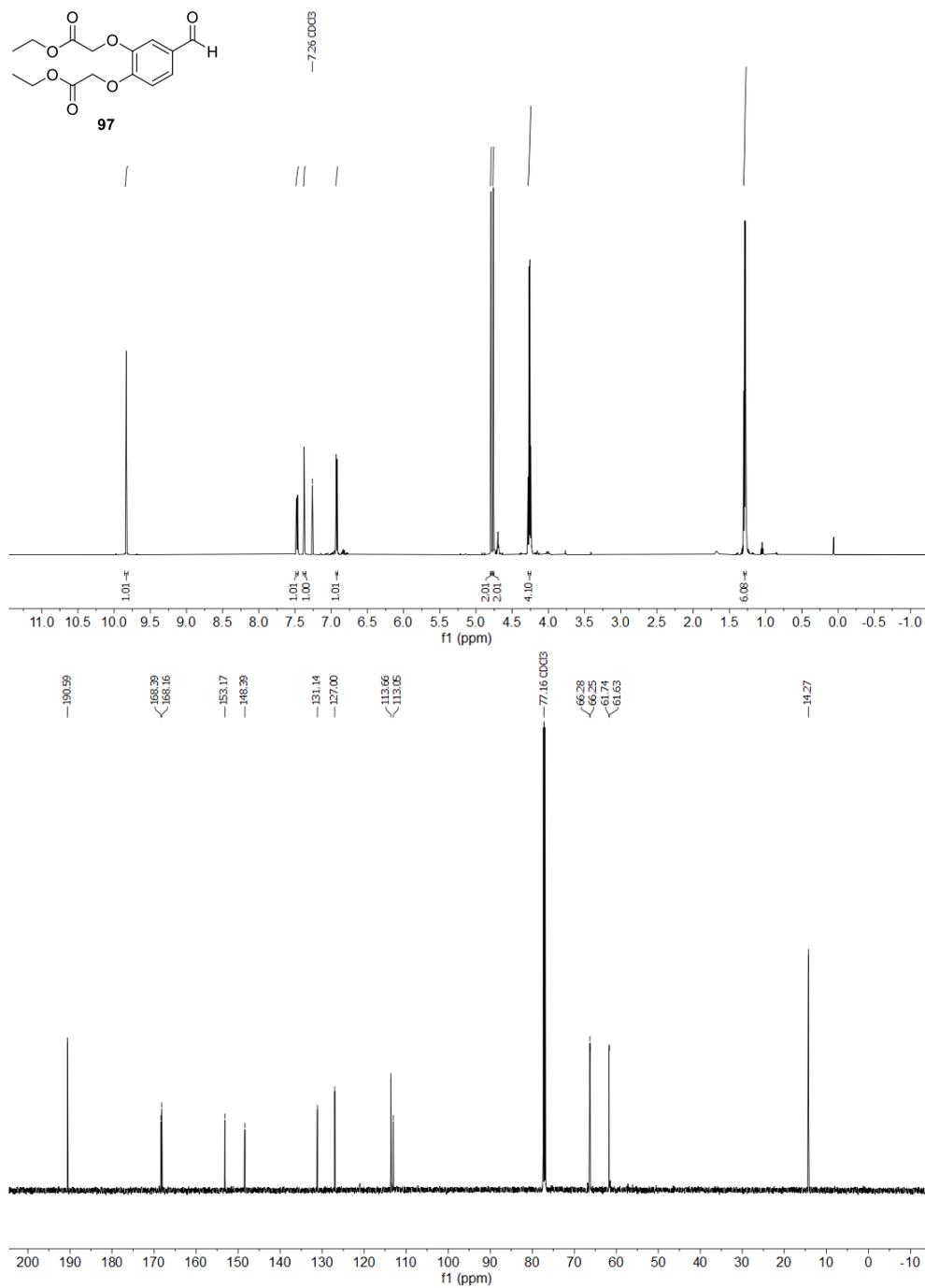


Abbildung 102: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **97** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

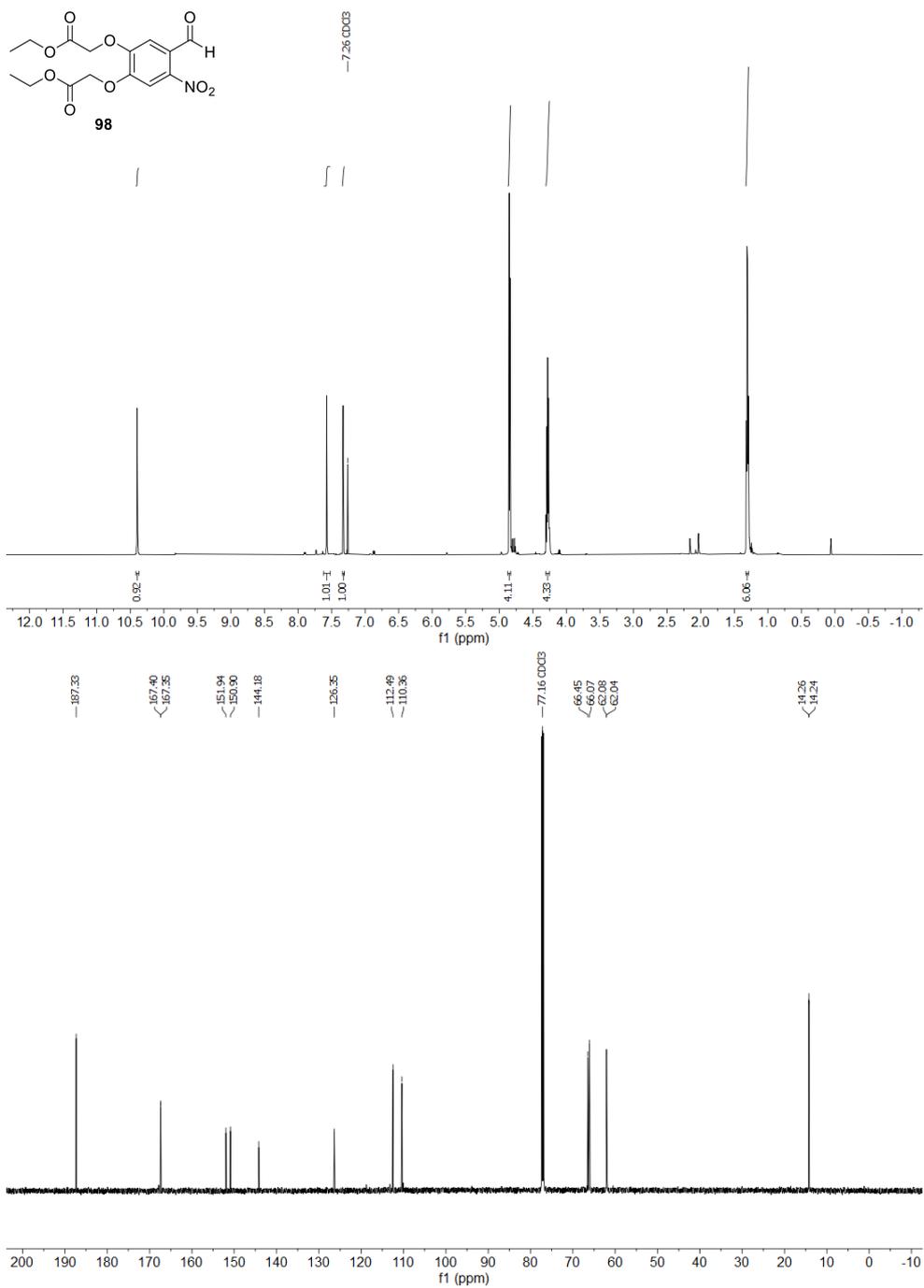


Abbildung 103: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **98** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

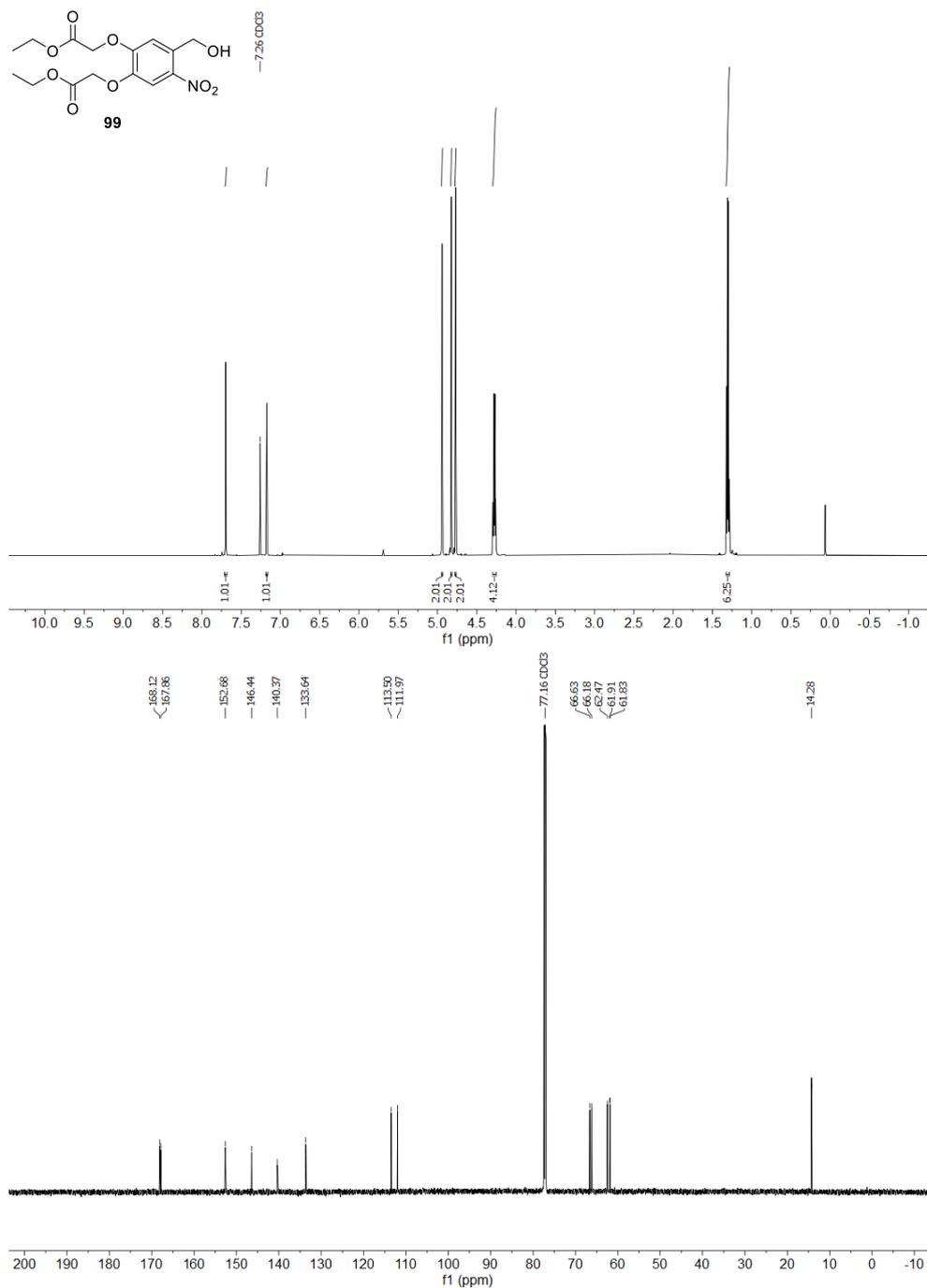


Abbildung 104: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **99** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

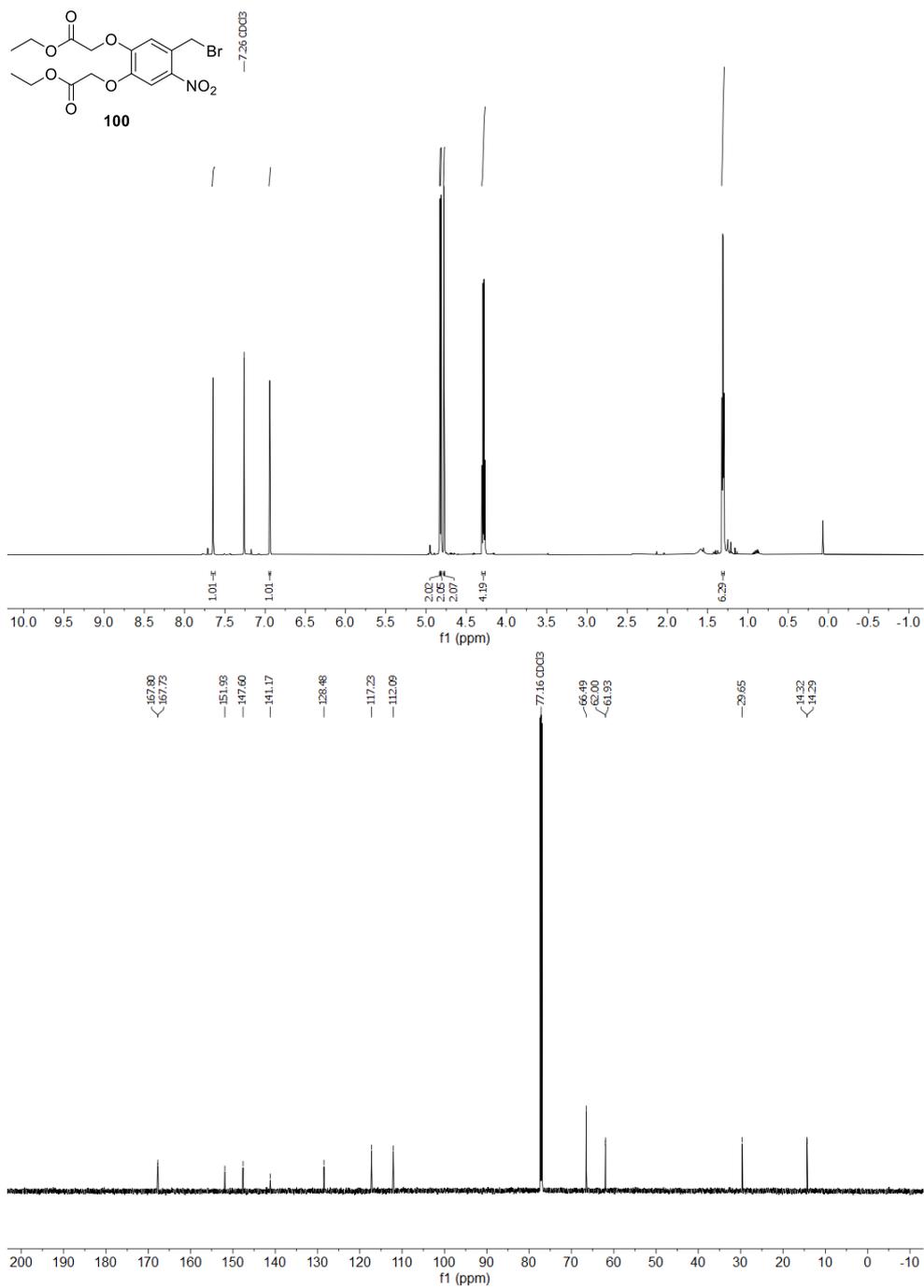


Abbildung 105: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **100** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

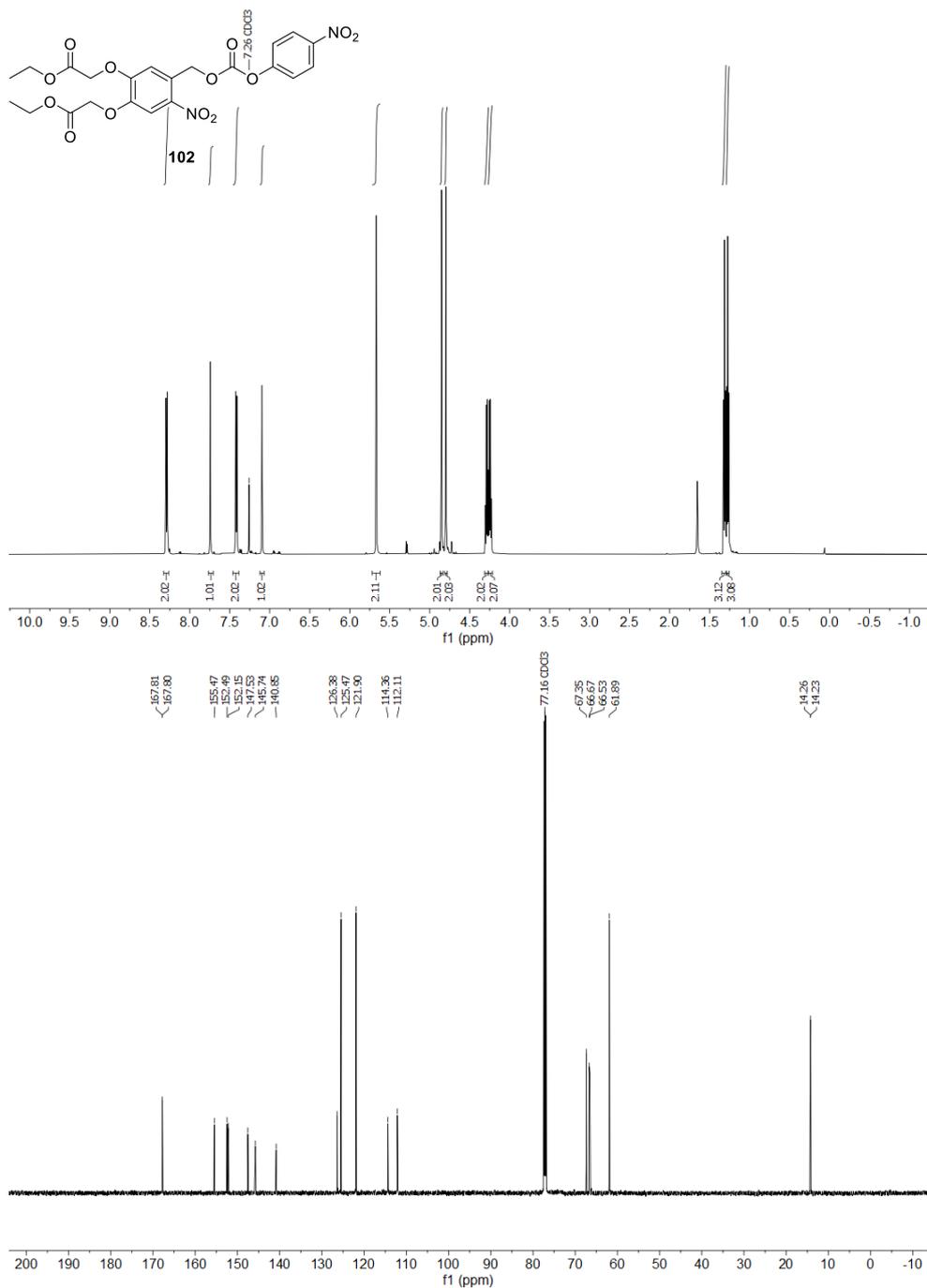


Abbildung 106: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **102** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

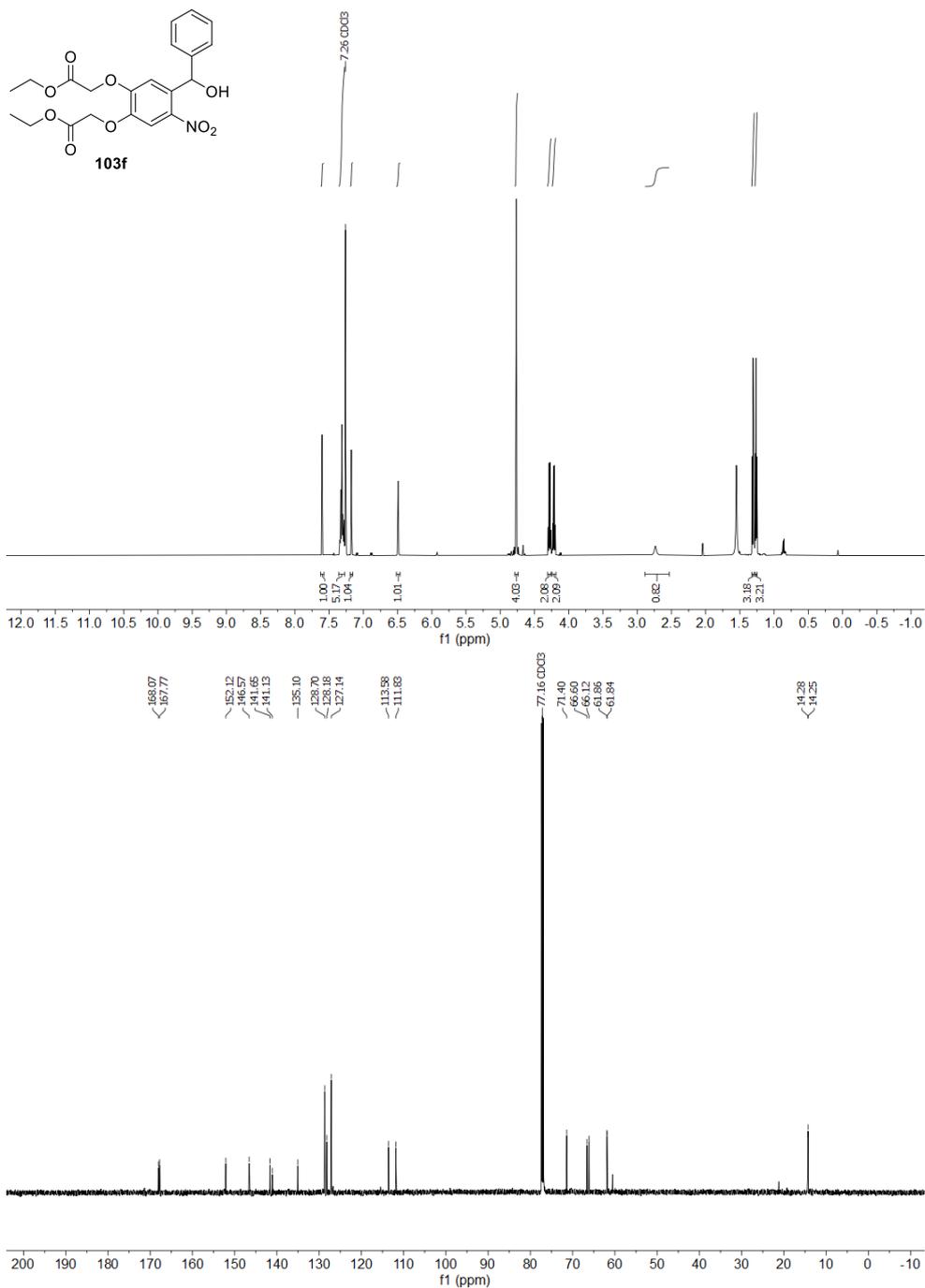


Abbildung 107: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **103f** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

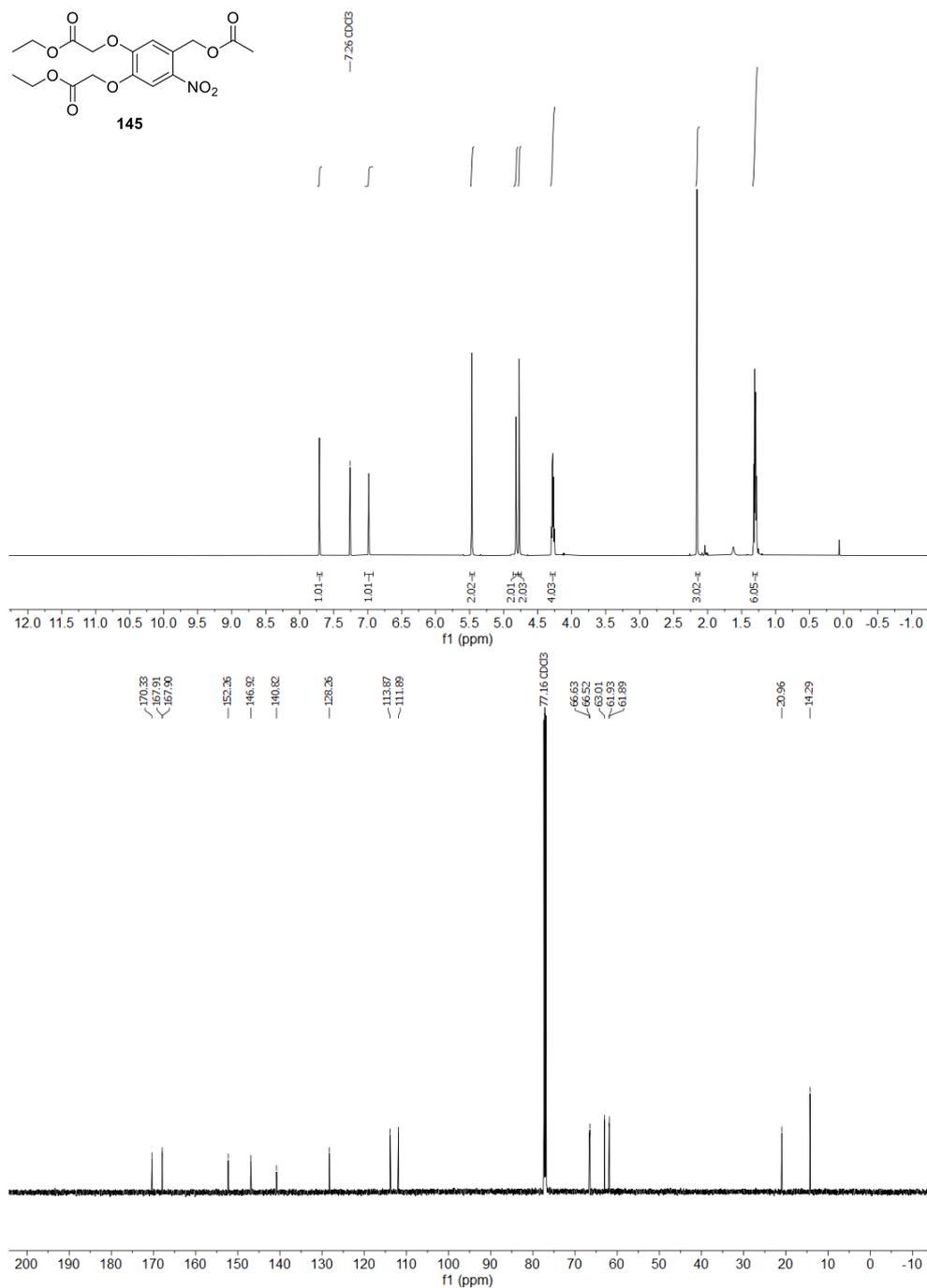


Abbildung 108: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **145** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

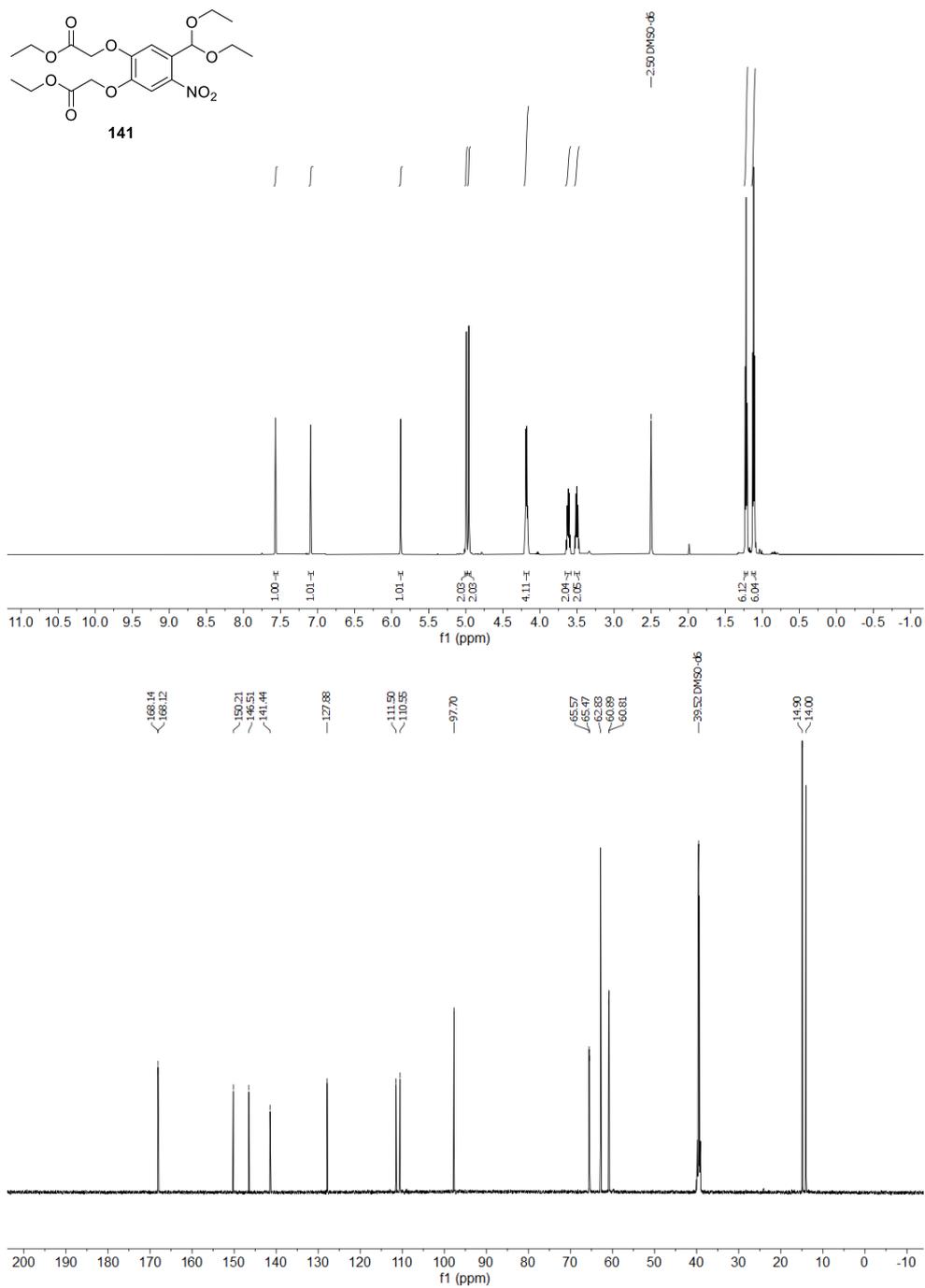


Abbildung 109: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **141** in DMSO-*d*₆ (600 MHz/151 MHz).

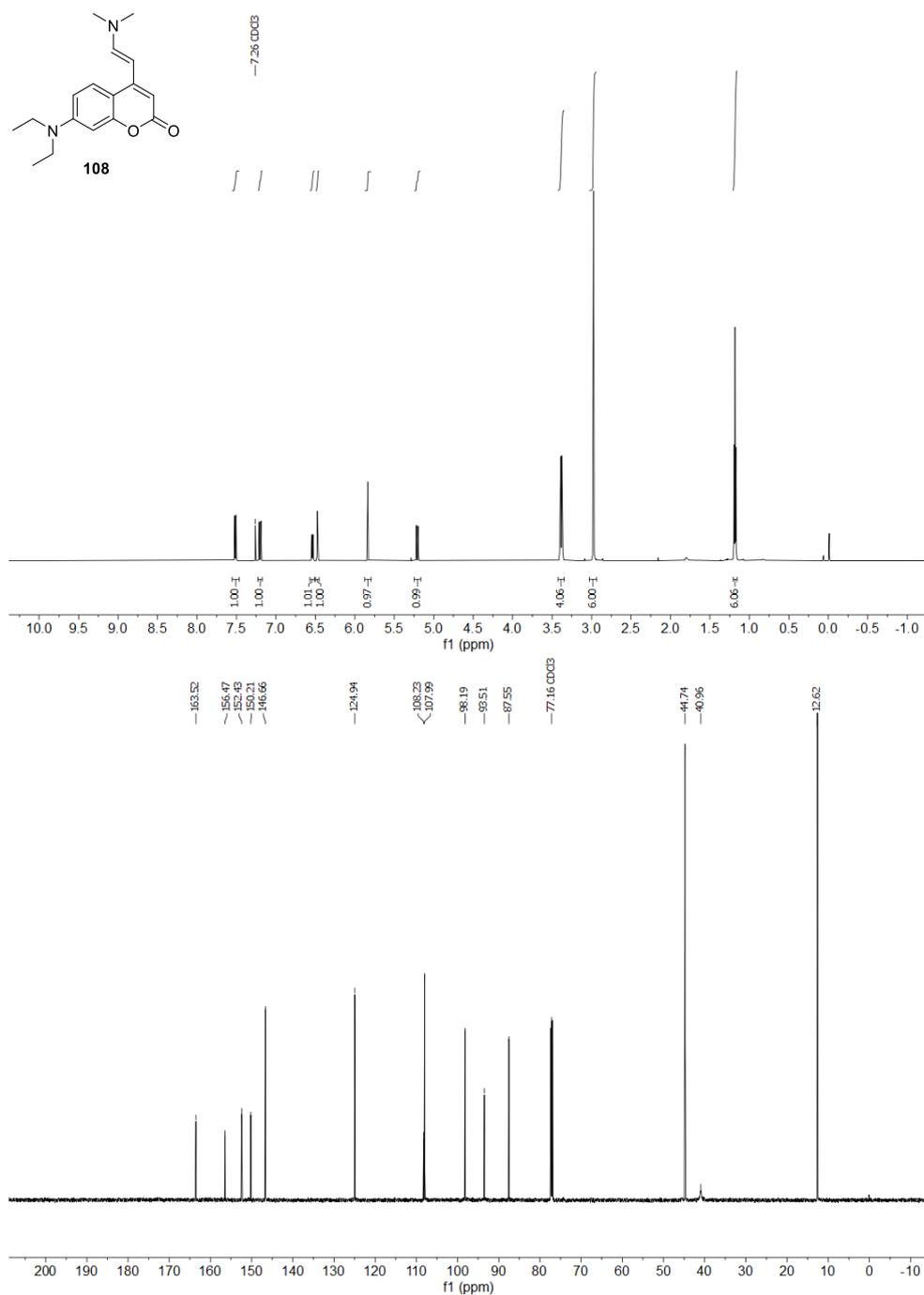


Abbildung 110: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **108** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

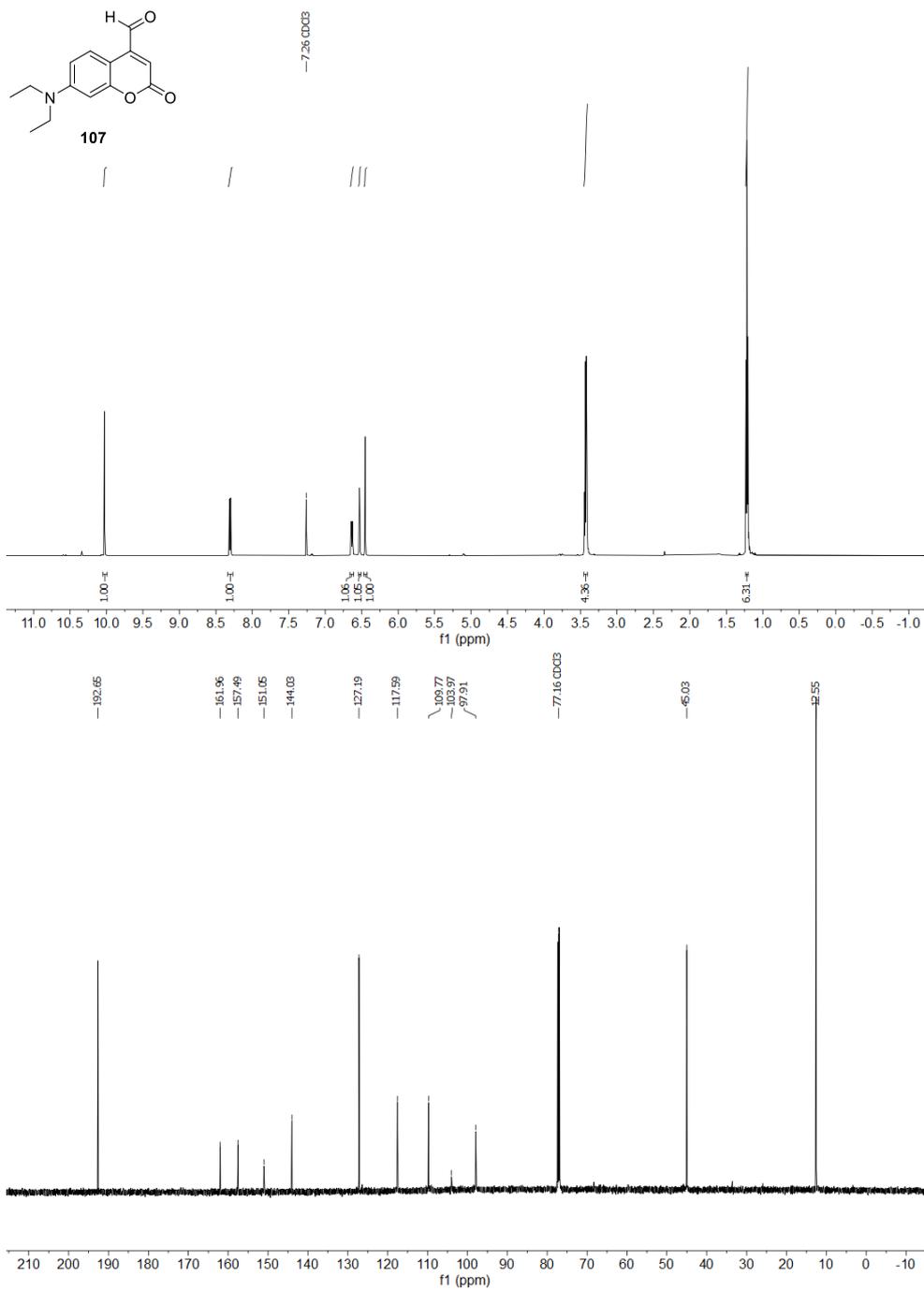


Abbildung 111: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **107** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

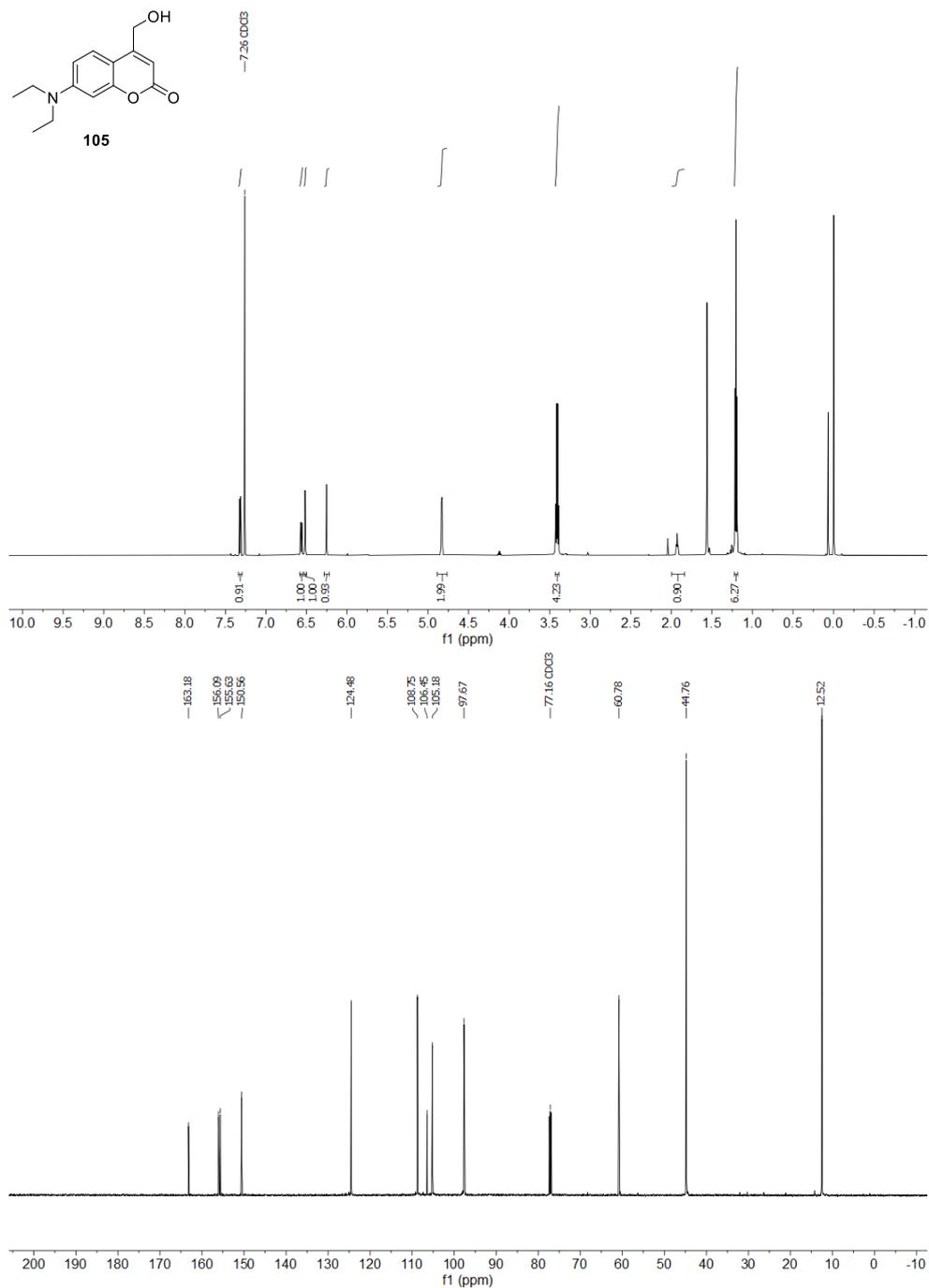


Abbildung 112: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **105** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

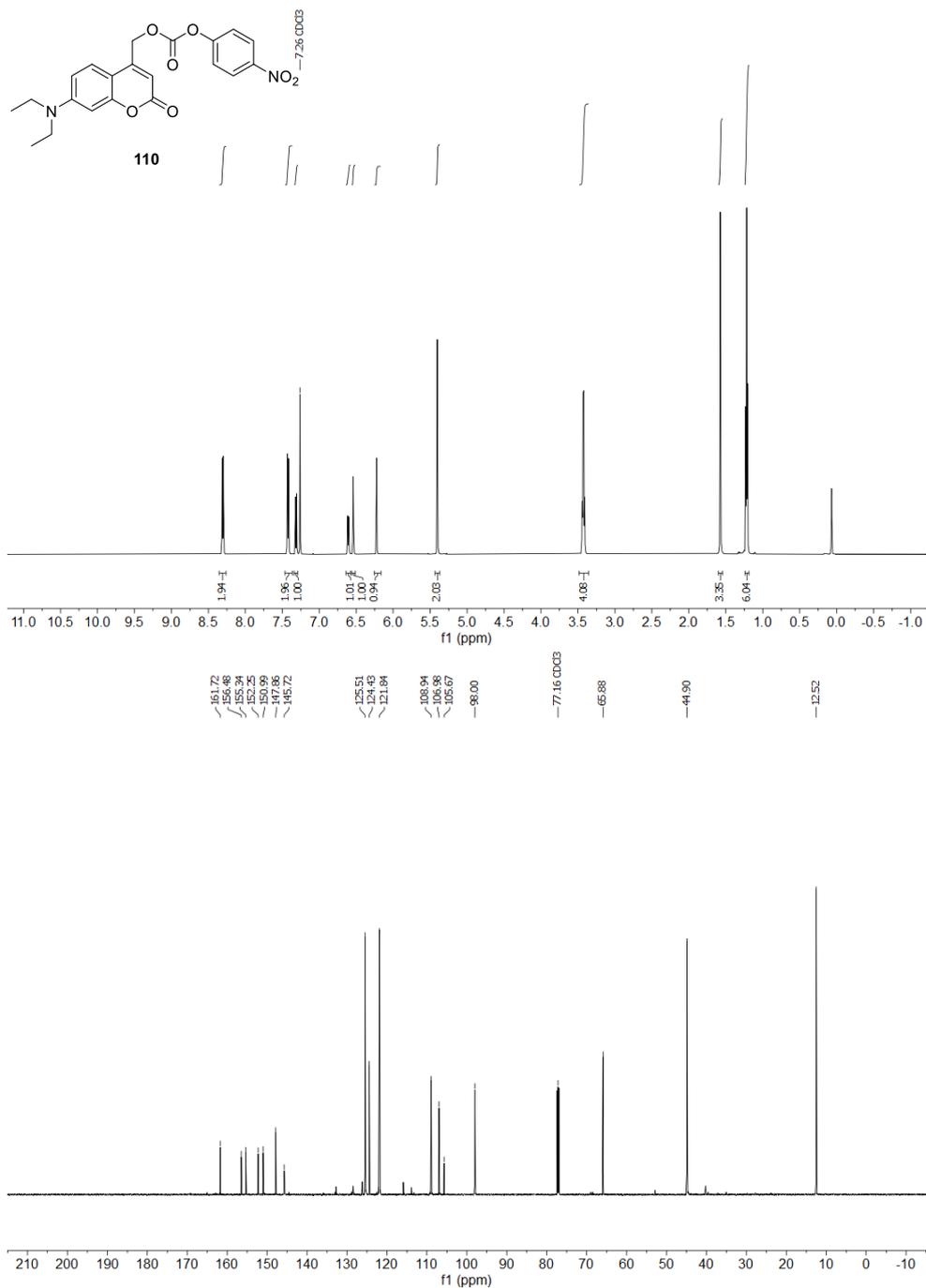


Abbildung 113: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **110** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

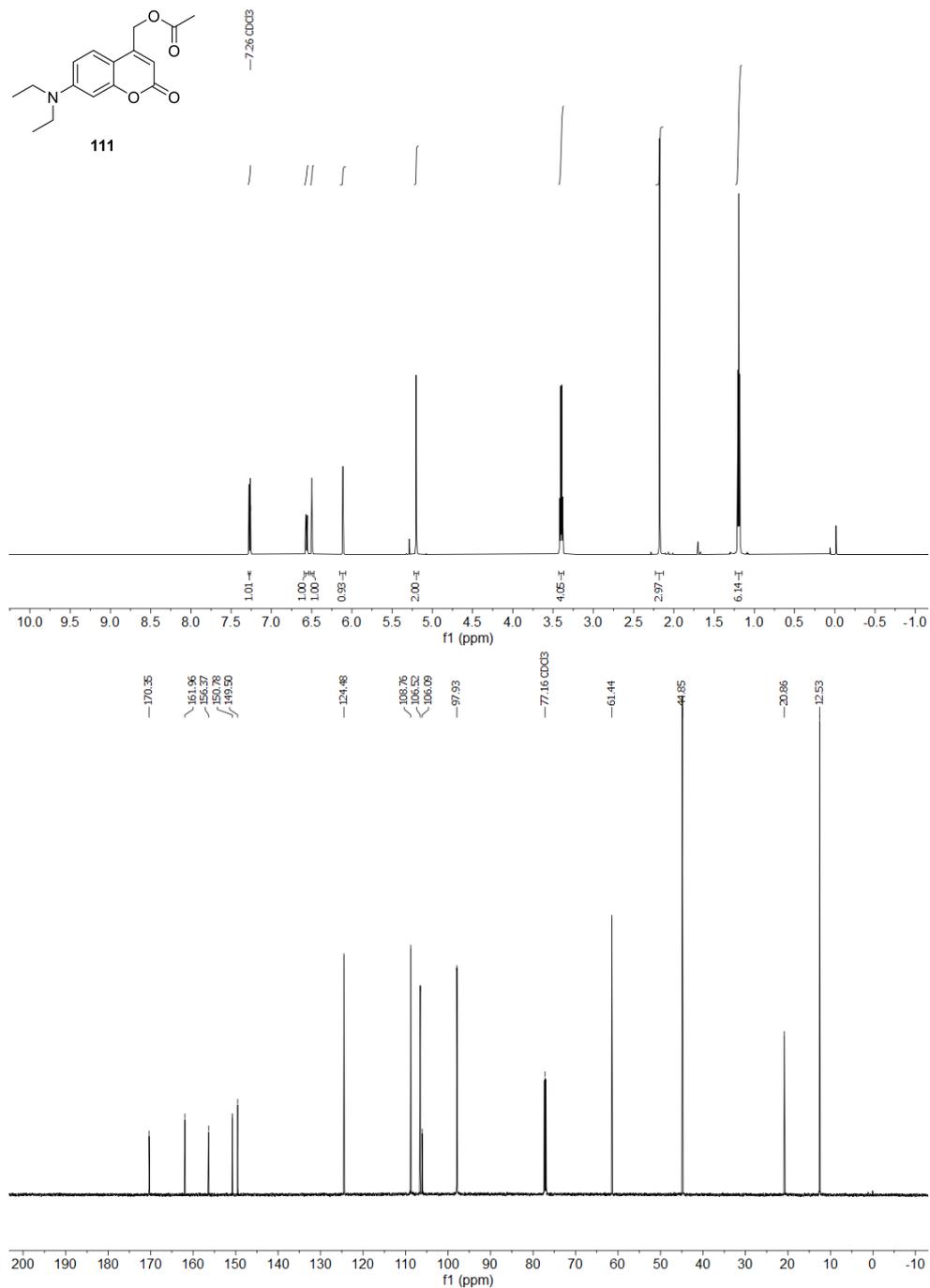


Abbildung 114: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **111** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

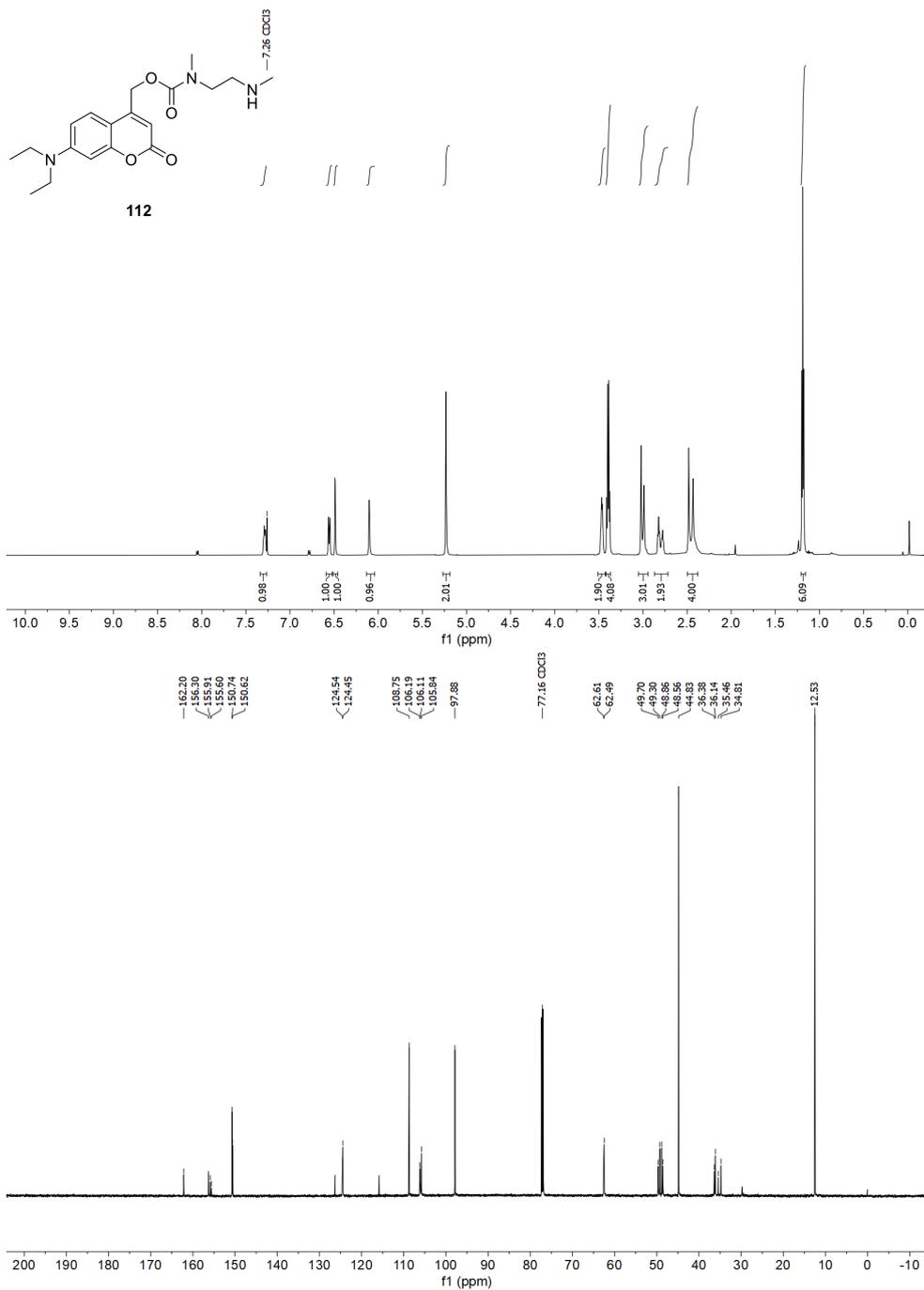


Abbildung 115: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **112** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

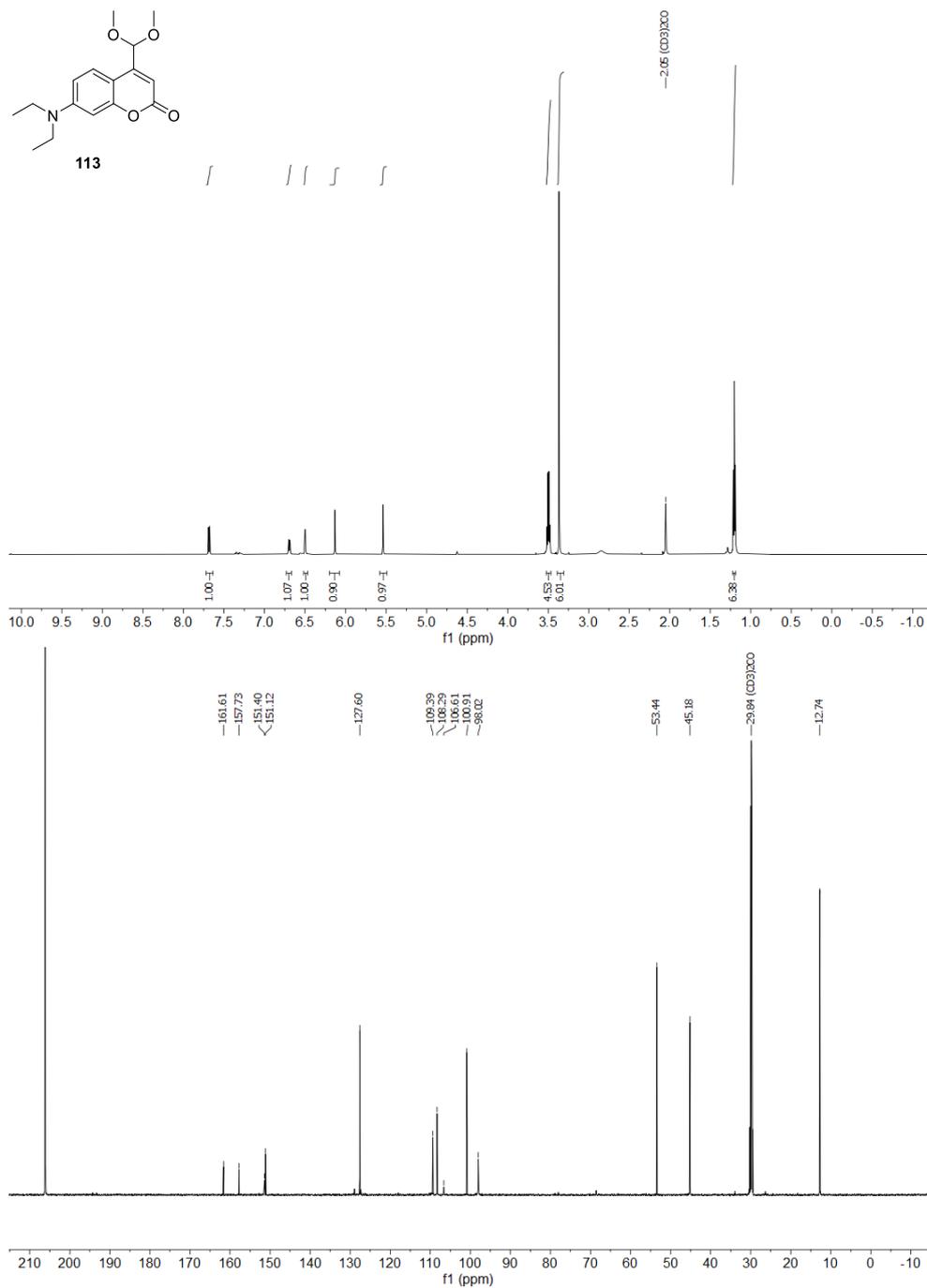


Abbildung 116: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **113** in $\text{Aceton-}d_6$ (600 MHz/151 MHz).

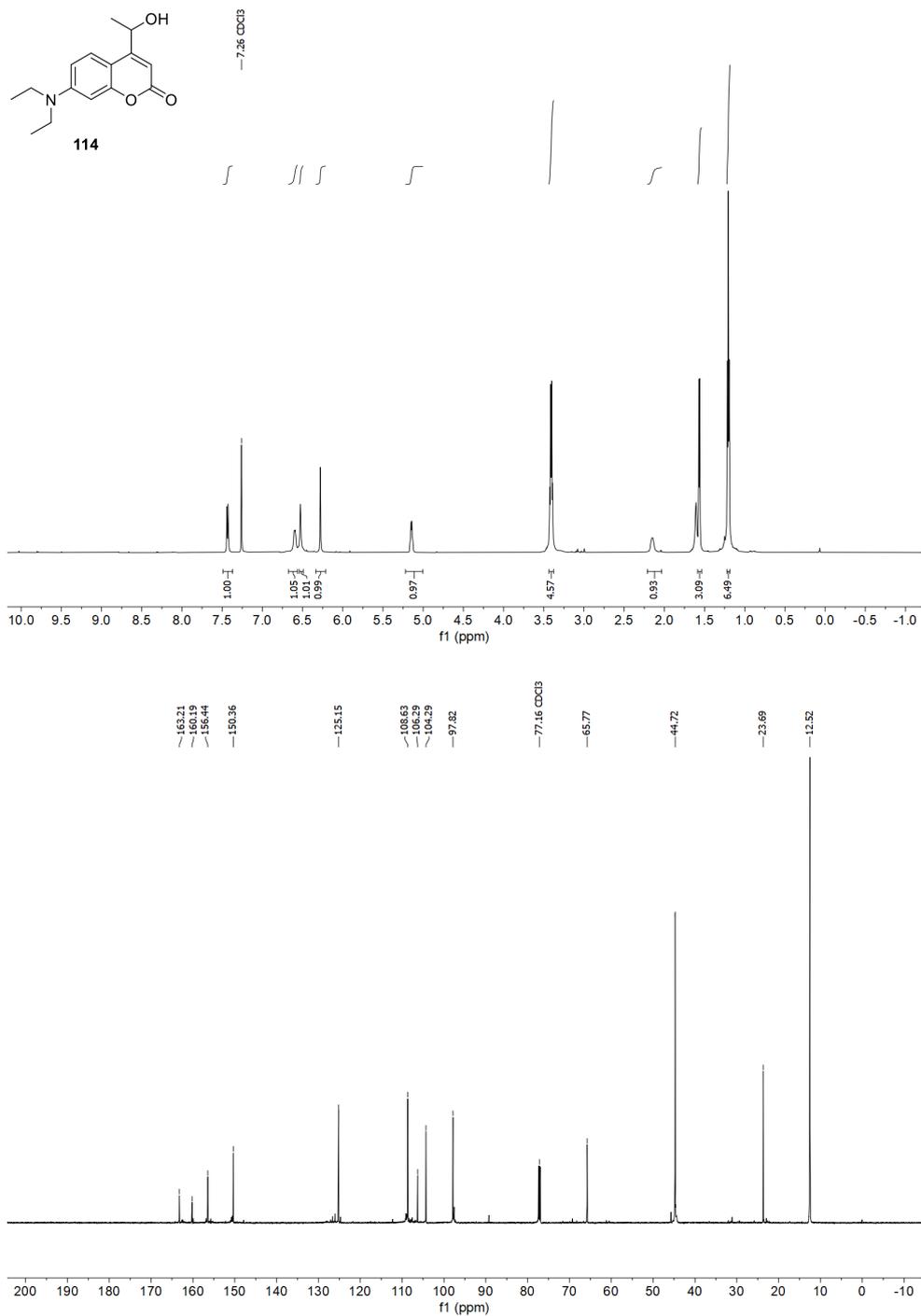


Abbildung 117: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **114** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

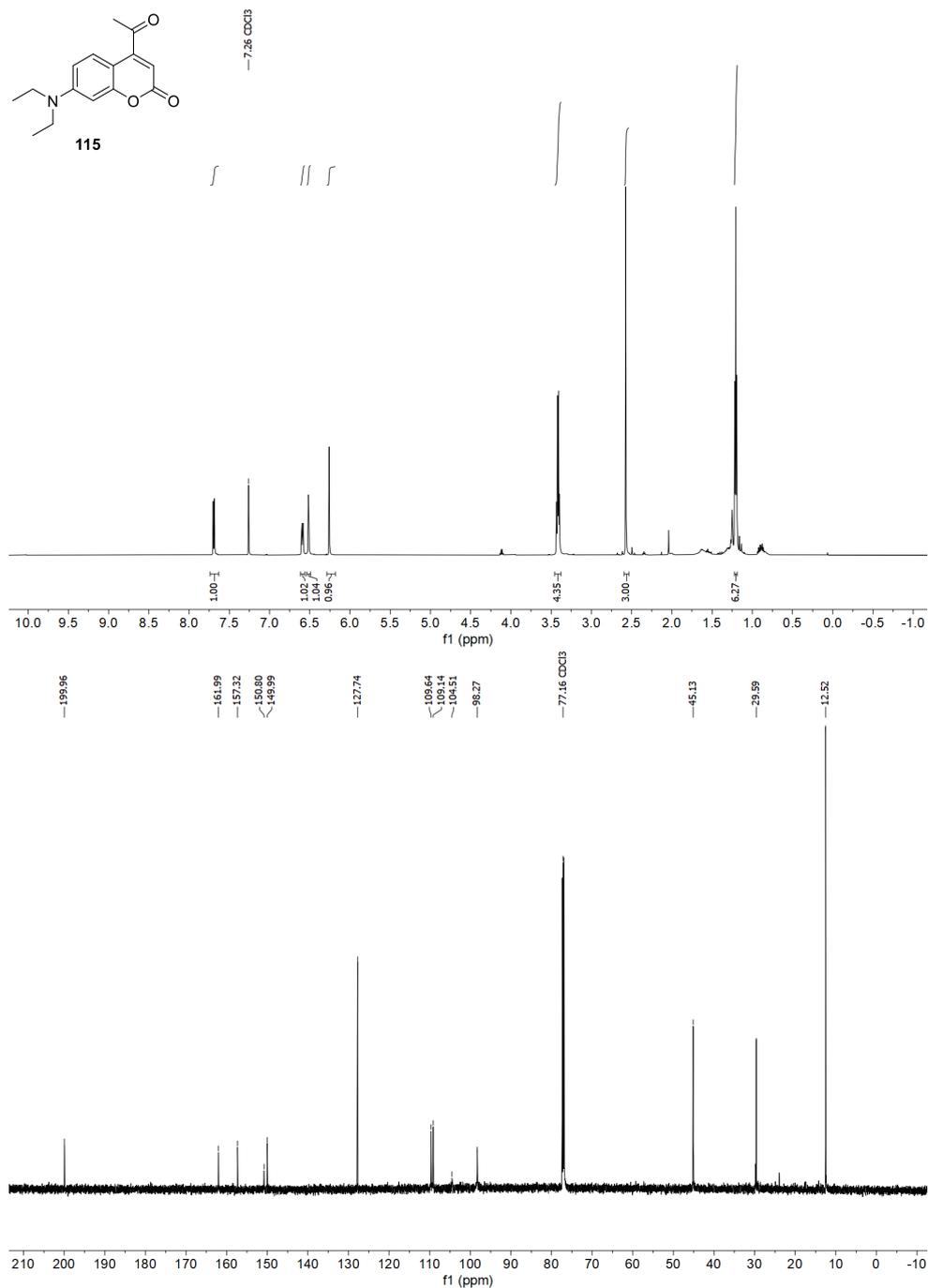


Abbildung 118: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **115** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

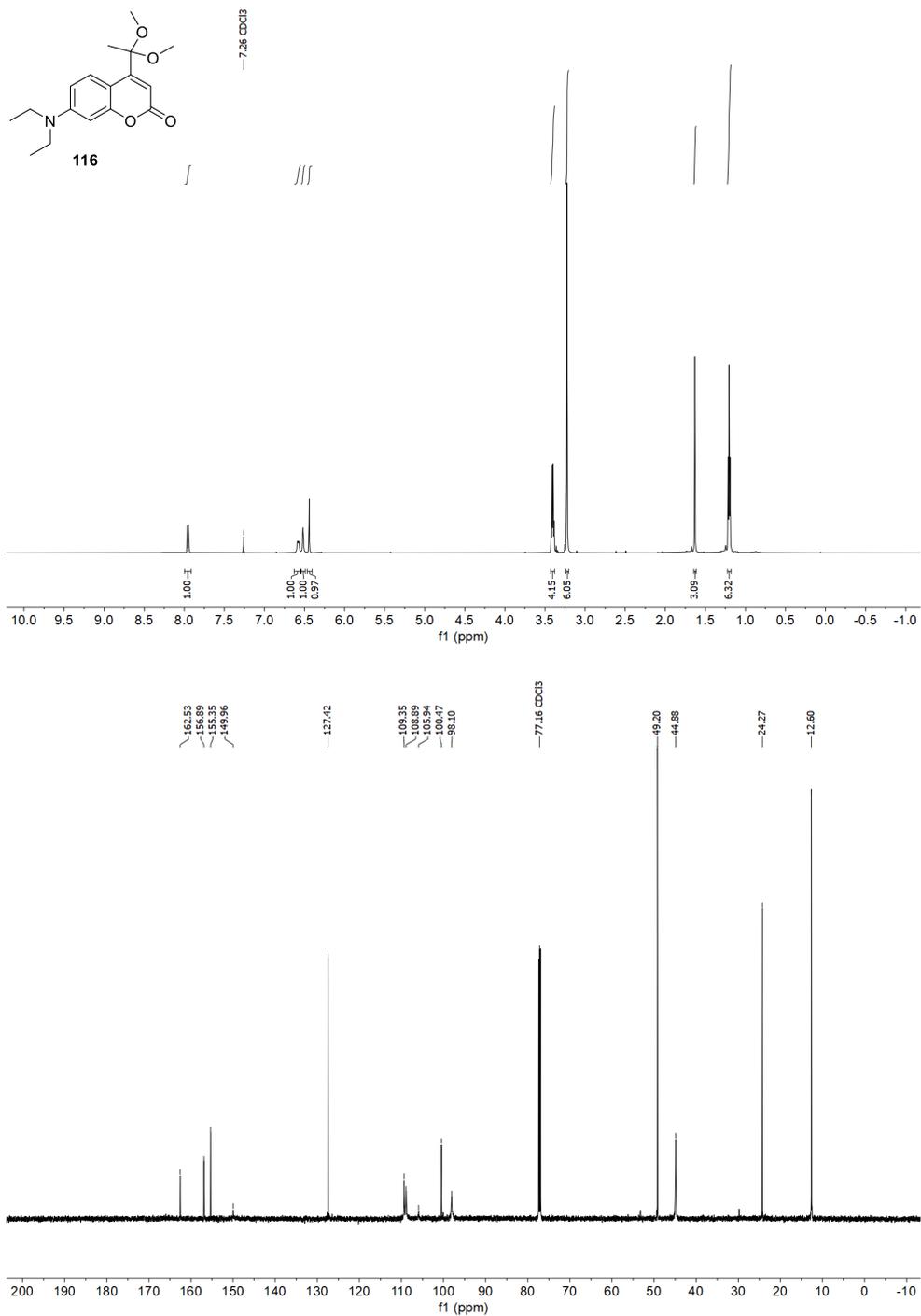


Abbildung 119: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **116** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

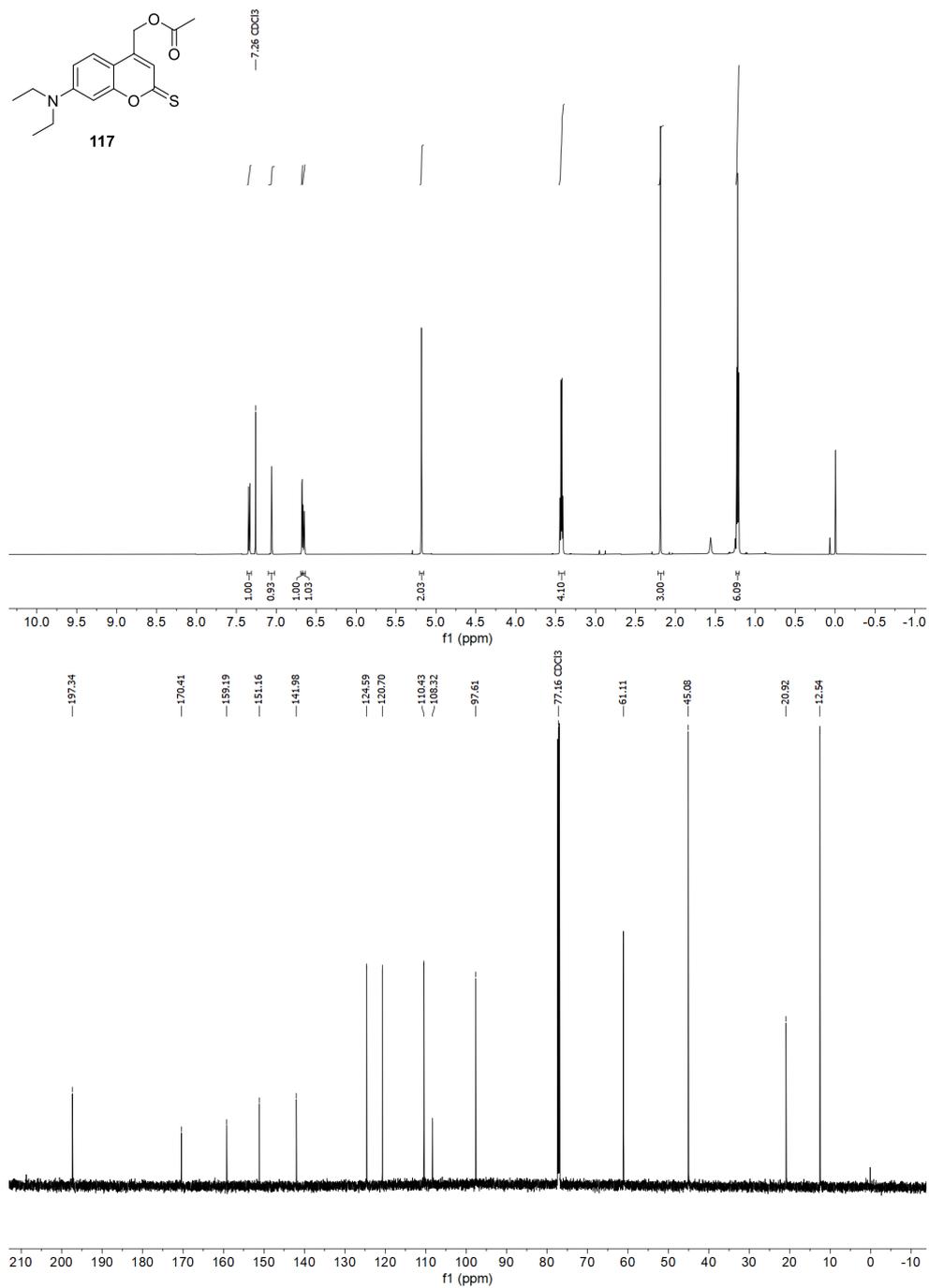


Abbildung 120: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **117** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

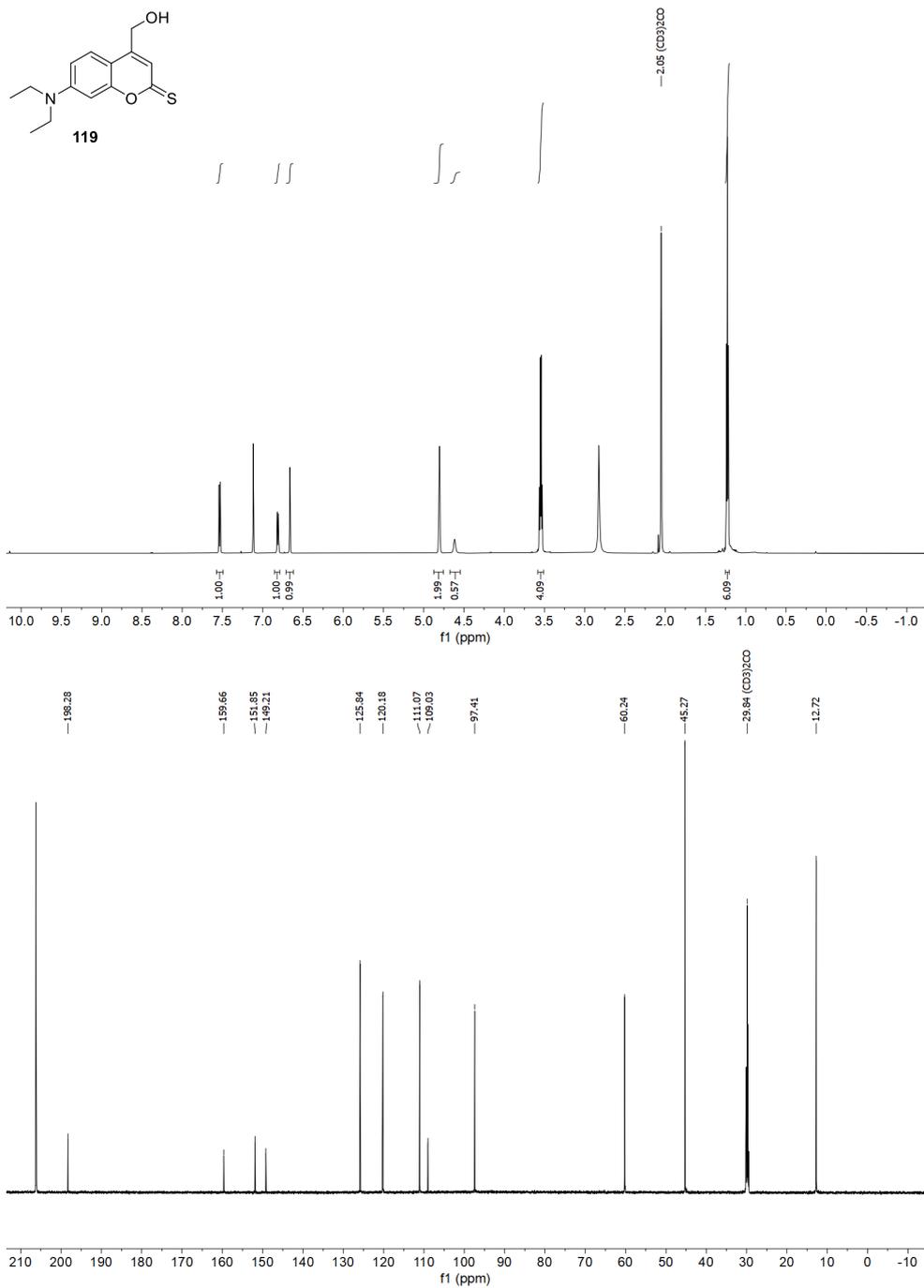


Abbildung 121: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **119** in Aceton- d_6 (600 MHz/151 MHz).

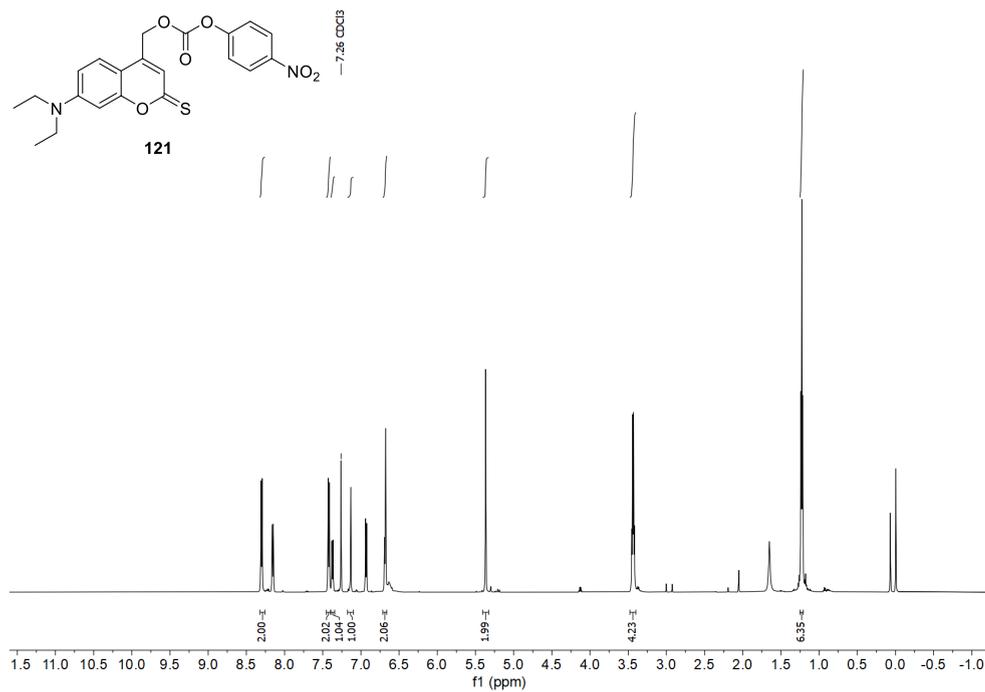


Abbildung 122: ¹H-Spektrum von **121** in CDCl₃ (600 MHz).

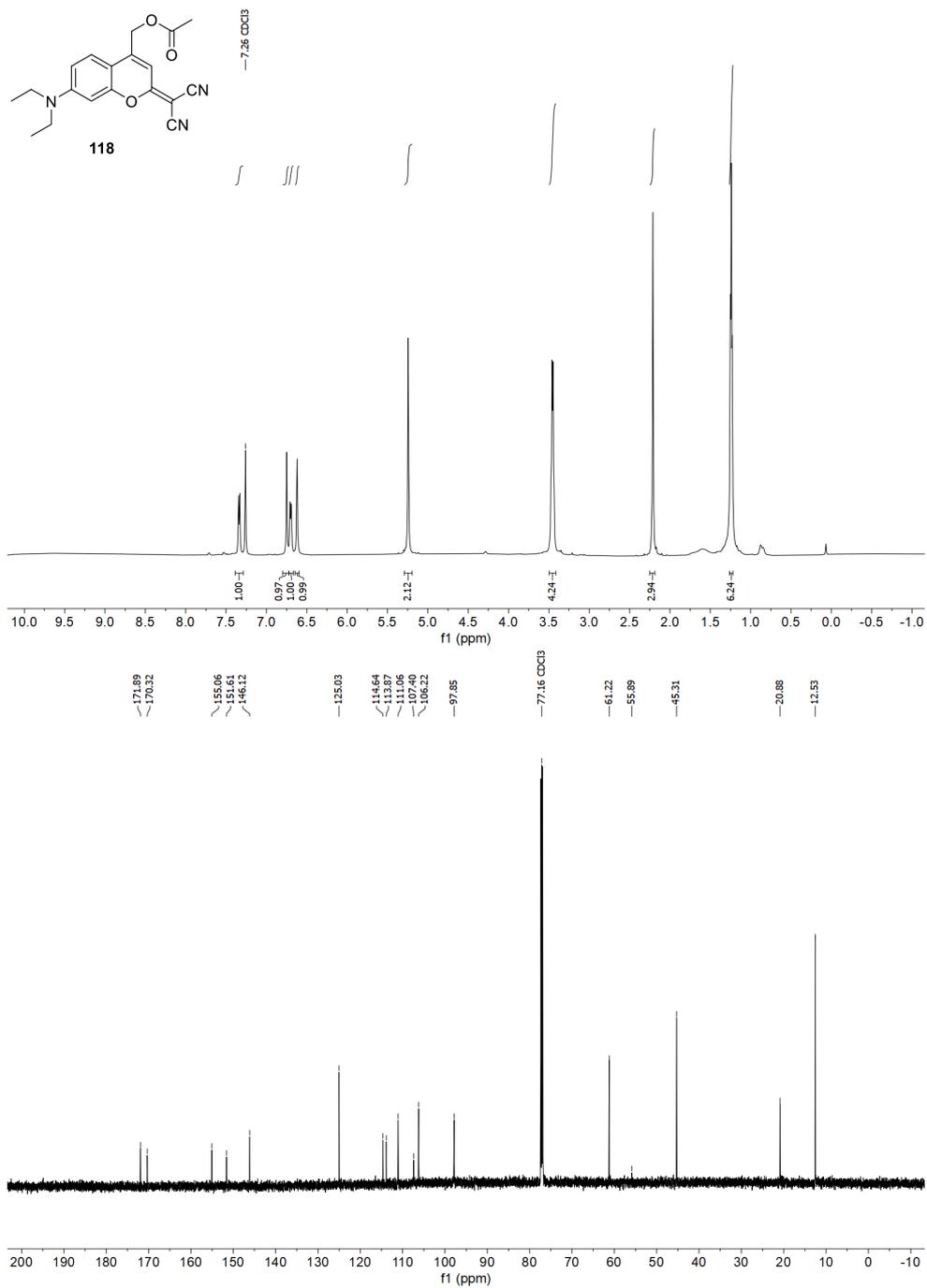


Abbildung 123: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **118** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

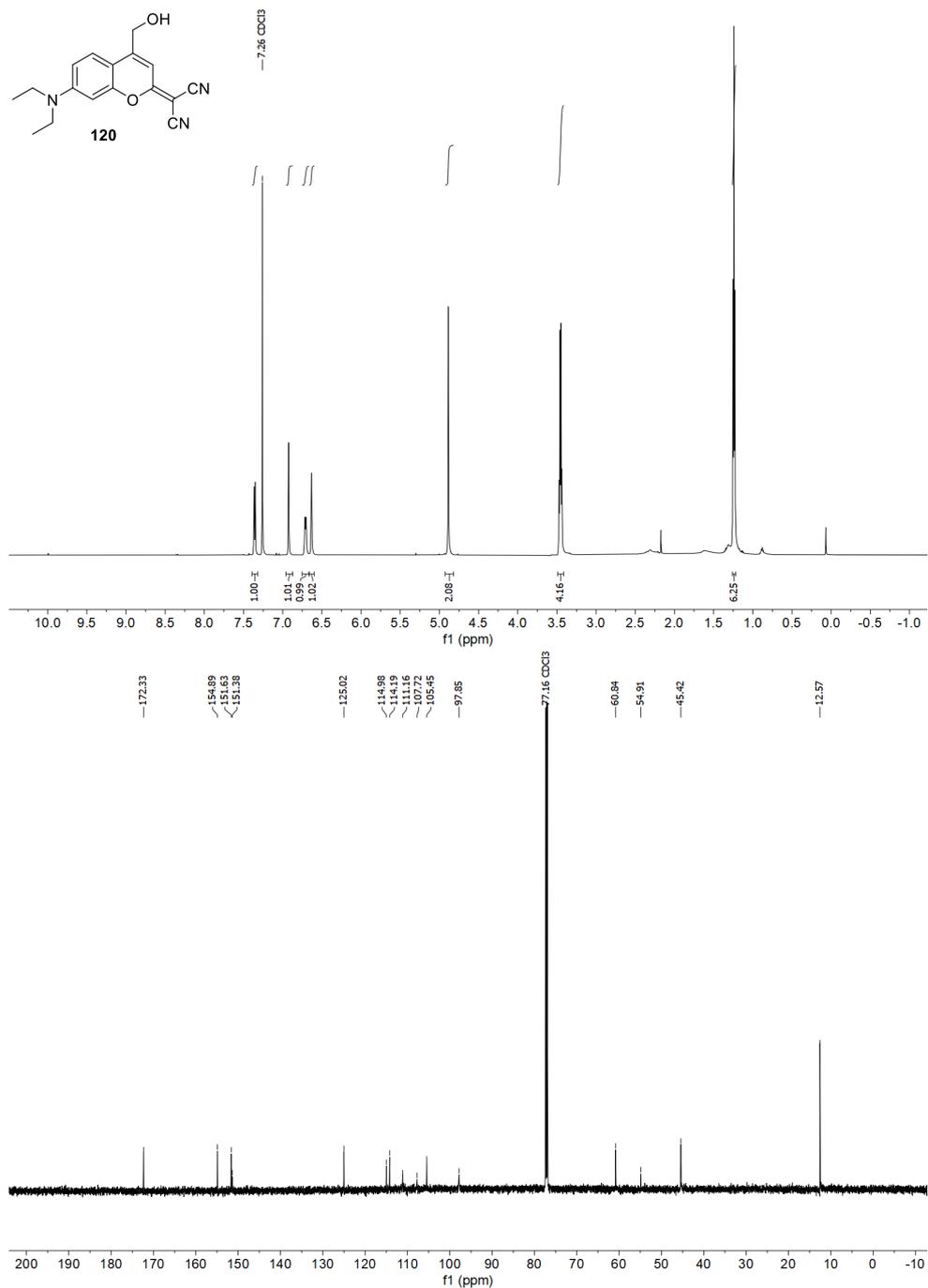


Abbildung 124: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **120** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

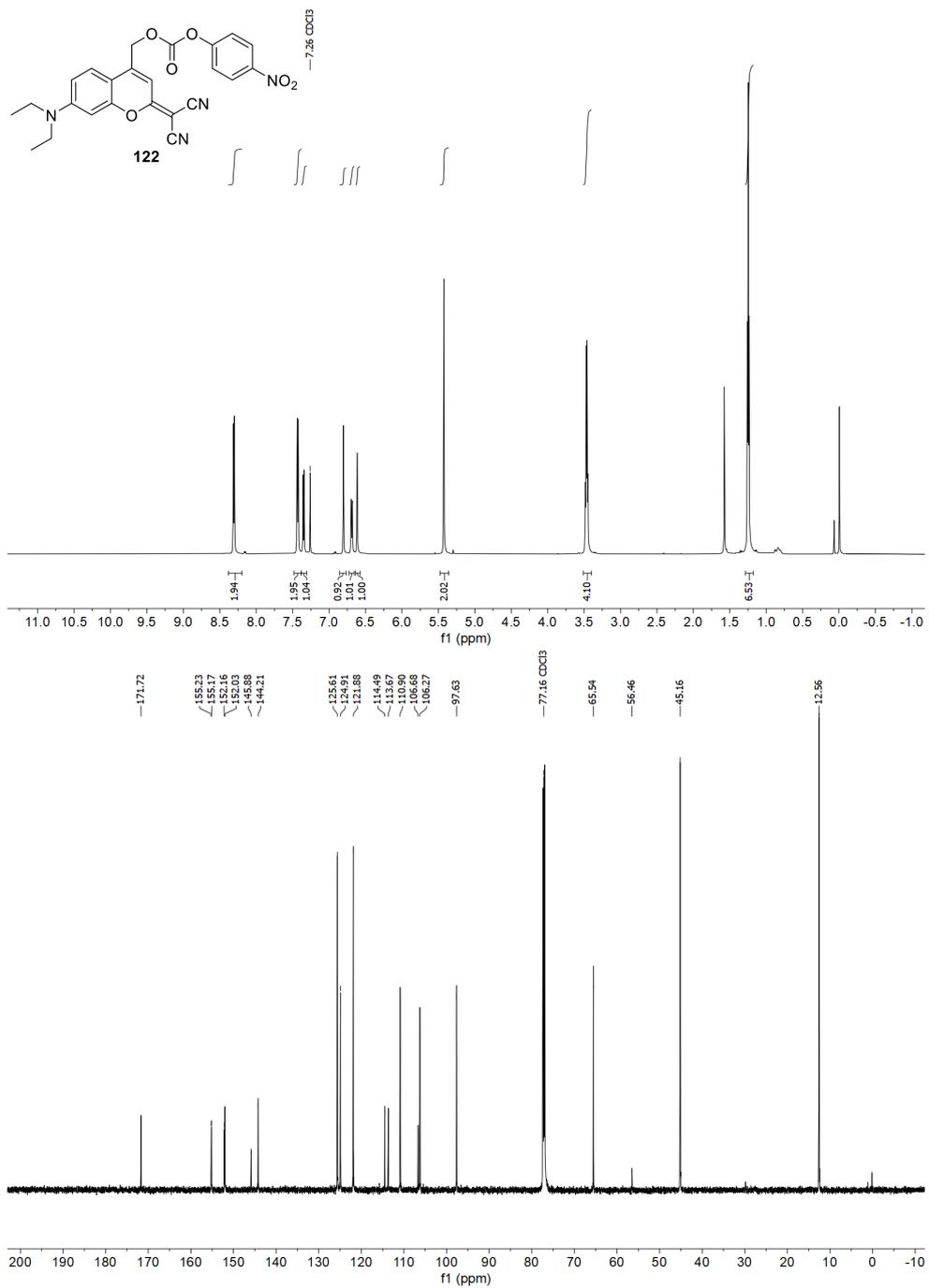


Abbildung 125: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **122** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

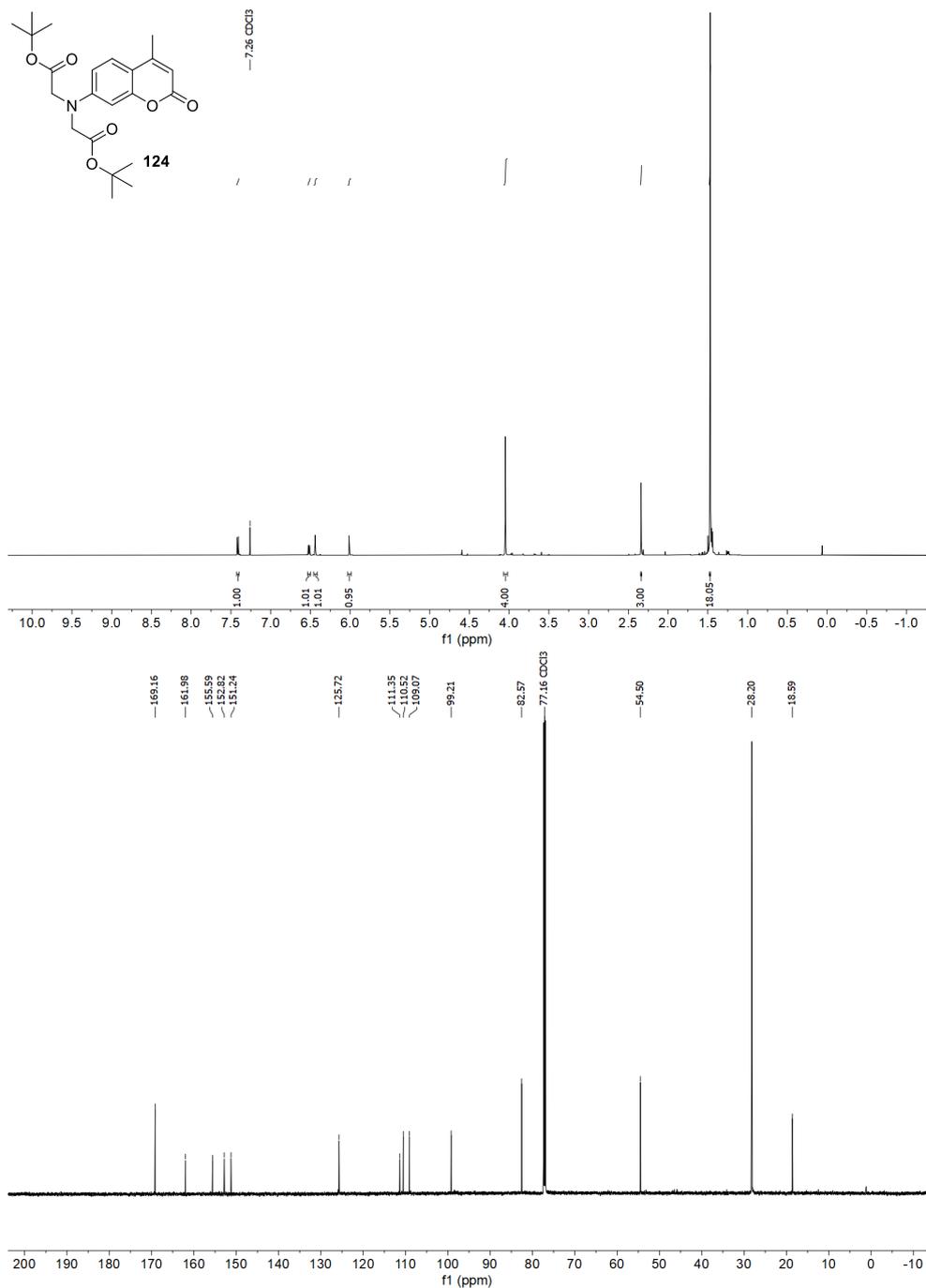


Abbildung 126: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **124** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

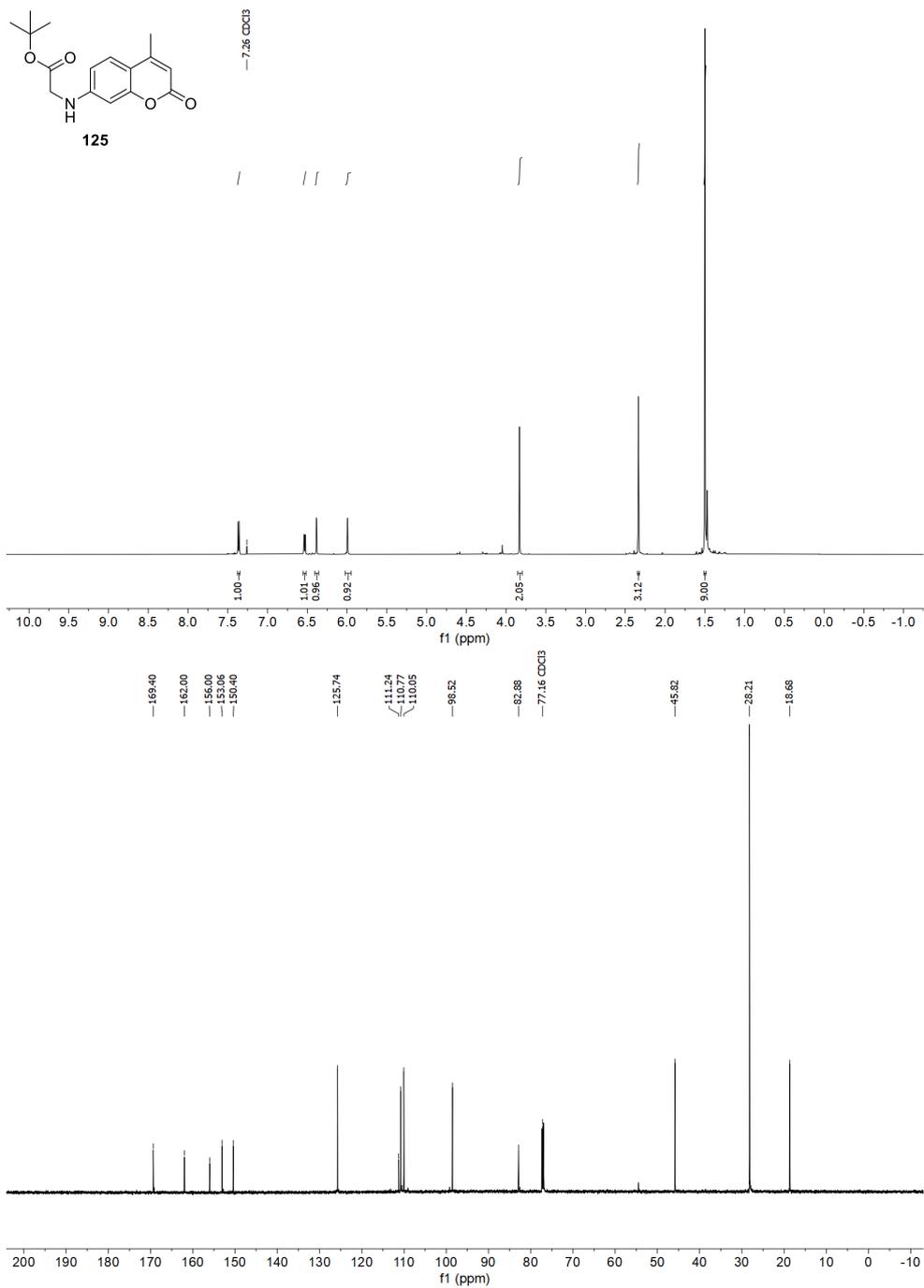


Abbildung 127: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **125** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

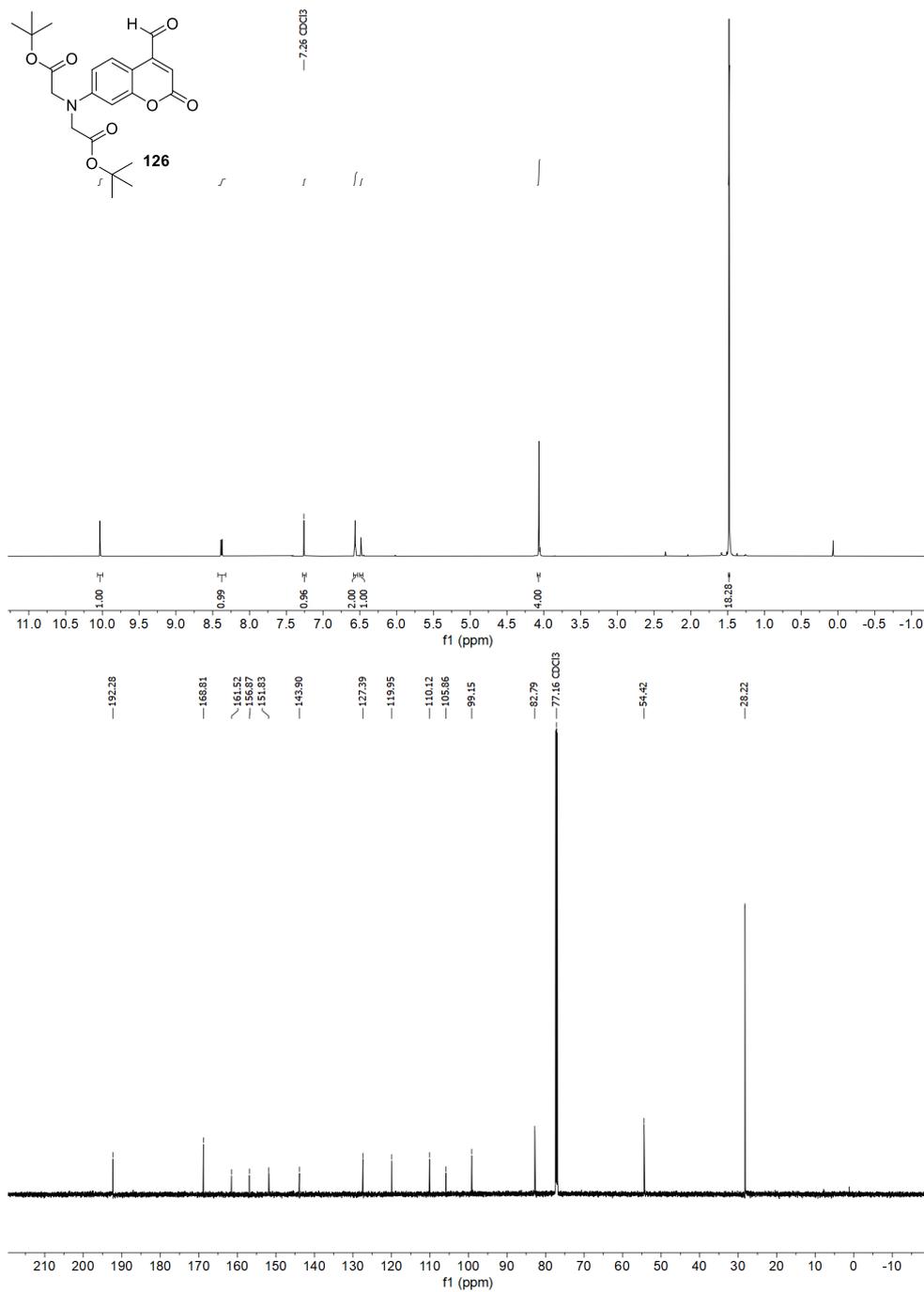


Abbildung 128: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **126** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

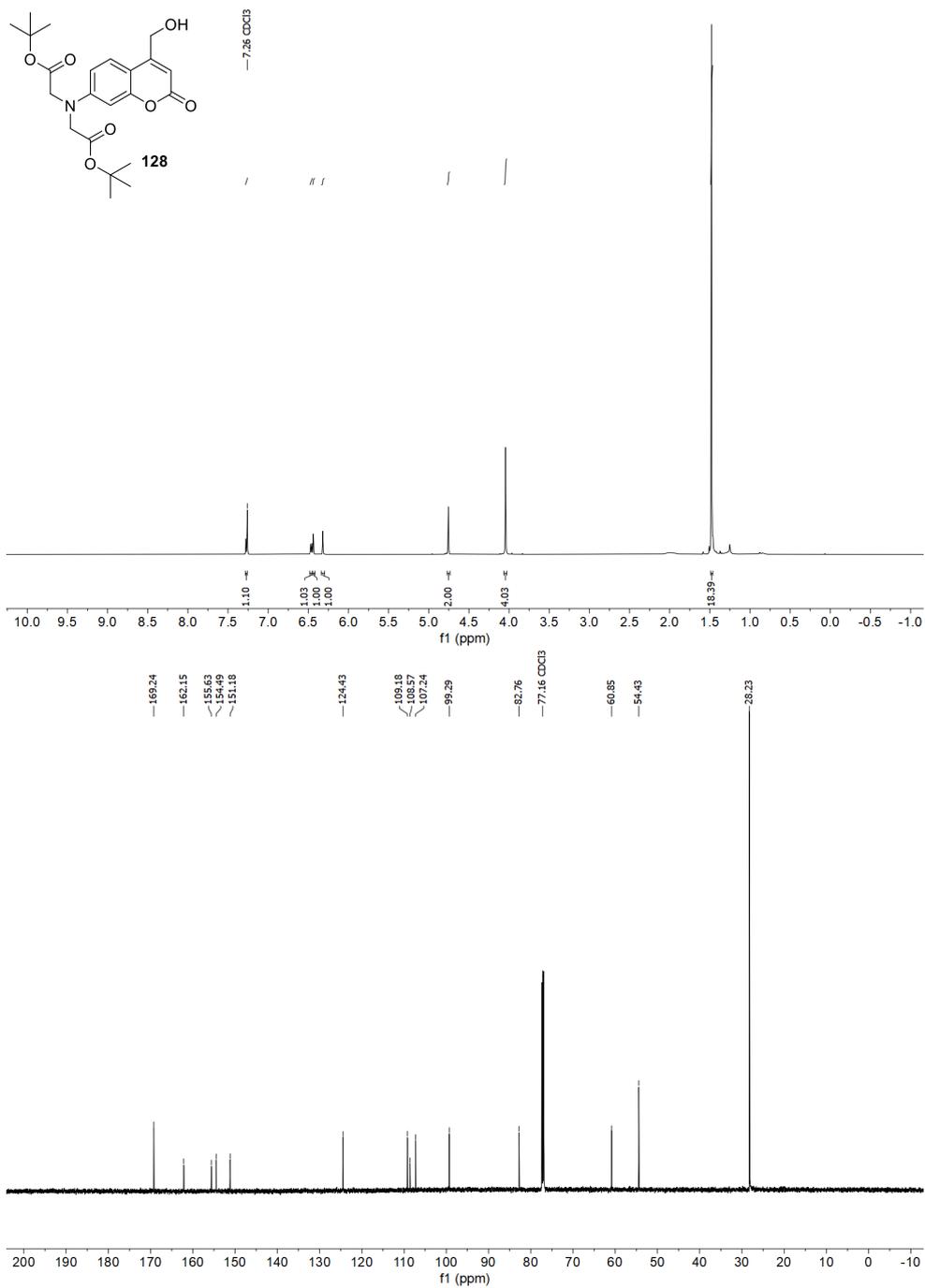


Abbildung 129: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **128** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

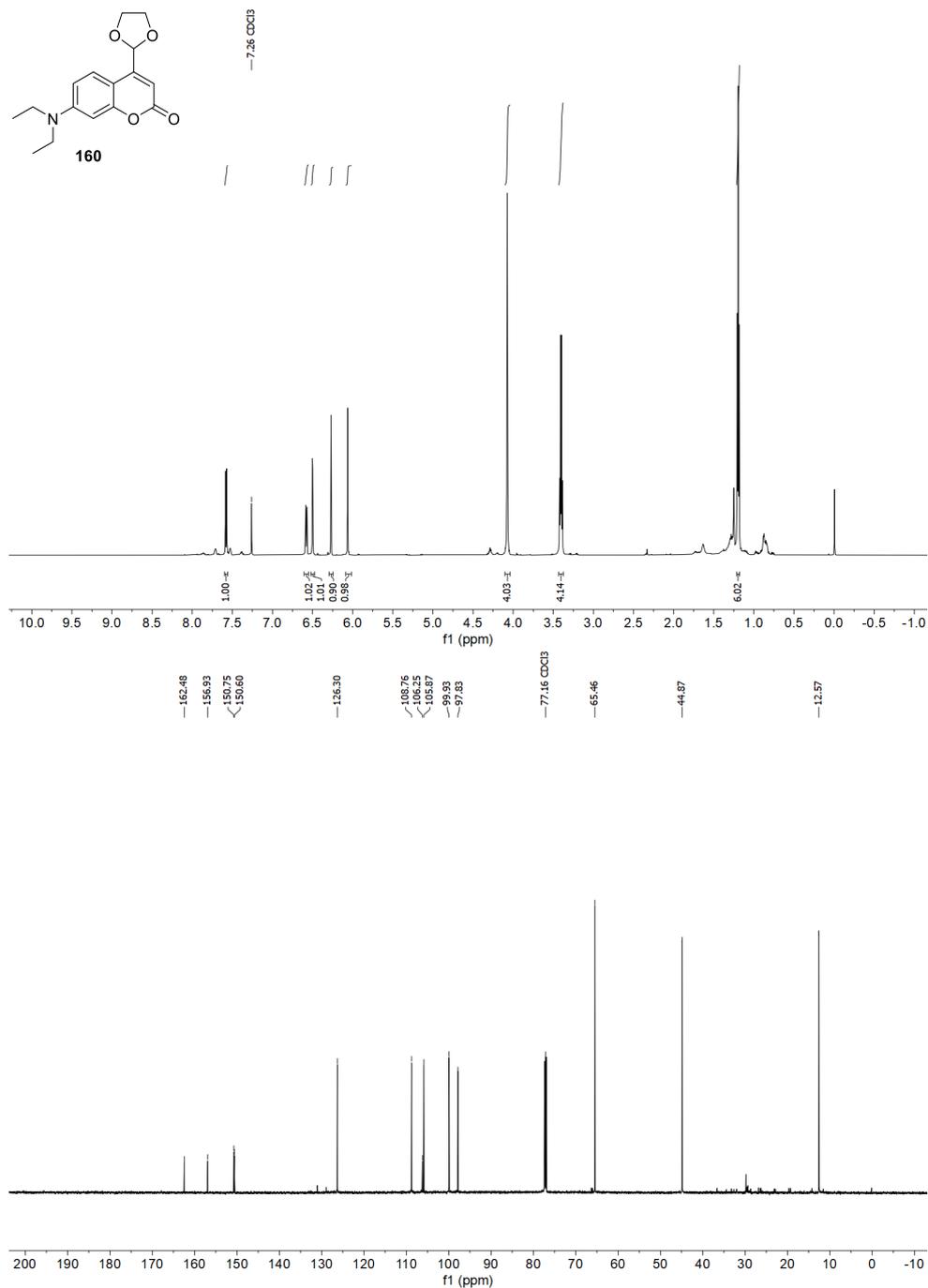


Abbildung 130: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **160** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

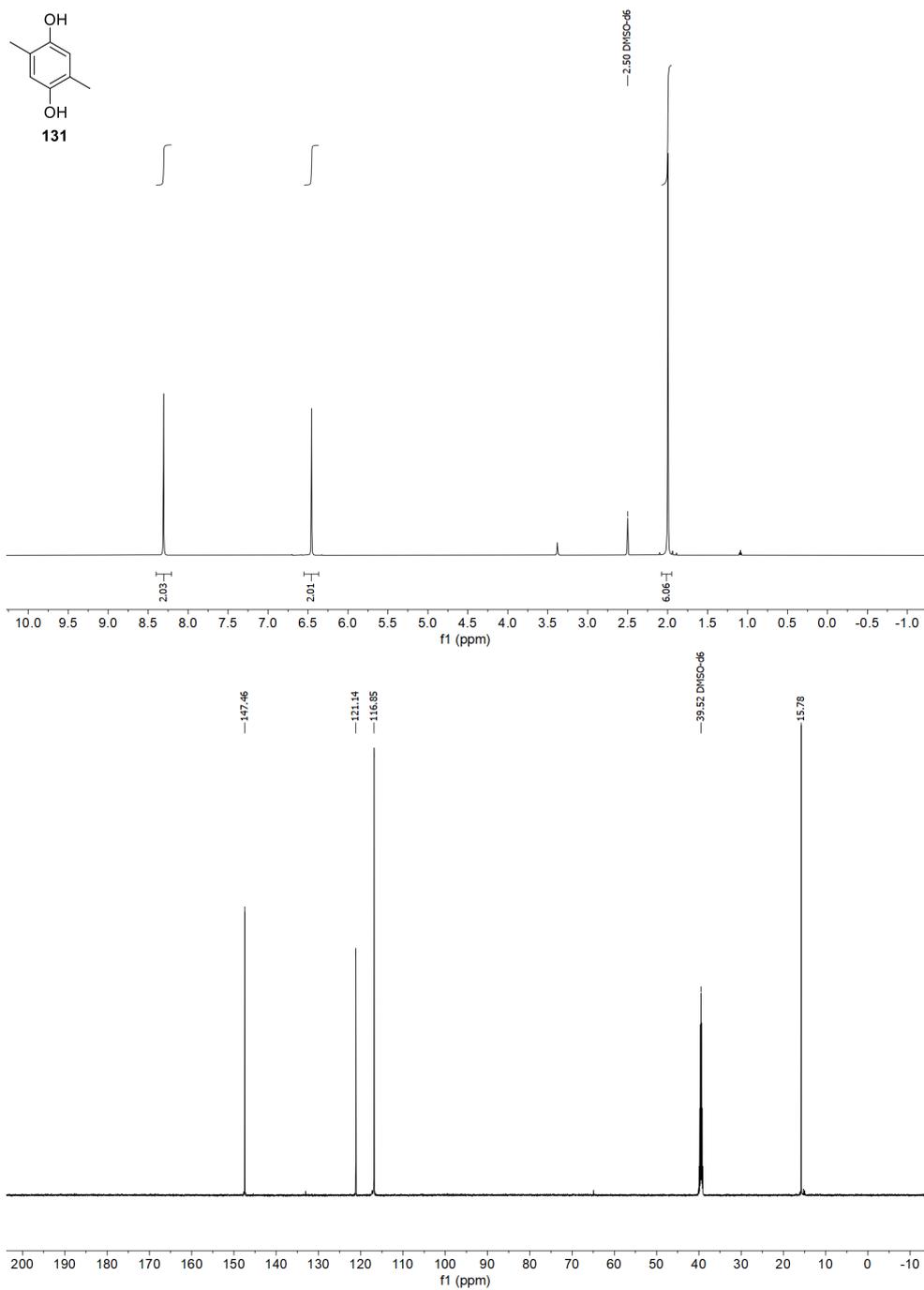


Abbildung 131: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **131** in $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz/151 MHz).

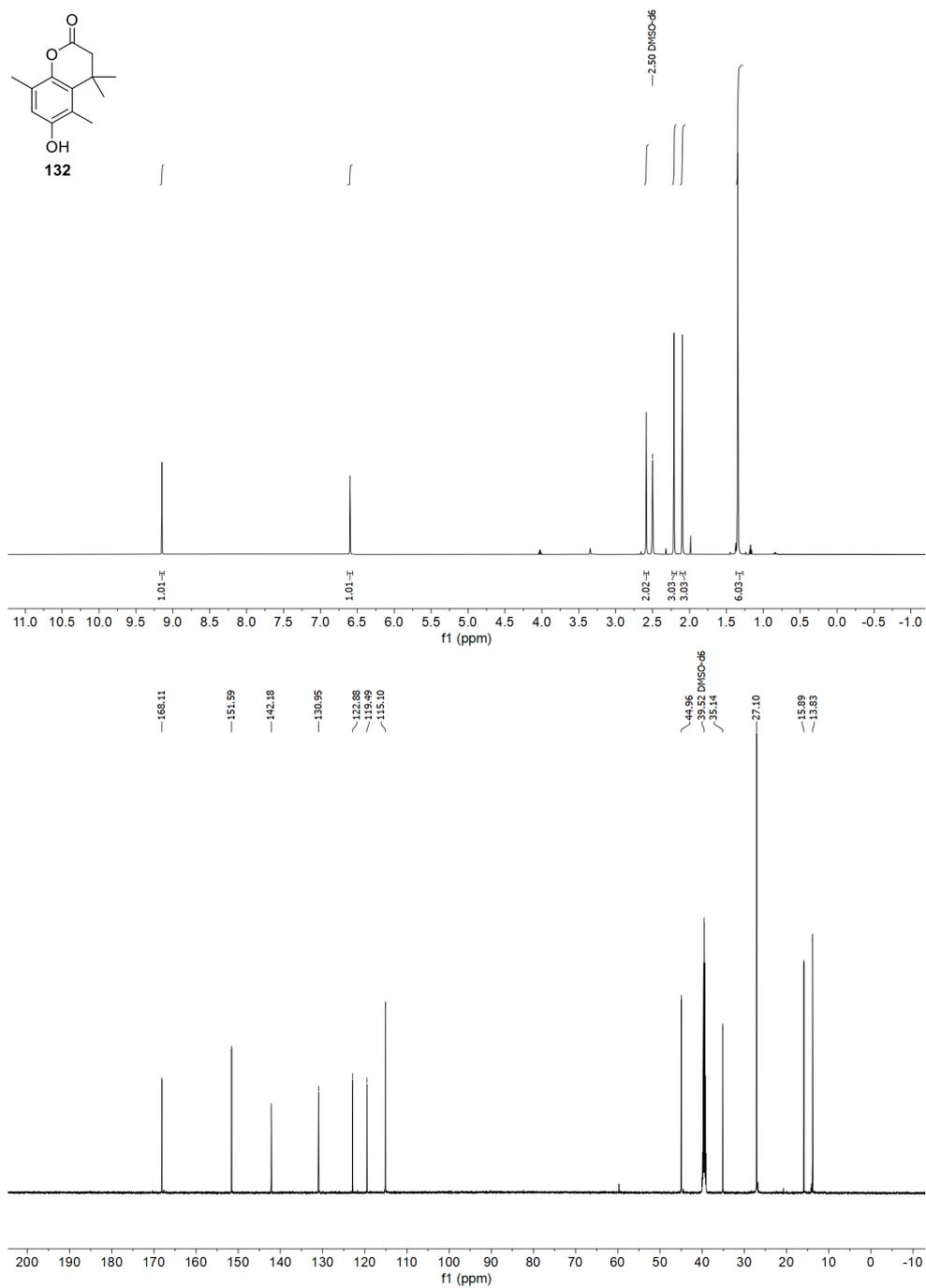


Abbildung 132: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **132** in DMSO-*d*₆ (600 MHz/151 MHz).

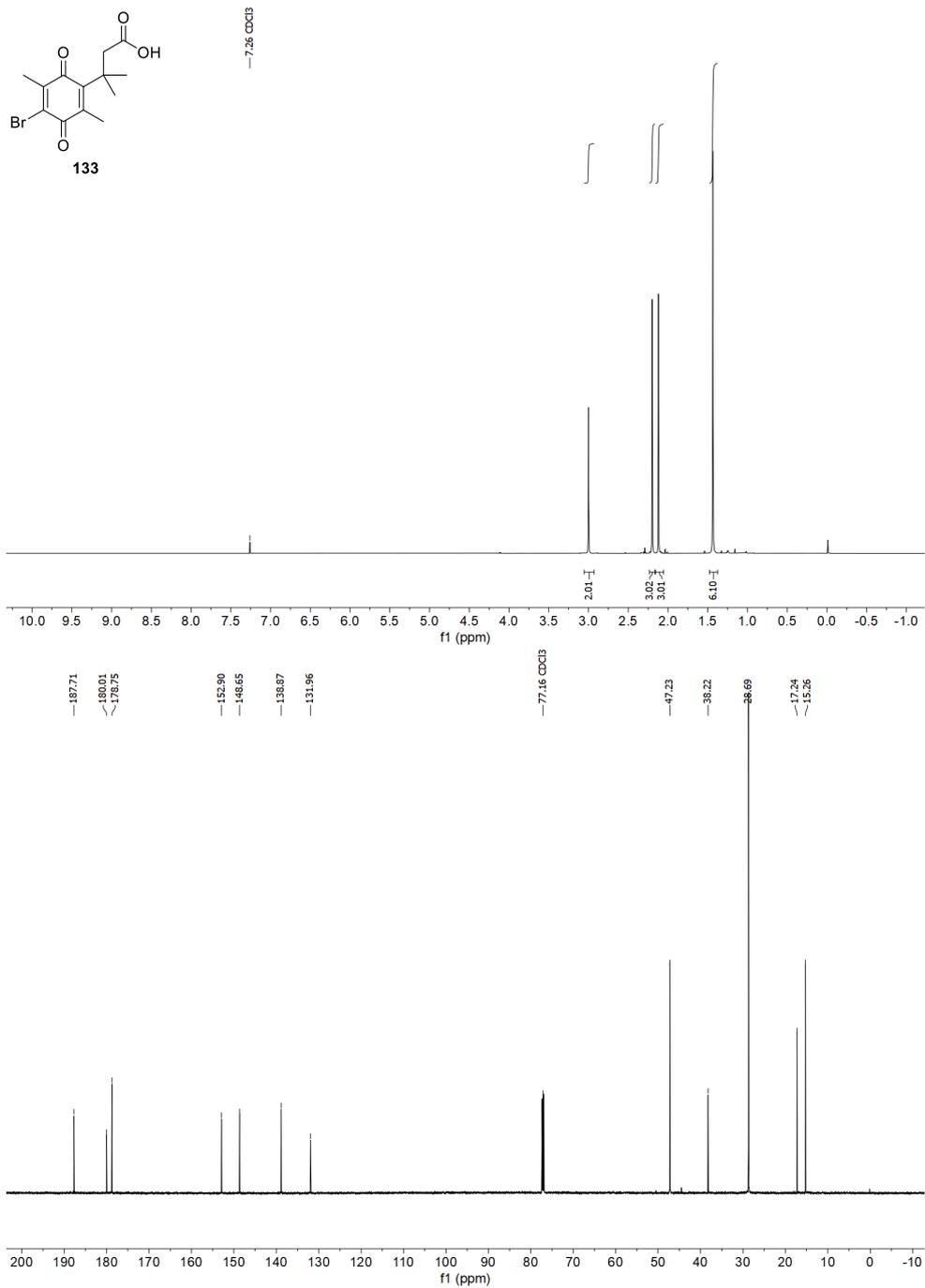


Abbildung 133: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **133** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

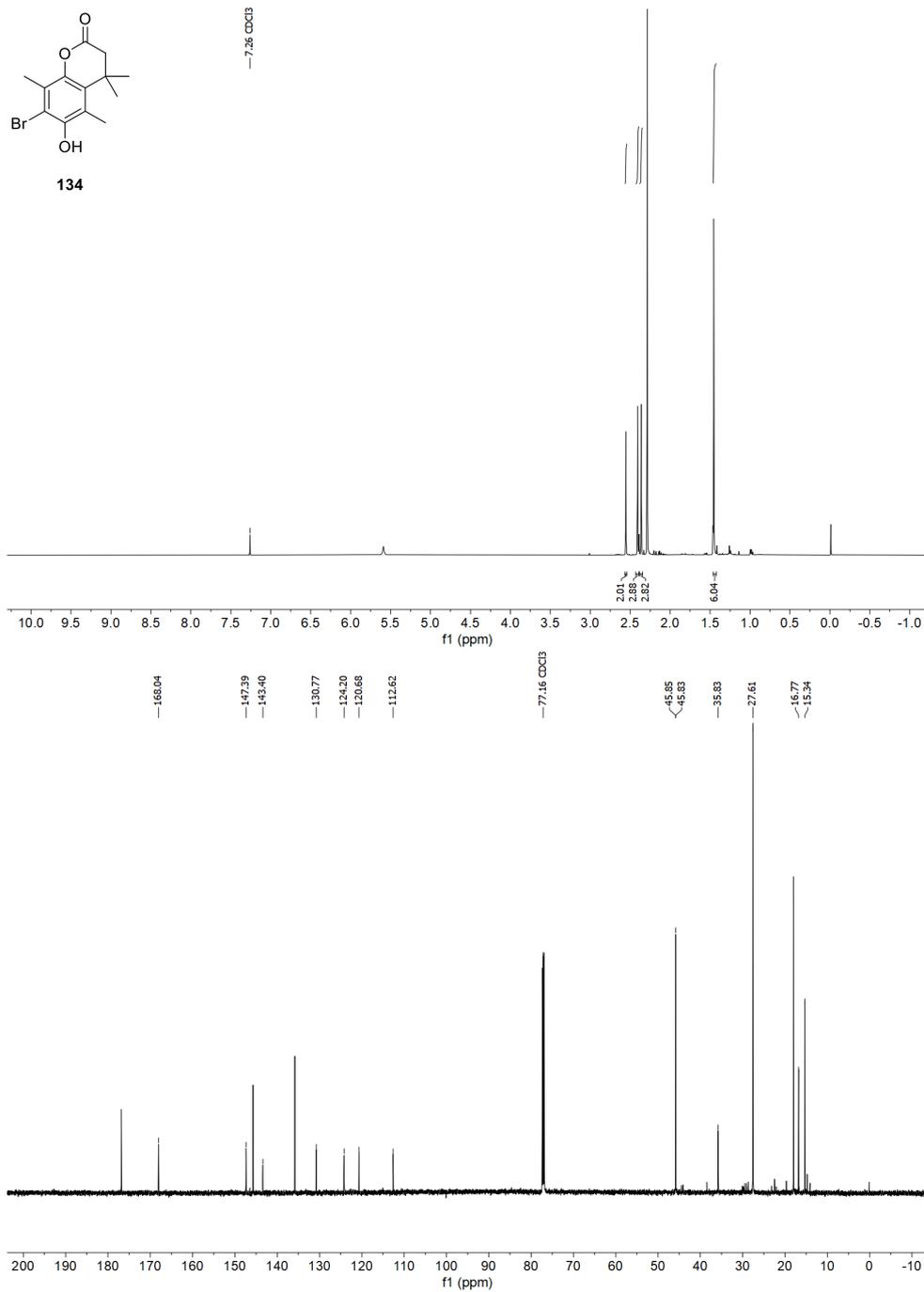


Abbildung 134: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **134** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

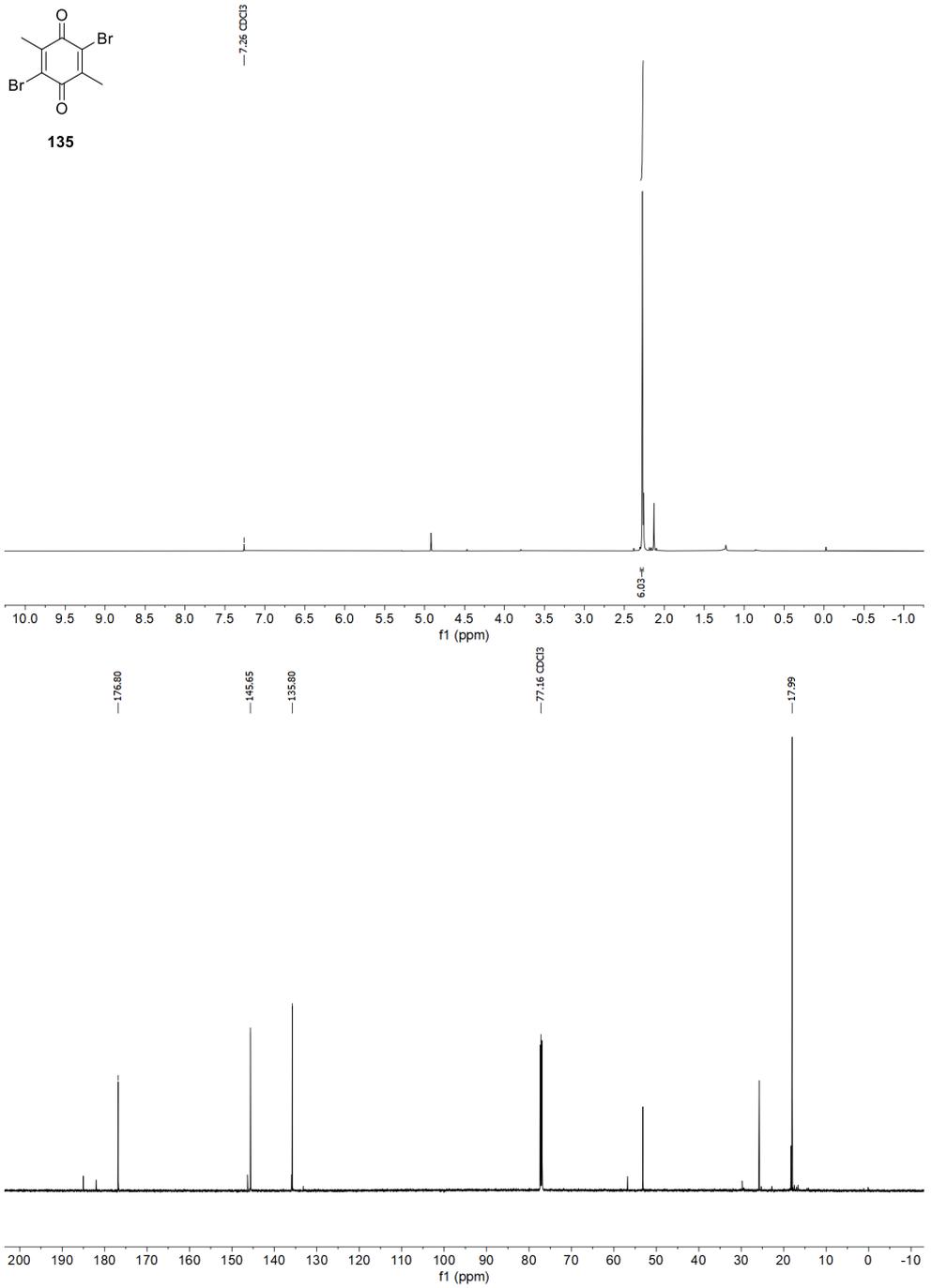


Abbildung 135: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **135** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

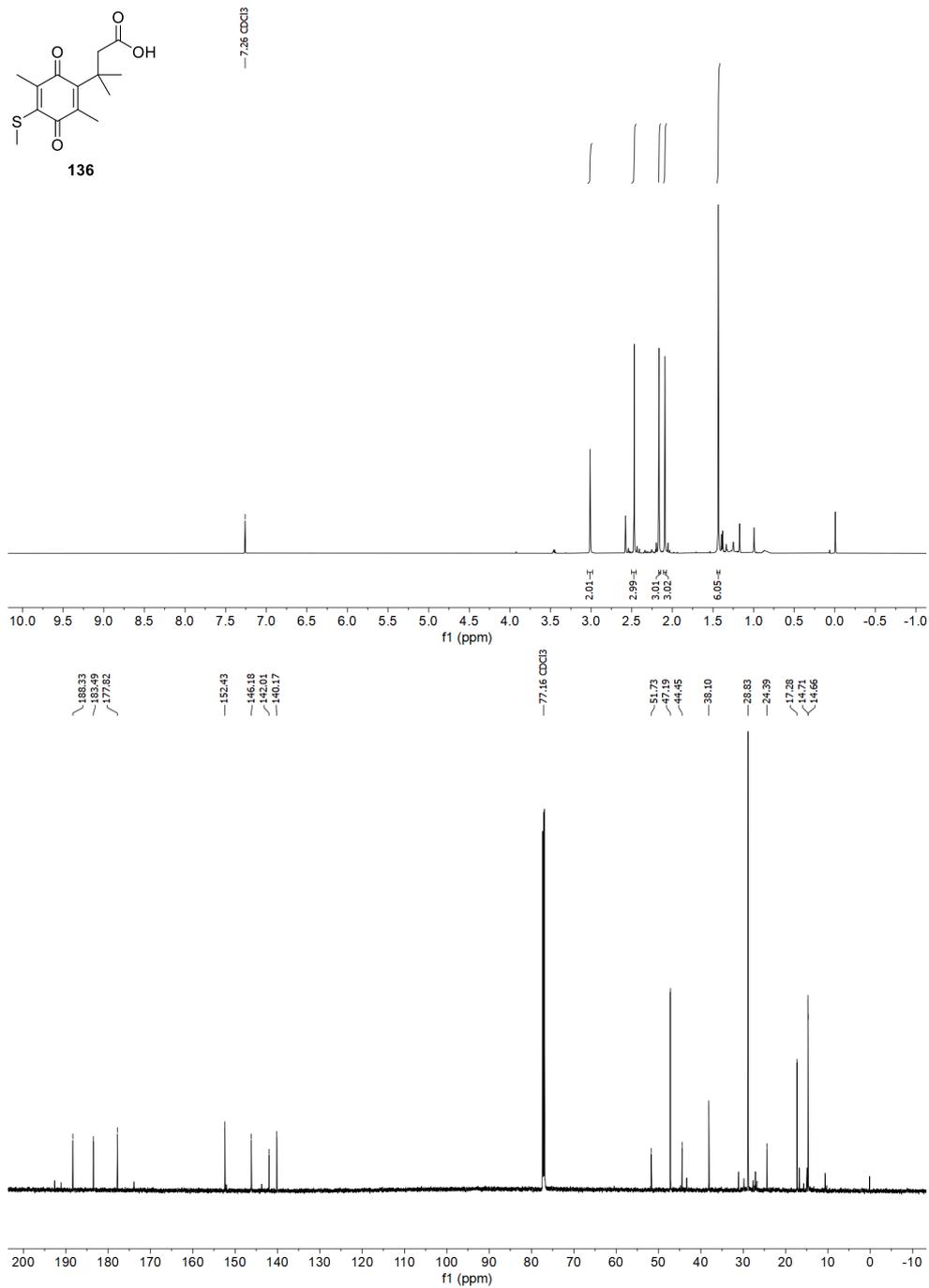


Abbildung 136: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **136** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

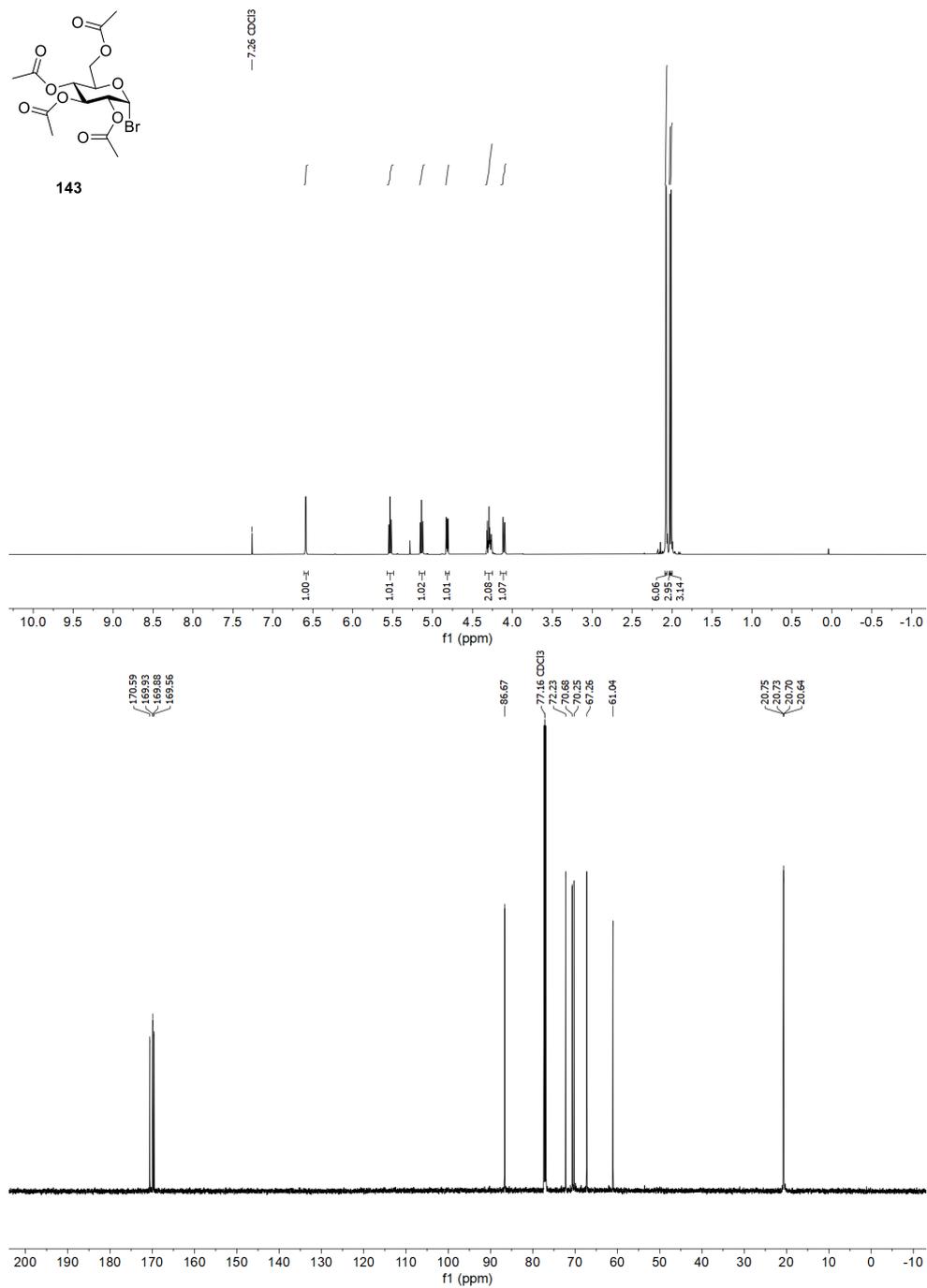


Abbildung 138: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **143** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

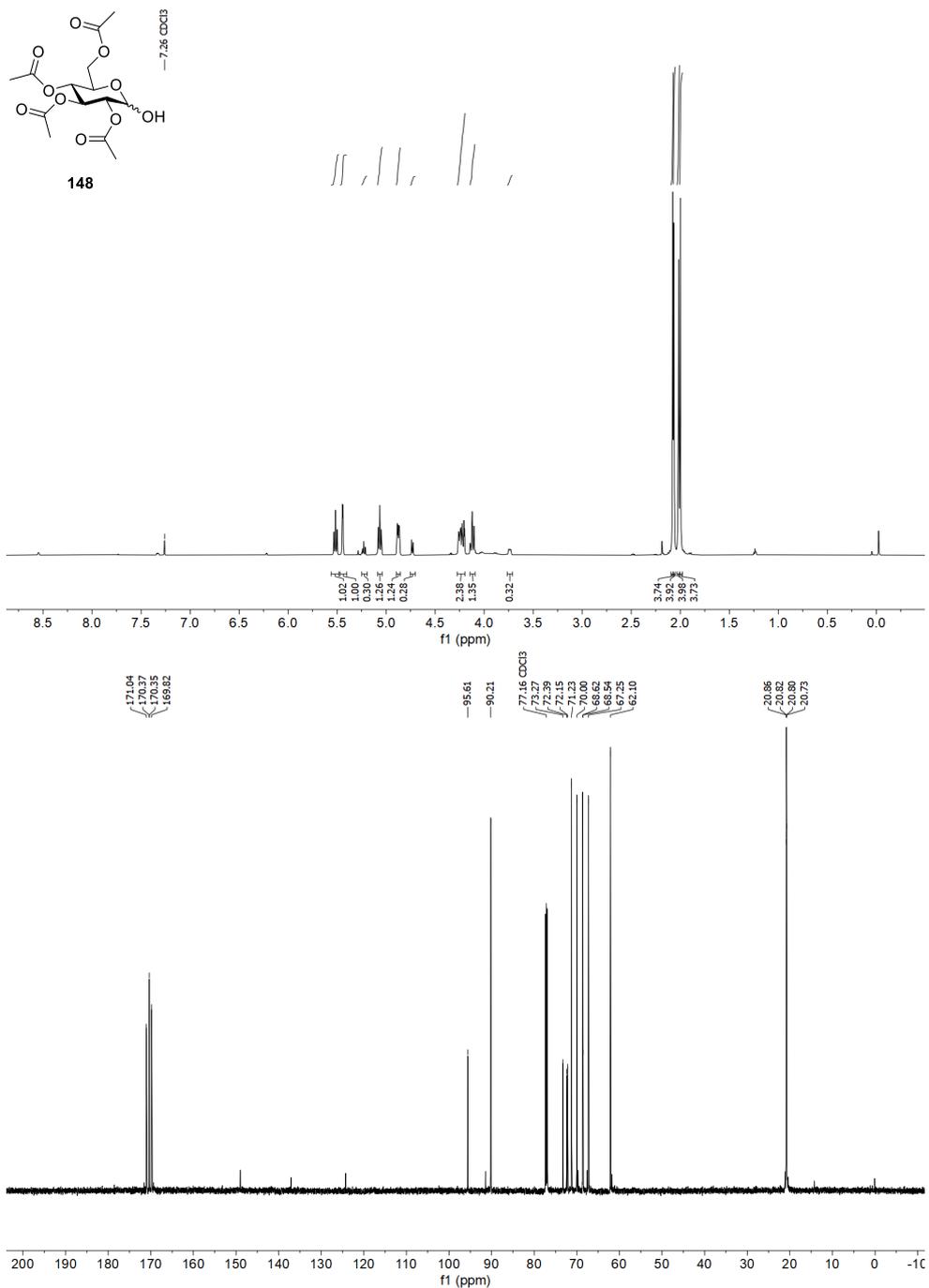


Abbildung 139: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **148** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

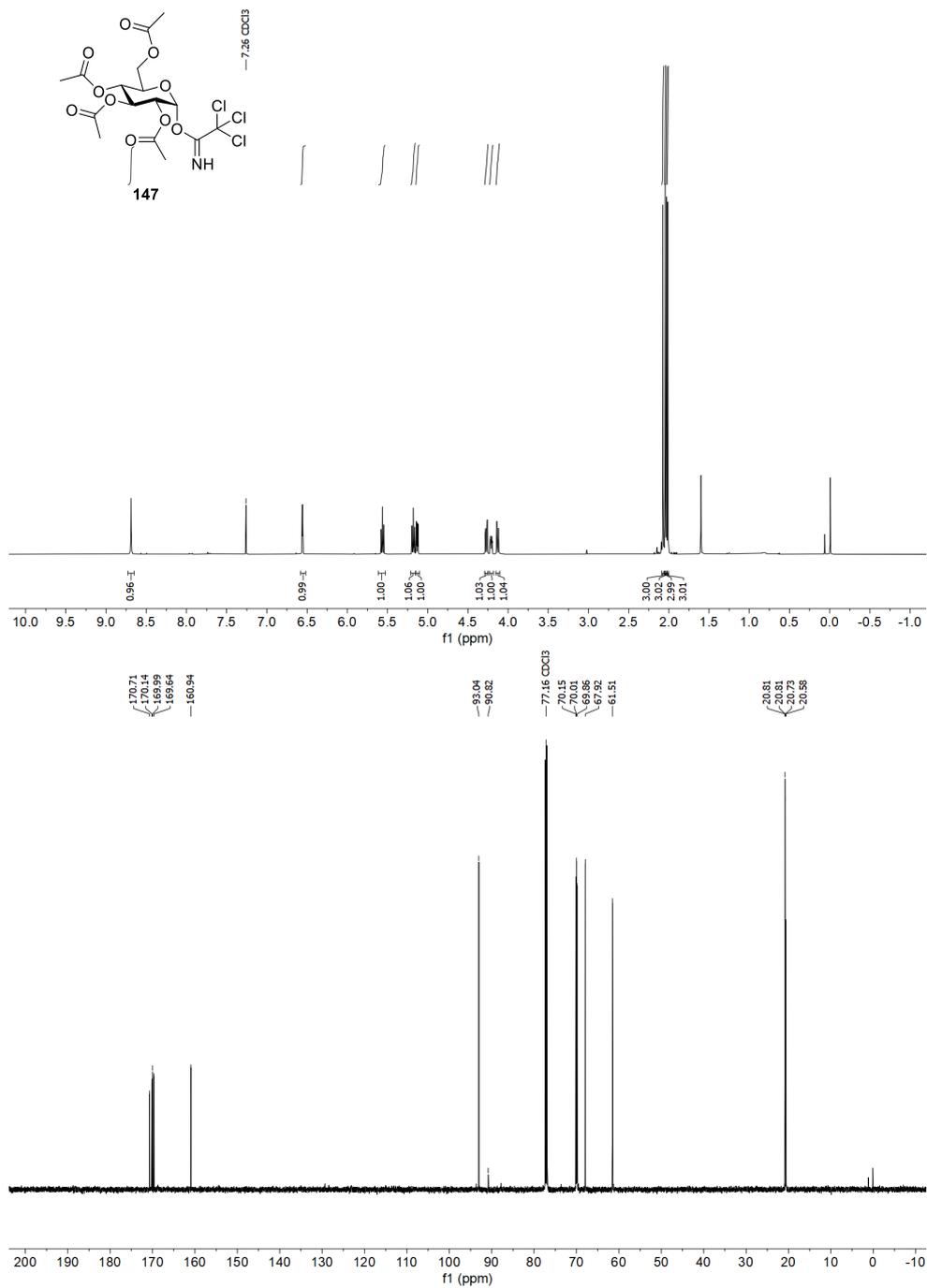


Abbildung 140: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **147** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

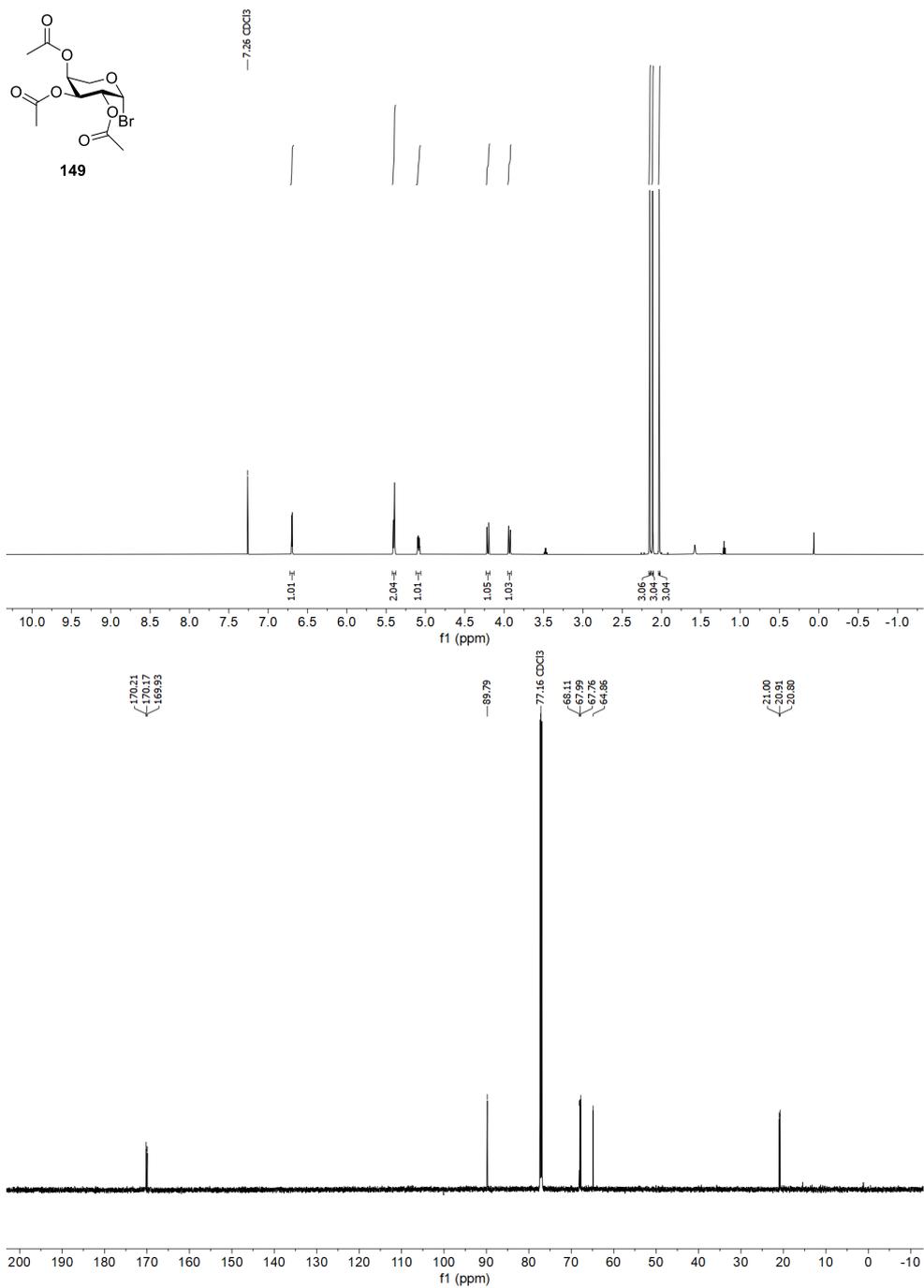


Abbildung 141: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **149** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

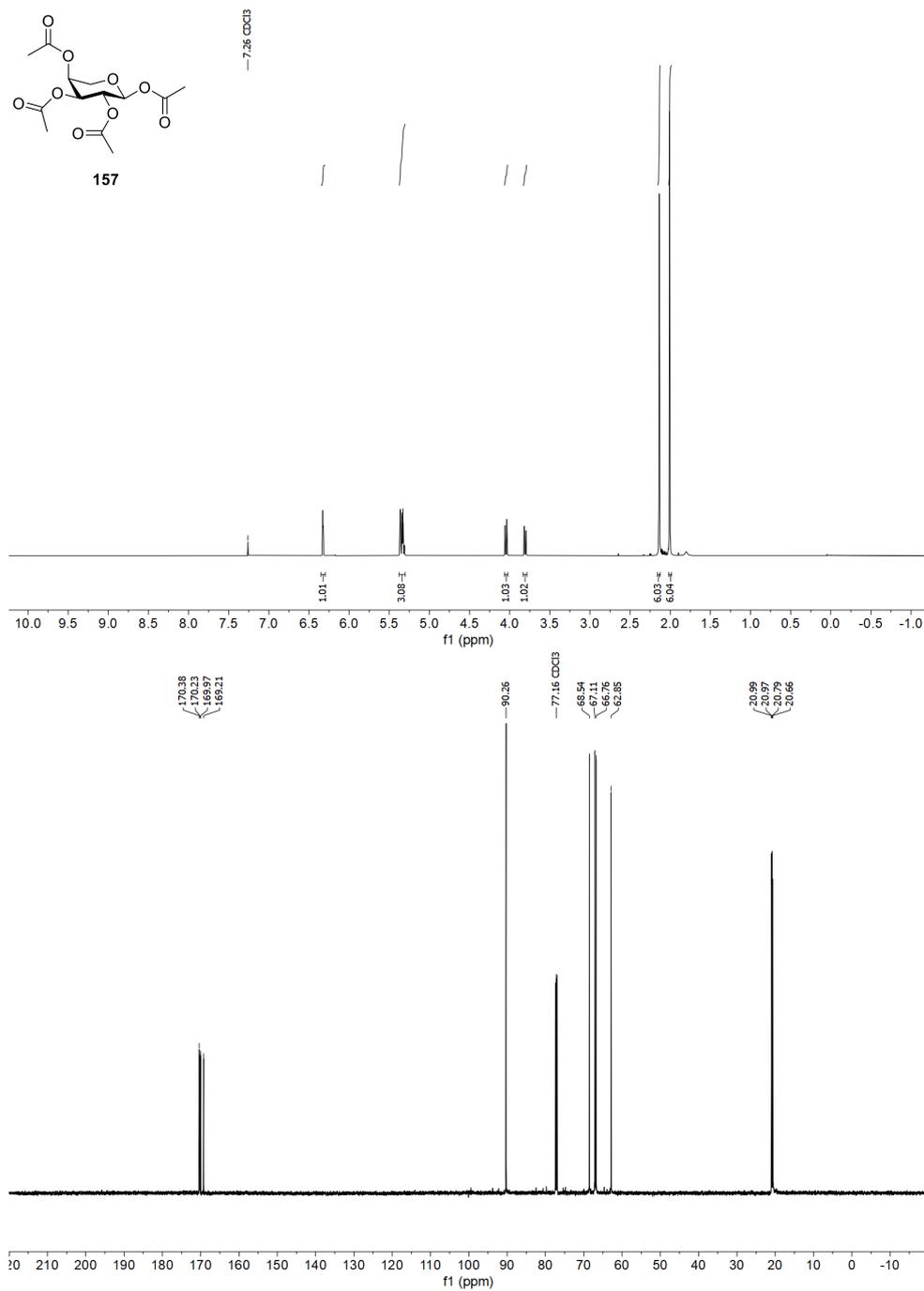


Abbildung 142: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **157** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

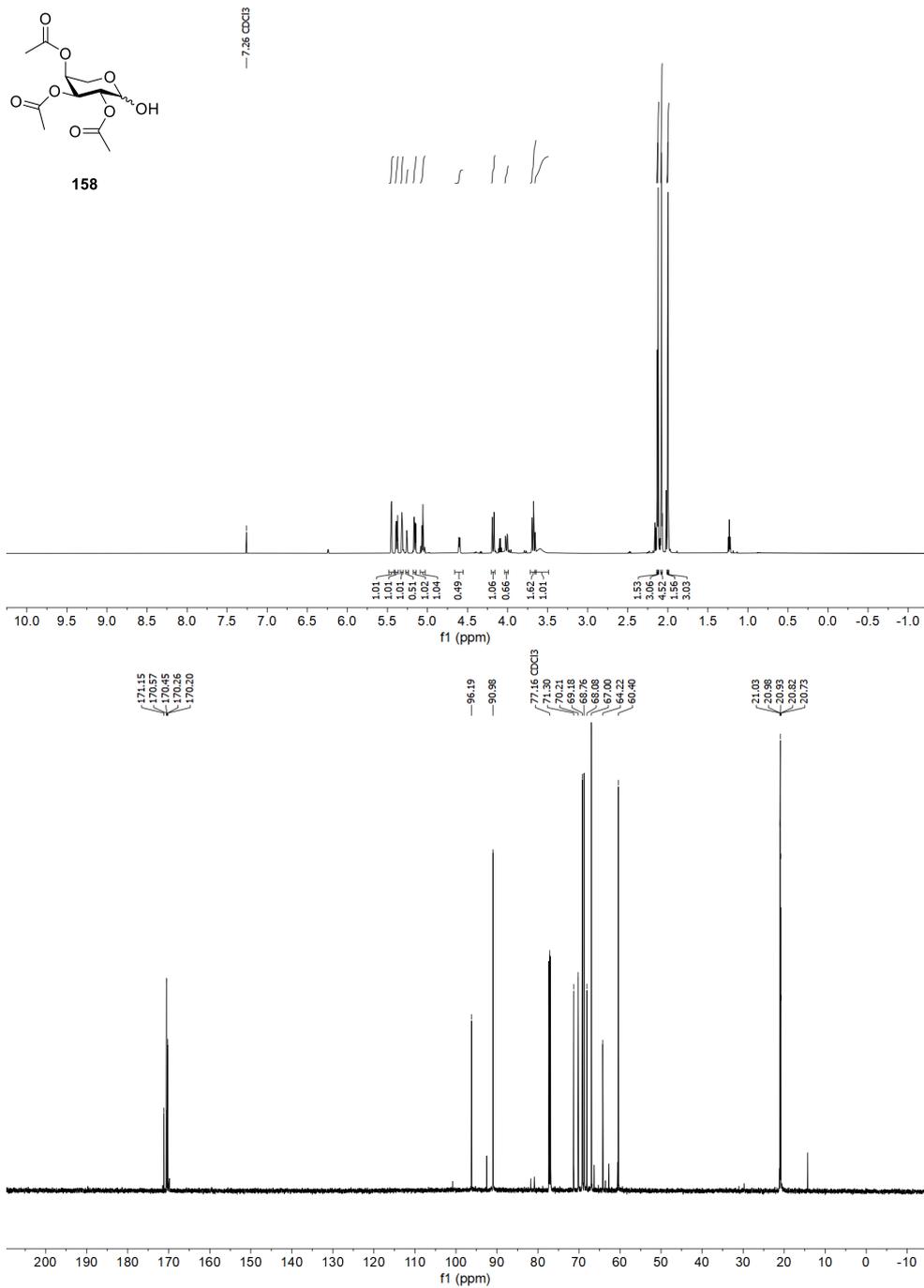


Abbildung 143: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **158** in CDCl_3 (600 MHz/ ^{13}C 151 MHz).

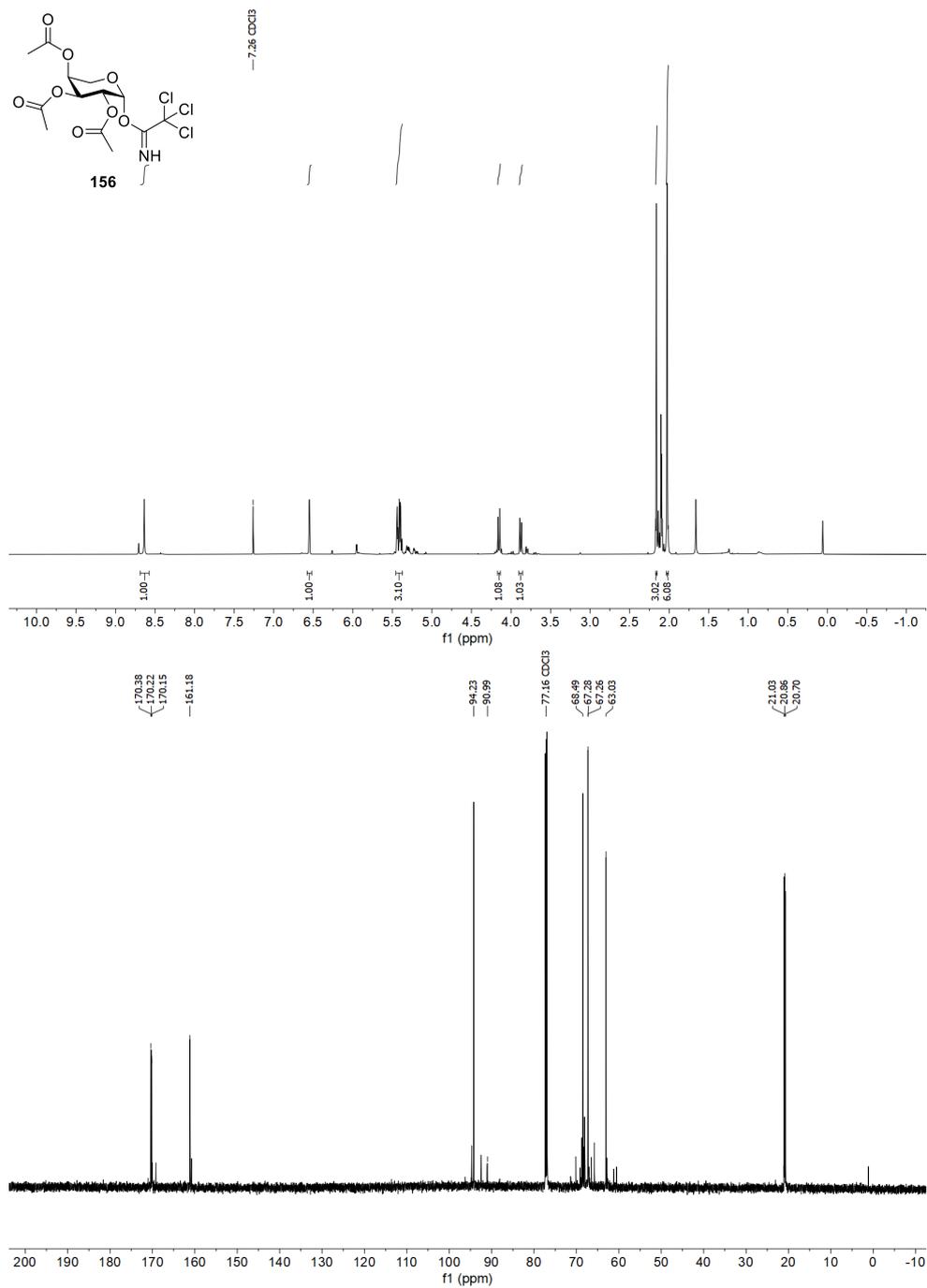


Abbildung 144: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **156** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

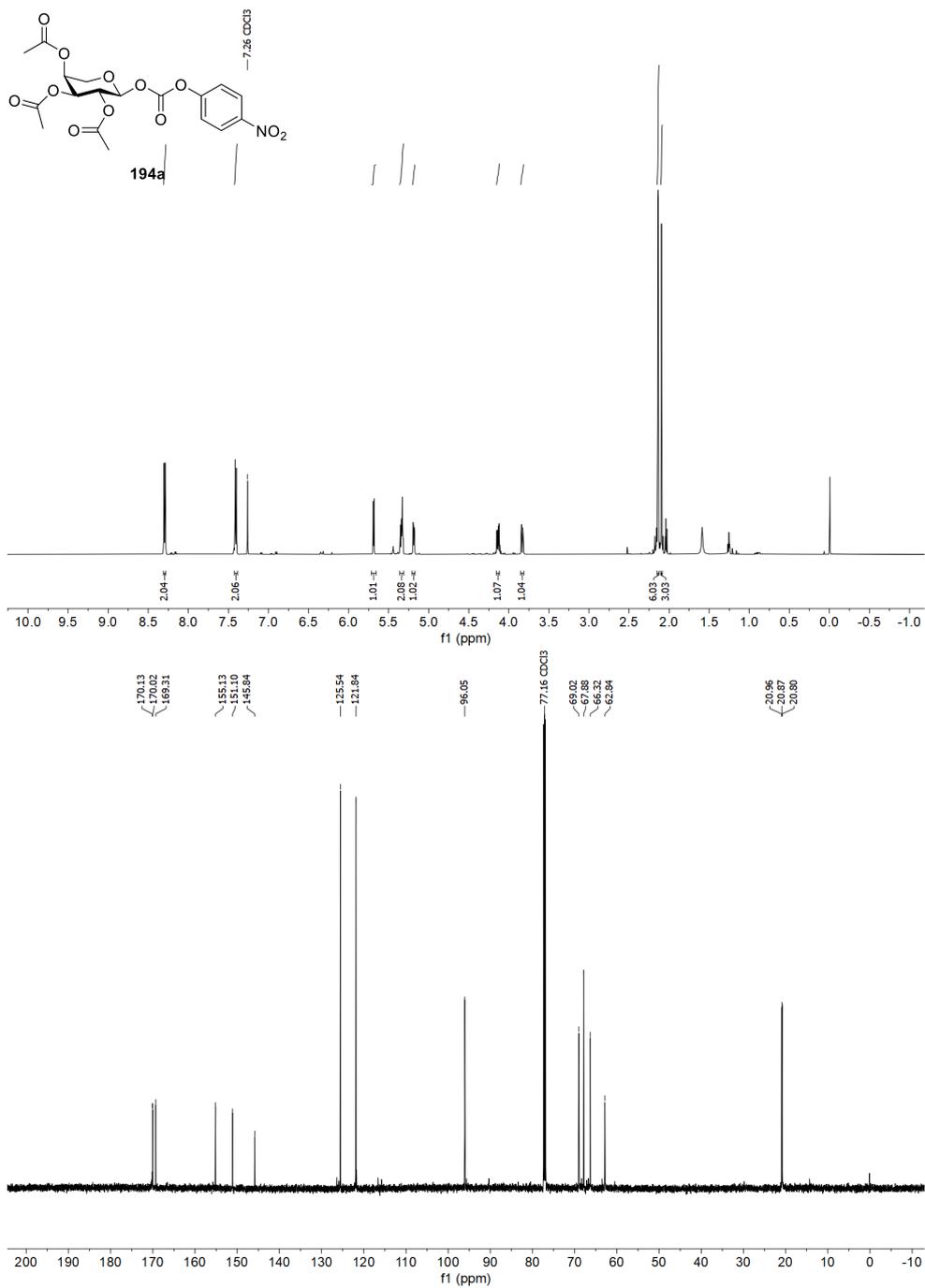


Abbildung 145: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **194a** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

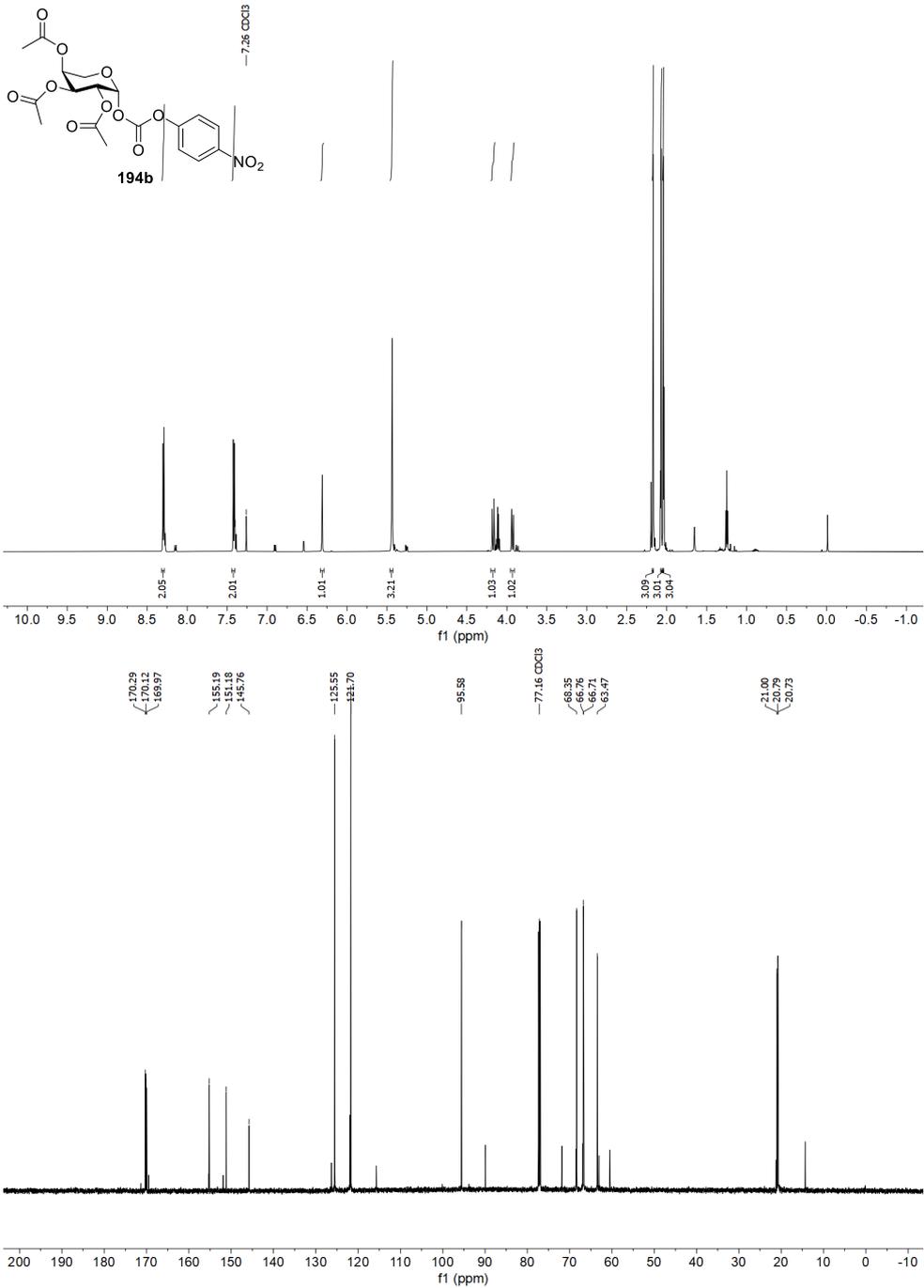


Abbildung 146: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **194b** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

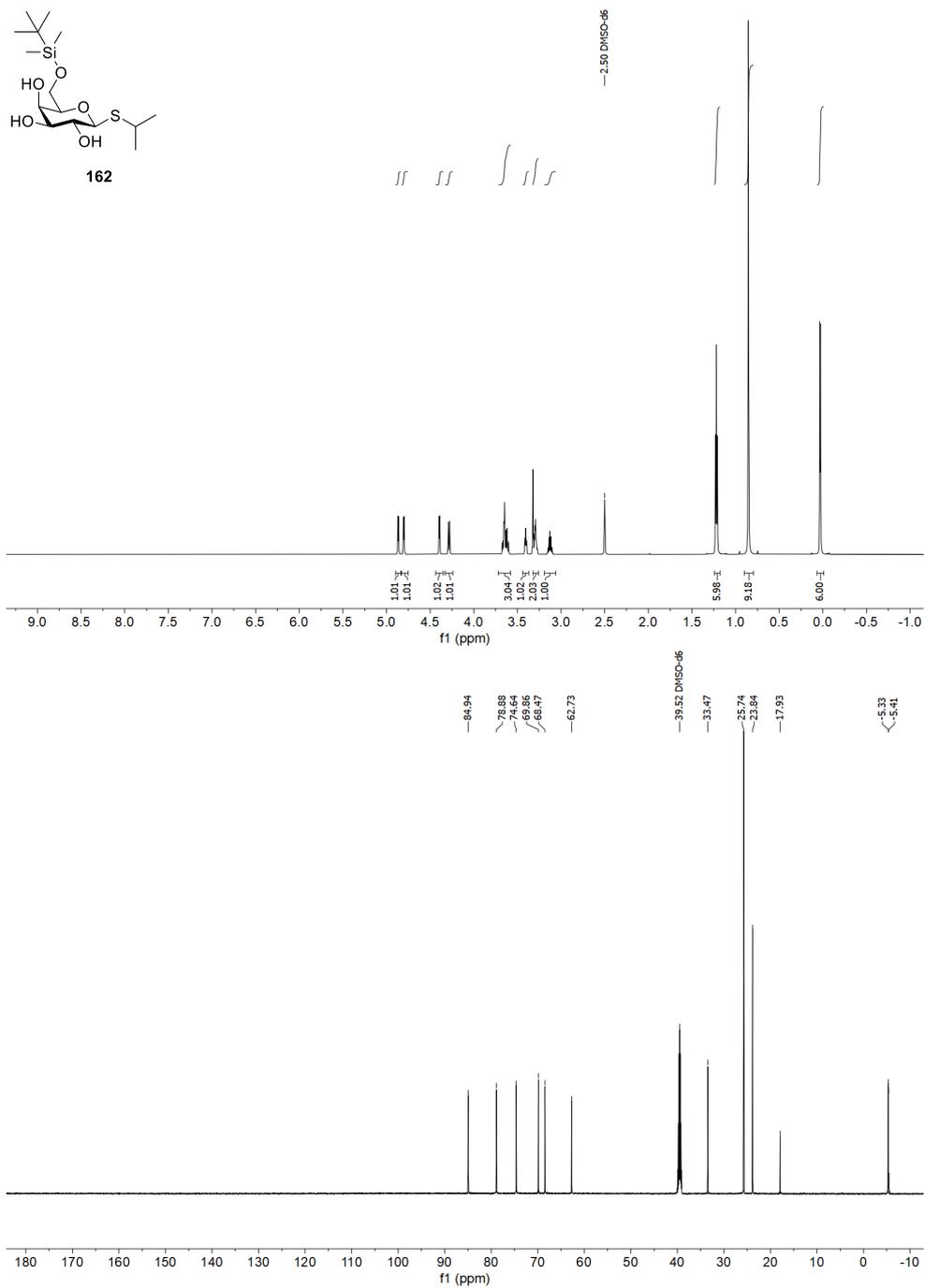


Abbildung 147: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **162** in $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz/151 MHz).

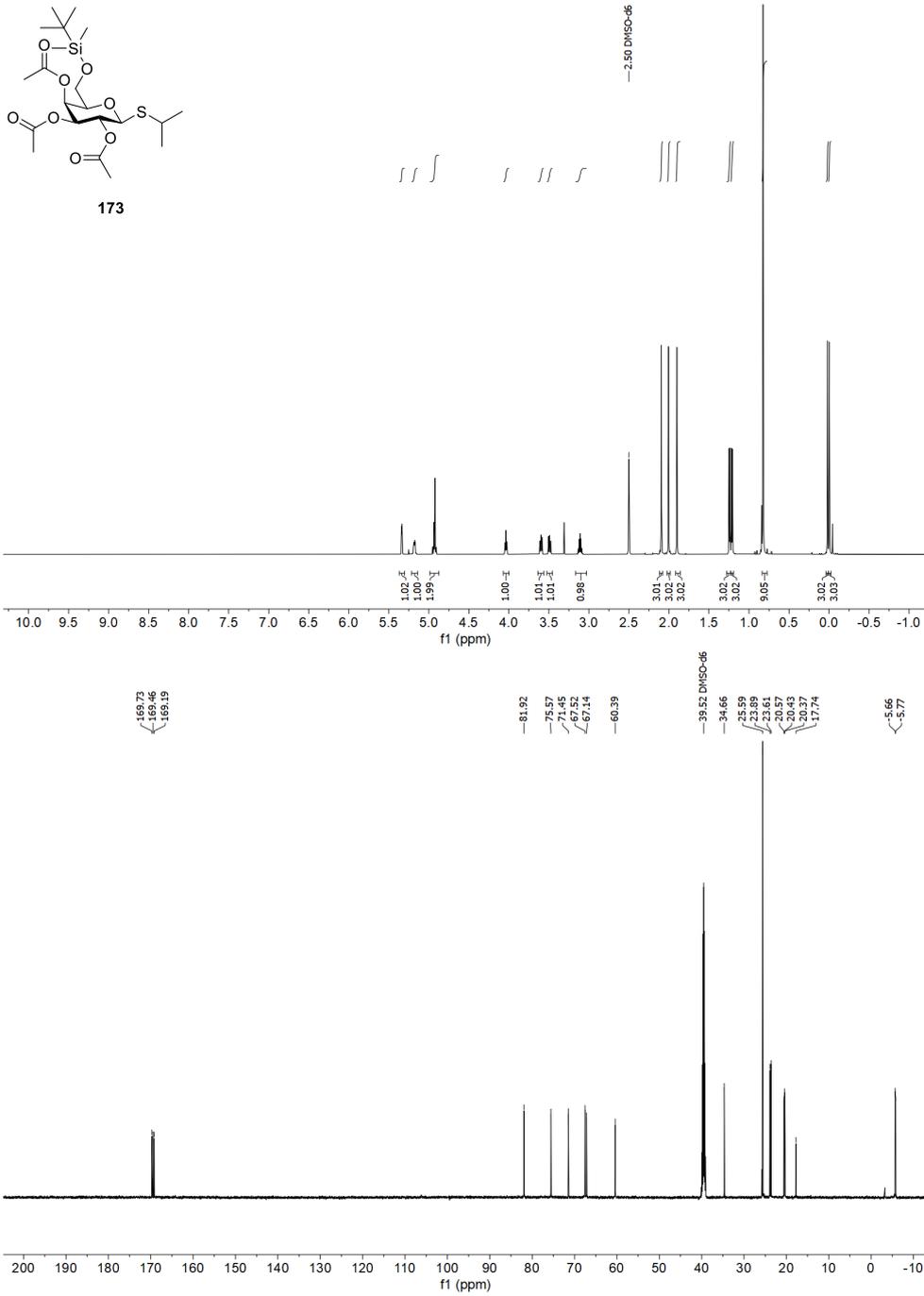


Abbildung 148: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **173** in DMSO-*d*₆ (600 MHz/151 MHz).

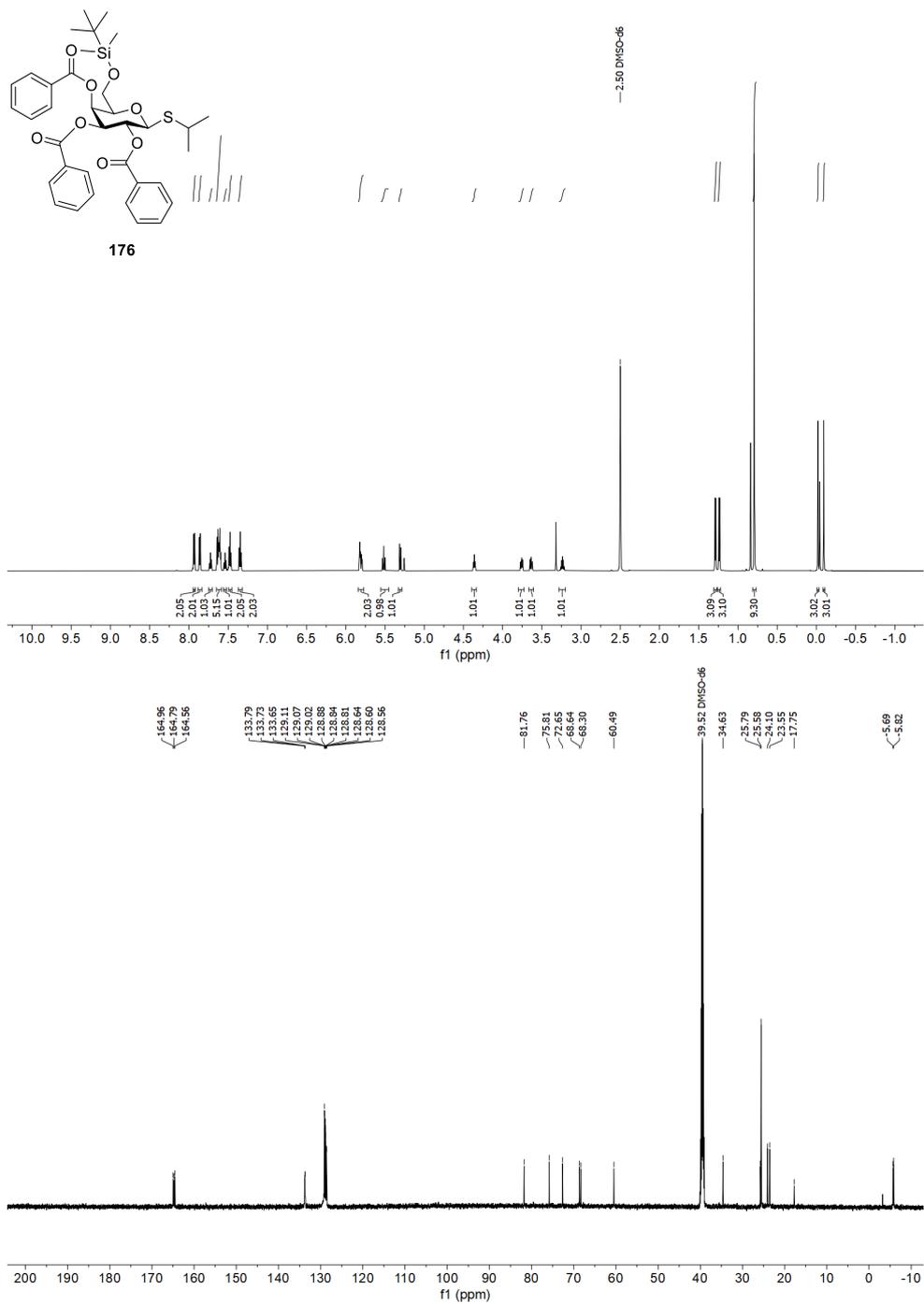


Abbildung 149: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **176** in DMSO-*d*₆ (600 MHz/151 MHz).

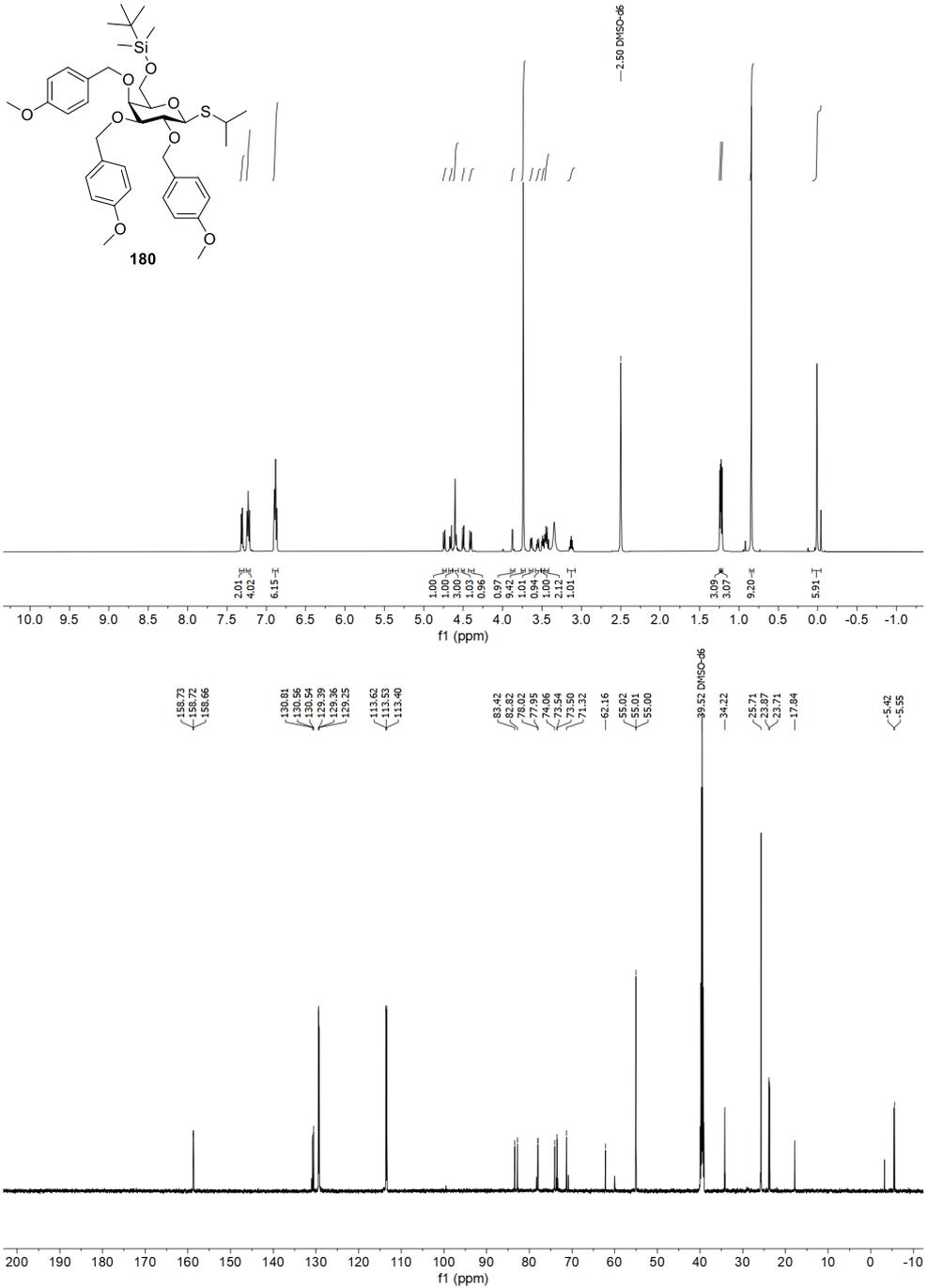


Abbildung 150: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **180** in DMSO-*d*₆ (600 MHz/151 MHz).

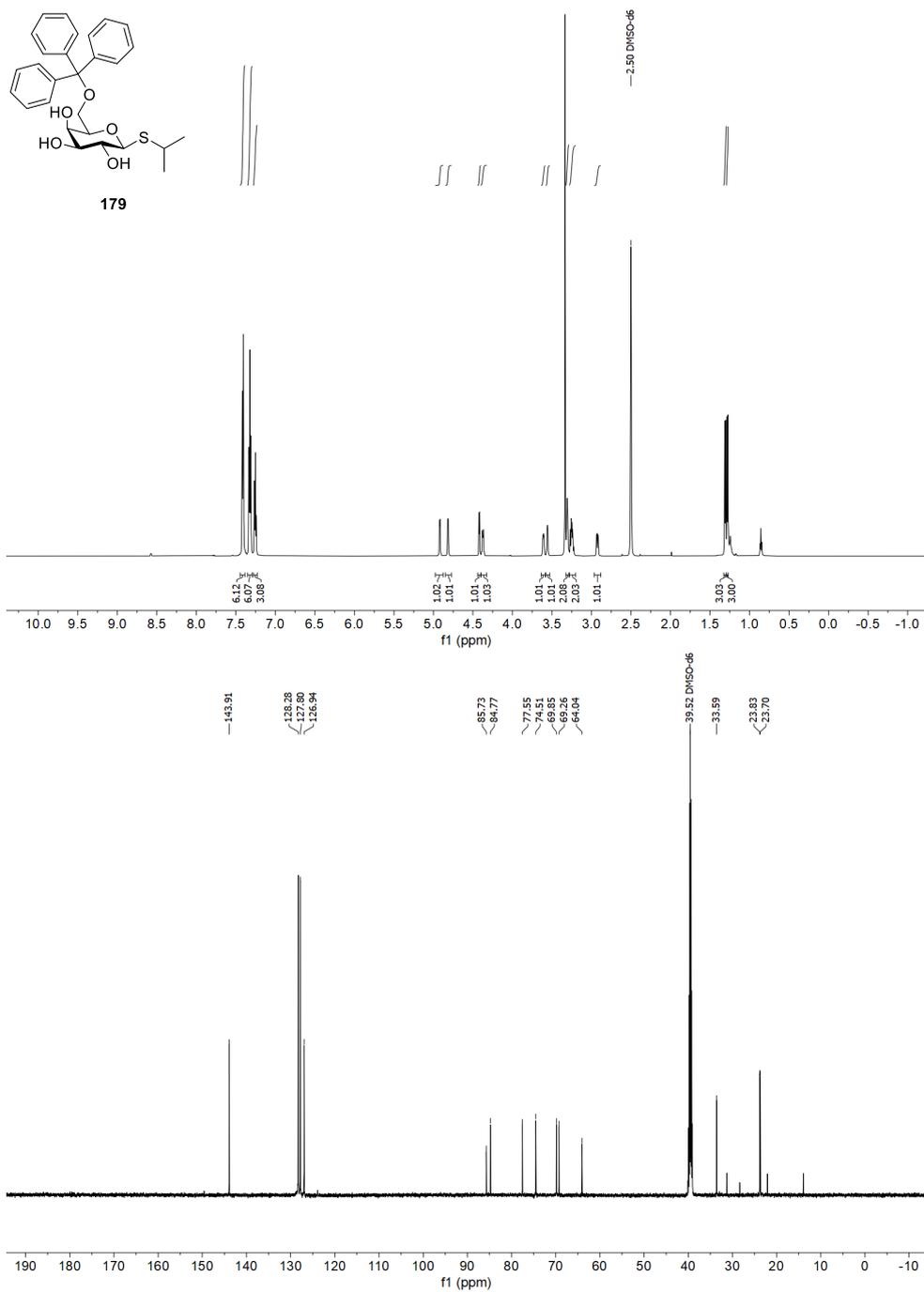


Abbildung 151: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **179** in $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz/151 MHz).

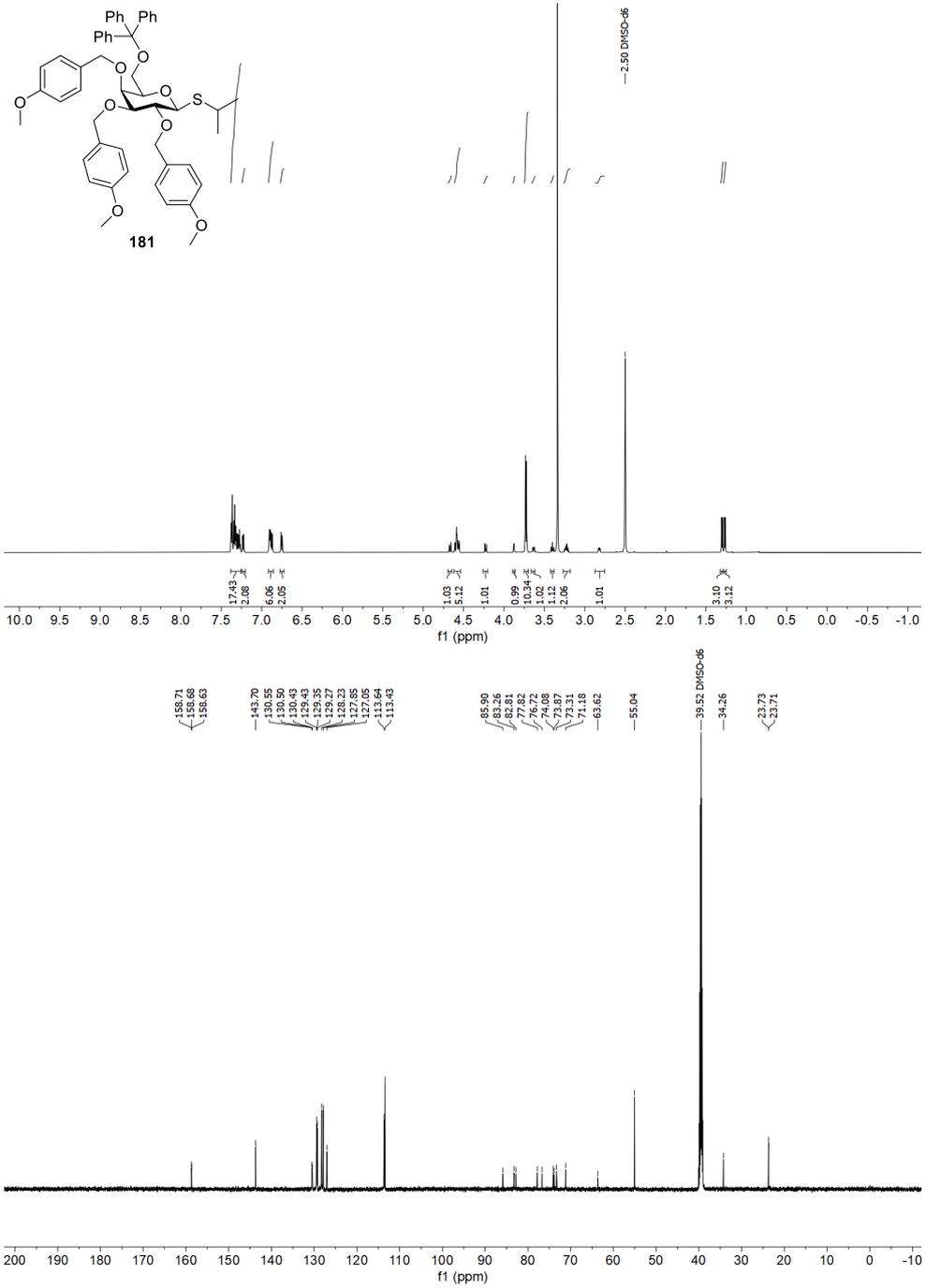


Abbildung 152: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **181** in DMSO-*d*₆ (600 MHz/151 MHz).

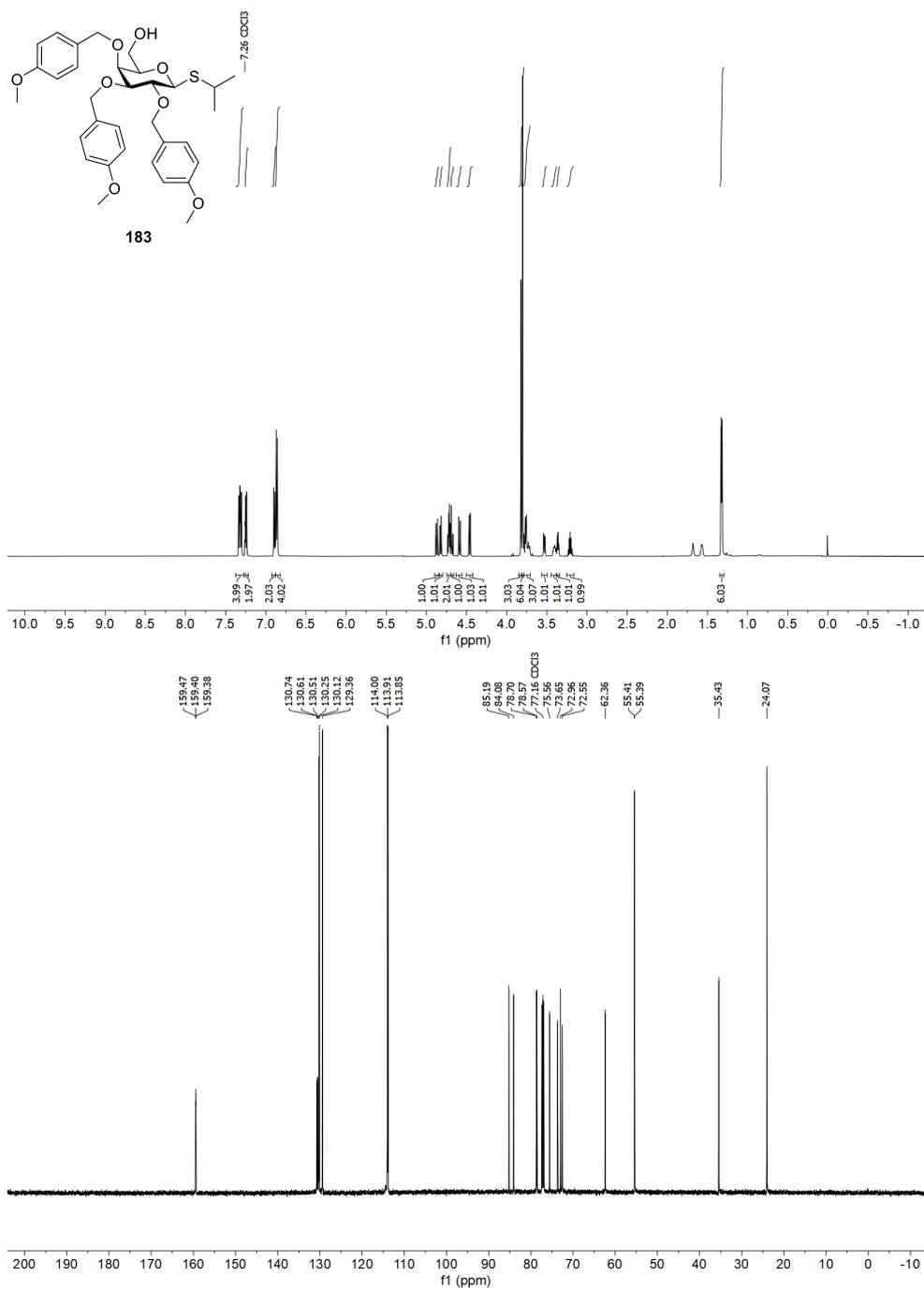


Abbildung 153: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **183** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

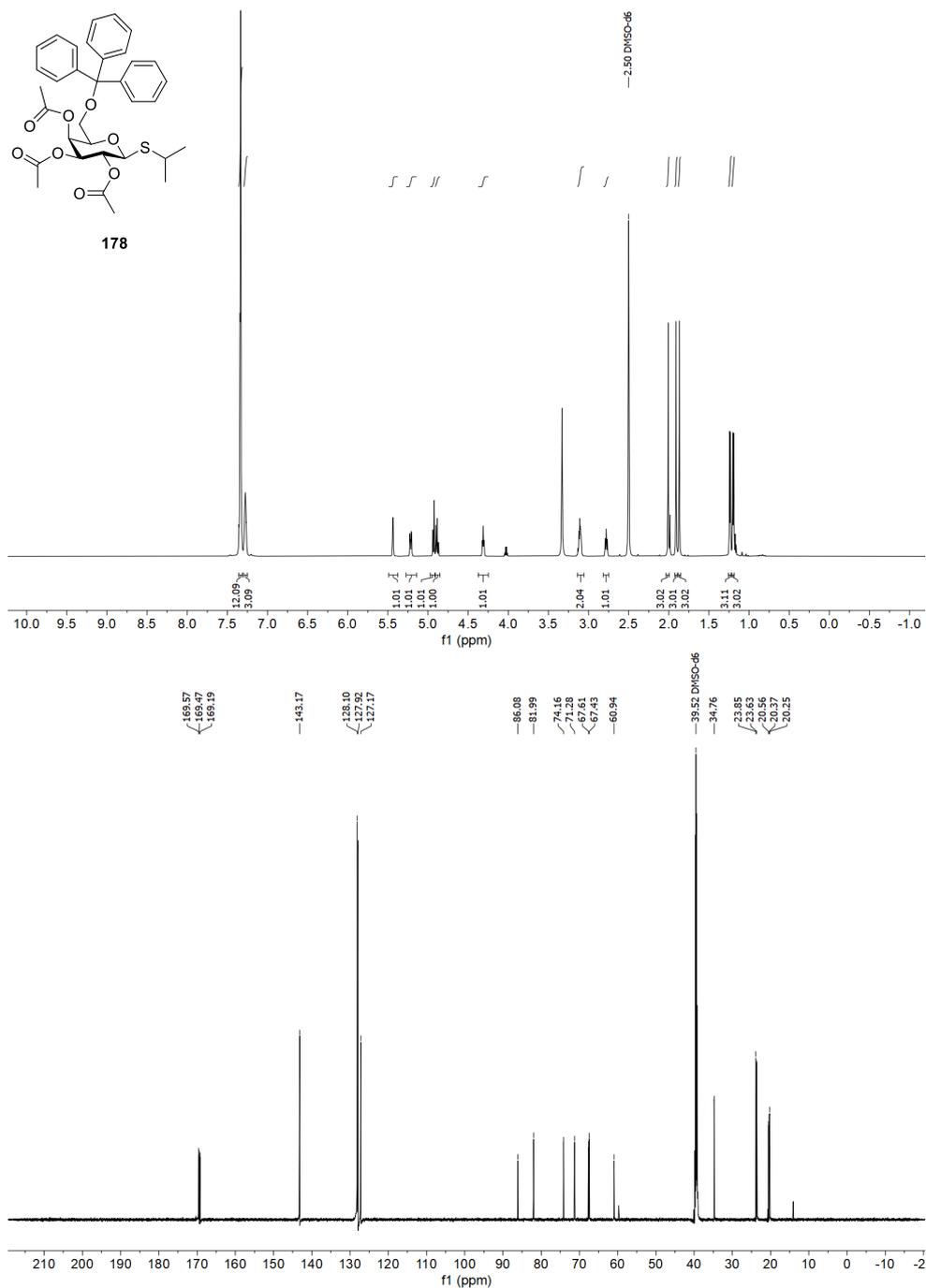


Abbildung 154: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **178** in DMSO-*d*₆ (600 MHz/151 MHz).

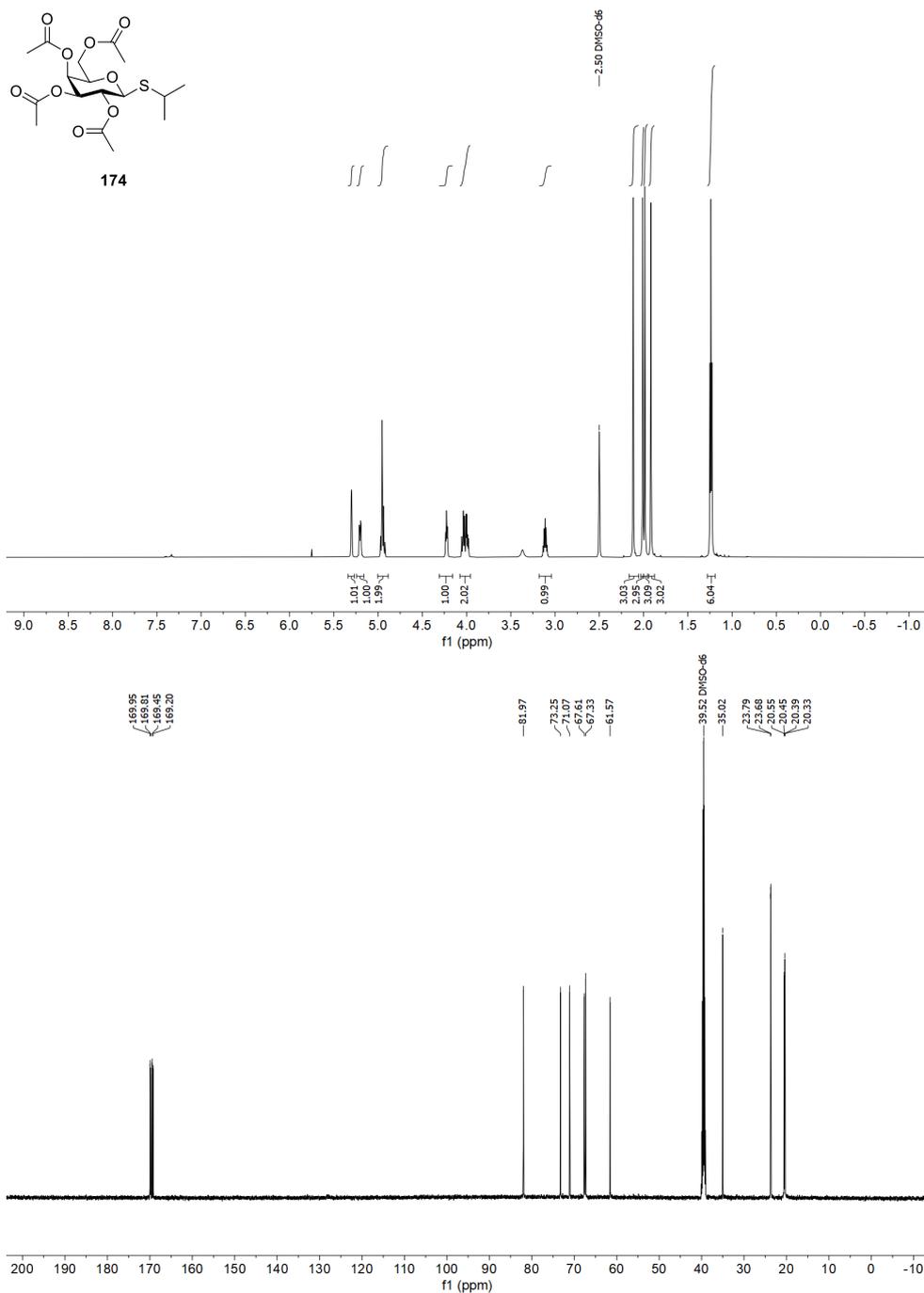


Abbildung 155: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **174** in DMSO-*d*₆ (600 MHz/151 MHz).

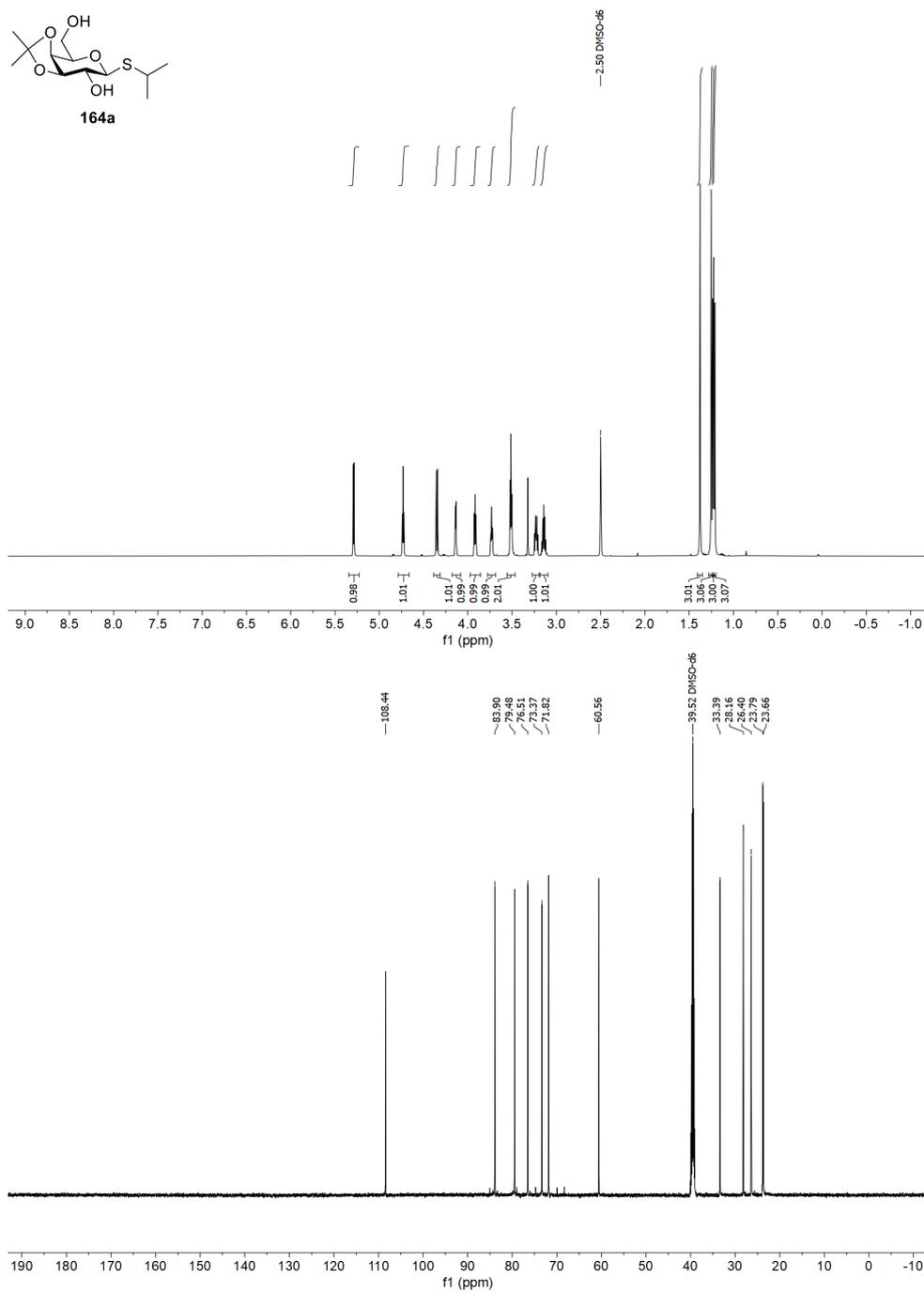


Abbildung 156: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **164a** in DMSO-*d*₆ (600 MHz/151 MHz).

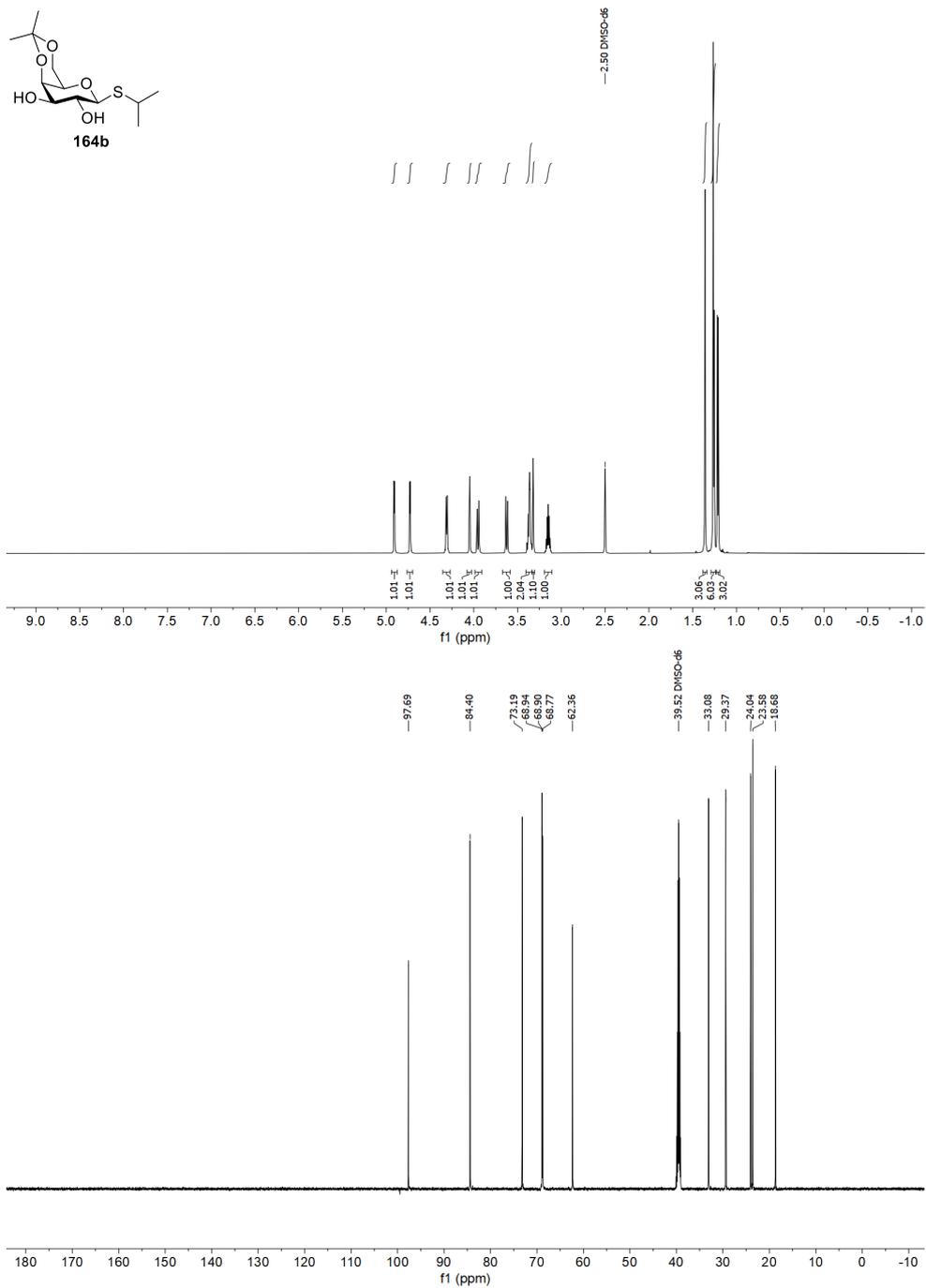


Abbildung 157: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **164b** in DMSO-*d*₆ (600 MHz/151 MHz).

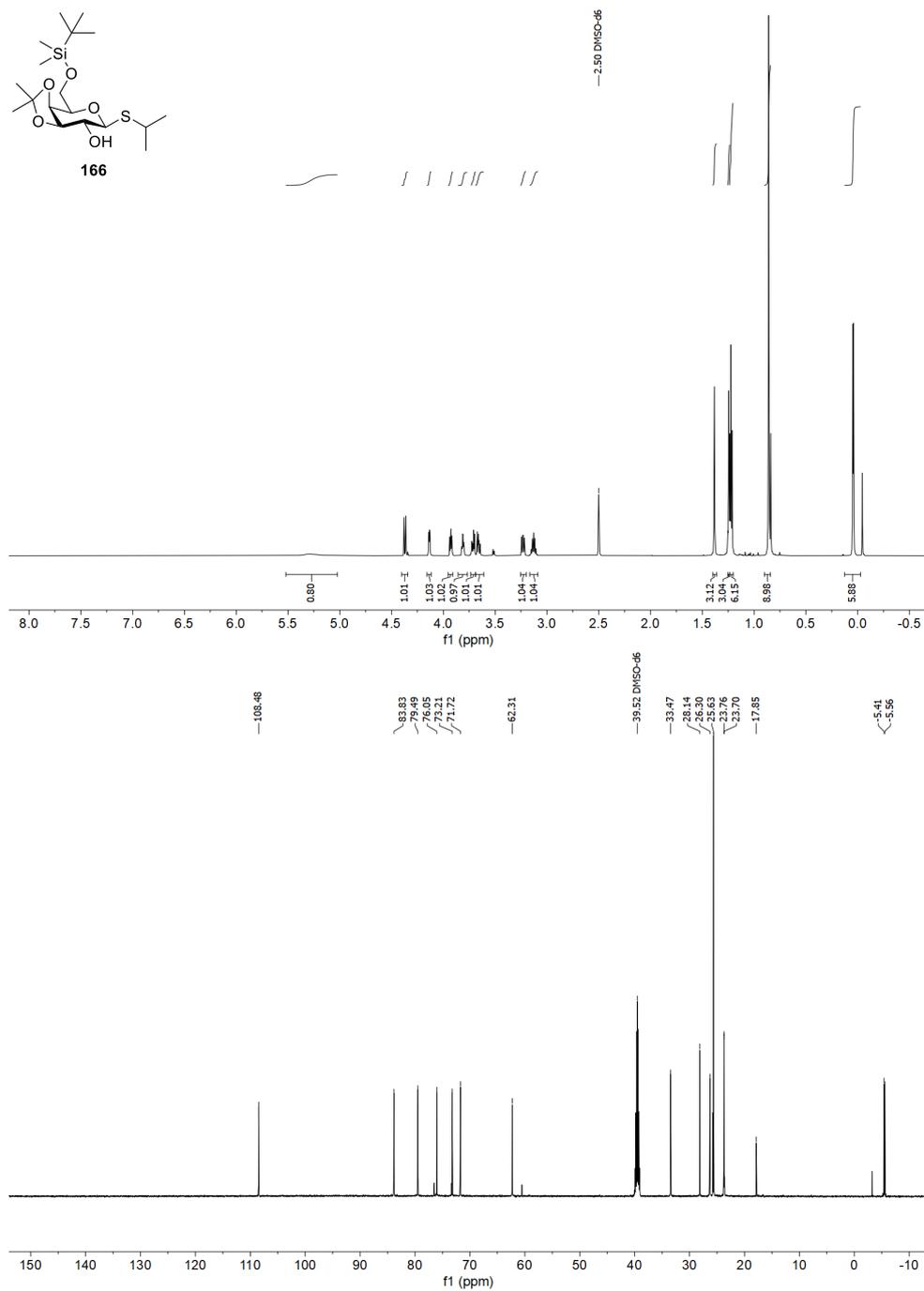


Abbildung 158: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **166** in $\text{DMSO}-d_6$ (600 MHz/151 MHz).

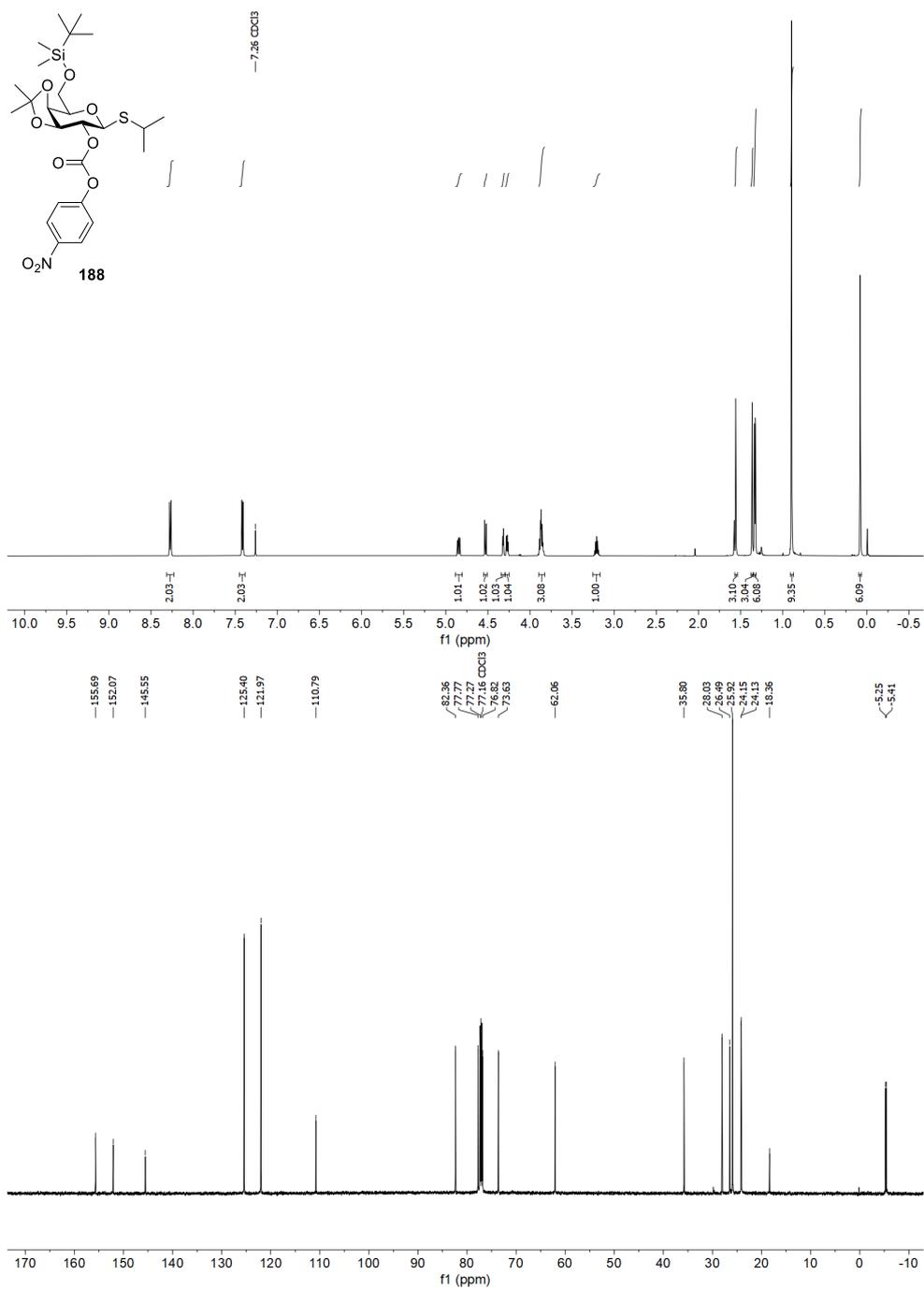


Abbildung 159: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **188** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

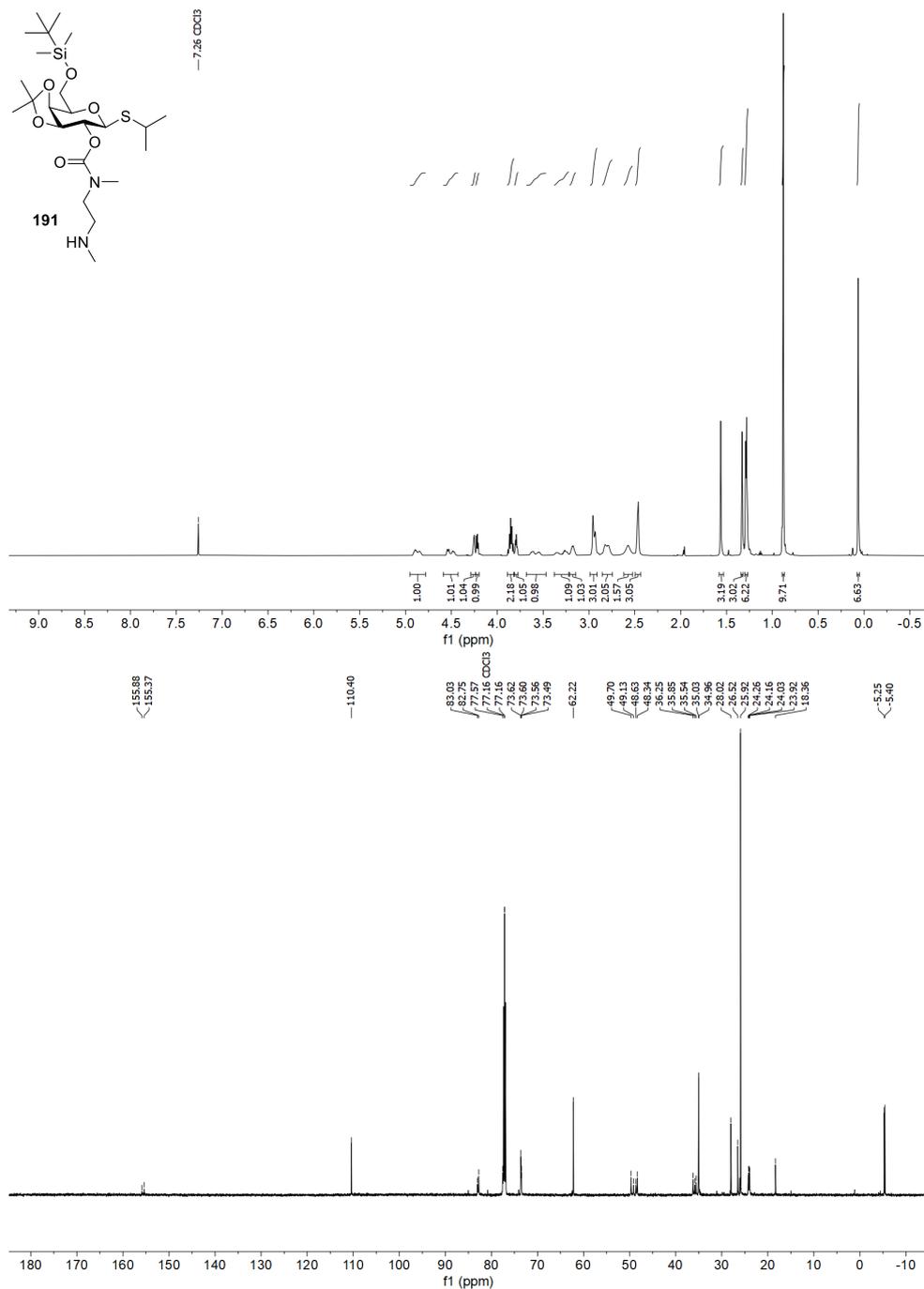
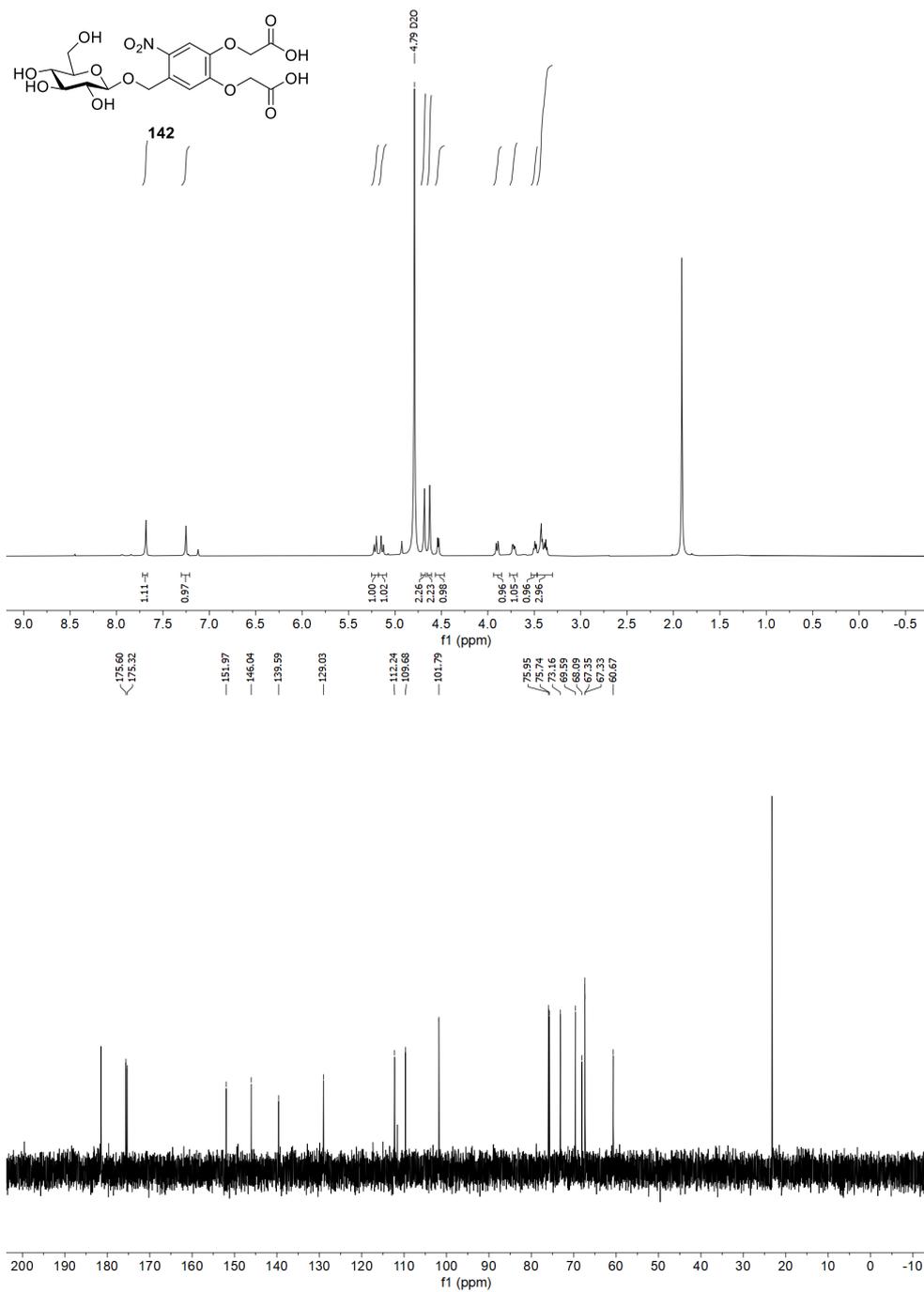


Abbildung 160: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **191** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).



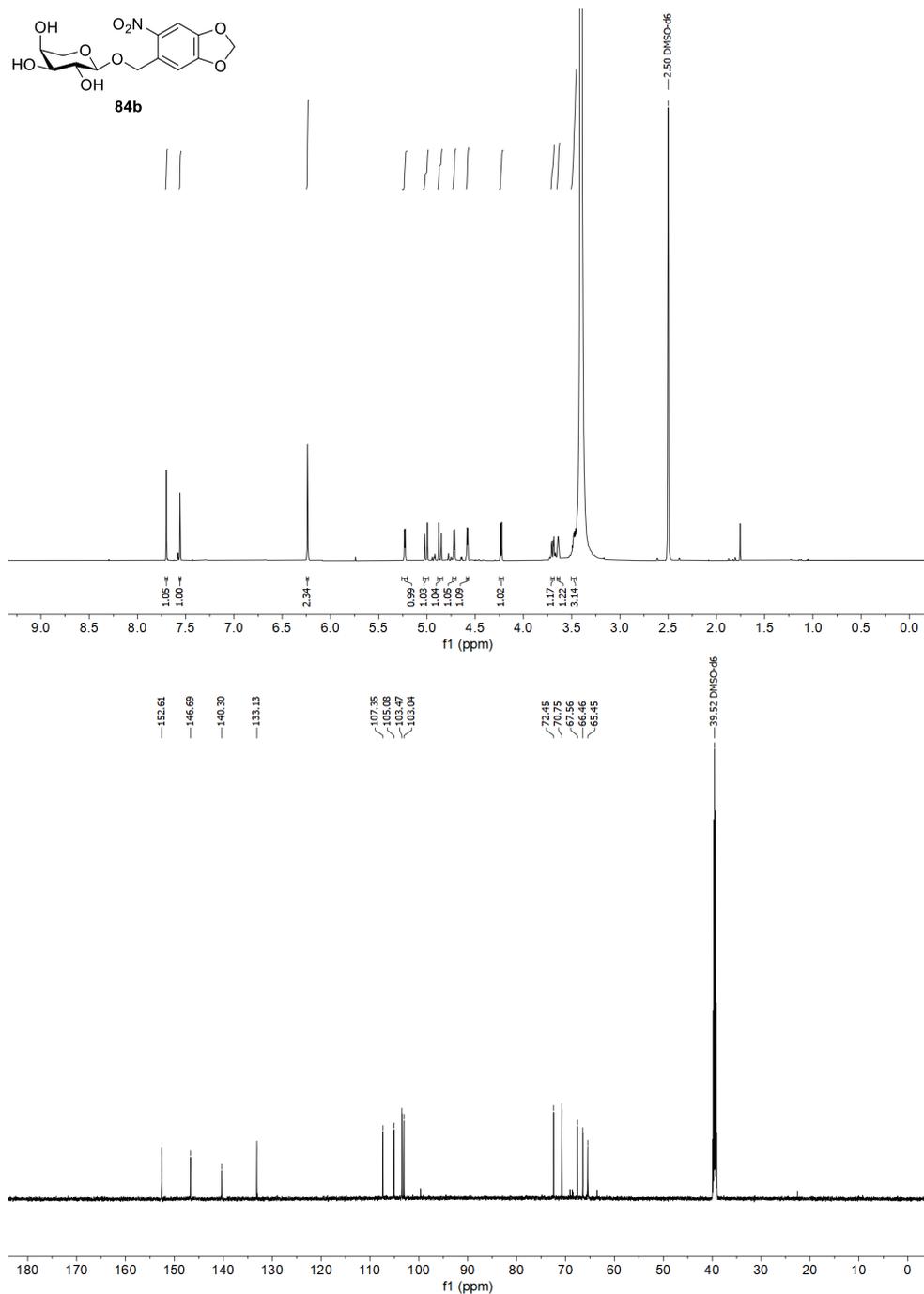


Abbildung 162: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **84b** in DMSO-*d*₆ (600 MHz/151 MHz).

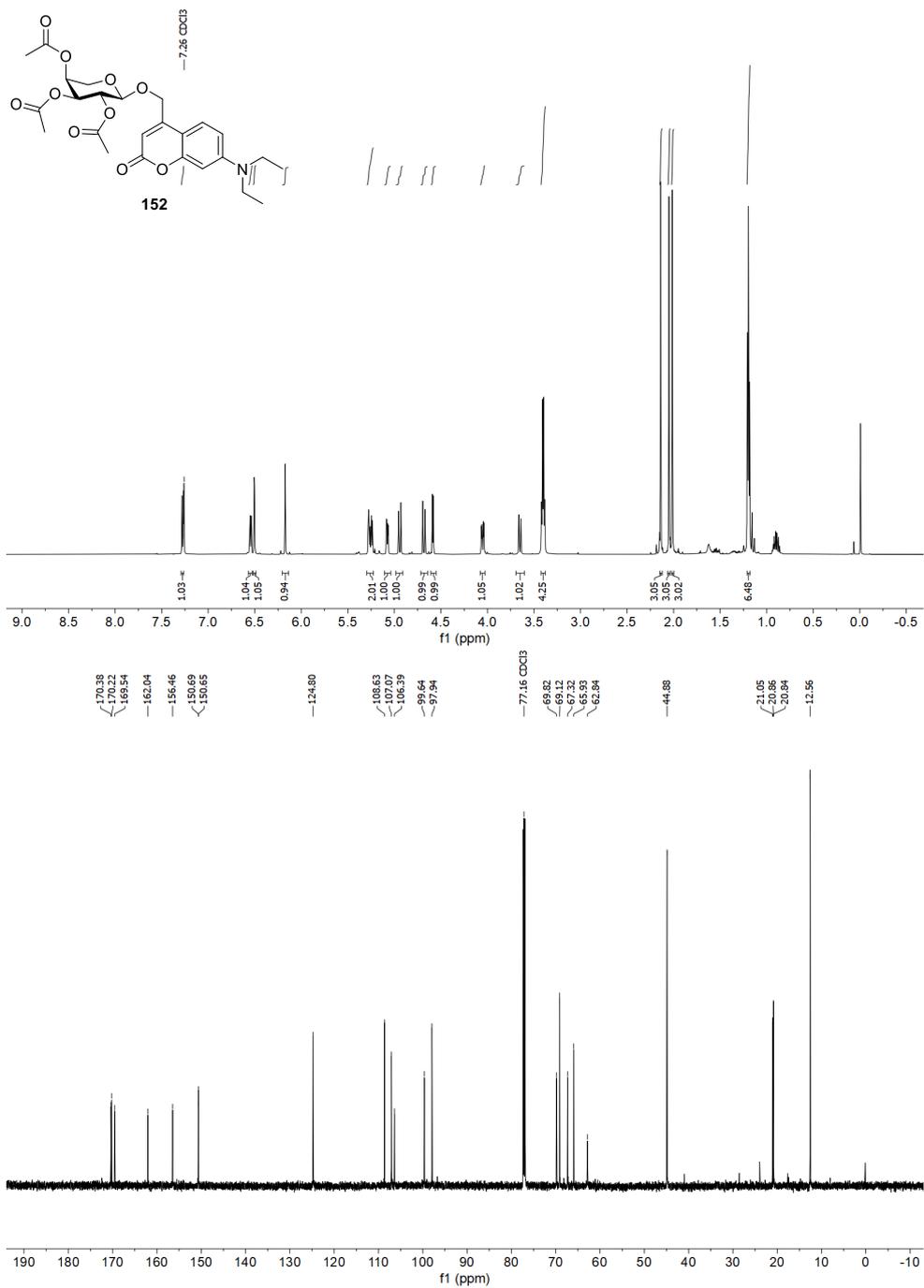


Abbildung 163: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **152** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

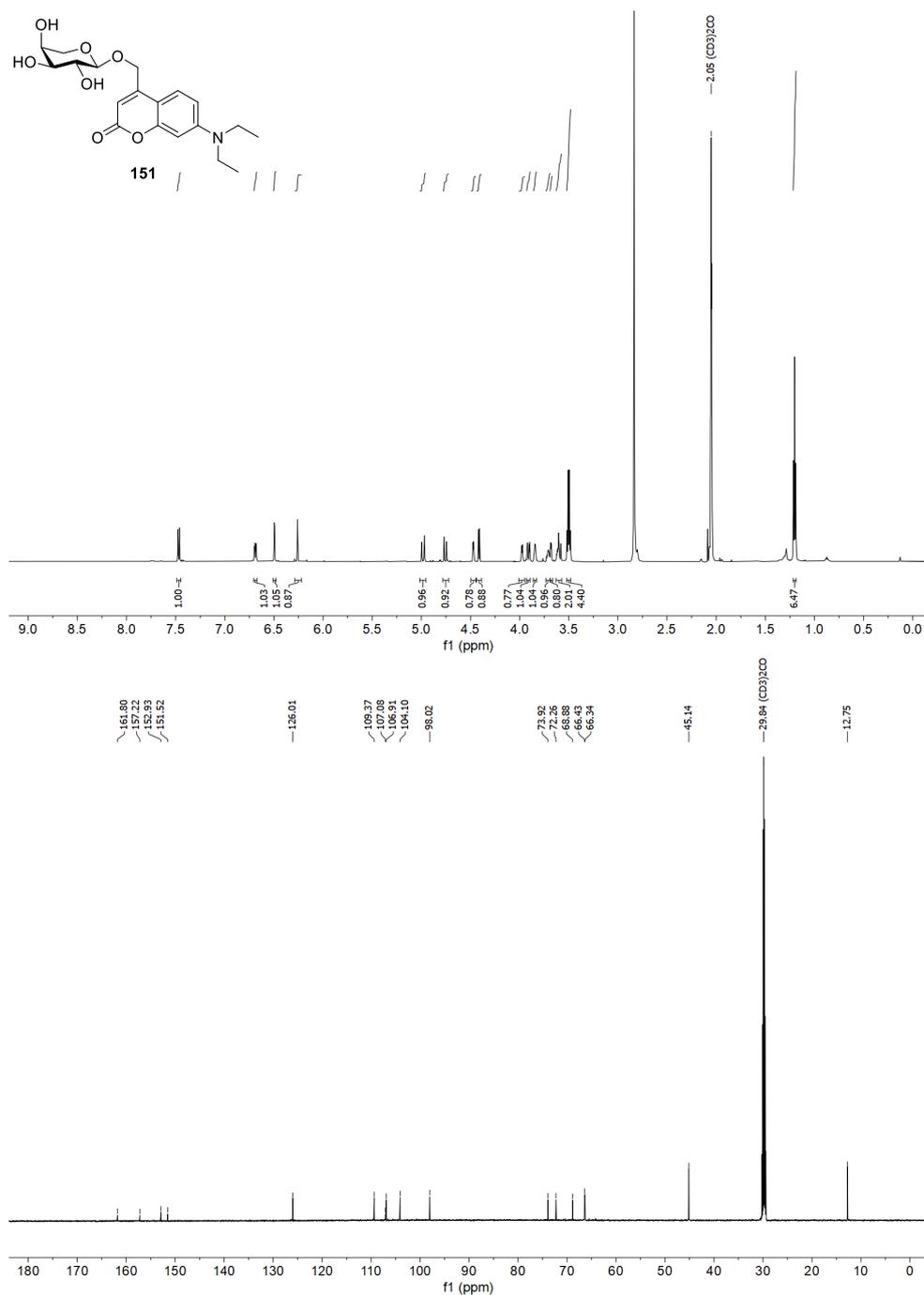


Abbildung 164: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **151** in Aceton-*d*₆ (600 MHz/151 MHz).

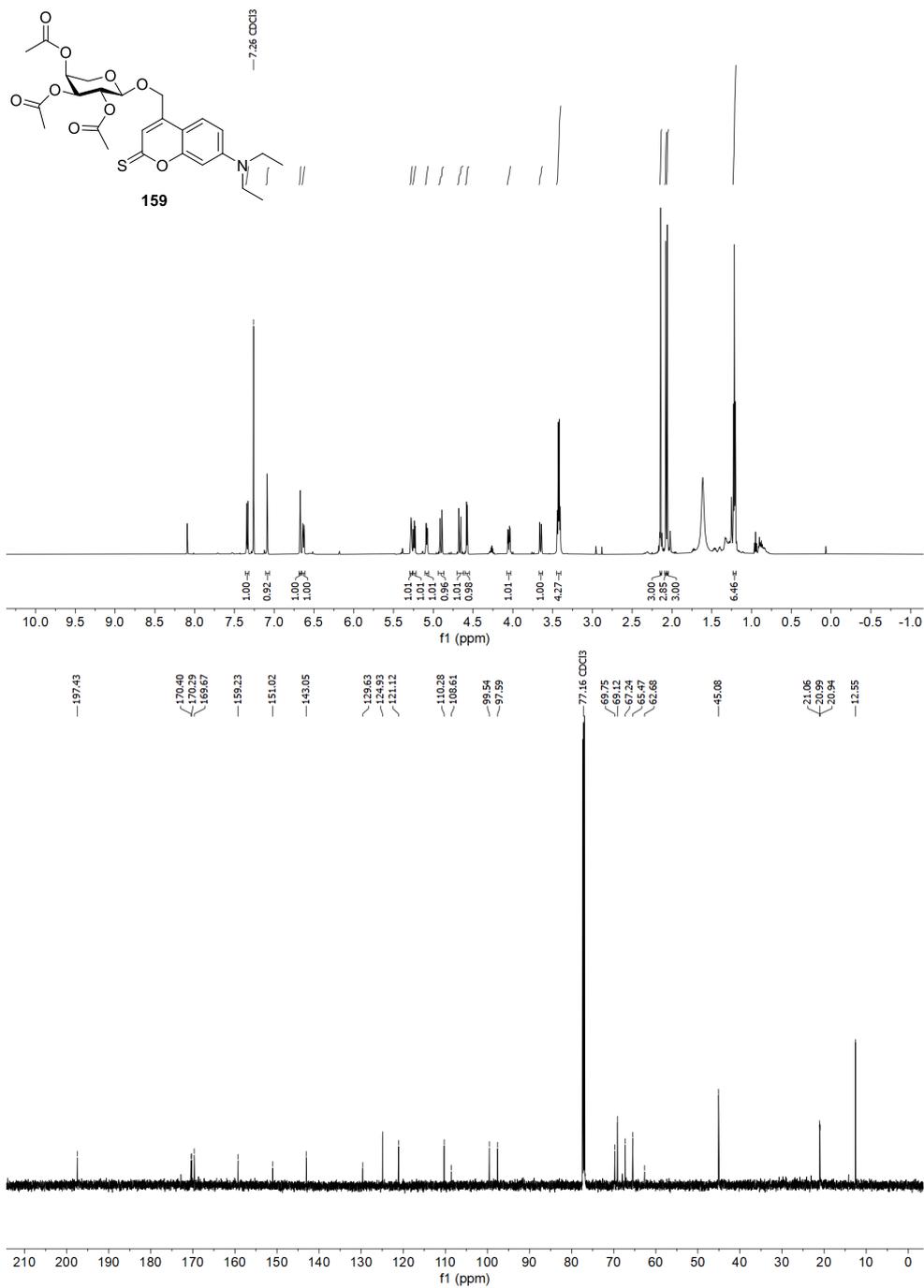


Abbildung 165: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **159** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

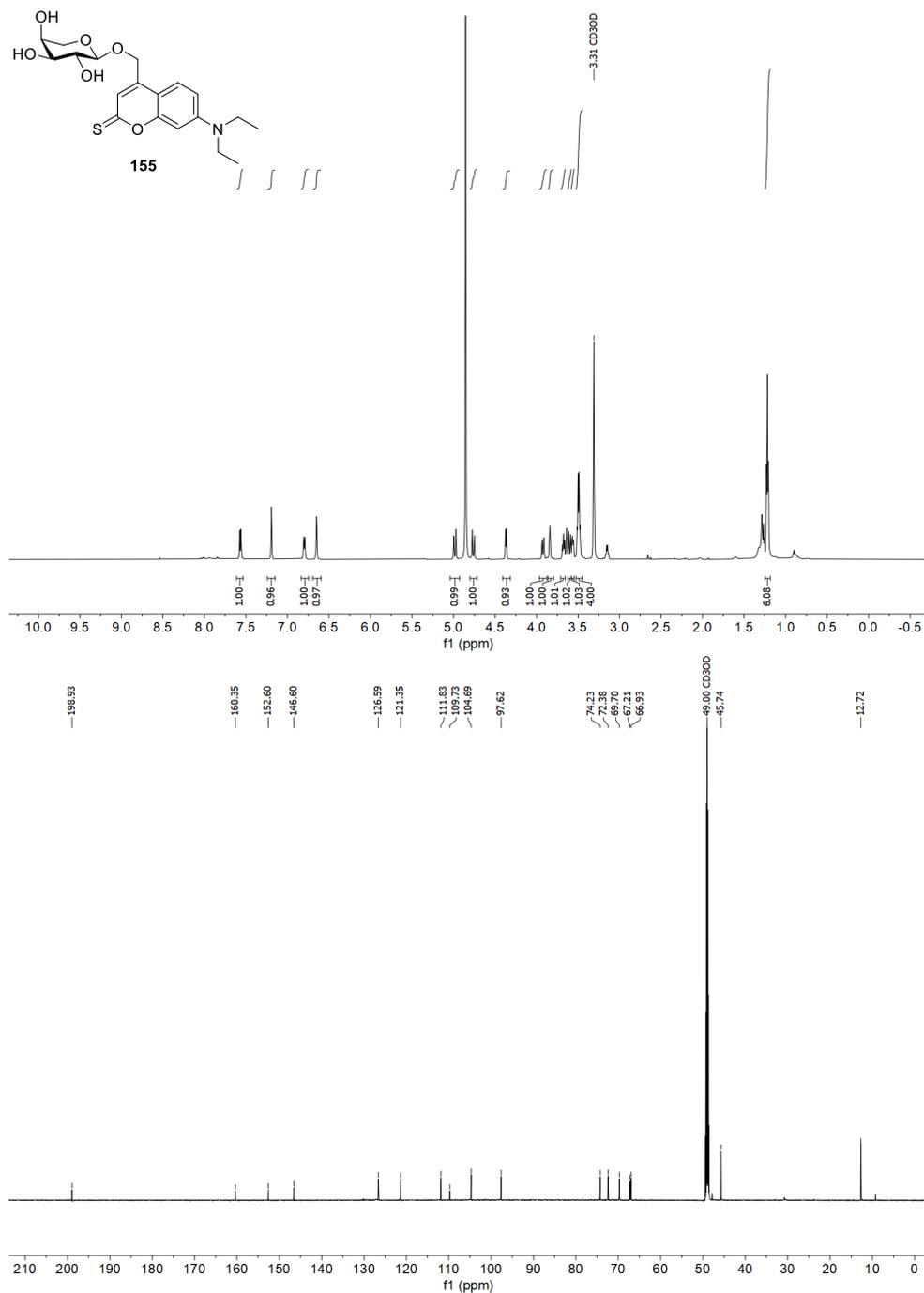


Abbildung 166: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **155** in Aceton- d_6 (600 MHz/151 MHz).

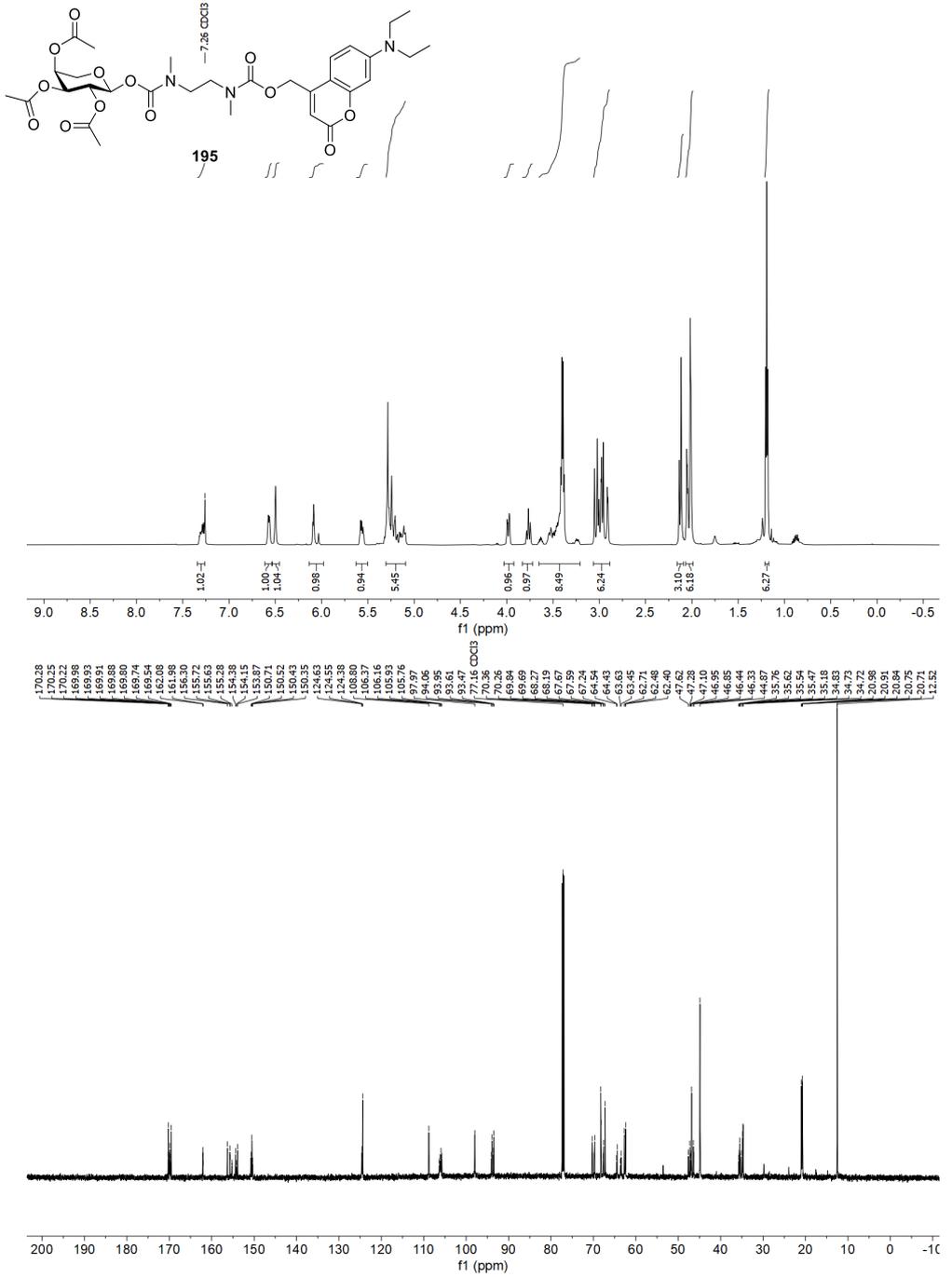


Abbildung 167: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **195** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

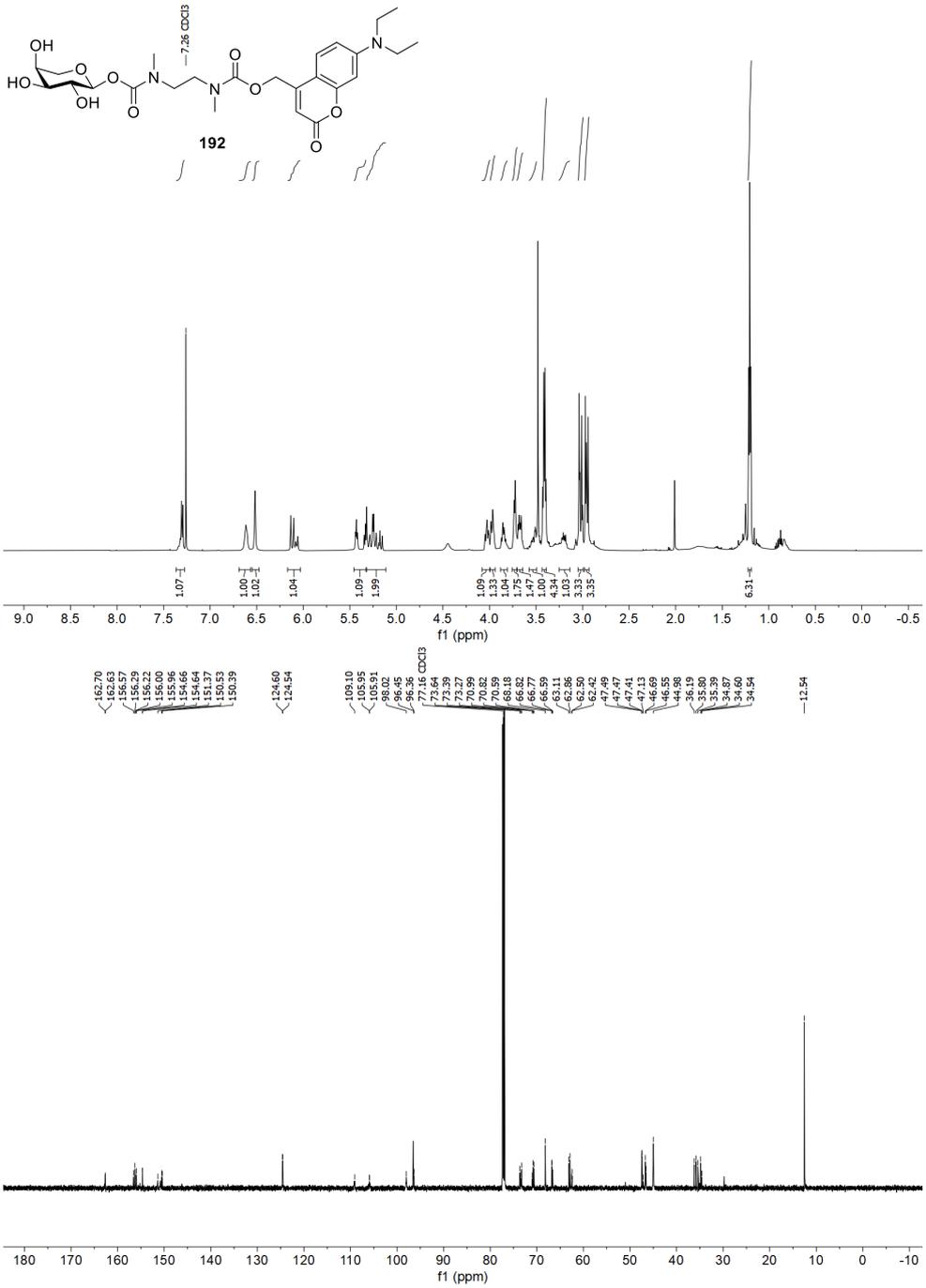


Abbildung 168: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **192** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

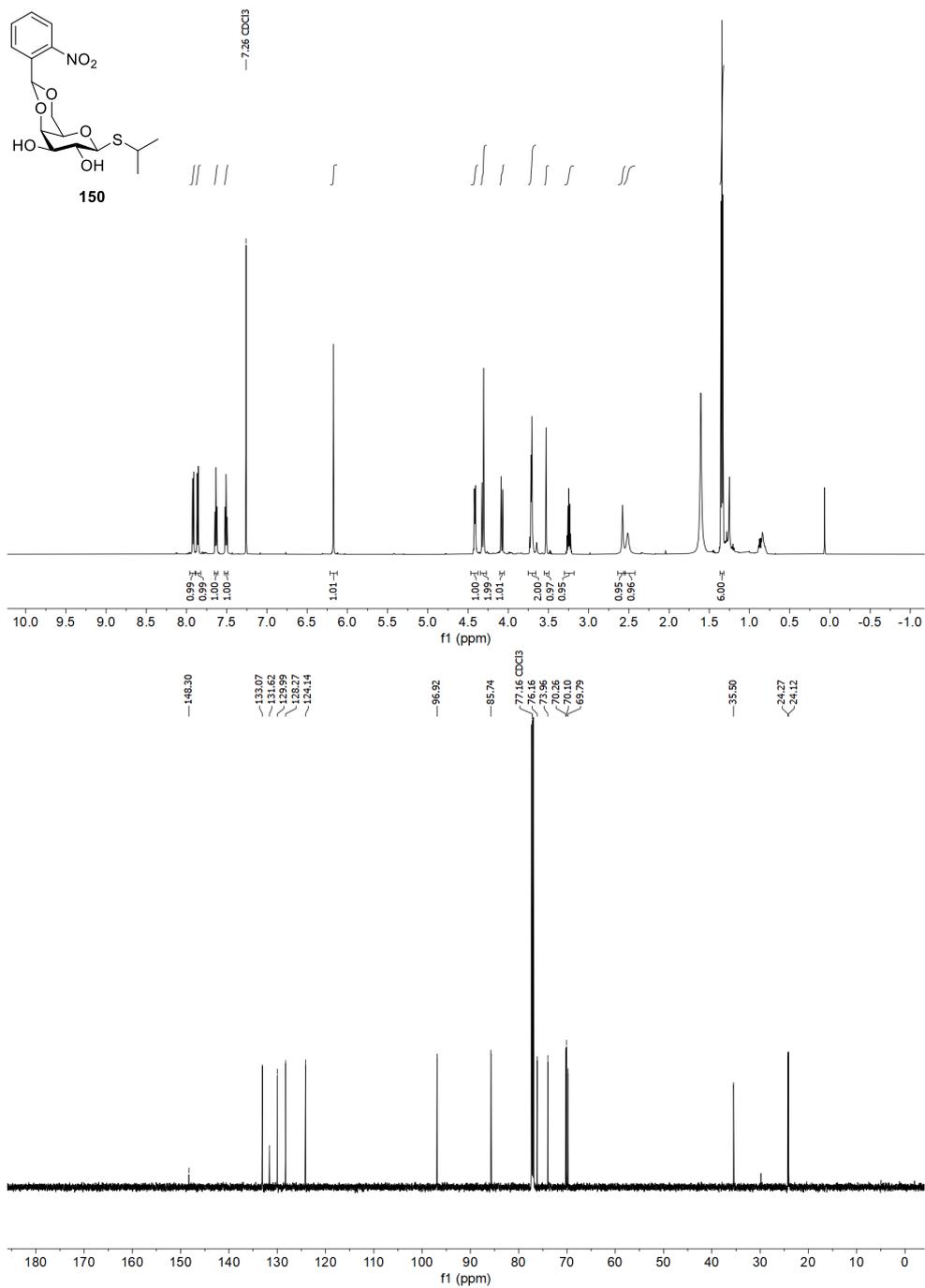


Abbildung 169: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **150** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

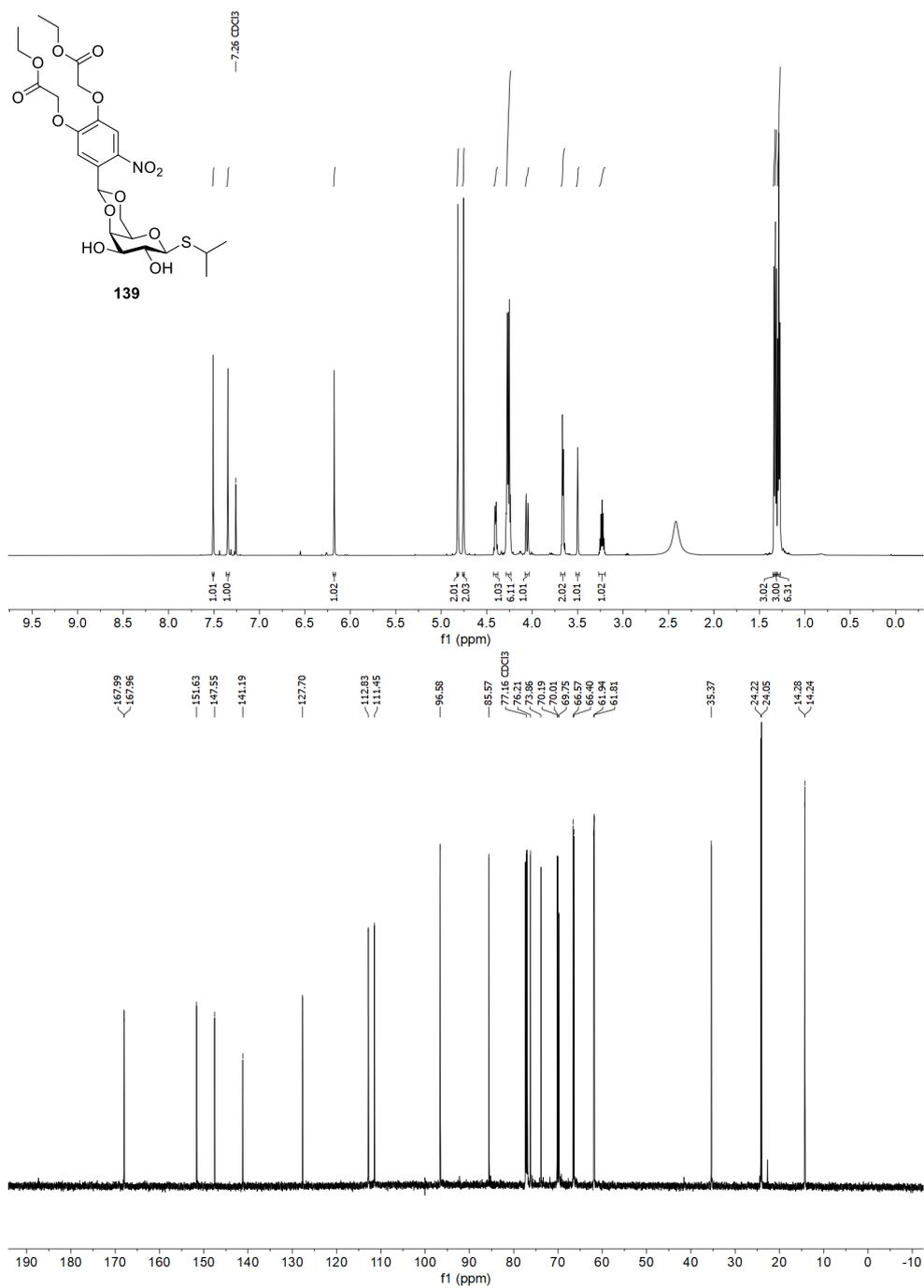


Abbildung 171: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **139** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

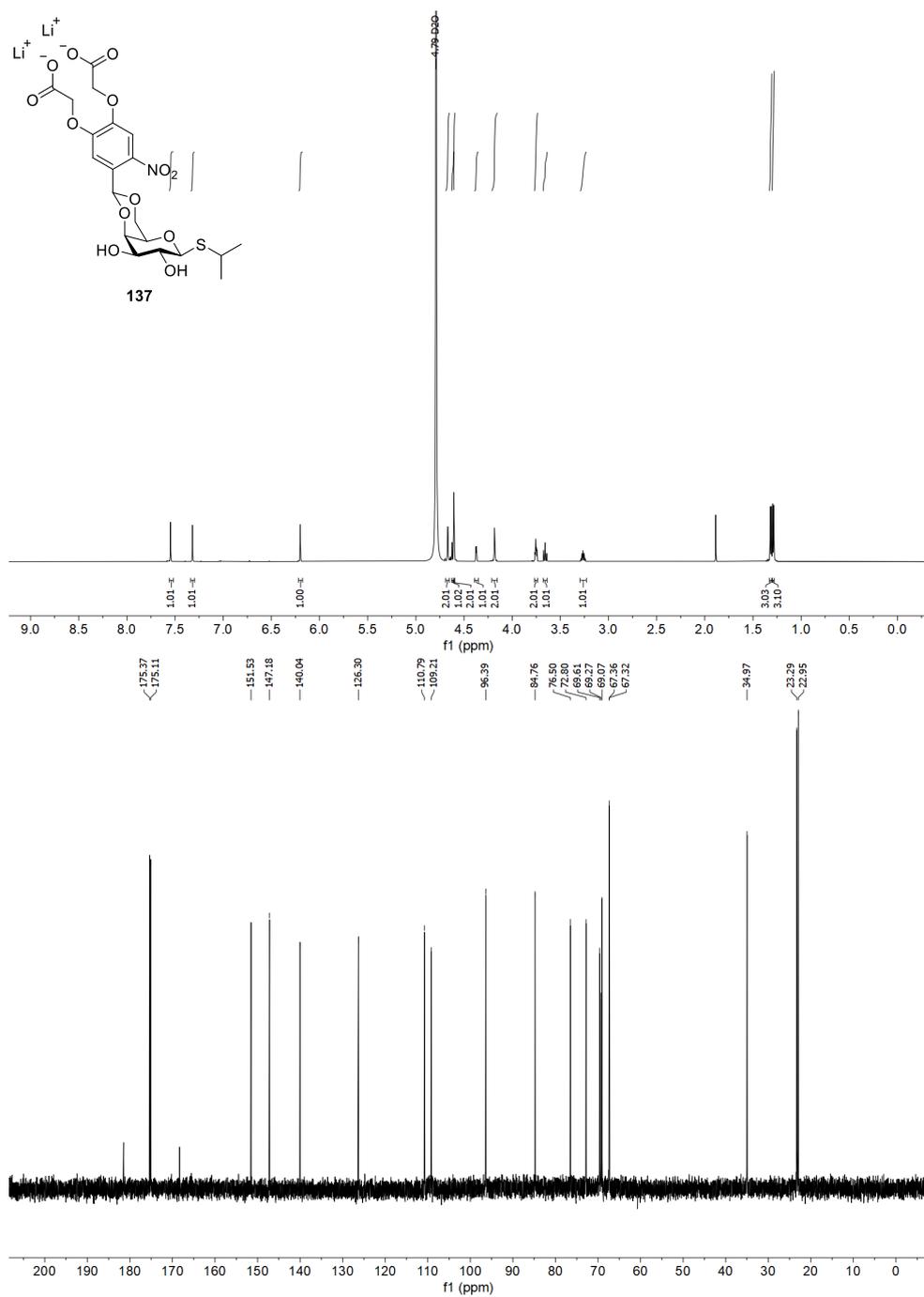


Abbildung 172: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **137** in D₂O (600 MHz/151 MHz).

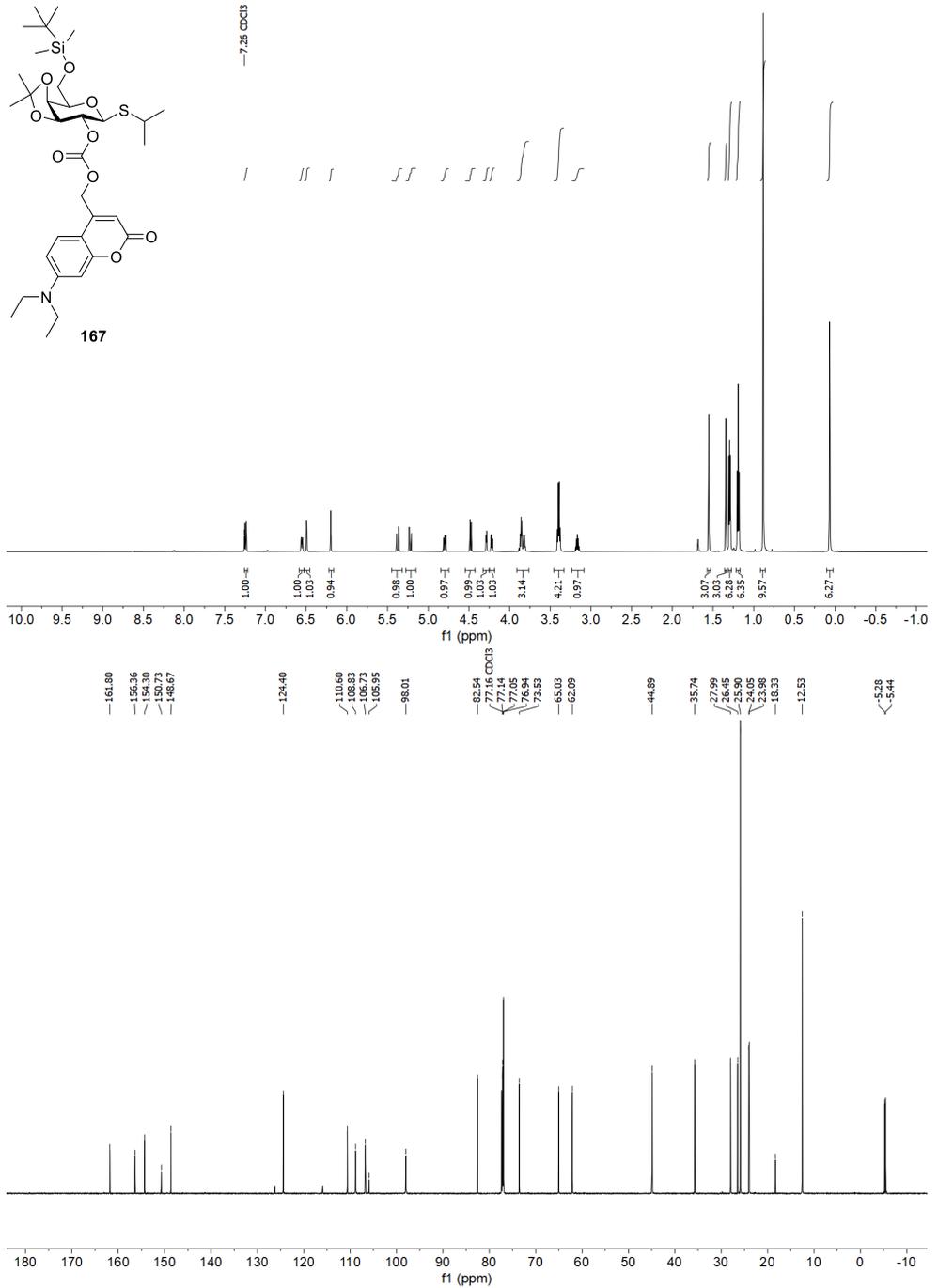


Abbildung 173: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **167** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

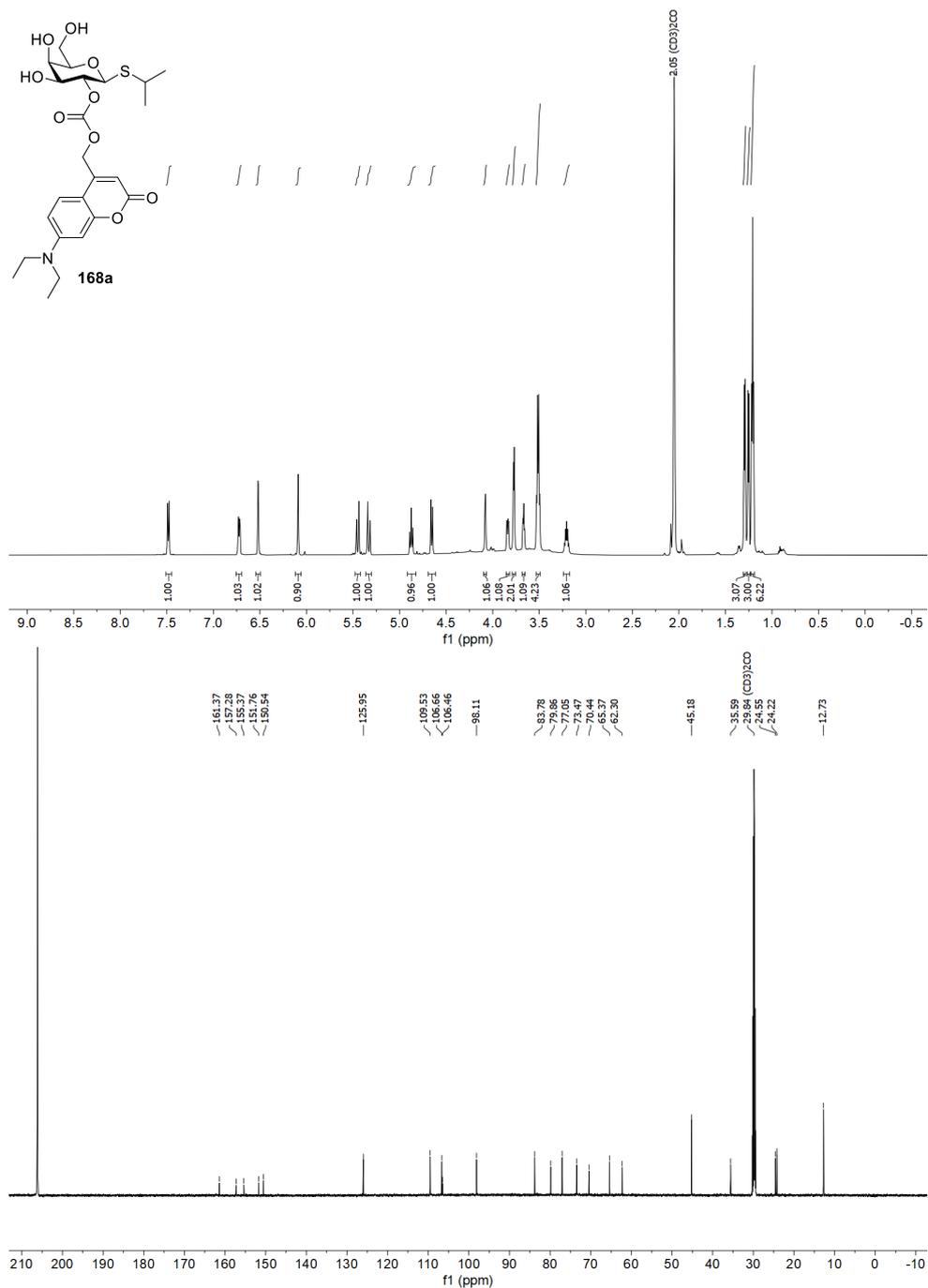


Abbildung 174: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **168a** in Aceton-d₆ (600 MHz/151 MHz).

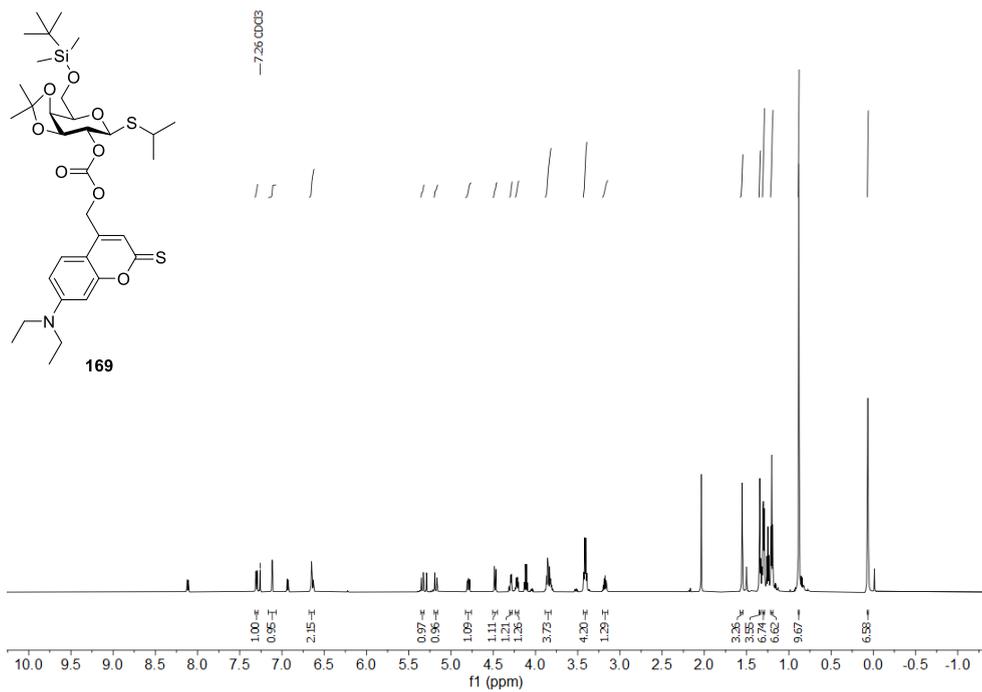


Abbildung 175: ^1H -Spektrum von **169** in CDCl_3 (600 MHz).

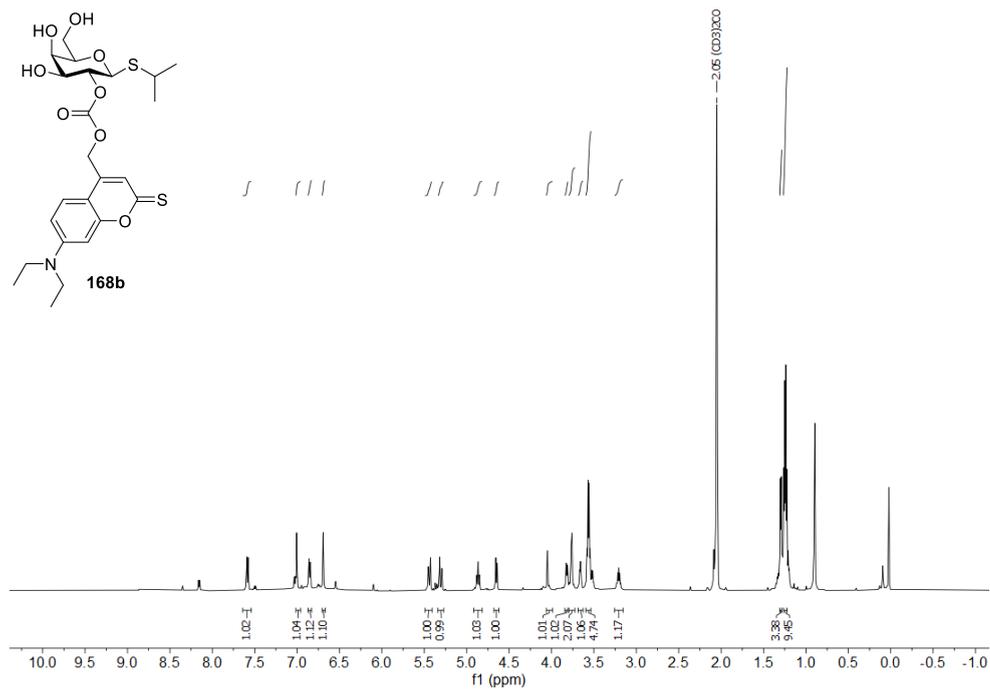


Abbildung 176: ^1H -Spektrum von **168b** in $\text{Aceton-}d_6$ (600 MHz).

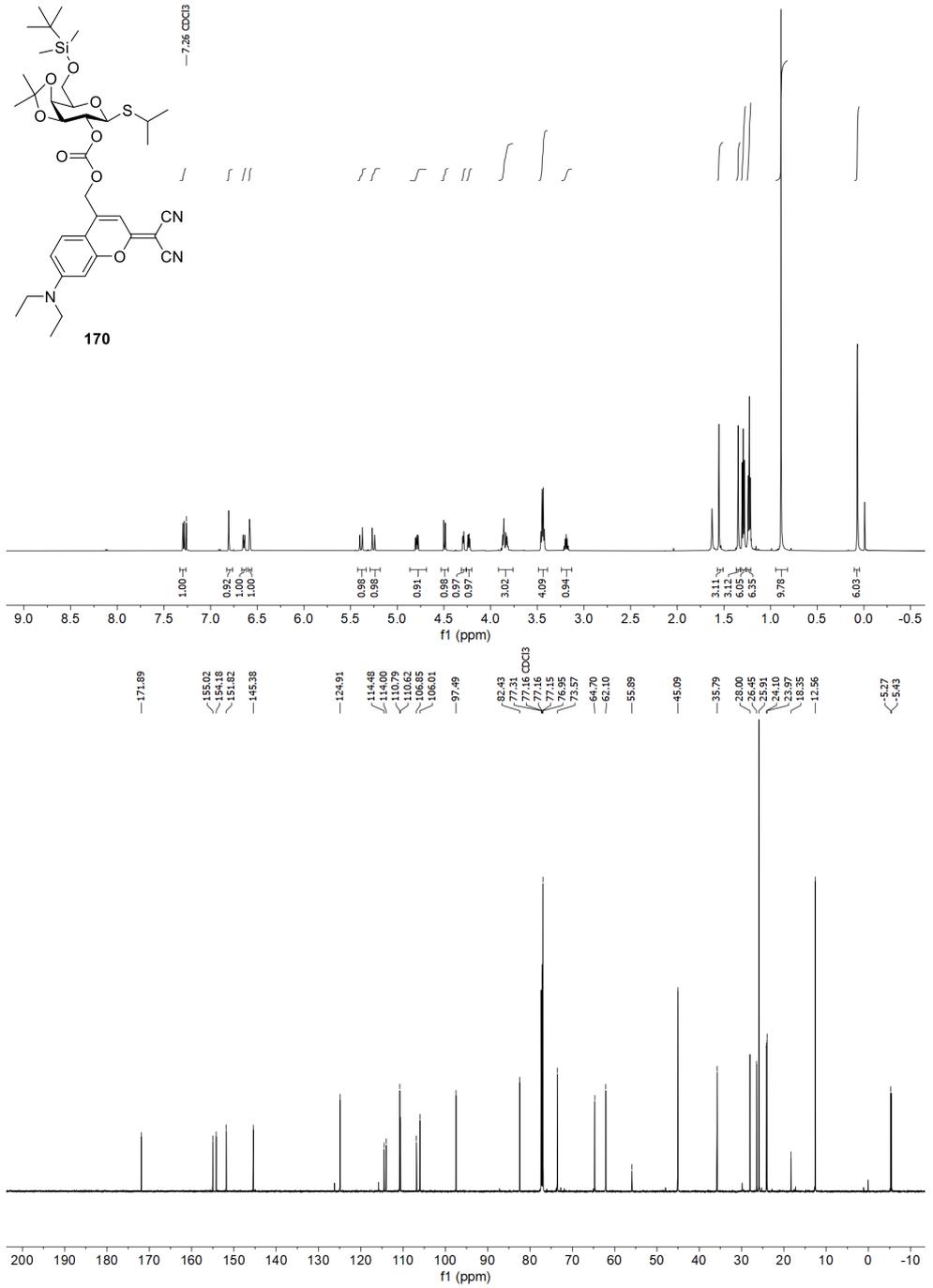


Abbildung 177: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **170** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

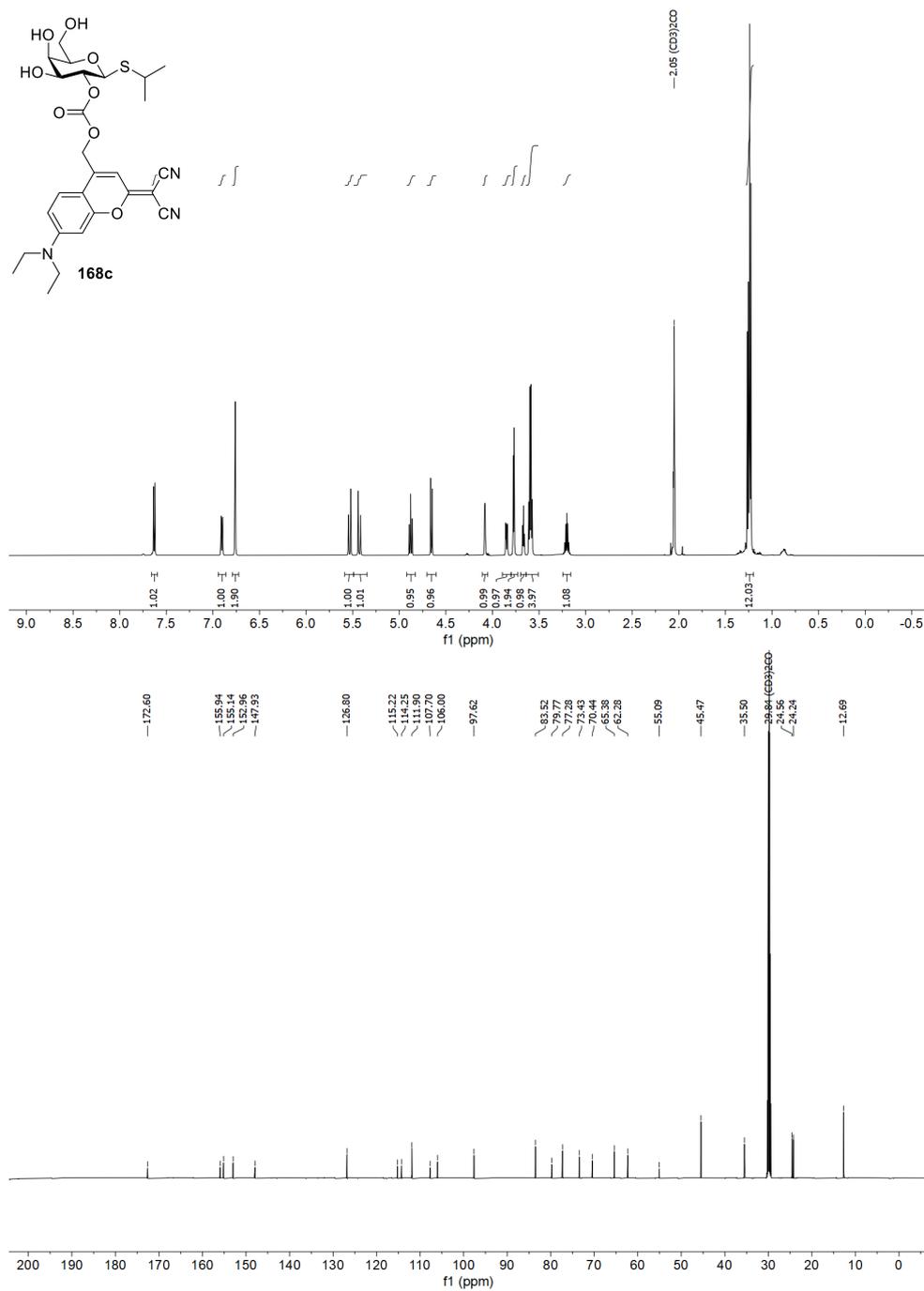


Abbildung 178: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **168c** in Aceton-d₆ (600 MHz/151 MHz).

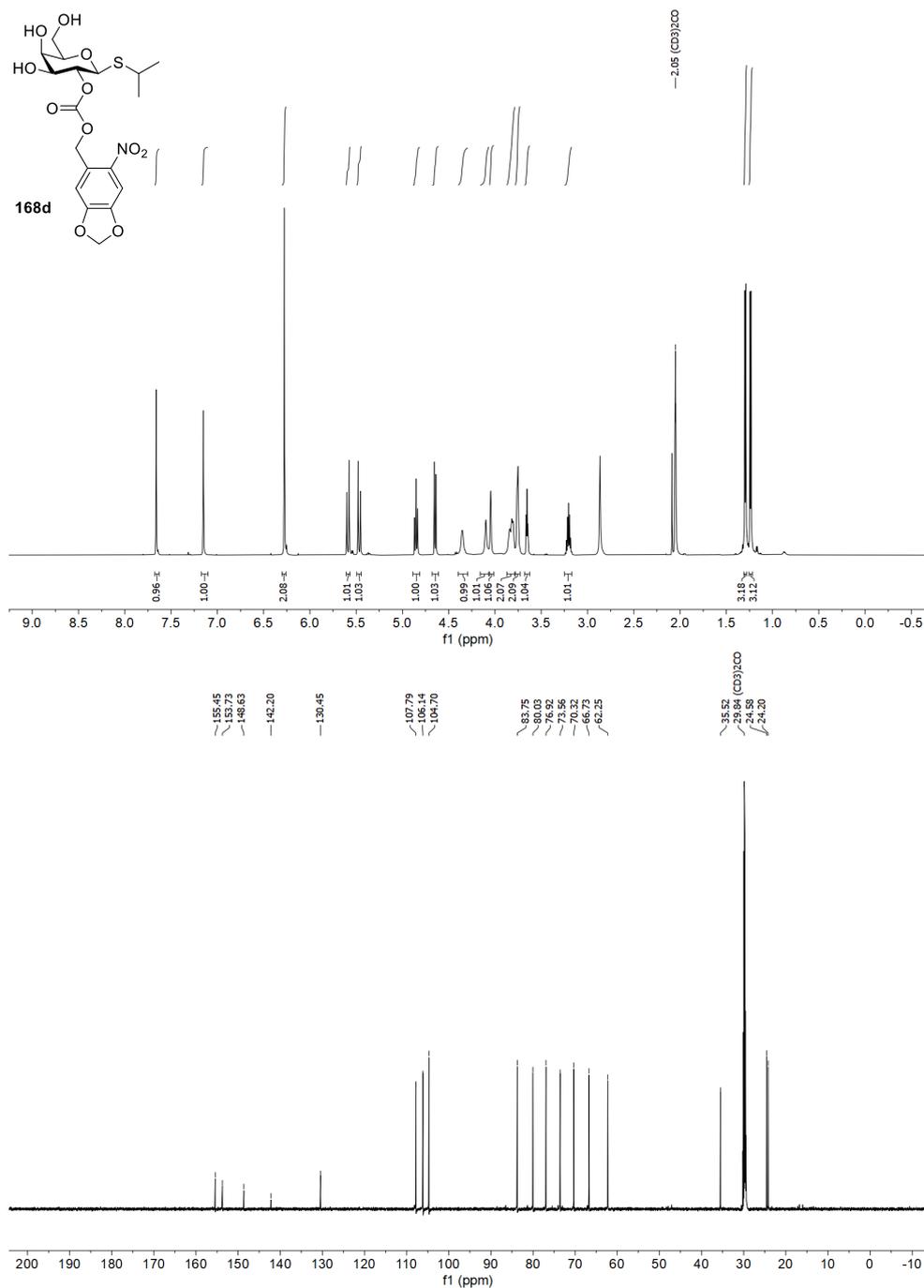


Abbildung 180: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **168d** in Aceton-d₆ (600 MHz/151 MHz).

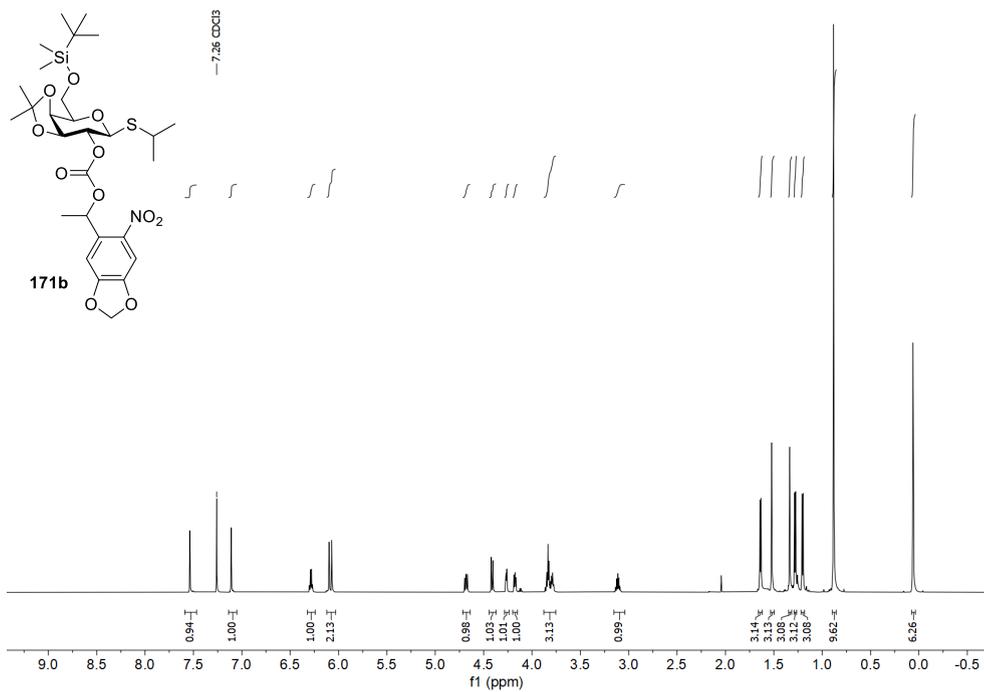


Abbildung 181: ¹H-Spektrum von **171b** in CDCl₃ (600 MHz).

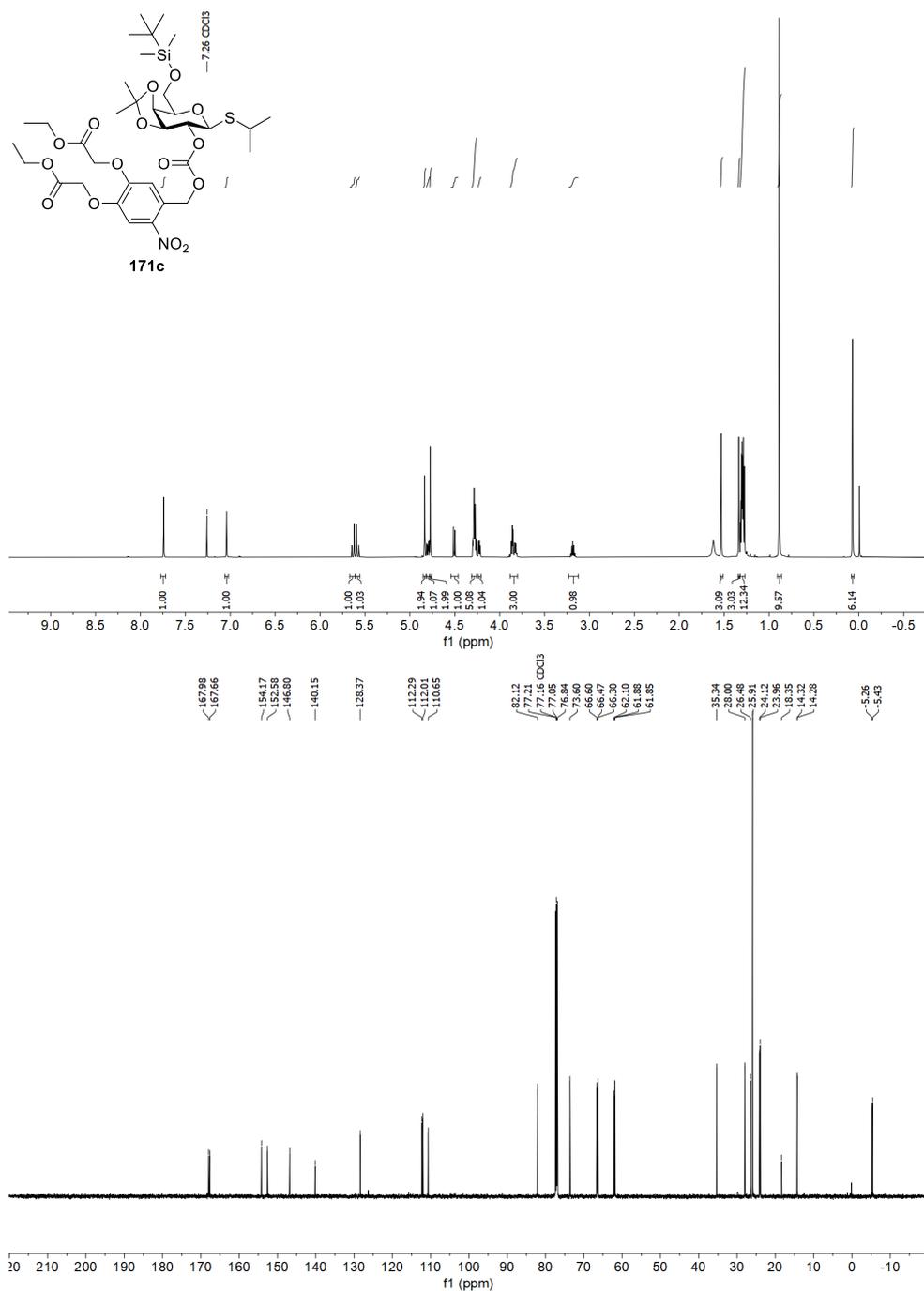


Abbildung 182: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **171c** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

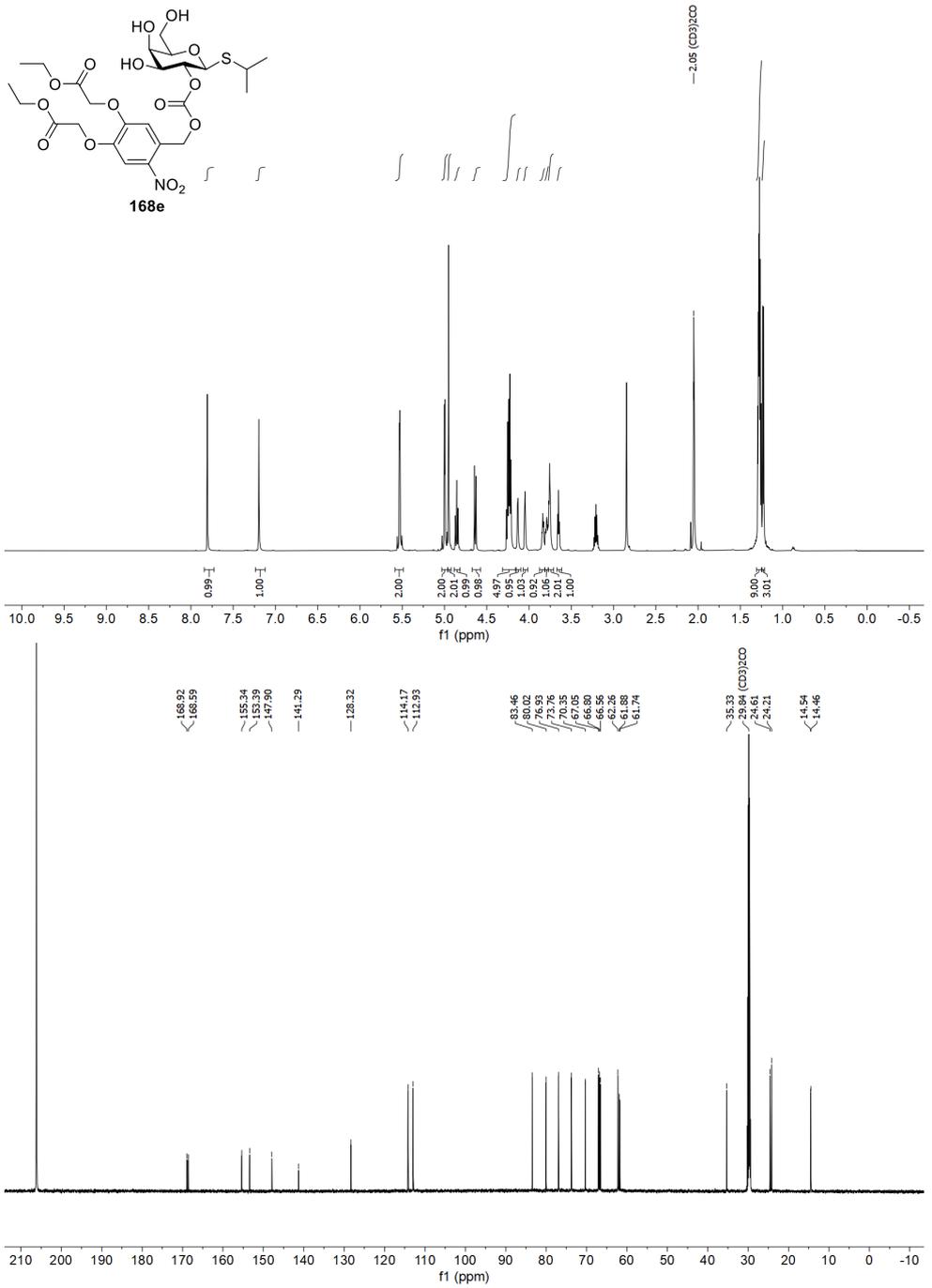


Abbildung 183: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **168e** in Aceton-*d*₆ (600 MHz/151 MHz).

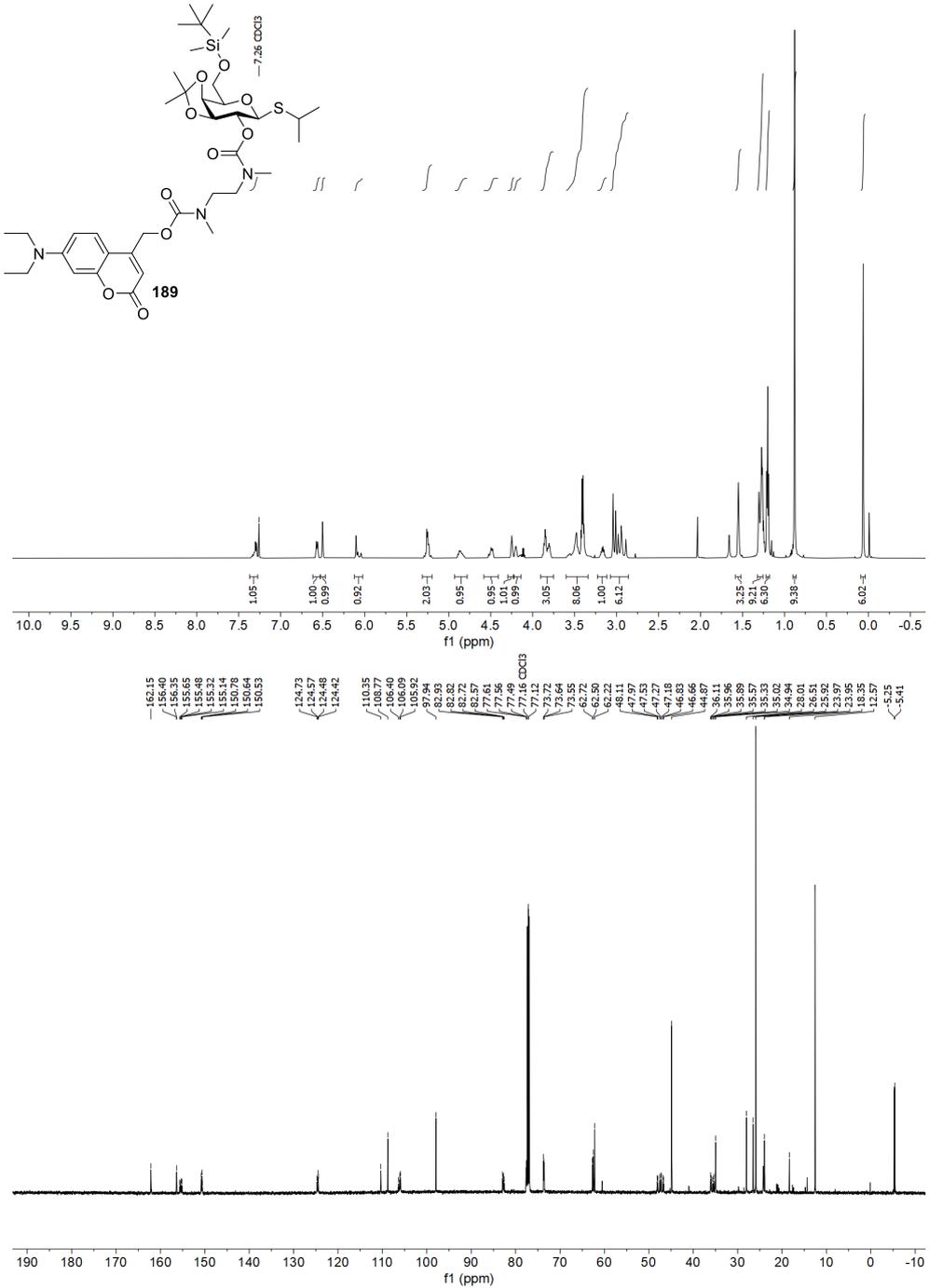


Abbildung 186: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **189** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

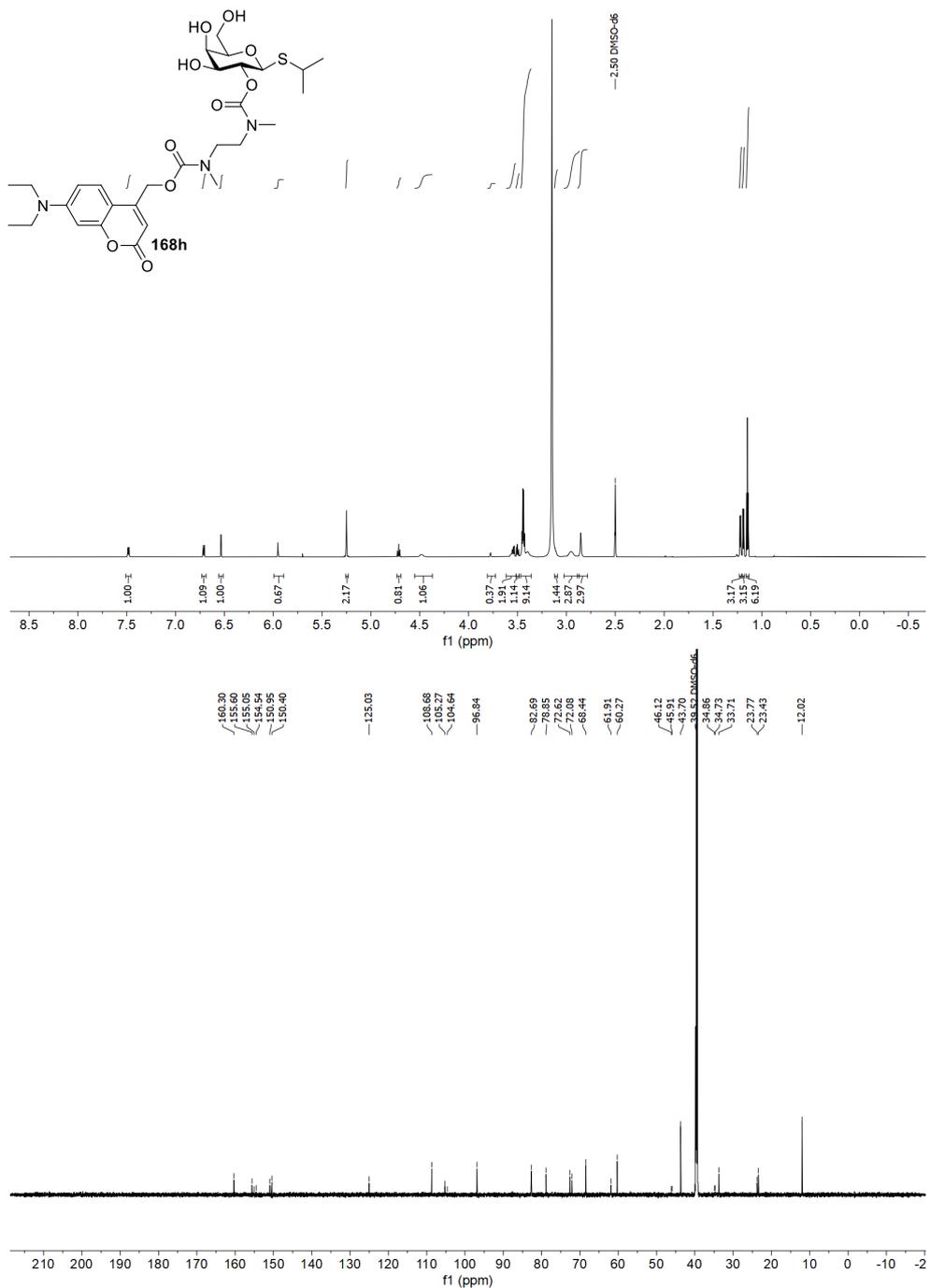


Abbildung 187: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **168h** in DMSO-*d*₆ (600 MHz/151 MHz).

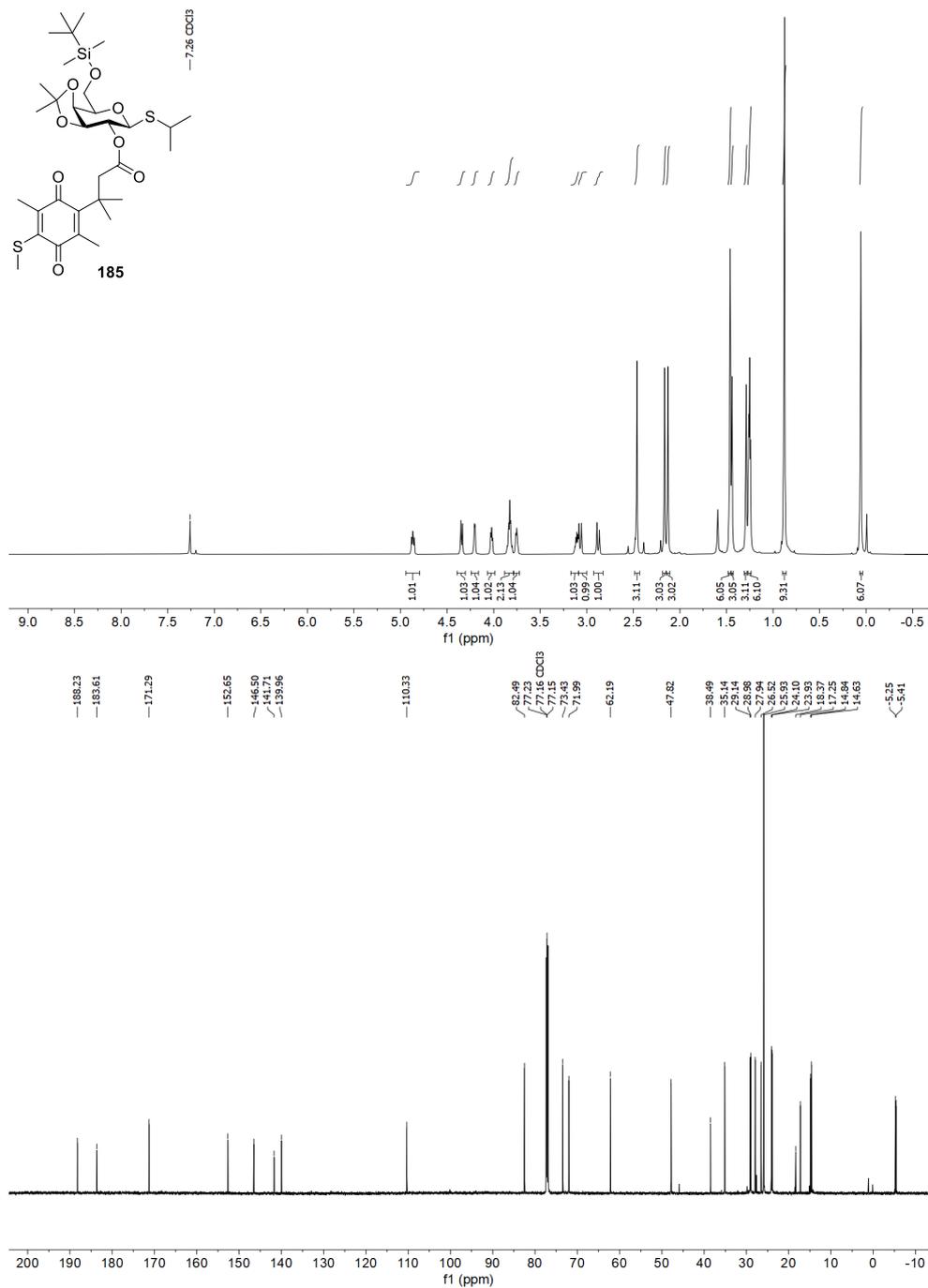


Abbildung 188: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **185** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

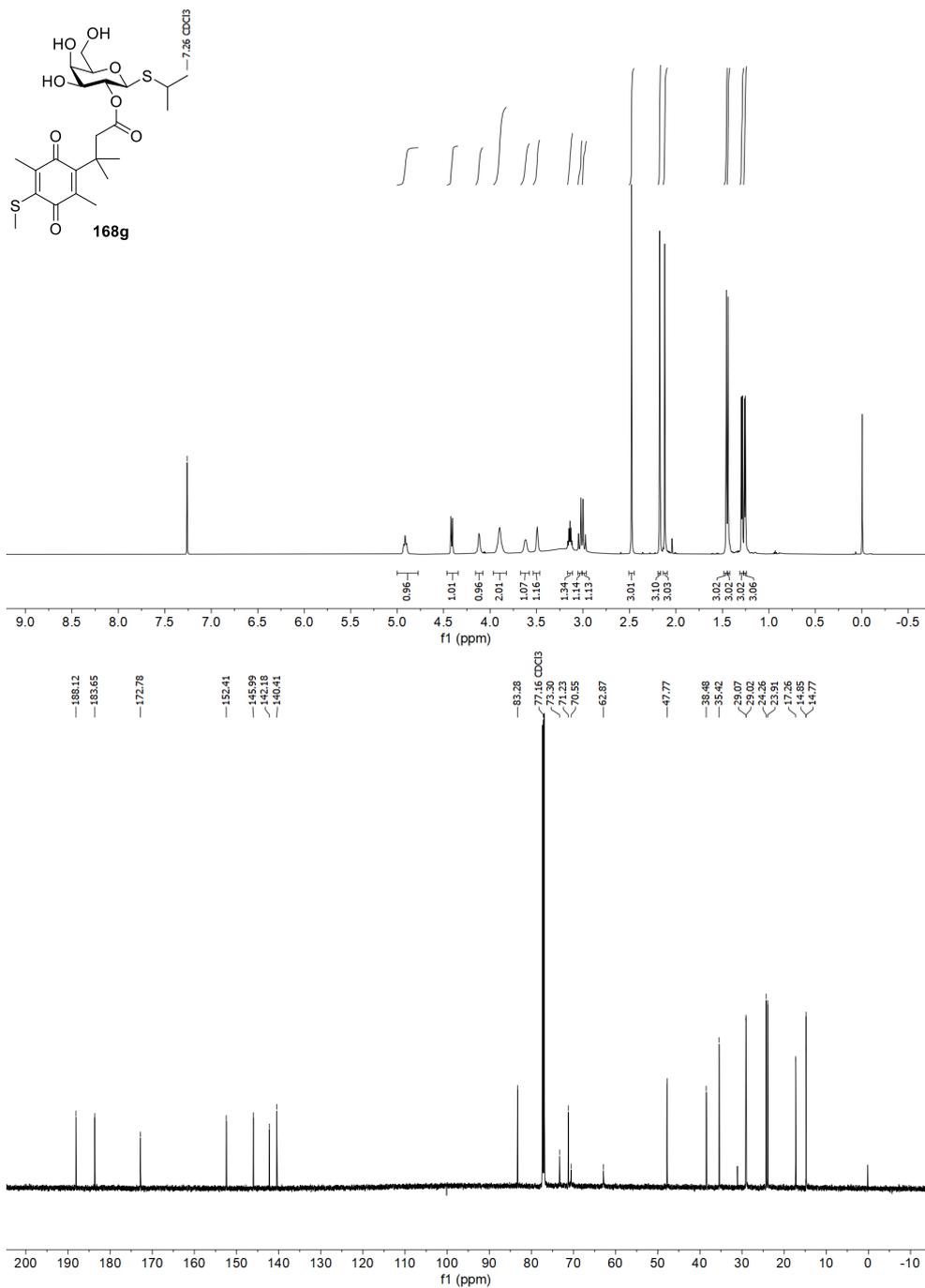


Abbildung 189: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **168g** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

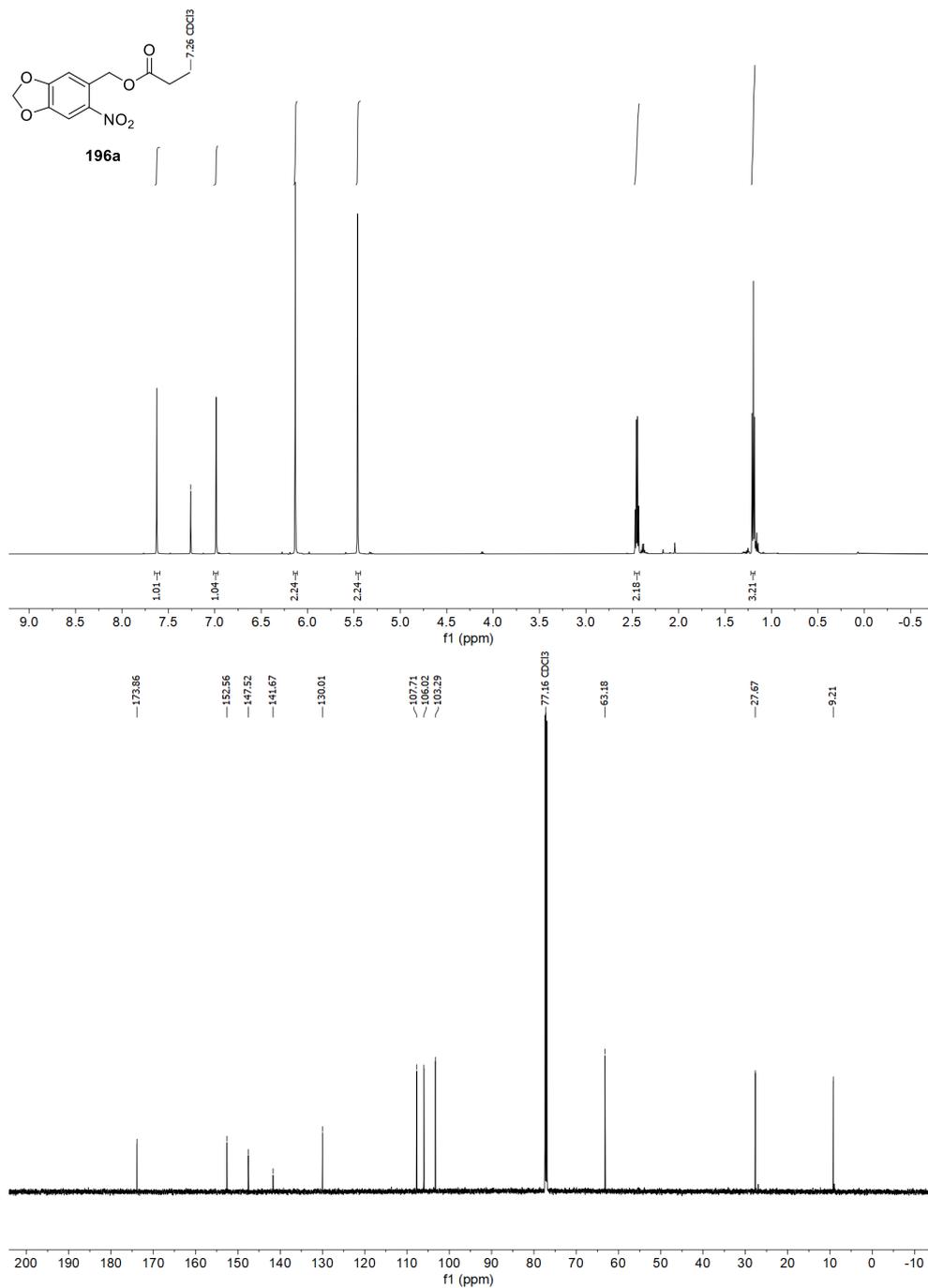


Abbildung 190: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **196a** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

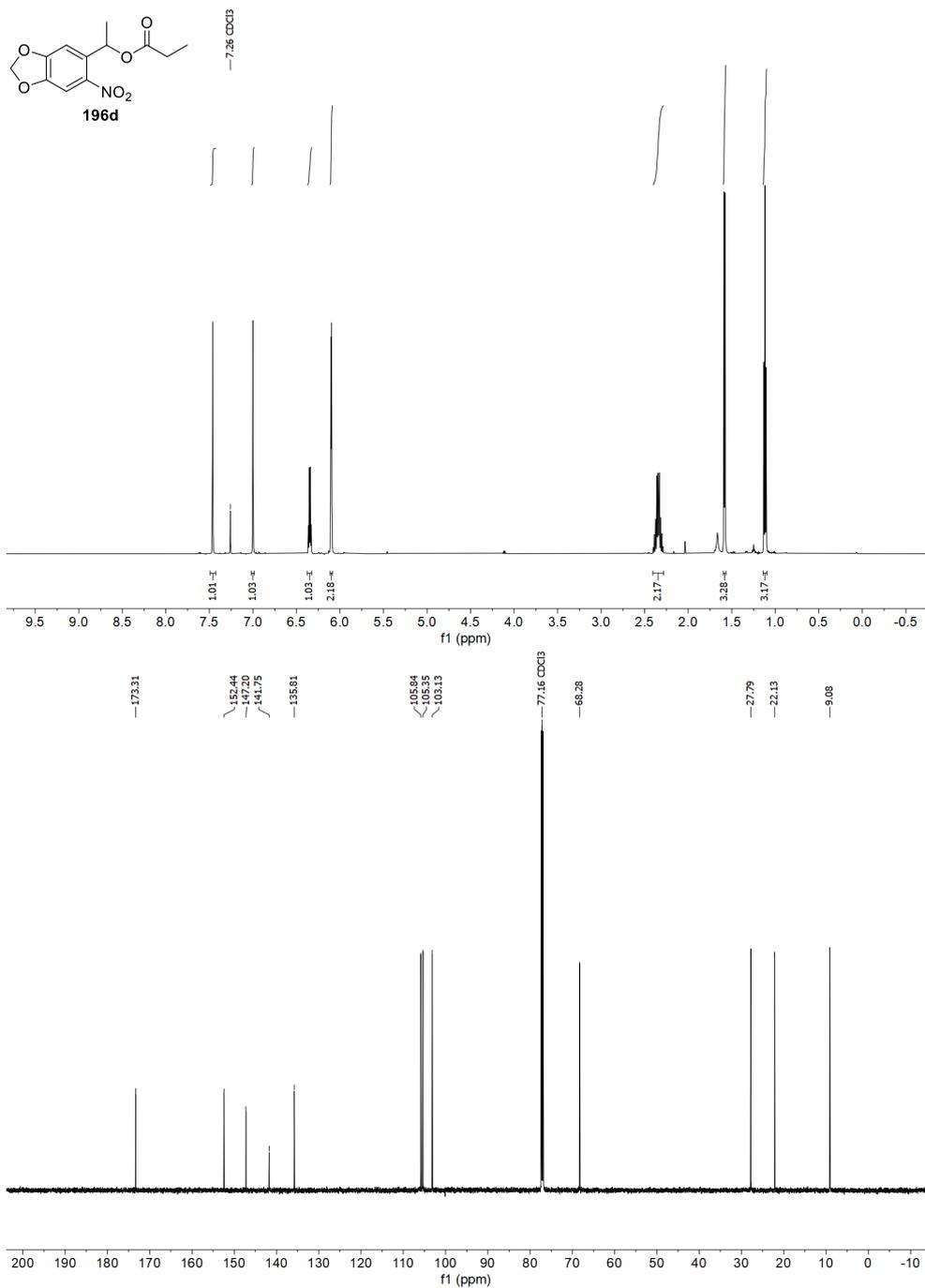


Abbildung 191: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **196d** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

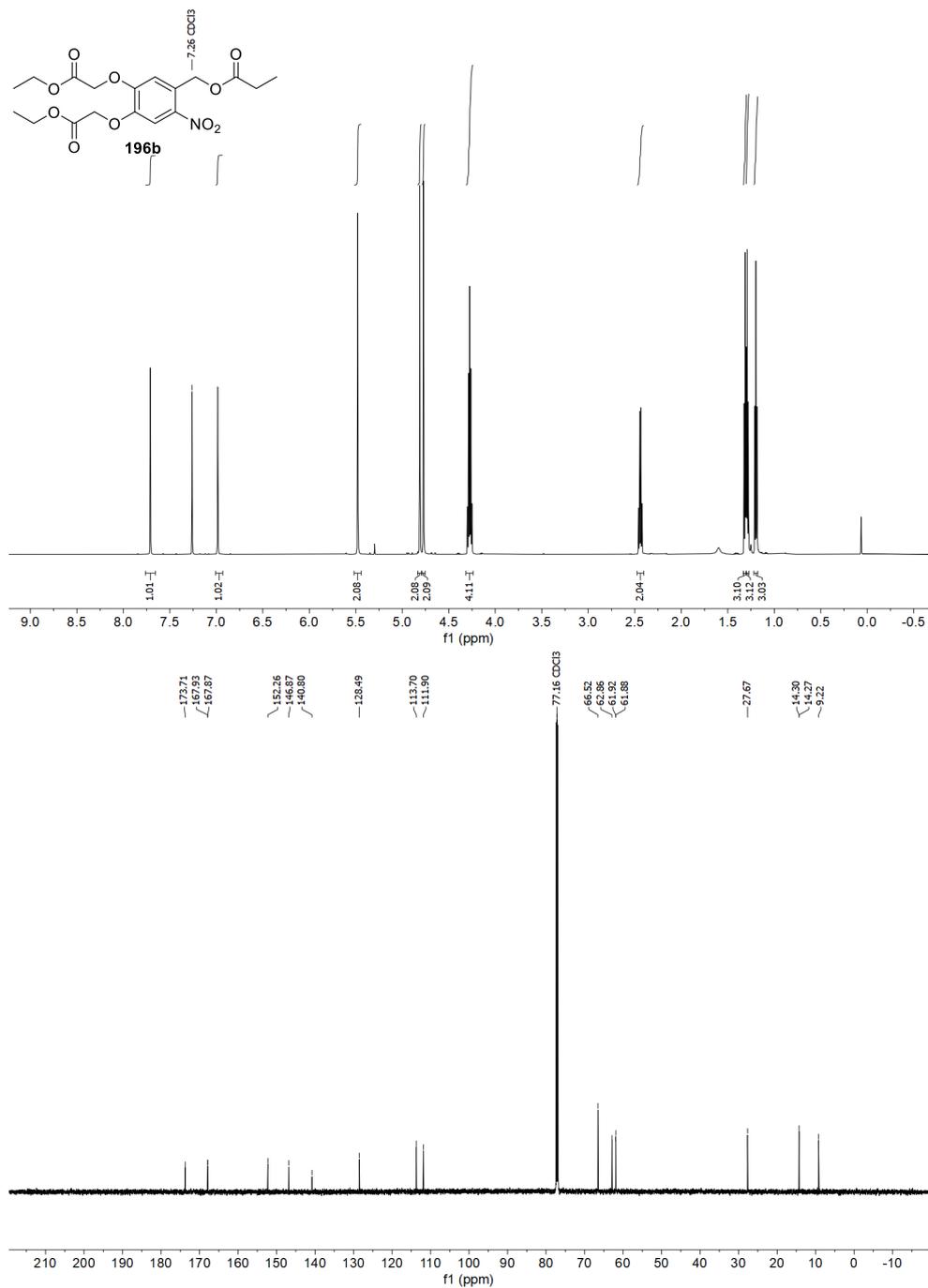
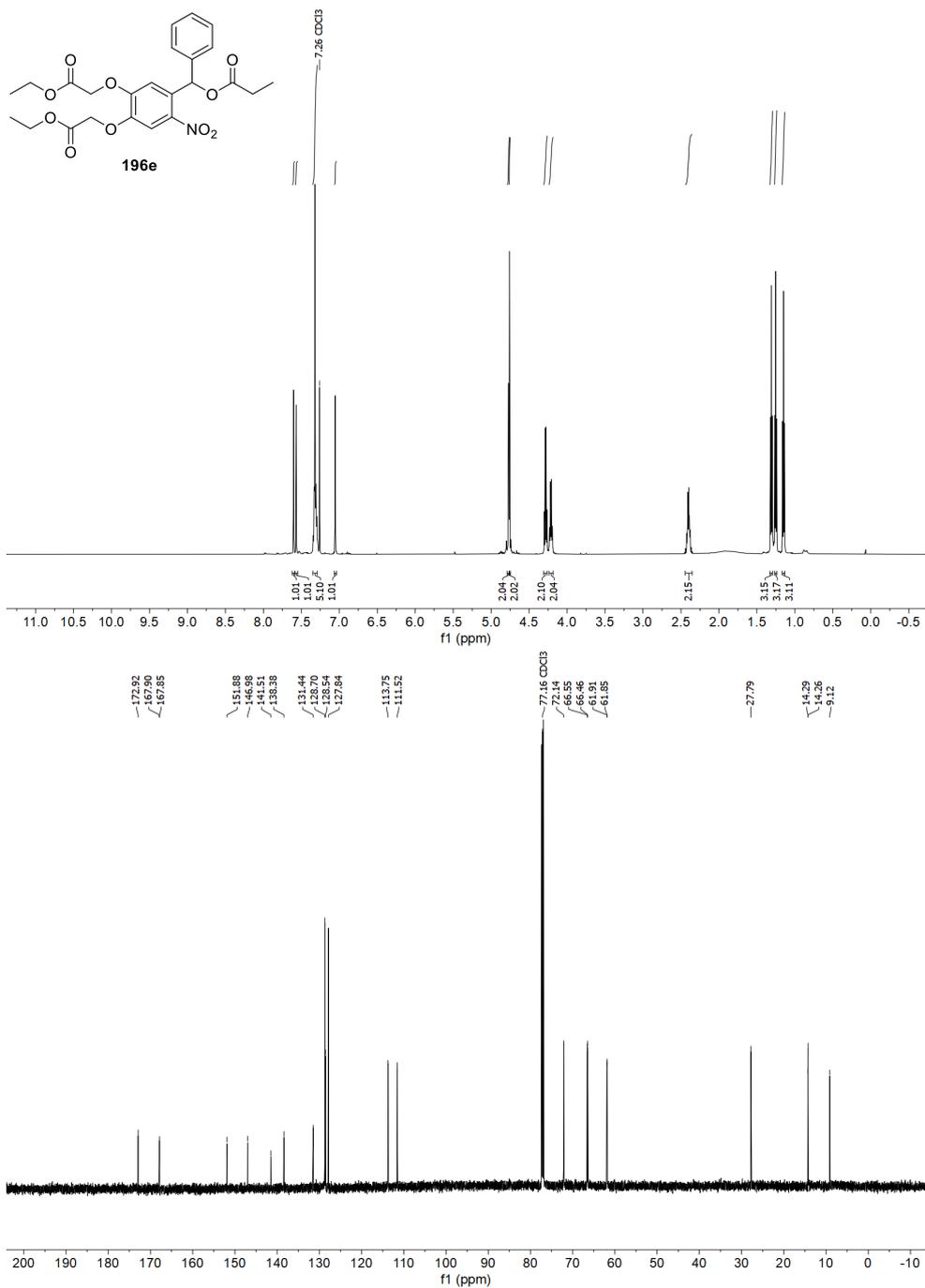


Abbildung 192: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **196b** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

Abbildung 193: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **196e** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

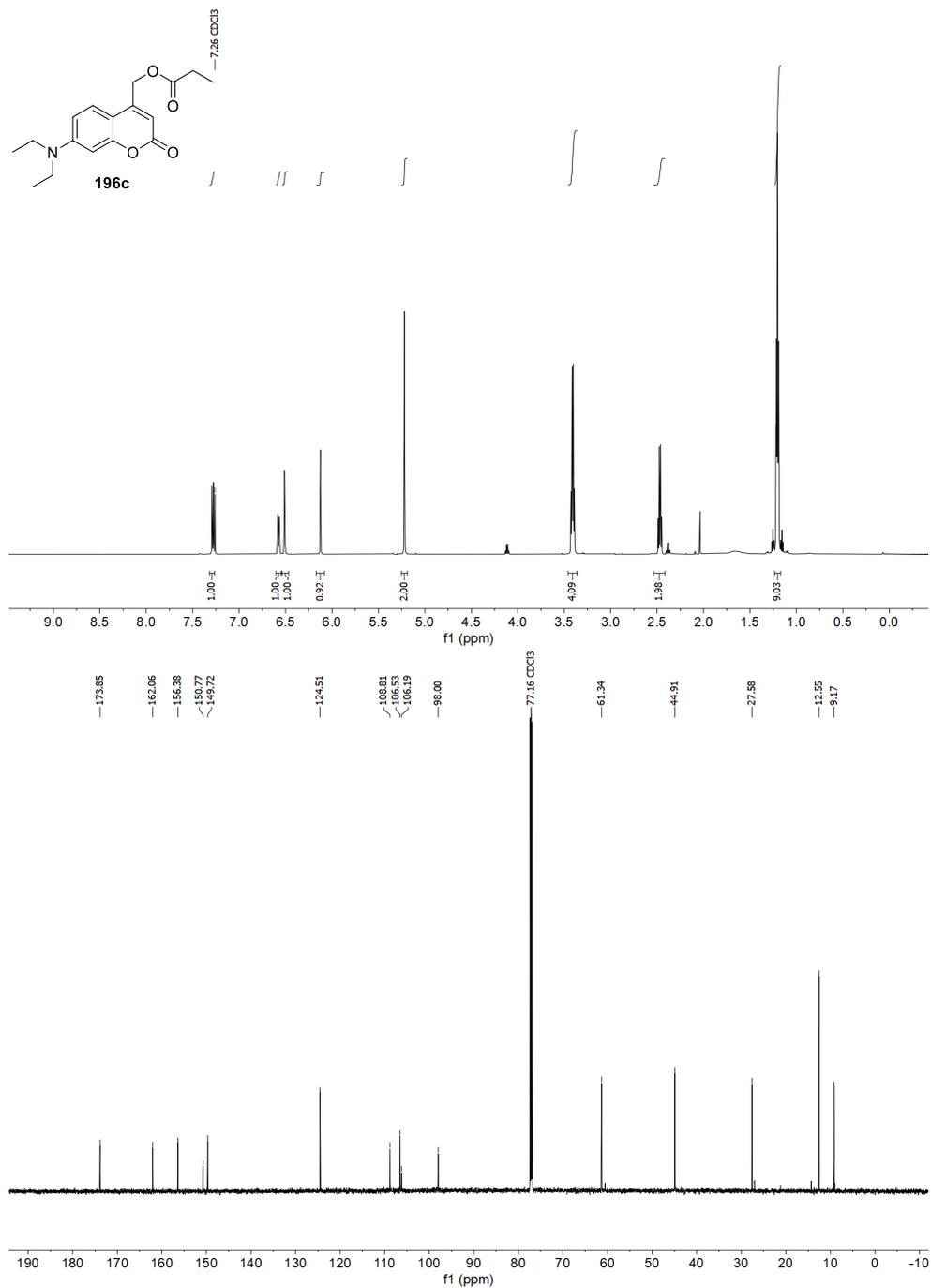


Abbildung 194: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **196c** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

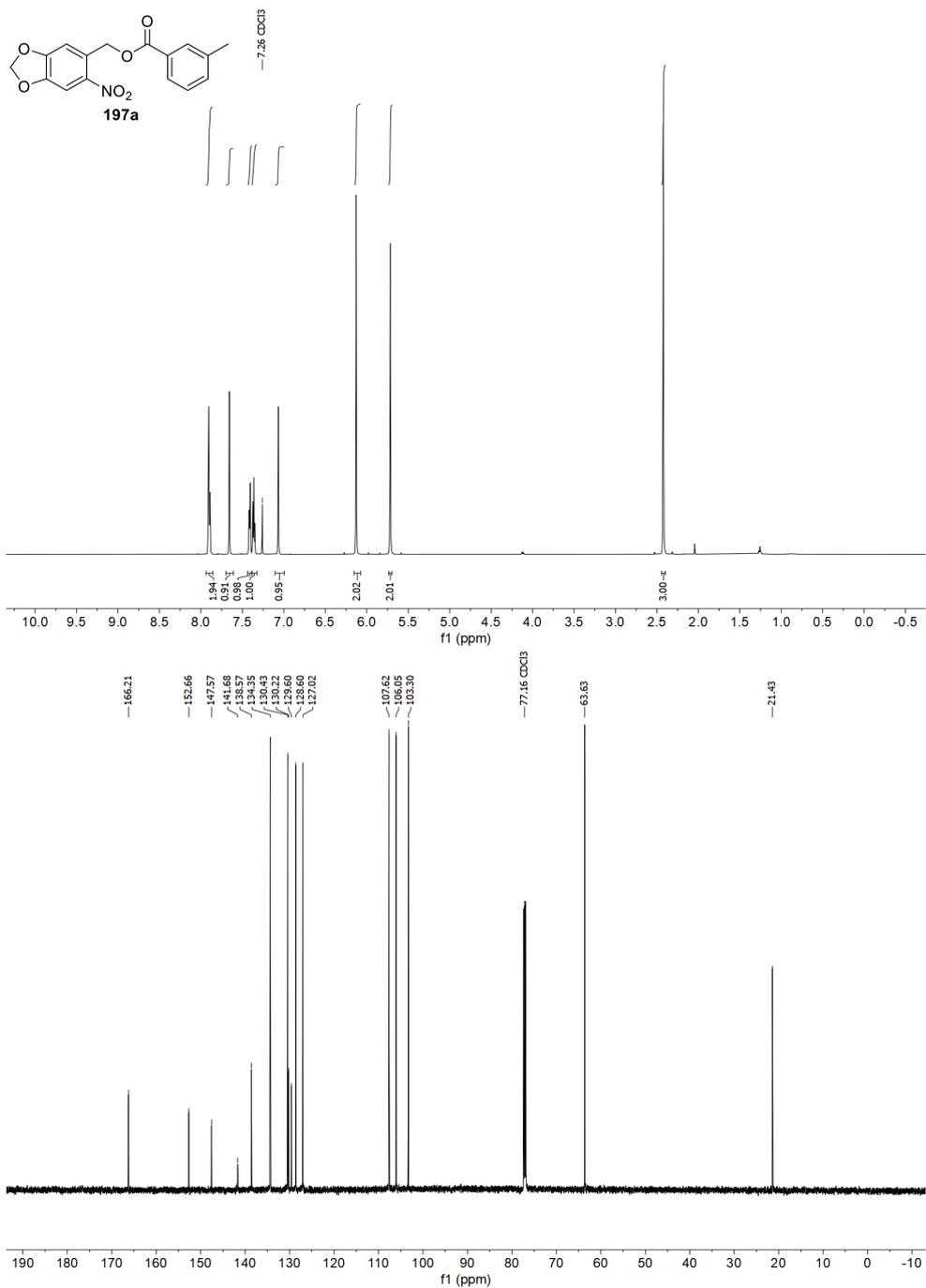


Abbildung 195: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **197a** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

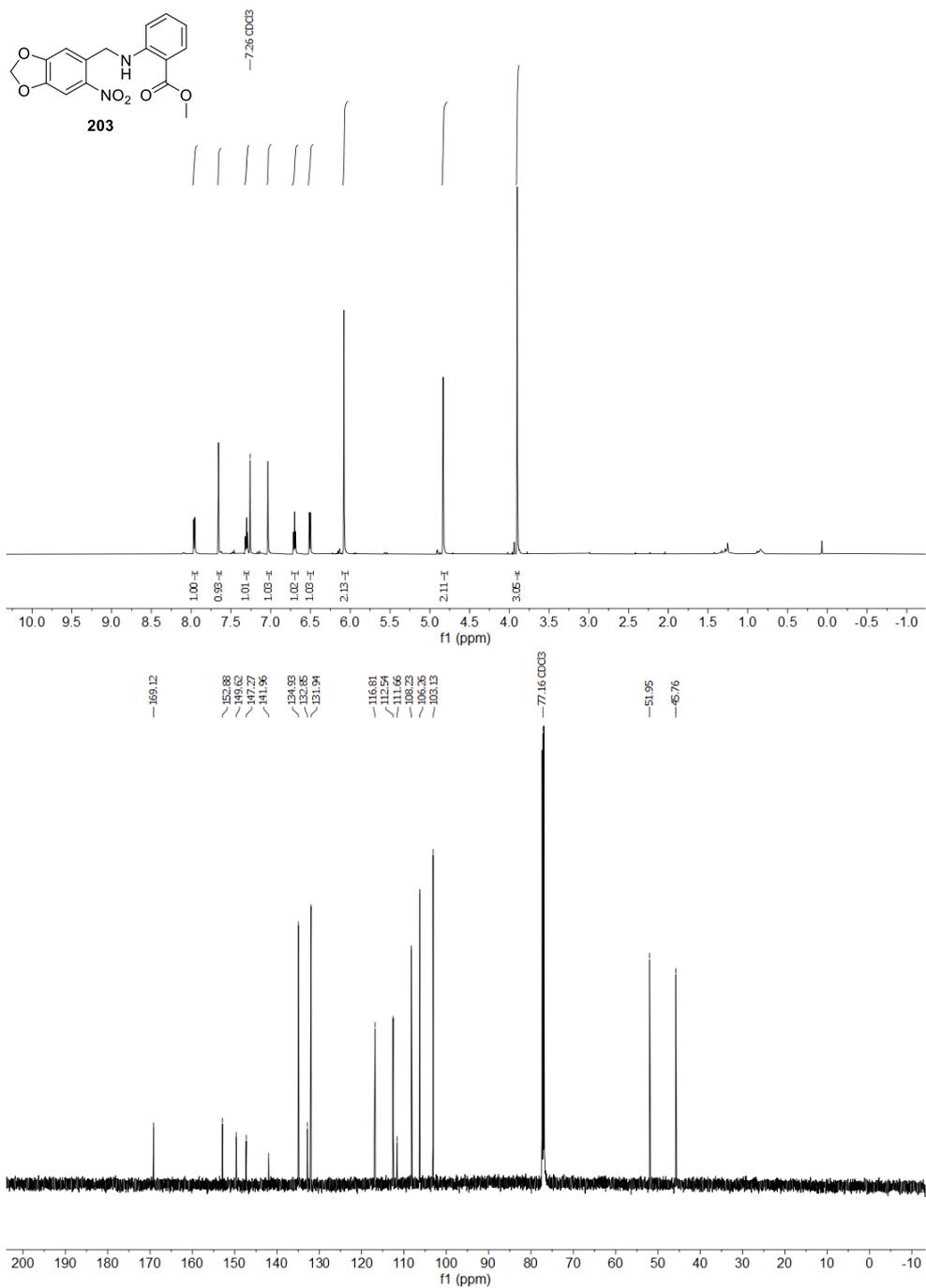


Abbildung 197: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **203** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

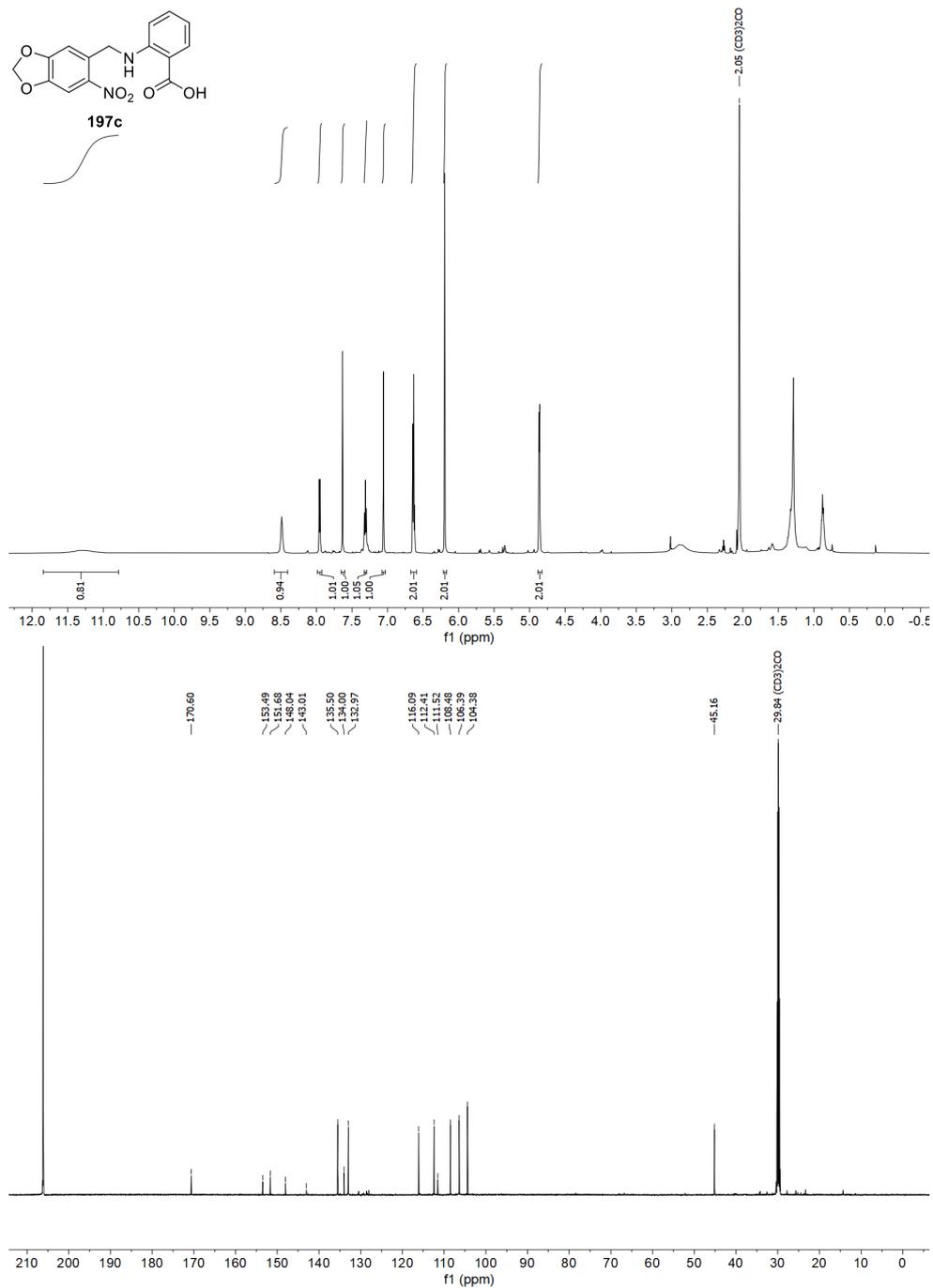


Abbildung 198: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **197c** in Aceton-*d*₆ (600 MHz/151 MHz).

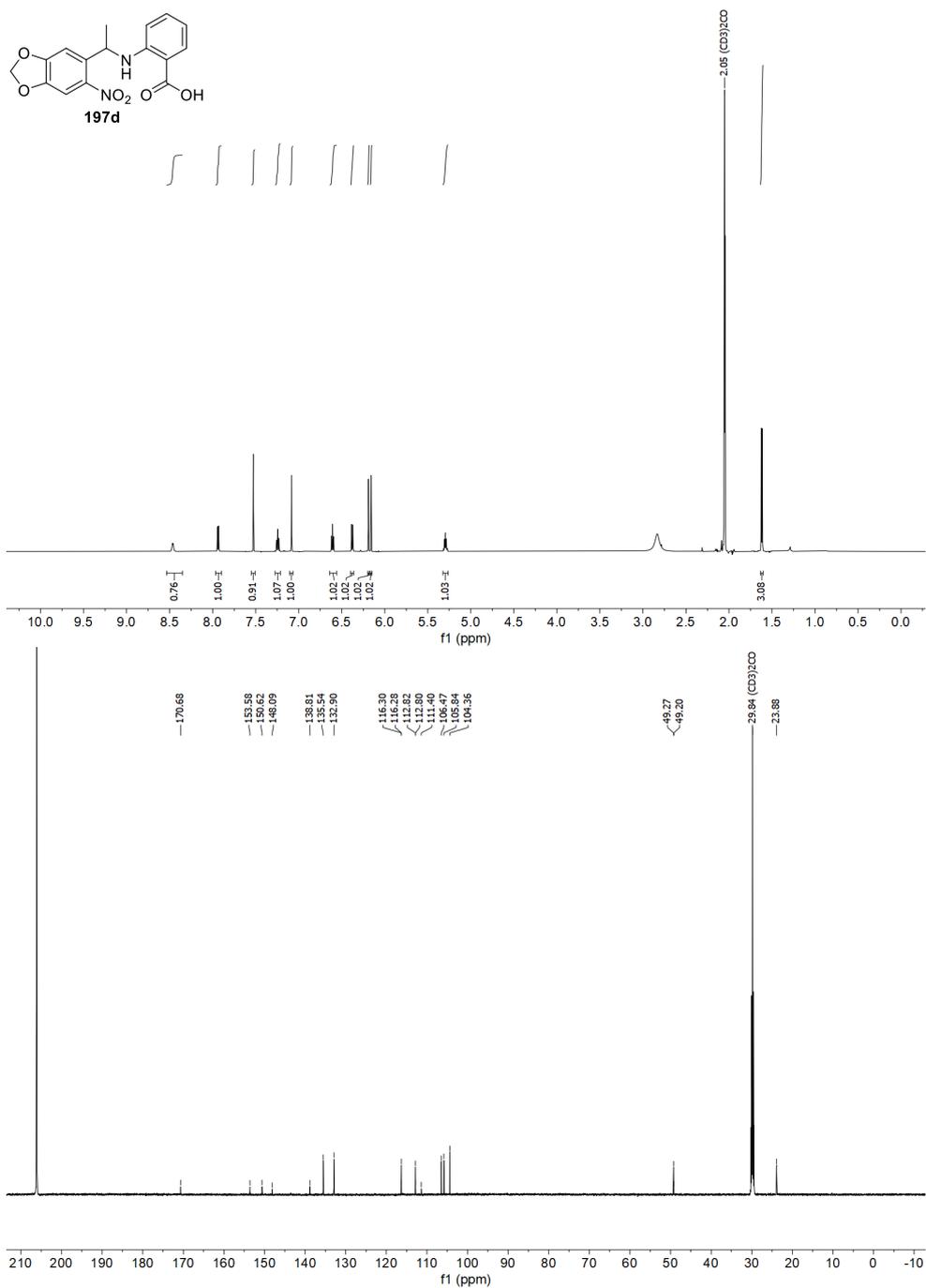


Abbildung 199: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **197d** in Aceton- d_6 (600 MHz/151 MHz).

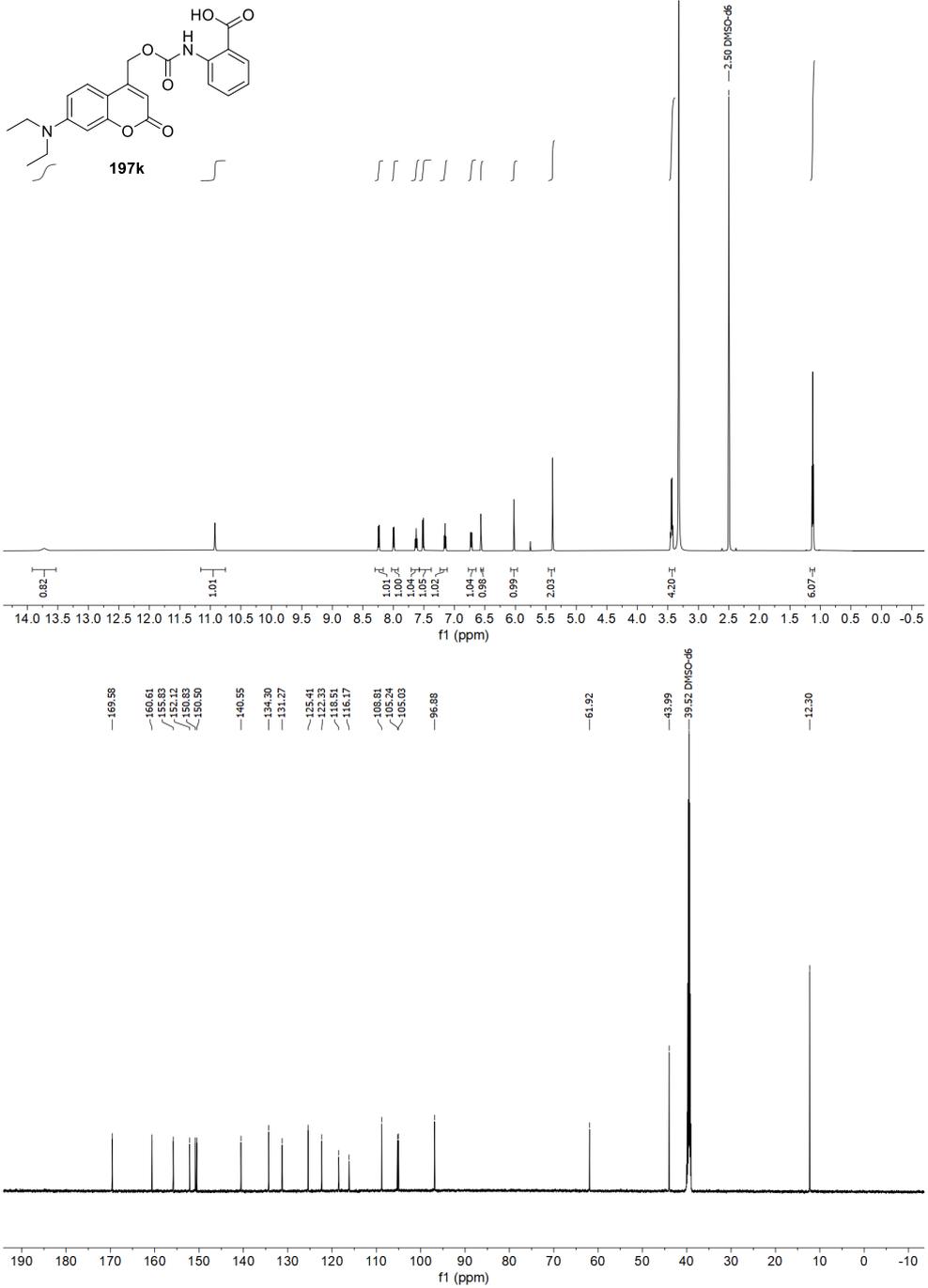


Abbildung 200: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **197k** in DMSO-*d*₆ (600 MHz/151 MHz).

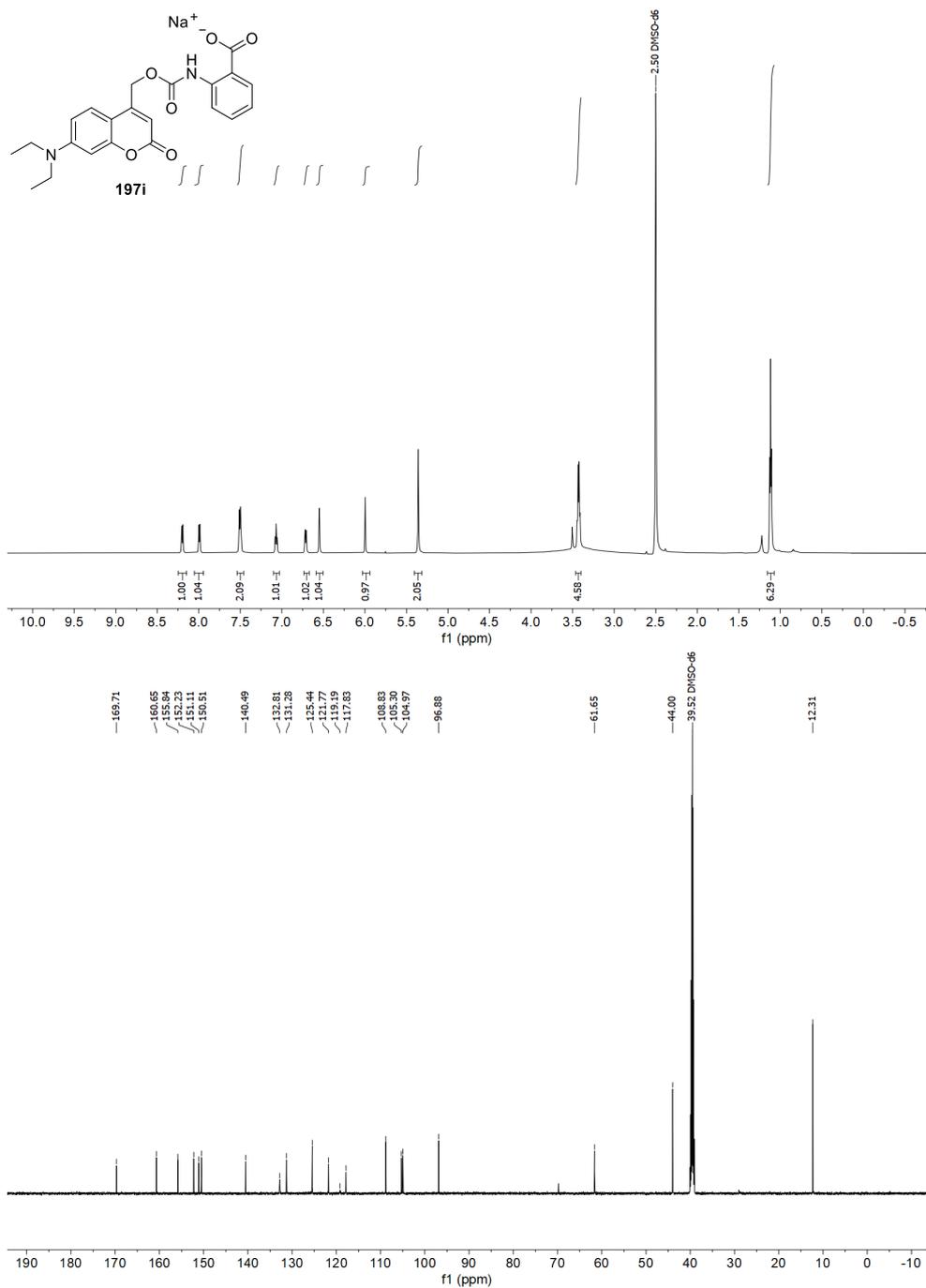


Abbildung 201: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **197i** in DMSO-*d*₆ (600 MHz/151 MHz).

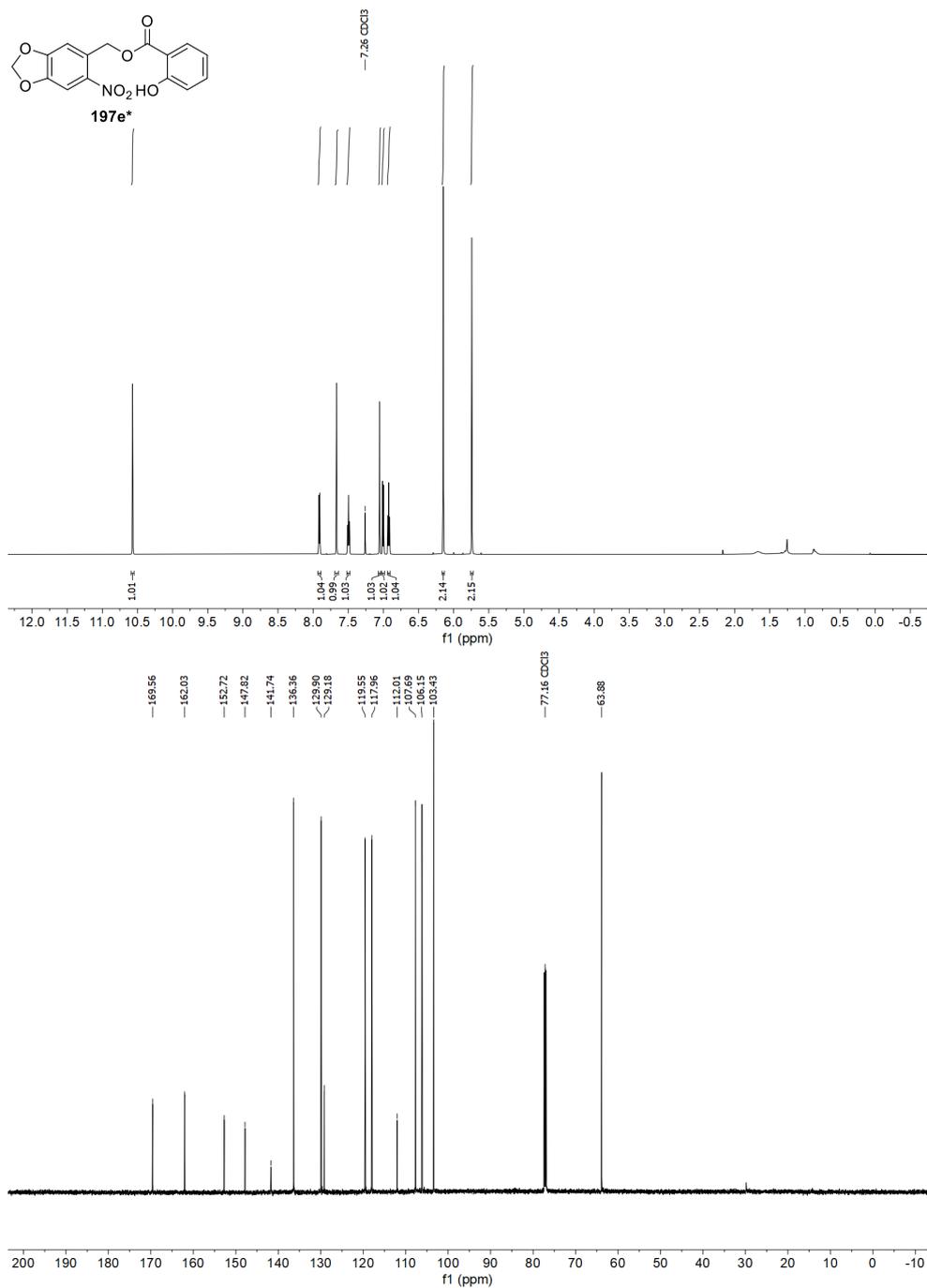


Abbildung 202: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **197e*** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

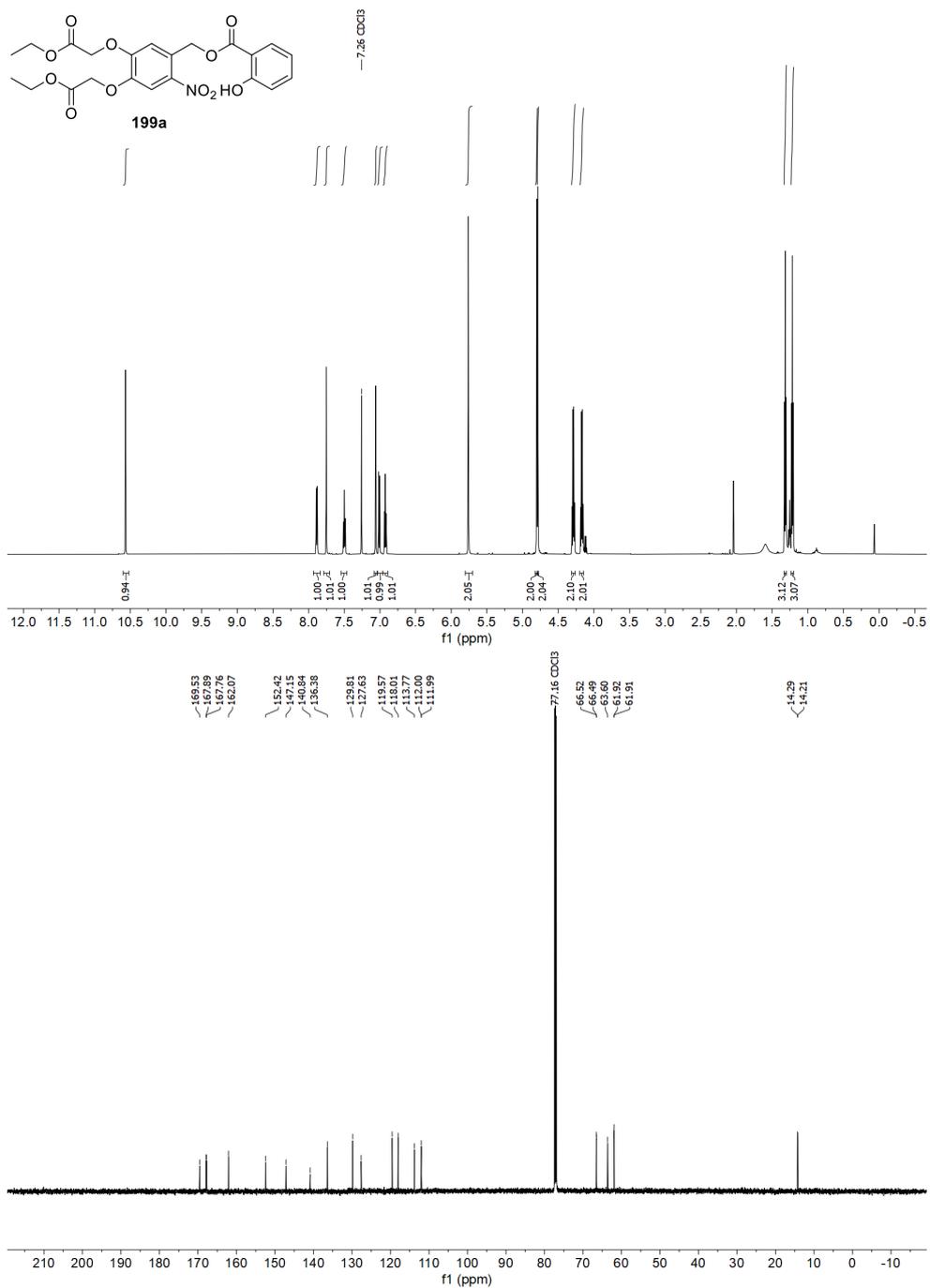


Abbildung 203: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **199a** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

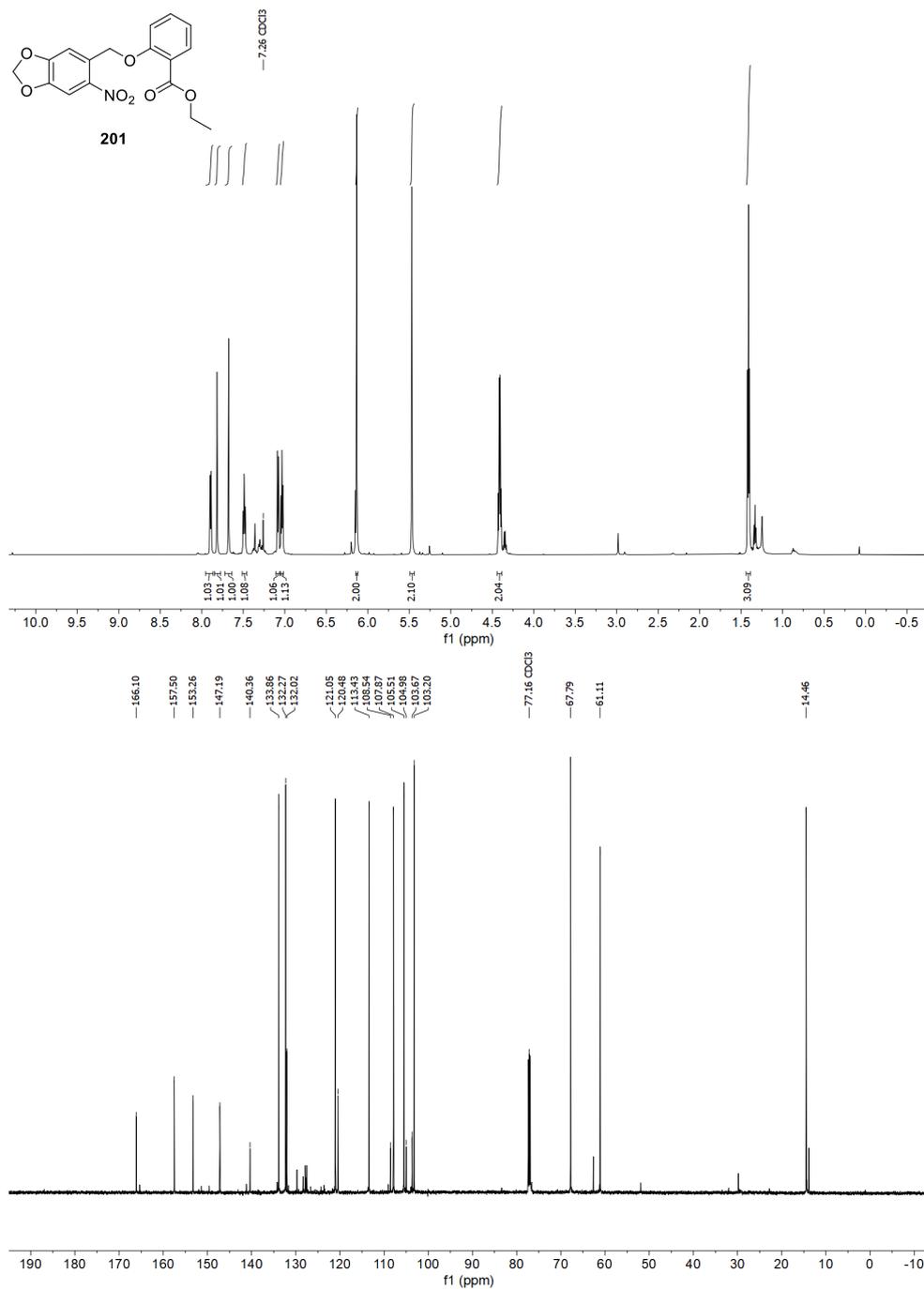


Abbildung 204: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **201** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

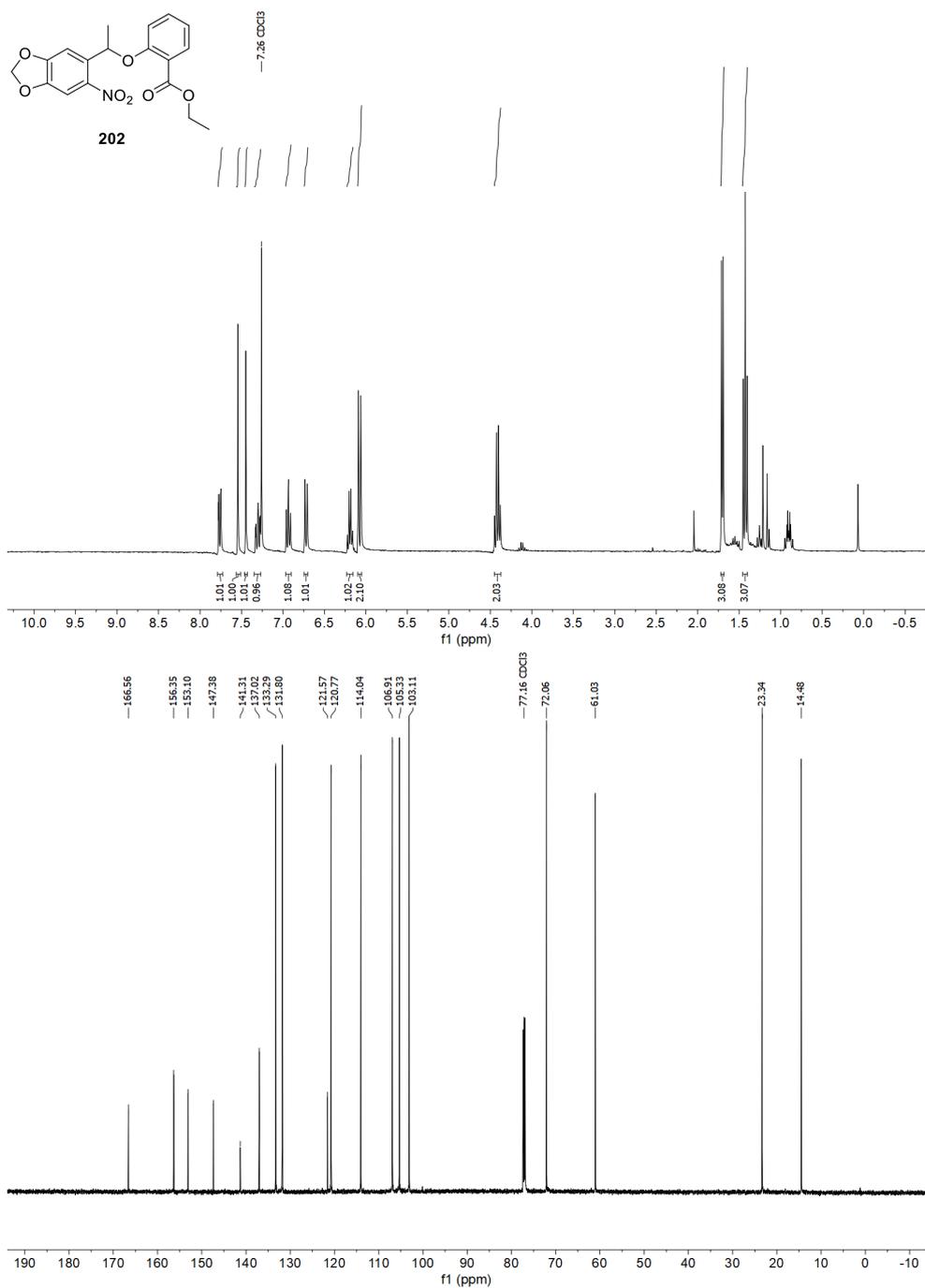


Abbildung 205: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **202** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

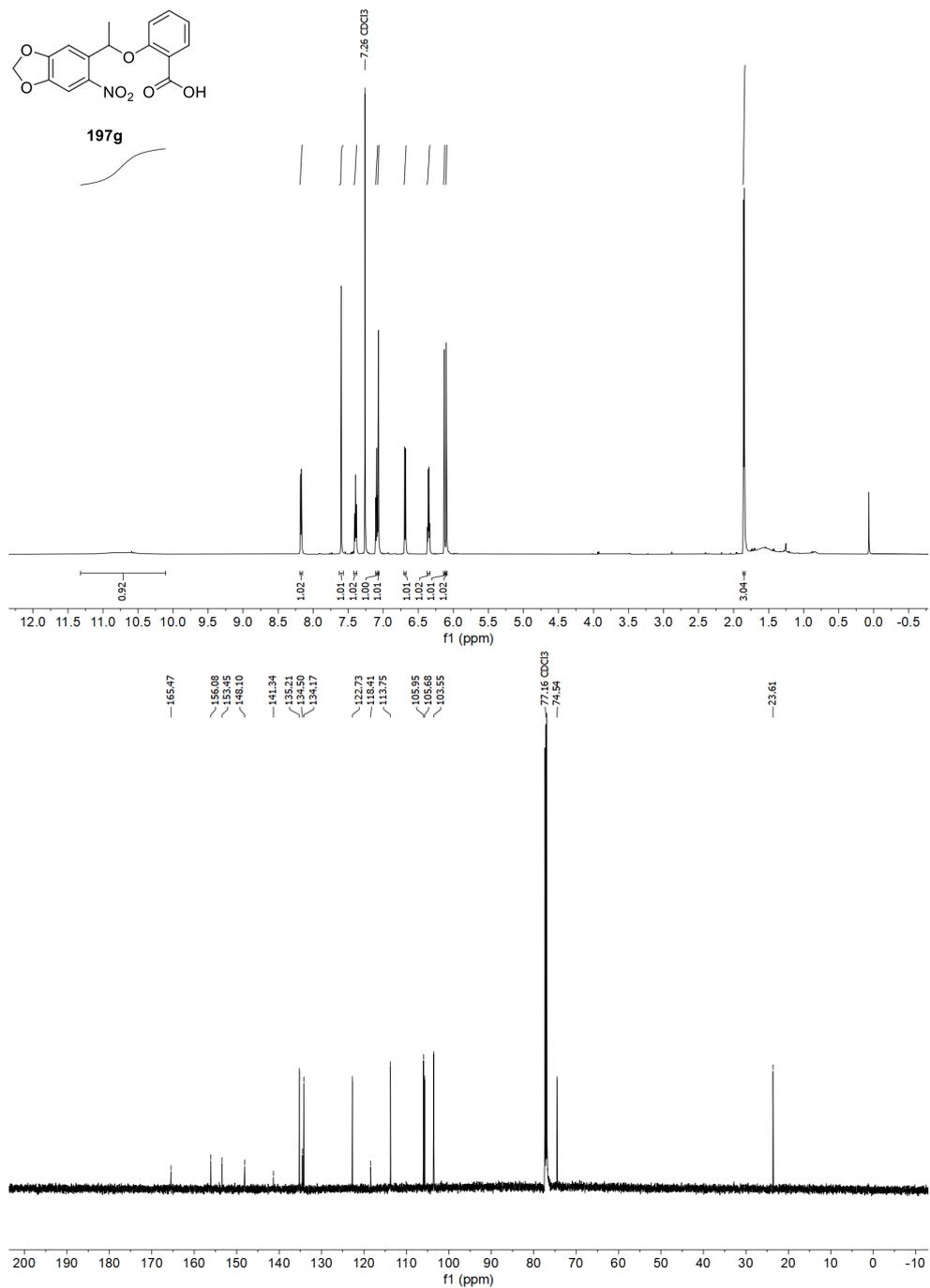


Abbildung 206: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **197g** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

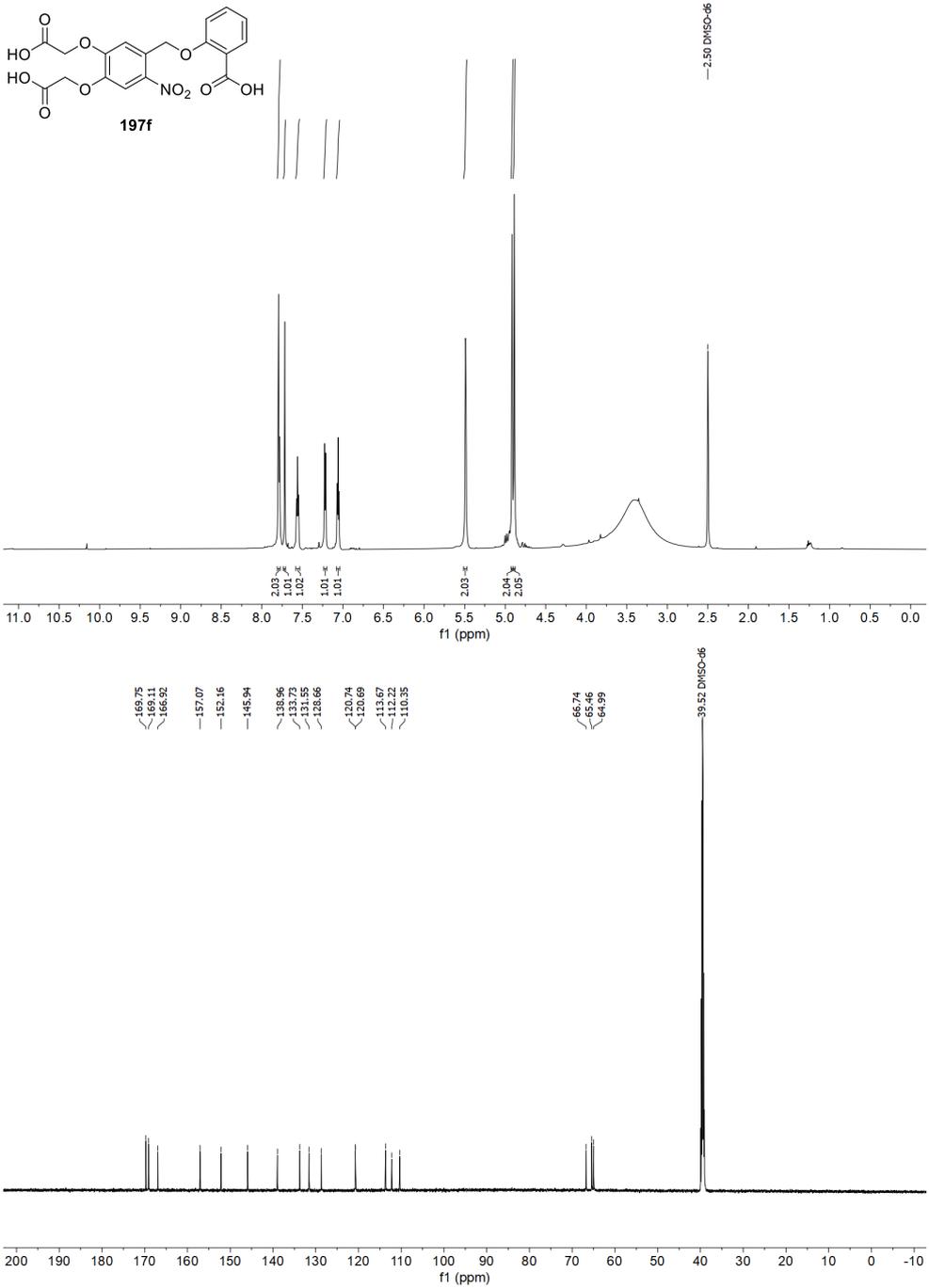


Abbildung 208: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **197f** in $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz/151 MHz).

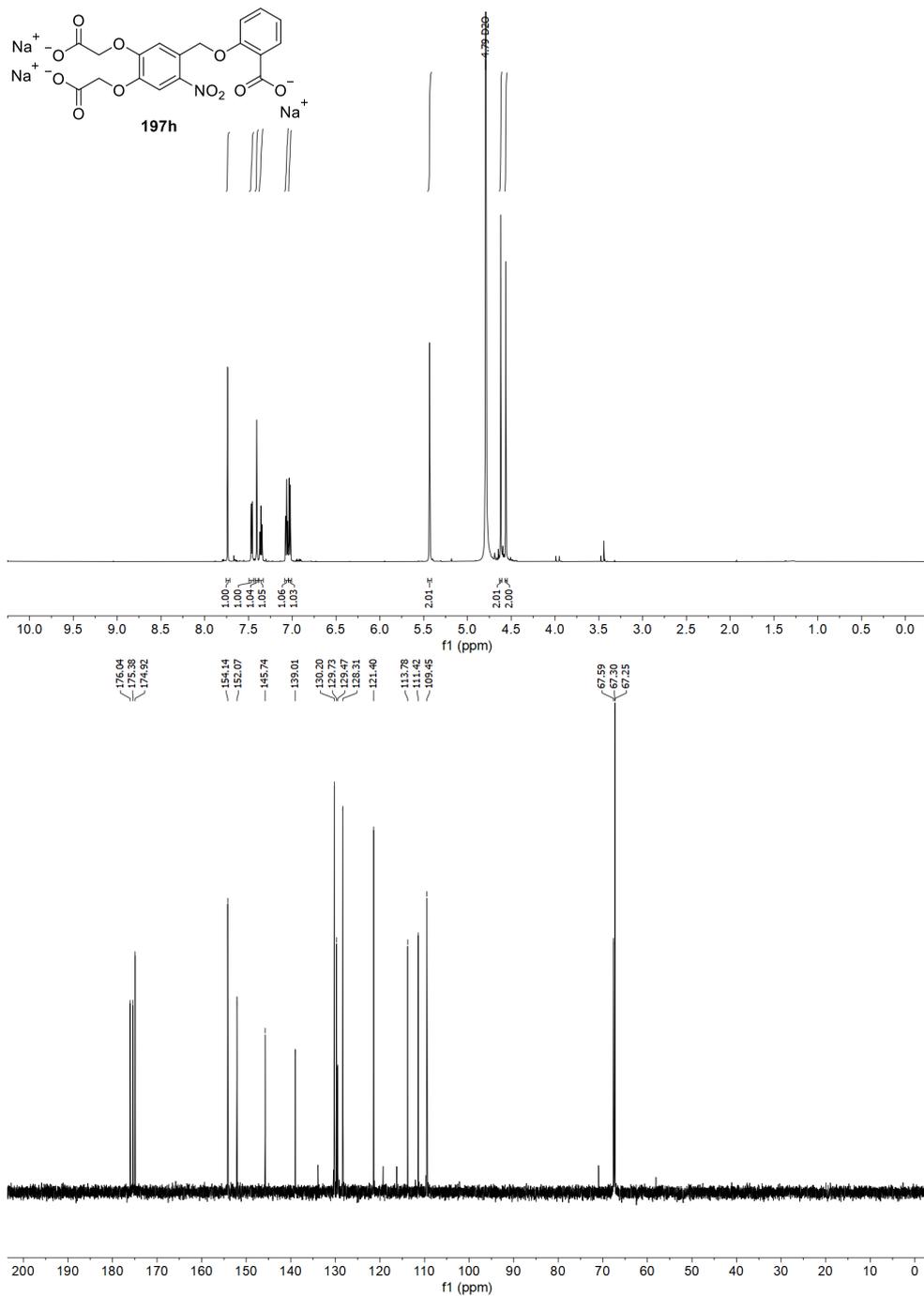


Abbildung 209: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **197h** in D_2O (600 MHz/151 MHz).

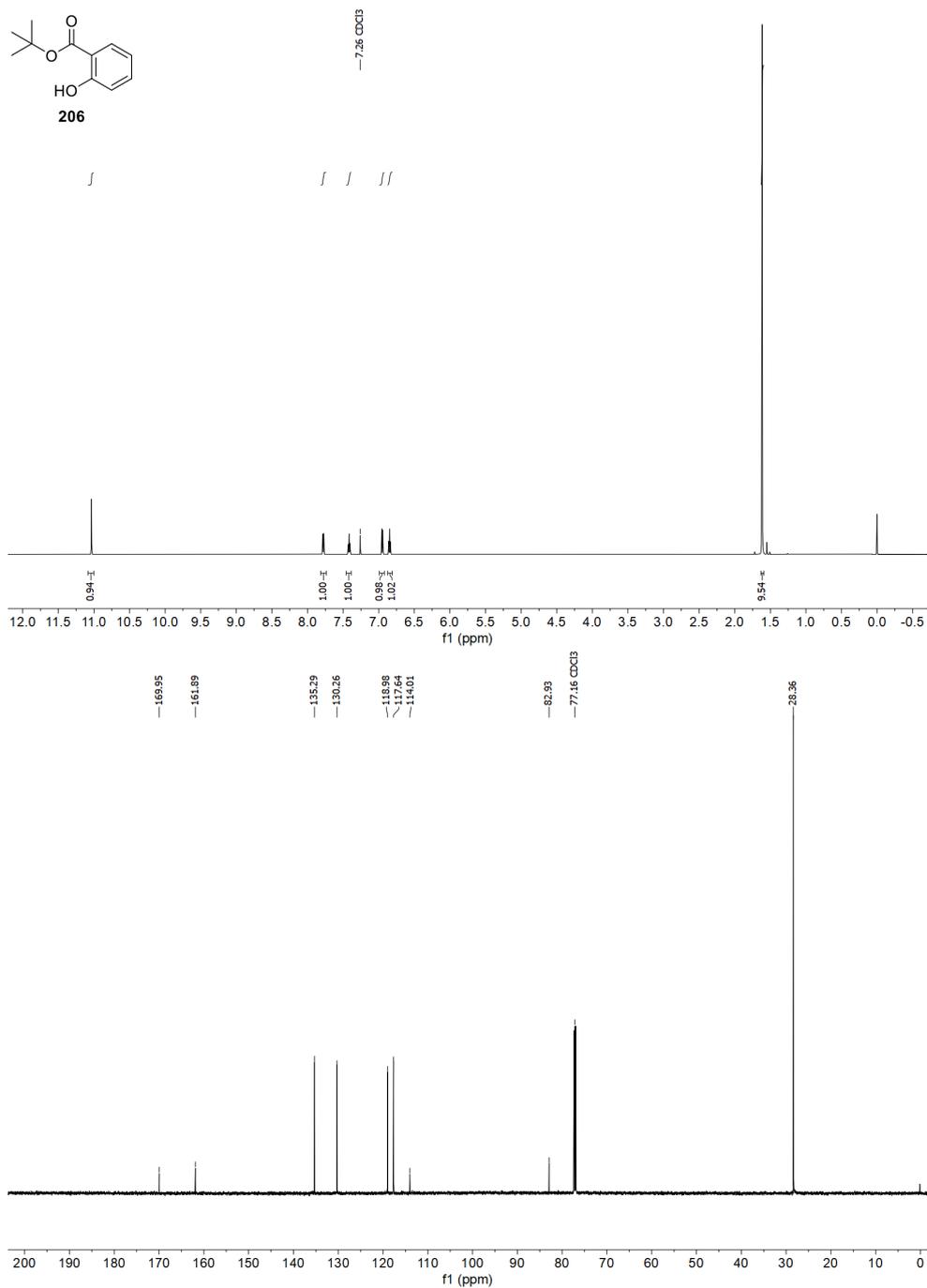


Abbildung 210: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **206** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

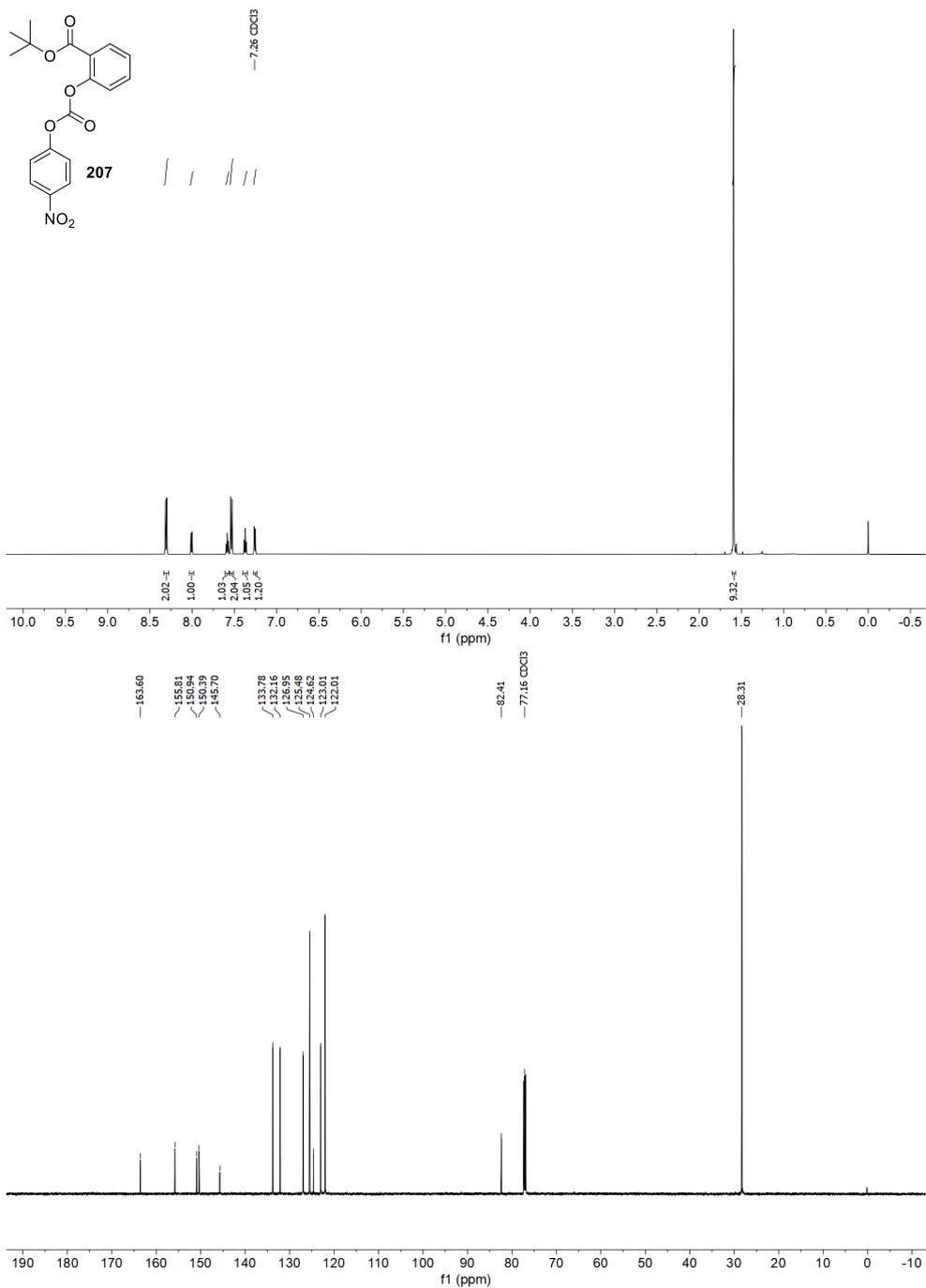


Abbildung 211: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **207** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

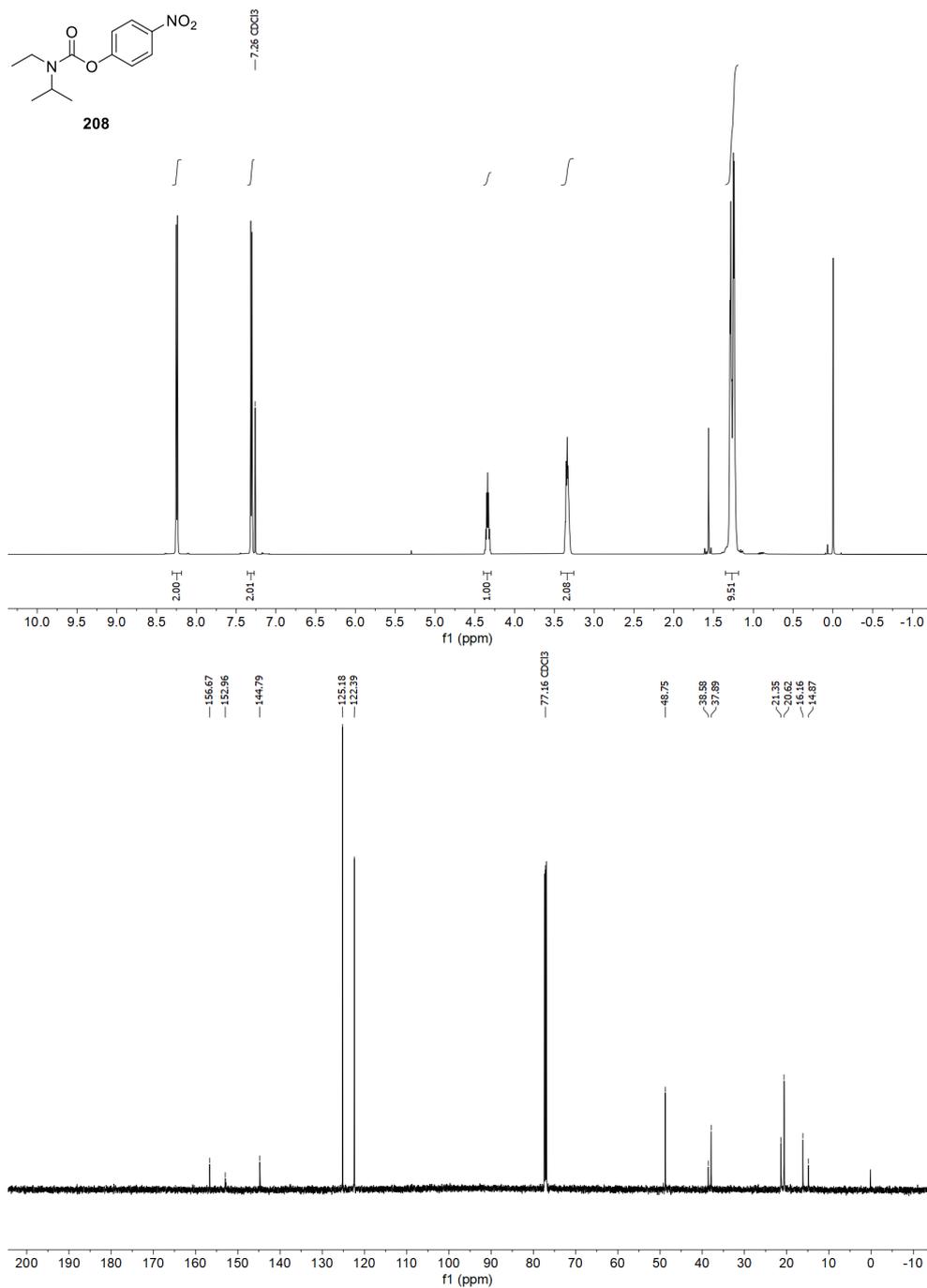


Abbildung 212: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **208** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

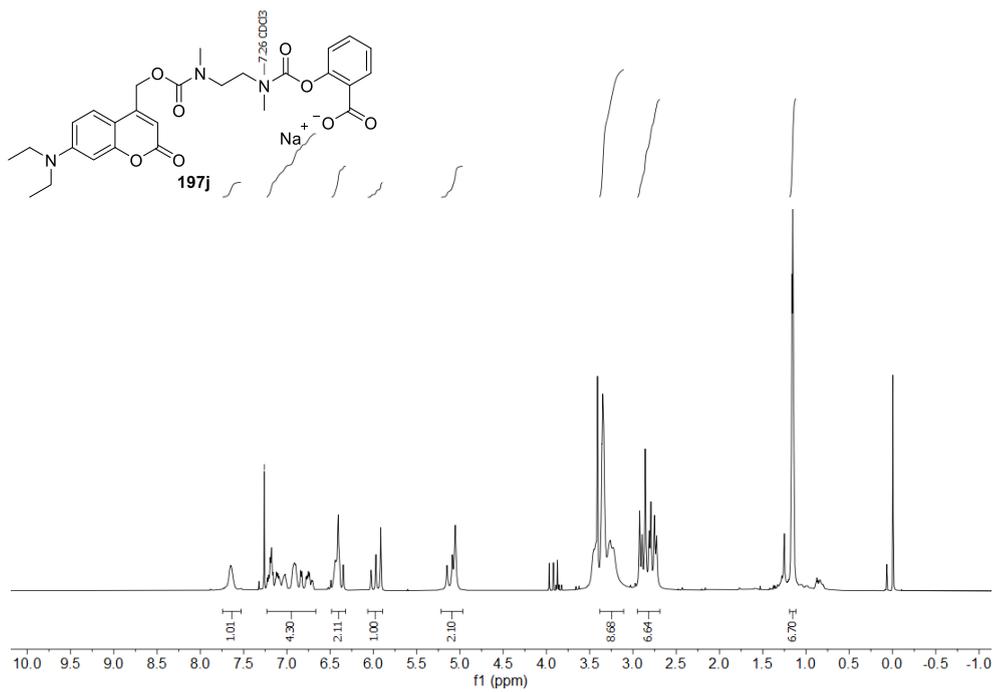


Abbildung 215: ^1H -Spektrum von **197j** in CDCl_3 (600 MHz).

8 Literaturverzeichnis

- [1] F. Hogenkamp, F. Hilgers, N. Bitzenhofer, V. Ophoven, M. Haase, C. Bier, D. Binder, K.-E. Jaeger, T. Drepper, J. Pietruszka, *ChemBioChem*, 10.1002/cbic.202100467; 'Optochemical control of bacterial gene expression – novel photocaged compounds for different promoter systems'.
- [2] A. Burmeister, Q. Akhtar, L. Hollmann, N. Tenhaef, F. Hilgers, F. Hogenkamp, S. Sokolowsky, J. Marienhagen, S. Noack, D. Kohlheyer, A. Grünberger, *ACS Synth. Biol.* **2021**, *10*, 1308–1319; '(Optochemical) Control of Synthetic Microbial Coculture Interactions on a Microcolony Level'.
- [3] F. Hogenkamp, F. Hilgers, A. Knapp, O. Klaus, C. Bier, D. Binder, K.-E. Jaeger, T. Drepper, J. Pietruszka, *ChemBioChem* **2021**, *22*, 539–547; 'Effect of Photocaged Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside Solubility on Light-Responsiveness of LacI-controlled Expression Systems in Different Bacteria'.
- [4] A. V. Fejzagić, S. Myllek, F. Hogenkamp, J. Greb, J. Pietruszka, T. Classen, *ChemistryOpen* **2020**, *9*, 959–966; 'A Fluorescence-Based Assay System for the Determination of Haloperoxidase-Activity Using a Two-Dimensional Calibration Ap-proach'.
- [5] B. Mechsner, D. Böse, F. Hogenkamp, N. Ledermann, R. Hartmann, K. Bochinsky, W. Frey, J. Pietruszka, *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 2991–2997; 'Enantioselective total synthesis of altersolanol A and N'.
- [6] M. Haase, Bachelor Thesis, 'Synthese einer 2H-Chromen-2-thion-Schutzgruppe: Auf dem Weg zu neuen Werkzeugen für die lichtregulierte Genexpression', Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Düsseldorf, Deutschland), **2018**.
- [7] U. Eberl, A. Ogradnik, M. E. Michel-Beyerle, *Phys. Bl.* **1994**, *50*, 215–220; 'Vom Licht zum Leben — Physik und Photosynthese: Mit modernen Meßverfahren der Physik gelingt die Aufklärung der ultraschnellen Elektrontransfer-Prozesse in der Photosynthese'.
- [8] I. Willner, S. Rubin, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 367–385; 'Control of the Structure and Functions of Biomaterials by Light'.
- [9] C. Mahlke, in *Der Experimentator: Neurowissenschaften* (Eds.: G. Hervey, C. Mahlke, M. Schwake, T. Sommer), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2011**, pp. 145–156.
- [10] H. Förster, in *Characterization I*, Springer, **2004**, pp. 337–426.
- [11] G. Wallraff, W. Hinsberg, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1801–1822; 'Lithographic imaging techniques for the formation of nanoscopic features'.
- [12] J. del Barrio, C. Sánchez-Somolinos, *Adv. Opt. Mater.* **2019**, *7*, 1900598; 'Light to Shape the Future: From Photolithography to 4D Printing'.
- [13] P. Klán, J. Wirz, *Photochemistry of Organic Compounds: From Concepts to Practice*, John Wiley & Sons, **2009**.
- [14] C. Stephenson, T. P. Yoon, D. W. C. MacMillan, *Visible light photocatalysis in organic chemistry*, John Wiley & Sons, **2018**.
- [15] N. Hoffmann, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1052–1103; 'Photochemical Reactions as Key Steps in Organic Synthesis'.
- [16] J. A. Barltrop, P. Schofield, *Tetrahedron Lett.* **1962**, *3*, 697–699; 'Photosensitive Protecting Groups'.
- [17] D. H. R. Barton, Y. L. Chow, A. Cox, G. W. Kirby, *Tetrahedron Lett.* **1962**, *3*, 1055–1057; 'Photosensitive protection of functional groups'.
- [18] A. Patchornik, B. Amit, R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6333–6335; 'Photosensitive protecting groups'.
- [19] V. N. R. Pillai, V. N. Rajasekharan-Pillai, *Synthesis* **1980**, *1980*, 1–26; 'Photoremovable Protecting Groups in Organic Synthesis'.
- [20] J. Li, S. Jeong, L. Esser, P. G. Harran, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 4765–4769; 'Total Synthesis of Nominal Diazonamides—Part 1: Convergent Preparation of the Structure Proposed for (–)-Diazonamide A'.
- [21] B. B. Snider, M. V. Busuyek, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 3301–3307; 'Synthesis of circumdatin F and sclerotigenin. Use of the 2-nitrobenzyl group for protection of a diketopiperazine amide; synthesis of *ent*-fumiquinazoline G'.
- [22] J. Engels, E. J. Schlaeger, *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 907–911; 'Synthesis, structure, and reactivity of adenosine cyclic 3',5'-phosphate-benzyltriesters'.

- [23] J. H. Kaplan, B. Forbush, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929–1935; 'Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analog: utilization by the sodium:potassium pump of human red blood cell ghosts'.
- [24] J. Li, H. Kong, C. Zhu, Y. Zhang, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 3390–3396; 'Photo-controllable bioorthogonal chemistry for spatiotemporal control of bio-targets in living systems'.
- [25] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446–8476; 'Light-Controlled Tools'.
- [26] M. J. Hansen, W. A. Velema, M. M. Lerch, W. Szymanski, B. L. Feringa, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 3358–3377; 'Wavelength-selective cleavage of photoprotecting groups: strategies and applications in dynamic systems'.
- [27] A. Deiters, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 678–686; 'Light activation as a method of regulating and studying gene expression'.
- [28] R. H. Kramer, J. J. Chambers, D. Trauner, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 360–365; 'Photochemical tools for remote control of ion channels in excitable cells'.
- [29] G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 619–628; 'Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology'.
- [30] G. C. R. Ellis-Davies, *Acc. Chem. Res.* **2020**, *53*, 1593–1604; 'Useful Caged Compounds for Cell Physiology'.
- [31] N. Ankenbruck, T. Courtney, Y. Naro, A. Deiters, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 2768–2798; 'Photochemical Control of Biological Processes in Cells and Animals'.
- [32] J. M. Silva, E. Silva, R. L. Reis, *J. Controlled Release* **2019**, *298*, 154–176; 'Light-triggered release of photocaged therapeutics - Where are we now?'.
- [33] M. M. Dcona, K. Mitra, M. C. T. Hartman, *RSC Med. Chem.* **2020**, *11*, 982–1002; 'Photocontrolled activation of small molecule cancer therapeutics'.
- [34] C. Yu, J. Schimelman, P. Wang, K. L. Miller, X. Ma, S. You, J. Guan, B. Sun, W. Zhu, S. Chen, *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 10695–10743; 'Photopolymerizable Biomaterials and Light-Based 3D Printing Strategies for Biomedical Applications'.
- [35] A. Deiters, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 47–53; 'Principles and Applications of the Photochemical Control of Cellular Processes'.
- [36] P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119–191; 'Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy'.
- [37] R. Weinstain, T. Slanina, D. Kand, P. Klán, *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 13135–13272; 'Visible-to-NIR-Light Activated Release: From Small Molecules to Nanomaterials'.
- [38] G. Ciamician, P. Silber, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 1530–1543; 'Chemische Lichtwirkungen'.
- [39] G. Ciamician, P. Silber, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 2040–2046; 'Chemische Lichtwirkungen'.
- [40] G. Ciamician, P. Silber, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1902**, *35*, 3593–3598; 'Chemische Lichtwirkungen'.
- [41] A. P. Pelliccioli, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 441–458; 'Photoremovable protecting groups: reaction mechanisms and applications'.
- [42] J. Barltrop, P. Plant, P. Schofield, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1966**, *22*, 822–823; 'Photosensitive Protective Groups'.
- [43] U. Zehavi, B. Amit, A. Patchornik, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2281–2285; 'Light-sensitive glycosides. I. 6-Nitroveratryl β -D-glucopyranoside and 2-nitrobenzyl β -D-glucopyranoside'.
- [44] U. Zehavi, A. Patchornik, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2285–2288; 'Light-sensitive glycosides. II. 2-Nitrobenzyl 6-deoxy- α -L-mannopyranoside and 2-nitrobenzyl 6-deoxy- β -L-galactopyranoside'.
- [45] P. M. Collins, N. Oparaeché, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1972**, 532–533; 'Photochemical rearrangement of some o-nitrobenzylidene carbohydrate derivatives. A route to partially protected sugars'.
- [46] P. M. Collins, N. N. Oparaeché, *Carbohydr. Res.* **1974**, *33*, 35–46; 'The synthesis of some o-nitrobenzylidene derivatives of aldopyranosides'.
- [47] P. M. Collins, N. N. Oparaeché, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1975**, 1695–1700; 'The photochemistry of carbohydrate derivatives. Part III. Photochemical rearrangements of 2,3- and 3,4-O-o-nitrobenzylideneglycopyranosides'.

- [48] P. M. Collins, N. N. Oparaeché, V. R. N. Munasinghe, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1975**, 1700–1706; 'The photochemistry of carbohydrate derivatives. Part IV. Photochemical rearrangement of 4,6-O-o-nitrobenzylidene-glycopyranosides'.
- [49] P. M. Collins, H. Eder, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1983**, 927–931; 'The photochemistry of carbohydrate derivatives. Part 6. Synthesis of 3-(methoxycarbonyl) propyl pyranosides of 2,3-di-O-(β -D-galactopyranosyl)- α -D-galactose and 3-O-(α -D-galactopyranosyl)-2-O-(β -D-galactopyranosyl)- α -D-galactose using photolabile O-(2-nitrobenzylidene) acetals as temporary blocking groups'.
- [50] P. M. Collins, V. R. N. Munasinghe, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1983**, 921–926; 'The photochemistry of carbohydrate derivatives. Part 5. Synthesis of methyl 2,3-di-O-(β -D-glucopyranosyl)- α -L-fucopyranoside and methyl 2,3-di-O-(β -D-galactopyranosyl)- α -L-fucopyranoside using photolabile O-(2-nitrobenzylidene) acetals as temporary blocking groups'.
- [51] P. M. Collins, V. R. N. Munasinghe, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1983**, 1879–1884; 'The photochemistry of carbohydrate derivatives. Part 7. The synthesis of methyl 3,4-di-O-(β -D-glucopyranosyl)- α -L-rhamnopyranoside from photolabile methyl 2,3-O-(2-nitrobenzylidene)- α -L-rhamnopyranoside'.
- [52] J. W. Walker, G. P. Reid, J. A. McCray, D. R. Trentham, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7170–7177; 'Photolabile 1-(2-nitrophenyl)ethyl phosphate esters of adenine nucleotide analogs. Synthesis and mechanism of photolysis'.
- [53] F. Bley, K. Schaper, H. Görner, *Photochem. Photobiol.* **2008**, *84*, 162–171; 'Photoprocesses of Molecules with 2-Nitrobenzyl Protecting Groups and Caged Organic Acids'.
- [54] I. R. Dunkin, J. Gębicki, M. Kiszka, D. Sanin-Leira, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 1414–1425; 'Phototautomerism of o-nitrobenzyl compounds: o-quinonoid aci-nitro species studied by matrix isolation and DFT calculations'.
- [55] M. Schwörer, J. Wirz, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 1441–1458; 'Photochemical Reaction Mechanisms of 2-Nitrobenzyl Compounds in Solution, I. 2-Nitrotoluene: Thermodynamic and Kinetic Parameters of the aci-Nitro Tautomer'.
- [56] S. Walbert, W. Pfeleiderer, U. E. Steiner, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 1601–1611; 'Photolabile Protecting Groups for Nucleosides: Mechanistic Studies of the 2-(2-Nitrophenyl)ethyl Group'.
- [57] J. E. T. Corrie, A. Barth, V. R. N. Munasinghe, D. R. Trentham, M. C. Hutter, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8546–8554; 'Photolytic Cleavage of 1-(2-Nitrophenyl)ethyl Ethers Involves Two Parallel Pathways and Product Release Is Rate-Limited by Decomposition of a Common Hemiacetal Intermediate'.
- [58] Y. V. Il'ichev, M. A. Schwörer, J. Wirz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4581–4595; 'Photochemical Reaction Mechanisms of 2-Nitrobenzyl Compounds: Methyl Ethers and Caged ATP'.
- [59] D. Wöll, S. Walbert, K.-P. Stengele, T. J. Albert, T. Richmond, J. Norton, M. Singer, R. D. Green, W. Pfeleiderer, U. E. Steiner, *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 28–45; 'Triplet-Sensitized Photodeprotection of Oligonucleotides in Solution and on Microarray Chips'.
- [60] M. Gaplovsky, Y. V. Il'ichev, Y. Kamdzhilov, S. V. Kombarova, M. Mac, M. A. Schwörer, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 33–42; 'Photochemical reaction mechanisms of 2-nitrobenzyl compounds: 2-Nitrobenzyl alcohols form 2-nitroso hydrates by dual proton transfer'.
- [61] H. Görner, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 822–828; 'Effects of 4,5-dimethoxy groups on the time-resolved photoconversion of 2-nitrobenzyl alcohols and 2-nitrobenzaldehyde into nitroso derivatives'.
- [62] T. Schmierer, F. Bley, K. Schaper, P. Gilch, *J. Photochem. Photobiol., A* **2011**, *217*, 363–368; 'The early processes in the photochemistry of ortho-nitrobenzyl acetate'.
- [63] K. Schaper, M. Etinski, T. Fleig, *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85*, 1075–1081; 'Theoretical Investigation of the Excited States of 2-Nitrobenzyl and 4,5-Methylenedioxy-2-nitrobenzyl Caging Groups'.
- [64] P. Wang, *Asian J. Org. Chem.* **2013**, *2*, 452–464; 'Photolabile Protecting Groups: Structure and Reactivity'.
- [65] B. Hellrung, Y. Kamdzhilov, M. Schwörer, J. Wirz, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8934–8935; 'Photorelease of Alcohols from 2-Nitrobenzyl Ethers Proceeds via Hemiacetals and May Be Further Retarded by Buffers Intercepting the Primary aci-Nitro Intermediates'.
- [66] H. Bayley, C.-Y. Chang, W. Todd Miller, B. Niblack, P. Pan, in *Methods in Enzymology*, Vol. 291, Academic Press, **1998**, pp. 117–135.

- [67] I. Aujard, C. Benbrahim, M. Gouget, O. Ruel, J.-B. Baudin, P. Neveu, L. Jullien, *Chem. - Eur. J.* **2006**, *12*, 6865–6879; 'o-Nitrobenzyl Photolabile Protecting Groups with Red-Shifted Absorption: Syntheses and Uncaging Cross-Sections for One- and Two-Photon Excitation'.
- [68] J. H. Kaplan, G. C. Ellis-Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, *85*, 6571–6575; 'Photolabile chelators for the rapid photorelease of divalent cations'.
- [69] T. Solomek, S. Mercier, T. Bally, C. G. Bochet, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 548–555; 'Photolysis of ortho-nitrobenzyl derivatives: the importance of the leaving group'.
- [70] G. Papageorgiou, J. E. T. Corrie, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 3917–3932; 'Synthesis and properties of carbamoyl derivatives of photolabile benzoin'.
- [71] G. Papageorgiou, A. Barth, J. E. T. Corrie, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 216–220; 'Flash photolytic release of alcohols from photolabile carbamates or carbonates is rate-limited by decarboxylation of the photoproduct'.
- [72] R. W. Yip, D. K. Sharma, R. Giasson, D. Gravel, *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 5328–5330; 'Photochemistry of the o-nitrobenzyl system in solution: evidence for singlet-state intramolecular hydrogen abstraction'.
- [73] P. Sebej, T. Solomek, L. u. Hroudna, P. Brancova, P. Klan, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8647–8658; 'Photochemistry of 2-Nitrobenzylidene Acetals'.
- [74] J. F. Cameron, J. M. Frechet, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4303–4313; 'Photogeneration of organic bases from o-nitrobenzyl-derived carbamates'.
- [75] E. Reichmanis, B. C. Smith, R. Gooden, *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **1985**, *23*, 1–8; 'o-Nitrobenzyl Photochemistry: Solution vs. Solid-State Behavior'.
- [76] P. Berroy, M. L. Viriot, M. C. Carré, *Sens. Actuators, B* **2001**, *74*, 186–189; 'Photolabile group for 5'-OH protection of nucleosides: synthesis and photodeprotection rate'.
- [77] D. Binder, C. Bier, A. Grünberger, D. Drobiez, J. Hage-Hülsmann, G. Wandrey, J. Büchs, D. Kohlheyer, A. Loeschcke, W. Wiechert, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka, T. Drepper, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 296–299; 'Photocaged Arabinose: A Novel Optogenetic Switch for Rapid and Gradual Control of Microbial Gene Expression'.
- [78] M. C. Pirrung, W. H. Pieper, K. P. Kaliappan, M. R. Dhananjeyan, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 12548; 'Combinatorial discovery of two-photon photoremovable protecting groups'.
- [79] A. Specht, M. Goeldner, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 2008–2012; '1-(o-Nitrophenyl)-2,2,2-trifluoroethyl Ether Derivatives as Stable and Efficient Photoremovable Alcohol-Protecting Groups'.
- [80] T. Milburn, N. Matsubara, A. P. Billington, J. B. Udgaonkar, J. W. Walker, B. K. Carpenter, W. W. Webb, J. Marquet, W. Denk, *Biochemistry* **1989**, *28*, 49–55; 'Synthesis, photochemistry, and biological activity of a caged photolabile acetylcholine receptor ligand'.
- [81] J. W. Walker, H. Martin, F. R. Schmitt, R. J. Barsotti, *Biochemistry* **1993**, *32*, 1338–1345; 'Rapid release of an α -adrenergic receptor ligand from photolabile analogs'.
- [82] R. Wieboldt, K. R. Gee, L. Niu, D. Ramesh, B. K. Carpenter, G. P. Hess, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 8752; 'Photolabile precursors of glutamate: synthesis, photochemical properties, and activation of glutamate receptors on a microsecond time scale'.
- [83] R. Wieboldt, D. Ramesh, B. K. Carpenter, G. P. Hess, *Biochemistry* **1994**, *33*, 1526–1533; 'Synthesis and Photochemistry of Photolabile Derivatives of g-Aminobutyric Acid for Chemical Kinetic Investigations of the g-Aminobutyric Acid Receptor in the Millisecond Time Region'.
- [84] H.-G. A. Breitingner, R. Wieboldt, D. Ramesh, B. K. Carpenter, G. P. Hess, *Biochemistry* **2000**, *39*, 5500–5508; 'Synthesis and Characterization of Photolabile Derivatives of Serotonin for Chemical Kinetic Investigations of the Serotonin 5-HT₃ Receptor'.
- [85] C. Grewer, J. Jäger, B. K. Carpenter, G. P. Hess, *Biochemistry* **2000**, *39*, 2063–2070; 'A New Photolabile Precursor of Glycine with Improved Properties: A Tool for Chemical Kinetic Investigations of the Glycine Receptor'.
- [86] J. E. T. Corrie, V. R. N. Munasinghe, D. R. Trentham, A. Barth, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 84–97; 'Studies of decarboxylation in photolysis of α -carboxy-2-nitrobenzyl (CNB) caged compounds'.
- [87] A. G. Russell, M. J. Sadler, H. J. Laidlaw, A. Gutierrez-Loriente, C. W. Wharton, D. Carteau, D. M. Bassani, J. S. Snaith, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 556–563; 'Photorelease of tyrosine from α -carboxy-6-nitroveratryl (aCNV) derivatives'.
- [88] J. J. Zaitsev-Doyle, A. Puchert, Y. Pfeifer, H. Yan, B. A. Yorke, H. M. Müller-Werkmeister, C. Uetrecht, J. Rehbein, N. Huse, A. R. Pearson, M. Sans, *RSC Adv.* **2019**, *9*, 8695–8699; 'Synthesis and characterisation of α -carboxynitrobenzyl photocaged l-aspartates for applications in time-resolved structural biology'.

- [89] E. Reichmanis, R. Gooden, C. W. Wilkins, H. Schonhorn, *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **1983**, *21*, 1075–1083; 'A study of the photochemical response of *o*-nitrobenzyl cholate derivatives in P(MMA-MAA) matrices'.
- [90] F. M. Houlihan, A. Shugard, R. Gooden, E. Reichmanis, *Macromolecules* **1988**, *21*, 2001–2006; 'Nitrobenzyl ester chemistry for polymer processes involving chemical amplification'.
- [91] A. Hasan, K.-P. Stengele, H. Giegrich, P. Cornwell, K. R. Isham, R. A. Sachleben, W. Pfeleiderer, R. S. Foote, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 4247–4264; 'Photolabile protecting groups for nucleosides: Synthesis and photodeprotection rates'.
- [92] C. G. Bochet, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6341–6346; 'Wavelength-selective cleavage of photolabile protecting groups'.
- [93] C. Bao, M. Jin, B. Li, Y. Xu, J. Jin, L. Zhu, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5238–5244; 'Long conjugated 2-nitrobenzyl derivative caged anticancer prodrugs with visible light regulated release: preparation and functionalizations'.
- [94] M. Jin, H. Xu, H. Hong, C. Bao, H. Pu, D. Wan, L. Zhu, *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, *130*, 4099–4106; 'Micropatterning of polymethacrylates by single- or two-photon irradiation using π -conjugated *o*-nitrobenzyl ester phototrigger as side chains'.
- [95] S. Boinapally, B. Huang, M. Abe, C. Katan, J. Noguchi, S. Watanabe, H. Kasai, B. Xue, T. Kobayashi, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 7822–7830; 'Caged Glutamates with π -Extended 1,2-Dihydronaphthalene Chromophore: Design, Synthesis, Two-Photon Absorption Property, and Photochemical Reactivity'.
- [96] N. Komori, S. Jakkampudi, R. Motoishi, M. Abe, K. Kamada, K. Furukawa, C. Katan, W. Sawada, N. Takahashi, H. Kasai, B. Xue, T. Kobayashi, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 331–334; 'Design and synthesis of a new chromophore, 2-(4-nitrophenyl)benzofuran, for two-photon uncaging using near-IR light'.
- [97] S. Jakkampudi, M. Abe, N. Komori, R. Takagi, K. Furukawa, C. Katan, W. Sawada, N. Takahashi, H. Kasai, *ACS Omega* **2016**, *1*, 193–201; 'Design and Synthesis of a 4-Nitrobromobenzene Derivative Bearing an Ethylene Glycol Tetraacetic Acid Unit for a New Generation of Caged Calcium Compounds with Two-Photon Absorption Properties in the Near-IR Region and Their Application *in Vivo*'.
- [98] E. Maurits, M. J. van de Graaff, S. Maiorana, D. P. A. Wander, P. M. Dekker, S. Y. van der Zanden, B. I. Florea, J. J. C. Neefjes, H. S. Overkleeft, S. I. van Kasteren, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 7250–7253; 'Immunoproteasome Inhibitor–Doxorubicin Conjugates Target Multiple Myeloma Cells and Release Doxorubicin upon Low-Dose Photon Irradiation'.
- [99] A. K. Singh, P. K. Khade, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 4899–4902; '7-Methoxy-3-nitro-2-naphthalenemethanol—a new phototrigger for caging applications'.
- [100] A. Momotake, N. Lindegger, E. Niggli, R. J. Barsotti, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 35–40; 'The nitrodibenzofuran chromophore: a new caging group for ultra-efficient photolysis in living cells'.
- [101] S. Kantevari, Y. Buskila, G. C. R. Ellis-Davies, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 508–513; 'Synthesis and characterization of cell-permeant 6-nitrodibenzofuranyl-caged IP₃'.
- [102] T. K. Bader, F. Xu, M. H. Hodny, D. A. Blank, M. D. Distefano, *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 1614–1625; 'A methoxy-substituted nitrodibenzofuran-based protecting group with an improved two-photon action cross-section for thiol protection in solid phase peptide synthesis'.
- [103] M. M. Mahmoodi, D. Abate-Pella, T. J. Pundsack, C. C. Palsuledesai, P. C. Goff, D. A. Blank, M. D. Distefano, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5848–5859; 'Nitrodibenzofuran: A One- and Two-Photon Sensitive Protecting Group That Is Superior to Brominated Hydroxycoumarin for Thiol Caging in Peptides'.
- [104] A. E. Mangubat-Medina, H. O. Trial, R. D. Vargas, M. T. Setegne, T. Bader, M. D. Distefano, Z. T. Ball, *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 5110–5114; 'Red-shifted backbone N–H photocaging agents'.
- [105] F. Schäfer, K. B. Joshi, M. A. H. Fichte, T. Mack, J. Wachtveitl, A. Heckel, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1450–1453; 'Wavelength-Selective Uncaging of dA and dC Residues'.
- [106] T. Sörmus, D. Lavogina, E. Enkvist, A. Uri, K. Viht, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 11147–11150; 'Efficient photocaging of a tight-binding bisubstrate inhibitor of cAMP-dependent protein kinase'.
- [107] K. Schaper, S. Mobarekeh, C. Grewer, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *2002*, 1037–1046; 'Synthesis and photophysical characterization of a new, highly hydrophilic caging group'.
- [108] K. Schaper, S. A. Madani Mobarekeh, P. Doro, D. Maydt, *Photochem. Photobiol.* **2010**, *86*, 1247–1254; 'The α ,5-Dicarboxy-2-nitrobenzyl Caging Group, a Tool for Biophysical

- Applications with Improved Hydrophilicity: Synthesis, Photochemical Properties and Biological Characterization'.
- [109] A. C. Allan, J. L. Ward, M. H. Beale, A. J. Trewavas, in *Caged Compounds, Vol. 291* (Ed.: G. Marriott), Academic Press, **1998**, pp. 474–483.
- [110] T. J. Mitchison, K. E. Sawin, J. A. Theriot, K. Gee, A. Mallavarapu, in *Methods in Enzymology, Vol. Volume 291*, Academic Press, **1998**, pp. 63–78.
- [111] R. Reinhard, B. F. Schmidt, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2434–2441; 'Nitrobenzyl-Based Photosensitive Phosphoramidate Mustards: Synthesis and Photochemical Properties of Potential Prodrugs for Cancer Therapy'.
- [112] L. R. Makings, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 6282–6285; 'Caged nitric oxide. Stable organic molecules from which nitric oxide can be photoreleased'.
- [113] J. Ni, D. A. Auston, D. A. Freilich, S. Muralidharan, E. A. Sobie, J. P. Y. Kao, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5316–5317; 'Photochemical Gating of Intracellular Ca²⁺ Release Channels'.
- [114] J. E. T. Corrie, T. Furuta, R. Givens, A. L. Yousef, M. Goeldner, in *Dynamic Studies in Biology*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2005**, pp. 1–94.
- [115] R. S. Givens, B. Matuszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6860–6861; 'Photochemistry of phosphate esters: an efficient method for the generation of electrophiles'.
- [116] B. Schade, V. Hagen, R. Schmidt, R. Herbrich, E. Krause, T. Eckardt, J. Bendig, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9109–9117; 'Deactivation Behavior and Excited-State Properties of (Coumarin-4-yl)methyl Derivatives. 1. Photocleavage of (7-Methoxycoumarin-4-yl)methyl-Caged Acids with Fluorescence Enhancement'.
- [117] T. Eckardt, V. Hagen, B. Schade, R. Schmidt, C. Schweitzer, J. Bendig, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 703–710; 'Deactivation Behavior and Excited-State Properties of (Coumarin-4-yl)methyl Derivatives. 2. Photocleavage of Selected (Coumarin-4-yl)methyl-Caged Adenosine Cyclic 3',5'-Monophosphates with Fluorescence Enhancement'.
- [118] R. Schmidt, D. Geissler, V. Hagen, J. Bendig, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 5000–5004; 'Kinetics Study of the Photocleavage of (Coumarin-4-yl)methyl Esters'.
- [119] R. Schmidt, D. Geissler, V. Hagen, J. Bendig, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 5768–5774; 'Mechanism of Photocleavage of (Coumarin-4-yl)methyl Esters'.
- [120] A. M. Sarker, Y. Kaneko, D. C. Neckers, *J. Photochem. Photobiol., A* **1998**, *117*, 67–74; 'Photochemistry and photophysics of novel photoinitiators: *N,N,N*-tributyl-*N*-(4-methylene-7-methoxycoumarin) ammonium borates'.
- [121] T. Furuta, S. S.-H. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 1193–1200; 'Brominated 7-hydroxycoumarin-4-ylmethyls: Photolabile protecting groups with biologically useful cross-sections for two photon photolysis'.
- [122] H. Takano, T. Narumi, W. Nomura, T. Furuta, H. Tamamura, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 5372–5375; 'Utilization of the Heavy Atom Effect for the Development of a Photosensitive 8-Azacoumarin-Type Photolabile Protecting Group'.
- [123] D. Offenbartl-Stiegert, T. M. Clarke, H. Bronstein, H. P. Nguyen, S. Howorka, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 6178–6183; 'Solvent-dependent photophysics of a red-shifted, biocompatible coumarin photocage'.
- [124] T. Furuta, H. Torigai, M. Sugimoto, M. Iwamura, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3953–3956; 'Photochemical Properties of New Photolabile cAMP Derivatives in a Physiological Saline Solution'.
- [125] V. Hagen, J. Bendig, S. Frings, T. Eckardt, S. Helm, D. Reuter, U. B. Kaupp, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 1045–1048; 'Highly Efficient and Ultrafast Phototriggers for cAMP and cGMP by Using Long-Wavelength UV/Vis-Activation'.
- [126] K. Takaoka, Y. Tatsu, N. Yumoto, T. Nakajima, K. Shimamoto, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 965–970; 'Synthesis and photoreactivity of caged blockers for glutamate transporters'.
- [127] A. S. C. Fonseca, M. S. T. Gonçalves, S. P. G. Costa, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1353–1359; 'Photocleavage studies of fluorescent amino acid conjugates bearing different types of linkages'.
- [128] T. Furuta, Y. Hirayama, M. Iwamura, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1809–1812; 'Anthraquinon-2-ylmethoxycarbonyl (Aqmc): A New Photochemically Removable Protecting Group for Alcohols'.

- [129] A. Z. Suzuki, T. Watanabe, M. Kawamoto, K. Nishiyama, H. Yamashita, M. Ishii, M. Iwamura, T. Furuta, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4867–4870; 'Coumarin-4-ylmethoxycarbonyls as Phototriggers for Alcohols and Phenols'.
- [130] P. T. Wong, E. W. Roberts, S. Tang, J. Mukherjee, J. Cannon, A. J. Nip, K. Corbin, M. F. Krummel, S. K. Choi, *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 1001–1010; 'Control of an Unusual Photo-Claissen Rearrangement in Coumarin Caged Tamoxifen through an Extended Spacer'.
- [131] M. M. Mahmoodi, S. A. Fisher, R. Y. Tam, P. C. Goff, R. B. Anderson, J. E. Wissinger, D. A. Blank, M. S. Shoichet, M. D. Distefano, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 8289–8300; '6-Bromo-7-hydroxy-3-methylcoumarin (mBhc) is an efficient multi-photon labile protecting group for thiol caging and three-dimensional chemical patterning'.
- [132] N. Kotzur, B. Briand, M. Beyermann, V. Hagen, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16927–16931; 'Wavelength-Selective Photoactivatable Protecting Groups for Thiols'.
- [133] T. Furuta, T. Watanabe, S. Tanabe, J. Sakyo, C. Matsuba, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4717–4720; 'Phototriggers for Nucleobases with Improved Photochemical Properties'.
- [134] S. Johnson, D. L. Morrison, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 1323–1334; 'Kinetics and mechanism of decarboxylation of *N*-arylcarbamates. Evidence for kinetically important zwitterionic carbamic acid species of short lifetime'.
- [135] Y. Pocker, B. Davison, T. Deits, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3564–3567; 'Decarboxylation of monosubstituted derivatives of carbonic acid. Comparative studies of water- and acid-catalyzed decarboxylation of sodium alkyl carbonates in H₂O and D₂O'.
- [136] R. O. Schönleber, B. Giese, *Synlett* **2003**, *2003*, 0501–0504; 'Photochemical Release of Amines by C,N-Bond Cleavage'.
- [137] W. Lin, D. S. Lawrence, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2723–2726; 'A Strategy for the Construction of Caged Diols Using a Photolabile Protecting Group'.
- [138] A. Laguerre, S. Hauke, J. Qiu, M. J. Kelly, C. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 16544–16547; 'Photo-Release of 2-Arachidonoylglycerol in Live Cells'.
- [139] E. Kim, S. B. Park, in *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology I: Fundamentals and Molecular Design* (Ed.: A. P. Demchenko), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2010**, pp. 149–186.
- [140] V. Hagen, F. Kilic, J. Schaal, B. Dekowski, R. Schmidt, N. Kotzur, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2790–2797; '[8-[Bis(carboxymethyl)aminomethyl]-6-bromo-7-hydroxycoumarin-4-yl]methyl Moieties as Photoremovable Protecting Groups for Compounds with COOH, NH₂, OH, and C=O Functions'.
- [141] J. Schaal, B. Dekowski, B. Wiesner, J. Eichhorst, K. Marter, C. Vargas, S. Keller, N. Eremina, A. Barth, A. Baumann, D. Eisenhardt, V. Hagen, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1458–1464; 'Coumarin-Based Octopamine Phototriggers and their Effects on an Insect Octopamine Receptor'.
- [142] A. Z. Suzuki, R. Sekine, S. Takeda, R. Aikawa, Y. Shiraishi, T. Hamaguchi, H. Okuno, H. Tamamura, T. Furuta, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 451–454; 'A clickable caging group as a new platform for modular caged compounds with improved photochemical properties'.
- [143] M. Gangopadhyay, S. K. Mukhopadhyay, S. Karthik, S. Barman, N. D. Pradeep Singh, *MedChemComm* **2015**, *6*, 769–777; 'Targeted photoresponsive TiO₂-coumarin nanoconjugate for efficient combination therapy in MDA-MB-231 breast cancer cells: synergic effect of photodynamic therapy (PDT) and anticancer drug chlorambucil'.
- [144] W. Jivaramonaiikul, P. Rashatasakhon, S. Wanichwecharungruang, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9*, 1120–1125; 'UVA absorption and photostability of coumarins'.
- [145] T. Lopez Arbeloa, F. Lopez Arbeloa, M. J. Tapia, I. Lopez Arbeloa, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 4704–4707; 'Hydrogen-bonding effect on the photophysical properties of 7-aminocoumarin derivatives'.
- [146] K. Rechthaler, G. Köhler, *Chem. Phys.* **1994**, *189*, 99–116; 'Excited state properties and deactivation pathways of 7-aminocoumarins'.
- [147] J. S. Seixas de Melo, R. S. Becker, A. L. Macanita, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 6054–6058; 'Photophysical Behavior of Coumarins as a Function of Substitution and Solvent: Experimental Evidence for the Existence of a Lowest Lying ¹(*n,p**) State'.
- [148] J. Donovalová, M. Cigáň, H. Stankovičová, J. Gašpar, M. Danko, A. Gáplovský, P. Hrdlovič, *Molecules* **2012**, *17*, 3259–3276; 'Spectral Properties of Substituted Coumarins in Solution and Polymer Matrices'.
- [149] A. S. C. Fonseca, M. S. T. Gonçalves, S. P. G. Costa, *Amino Acids* **2010**, *39*, 699–712; 'Light-induced cleavage of model phenylalanine conjugates based on coumarins and quinolones'.

- [150] A. S. C. Fonseca, A. M. S. Soares, M. S. T. Gonçalves, S. P. G. Costa, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7892–7900; 'Thionated coumarins and quinolones in the light triggered release of a model amino acid: synthesis and photolysis studies'.
- [151] B. Cürten, P. H. M. Kullmann, M. E. Bier, K. Kandler, B. F. Schmidt, *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 641–648; 'Synthesis, Photophysical, Photochemical and Biological Properties of Caged GABA, 4-[[[(2H-1-Benzopyran-2-one-7-amino-4-methoxy) carbonyl] amino] Butanoic Acid]'
- [152] D. Geißler, W. Kresse, B. Wiesner, J. Bendig, H. Kettenmann, V. Hagen, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 162–170; 'DMACM-Caged Adenosine Nucleotides: Ultrafast Phototriggers for ATP, ADP, and AMP Activated by Long-Wavelength Irradiation'.
- [153] V. Hagen, S. Frings, B. Wiesner, S. Helm, U. B. Kaupp, J. Bendig, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 434–442; '[7-(Dialkylamino)coumarin-4-yl]methyl-Caged Compounds as Ultrafast and Effective Long-Wavelength Phototriggers of 8-Bromo-Substituted Cyclic Nucleotides'.
- [154] S. Atta, A. Jana, R. Ananthakirshnan, P. S. Narayana Dhuleep, *J. Agric. Food. Chem.* **2010**, *58*, 11844–11851; 'Fluorescent Caged Compounds of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D): Photorelease Technology for Controlled Release of 2,4-D'.
- [155] V. R. Shembekar, Y. Chen, B. K. Carpenter, G. P. Hess, *Biochemistry* **2005**, *44*, 7107–7114; 'A Protecting Group for Carboxylic Acids That Can Be Photolyzed by Visible Light'.
- [156] V. R. Shembekar, Y. Chen, B. K. Carpenter, G. P. Hess, *Biochemistry* **2007**, *46*, 5479–5484; 'Coumarin-Caged Glycine that Can Be Photolyzed within 3 μ s by Visible Light'.
- [157] S. Tang, J. Cannon, K. Yang, M. F. Krummel, J. R. Baker, S. K. Choi, *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 2945–2955; 'Spacer-Mediated Control of Coumarin Uncaging for Photocaged Thymidine'.
- [158] Q. Lin, C. Bao, G. Fan, S. Cheng, H. Liu, Z. Liu, L. Zhu, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 6680–6688; '7-Amino coumarin based fluorescent phototriggers coupled with nano/bio-conjugated bonds: Synthesis, labeling and photorelease'.
- [159] V. Hagen, B. Dekowski, V. Nache, R. Schmidt, D. Geißler, D. Lorenz, J. Eichhorst, S. Keller, H. Kaneko, K. Benndorf, B. Wiesner, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 7887–7891; 'Coumarinylmethyl Esters for Ultrafast Release of High Concentrations of Cyclic Nucleotides upon One- and Two-Photon Photolysis'.
- [160] V. Hagen, B. Dekowski, N. Kotzur, R. Lechler, B. Wiesner, B. Briand, M. Beyermann, *Chem. - Eur. J.* **2008**, *14*, 1621–1627; '{7-[Bis(carboxymethyl)amino]coumarin-4-yl}methoxycarbonyl Derivatives for Photorelease of Carboxylic Acids, Alcohols/Phenols, Thioalcohols/Thiophenols, and Amines'.
- [161] T. Furuta, A. Momotake, M. Sugimoto, M. Hatayama, H. Torigai, M. Iwamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *228*, 193–198; 'Acyloxycoumarinylmethyl-Caged cAMP, the Photolabile and Membrane-Permeable Derivative of cAMP That Effectively Stimulates Pigment-Dispersion Response of Melanophores'.
- [162] P.-L. Yu, Z.-H. Zhang, B.-X. Hao, Y.-J. Zhao, L.-H. Zhang, H.-C. Lee, L. Zhang, J. Yue, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 24774–24783; 'A Novel Fluorescent Cell Membrane-permeable Caged Cyclic ADP-ribose Analogue'.
- [163] G. Bassolino, C. Nancoz, Z. Thiel, E. Bois, E. Vauthey, P. Rivera-Fuentes, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 387–391; 'Photolabile coumarins with improved efficiency through azetidiny substitution'.
- [164] A. M. Piloto, S. P. G. Costa, M. S. T. Gonçalves, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 650–657; 'Wavelength-selective cleavage of *o*-nitrobenzyl and polyheteroaromatic benzyl protecting groups'.
- [165] A. M. Piloto, G. Hungerford, S. P. G. Costa, M. S. T. Gonçalves, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 7715–7723; 'Photoinduced Release of Neurotransmitter Amino Acids from Coumarin-Fused Julolidine Ester Cages'.
- [166] V. Hagen, S. Frings, J. Bendig, D. Lorenz, B. Wiesner, U. B. Kaupp, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 3625–3628; 'Fluorescence Spectroscopic Quantification of the Release of Cyclic Nucleotides from Photocleavable [Bis(carboxymethoxy)coumarin-4-yl]methyl Esters inside Cells'.
- [167] K. Takaoka, Y. Tatsu, N. Yumoto, T. Nakajima, K. Shimamoto, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3687–3694; 'Synthesis of carbamate-type caged derivatives of a novel glutamate transporter blocker'.
- [168] U. B. Kaupp, J. Solzin, E. Hildebrand, J. E. Brown, A. Helbig, V. Hagen, M. Beyermann, F. Pampaloni, I. Weyand, *Nat. Cell Biol.* **2003**, *5*, 109–117; 'The signal flow and motor response controlling chemotaxis of sea urchin sperm'.

- [169] Y. A. Kim, D. M. C. Ramirez, W. J. Costain, L. J. Johnston, R. Bittman, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 9236–9238; 'A new tool to assess ceramide bioactivity: 6-bromo-7-hydroxycoumarinyl-caged ceramide'.
- [170] W. Nomura, T. Narumi, N. Ohashi, Y. Serizawa, N. E. Lewin, P. M. Blumberg, T. Furuta, H. Tamamura, *ChemBioChem* **2011**, 12, 535–539; 'Synthetic Caged DAG-lactones for Photochemically Controlled Activation of Protein Kinase C'.
- [171] R. G. Wylie, S. Ahsan, Y. Aizawa, K. L. Maxwell, C. M. Morshead, M. S. Shoichet, *Nature Materials* **2011**, 10, 799–806; 'Spatially controlled simultaneous patterning of multiple growth factors in three-dimensional hydrogels'.
- [172] N. Fomina, C. L. McFearin, A. Almutairi, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 9138–9140; 'Increasing materials' response to two-photon NIR light *via* self-immolative dendritic scaffolds'.
- [173] J. Luo, R. Uprety, Y. Naro, C. Chou, D. P. Nguyen, J. W. Chin, A. Deiters, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 15551–15558; 'Genetically Encoded Optochemical Probes for Simultaneous Fluorescence Reporting and Light Activation of Protein Function with Two-Photon Excitation'.
- [174] T. Furuta, H. Takeuchi, M. Isozaki, Y. Takahashi, M. Kanehara, M. Sugimoto, T. Watanabe, K. Noguchi, T. M. Dore, T. Kurahashi, M. Iwamura, R. Y. Tsien, *ChemBioChem* **2004**, 5, 1119–1128; 'Bhc-cNMPs as either Water-Soluble or Membrane-Permeant Photoreleasable Cyclic Nucleotides for both One- and Two-Photon Excitation'.
- [175] L. Fournier, I. Aujard, T. Le Saux, S. Maurin, S. Beaupierre, J. B. Baudin, L. Jullien, *Chem. - Eur. J.* **2013**, 19, 17494–17507; 'Coumarinylmethyl caging groups with redshifted absorption'.
- [176] J. P. Olson, M. R. Banghart, B. L. Sabatini, G. C. R. Ellis-Davies, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 15948–15954; 'Spectral Evolution of a Photochemical Protecting Group for Orthogonal Two-Color Uncaging with Visible Light'.
- [177] J. P. Olson, H.-B. Kwon, K. T. Takasaki, C. Q. Chiu, M. J. Higley, B. L. Sabatini, G. C. R. Ellis-Davies, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 5954–5957; 'Optically Selective Two-Photon Uncaging of Glutamate at 900 nm'.
- [178] J. M. Amatruedo, J. P. Olson, G. Lur, C. Q. Chiu, M. J. Higley, G. C. R. Ellis-Davies, *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, 5, 64–70; 'Wavelength-Selective One- and Two-Photon Uncaging of GABA'.
- [179] H. K. Agarwal, S. Zhai, D. J. Surmeier, G. C. R. Ellis-Davies, *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, 8, 2139–2144; 'Intracellular Uncaging of cGMP with Blue Light'.
- [180] M. Klausen, V. Dubois, G. Clermont, C. Tonnelé, F. Castet, M. Blanchard-Desce, *Chem. Sci.* **2019**, 10, 4209–4219; 'Dual-wavelength efficient two-photon photorelease of glycine by π -extended dipolar coumarins'.
- [181] M. Bojtár, A. Kormos, K. Kis-Petik, M. Kellermayer, P. Kele, *Org. Lett.* **2019**, 21, 9410–9414; 'Green-Light Activatable, Water-Soluble Red-Shifted Coumarin Photocages'.
- [182] A. S. C. Fonseca, M. S. T. Gonçalves, S. P. G. Costa, *Tetrahedron* **2012**, 68, 8024–8032; 'Phenacyl ester derivatives bearing heterocycles as models for photocleavable linkers: synthesis and photolysis studies'.
- [183] L. Fournier, C. Gauron, L. Xu, I. Aujard, T. Le Saux, N. Gagey-Eilstein, S. Maurin, S. Dubruille, J.-B. Baudin, D. Bensimon, M. Volovitch, S. Vriz, L. Jullien, *ACS Chem. Biol.* **2013**, 8, 1528–1536; 'A Blue-Absorbing Photolabile Protecting Group for *in Vivo* Chromatically Orthogonal Photoactivation'.
- [184] R. P. Steer, V. Ramamurthy, *Acc. Chem. Res.* **1988**, 21, 380–386; 'Photophysics and intramolecular photochemistry of thiones in solution'.
- [185] A. Maciejewski, R. P. Steer, *Chem. Rev.* **1993**, 93, 67–98; 'The photophysics, physical photochemistry, and related spectroscopy of thiocarbonyls'.
- [186] Q. Lin, L. Yang, Z. Wang, Y. Hua, D. Zhang, B. Bao, C. Bao, X. Gong, L. Zhu, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, 57, 3722–3726; 'Coumarin Photocaging Groups Modified with an Electron-Rich Styryl Moiety at the 3-Position: Long-Wavelength Excitation, Rapid Photolysis, and Photobleaching'.
- [187] A. Gandioso, M. Cano, A. Massaguer, V. Marchán, *J. Org. Chem.* **2016**, 81, 11556–11564; 'A Green Light-Triggerable RGD Peptide for Photocontrolled Targeted Drug Delivery: Synthesis and Photolysis Studies'.
- [188] A. Gandioso, M. Palau, A. Nin-Hill, I. Melnyk, C. Rovira, S. Nonell, D. Velasco, J. García-Amorós, V. Marchán, *ChemistryOpen* **2017**, 6, 375–384; 'Sequential Uncaging with Green Light can be Achieved by Fine-Tuning the Structure of a Dicyanocoumarin Chromophore'.

- [189] A. Gandioso, S. Contreras, I. Melnyk, J. Oliva, S. Nonell, D. Velasco, J. García-Amorós, V. Marchán, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 5398–5408; 'Development of Green/Red-Absorbing Chromophores Based on a Coumarin Scaffold That Are Useful as Caging Groups'.
- [190] M. N. Levine, R. T. Raines, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 2412–2420; (Chem Sci); 'Trimethyl lock: A trigger for molecular release in chemistry, biology, and pharmacology'.
- [191] M. E. Jung, G. Piizzi, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1735–1766; 'gem-Disubstituent Effect: Theoretical Basis and Synthetic Applications'.
- [192] S. Milstien, L. A. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1970**, *67*, 1143; 'Rate Acceleration by Stereopopulation Control: Models for Enzyme Action'.
- [193] O. A. Okoh, P. Klahn, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1668–1694; 'Trimethyl Lock: A Multifunctional Molecular Tool for Drug Delivery, Cellular Imaging, and Stimuli-Responsive Materials'.
- [194] S. Milstien, L. A. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 9158–9165; 'Stereopopulation control. I. Rate enhancement in the lactonizations of *o*-hydroxyhydrocinnamic acids'.
- [195] R. T. Borchardt, L. A. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 9166–9174; 'Stereopopulation control. II. Rate enhancement of intramolecular nucleophilic displacement'.
- [196] R. T. Borchardt, L. A. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 9175–9182; 'Stereopopulation control. III. Facilitation of intramolecular conjugate addition of the carboxyl group'.
- [197] C. Danforth, A. W. Nicholson, J. C. James, G. M. Loudon, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 4275–4281; 'Steric acceleration of lactonization reaction: an analysis of "stereopopulation control"'.
- [198] R. E. Winans, C. F. Wilcox Jr, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 4281–4285; 'Comparison of stereopopulation control with conventional steric effects in lactonization of hydrocoumarinic acids'.
- [199] A. E. Dorigo, K. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3698–3708; 'The origin of proximity effects on reactivity: a modified MM2 model for the rates of acid-catalyzed lactonizations of hydroxy acids'.
- [200] K. N. Houk, J. A. Tucker, A. E. Dorigo, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 107–113; 'Quantitative modeling of proximity effects on organic reactivity'.
- [201] R. Karaman, *Org. Chem. Int.* **2009**, *2009*; 'Accelerations in the lactonization of trimethyl lock systems are due to proximity orientation and not to strain effects'.
- [202] M. Caswell, G. L. Schmir, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 4815–4821; 'Formation and hydrolysis of lactones of phenolic acids'.
- [203] K. L. Amsberry, A. E. Gerstenberger, R. T. Borchardt, *Pharm. Res.* **1991**, *8*, 455–461; 'Amine Prodrugs Which Utilize Hydroxy Amide Lactonization. II. A Potential Esterase-Sensitive Amide Prodrug'.
- [204] M. P. Dillon, H. Cai, H. Maag, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1653–1656; 'Application of the "trimethyl lock" to Ganciclovir, a pro-prodrug with increased oral bioavailability'.
- [205] K. L. Amsberry, R. T. Borchardt, *Pharm. Res.* **1991**, *8*, 323–330; 'Amine Prodrugs Which Utilize Hydroxy Amide Lactonization. I. A Potential Redox-Sensitive Amide Prodrug'.
- [206] B. Wang, S. Liu, R. T. Borchardt, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 539–543; 'Development of a Novel Redox-Sensitive Protecting Group for Amines Which Utilizes a Facilitated Lactonization Reaction'.
- [207] A. Shigenaga, D. Tsuji, N. Nishioka, S. Tsuda, K. Itoh, A. Otaka, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1929–1931; 'Synthesis of a Stimulus-Responsive Processing Device and Its Application to a Nucleocytoplasmic Shuttle Peptide'.
- [208] A. Shigenaga, J. Yamamoto, Y. Sumikawa, T. Furuta, A. Otaka, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2868–2871; 'Development and photo-responsive peptide bond cleavage reaction of two-photon near-infrared excitation-responsive peptide'.
- [209] D. P. Walton, D. A. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 4655–4658; 'A General Strategy for Visible-Light Decaging Based on the Quinone Trimethyl Lock'.
- [210] S. S. Chandran, K. A. Dickson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1652–1653; 'Latent Fluorophore Based on the Trimethyl Lock'.
- [211] G. G. Dias, A. King, F. de Moliner, M. Vendrell, E. N. da Silva Júnior, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 12–27; 'Quinone-based fluorophores for imaging biological processes'.
- [212] B. Wang, S. Gangwar, G. M. Pauletti, T. J. Siahaan, R. T. Borchardt, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1363–1367; 'Synthesis of a Novel Esterase-Sensitive Cyclic Prodrug System for Peptides That Utilizes a "Trimethyl Lock"-Facilitated Lactonization Reaction'.
- [213] G. A. Ellis, M. J. Palte, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 3631–3634; 'Boronate-Mediated Biologic Delivery'.

- [214] Y. Ueda, A. B. Mikkilineni, J. O. Knipe, W. C. Rose, A. M. Casazza, D. M. Vyas, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 1761–1766; 'Novel water soluble phosphate prodrugs of taxol® possessing *in vivo* antitumor activity'.
- [215] R. B. Greenwald, Y. H. Choe, C. D. Conover, K. Shum, D. Wu, M. Royzen, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 475–487; 'Drug Delivery Systems Based on Trimethyl Lock Lactonization: Poly(ethylene glycol) Prodrugs of Amino-Containing Compounds'.
- [216] W. N. Hartley, A. G. Leonard, *J. Chem. Soc., Trans.* **1909**, *95*, 34–52; 'The absorption spectra of *para*-benzoquinone, quinol, and quinhydrone in the state of vapour and in solution'.
- [217] P. A. Leighton, G. S. Forbes, *J. Am. Chem. Soc.* **1929**, *51*, 3549–3559; 'The photochemical decomposition of benzoquinone in water and in alcohol'.
- [218] A. Pochon, P. P. Vaughan, D. Gan, P. Vath, N. V. Blough, D. E. Falvey, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 2889–2894; 'Photochemical Oxidation of Water by 2-Methyl-1,4-benzoquinone: Evidence against the Formation of Free Hydroxyl Radical'.
- [219] D. Gan, M. Jia, P. P. Vaughan, D. E. Falvey, N. V. Blough, *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 2803–2812; 'Aqueous Photochemistry of Methyl-Benzoquinone'.
- [220] I. Hidetoshi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, *62*, 3479–3487; 'Photoinduced Intramolecular Cyclization Reaction of 3-Substituted 2-Alkenoyl-1,4-benzoquinones'.
- [221] H. Iwamoto, A. Takuwa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 724–726; 'Photoinduced Intramolecular Cyclization Reaction of 2-(2-Alkenoyl)-3-isopropylthio-1,4-benzoquinones to Heterocyclic Compounds'.
- [222] D. Cameron, R. Giles, *Chemical Communications (London)* **1965**, 573–574; 'A photochemical rearrangement involving aminated quinones'.
- [223] D. W. Cameron, R. G. F. Giles, *J. Chem. Soc. C* **1968**, 1461–1464; 'Photochemical formation of benzoxazoline derivatives from aminated quinones'.
- [224] R. G. F. Giles, *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13*, 2253–2254; 'The photochemistry of an aminated 1,4-benzoquinone'.
- [225] Y. Chen, M. G. Steinmetz, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3729–3732; 'Photochemical Cyclization with Release of Carboxylic Acids and Phenol from Pyrrolidino-Substituted 1,4-Benzoquinones Using Visible Light'.
- [226] Y. Chen, M. G. Steinmetz, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 6053–6060; 'Photoactivation of Amino-Substituted 1,4-Benzoquinones for Release of Carboxylate and Phenolate Leaving Groups Using Visible Light'.
- [227] C. J. Regan, D. P. Walton, O. S. Shafaat, D. A. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 4729–4736; 'Mechanistic Studies of the Photoinduced Quinone Trimethyl Lock Decaging Process'.
- [228] V. X. Truong, F. Li, F. Ercole, J. S. Forsythe, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 12076–12079; 'Visible-light-mediated cleavage of polymer chains under physiological conditions *via* quinone photoreduction and trimethyl lock'.
- [229] G. Barany, R. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 7363–7365; 'A new amino protecting group removable by reduction. Chemistry of the dithiasuccinoyl (Dts) function'.
- [230] C.-H. Wong, S. C. Zimmerman, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 1679–1695; 'Orthogonality in organic, polymer, and supramolecular chemistry: from Merrifield to click chemistry'.
- [231] C. G. Bochet, *Isr. J. Chem.* **2021**, *61*, 486–495; 'Two decades of chromatic orthogonality'.
- [232] P. Julie A, Y. Ding, W. Arthur, *J. Org. Chem.* **2020**, *86*, 9781–9787; 'Multiwavelength Control of Mixtures Using Visible Light Absorbing Photocages'.
- [233] S. E. Braslavsky, *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 293; (pac); 'Glossary of terms used in photochemistry, 3rd edition (IUPAC Recommendations 2006)'.
- [234] C. G. Bochet, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2071–2073; 'Orthogonal Photolysis of Protecting Groups'.
- [235] A. Blanc, C. G. Bochet, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5567–5577; 'Wavelength-Controlled Orthogonal Photolysis of Protecting Groups'.
- [236] A. Blanc, C. G. Bochet, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2649–2651; 'Isotope Effects in Photochemistry: Application to Chromatic Orthogonality'.
- [237] M. Kessler, R. Glatthar, B. Giese, C. G. Bochet, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1179–1181; 'Sequentially Photocleavable Protecting Groups in Solid-Phase Synthesis'.
- [238] J.-L. Débieux, C. G. Bochet, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 405–406; 'The all-photochemical synthesis of an OGP(10–14) precursor'.

- [239] T. F. Scott, B. A. Kowalski, A. C. Sullivan, C. N. Bowman, R. R. McLeod, *Science* **2009**, 324, 913; 'Two-Color Single-Photon Photoinitiation and Photoinhibition for Subdiffraction Photolithography'.
- [240] L. García-Fernández, C. Herbivo, V. S. M. Arranz, D. Warther, L. Donato, A. Specht, A. del Campo, *Adv. Mater.* **2014**, 26, 5012–5017; 'Dual Photosensitive Polymers with Wavelength-Selective Photoresponse'.
- [241] A. del Campo, D. Boos, H. W. Spiess, U. Jonas, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, 44, 4707–4712; 'Surface Modification with Orthogonal Photosensitive Silanes for Sequential Chemical Lithography and Site-Selective Particle Deposition'.
- [242] P. Stegmaier, J. M. Alonso, A. d. Campo, *Langmuir* **2008**, 24, 11872–11879; 'Photoresponsive Surfaces with Two Independent Wavelength-Selective Functional Levels'.
- [243] V. San Miguel, C. G. Bochet, A. del Campo, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 5380–5388; 'Wavelength-Selective Caged Surfaces: How Many Functional Levels Are Possible?'.
- [244] A. Rodrigues-Correia, X. M. M. Weyel, A. Heckel, *Org. Lett.* **2013**, 15, 5500–5503; 'Four Levels of Wavelength-Selective Uncaging for Oligonucleotides'.
- [245] S. Kantevari, M. Matsuzaki, Y. Kanemoto, H. Kasai, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods* **2010**, 7, 123–125; 'Two-color, two-photon uncaging of glutamate and GABA'.
- [246] M. A. Priestman, L. Sun, D. S. Lawrence, *ACS Chem. Biol.* **2011**, 6, 377–384; 'Dual Wavelength Photoactivation of cAMP- and cGMP-Dependent Protein Kinase Signaling Pathways'.
- [247] B. N. Goguen, A. Aemissegger, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 11038–11041; 'Sequential Activation and Deactivation of Protein Function Using Spectrally Differentiated Caged Phosphoamino Acids'.
- [248] A. Rodrigues-Correia, D. Knapp-Bühle, J. W. Engels, A. Heckel, *Org. Lett.* **2014**, 16, 5128–5131; 'Selective Uncaging of DNA through Reaction Rate Selectivity'.
- [249] W. A. Velema, J. P. van der Berg, W. Szymanski, A. J. M. Driessen, B. L. Feringa, *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9, 1969–1974; 'Orthogonal Control of Antibacterial Activity with Light'.
- [250] L. M. Ceo, J. T. Koh, *ChemBioChem* **2012**, 13, 511–513; 'Photocaged DNA Provides New Levels of Transcription Control'.
- [251] R. M. Hughes, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2018**, 53, 453–474; 'A compendium of chemical and genetic approaches to light-regulated gene transcription'.
- [252] D. Hartmann, J. M. Smith, G. Mazzotti, R. Chowdhry, M. J. Booth, *Biochem. Soc. Trans.* **2020**, 48, 1645–1659; 'Controlling gene expression with light: a multidisciplinary endeavour'.
- [253] F. G. Cruz, J. T. Koh, K. H. Link, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8777–8778; 'Light-Activated Gene Expression'.
- [254] Y. Shi, J. T. Koh, *ChemBioChem* **2004**, 5, 788–796; 'Light-Activated Transcription and Repression by Using Photocaged SERMs'.
- [255] D. K. Sinha, P. Neveu, N. Gagey, I. Aujard, C. Benbrahim-Bouzidi, T. Le Saux, C. Rampon, C. Gauron, B. Goetz, S. Dubrulle, M. Baaden, M. Volovitch, D. Bensimon, S. Vriza, L. Jullien, *ChemBioChem* **2010**, 11, 653–663; 'Photocontrol of Protein Activity in Cultured Cells and Zebrafish with One- and Two-Photon Illumination'.
- [256] K.-i. Hayashi, K. Hashimoto, N. Kusaka, A. Yamazoe, H. Fukaki, M. Tasaka, H. Nozaki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 2470–2474; 'Caged gene-inducer spatially and temporally controls gene expression and plant development in transgenic Arabidopsis plant'.
- [257] M. A. Inlay, V. Choe, S. Bharathi, N. B. Fernhoff, J. R. Baker, I. L. Weissman, S. K. Choi, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 4971–4973; 'Synthesis of a photocaged tamoxifen for light-dependent activation of Cre-ER recombinase-driven gene modification'.
- [258] T. Faal, P. T. Wong, S. Tang, A. Coulter, Y. Chen, C. H. Tu, J. R. Baker, S. K. Choi, M. A. Inlay, *Mol. BioSyst.* **2015**, 11, 783–790; '4-Hydroxytamoxifen probes for light-dependent spatiotemporal control of Cre-ER mediated reporter gene expression'.
- [259] C. Rampon, C. Gauron, T. Lin, F. Meda, E. Dupont, A. Cosson, E. Ipendey, A. Frerot, I. Aujard, T. Le Saux, D. Bensimon, L. Jullien, M. Volovitch, S. Vriza, A. Joliot, *Development* **2015**, 142, 1840; 'Control of brain patterning by Engrailed paracrine transfer: a new function of the Pbx interaction domain'.
- [260] W. Zhang, F. Hamouri, Z. Feng, I. Aujard, B. Ducos, S. Ye, S. Weiss, M. Volovitch, S. Vriza, L. Jullien, D. Bensimon, *ChemBioChem* **2018**, 19, 1232–1238; 'Control of Protein Activity and Gene Expression by Cyclofen-OH Uncaging'.
- [261] A. P. Gorka, T. Yamamoto, J. Zhu, M. J. Schnermann, *ChemBioChem* **2018**, 19, 1239–1243; 'Cyanine Photocages Enable Spatial Control of Inducible Cre-Mediated Recombination'.

- [262] S. B. Cambridge, D. Geissler, S. Keller, B. Cürten, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 2229–2231; 'A Caged Doxycycline Analogue for Photoactivated Gene Expression'.
- [263] S. B. Cambridge, D. Geissler, F. Calegari, K. Anastassiadis, M. T. Hasan, A. F. Stewart, W. B. Huttner, V. Hagen, T. Bonhoeffer, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 527–531; 'Doxycycline-dependent photoactivated gene expression in eukaryotic systems'.
- [264] D. J. Sauer, M. K. Temburni, J. B. Biggins, L. M. Ceo, D. S. Gaileo, J. T. Koh, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 313–320; 'Light-Activated Gene Expression Directs Segregation of Co-cultured Cells *in Vitro*'.
- [265] B. Goegan, F. Terzi, F. Bolze, S. Cambridge, A. Specht, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1341–1348; 'Synthesis and Characterization of Photoactivatable Doxycycline Analogues Bearing Two-Photon-Sensitive Photoremovable Groups Suitable for Light-Induced Gene Expression'.
- [266] P. M. Kusen, K. Hoffmann, G. Wandrey, J. Büchs, J. Pietruszka, *BIOspektrum* **2017**, *23*, 643–645; 'Optische Genregulation in Mikrobioreaktoren'.
- [267] P. M. Kusen, G. Wandrey, C. Probst, A. Grünberger, M. Holz, S. Meyer zu Berstenhorst, D. Kohlheyer, J. Büchs, J. Pietruszka, *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 2915–2922; 'Optogenetic Regulation of Tunable Gene Expression in Yeast Using Photo-Labile Caged Methionine'.
- [268] P. M. Kusen, G. Wandrey, V. Krewald, M. Holz, S. M. zu Berstenhorst, J. Büchs, J. Pietruszka, *J. Biotechnol.* **2017**, *258*, 117–125; 'Light-controlled gene expression in yeast using photocaged Cu²⁺'.
- [269] D. D. Young, A. Deiters, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 4290–4292; 'Photochemical Activation of Protein Expression in Bacterial Cells'.
- [270] C. J. Wilson, H. Zhan, L. Swint-Kruse, K. S. Matthews, *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 3–16; 'The lactose repressor system: paradigms for regulation, allosteric behavior and protein folding'.
- [271] D. Binder, A. Grünberger, A. Loeschcke, C. Probst, C. Bier, J. Pietruszka, W. Wiechert, D. Kohlheyer, K.-E. Jaeger, T. Drepper, *Integr. Biol.* **2014**, *6*, 755–765; 'Light-responsive control of bacterial gene expression: precise triggering of the lac promoter activity using photocaged IPTG'.
- [272] G. Wandrey, C. Bier, D. Binder, K. Hoffmann, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka, T. Drepper, J. Büchs, *Microb. Cell Fact.* **2016**, *15*, 1–16; 'Light-induced gene expression with photocaged IPTG for induction profiling in a high-throughput screening system'.
- [273] D. Binder, J. Frohwitter, R. Mahr, C. Bier, A. Grünberger, A. Loeschcke, P. Peters-Wendisch, D. Kohlheyer, J. Pietruszka, J. Frunzke, K.-E. Jaeger, V. F. Wendisch, T. Drepper, *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 6141–6149; 'Light-controlled cell factories – Employing photocaged IPTG for light-mediated optimization of lac-based gene expression and (+)-valencene biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*'.
- [274] C. Bier, D. Binder, D. Drobietz, A. Loeschcke, T. Drepper, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka, *Synthesis* **2017**, *49*, 42–52; 'Photocaged Carbohydrates: Versatile Tools for Controlling Gene Expression by Light'.
- [275] D. Binder, C. Probst, C. Bier, A. Loeschcke, A. Grünberger, *BIOspektrum* **2015**, *21*, 612–615; 'Lichtgesteuerte Genexpression auf Einzelzellebene'.
- [276] S. Kumar, E. J. Wachtel, E. Keinan, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3821–3827; 'Hexaalkoxytricycloquinazolines: new discotic liquid crystals'.
- [277] R. Appel, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1975**, *14*, 801–811; 'Tertiary Phosphane/Tetrachloromethane, a Versatile Reagent for Chlorination, Dehydration, and P—N Linkage'.
- [278] D. P. Nguyen, M. Mahesh, S. J. Elsässer, S. M. Hancock, C. Uttamapinant, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2240–2243; 'Genetic Encoding of Photocaged Cysteine Allows Photoactivation of TEV Protease in Live Mammalian Cells'.
- [279] L. P. Smaga, N. W. Pino, G. E. Ibarra, V. Krishnamurthy, J. Chan, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 680–684; 'A Photoactivatable Formaldehyde Donor with Fluorescence Monitoring Reveals Threshold To Arrest Cell Migration'.
- [280] L. Tietze, M. Müller, S.-C. Duefert, K. Schmuck, I. Schuberth, *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 1726–1731; 'Photoactivatable Prodrugs of Highly Potent Duocarmycin Analogues for a Selective Cancer Therapy'.
- [281] G. Bartoli, M. Bosco, R. Dalpozzo, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 115–118; 'Grignard reagents selective attack to nitroarene function in the presence of other electrophilic groups'.
- [282] A. Ricci, M. Fochi, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 1444–1446; 'Reactions between Organomagnesium Reagents and Nitroarenes: Past, Present, and Future'.

- [283] R. S. Lankalapalli, A. Ouro, L. Arana, A. Gómez-Muñoz, R. Bittman, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8844–8847; 'Caged Ceramide 1-Phosphate Analogues: Synthesis and Properties'.
- [284] S. J. Teague, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5751–5754; 'Facile synthesis of a *o*-nitrobenzyl photolabile linker for combinatorial chemistry'.
- [285] K. Ito, K. Nakajima, *J. Heterocycl. Chem.* **1988**, *25*, 511–515; 'Selenium dioxide oxidation of alkylcoumarins and related methyl-substituted heteroaromatics'.
- [286] R. O. Schönleber, J. Bendig, V. Hagen, B. Giese, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 97–101; 'Rapid photolytic release of cytidine 5'-diphosphate from a coumarin derivative: a new tool for the investigation of ribonucleotide reductases'.
- [287] T. Weinrich, M. Gränz, C. Grünewald, T. Prisner, M. Göbel, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 491–496; 'Synthesis of a Cytidine Phosphoramidite with Protected Nitroxide Spin Label for EPR Experiments with RNA'.
- [288] D. L. Klayman, T. S. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 197–199; 'Reaction of selenium with sodium borohydride in protic solvents. A Facile Method for the introduction of selenium into organic molecules'.
- [289] T. Ozturk, E. Ertas, O. Mert, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5210–5278; 'Use of Lawesson's Reagent in Organic Syntheses'.
- [290] M. Noguchi, M. Skwarczynski, H. Prakash, S. Hirota, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5389–5397; 'Development of novel water-soluble photocleavable protective group and its application for design of photoresponsive paclitaxel prodrugs'.
- [291] T. Imoto, A. Kawase, M. Minoshima, T. Yokoyama, H. Bito, K. Kikuchi, *Org. Lett.* **2019**, *22*, 22–25; 'Photolytic Release of a Caged Inhibitor of an Endogenous Transcription Factor Enables Optochemical Control of CREB-Mediated Gene Expression'.
- [292] A. Peyret, E. Ibarboure, A. Tron, L. Beauté, R. Rust, O. Sandre, N. D. McClenaghan, S. Lecommandoux, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 1566–1570; 'Polymersome Popping by Light-Induced Osmotic Shock under Temporal, Spatial, and Spectral Control'.
- [293] R. D. Rohde, H. D. Agnew, W.-S. Yeo, R. C. Bailey, J. R. Heath, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9518–9525; 'A Non-Oxidative Approach toward Chemically and Electrochemically Functionalizing Si(111)'.
- [294] K. Shoji, M. Yukihiko, F. Shizuo, K. Takaaki, N. Keigo, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 336–338; 'Oxidation Using Quaternary Ammonium Polyhalides. VIII. Oxidation of 1,4-Benzenediols with Benzyltrimethylammonium Tribromide'.
- [295] K. Terpe, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *72*, 211–222; 'Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems'.
- [296] T. Brautaset, R. Lale, S. Valla, *Microb. Biotechnol.* **2009**, *2*, 15–30; 'Positively regulated bacterial expression systems'.
- [297] S. K. Lee, J. D. Keasling, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 6856–6862; 'A propionate-inducible expression system for enteric bacteria'.
- [298] D. Zander, D. Samaga, R. Straube, K. Bettenbrock, *Biophys. J.* **2017**, *112*, 1984–1996; (Biophys. J.); 'Bistability and Nonmonotonic Induction of the *lac* Operon in the Natural Lactose Uptake System'.
- [299] A. Gawin, S. Valla, T. Brautaset, *Microb. Biotechnol.* **2017**, *10*, 702–718; 'The XylS/Pm regulator/promoter system and its use in fundamental studies of bacterial gene expression, recombinant protein production and metabolic engineering'.
- [300] S. L. Fuenmayor, M. Wild, A. L. Boyes, P. A. Williams, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 2522; 'A Gene Cluster Encoding Steps in Conversion of Naphthalene to Gentisate in *Pseudomonas* sp. Strain U2'.
- [301] L. Hüsken, R. Beeffink, J. de Bont, J. Wery, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *55*, 571–577; 'High-rate 3-methylcatechol production in *Pseudomonas putida* strains by means of a novel expression system'.
- [302] R. M. Jones, B. Britt-Compton, P. A. Williams, *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 5847–5853; (J. Bacteriol.); 'The naphthalene catabolic (*nag*) genes of *Ralstonia* sp. strain U2 are an operon that is regulated by NagR, a LysR-type transcriptional regulator'.
- [303] F. Hogenkamp, Master Thesis, 'Studien zur Beeinflussung der Hydrophilie von photolabilen Schutzgruppen', Heinrich Heine University Düsseldorf (Düsseldorf, Germany), **2016**.
- [304] B. M. Smith, A. E. Graham, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 6281–6283; 'Indium triflate mediated tandem acetalisation-acetal exchange reactions under solvent-free conditions'.

- [305] B. M. Smith, T. M. Kubczyk, A. E. Graham, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7775–7781; 'Iridium(III) triflate catalysed transacetalisation reactions of diols and triols under solvent-free conditions'.
- [306] K. M. Schelkle, C. Schmid, K. Yserentant, M. Bender, I. Wacker, M. Petzoldt, M. Hamburger, D.-P. Herten, R. Wombacher, R. R. Schröder, U. H. F. Bunz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 4724–4728; 'Cell Fixation by Light-Triggered Release of Glutaraldehyde'.
- [307] B. G. Davis, D. Chambers, I. Cumpstey, R. France, D. Gamblin, in *Carbohydrates*, Academic Press, Oxford, **2003**, pp. 69–120.
- [308] V. Duléry, O. Renaudet, C. Philouze, P. Dumy, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 894–900; 'α and β 1-Fucopyranosyl oxyamines: key intermediates for the preparation of fucose-containing glycoconjugates by oxime ligation'.
- [309] T. K. Lindhorst, in *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2000**, p. 51.
- [310] K. P. R. Kartha, H. J. Jennings, *J. Carbohydr. Chem.* **1990**, *9*, 777–781; 'A Simplified, One-Pot Preparation of Acetobromosugars from Reducing Sugars'.
- [311] R. R. Schmidt, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 212–235; 'New Methods for the Synthesis of Glycosides and Oligosaccharides—Are There Alternatives to the Koenigs-Knorr Method?'.
- [312] C. Bier, PhD Thesis, 'Neue lichtgesteuerte Werkzeuge für biotechnologische und biosynthetische Anwendungen', Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Düsseldorf, Deutschland), **2017**.
- [313] K. Troost, A. Loeschke, F. Hilgers, A. Y. Özgür, T. M. Weber, B. Santiago-Schübel, V. Svensson, J. Hage-Hülsmann, S. S. Habash, F. M. W. Grundler, A. S. S. Schleker, K.-E. Jaeger, T. Drepper, *Front. Microbiol.* **2019**, *10*; 'Engineered *Rhodobacter capsulatus* as a Phototrophic Platform Organism for the Synthesis of Plant Sesquiterpenoids'.
- [314] M. D. Roldán, R. Blasco, F. J. Caballero, F. Castillo, *Arch. Microbiol.* **1997**, *169*, 36–42; 'Degradation of *p*-nitrophenol by the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*'.
- [315] G. E. Wright, M. T. Madigan, *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 2069–2073; 'Photocatabolism of aromatic compounds by the phototrophic purple bacterium *Rhodospirillum rubrum*'.
- [316] R. Blasco, F. Castillo, *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 690–695; 'Light-dependent degradation of nitrophenols by the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1'.
- [317] R. Blasco, F. Castillo, *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 1774–1778; 'Characterization of a nitrophenol reductase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1'.
- [318] J. Ma, A. Ripp, D. Wassy, T. Dürr, D. Qiu, M. Häner, T. Haas, C. Popp, D. Bezold, S. Richert, *Molecules* **2020**, *25*, 5325; 'Thiocoumarin Caged Nucleotides: Synthetic Access and Their Photophysical Properties'.
- [319] D. Wahler, O. Boujard, F. Lefèvre, J.-L. Reymond, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 703–710; 'Adrenaline profiling of lipases and esterases with 1,2-diol and carbohydrate acetates'.
- [320] B. K. Gorityala, Z. Lu, M. L. Leow, J. Ma, X.-W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15229–15232; 'Design of a "Turn-Off/Turn-On" Biosensor: Understanding Carbohydrate-Lectin Interactions for Use in Noncovalent Drug Delivery'.
- [321] J. Tang, M. A. Robichaux, K.-L. Wu, J. Pei, N. T. Nguyen, Y. Zhou, T. G. Wensel, H. Xiao, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 14699–14706; 'Single-Atom Fluorescence Switch: A General Approach toward Visible-Light-Activated Dyes for Biological Imaging'.
- [322] V. Dimakos, M. S. Taylor, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 11457–11517; 'Site-Selective Functionalization of Hydroxyl Groups in Carbohydrate Derivatives'.
- [323] N. Bi, C. Xiong, G. Jin, Z. Guo, G. Gu, *Carbohydr. Res.* **2017**, *451*, 1–11; 'Synthesis of a trisaccharide repeating unit of the O-antigen from *Burkholderia cenocepacia* and its dimer'.
- [324] S. K. Giri, M. Verma, K. P. R. Kartha, *J. Carbohydr. Chem.* **2008**, *27*, 464–478; 'Iridium(III) Triflate: A Highly Efficient Catalyst for Reactions of Sugars'.
- [325] P. J. Kocięński, in *Protecting Groups*, 3rd ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2005**, p. 160.
- [326] Y. Du, G. Gu, G. Wei, Y. Hua, R. J. Linhardt, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3627–3630; 'Synthesis of Saponins Using Partially Protected Glycosyl Donors'.
- [327] W. A. Szarek, A. Zamojski, K. N. Tiwari, E. R. Ison, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3827–3830; 'A new, facile method for cleavage of acetals and dithioacetals in carbohydrate derivatives'.
- [328] A. R. Vaino, W. A. Szarek, *Chem. Commun.* **1996**, 2351–2352; 'A mild and efficient method for the deprotection of *tert*-butyldimethylsilyl ethers using iodine in methanol'.
- [329] H. Wang, W.-G. Li, K. Zeng, Y.-J. Wu, Y. Zhang, T.-L. Xu, Y. Chen, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, *58*, 561–565; 'Photocatalysis Enables Visible-Light Uncaging of Bioactive Molecules in Live Cells'.

- [330] A. M. DiLauro, W. Seo, S. T. Phillips, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7352–7358; 'Use of Catalytic Fluoride under Neutral Conditions for Cleaving Silicon–Oxygen Bonds'.
- [331] X. Ding, W. Wang, F. Kong, *Carbohydr. Res.* **1997**, *303*, 445–448; 'Detritylation of mono- and di-saccharide derivatives using ferric chloride hydrate'.
- [332] H. Yu, X. Chen, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2393–2396; 'Aldolase-Catalyzed Synthesis of β -D-Galp-(1 \rightarrow 9)-D-KDN: A Novel Acceptor for Sialyltransferases'.
- [333] C. Callaghan, M. Redmond, R. C. Alnoch, C. Mateo, M. Filice, J. M. Palomo, *ChemCatChem* **2017**, *9*, 2536–2543; 'Biocatalytic Process Optimization for the Production of High-Added-Value 6-O-Hydroxy and 3-O-Hydroxy Glycosyl Building Blocks'.
- [334] D. L. J. Clive, X. He, M. H. D. Postema, M. J. Mashimbye, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4231–4234; 'A synthetic route from d-glucose to d-myo-inositol-1,4,5-tris(dihydrogenphosphate): use of an unusual ene reaction and the Bu₂SnCl₂/Bu₂SnH₂ reagent'.
- [335] T. Wakabayashi, K. Mori, S. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1372–1375; 'Total Synthesis and Structural Elucidation of Khafrefungin'.
- [336] D. Lim, S. B. Park, *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 7100–7108; 'Synthesis of Molecular Frameworks Containing Two Distinct Heterocycles Connected in a Single Molecule with Enhanced Three-Dimensional Shape Diversity'.
- [337] D. Binder, C. Probst, A. Grünberger, F. Hilgers, A. Loeschke, K.-E. Jaeger, D. Kohlheyer, T. Drepper, *PLoS One* **2016**, *11*, e0160711; 'Comparative Single-Cell Analysis of Different *E. coli* Expression Systems during Microfluidic Cultivation'.
- [338] W. S. Saari, J. E. Schwering, P. A. Lyle, S. J. Smith, E. L. Engelhardt, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 97–101; 'Cyclization-Activated Prodrugs. Basic Carbamates of 4-Hydroxyanisole'.
- [339] A. Alouane, R. Labruère, T. Le Saux, F. Schmidt, L. Jullien, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 7492–7509; 'Self-Immolative Spacers: Kinetic Aspects, Structure–Property Relationships, and Applications'.
- [340] C. Dugave, L. Demange, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2475–2532; 'Cis–Trans Isomerization of Organic Molecules and Biomolecules: Implications and Applications'.
- [341] A. K. Ghosh, M. Brindisi, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2895–2940; (J. Med. Chem.); 'Organic carbamates in drug design and medicinal chemistry'.
- [342] M. A. DeWit, E. R. Gillies, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18327–18334; 'A Cascade Biodegradable Polymer Based on Alternating Cyclization and Elimination Reactions'.
- [343] N. Fomina, C. McFearin, M. Sermsakdi, O. Edigin, A. Almutairi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9540–9542; 'UV and Near-IR Triggered Release from Polymeric Nanoparticles'.
- [344] C. de Gracia Lux, C. L. McFearin, S. Joshi-Barr, J. Sankaranarayanan, N. Fomina, A. Almutairi, *ACS Macro Lett.* **2012**, *1*, 922–926; (ACS Macro Lett); 'A Single UV or Near IR Triggering Event Leads to Polymer Degradation into Small Molecules'.
- [345] E. Bouvier, S. Thiroit, F. Schmidt, C. Monneret, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 969–977; 'First enzymatically activated Taxotere prodrugs designed for ADEPT and PMT'.
- [346] K. Haba, M. Popkov, M. Shamis, R. A. Lerner, C. F. Barbas III, D. Shabat, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 716–720; 'Single-Triggered Trimeric Prodrugs'.
- [347] R. Wang, K. Cai, H. Wang, C. Yin, J. Cheng, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 4878–4881; 'A caged metabolic precursor for DT-diaphorase-responsive cell labeling'.
- [348] M. E. Brewster, M.-j. Huang, E. Pop, J. Pitha, M. J. S. Dewar, J. J. Kaminski, N. Bodor, *Carbohydr. Res.* **1993**, *242*, 53–67; 'An AM1 molecular orbital study of α -D-glucopyranose and β -maltose: Evaluation and implications'.
- [349] S. Feng, C. Bagia, G. Mpourmpakis, *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117*, 5211–5219; 'Determination of Proton Affinities and Acidity Constants of Sugars'.
- [350] S. André, D. Specker, N. V. Bovin, M. Lensch, H. Kaltner, H.-J. Gabius, V. Wittmann, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1716–1728; 'Carbamate-Linked Lactose: Design of Clusters and Evidence for Selectivity to Block Binding of Human Lectins to (Neo)Glycoproteins with Increasing Degree of Branching and to Tumor Cells'.
- [351] M. Azoulay, V. Escriou, J.-C. Florent, C. Monneret, *J. Carbohydr. Chem.* **2001**, *20*, 841–853; 'Synthesis of new galactosyl and lactosyl carbamate-containing glycolipids'.
- [352] S. Cherif, M. R. Leach, D. B. Williams, C. Monneret, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1237–1240; 'Synthesis of a molecular mimic of the Glc₁Man₉ oligoside as potential inhibitor of calnexin binding to Δ F508 CFTR protein'.
- [353] T. B. Cai, D. Lu, X. Tang, Y. Zhang, M. Landerholm, P. G. Wang, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3518–3524; 'New Glycosidase Activated Nitric Oxide Donors: Glucose and 3-Morpholinopyridone Conjugates'.

- [354] D. Schwefel, C. Maierhofer, J. G. Beck, S. Seeberger, K. Diederichs, H. M. Möller, W. Welte, V. Wittmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8704–8719; 'Structural Basis of Multivalent Binding to Wheat Germ Agglutinin'.
- [355] T. Terai, E. Maki, S. Sugiyama, Y. Takahashi, H. Matsumura, Y. Mori, T. Nagano, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1261–1272; 'Rational Development of Caged-Biotin Protein-Labeling Agents and Some Applications in Live Cells'.
- [356] R. Bovill, P. G. Evans, G. L. Howse, H. M. I. Osborn, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 3774–3779; 'Synthesis and biological analysis of novel glycoside derivatives of I-AEP, as targeted antibacterial agents'.
- [357] P. Rohse, V. Wittmann, *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22*, 9724–9733; 'Mechanistic Insight into Nanomolar Binding of Multivalent Neoglycopeptides to Wheat Germ Agglutinin'.
- [358] M. El Hilali, B. Reux, E. Debiton, F. Leal, M.-J. Galmier, M. Vivier, J.-M. Chezal, E. Miot-Noirault, P. Coudert, V. Weber, *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 5692–5708; 'Linker structure-activity relationships in fluorodeoxyglucose chlorambucil conjugates for tumor-targeted chemotherapy'.
- [359] T. Sakakibara, T. Nishitani, A. Seta, T. Nakagawa, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 5809–5812; 'Anomeric effect on acidity; experimental and theoretical studies on proton abstraction at anomeric center of 1,5-anhydro-4,6-O-benzylidene-2,3-dideoxy-3-C-nitro-D-hex-2-enitol'.
- [360] A. Alouane, R. Labruère, T. Le Saux, I. Aujard, S. Dubruille, F. Schmidt, L. Jullien, *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 11717–11724; 'Light Activation for the Versatile and Accurate Kinetic Analysis of Disassembly of Self-Immolative Spacers'.
- [361] M. O. Anderson, J. Moser, J. Sherrill, R. K. Guy, *Synlett* **2004**, *2004*, 2391–2393; 'A Convenient Procedure for Parallel Ester Hydrolysis'.
- [362] J. D. Hobson, J. G. McCluskey, *J. Chem. Soc. C* **1967**, 2015–2017; 'Cleavage of tertiary bases with phenyl chloroformate: the reversion of 21-deoxyajmaline into ajmaline'.
- [363] R. Silva-Rocha, H. de Jong, J. Tamames, V. de Lorenzo, *BMC Syst. Biol.* **2011**, *5*, 191; 'The logic layout of the TOL network of *Pseudomonas putida* pWWO plasmid stems from a metabolic amplifier motif (MAM) that optimizes biodegradation of *m*-xylene'.
- [364] R. Ruíz, S. Marqués, J. L. Ramos, *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 3036–3041; (J. Bacteriol.); 'Leucines 193 and 194 at the N-terminal domain of the XylS protein, the positive transcriptional regulator of the TOL *meta*-cleavage pathway, are involved in dimerization'.
- [365] N. Mermod, J. L. Ramos, A. Bairoch, K. N. Timmis, *Mol. Gen. Genet.* **1987**, *207*, 349–354; 'The *xyIS* gene positive regulator of TOL plasmid pWWO: Identification, sequence analysis and overproduction leading to constitutive expression of *meta* cleavage operon'.
- [366] T. Tiso, N. Ihling, S. Kubicki, A. Biselli, A. Schonhoff, I. Bator, S. Thies, T. Karmainski, S. Kruth, A.-L. Willenbrink, A. Loeschcke, P. Zapp, A. Jupke, K.-E. Jaeger, J. Büchs, L. M. Blank, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*; 'Integration of Genetic and Process Engineering for Optimized Rhamnolipid Production Using *Pseudomonas putida*'.
- [367] A. Wittgens, F. Kovacic, M. M. Müller, M. Gerlitzki, B. Santiago-Schübel, D. Hofmann, T. Tiso, L. M. Blank, M. Henkel, R. Hausmann, C. Syldatk, S. Wilhelm, F. Rosenau, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 2865–2878; 'Novel insights into biosynthesis and uptake of rhamnolipids and their precursors'.
- [368] C. Helgen, C. G. Bochet, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2483–2486; 'Photochemical Protection of Amines with Cbz and Fmoc Groups'.
- [369] G. Papageorgiou, D. Ogden, G. Kelly, J. E. T. Corrie, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 887–896; 'Synthetic and photochemical studies of substituted 1-acyl-7-nitroindolines'.
- [370] A. Hassner, D. Yagudayev, T. K. Pradhan, A. Nudelman, B. Amit, *Synlett* **2007**, *2007*, 2405–2409; 'Light-Sensitive Protecting Groups for Amines and Alcohols: The Photosolvolysis of N-Substituted 7-Nitroindolines'.
- [371] G. Papageorgiou, D. C. Ogden, A. Barth, J. E. Corrie, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6503–6504; 'Photorelease of carboxylic acids from 1-Acyl-7-nitroindolines in aqueous solution: rapid and efficient photorelease of L-glutamate'.
- [372] G. Papageorgiou, J. E. T. Corrie, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 8197–8205; 'Effects of Aromatic Substituents on the Photocleavage of 1-Acyl-7-nitroindolines'.
- [373] G. Papageorgiou, J. E. Corrie, *J. Heterocycl. Chem.* **2005**, *42*, 1101–1104; 'A strategy to avoid anomalous O-alkylation of 4-hydroxyindole by diethyl bromomalonate'.
- [374] N. Rubinstein, P. Liu, E. W. Miller, R. Weinstain, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 6369–6372; 'meso-Methylhydroxy BODIPY: a scaffold for photo-labile protecting groups'.

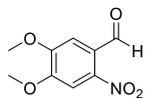
- [375] P. P. Goswami, A. Syed, C. L. Beck, T. R. Albright, K. M. Mahoney, R. Unash, E. A. Smith, A. H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3783–3786; 'BODIPY-Derived Photoremovable Protecting Groups Unmasked with Green Light'.
- [376] J. A. Peterson, C. Wijesooriya, E. J. Gehrmann, K. M. Mahoney, P. P. Goswami, T. R. Albright, A. Syed, A. S. Dutton, E. A. Smith, A. H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 7343–7346; 'A Family of BODIPY Photocages Cleaved by Single Photons of Visible/Near-IR Light'.
- [377] W. Lv, W. Wang, *Synlett* **2020**, *31*, 1129–1134; 'One-Photon Upconversion-Like Photolysis: A New Strategy to Achieve Long-Wavelength Light-Excitable Photolysis'.
- [378] A. B. Descalzo, P. Ashokkumar, Z. Shen, K. Rurack, *ChemPhotoChem* **2020**, *4*, 120–131; 'On the Aggregation Behaviour and Spectroscopic Properties of Alkylated and Annelated Boron-Dipyrromethene (BODIPY) Dyes in Aqueous Solution'.
- [379] E. K. Y. Chen, R. A. McBride, E. R. Gillies, *Macromolecules* **2012**, *45*, 7364–7374; 'Self-Immolative Polymers Containing Rapidly Cyclizing Spacers: Toward Rapid Depolymerization Rates'.
- [380] N. Karton-Lifshin, D. Shabat, *New J. Chem.* **2012**, *36*, 386–393; 'Exponential diagnostic signal amplification *via* dendritic chain reaction: the dendritic effect of a self-immolative amplifier component'.
- [381] N. Karton-Lifshin, U. Vogel, E. Sella, P. H. Seeberger, D. Shabat, B. Lepenies, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2903–2910; 'Enzyme-mediated nutrient release: glucose-precursor activation by β -galactosidase to induce bacterial growth'.
- [382] R. Cheaib, A. Listkowski, S. Chambert, A. Doutheau, Y. Queneau, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1919–1933; 'Synthesis of new mono- and disaccharidic carboxymethylglycoside lactones (CMGLs) and their use toward 1,2-bisfunctionalized carbohydrate synthons'.
- [383] J. Morrison, P. Wan, J. E. T. Corrie, G. Papageorgiou, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 960–969; 'Mechanisms of photorelease of carboxylic acids from 1-acyl-7-nitroindolines in solutions of varying water content'.
- [384] A. D. Cohen, C. Helgen, C. G. Bochet, J. P. Toscano, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2845–2848; 'The Mechanism of Photoinduced Acylation of Amines by *N*-Acyl-5,7-dinitroindoline as Determined by Time-Resolved Infrared Spectroscopy'.
- [385] C. A. Parker, E. J. Bowen, *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **1953**, *220*, 104–116; 'A new sensitive chemical actinometer. I. Some trials with potassium ferrioxalate'.
- [386] C. G. Hatchard, C. A. Parker, E. J. Bowen, *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **1956**, *235*, 518–536; 'A new sensitive chemical actinometer - II. Potassium ferrioxalate as a standard chemical actinometer'.
- [387] H. J. Kuhn, S. E. Braslavsky, R. Schmidt, *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 2105–2146; 'Chemical actinometry (IUPAC Technical Report)'.
- [388] B. A. M. Bier, PhD Thesis, 'Optische Schalter und Fluoreszenzsonden', Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Düsseldorf, Deutschland), **2011**.
- [389] D. M. Mangiante, R. D. Schaller, P. Zarzycki, J. F. Banfield, B. Gilbert, *ACS Earth Space Chem.* **2017**, *1*, 270–276; 'Mechanism of Ferric Oxalate Photolysis'.
- [390] K. A. Hislop, J. R. Bolton, *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 3119–3126; 'The Photochemical Generation of Hydroxyl Radicals in the UV-vis/Ferrioxalate/H₂O₂ System'.
- [391] K. A. Juárez-Ornelas, J. O. C. Jiménez-Halla, T. Kato, C. R. Solorio-Alvarado, K. Maruoka, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 1315–1319; 'Iodine(III)-Catalyzed Electrophilic Nitration of Phenols *via* Non-Brønsted Acidic NO₂⁺ Generation'.
- [392] N. S. Baleeva, S. O. Zaitseva, K. S. Mineev, A. V. Khavroshechkina, M. B. Zagudaylova, M. S. Baranov, *Tetrahedron Lett.* **2019**, *60*, 456–459; 'Enamine-azide [2+3]-cycloaddition as a method to introduce functional groups into fluorescent dyes'.
- [393] L. Schmidt, T. Doroshenko, P. Barbie, A. Grüter, G. Jung, U. Kazmaier, *Synthesis* **2016**, *48*, 3077–3086; 'Synthesis of Fluorescent Amino Acids *via* Palladium-Catalyzed Allylic Alkylations'.
- [394] W. Lin, L. Long, W. Tan, B. Chen, L. Yuan, *Chem. - Eur. J.* **2010**, *16*, 3914–3917; 'Coumarin-Caged Rosamine Probes Based on a Unique Intramolecular Carbon–Carbon Spirocyclization'.
- [395] Z. Li, K. Su, Z. Jiang, Y. Yu, Q.-D. You, X. Zhang, *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 7583–7588; 'Photoactivatable Prolyl Hydroxylase 2 Inhibitors for Stabilizing the Hypoxia-Inducible Factor with Light'.
- [396] N. Fomina, C. L. McFearin, M. Sermsakdi, J. M. Morachis, A. Almutairi, *Macromolecules* **2011**, *44*, 8590–8597; 'Low Power, Biologically Benign NIR Light Triggers Polymer Disassembly'.

- [397] Z. Gao, P. Yuan, D. Wang, Z. Xu, Z. Li, X. Shao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 2528–2535; 'Photo-controlled release of fipronil from a coumarin triggered precursor'.
- [398] K. Ito, J. Maruyama, *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 3014–3023; 'Studies on Stable Diazoalkanes as Potential Fluorogenic Reagents. I. 7-Substituted 4-Diazomethylcoumarins'.
- [399] S. Wang, G. W. Morrow, J. S. Swenton, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5364–5371; 'Spiro-fused 2,5-cyclohexadienones from the thermal 1,3-alkyl migrations of quinol vinyl ethers. A strategy for conversion of a carbonyl carbon to a quaternary carbon'.
- [400] C. M. Orlando, H. Mark, A. K. Bose, M. S. Manhas, *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 2512–2516; 'Photoreactions. V. Mechanism of the photorearrangement of alkyl-*p*-benzoquinones'.
- [401] M. V. R. Reddy, M. R. Mallireddigari, V. R. Pallela, S. C. Cosenza, V. K. Billa, B. Akula, D. R. C. V. Subbaiah, E. V. Bharathi, A. Padgaonkar, H. Lv, J. M. Gallo, E. P. Reddy, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5562–5586; 'Design, Synthesis, and Biological Evaluation of (*E*)-*N*-Aryl-2-arylethanesulfonamide Analogues as Potent and Orally Bioavailable Microtubule-Targeted Anticancer Agents'.
- [402] K.-Y. Zee-Cheng, C.-C. Cheng, *J. Med. Chem.* **1970**, *13*, 264–268; 'Preparation and the results of antitumor screening of some substituted amino-, azido-, halogeno- and hydroxy-*p*-benzoquinones'.
- [403] C. Wang, P.-F. Ren, X.-J. Huang, J. Wu, Z.-K. Xu, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 3930–3932; 'Surface glycosylation of polymer membrane by thiol-yne click chemistry for affinity adsorption of lectin'.
- [404] G. J. L. Bernardes, J. P. Marston, A. S. Batsanov, J. A. K. Howard, B. G. Davis, *Chem. Commun.* **2007**, 3145–3147; 'A trisulfide-linked glycoprotein'.
- [405] J. M. Neumaier, A. Madani, T. Klein, T. Ziegler, *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 558–566; 'Low-budget 3D-printed equipment for continuous flow reactions'.
- [406] Annaleise R. Grummitt, Margaret M. Harding, Pia I. Anderberg, A. Rodger, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003*, 63–71; 'Carbohydrate Derivatives of the Antitumour Alkaloid 9-Hydroxyellipticine'.
- [407] A. L. M. Morotti, K. L. Lang, I. Carvalho, E. P. Schenkel, L. S. C. Bernardes, *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 303–307; 'Semi-Synthesis of new glycosidic triazole derivatives of dihydrocucurbitacin B'.
- [408] K. Ruda, J. Lindberg, P. J. Garegg, S. Oscarson, P. Konradsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11067–11072; 'Synthesis of the *Leishmania* LPG Core Heptasaccharyl *myo*-Inositol'.
- [409] Y. Du, M. Zhang, F. Yang, G. Gu, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 3122–3127; 'A simple access to 3,6-branched oligosaccharides: Synthesis of a glycopeptide derivative that relates to *Lycium barbarum* L'.
- [410] P. Grice, S. V. Ley, J. Pietruszka, H. M. I. Osborn, H. W. M. Priepe, S. L. Warriner, *Chem. - Eur. J.* **1997**, *3*, 431–440; 'A New Strategy for Oligosaccharide Assembly Exploiting Cyclohexane-1,2-diacetal Methodology: An Efficient Synthesis of a High Mannose Type Nonasaccharide'.
- [411] D. Gilbert, K. Funk, B. Dekowski, R. Lechler, S. Keller, F. Möhrten, S. Frings, V. Hagen, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 89–97; 'Caged Capsaicins: New Tools for the Examination of TRPV1 Channels in Somatosensory Neurons'.
- [412] R. Kluger, V. D. Stefano, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 214–219; 'Mechanism of Site-Directed Protein Cross-Linking. Protein-Directed Selectivity in Reactions of Hemoglobin with Aryl Trimesates'.

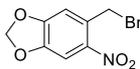
9 Formelregister

In der nachfolgenden Abbildung sind alle in der Arbeit synthetisierten Verbindungen sowie die entsprechende Abkürzung aufgelistet, welche im Laborjournal verwendet werden.

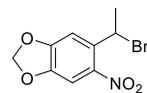
o-Nitrobenzyl-Derivate



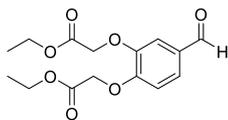
93, FHO086



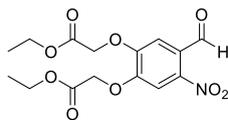
94, FHO206



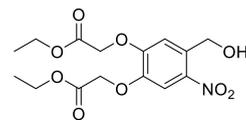
95, FHO210



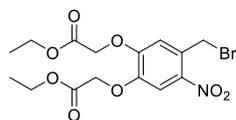
97, FHO004



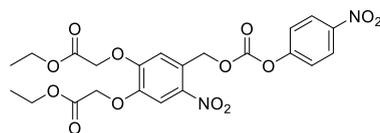
98, FHO005



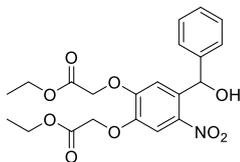
99, FHO017



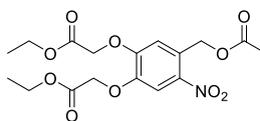
100, FHO048



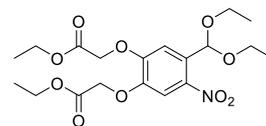
102, FHO095



103f, FHO076

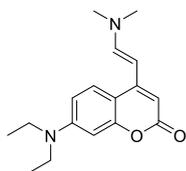


145, FHO045

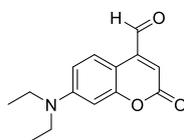


141, FHO225

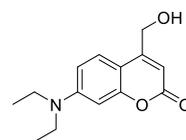
(Cumarin-4-yl)methyl-Derivate



108, FHO071

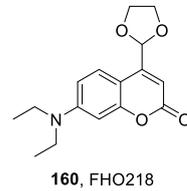
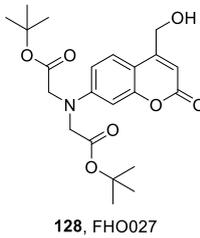
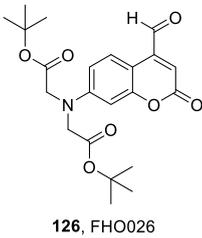
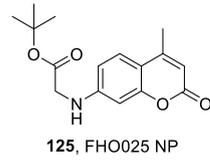
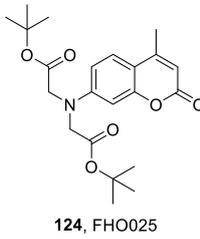
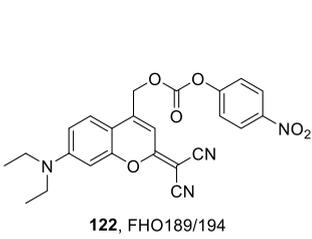
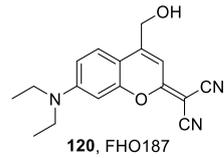
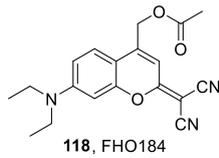
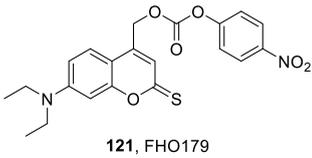
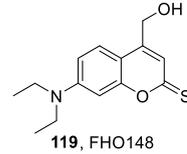
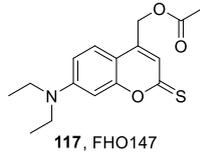
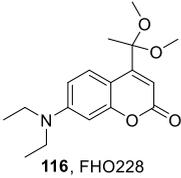
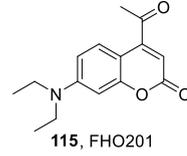
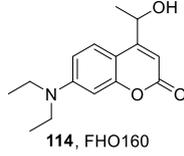
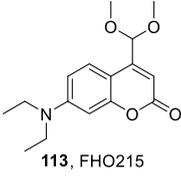
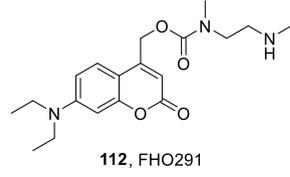
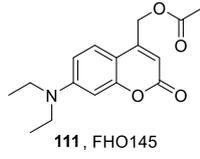
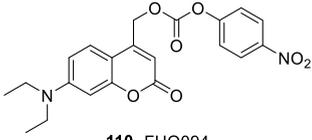


107, FHO072

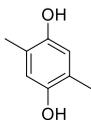


105, FHO073

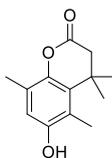
Formelregister



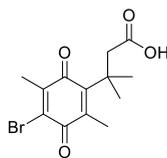
Trimethyl-Lock-Derivate



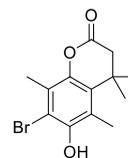
131, FHO269 (1. Stufe)



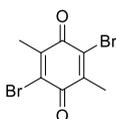
132, FHO269 (2. Stufe)



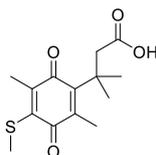
133, FHO270



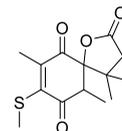
134, FHO270 NP



135, FHO284

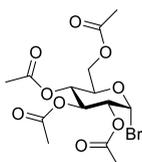


136, FHO272

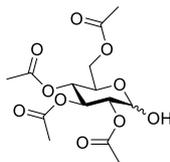


186, FHO272 NP

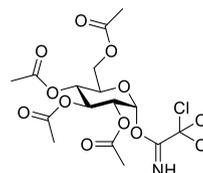
Kohlenhydrate



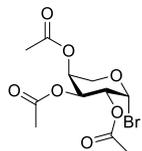
143, FHO020



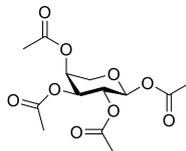
148, FHO038



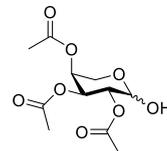
147, FHO039



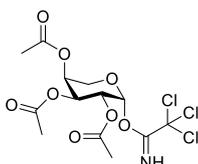
149, FHO031



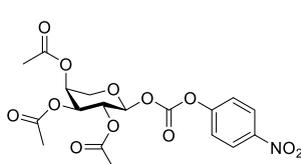
157, FHO296



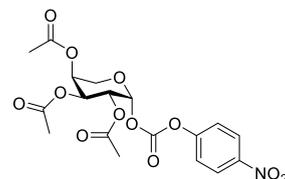
158, FHO297



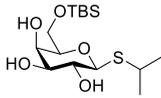
156, FHO_MHS021



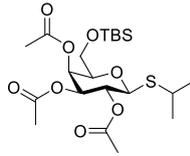
194a, FHO301



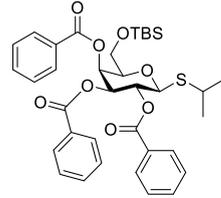
194b, FHO300



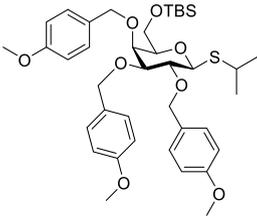
162, FHO216



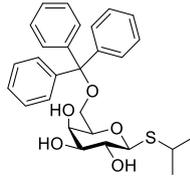
173, FHO247



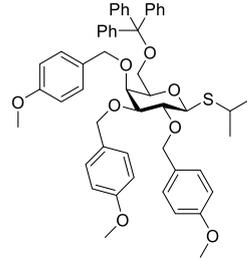
176, FHO253



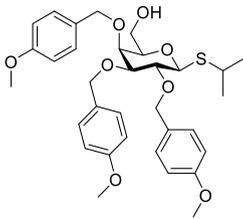
180, FHO256



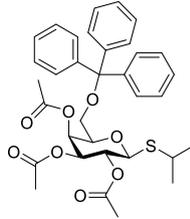
179, FHO268



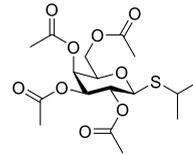
181, FHO271



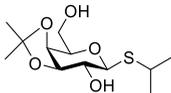
183, FHO274



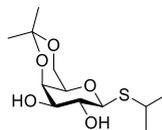
178, FHO252



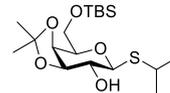
174, FHO252 NP



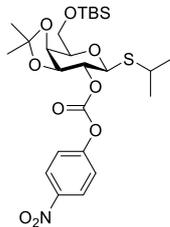
164a, FHO164a



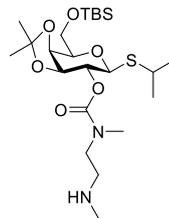
164b, FHO164b



166, FHO172

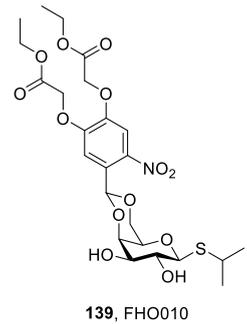
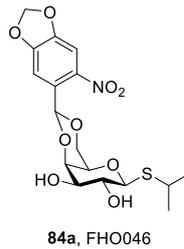
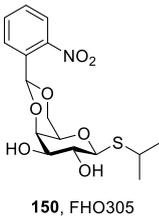
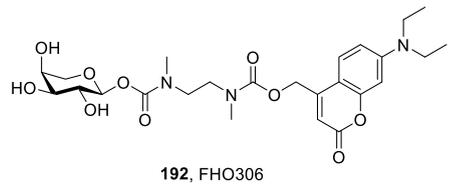
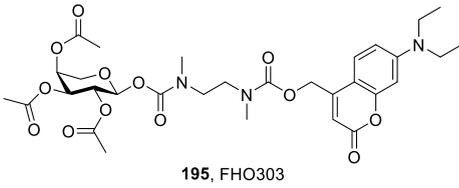
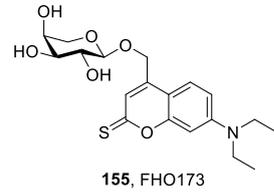
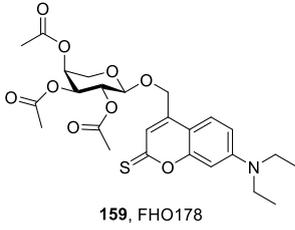
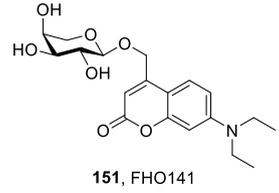
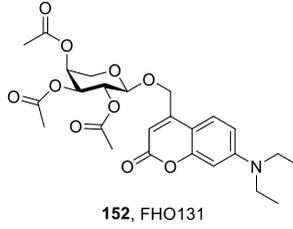
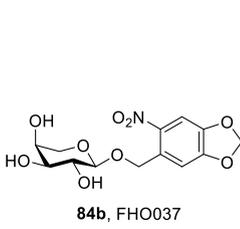
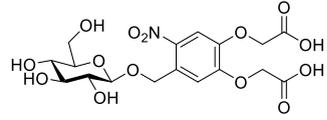
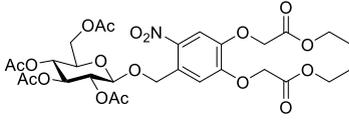


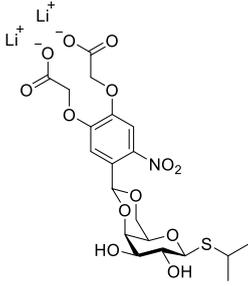
188, FHO290



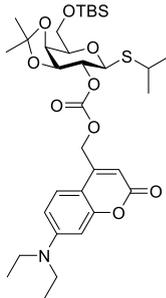
191, FHO295

Photocaged Kohlenhydrate

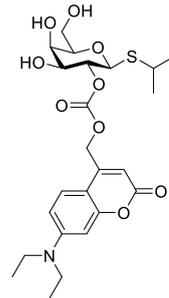




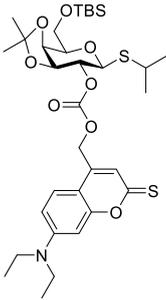
137, FHO013



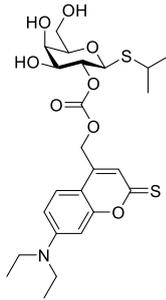
167, FHO175



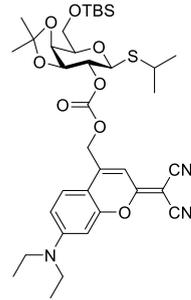
168a, FHO176



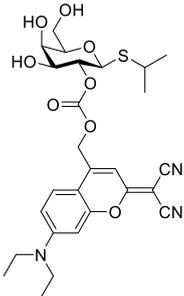
169, FHO181



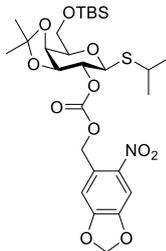
168b, FHO182



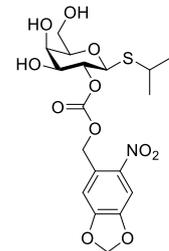
170, FHO192/197



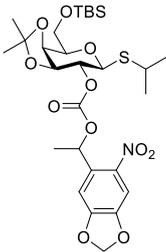
168c, FHO198



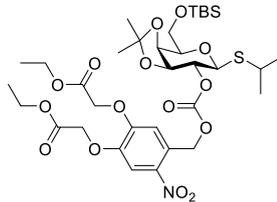
171a, FHO193



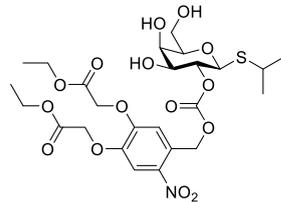
168d, FHO199



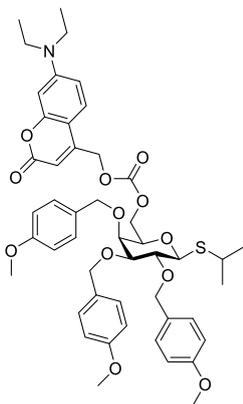
171b, FHO196



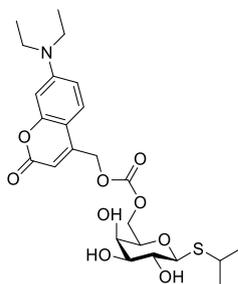
171c, FHO195/322



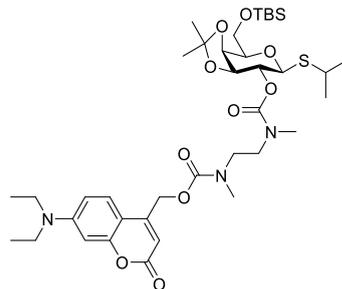
168e, FHO205



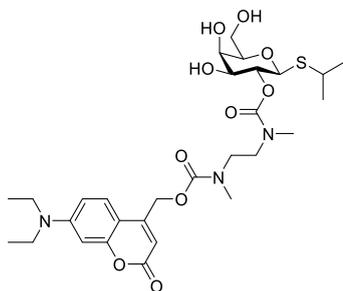
184, FHO285



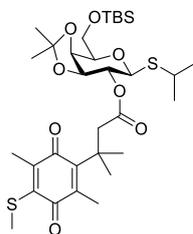
168f, FHO287



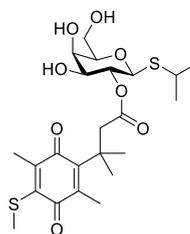
189, FHO293



168h, FHO294

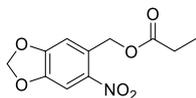


185, FHO277

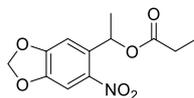


168g, FHO278

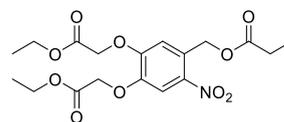
Photocaged Propionsäuren



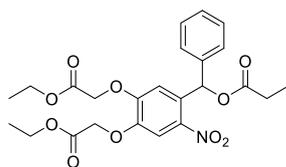
196a, FHO081



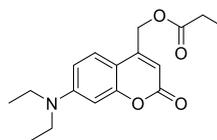
196d, FHO080



196b, FHO047

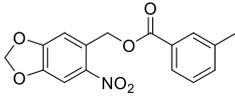


196e, FHO082

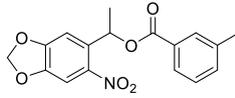


196c, FHO083

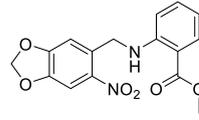
Photocaged Benzoessäure-Derivate



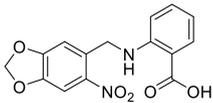
197a, FHO316



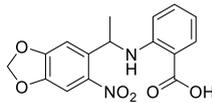
197b, FHO203



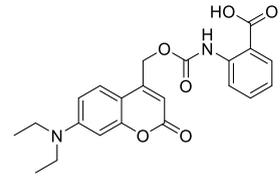
203, FHO212



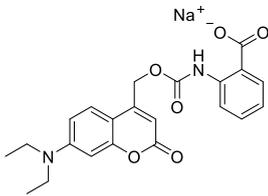
197c, FHO209



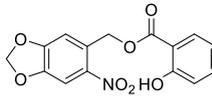
197d, FHO202



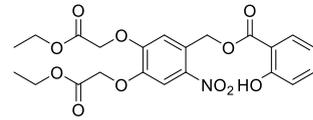
197k, FHO304



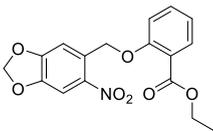
197i, FHO309



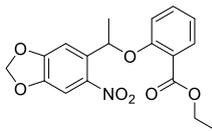
197e*, FHO_NP-cSal



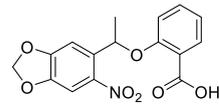
199a, FHO051



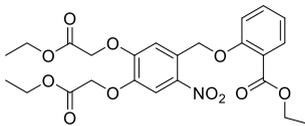
201, FHO208



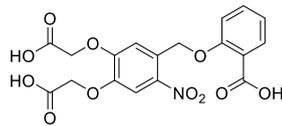
202, FHO204



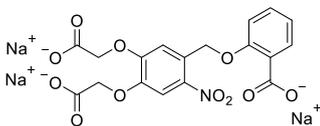
197g, FHO207



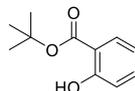
200, FHO056



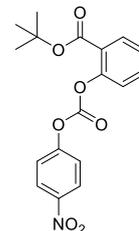
197f, FHO064



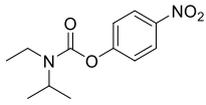
197h, FHO321



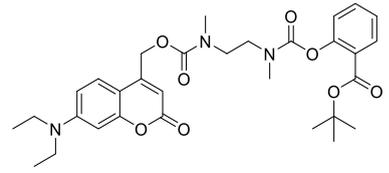
206, FHO060



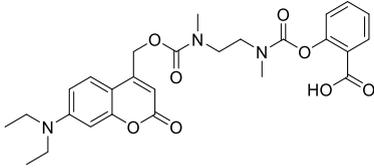
207, FHO315



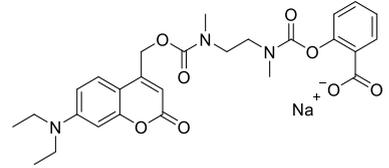
208, FHO315 NP



209, FHO317



197i, FHO319



197j, FHO320

10 Eigenanteile an den veröffentlichten Publikationen dieser Arbeit

F. Hilgers, F. Hogenkamp, N. L. Bitzenhofer, S. Thies, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka and T. Drepper, *Manuskript in Vorbereitung*; 'Wavelength-selective Control of Mono- and Di-rhamnolipid Synthesis in *Pseudomonas putida* Using Photocaged Compounds'.

Die oben genannte Publikation enthält die folgenden Eigenanteile: Das Design aller Zielmoleküle wurde eigenständig erdacht. Alle chemischen Verbindungen wurden im präparativen Maßstab synthetisiert. Die Analyse der chemischen Verbindungen und die Auswertung der chemischen Daten sowie die vollständige *in vitro* Charakterisierung erfolgte eigenständig. Der erste Entwurf des Manuskripts wurde von F. Hilgers und mir verfasst. Zudem wurde die Literaturrecherche von F. Hilgers und mir durchgeführt.

F. Hilgers, F. Hogenkamp, O. Klaus, L. Kruse, A. Lappe, A. Loeschke, C. Bier, D. Binder, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka and T. Drepper, *Manuskript in Vorbereitung*; 'Photocaged Inducers for the Non-invasive Light Control of Production Processes in the Phototrophic Bacterium *Rhodobacter capsulatus*'.

Die oben genannte Publikation enthält die folgenden Eigenanteile: Die Verbindungen **84a**, **137** und **139** wurden im präparativen Maßstab synthetisiert und ihre Reinheit mittels qNMR überprüft.

F. Hogenkamp, F. Hilgers, N. L. Bitzenhofer, V. Ophoven, M. Haase, C. Bier, D. Binder, K.-E. Jaeger, T. Drepper and J. Pietruszka, *ChemBioChem* 10.1002/cbic.202100467; 'Optochemical Control of Bacterial Gene Expression – Novel Photocaged Compounds for Different Promoter Systems'.

Die oben genannte Publikation enthält die folgenden Eigenanteile: Das Design aller Zielmoleküle wurde eigenständig erdacht. Alle chemischen Verbindungen wurden im präparativen Maßstab synthetisiert. Die Analyse der chemischen Verbindungen und die Auswertung der chemischen Daten sowie die vollständige *in vitro* Charakterisierung erfolgte eigenständig. Der erste Entwurf des Manuskripts wurde von F. Hilgers und mir verfasst. Zudem wurde die Literaturrecherche von F. Hilgers und mir durchgeführt.

A. Burmeister, Q. Akhtar, L. Hollmann, N. Tenhaef, F. Hilgers, F. Hogenkamp, S. Sokolowsky, J. Marienhagen, S. Noack, D. Kohlheyer, A. Grünberger, *ACS Synth. Biol.* **2021**, *10* (6), 1308–1319; '(Optochemical) Control of Synthetic Microbial Coculture Interactions on a Microcolony Level'.

Die oben genannte Publikation enthält die folgenden Eigenanteile: Die Verbindung **84a** wurde im präparativen Maßstab synthetisiert.

F. Hogenkamp*, F. Hilgers*, A. Knapp, O. Klaus, C. Bier, D. Binder, K.-E. Jaeger, T. Drepper, J. Pietruszka, *ChemBioChem* **2021**, *22*, 539–547; 'Effect of Photocaged Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside Solubility on Light-Responsiveness of LacI-controlled Expression Systems in Different Bacteria'.

Die oben genannte Publikation enthält die folgenden Eigenanteile: Alle chemischen Verbindungen wurden im präparativen Maßstab synthetisiert. Die Analyse der chemischen Verbindungen und die Auswertung aller chemischen Daten sowie die vollständige *in vitro* Charakterisierung erfolgte eigenständig. Der erste Entwurf des Manuskripts wurde von F. Hilgers und mir verfasst. Zudem wurde die Literaturrecherche von F. Hilgers und mir durchgeführt.

11 Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die vorliegende Dissertation wurde ausschließlich an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt. Es wurde zuvor kein weiterer Promotionsversuch unternommen.

Fabian Hogenkamp

Düsseldorf, den

12 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Jörg Pietruszka bedanken. Vielen Dank für das Vertrauen, das du mir entgegengebracht hast, die Unterstützung in dieser Zeit und natürlich die vielen Freiheiten bei der Gestaltung meines Projektes. Ebenso danke ich dir für die Chance meine Forschungsergebnisse auf internationalen Konferenzen präsentieren zu dürfen. In den Jahren habe ich vieles gelernt. Insbesondere an die vielen wissenschaftlichen, aber grade auch an die vielen nicht-wissenschaftlichen Gespräche werde ich mich gerne zurückerinnern.

Ebenso möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Constantin Czekelius für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ich möchte mich bei meinen Kooperationspartnern aus dem IMET und dem IBG-1 für die erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken, dieser Dank gilt insbesondere M. Sc. Fabienne Hilgers, Dr. Dennis Binder, M. Sc. Nora Bitzenhofer, M. Sc. Oliver Klaus, Dr. Thomas Drepper, Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger, M. Sc. Alina Burmeister und Prof. Dr.-Ing. Alexander Grünberger. Für die Unterstützung im Labor möchte ich vor allem Vera Ophoven, M. Sc. Mona Haase, M. Sc. Sven Mörsel, Hannah Kerkenpaß aber natürlich auch Sedef Eyeoglu danken. Ebenso danke ich Dr. Martina Holz und Dr. Peter Kusen für die Einführung in die Welt der Hefen und Dr. Claus Bier für die vielen fachlichen Ratschläge. Darüber hinaus danke ich Kevin Bochinsky für die Durchführung der dynamischen NMR-Messungen.

Ein großes Dankeschön gebührt auch Birgit Henßen. Danke für die zahllosen Kleinigkeiten, bei denen du mir geholfen hast, die andauernde Unterstützung, deine unendliche Geduld, wenn die Prinzessin mal wieder gestreikt hat und natürlich auch für die ganzen Gespräche währenddessen und alles darüber hinaus. Ebenso danke ich Moni und Erik für die Hilfe bei diversen organisatorischen Angelegenheiten. Natürlich danke ich auch dem gesamten Labor 304 für die gemeinsame Zeit. Danke Patrick, Patrick, Claus, Anja, Roxy, Basti, Dennis, Frederike, Jasmin, Christina, Cindy, Max und Vera.

Ein besonderer Dank gilt vor allem auch Julian Greb, Hannah Braß, Marvin Mantel und Julian Hogenkamp dafür, dass sie sich durch die Rohfassungen meiner Dissertation gequält haben und dabei zahllose hilfreiche Kommentare und Vorschläge hinterlassen haben. Insbesondere Hannah möchte ich dafür danken, dass sie mir auch jede noch so dämliche Frage beantwortet hat.

Da ich es wohl nicht schaffe jede Person einzeln namentlich zu benennen, möchte ich auf diesem Weg allen Institutsmitgliedern des IBOC's, die mich in dieser Zeit begleitet haben, für die gemeinsame Zeit und die Unterstützung sowie die vielen unterhaltsamen Diskussionen in den Mittagspausen danken. Dabei möchte ich insbesondere Alex, Jan, David, Marc, Hannah, Ben, Julia, Moritz, Julian, Teresa, Marcus und den großen unvergleichlichen Marvin Mantel hervorheben.

Ein großer Dank gilt auch allen Fahrgemeinschaften, denen ich in den letzten Jahren angehört habe, und selbstverständlich ihren Fahrern. Ohne euch hätte ich vermutlich weniger Zeit im Labor verbringen können. Ein kleiner Dank gilt natürlich auch Barilla. Ohne Capellini n.1 und die große Auswahl an Pesto-Sorten hätte ich wohl deutlich mehr Zeit für die Zubereitung von Speisen aufbringen müssen, welche ich so stattdessen zur Synthese von chemischen Verbindungen nutzen konnte. Ebenso möchte ich mich bei der Spikeball-Truppe für die wohl sportlichsten Mittagspausen bedanken.

Der größte Dank ist jedoch meiner Familie und meinen Freunden vorbehalten, welche mich über all die Jahre hinweg unterstützt, aufgebaut und motiviert haben. Ohne euch wäre das so nicht möglich gewesen. Carina, besonders dir danke ich für deine grenzenlose Geduld mit mir. Ich bin unendlich dankbar dafür, dass du immer für mich da bist.

Band 31

**Development and Characterisation of Galactosynthases for
Application in Organic Synthesis**

B. W. Berntsson (2018), xvi, 226, A-1 – B-5 pp
ISBN: 978-3-95806-321-1

Band 32

**Lichtregulierte Genexpression mittels photolabil geschützter Effektormoleküle
in *Saccharomyces cerevisiae***

P. M. Kusen (2018), 215 pp
ISBN: 978-3-95806-322-8

Band 33

**α,β -Ungesättigte δ -Lactone als Schlüsselbausteine für die Synthese von
Isocumarinen und Naphthopyranonen
– Neue Wirkstoffkandidaten und theoretische Betrachtungen –**

A. Weber (2018), 340 pp
ISBN: 978-3-95806-325-9

Band 34

**Methoden zur Herstellung von Prodigininen als Wirkstoffe –
Eine farbenfrohe Brücke zwischen Chemie und Biologie**

A. S. Klein (2018), IX, 265 pp
ISBN: 978-3-95806-343-3

Band 35

Ammoniumylide in der asymmetrischen Organokatalyse

L. Öhler (2019), V, 377 pp
ISBN: 978-3-95806-407-2

Band 36

Enantioselektive Totalsynthese von Altersolanolen

B. Mechsner (2019), I, V, 311 pp
ISBN: 978-3-95806-412-6

Band 37

**Glycosynthases – tuning glycosidase activity towards glycoside
diversification and synthesis**

M. R. Hayes (2019), VI, 225 pp
ISBN: 978-3-95806-441-6

Band 38

**Chemoenzymatische Synthesemethoden –
Zugang zur duftenden Welt der Chemie und darüber hinaus**

C. Kumru (2019), V, 338 pp
ISBN: 978-3-95806-446-1

Band 39

**Oxidoreduktasen für die Bereitstellung von Schlüsselbausteinen
der Natur- und Wirkstoffsynthese**

R. Krug (2020), 216 pp

ISBN: 978-3-95806-454-6

Band 40

**Die farbenfrohe Welt der Prodiginine – Neue Enzyme für die Synthese
bioaktiver Naturstoffderivate**

H. U. C. Braß (2021), IX, 349 pp

ISBN: 978-3-95806-523-9

Band 41

**Oxidoreduktasen: Von neuen Biokatalysatoren
bis zum fertigen Naturstoff**

D. Dickmann (2021), 274 pp

ISBN: 978-3-95806-573-4

Band 42

**Chemie ohne Grenzen –
Biokatalysatoren und Bororganyle als wertvolle Hilfsmittel
für die zielmolekülorientierte, enantioselektive Synthese**

M. R. Mantel (2021), 487 pp

ISBN: 978-3-95806-585-7

Band 43

**Über tetraolbasierte Allylboronsäureester und deren Potential
in der stereoselektiven Synthese**

P. Ullrich (2022), xii, 324 pp

ISBN: 978-3-95806-618-2

Band 44

**Design, Synthese und Charakterisierung neuartiger *photocaged compounds* –
Optimierte Werkzeuge zur Etablierung wellenlängenselektiver Genexpression**

F. Hogenkamp (2022), V, 456 pp

ISBN: 978-3-95806-637-3

Photocaged compounds sind optochemische Werkzeuge, welche die lichtgesteuerte Freisetzung von biologischen Effektormolekülen mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung ermöglichen. Licht gewährleistet dabei als orthogonaler, externer und einfach regulierbarer Stimulus eine nicht-invasive Steuerung von biologischen Prozessen, wie der Genexpression. Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung und *in vitro* Charakterisierung von neuartigen photolabil-geschützten Induktoren, welche eine simultane, wellenlängenselektive Kontrolle über mehrere, biotechnologisch relevante Promotoren ermöglichen sollen.

Der Fokus lag zunächst auf der Synthese von *photocaged compounds*, welche verbesserte Eigenschaften für die Anwendung in mikrobiellen Organismen aufweisen sollten. Induktoren aus den Molekülklassen der Kohlenhydrate sowie der aliphatischen und der aromatischen Carbonsäuren (Propionsäure bzw. Benzoesäure-Derivate) konnten mit einer photolabilen Schutzgruppe versehen und in einem iterativen Prozess optimiert werden. Bei den photoabspaltbaren Schutzgruppen handelte es sich entweder um Vertreter der *o*-Nitrobenzyl-, (Cumarin-4-yl)methyl- oder Trimethyllock-Chromophore. Die mit *o*-Nitrobenzyl-Derivaten versehenen Induktoren wurden im Hinblick auf eine Belichtung bei 375 nm konzipiert, wohingegen die (Cumarin-4-yl)methyl- und Trimethyllock-geschützten Effektormoleküle für eine Anregung oberhalb von 400 nm entworfen wurden. So konnten erfolgreich eine diverse Bibliothek, bestehend aus 30 photolabil-geschützten Effektormolekülen, dargestellt und ihre relevanten Parameter für eine *in vivo* Anwendung wie Quantenausbeute sowie Löslichkeit und Stabilität in wässrigen Medien bestimmt werden.

Durch eine Kooperation mit M. Sc. *Fabienne Hilgers* (Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Heinrich Heine Universität Düsseldorf) wurde die *in vivo* Anwendbarkeit der synthetisierten *photocaged* Induktoren in Gram-negativen sowie Gram-positiven Bakterien demonstriert. Dabei wurden verschiedene Regulator/Promotor-Systeme unter Verwendung von *photocaged* Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid-, Arabinose- und Salicylsäure-Derivaten erfolgreich lichtgesteuert aktiviert. In *Escherichia coli* konnten die Regulator/Promotor-Kombinationen LacI/P_{T7} , $\text{AraC}/P_{\text{BAD}}$ und $\text{NagR}/P_{\text{nagAa}}$ kontrolliert werden. Des Weiteren wurden im Organismus *Pseudomonas putida* die $\text{LacI}/P_{\text{tac}}$ und $\text{NagR}/P_{\text{nagAa}}$, Systeme sowie die IPTG-induzierbaren Promotoren P_{grac} in *Bacillus subtilis* und P_{T7} im anoxygenen phototrophen Organismus *Rhodobacter capsulatus* lichtgesteuert reguliert. Abschließend konnte in *P. putida* durch Kombination von zwei *photocaged* Induktoren eine lichtgesteuerte wellenlängenselektive Genexpression etabliert und am Beispiel der Biosynthese von Mono- und Di-Rhamnolipiden demonstriert werden.