

**Elektronentransfer durch Oligopeptide:
Synthese und kinetische Untersuchung von Polyprolin-Modellsystemen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines
Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von Diplom-Chemiker

Matthias Napp

aus Stuttgart (Deutschland)

Basel 2004

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel auf
Antrag der Herren Professoren:

Prof. Dr. B. Giese

Prof. Dr. J. Wirz

Basel, den 16. November 2004

Prof. Dr. J. Wirz
(Dekan)

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. B. Giese in der Zeit von November 2000 bis November 2004 am Institut für Organische Chemie der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel durchgeführt.

Teile der Arbeit wurden an folgenden Veranstaltungen vorgestellt:

M. Napp, G. Gramlich, W. Nau, B. Giese *Workshop on Nanoscience*, Twannberg (Schweiz), **2002**.

M. Napp, G. Gramlich, W. Nau, B. Giese *22nd International Symposium on Organic Synthesis and Catalysis*, Falkau (Deutschland), **2002**.

M. Napp, O. Jacques, H. Boudebous, J. Wirz, B. Giese *XX. IUPAC Symposium on Photochemistry*, Granada (Spanien), **2004**.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. B. Giese gilt mein Dank für die interessante Themenstellung, die kritischen und anregenden Diskussionen und seine Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. J. Wirz und seinem Mitarbeiter Hassen Boudebous danke ich für die gute Kooperation bei Planung, Durchführung und Auswertung der gemeinsamen Laserexperimente.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Olivier Jacques und Alexander M. Taylor für die fruchtbare Zusammenarbeit und deren Engagement. Ebenso gilt mein Dank Michael Graber für seine Mitarbeit im Rahmen seiner Diplomarbeit.

Stanislav Ivan danke ich für Durchführung der computergestützten Konformationsanalysen.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Giese danke ich für gute Zusammenarbeit und ein angenehmes Arbeitsklima. Stephan Bürgi und Barbara Carl danke ich für die Überarbeitung des Manuskripts.

Bei Herrn Dr. K. Kulicke, Herrn Dr. H. Nadig und Herrn W. Kirsch aus der analytischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie möchte ich mich für die stete Hilfsbereitschaft und die Durchführung der Analysen bedanken.

*Meinen Eltern und Tina
In Liebe und Dankbarkeit*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Allgemeiner Teil	3
2.1 Adiabatischer Elektronentransfer: Die Marcus-Gleichung	3
2.2 Nichtadiabatischer Elektronentransfer: Die Marcus-Levich-Gleichung	5
2.3 Konzepte zur Untersuchung des Elektronentransfers in Proteinen	6
2.4 Die Reorganisationsenergie λ in Proteinen	10
2.5 Das elektronische Kopplungselement H_{AD}	11
2.6 Elektronentransfer über große Distanzen	14
2.6.1 Der Hopping-Mechanismus	14
2.6.2 Elektronentransfer-Kaskaden in Proteinen	14
2.7 Untersuchung des Elektronentransfers in Modellsystemen	19
2.7.1 Einleitung	19
2.7.2 Elektronentransfer durch Polyprolinverbrückte Modellverbindungen	19
2.8 Zusammenfassung	25
3. Aufgabenstellung	26
4. Spezieller Teil	28
4.1 Selektive Erzeugung von Radikalkationen in Biopolymeren	28
4.1.1 Biologischer Hintergrund	28
4.1.2 Untersuchung zum 4'-DNA-Radikal-Bindungsbruch	29
4.1.3 Photochemie pivaloyl-modifizierter Radikalvorläufer	31
4.2 Erzeugung von Radikalkationen in Peptiden	33
4.2.1 Synthese des <i>tert.</i> -Butylketon-Radikalvorläufers	35
4.2.2 Einleitung	34
4.2.3 Konzept der ortsselektiven Freisetzung positiver Ladung in Peptiden	35
4.3 Versuchsaufbau zur Durchführung zeitaufgelöster Laserexperimente	36
4.4 Aromatische Aminosäuren als Elektronendonoren	38
4.4.1 Synthese der 2,4,6-Trimethoxyphenylalaninderivate	38
4.4.2 Synthese der 2,4,5-Trimethoxyphenylalaninderivate	40
4.4.3 Einleitung	41
4.4.4 Erzeugung aromatischer Radikale und Radikalkationen durch photo-sensibilisierten Elektronentransfer	42

4.4.5 UV-Spektren verschiedener natürlicher und nicht-natürlicher Aminosäuren	45
4.5 Beobachtung des Elektronentransfers in einfachen Donor-Akzeptor-Systemen	48
4.5.1 Synthese der Donor-Akzeptor-Systeme 67 , 68 und 69	48
4.5.2 Einleitung	49
4.5.3 Photolyseexperimente	50
4.5.4 Abhängigkeit von der Lösungsmittelpolarität	51
4.5.5 Bestimmung der Geschwindigkeit des β -Bindungsbruches	53
4.5.6 Kinetische Messungen zur Geschwindigkeit des Elektronentransfers	56
4.5.7 Analyse der Photoprodukte von 67 und 69	58
4.5.8 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	61
4.6 Beobachtung des Elektronentransfers in Oligopeptid-Modellsystemen mit Tyrosin als Elektronendonator	62
4.6.1 Synthese der Oligopeptid-Modellsysteme mit Tyrosin als Elektronendonator	62
4.6.2 Einleitung	63
4.6.3 Photolyseexperimente	64
4.6.4 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	66
4.7 Beobachtung des Elektronentransfers in Oligopeptid-Modellsystemen mit 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin als Elektronendonator	67
4.7.1 Synthese von Oligopeptid-Modellsystemen mit 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin als Elektronendonator	67
4.7.2 Einleitung	67
4.7.3 Photolyseexperimente	68
4.7.4 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	72
4.8 Untersuchung mehrstufiger Elektronentransfer-Prozesse	73
4.8.1 Synthese von Oligopeptid-Modellsystemen mit 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin als intermediärem und Tyrosin als finalem Elektronendonator	73
4.8.2 Einleitung	74
4.8.3 Photolyseexperimente	76
4.8.4 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	87
4.9 Ergänzende Experimente zum Mechanismus der beobachteten mehrstufigen Elektronentransfer-Prozesse	89

4.9.1 Einleitung	89
4.9.2 Synthese von Oligopeptid-Modellsysteme mit 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin als intermediärem und Tyrosin(<i>O</i> -methyl) als finalem Elektronendonator	89
4.9.3 Photolyseexperimente mit der Modellverbindung 120	90
4.9.4 Isotopeneffekt bei der Photolyse von 113	92
4.9.5 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	94
5. Zusammenfassung und Ausblick	95
6. Experimenteller Teil	99
6.1 Messgeräte und Hilfsmittel	99
6.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)	104
6.2.1 AAV1: Amidknüpfung zwischen dem <i>C</i> - und <i>N</i> -Terminus zweier Aminosäuren	104
6.2.2 AAV2: <i>tert.</i> -Butylesterspaltung mit Trifluoressigsäure	104
6.2.3 AAV3: Benzyletherspaltung durch Hydrogenolyse	104
6.2.4 AAV4: Veresterung mit DMAP als Acylierungskatalysator	105
6.2.5 AAV5: Freisetzung <i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl-geschützter Amine mit HCl	105
6.3 Synthese des <i>tert.</i> -Butylketon-Radikalvorläufers 35	106
6.4 Synthese eines Modellsystems mit Tyrosin(<i>O</i> -methyl) als Elektronendonator	113
6.5 Synthese von Oligopeptid-Modellsystemen mit Tyrosin als Elektronendonator	114
6.6 Synthese von 2,4,6-Trimethoxyphenylalaninderivaten	126
6.7 Synthese von 2,4,5-Trimethoxyphenylalaninderivaten	129
6.8 Synthese von Oligopeptid-Modellsystemen mit 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin als Elektronendonator	134
6.9 Synthese von Oligopeptid-Modellsystemen mit 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin als intermediärem und Tyrosin als finalem Elektronendonator	143
6.10 Synthese von Oligopeptid-Modellsystemen mit 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin als intermediärem- und Tyrosin(<i>O</i> -methyl) als finalem Elektronendonator	156
7. Literaturverzeichnis	160
8. Anhang	167

1. Einleitung

Elektronentransfer-Reaktionen sind Schlüsselschritte in einer Vielzahl biologischer Prozesse. So sind im Mitochondrium eukaryontischer Zellen eine Reihe von Proteinen an einer Elektronentransportkette beteiligt, an deren Ende die gespeicherte freie Enthalpie in Form von Adenosintriphosphat fixiert wird.^[1] Auch bei der Photosynthese spielen Elektronentransfer-Reaktionen eine fundamentale Rolle.^[2] Dabei werden Elektronen angeregter Chlorophyllmoleküle über eine Reihe von Akzeptormolekülen weitergeleitet, um elektronische in chemische Energie umzuwandeln.

Bei diesen Transformationen sind es die Anforderungen des Lebens, die enge Rahmenbedingungen für Geschwindigkeit und Selektivität des Elektronentransfers schaffen. Um die katalytische Aktivität von Proteinen unter physiologischen Bedingungen gewährleisten zu können, müssen Elektronen mit hoher Geschwindigkeit ($< \text{ms}$) über Distanzen von mehr als 20 \AA bewegt werden.^[3] Dabei ist die Triebkraft der Reaktionen durch die moderaten Redoxpotentiale der beteiligten Aminosäuren beschränkt, so dass der Elektronentransfer unter Freisetzung geringer Mengen an freier Enthalpie stattfinden muss.

Es stellt sich die Frage, ob die komplexe Struktur der Redoxenzyme für den erfolgreichen Elektronentransfer benötigt wird, und wenn ja, wie die gefalteten Polypeptide die Aufgabe des Ladungstransfers erfüllen. Welche Faktoren regulieren in einem Protein Geschwindigkeit und Selektivität des Elektronentransfers? Wie vermag ein Enzym Elektronen effektiv und mit hoher Geschwindigkeit über eine Entfernung von 35 \AA zu transportieren?^[4] Gibt es Pfade in Redoxenzymen, die durch die Evolution optimiert wurden und entlang derer sich die Elektronen bewegen?^[5] Wie robust verhalten sich diese Elektronentransfer-Pfade in Redoxenzymen gegenüber Mutationen? Oder verläuft der Elektronentransport, ungeachtet der Struktur des Mediums, zwischen Elektronendonator und Akzeptor?^[6]

Die Erforschung dieser Fragen ist eines der aktivsten Felder der Biologie, Chemie und der angrenzenden Teilgebiete. Die Messung der Geschwindigkeit des Elektronentransfers in Proteinen ist ein wichtiges Element bei der Suche nach Antworten auf die offenen Fragen. Dabei sind die Experimente an Proteinen mit großen Problemen verbunden. Durch eine Reihe hochaufgelöster Röntgenstrukturanalysen konnten in jüngster Zeit zwar große Fortschritte bei der Strukturaufklärung vieler Enzyme gemacht werden,^[7] dennoch sind die erhaltenen Versuchsergebnisse aufgrund der komplexen Struktur mit schwer kalkulierbaren Unsicherheiten behaftet.^[8] Zudem sind die Versuche mit einem enormen experimentellen Aufwand verbunden.

Bisher haben sich nur wenige Arbeitsgruppen der großen Herausforderung gestellt und zeitaufgelöste Messungen des Elektronentransfers an Proteinen durchgeführt. Somit steht bis heute nur eine begrenzte Anzahl von Informationen über dieses Phänomen zur Verfügung. Viele Fragen bezüglich des Elektronentransfers in Proteinen blieben unbeantwortet und sind Gegenstand intensiver Diskussionen.^[9]

Es bietet sich an, den Elektronentransfer in vereinfachten Oligopeptid-Modellsystemen zu beobachten. Mit geringerem Aufwand können so bestimmte Fragestellungen isoliert untersucht und ausgewertet werden. Vor diesem Hintergrund wurde in den letzten Jahren eine Reihe von Modellsystemen entwickelt, die es ermöglichen die Kinetik des Elektronentransfers mit hoher Genauigkeit zu bestimmen.^[10-12] Mit Hilfe dieser Modellsysteme konnten wertvolle Erkenntnisse über den Elektronentransfer gewonnen werden. Bei der Untersuchung des Elektronentransfers an größeren Sekundärstruktur-Elementen wurden in jüngster Zeit allerdings auch Probleme deutlich. So wurde deutlich, dass Fluktuationen in der Konformation der Strukturelemente eine Vorhersage der Struktur der Modellsysteme erschwert.^[11, 13] Die Übertragbarkeit der in den Modellsystemen gewonnenen Erkenntnisse auf biologische Systeme muss daher sorgfältig abgewogen werden.

2. Allgemeiner Teil

2.1 Adiabatischer Elektronentransfer: Die Marcus-Gleichung

Die theoretische Behandlung des Elektronentransfers begann mit den Arbeiten von Marcus in den späten 1950er Jahren.^[14, 15] Ausgangspunkt der Beschreibung ist die Theorie des aktivierten Komplexes, in deren allgemeiner Form die beobachtete Geschwindigkeit und die freie Aktivierungsenthalpie ΔG^* des Elektronentransfers in folgendem Verhältnis stehen:

$$k_{\text{ET}} = A \exp\left[\frac{-\Delta G^*}{RT}\right] \quad (2.1).$$

Dabei gibt der präexponentielle Faktor A in Gleichung 2.1 die Grenze der Reaktionsgeschwindigkeit vor. Gemäß der Theorie von Marcus wird ΔG^* von zwei Faktoren bestimmt: ΔG^0 , der freien Standardreaktionsenthalpie und damit der Triebkraft des Elektronentransports und λ , der Reorganisationsenergie. Dabei ist λ die Energie, die man benötigt um die Kernkoordinaten der Reaktanden aus der Gleichgewichtsposition in die Kernkoordinaten der Produkte in der Gleichgewichtsposition zu überführen.

$$k_{\text{ET}} = k_{\text{ET}}(0) \exp\left[\frac{-(\lambda + \Delta G^0)^2}{4\lambda RT}\right] \quad (2.2).$$

In der klassischen Marcus-Gleichung (Gleichung 2.2) wird dabei der Faktor A aus Gleichung 2.1 durch die Geschwindigkeit des aktivierungsfreien ($\Delta G^0 = -\lambda$) Elektronentransfers $k_{\text{ET}}(0)$ ersetzt. Die Variablen, die k_{ET} bestimmen, können in einem Energiediagramm veranschaulicht werden (Abbildung 2.1, S. 4). Dabei wird die potentielle Energie der Reaktanden (R) und der Produkte (P) gegen die Kernkoordinaten der Elektronentransfer-Reaktion aufgetragen.

Die aufgetragene potentielle Energie ergibt sich aus der Gesamtenergie des Systems als Funktion der Kernkoordinaten der reagierenden Redoxzentren und der Kerne des umgebenden Mediums. Die potentielle Energie wird in einer Näherung als harmonisches Potential beschrieben, das sich durch eine Auslenkung der Kernkoordinaten entlang der X-Achse ergibt.

Beim Elektronentransfer kommt es zur Übertragung eines Elektrons von der Potentialenergiekurve der Reaktanden zu der der Produkte. Das Franck-Condon-Prinzip besagt dazu, dass sich im Verlauf eines elektronischen Übergangs die Kernkoordinaten nicht verändern.

Diese Forderung an den Elektronentransfer ist im Fall der klassischen Beschreibung durch die Marcus-Theorie am Schnittpunkt der Parabeln (Kernkoordinaten Q^* in Abbildung 2.1) erfüllt. Dabei kommt es nach der klassischen Marcus-Theorie immer zur Übertragung eines Elektrons, wenn dieser Übergangszustand durchschritten wird. Man spricht in diesem Fall von einem elektronisch-adiabatischen Prozess.

Die Höhe der Aktivierungsbarriere (ΔG^*) wird gemäß der Theorie von Marcus durch die vertikale sowie die horizontale Orientierung der harmonischen Potentiale der Reaktanden und Produkte bestimmt. Die Triebkraft der Reaktion (ΔG^0) bestimmt die vertikale Orientierung der Parabeln, wohingegen die Reorganisationsenergie λ die horizontale Versetzung beschreibt. So führt eine Reduzierung der Triebkraft (bei $\lambda = \text{const.}$) zu einer Erhöhung von ΔG^* und damit zu einer Absenkung von k_{ET} . Analog führt auch die Erhöhung von λ durch eine horizontale Verschiebung der Parabeln zu einem Anstieg von ΔG^* .

Eine der großen Stärken der Marcus-Theorie liegt in der Vorhersage einer „inversen Marcus-Region“, in der die Geschwindigkeit des Elektronentransports abfällt trotz eines Anstiegs der Triebkraft. Dieses Phänomen tritt auf, wenn die Triebkraft der Reaktion über die Reorganisationsenergie hinauswächst ($-\Delta G > \lambda$, Abbildung 2.2).

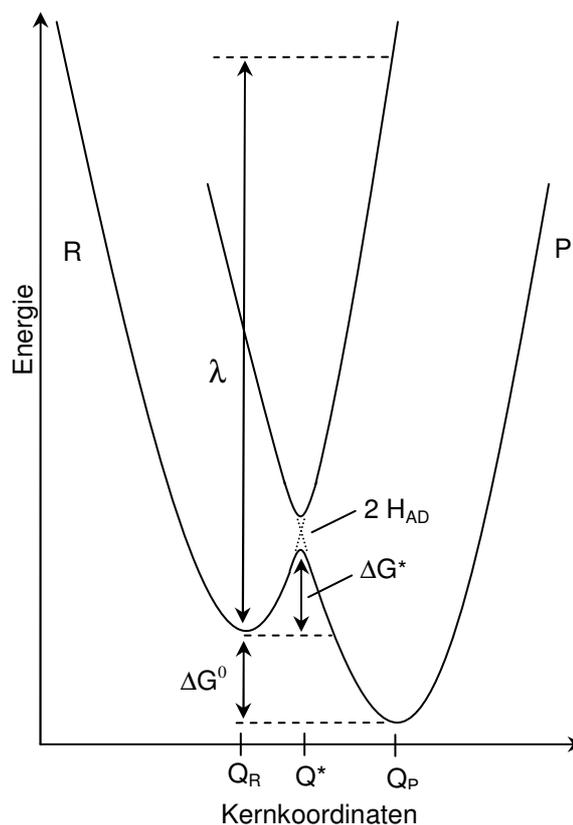


Abbildung 2.1: Harmonische Potentiale der Reaktanden (R) und Produkte (P) als Funktion der Kernkoordinaten Q .

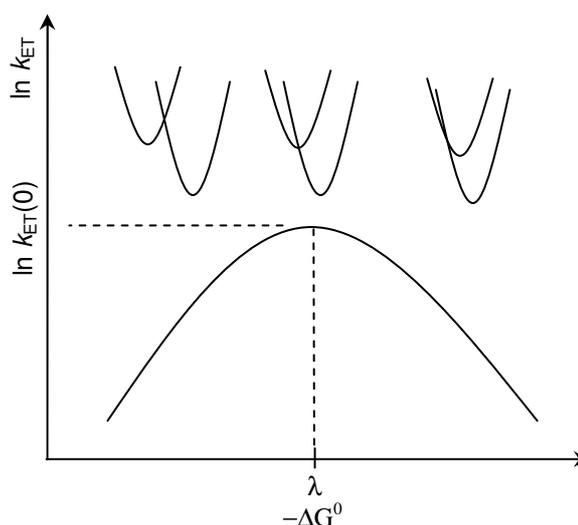


Abbildung 2.2: Abhängigkeit der Geschwindigkeit des Elektronentransfers von der Triebkraft ΔG^0 .

2.2 Nichtadiabatischer Elektronentransfer: Die Marcus-Levich-Gleichung

In der klassischen Marcus-Theorie erfährt der Elektronentransfer keine Distanzabhängigkeit. In Gleichung 2.2 findet eine Reaktion mit der maximalen Geschwindigkeit $k_{\text{ET}}(0)$ statt, wenn die beiden Redoxpartner in direkten Kontakt miteinander treten. Muss ein Elektron über eine längere Distanz transportiert werden, so tunnelt es. Die Effizienz des Elektronentransfers ist dabei abhängig von der Überlappung der Wellenfunktionen des Donors und des Akzeptors. Da die Wellenfunktionen exponentiell mit der Distanz abklingen, ist es einleuchtend, dass k_{ET} exponentiell mit dem Abstand r_{DA} abnimmt. Eine schematische Darstellung der Wellenfunktionen zweier Redoxzentren im Abstand r_{DA} ist in Abbildung 2.3 wiedergegeben.

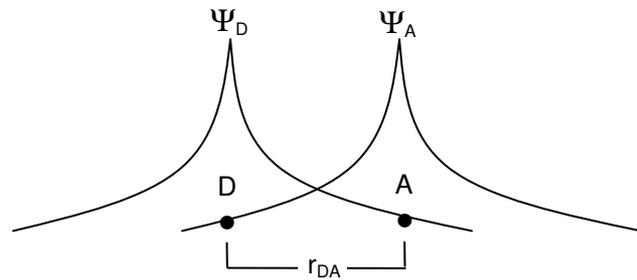


Abbildung 2.3: Wellenfunktion eines Elektrons am Donor und Akzeptor im Abstand r_{DA} .

Die Erweiterung der klassischen Marcus-Theorie um den Formalismus eines tunnelnden Elektrons durch eine Potentialbarriere wurde von Levich durchgeführt.^[16] Die Tunnelwahrscheinlichkeit H_{AD}^2 ist dabei definiert durch das elektronische Kopplungselement

$$H_{\text{AD}} = H_{\text{AD}}^0 e^{-\beta(r_{\text{DA}} - r_0)} \quad (2.3),$$

wobei r_0 den Abstand der Mittelpunkte des Donor-Akzeptor-Paars im direkten Kontakt beschreibt. β ist eine Konstante, die im übertragenen Sinn die Stärke des exponentiellen Abfalls der Wellenfunktion beschreibt.

Die Kombination der klassischen Marcus-Theorie mit Levichs Konzept des tunnelnden Elektrons liefert die Marcus-Levich-Gleichung

$$k_{\text{ET}} = \sqrt{\frac{4\pi^3}{h^2 \lambda k_{\text{B}} T}} H_{\text{AD}}^2 \exp\left[\frac{-(\lambda + \Delta G^0)^2}{4\lambda RT}\right] \quad (2.4).$$

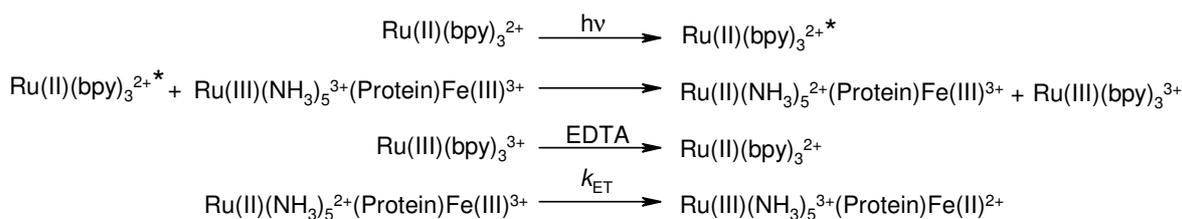
Die Gleichung 2.4 ist der allgemein anerkannte Ausdruck zur Beschreibung des Elektronentransfers zwischen zwei Redoxzentren in einem festgelegten Abstand. Dabei ist der präexponentielle Faktor $k_{\text{ET}}(0)$ aus Gleichung 2.2 (S. 3) durch den Umfang der Orbitalüberlappung begrenzt. Unter diesen Voraussetzungen muss der Übergangszustand mehrfach erreicht werden, bevor ein Elektronentransfer stattfinden kann. Man spricht in diesem Fall von einem elektronisch-nichtadiabatischen Prozess.

2.3 Konzepte zur Untersuchung des Elektronentransfers in Proteinen

Untersuchungen des Elektronentransfers in Proteinen sind im Allgemeinen mit großem experimentellem Aufwand verbunden. In den letzten zwanzig Jahren konnte nur eine kleine Anzahl von Konzepten entwickelt werden, die der Komplexität der Fragestellung gerecht wurde. Dabei gelang es unter Einbeziehung der Sekundär- und Tertiärstruktur Redoxcofaktoren in definiertem Abstand zueinander zu positionieren. In vielen Fällen wurde der Elektronentransfer photochemisch eingeleitet, wodurch die Folgereaktionen in einem großen Zeitfenster beobachtet werden konnte. Die Strategien zur Untersuchung des Ladungstransfers in Proteinen können in drei Kategorien unterteilt werden:

Ruthenium-modifizierte Metalloproteine:

Dieser Ansatz umfasst die kovalente Verknüpfung eines Ruthenium-Komplexes an eine Polypeptidseitenkette eines Metalloproteins. Dabei macht man sich die Bindungsaffinität von Ruthenium-Ionen gegenüber Stickstoff-Heterocyclen zunutze. So ist es möglich, an der Oberfläche von Proteinen selektiv die Aminosäure Histidin mit einem Ruthenium-Komplex zu modifizieren. In den ersten Experimenten gelang es, Histidin-33 in Cytochrom *c* mit $\text{Ru(III)(NH}_3)_5^{3+}$ zu verknüpfen.^[17, 18] Bei den anschließenden Untersuchungen erhielt der $\text{Ru(III)(NH}_3)_5(\text{His-33})^{3+}$ -Komplex ein Elektron von photochemisch angeregtem $\text{Ru(II)(bpy)}_3^{2+*}$ (bpy = 2,2'-Bipyridin, Schema 2.1).



Schema 2.1: Schematische Darstellung des Reaktionsgeschehens bei der Untersuchung der Geschwindigkeit des Elektronentransfers (k_{ET}) in $\text{Ru(II)(NH}_3)_5(\text{His-33})$ -Ferricytochrom *c*.

Das oxidierte $\text{Ru(III)(bpy)}_3^{3+}$ wurde mit einem Elektronendonator (EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure) irreversibel abgefangen, um einen Elektronenrücktransfer vom photoreduzierten Enzym zu verhindern. Mit Hilfe der Transienten-Absorptions-Spektroskopie konnte der Elektronentransfer zwischen dem reduzierten $\text{Ru(II)(NH}_3)_5(\text{His-33})^{2+}$ -Komplex und dem Fe(III)^{3+} -Ion im Zentrum von Ferricytochrom *c* beobachtet werden.^[19]

Durch die bimolekulare Aktivierung mit einem externen Elektronendonator können keine intramolekularen Elektronentransfer-Reaktionen gemessen werden, die schneller als 10^4 s^{-1} ablaufen. Die Entwicklung der „flash-quench“-Methode konnte hier Abhilfe schaffen. Dabei wurden Metalloproteine direkt mit photoaktiven Ruthenium(II)-Komplexen verknüpft. So gelang es Gray *et al.* Histidin-33 in Cytochrom *c* als $\text{Ru(II)(bpy)}_2(\text{im})(\text{His-33})^{2+}$ zu modifizieren (im = Imidazol, Abbildung 2.4).^[3, 20]

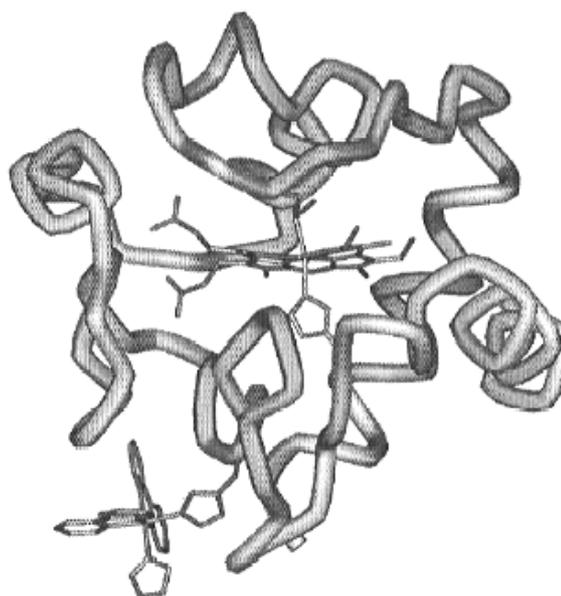
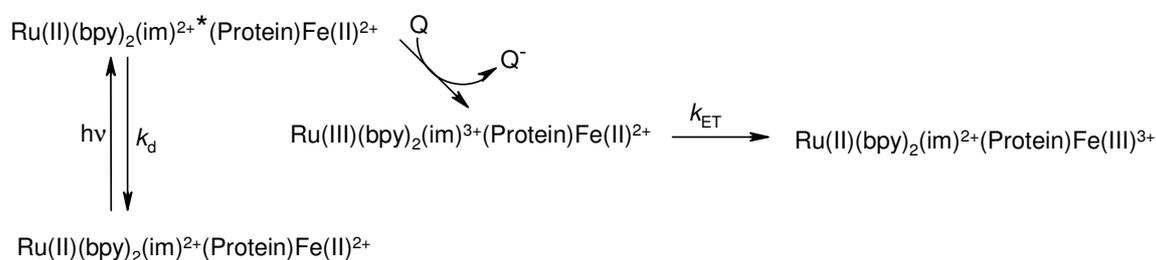


Abbildung 2.4: Modell der Struktur von $\text{Ru(II)(bpy)}_2(\text{im})(\text{His-33})$ -cytochrom *c*.

Hier wurde der angeregte Zustand des gebundenen Ru(II) -Komplexes durch Laser-Flash-Photolyse direkt an der Oberfläche des Enzyms erzeugt. Mit Hilfe von $\text{Ru(III)(NH}_3)_6^{3+}$ konnte dieser angeregte Zustand in einer bimolekularen Reaktion oxidiert werden (Schema 2.2).



Schema 2.2: Die „flash-quench“-Methode am Beispiel der Reaktionssequenz von $\text{Ru(bpy)}_2(\text{im})(\text{His-33})$ -Cytochrom *c* ($\text{Q} = \text{Ru(III)(NH}_3)_6^{3+}$).

Mit Hilfe der Transienten-Spektroskopie konnte die Geschwindigkeit des anschließenden Elektronentransfers vom Fe(II) -Zentrum zum Ru(III) -Komplex bestimmt werden. Durch den Einsatz von *p*-Methoxy-*N,N*-dimethylanilin war es möglich, den angeregten Zustand von $\text{Ru(II)(bpy)}_2(\text{im})(\text{His-33})^{2+}$ auch oxidativ zum Ru(I) -Komplex abzufangen. Dabei bietet sich die Möglichkeit, den Ladungstransport in Richtung des Fe(III) -Zentrums der oxidierten Form des Cytochrom *c* zu beobachten.^[20]

Es wurde festgestellt, dass der bimolekulare Elektronenrücktransport zum Ru(III) -Zentrum bzw. vom Ru(I) -Zentrum im Allgemeinen langsamer verläuft als der intramolekulare

Elektronentransfer im Cytochrom *c*. Die „flash-quench“-Methode bietet dadurch ein großes Zeitfenster zur Untersuchung von Elektronentransfer-Reaktionen. Kommen irreversible Abfangreagenzien zum Einsatz, können Prozesse im Zeitrahmen von Picosekunden bis Sekunden gemessen werden.

Seit den ersten Untersuchungen an Cytochrom *c* wurden zahlreiche weitere Experimente an Ru-modifizierten Proteinen durchgeführt. Dazu gehören Messungen an den Häm-Proteinen Myoglobin^[21-23] und Cytochrom *b*₅^[24] sowie an den Kupferproteinen Azurin^[25-28] und Plastocyanin^[29, 30].

Dabei konnte durch genetische Manipulation die Verankerungsposition des Ruthenium-Komplexes an der Oberfläche der Enzyme systematisch verändert und somit die Distanzabhängigkeit des Elektronentransfers erforscht werden. Die Änderung der Polypyridinliganden ermöglichte eine Variation im Reduktionspotential der Ruthenium-Komplexe. Dadurch bot sich die Möglichkeit, den Einfluss unterschiedlicher Triebkraft auf den Elektronentransfer zu untersuchen.^[3, 19]

Protein-Protein-Elektronentransfer:

Der Elektronentransfer zwischen Häm-Proteinen spielt eine große Rolle in der Atmungskette.^[1] Mit Hilfe photoinduzierter Reaktionen Ruthenium-modifizierter Proteine konnten wichtige Erkenntnisse zum Elektronentransfer zwischen Cytochrom *b*₅ / Cytochrom *c*,^[31] Cytochrom *c* / Cytochrom *c* Peroxydase,^[32] Cytochrom *c* / Zn-Cytochrom *c*^[33] und Cytochrom *c* / Cytochrom Oxidase Komplexen^[34] gewonnen werden.

Im Fall des Cytochrom *b*₅ / Cytochrom *c* Komplexes wurde Cytochrom *b*₅ mit einem Ruthenium(II)-bipyridin-Komplex versehen (Abbildung 2.5).^[35] Die Anregung des Ru(II)-Komplexes durch einen Laserblitz lieferte nach photoinduziertem Elektronentransfer

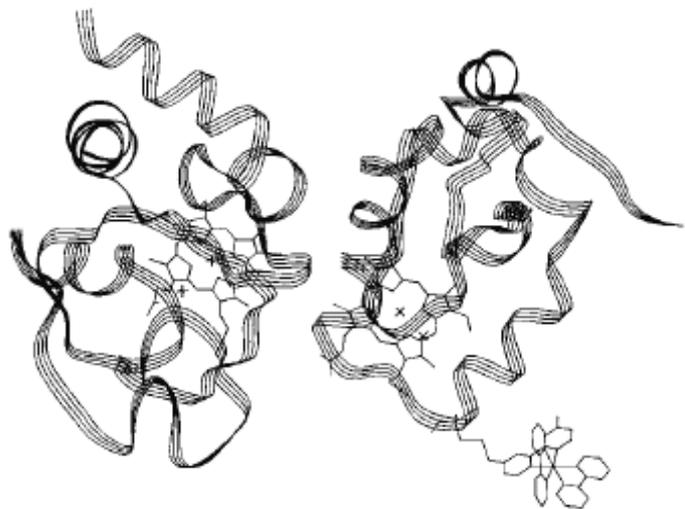
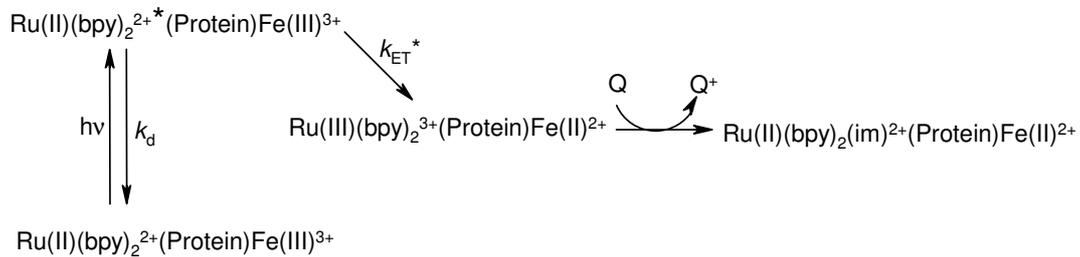


Abbildung 2.5: Komplex aus Cytochrom *c* (links) und Ru-modifiziertem Cytochrom *b*₅.

und Reduktion durch einen externen Elektronendonator die vollständig reduzierte Form von Cytochrom b_5 (Schema 2.3). Durch diese Vorgehensweise ist es möglich, innerhalb von wenigen Mikrosekunden Cytochrom b_5 mit einem Fe(II)-Zentrum zu generieren.



Schema 2.3: Photoinduzierte Reduktion von Ru-modifiziertem Cytochrom b_5 in Gegenwart eines externen Elektronendonors (Q = Anilin).

Ist in der bestrahlten Lösung Fe(III)-Cytochrom c vorhanden, so kann der Elektronentransfer zwischen den Fe-Zentren im Fe(II)-Cytochrom b_5 / Fe(III)-Cytochrom c Komplex gemessen werden.^[35]

Cofaktor-Modifikation in Proteinen:

Diese Methode zur Untersuchung des Elektronentransfers in Proteinen basiert auf der systematischen Veränderung eines Cofaktors in einer Kaskade verschiedener Cofaktoren eines Proteins oder Enzyms. Ein typisches Beispiel sind die Untersuchungen an der Elektronen-Transportkette im photosynthetischen Reaktionszentrum von Purpurbakterien.^[36] Hier wurden die Elektronencarrier Menachinon (Q_A) und Ubichinon (Q_B) durch eine Reihe anderer Quinone mit unterschiedlichen Reduktionspotentialen ersetzt. Der Elektronentransfer im bakteriellen photosynthetischen Reaktionszentrum konnte so bei unterschiedlicher Triebkraft untersucht werden.

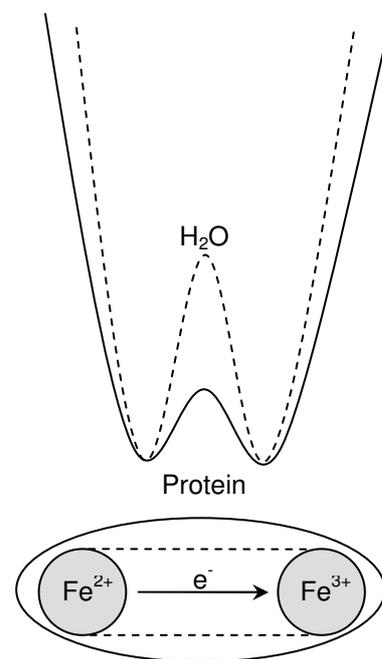
2.4 Die Reorganisationsenergie λ in Proteinen

Nach der semiklassischen Beschreibung durch die Marcus-Levich-Gleichung (Gleichung 2.4, S. 5) wird die Geschwindigkeit des Elektronentransfers durch die freie Standardreaktionsenthalpie ΔG^0 , die Temperatur T und die Reorganisationsenergie λ bestimmt. Dabei gilt:

$$\lambda = \lambda_i + \lambda_o \quad (2.5)$$

wobei λ_i die innere Reorganisationsenergie darstellt und die energetischen Veränderungen von Donor und Akzeptor durch Bindungsstreckung / -stauchung oder Bindungswinkel-Deformationen wiedergibt. λ_o stellt die äußere Reorganisationsenergie dar. Diese beschreibt die Veränderung der elektrostatischen Umgebung der Reaktanden durch das umgebende Medium. So ist bei dem Elektronentransfer zwischen einem Fe(II)^{2+} - und einem Fe(III)^{3+} -Ion in wässrigem Medium eine Reorganisationsenergie von 2.7 eV aufzubringen. Der Hauptteil der Reorganisationsenergie (1.5 eV) wird dabei der Veränderung der Fe-O Bindungslängen in den beiden Hexaqua-Komplexen zugeschrieben. Die restlichen 1.2 eV werden durch die Repolarisation des umgebenden Lösungsmittels verursacht. Durch die hohe Reorganisationsenergie läuft der Elektronentransfer beim Kontakt der beiden Ionen in der Größenordnung von 30 ms ab. Damit wird klar, dass der Elektronentransfer zwischen solvatisierten Metallionen auch über kleine Distanzen nicht den Ansprüchen biologischer Prozesse gerecht wird. Um die Reorganisationsenergie zu reduzieren, müssen Enzyme ihre Redoxzentren in hydrophober Umgebung von Wasser fernhalten. So ist es möglich, die Reorganisation um den Faktor drei zu reduzieren und dadurch k_{ET} um rund sieben Größenordnungen zu erhöhen (Schema 2.4).^[9]

Die Reorganisationsenergie λ kann in Proteinen durch zwei Methoden ermittelt werden. Die Messung von k_{ET} bei unterschiedlicher Triebkraft ΔG^0 liefert eine Marcus-Kurve (Abbildung 2.2, S.4), aus der man λ ermitteln kann. Ist die Temperaturabhängigkeit von ΔG^0



Schema 2.4: Reaktionsenthalpie beim Elektronentransfer zwischen Fe^{2+} und Fe^{3+} in wässriger Lösung und im Protein.

bekannt, kann auch über die Temperaturabhängigkeit von k_{ET} die Reorganisationsenergie bestimmt werden. Die verlässlichsten Werte von λ wurden in Ruthenium-modifizierten Metalloproteinen bestimmt. Dazu wurden Enzyme an der gleichen Position mit verschiedenen Ru-Komplexen verknüpft. Durch unterschiedliche Polypyridin-Ligandensysteme wurden die Potentiale der Ru-Komplexe und damit ΔG^0 des Elektronentransfers variiert. Die so zugänglichen Werte für λ werden dabei zum größten Teil der Reorganisation des Enzyms und des umgebenden Lösungsmittels zugesprochen, da sich die Geometrie der Ru-Modifikation im Verlauf der Elektronentransfer-Reaktion kaum verändert.^[35]

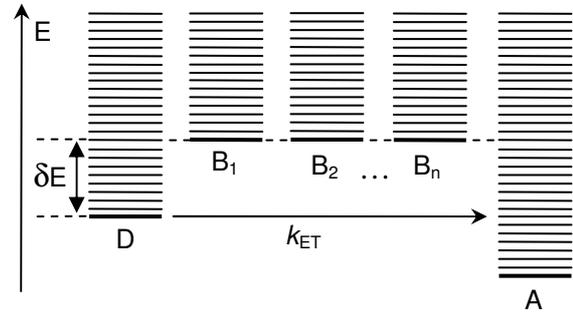
Bei Messungen in Cytochrom *c*, Azurin, Plastocyanin, HiPIP und dem bakteriellen photosynthetischen Reaktionszentrum wurde festgestellt, dass die Werte für $\lambda = 0.7 \pm 0.1$ eV betragen.^[5, 37, 38] Dabei ist bemerkenswert, dass die untersuchten Proteine trotz unterschiedlicher Struktur und Funktion ähnliche Reorganisationsenergien besitzen.

2.5 Das elektronische Kopplungselement H_{AD}

Bei der Beschreibung des nichtadiabatischen Elektronentransfers wird k_{ET} durch das Kopplungselement H_{AD} bestimmt (Gleichung 2.3, S. 5). H_{AD} fällt dabei exponentiell mit der Distanz der Reaktanden ab. Der Umfang der Distanzabhängigkeit des elektronischen Kopplungselements hängt von der Größe β ab. Tunnelt ein Elektron durch eine Potentialbarriere, ist β ein Maß für die Höhe der Barriere. β wird vom Medium zwischen den Redoxzentren bestimmt und ist für den Elektronentransfer über größere Distanzen von enormer Bedeutung. Der β -Wert im Vakuum wird mit 3.5 \AA^{-1} angenommen. Unter diesen Voraussetzungen würde der Elektronentransfer zwischen dem Fe(II)^{2+} - und dem Fe(III)^{3+} -Ion aus Schema 2.4 (S. 10) über die biologisch relevante Distanz von 20 \AA im Vakuum 10^{17} Jahre dauern.^[39] Findet die Reaktion in Wasser statt ($\beta = 1.68 \text{ \AA}^{-1}$), so beobachtet man eine drastische Beschleunigung des Elektronentransfers ($3 \cdot 10^3$ Jahre), wobei die Geschwindigkeit immer noch nicht den biologischen Anforderungen entspricht.^[9] Es wird klar, dass das Protein neben der Erniedrigung der Reorganisationsenergie zudem die elektronische Wechselwirkung der Redoxzentren erhöhen muss. Wie dieses Phänomen zu beschreiben ist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Dabei werden verschiedene Konzepte unterschieden:

Superaustausch-Mechanismus

Dieser Ansatz wurde von McConnell entwickelt, um den Elektronentransport zwischen einem Donor (D) und einem Akzeptor (A) zu beschreiben, die durch eine Brücke (B) aus identischen Untereinheiten (B_n) voneinander getrennt sind (Schema 2.5).^[40] Dabei tunnelt das Elektron durch die Brücke ohne Ausbildung von Intermediaten. Das gesamte Kopplungselement H_{AD} wird beim Superaustausch-Mechanismus durch das Produkt der Abklingkonstanten (ϵ) der identischen Brückenuntereinheiten beschrieben und ist vom Energieabstand (δE) der Brückenwellenfunktion abhängig.



Schema 2.5: Energieniveau-Diagramm für den Superaustausch-Mechanismus.

Tunnel-Pfad-Mechanismus

Der Ansatz einer homogenen Brücke ist auf Proteine nicht übertragbar. Um der komplexen Struktur von Proteinen Rechnung zu tragen, wurde daher von Beratan und Mitarbeitern der Tunnel-Pfad-Mechanismus entwickelt.^[41, 42] Dabei werden die Kontakte im Protein unterteilt in kovalente Bindungen, Wasserstoffbrücken-Bindungen und durch-den-Raum Kontakte. Jedem dieser Kontakte wird eine Abklingkonstante zugeordnet (ϵ_C , ϵ_H , ϵ_S). Das gesamte Kopplungselement H_{AD} ergibt sich dabei aus den Produkten

$$H_{AD} \propto \prod \epsilon_C \prod \epsilon_H \prod \epsilon_S \quad (2.6).$$

Diese Vorstellung ermöglicht die computergestützte Suche nach einem optimalen Pfad für den Elektronentransfer durch ein Protein. Darüber hinaus gelang es mit Hilfe der Gleichung 2.6 unter Berücksichtigung struktureller Gegebenheiten β -Werte für Sekundärstrukturelemente in Proteinen zu berechnen (Tabelle 2.1).

	$\beta / \text{\AA}^{-1}$
Gray <i>et. al.</i> beobachteten bei der Untersuchung von Ru-modifizierten Proteinen, dass fast alle Elektronentransfer-Prozesse in einen Bereich fallen, der durch die vorhergesagte Distanzabhängigkeit	
β -Faltblatt-Strang	1.00
α -Helix (mit H-Brücken)	1.26
α -Helix (ohne H-Brücken)	1.97

Tabelle 2.1: Berechnete β -Werte nach dem Tunnel-Pfad-Mechanismus.

des β -Faltblatts und der α -Helix (mit H-Brücken) beschrieben werden kann.^[3] Dieser Sachverhalt zeigt aus ihrer Sicht, dass der Tunnel-Prozess in Proteinen durch das σ -Bindungsgerüst des Peptids vermittelt wird.^[43]

Modell der universellen Barriere

Dutton *et al.* bemängeln an der Vorstellung eines optimierten Pfads für den Elektronentransfer die daraus resultierende fehlende Flexibilität der Redoxenzyme gegenüber Veränderungen. Die Mutation einer Aminosäure könnte die Funktion des gesamten Enzyms stark beeinträchtigen. In Experimenten konnte hingegen gezeigt werden, dass sich Redoxenzyme gegenüber strukturellen Veränderungen relativ robust verhalten. Dutton schlägt vielmehr eine universelle Barriere für das tunnelnde Elektron im Protein vor. In Experimenten stellte er fest, dass die Elektronentransfer-Prozesse in einer Polypeptid-Matrix im Allgemeinen mit einem universellen β -Wert von 1.4 \AA^{-1} beschrieben werden können.^[38]

Erweitertes Modell der universellen Barriere

In jüngster Zeit erfuhr das Modell der universellen Barriere einige Modifikationen. So wurden auch bei diesem Ansatz Informationen über die Proteinstruktur implementiert. Bei der Abschätzung der Tunnelgeschwindigkeit wurde die Packungsdichte (ρ) der Proteinatome im Volumen zwischen den Redoxzentren berücksichtigt. Der nach der Packungsdichte ρ gewichtete β -Wert ergibt sich als

$$\beta = (\rho) 0.9 \text{ \AA}^{-1} + (1 - \rho) 2.8 \text{ \AA}^{-1} \quad (2.7).$$

Im Fall der dichtesten Packung ($\rho = 1$) wird dabei ein β -Wert von 0.9 \AA^{-1} angenommen, wohingegen bei $\rho = 0$ der β -Wert mit 2.8 \AA^{-1} abgeschätzt wird (Schema 2.6).^[6]

	$\beta / \text{\AA}^{-1}$	Barriere / eV	ρ
durch Atome	0.9	0.8	1
durch Proteine	1.4	2	0.75
durch Vakuum	2.8	8	0

Schema 2.6: Tabellarische Darstellung der Größe β und der Höhe der Potentialbarriere in Abhängigkeit von der Packungsdichte ρ nach Dutton *et al.*

Dutton *et al.* konnten zeigen, dass sich die Packungsdichte ρ für Redoxenzyme im Mittel bei 0.76 ± 0.10 bewegt, wodurch sich ein β -Wert von $1.39 \pm 0.15 \text{ \AA}^{-1}$ ergibt. Nach seiner Argumentation sind Enzyme nicht an einem optimalen Tunnel-Pfad interessiert. Stattdessen sind gemäß seinen Untersuchungen in Enzymen die Redoxzentren selten weiter als 14 \AA voneinander getrennt. So kann ein schneller Elektronentransfer bei gleichzeitiger struktureller Widerstandsfähigkeit gegenüber Mutationen realisiert werden.^[44]

Neben den Auseinandersetzungen über die theoretische Beschreibung des Elektronentransports in einer Protein-Matrix treten in der allgemeinen Diskussion aber noch weitere Unstimmigkeiten auf. So gibt es Probleme bei einer allgemeingültigen Definition des Abstandes zwischen zwei Redoxzentren. Zum Teil wird auch die Qualität der strukturellen Information der untersuchten Enzyme in Frage gestellt.^[8] Wegen der Distanzabhängigkeit von λ ist es zudem erforderlich, zum Vergleich der Werte β im Maximum der Marcus-Kurve (Abbildung 2.2, S. 4) zu messen. Dies wird aufgrund des hohen Aufwands allerdings nicht immer konsequent durchgeführt.^[45]

2.6 Elektronentransfer über große Distanzen

2.6.1 Der Hopping-Mechanismus

Tunnel-Pfad-Mechanismus oder universelle Barriere? Diese kontrovers diskutierte Frage sollte nicht darüber hinwegtäuschen, dass das Konzept des Superaustauschs und die daraus resultierenden Theorien noch nicht ausreichen, um die in jüngster Zeit beobachteten Phänomene beim Elektronentransfer in biologischen Systemen zu erklären. Mit der Erweiterung der bisher vorgestellten Konzepte zur Beschreibung des weitreichenden Elektronentransfers beschäftigt sich das folgende Kapitel.

Neben den Untersuchungen des Ladungstransports in Proteinen beobachtete man in den letzten Jahren auch ein großes Interesse am Elektronentransfer durch DNA. Durch Arbeiten von Giese,^[46-49] Lewis und Schuster^[9, 50], sowie Barton^[51-53] konnten wichtige Erkenntnisse im diesem Bereich gewonnen werden. Es wurde festgestellt, dass effektiver Elektronentransfer in DNA über Distanzen von 54 \AA und mehr beobachtet werden kann.^[54, 55]

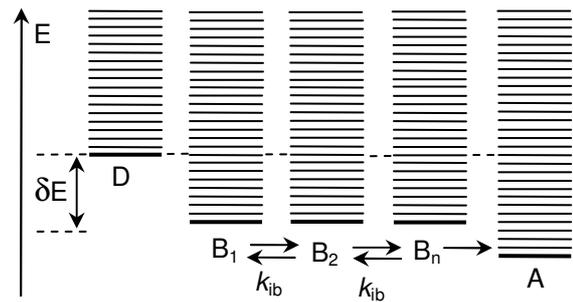
Dies kann mit dem einstufigen Superaustausch-Mechanismus nicht mehr in Einklang gebracht werden. Bei den Studien wurde beobachtet, dass die Effizienz des Ladungstransports in einem direkten Verhältnis zur Anzahl an Guaninbasen im untersuchten Strang steht. Diese Erkenntnis führte zu dem Vorschlag, dass der Elektronentransfer in DNA durch Hüpfen der Ladung über Guaninbasen realisiert

wird.^[49, 56, 57] Diese Vorstellung wurde kürzlich durch das Hüpfen der Ladung über Adeninbasen erweitert.^[46] Im Gegensatz zum Superaustausch-Mechanismus ist beim Hopping-Mechanismus die Ladung auf dem Weg vom Donor (D) zum Akzeptor (A) tatsächlich auf den Brückenelementen (B_n) lokalisiert (Schema 2.7). Durch die Einbeziehung geeigneter Relaisstationen kann die Überlappung der Wellenfunktion stark verbessert werden. Aufgrund der verbesserten elektronischen Wechselwirkung erfährt die Geschwindigkeit des Elektronentransfers (k_{ET}) eine erhebliche Beschleunigung. Nach Jortner und Bixon wird k_{ET} entsprechend folgender Beziehung beschrieben.^[58, 59]

$$k_{ET} \propto k_{ib} n^{-\eta} \quad (2.8).$$

Dabei wird die exponentielle Distanzabhängigkeit aus Gleichung 2.4 (S. 5) durch eine algebraische Abhängigkeit von der Anzahl der Hopping-Schritte (n) ersetzt. Die Größe k_{ib} ist die Transfargeschwindigkeit zwischen den Relaisstationen (B_n), wohingegen die Konstante η Werte zwischen eins und zwei annehmen kann. Beim Hopping-Mechanismus wird die Gesamtgeschwindigkeit k_{ET} durch die Geschwindigkeit des langsamsten Hopping-Schritts bestimmt.^[60]

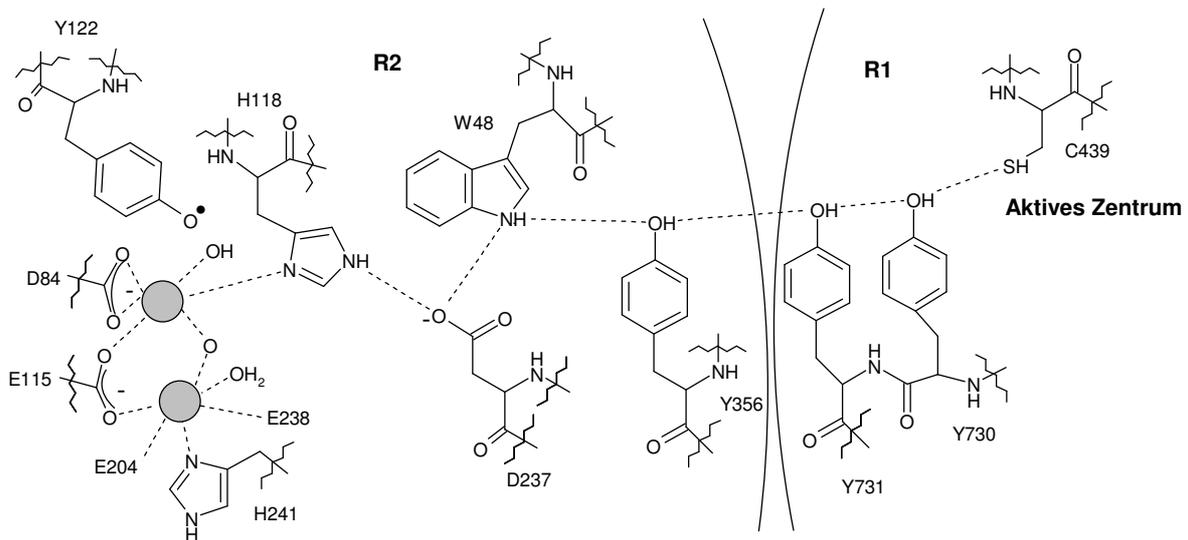
Ob die Ladung in einem Schritt zwischen Donor und Akzeptor tunnelt (Superaustausch-Mechanismus) oder über geeignete Relaisstationen hüpfert (Hopping-Mechanismus), wird durch die energetischen Verhältnisse zwischen Donor, Akzeptor und dem verbrückenden Medium bestimmt.



Schema 2.7: Energieniveau-Diagramm für den Hopping-Mechanismus.

2.6.2 Elektronentransfer-Kaskaden in Proteinen

In jüngster Zeit wird auch die Beteiligung des Hopping-Mechanismus beim weitreichenden Elektronentransfer in Proteinen diskutiert. Eines der prominentesten Beispiele für den Hopping-Mechanismus in Enzymen ist die Ribonucleotid-Reduktase (RNR).^[61, 62] RNR katalysiert die Reduktion von Ribonucleosid-Diphosphaten zu Desoxyribonucleosid-Diphosphaten. In *Escherichia coli* besteht das Enzym aus zwei homodimeren Untereinheiten: R1 und R2. Die Untereinheit R1 bindet an das Substrat und enthält die für die Umsetzung des Substrats essentielle Cystein-Seitenkette C439. R2 beherbergt in der aktiven Form des Enzyms einen Dieisen(III)-Tyrosylradikal-Cofaktor. Bei der radikalischen Aktivierung des Enzyms erzeugt das Tyrosylradikal Y122[•] aus der Untereinheit R2 ein Tyrosylradikal in Position C439 der Untereinheit R1 (Schema 2.8).^[4]

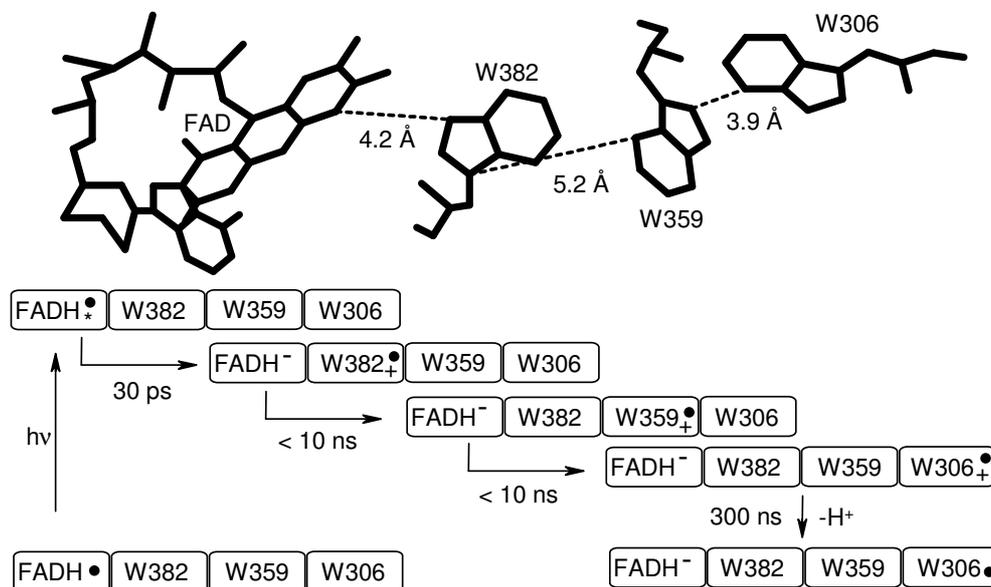


Schema 2.8: Die am vorgeschlagenen Elektronentransfer-Pfad zwischen den Untereinheiten R1 und R2 der RNR beteiligten Aminosäuren.

An einem Modell der RNR konnte abgeschätzt werden, dass die beiden Aminosäuren 35 Å voneinander getrennt sind.^[7] Der Superaustausch-Mechanismus sagt für eine solche Distanz eine extrem langsame Geschwindigkeit des Elektronentransfers voraus ($\sim 6 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, bei $\beta = 1.2 \text{ \AA}^{-1}$).^[4] Die bei der RNR gemessene Umsatzgeschwindigkeit beträgt allerdings 10 s^{-1} . Dieser Sachverhalt legt nahe, dass der Elektronentransfer unter beschleunigender Beteiligung radikalischer Zwischenstufen abläuft. Auf der Basis der Kristallstrukturen von R1 und R2 wurde der in Schema 2.8 dargestellte Elektronentransfer-Pfad vorgeschlagen.^[7] Für die Oxidation von C439 durch das Tyrosylradikal Y122[•] wird ein Protonen-gekoppelter

Elektronentransfer vorgeschlagen, da das Tyrosylradikal aufgrund seines Redoxpotentials nicht in der Lage ist, Cystein zu oxidieren $\{E_{\text{ox}}[\text{Tyr}(\text{O}^-)/\text{Tyr}(\text{O}^\bullet)] = 0.65 \text{ V (NHE)}, E_{\text{ox}}[\text{Cys}(\text{SH})/\text{Cys}(\text{S}^\bullet)] = 1.33 \text{ V (NHE)}\}$.^[4] Es wird daher angenommen, dass RNR die Redoxigenschaften der beteiligten Aminosäuren durch den Protonierungszustand moduliert.^[63]

Ein weiteres gut untersuchtes Enzym, bei dem der Elektronentransfer über eine große Distanz unter Beteiligung aromatischer Aminosäuren diskutiert wird, ist die DNA-Photolyase.^[64] Dieses Enzym katalysiert die Reparatur von DNA Schäden, Cyclobutylthymine-Dimeren oder (6-4)-Photoprodukten mit Hilfe von langwelliger UV-Strahlung.^[65, 66] Die DNA-Photolyase besitzt ein Flavin-adenin-dinucleotid-Molekül (FAD) als essentiellen Cofaktor, das in der aktiven Form des Enzyms im vollständig reduzierten Zustand (FADH^-) vorliegt. Wird das Enzym aus *E. coli* unter aeroben Bedingungen isoliert, so befindet sich der Cofaktor in der inaktiven Semichinon-Form (FADH^\bullet). Durch einen photoinduzierten Elektronentransfer kann die inaktive Form des Enzyms in die aktive Form überführt werden. Diese Photoaktivierung wurde mit zeitaufgelöster Laserspektroskopie untersucht.^[64] Zusammen mit Röntgenstrukturdaten wurde für die Photoaktivierung der DNA-Photolyase aus *E. coli* ein Reaktionsmechanismus entwickelt, der in Schema 2.9 dargestellt ist.

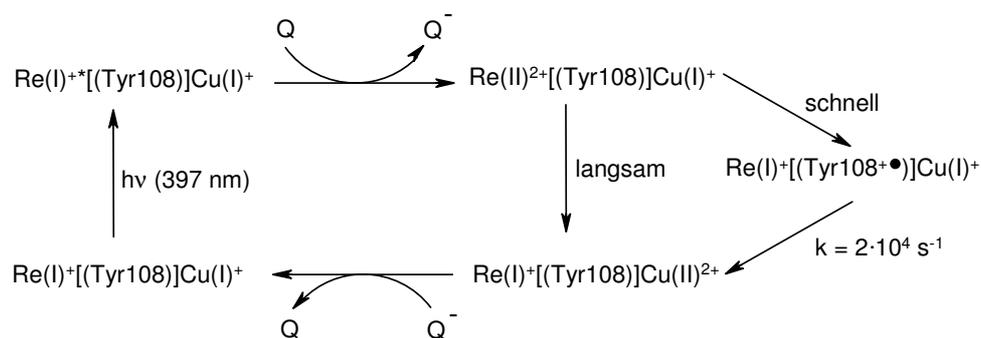


Schema 2.9: Postulierter Mechanismus für die Photoaktivierung der DNA-Photolyase aus *E. coli*, basierend auf Röntgenstrukturdaten.

Nach diesem Modell kommt es binnen 30 ps zur Reduktion des angeregten Flavin-Semichinon-Radikals ($\text{FADH}^{\bullet*}$) unter simultaner Oxidation des benachbarten Tryptophans W382. Innerhalb eines Zeitraums von weniger als 10 ns wandert die Ladung von $\text{W382}^{\bullet+}$ unter Oxidation von W359 zum Tryptophan W306. Das oxidierte Tryptophan $\text{W306}^{\bullet+}$ befindet sich an der Oberfläche des Enzyms und gibt nach 300 ns ein Proton an das umgebende Wasser ab. Es wird vermutet, dass die am Hopping beteiligten Tryptophane als Radikalkationen an der Kaskade partizipieren, da den Tryptophanen im Enzym innerhalb von 5 Å keine Protonen-Akzeptoren zur Verfügung stehen.

Zusätzliche Informationen über die Aktivierung der Photolyase konnten durch Experimente an DNA-Photolyase aus *Aspergillus nidulans* gewonnen werden.^[67] Auch hier wurde eine konservierte Tryptophan-Triade (W390, W367 und W314) im Enzym lokalisiert. Am Ende der Elektronentransfer-Kaskade steht bei der Photolyase aus *A. nidulans* ein Tyrosin (Y468), das sich an der Oberfläche des Enzyms befindet. Die Intermediate des mehrstufigen Elektronentransfers in der DNA-Photolyase konnten allerdings auch bei diesen Experimenten nicht spektroskopisch nachgewiesen werden.

Gray *et al.* haben begonnen, den Effekt des mehrstufigen Tunnelns in Proteinen quantitativ zu untersuchen. Bei Messungen an einem Rhenium-modifizierten Kupferprotein beobachteten sie eine unerwartet hohe Geschwindigkeit für den Elektronentransfer über eine Distanz von 26 Å. Für die Beschleunigung des Elektronentransfers wird in dem Versuch die Beteiligung einer Tyrosin-Seitenkette (Tyr108) verantwortlich gemacht, die sich zwischen der Rhenium-Modifikation und dem Kupfer-Zentrum des Proteins befindet (Schema 2.10). Der Nachweis der oxidierten Tyrosin-Spezies bleibt dabei aus.^[3, 68]



Schema 2.10: Vorgeschlagener Hopping-Mechanismus bei der Oxidation vom Kupfer(I)-Zentrum in Rhenium-modifiziertem H83Q/Q107H Azurin {Q = $[\text{Ru(III)(NH}_3)_6]^{3+}$ }.

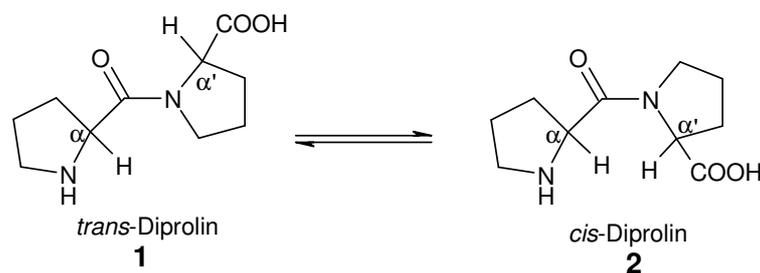
2.7 Untersuchung des Elektronentransfers in Modellsystemen

2.7.1 Einleitung

Um ein besseres Verständnis für Elektronentransfer-Prozesse in Proteinen zu erhalten, bietet sich die Untersuchung von Modellsystemen an. Dabei werden Donor und Akzeptor zumeist durch ein synthetisches Peptid oder ein Proteinfragment voneinander getrennt. Der vereinfachte Aufbau der Modellsysteme reduziert den experimentellen Aufwand und ermöglicht es, verlässlichere Aussagen über die Struktur der Verbindungen zu treffen. In Modellsystemen können gezielt Probleme isoliert untersucht und einfacher ausgewertet werden als in komplexen Biopolymeren.^[8]

2.7.2 Elektronentransfer durch Polyprolinverbrückte Modellsysteme

Der Schwerpunkt der bisher publizierten Arbeiten an Oligopeptid-Modellsystemen lag bei der Untersuchung der Distanzabhängigkeit der Geschwindigkeit des Elektronentransfers.^[10] Um bei den Experimenten das rigide Peptidgerüst im Enzym nachzubilden, kamen in zahlreichen Fällen Polyprolin-Fragmente als verbrückende Einheit zwischen den Redoxzentren zum Einsatz. Dabei kann Poly-L-prolin zwei Helixstrukturen ausbilden, die sich durch die *cis*- und *trans*-Konfigurationen ihrer Peptidbindungen unterscheiden (Polyprolin I und II). Bei der *cis-trans*-Isomerisierung verändern die α -Kohlenstoffatome der Pyrrolidin-Ringe ihre Lage relativ zur Peptid-Amidbindung (Schema 2.11).



Schema 2.11: Schematische Darstellung von *cis*-Diprolin (1) und *trans*-Diprolin (2).

Die Tendenz zur Bildung von all-*trans*- (Polyprolin II) und all-*cis*-Peptiden (Polyprolin I) ist von der Kettenlänge und vom Lösungsmittel abhängig. In Wasser liegen Di- und Triprolin im *cis-trans*-Gleichgewicht vor. Ab einer Kettenlänge von vier Prolinen beobachtet man in

Wasser nur noch *trans*-Peptidbindungen.^[69] Polyprolin II bildet eine linksgängige Helix, wobei eine Windung aus vier Prolinen besteht (Abbildung 2.6).

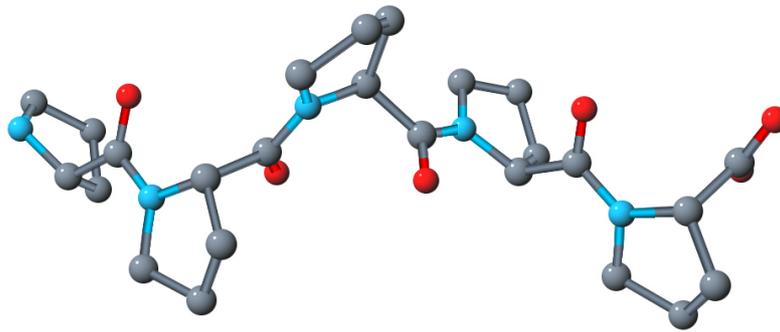


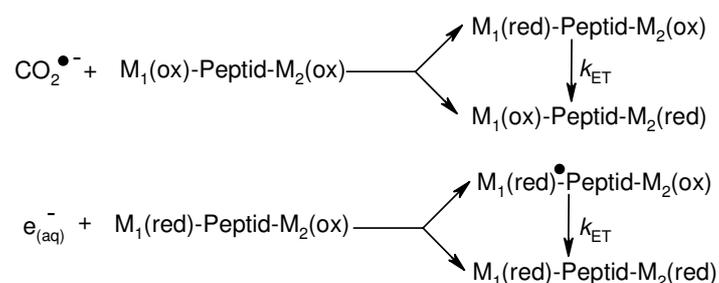
Abbildung 2.6: H-Pro₅-OH in der Konformation einer Polyprolin II-Helix.

In Polyprolin II wird die Ganghöhe für ein Prolin mit 3.1 Å abgeschätzt.^[70] Polymere aus Prolin und Hydroxyprolin bilden die Grundlage von Strukturproteinen wie Collagen. Regionen mit Polyprolin II Strukturelementen mit einer Kettenlänge von bis zu zwölf Prolinen konnten aber auch in zahlreichen anderen eukaryontischen und prokaryontischen Proteinen nachgewiesen werden.^[71]

Bei der Untersuchung des Elektronentransfers durch Polyprolin-Fragmente können im Wesentlichen zwei Konzepte unterschieden werden.

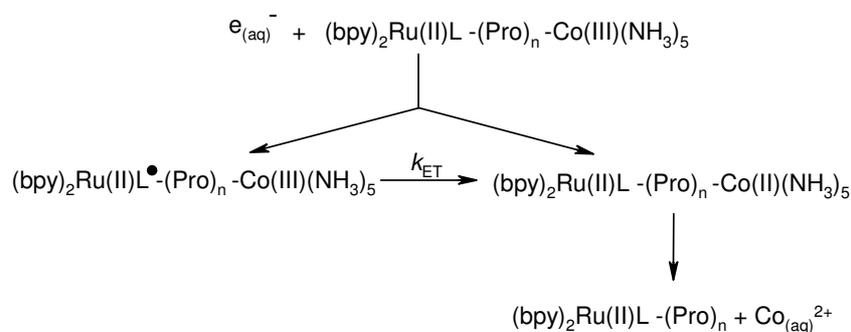
Pulsradiolyse von Übergangsmetall-modifizierten Modellsystemen

In den von Isied *et al.* untersuchten Modellsystemen wurde der *N*- und *C*-Terminus von Poly-L-Prolin mit Metall-Komplexen versehen, die als Elektronendonator und -akzeptor fungierten.^[10] Durch die Wahl verschiedener Donor-Akzeptor-Paare konnte die Reorganisationsenergie λ , sowie die Triebkraft des Elektronentransfers (ΔG^0) variiert werden. Der Donor-Akzeptor-Komplex, an dem die Untersuchung des Elektronentransfers stattfand, wurde durch Pulsradiolyse generiert.



Schema 2.12: Beobachtung des Elektronentransfers in Übergangsmetall-modifizierten Modellsystemen mit Hilfe der Pulsradiolyse.

In ersten Experimenten wurden durch die Reaktion von pulsradiolytisch erzeugten Hydroxylradikalen mit Formiat-Ionen Kohlendioxid-Radikalanionen erzeugt. Diese vermögen geeignete Metalle zu reduzieren (Schema 2.12, S. 20). Man beobachtete anschließend den Elektronentransfer in einer Spezies, in der M_1 reduziert und M_2 oxidiert vorlag.^[72, 73] Bei anschließenden Untersuchungen kamen auch pulsradiolytisch generierte solvatisierte Elektronen zum Einsatz. Dabei wurde die Bildung eines radikalischen Zustands am Ligand von Metall M_1 festgestellt. Im Folgenden konnte der Elektronentransfer zum oxidierten Metall M_2 gemessen werden. Intensive Untersuchungen wurden analog dieser Vorgehensweise an Modellsystemen mit $(bpy)_2Ru(II)L^\bullet$ ($bpy = 2,2'$ -Bipyridin, $L = 4$ -Carboxyl-4'-methyl-2,2'-bipyridin) als Donor und $Co(III)(NH_3)_5$ als Akzeptor durchgeführt.^[74] Die Anzahl der verbrückenden Proline (n) wurde dabei systematisch von $n = 0 - 6$ variiert (Schema 2.13).



Schema 2.13: Reaktionssequenz bei der Untersuchung des Elektronentransfers in $(bpy)_2Ru(II)L^\bullet-(Pro)_n-Co(III)(NH_3)_5$.

Eines der wichtigsten Ergebnisse der Studien war die Feststellung, dass keine lineare Abhängigkeit zwischen dem natürlichen Logarithmus von k_{ET} und der Anzahl der verbrückenden Prolineinheiten bestand. Zwischen $n = 1 - 3$ wurde eine stärkere Distanzabhängigkeit beobachtet als dies bei $n = 4 - 6$ der Fall war (Abbildung 2.7, S. 22).^[74] Mit der Abschätzung, dass die Redoxzentren pro Prolineinheit um weitere 3.1 \AA getrennt werden, ergibt sich für $n \leq 3$ ein β -Wert von 1.2 \AA^{-1} und für $n \geq 3$ ein β -Wert von 0.3 \AA^{-1} . Für dieses unterschiedliche Verhalten machten Isied und Mitarbeiter einen Wechsel im Mechanismus des Elektronentransfers verantwortlich: Für die kürzeren Abstände ($n = 1 - 3$) zwischen den Redoxzentren wurde ein Elektronentransfer infolge direkter Wechselwirkungen von Donor und Akzeptor durch den Raum vorgeschlagen. Im Fall größerer Abstände ($> 10 \text{ \AA}$) soll der Ladungstransfer durch die Bindungen der verbrückenden Prolineinheiten verlaufen.^[10, 75] Dieser Ansatz wurde kürzlich erneut aufgegriffen und erweitert.^[76, 77]

Problematisch an den Versuchen mit Übergangsmetall-modifizierten Polyprolinen ist die unselektive Generierung der Überschussladung in den Modellverbindungen. Die Ladung im Oligopeptid wird in Folge einer Pulsradiolyse mit Hilfe großer Energiemengen (Linearbeschleuniger mit 20 MeV) eingebracht.^[75] Trotz des Einsatzes von *tert.*-Butanol als Hydroxylradikalfänger sind Nebenreaktionen der Modellsysteme mit Hydroxylradikalen und den entstehenden *tert.*-Butanolradikalen möglich. Die

Folgereaktionen der bei der Pulsradiolyse von Wasser gebildeten Wasserstoffradikale werden vollständig ausgeblendet.^[78] Der Einsatz pulsradiolytisch erzeugter solvatisierter Elektronen ist darüber hinaus auf neutrales bis basisches Medium beschränkt.^[10] Nicht zu unterschätzen ist auch der Eingriff in die Struktur der Oligopeptide durch den Einsatz der Übergangsmetallkomplexe.^[72] Anzumerken bleibt ebenso, dass die kinetischen Daten des Elektronentransfers in den Verbindungen $(\text{bpy})_2\text{Ru(II)L}-(\text{Pro})_n-\text{Co(III)(NH}_3)_5$ nur anhand kleiner Veränderungen im Absorptionsspektrum zwischen $(\text{bpy})_2\text{Ru(II)L}^\bullet$ und $(\text{bpy})_2\text{Ru(II)L}$ ermittelt wurden. Die Reduktion von Co(III) und damit das Ankommen der Ladung am Elektronenakzeptor konnte aufgrund der geringen Absorption von $\text{Co(III)(NH}_3)_5$ nicht beobachtet werden.^[75]

Pulsradiolyse von Tryptophan-modifizierten Modellsystemen

Eine weitere Methode zur Untersuchung des Elektronentransfers in Oligopeptiden umfasst die selektive Erzeugung eines Tryptophanradikals (Trp^\bullet) durch die Reaktion mit pulsradiolytisch erzeugten Azidradikalen. Im Folgenden wurde der intramolekulare Protonen-gekoppelte Elektronentransfer von einer Tyrosin-Seitenkette $\{E_{\text{ox}}[\text{Tyr(OH)/Tyr(O}^\bullet)] = 0.93 \text{ V (pH = 7, NHE)}\}$ ^[79] durch ein Polyprolin-Fragment zum Tryptophanradikal $[E_{\text{ox}}(\text{TrpH/Trp}^\bullet) = 1.02 \text{ V (pH = 7, NHE)}]$ ^[79] beobachtet (Schema 2.14, S. 23).^[80]

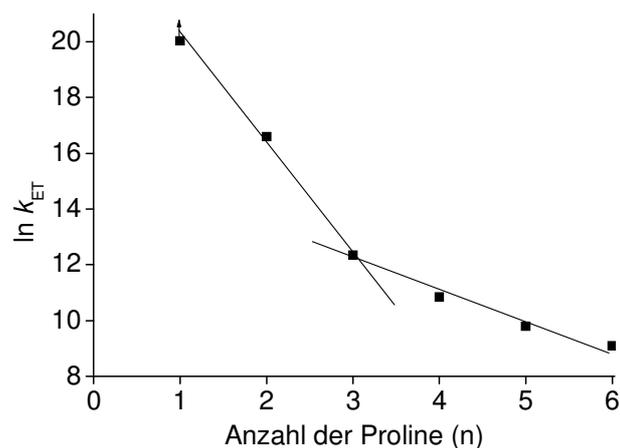
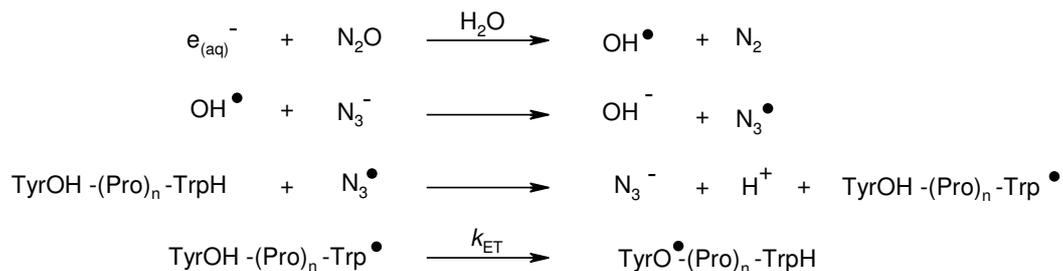


Abbildung 2.7: Auftragung von $\ln k_{\text{ET}}$ gegen die Anzahl der Prolineinheiten in $(\text{bpy})_2\text{Ru(II)L}-(\text{Pro})_n-\text{Co(III)(NH}_3)_5$ nach Isied *et al.*



Schema 2.14: Reaktionsschema des durch Pulsradiolyse initiierten Elektronentransfers zwischen Tyrosin und einem Tryptophanradikal (TrpH = Tryptophan, TyrOH = Tyrosin).

Die Kinetik des Elektronentransfers zwischen Tyrosin (TyrOH) und Tryptophan (TrpH) konnte durch die Absorption von Trp^\bullet ($\lambda_{\text{max, Trp}} = 510 \text{ nm}$) und TyrO^\bullet ($\lambda_{\text{max, Tyr}} = 410 \text{ nm}$) verfolgt werden. Mit Ausnahme des Dipeptids TyrOH-TrpH wurde bei der Untersuchung der Peptide TyrOH-(Pro)_n-TrpH eine exponentielle Abhängigkeit von k_{ET} und der Anzahl der verbrückenden Prolineinheiten festgestellt (Abbildung 2.8).^[12] Unter der Annahme,

dass jede Prolineinheit die aromatischen Aminosäureseitenketten 3.1 \AA voneinander trennt, wurde von Klapper *et al.* in den Oligopeptiden der Art TyrOH-(Pro)_n-TrpH ein β -Wert von 0.23 \AA^{-1} ermittelt. Die Autoren konnten zeigen, dass die Deprotonierung von Tyrosin und die anschließende Reprotonierung von Tryptophan im Verlauf des Protonen-gekoppelten Elektronentransfers nicht geschwindigkeitsbestimmend ist. Vielmehr machten sie einen konzertierten Mechanismus für den beobachteten Prozess verantwortlich. Für die unerwartet geringe Distanzabhängigkeit des Elektronentransfers wurden verschiedene Erklärungen diskutiert. Dabei wurde zum einen auf die mögliche Flexibilität der Oligopeptide und der aromatischen Aminosäureseitenketten hingewiesen. Zum anderen wurde ein besonders effektiver Ladungstransport durch das Peptidgerüst unter

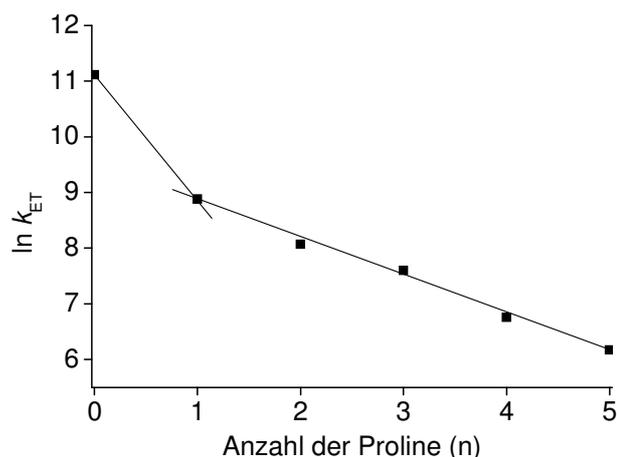


Abbildung 2.8: Auftragung von $\ln k_{\text{ET}}$ gegen die Kettenlänge der verbrückenden Prolineinheiten in TyrOH-(Pro)_n-TrpH nach Klapper *et al.*

verantwortlich. Für die unerwartet geringe Distanzabhängigkeit des Elektronentransfers wurden verschiedene Erklärungen diskutiert. Dabei wurde zum einen auf die mögliche Flexibilität der Oligopeptide und der aromatischen Aminosäureseitenketten hingewiesen. Zum anderen wurde ein besonders effektiver Ladungstransport durch das Peptidgerüst unter

Beteiligung der delokalisierten Elektronen der peptidischen Amidbindungen vorgeschlagen.^[81]

Auch bei den Untersuchungen mit pulsradiolytisch erzeugten Azidradikalen sind die harschen Reaktionsbedingungen zu bemängeln. Der Einsatz von pulsradiolytisch erzeugten Azidradikalen ist zudem auf den neutralen und basischen pH-Bereich eingeschränkt. Klapper *et al.* stellten in dem vorgestellten System sehr geringe Werte für k_{ET} fest ($k_{ET} = 7 \cdot 10^4 - 5 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1}$).^[12] Die Messwerte wurden dennoch ohne weitere Diskussion dem intramolekularen Elektronentransfer zugeschrieben. Fehler bei der Ermittlung von k_{ET} durch intermolekularen Elektronentransfer wurden nicht berücksichtigt. Stattdessen führten die Autoren ihre Experimente in stark verdünnten Peptidlösungen durch. So konnten die gebildeten Aminosäureradikale nur mit sehr geringer Absorption beobachtet werden.^[80] Da die Versuche bei niedrigen Peptidkonzentrationen durchzuführen sind, erfolgt die bimolekulare Oxidation von Tryptophan durch die Azidradikale (Schema 2.14, S. 23) verhältnismäßig langsam. Prozesse, die schneller als 10^6 s^{-1} ablaufen, können bei Peptidkonzentrationen $\leq 0.2 \text{ mM}$ deshalb nicht gemessen werden.

Kinetische Messungen des Elektronentransfers wurden unter großem Aufwand auch an α -helicalen Polypeptiden durchgeführt.^[11, 74, 82] Bei den untersuchten Strukturen stellte man eine komplexe und zumeist nicht lineare Distanzabhängigkeit von k_{ET} fest. Die ermittelten β -Werte lagen dabei weit unter den in helicalen Peptiden zu erwartenden Werten. Neuere Studien führen diesen Effekt auf Fluktuationen in der Konformation der untersuchten Peptide zurück. So wird vermutet, dass die Flexibilität der Polypeptide die Distanz zwischen Donor und Akzeptor in den Modellsystemen stark verkürzt.^[11] Diese Annahme stützt sich auf Untersuchungen der Faltungsgeschwindigkeit von helicalen Peptiden. Dabei wurden bei einem aus 21 Aminosäuren bestehenden Peptid eine Geschwindigkeit von $6 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ für das Aufbrechen der helicalen Sekundärstruktur und den Übergang in die Knäuel-Konformation ermittelt.^[13] Die Distanzabhängigkeit langsamer Elektronentransfer-Prozesse wird somit durch die schnelle Fluktuation der α -Helix stark beeinflusst. Die hohe Flexibilität isolierter Sekundärstruktur-Elemente stellt daher eine große Herausforderung für künftige Messungen des Elektronentransfers dar.

2.8 Zusammenfassung

Durch die zeitaufgelösten Untersuchungen des Elektronentransfers an Cytochromen und am bakteriellen Reaktionszentrum wurde ein reges Interesse am Mechanismus des biologischen Ladungstransports ausgelöst. Beinahe explosionsartig wurde seit den ersten Experimenten an Ruthenium-modifiziertem Cytochrom *c* die Erforschung der Kinetik des Elektronentransfers in Proteinen vorangetrieben.^[9]

Auf der Basis der gewonnenen Daten lässt sich erkennen, dass die Ladung in Proteinen zwischen den Redoxzentren tunnelt. Die Struktur der Proteine nimmt durch die Reduktion der Reorganisationsenergie Einfluss auf die Thermodynamik des Elektronentransfers. Dazu werden die Redoxzentren tief im Innern der Proteine vom umgebenden Wasser ferngehalten.^[3] Die Isolation der Redoxzentren hat den Nachteil, dass Ladungstransfer-Reaktionen in Proteinen nicht-adiabatisch über eine größere Distanz erfolgen müssen. Um einen möglichst effektiven und schnellen Elektronentransfer zu gewährleisten, muss die Polypeptid-Matrix die elektronische Kopplung der Redoxzentren verstärken. Zur Beschreibung der elektronischen Kopplung wurden verschiedene Konzepte entwickelt: die Theorie der universellen Barriere und das Tunnel-Pfad-Modell. Beide Modelle ermöglichen eine grobe Abschätzung der elektronischen Kopplung in Proteinen.^[83] Die Modelle wurden in den letzten Jahren erweitert und haben dabei jeweils Bestandteile der anderen Theorie übernommen.^[43]

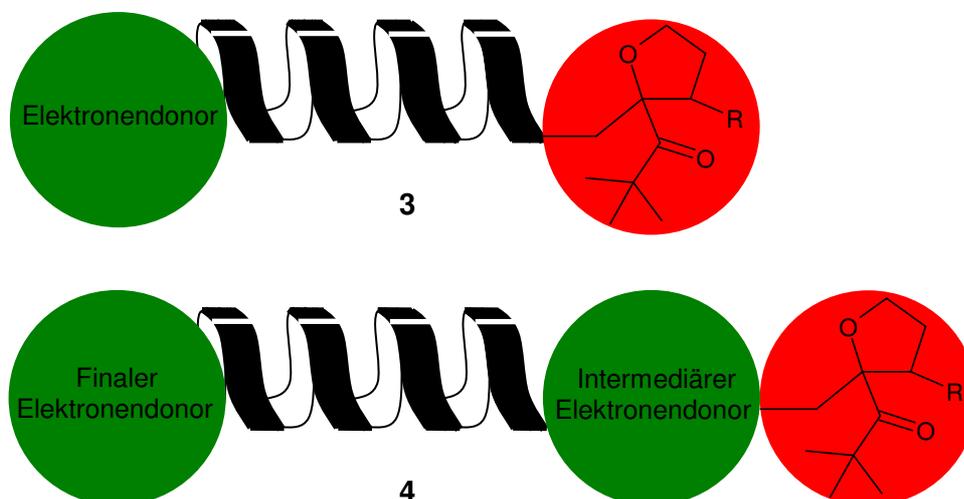
Muss Ladung in der Polypeptid-Matrix über eine große Distanz ($> 25 \text{ \AA}$) transportiert werden, so kann es erforderlich sein, dass die Ladung über Relaisstationen im Peptid hüpft. Dies ist besonders dann von Bedeutung, wenn die Geschwindigkeit des Elektronentransfers für die biologische Aktivität essentiell ist. In jüngster Zeit konnten Anhaltspunkte für das Auftreten des mehrstufigen Ladungstransports in Proteinen erhalten werden.^[4, 64] Dabei gelang es aber bisher nicht die postulierten oxidierten Zwischenstufen spektroskopisch nachzuweisen.

Eine beeindruckende Anzahl von Veröffentlichungen beschäftigt sich mit dem Elektronentransfer durch Oligopeptid-Modellsysteme. Dabei gelang es in zahlreichen Oligopeptiden die Kinetik des Elektronentransfers mit hoher Genauigkeit zu messen. Unsicherheiten treten allerdings bei der Vorhersage der Struktur der untersuchten Modellsysteme auf. Fluktuationen in der Konformation der Oligopeptide erschweren eine eindeutige Interpretation der Messergebnisse.

3. Aufgabenstellung

An Untersuchungen des Elektronentransfers in Modellsystemen besteht trotz einer Vielzahl publizierter Arbeiten immer noch großes Interesse.^[8] Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher die Kinetik des Ladungstransports in einfachen Oligopeptiden beobachtet werden. Dazu musste eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, in einem Oligopeptid eine positive Ladung zu generieren. Die Entwicklung einer neuen Vorgehensweise war erforderlich, da bisher nur wenige Systeme bekannt sind, die es erlauben, den Elektronentransfer in Peptiden zeitaufgelöst zu verfolgen.^[84] Im Gegensatz zu den bekannten Pulsradiolyse-Experimenten^[10] sollte bei der gesuchten Methode unter milden Bedingungen ortsselektiv ein starkes Oxidationsmittel erzeugt werden. Dabei sollte die Struktur der Modellsysteme im Vergleich zu den Versuchen mit Übergangsmetall-Komplexen nur geringfügig modifiziert werden.^[72] Ziel war darüber hinaus die direkte Erzeugung eines Oxidationsmittels im photochemischen Grundzustand ohne die Zugabe von externen Quenchern.^[35]

Um diese Bedingungen zu erfüllen, bot sich der Einsatz eines photolabilen 2-pivaloyl-modifizierten Tetrahydrofuranerivats als Elektronenakzeptorvorläufer an (Schema 3.1).



Schema 3.1: Vereinfachte Darstellung der Oligopeptid-Modellsysteme 3 und 4.

Es ist bekannt, dass durch Anregung von 2-pivaloyl-modifizierten Tetrahydrofuranerivaten mit Licht geeigneter Wellenlänge eine radikalische Fragmentierung eingeleitet werden kann, die es ermöglicht ein Radikalkation mit hohem Oxidationsvermögen zu generieren.^[85, 86] Diese Methode wurde in der Arbeitsgruppe Giese bereits erfolgreich zur regioselektiven Bildung von Radikalkationen in DNA eingesetzt.^[46, 87] Bei der photoinduzierten

Fragmentierung musste gewährleistet werden, dass die Wellenlänge des eingestrahlten Lichts nicht mit anderen Chromophoren in den Modellsystemen wechselwirkt.^[88] Bei der Wahl der Austrittsgruppe R in den Tetrahydrofuran-derivaten **3** und **4** war darauf zu achten, dass diese nach einem kurzen Laserblitz eine möglichst schnelle Generierung der positiven Ladung erlaubt.^[89, 90] Nur so kann die Kinetik schneller Elektronentransfer-Prozesse, im Anschluss an die Erzeugung des Elektronenakzeptors, verfolgt werden.

Zur Untersuchung des Elektronentransfers war es weiterhin erforderlich eine Reihe natürlicher und nicht-natürlicher Aminosäuren auf ihre Eignung als Elektronendonoren zu prüfen. Bei der Auswahl geeigneter Aminosäuren war eine charakteristische Absorption der oxidierten Donoren ausschlaggebend. Mit Hilfe der Laser-Transienten-Spektroskopie sollte anhand dieser Absorption die Kinetik der Elektronentransfer-Prozesse in den Modellsystemen **3** und **4** untersucht werden.

In Oligopeptid-Modellsystemen vom Typ der Verbindung **3** sollten Donor und Akzeptor durch einen rigiden Polyprolin-Abstandshalter voneinander getrennt werden. Durch eine Variation der Kettenlänge der Polyprolin-Brücke war beabsichtigt, die Distanzabhängigkeit der Geschwindigkeit des intramolekularen Elektronentransfers zu analysieren und die gewonnenen Ergebnisse mit den aus der Literatur bekannten Werten zu vergleichen.^[10] Im Rahmen dieser Experimente sollte die Zweckmäßigkeit von Polyprolin als verbrückendes Oligopeptid-Modellsystem untersucht werden.

Bei Experimenten mit Verbindungen vom Typ **4** sollten zwei verschiedene Elektronendonoren zum Einsatz kommen. Mit Hilfe dieser Modellsysteme war geplant mehrstufige Elektronentransfer-Prozesse zu untersuchen. Nach der Aktivierung des Elektronenakzeptorvorläufers durch einen Laserblitz sollte in einem ersten Schritt die Oxidation des intermediären Elektronendonors stattfinden. Zeitaufgelöst sollte anschließend der Elektronentransfer von einem benachbarten finalen Donor untersucht werden. Bei der Auswahl der beiden Elektronendonoren muss auf die geeigneten Oxidationspotentiale geachtet werden. Die oxidierten Spezies der beiden Elektronendonoren sollten zudem ein möglichst unterschiedliches Absorptionsspektrum besitzen. Nur so sollte es möglich sein eine Beteiligung des intermediären Elektronendonors am mehrstufigen Elektronentransfer-Prozess spektroskopisch nachzuweisen.

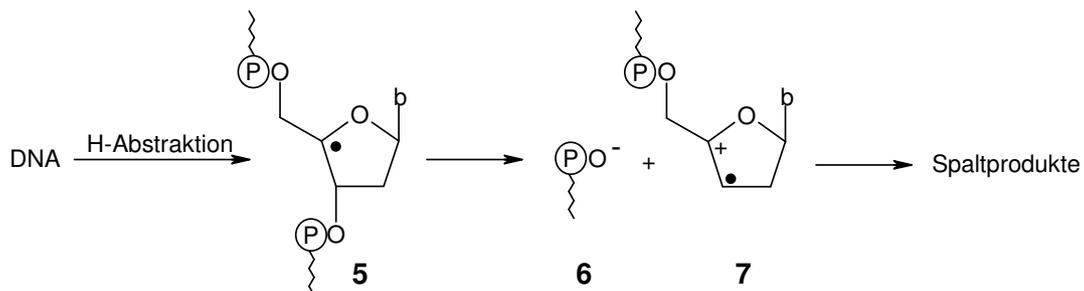
4. Spezieller Teil

4.1 Selektive Erzeugung von Radikalkationen in Biopolymeren

4.1.1 Biologischer Hintergrund

Radikale und deren Folgereaktionen in Biopolymeren sind von großer Bedeutung. So können radiolytisch oder chemisch erzeugte Radikale Wasserstoffatome aus den 2'-Desoxyribosebausteinen der DNA abstrahieren.^[91] Infolge dieser Schädigung kommt es zu Veränderungen am Erbgut, die mitverantwortlich gemacht werden für Mutagenese, Karzinogenese und den Alterungsprozess bis hin zum Zelltod.

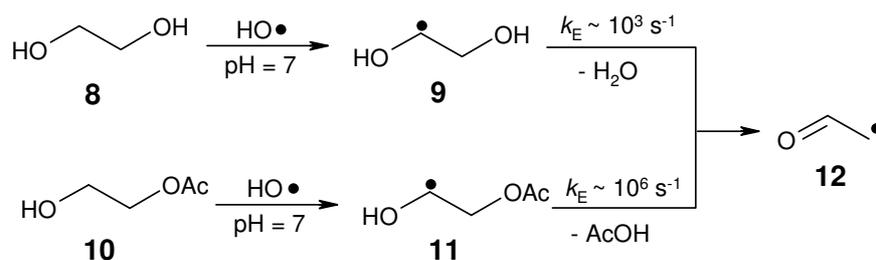
Das durch die Abstraktion des 4'-Wasserstoffatoms der Desoxyribose generierte 4'-DNA-Radikal **5** weist eine Besonderheit auf: Unter Bildung des Radikalkations **7** und des 5'-Phosphats **6** löst es auch unter anaeroben Bedingungen einen spontanen DNA-Strangbruch aus (Schema 4.1).



Schema 4.1: Spontaner DNA-Strangbruch unter Bildung eines 4'-DNA-Radikalkations.

Um die gebildeten DNA-Spaltprodukte zu erklären, haben Schulte-Frohlinde und von Sonntag *et al.* die radikalinduzierte Fragmentierung $\mathbf{5} \rightarrow \mathbf{6} + \mathbf{7}$ vorgeschlagen.^[92, 93] Demnach wird das halbbesetzte Atomorbital im Radikal **5** für eine Schwächung der benachbarten 3'-C,O-Bindung verantwortlich gemacht. Diese Destabilisierung induziert eine heterolytische β -Eliminierung des 5'-Phosphats **6**, wobei die in den Fragmenten auftretenden Ladungen elektronisch stabilisiert werden können.

Ein beschleunigender Einfluss von Radikalen auf die Eliminierung von β -ständigen Abgangsgruppen wurde auch in einfachen Modellsystemen beobachtet.^[94, 95] Dabei kamen die Ethylenglykolderivate **8** und **10** zum Einsatz. Durch Pulsradiolyse erzeugte Hydroxylradikale reagieren mit diesen Alkoholen unter Wasserstoffabstraktion und Ausbildung der radikalischen Intermediate **9** und **11** (Schema 4.2, S. 29).



Schema 4.2: Untersuchungen zur radikalinduzierten β -Eliminierung der Ethylen-glykolderivate **8** und **10**.

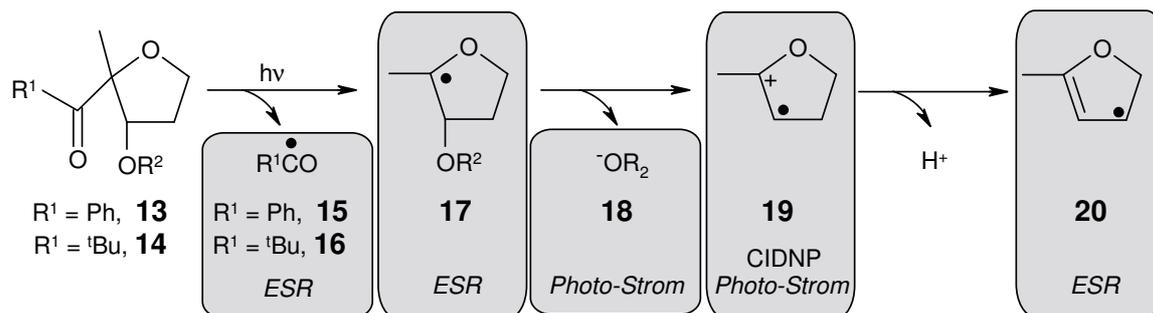
In einer Folgereaktion kommt es zur Eliminierung der Fluchtgruppen unter Bildung des Formylradikals **12**. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Geschwindigkeitskonstante der Eliminierung (k_E) vom pK_A -Wert der konjugierten Säure der Austrittsgruppe abhängig ist. So beobachtet man beim Wechsel vom Hydroxylanion zum Acetatanion als Austrittsgruppe eine Beschleunigung der Eliminierung um etwa drei Zehnerpotenzen.

Diese Beobachtung wird auch für die Erklärung des heterolytischen 3'-C,O-Bindungsbruchs von 4'-DNA-Radikalen herangezogen.

4.1.2 Untersuchung zum 4'-DNA-Radikal-Bindungsbruch

Der Mechanismus des anaeroben 4'-DNA-Radikal-Bindungsbruchs ist Gegenstand intensiver Untersuchungen in der Arbeitsgruppe Giese.^[85, 86, 89, 96-102] Anhand zahlreicher Experimente ist es gelungen, durch Folgeprodukte indirekt Hinweise auf die Existenz des neutralen C-4'-Nucleotidradikals **5** sowie des Radikalkations **7** zu erhalten.^[89, 96, 98] Zusätzlich wurde durch konkurrenzkinetische Messungen die Geschwindigkeitskonstante der β -Eliminierung (k_E) unter dem Einfluss unterschiedlicher Lösungsmittel und Austrittsgruppen untersucht. So stellte man eine starke Beschleunigung des C,O-Bindungsbruchs bei steigender Polarität des Lösungsmittels fest. Auch der beobachtete Einfluss der Azidität des Nucleofugs auf die Eliminierungsgeschwindigkeit wurde als deutliches Indiz für eine heterolytische C,O-Bindungsspaltung interpretiert.^[89]

Ein spektroskopischer Nachweis der bei der Fragmentierung von C-4'-Radikalen (**5**) postulierten radikalischen Zwischenstufen gelang durch Untersuchungen an Modellverbindungen (Schema 4.3, S. 30).^[103]



Schema 4.3: Überblick über die nachgewiesenen Intermediate der radikalinduzierten β -Eliminierung unter Angabe der verwendeten Methoden.

Das neutrale Radikal **17** wurde dabei durch Photolyse der Vorläufer **13** bzw. **14** erzeugt und mit Hilfe der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) untersucht. Im Fall von phosphorylierten Modellsystemen mit $R^2 = \text{OPO}(\text{OEt})_2$ kam es zu einer schnellen β -Eliminierung der Austrittsgruppe, gefolgt von der Deprotonierung des gebildeten Radikalkations **19**. Durch ESR-Spektroskopie konnte in diesem Fall nur das Allylradikal **20** beobachtet werden. Es war jedoch möglich, das Primärradikal **17** von Vorläufern mit schlechterer Austrittsgruppe ($R^2 = \text{TBDMS}$) spektroskopisch nachzuweisen.^[102] Das bei der Photolyse gebildete Benzoylradikal **15** bzw. das bei der Fragmentierung des Acylradikals **16** entstehende *tert.*-Butylradikal konnte ebenfalls im ESR-Versuch beobachtet werden.

Hinweise auf eine heterolytische β -Eliminierung des neutralen Radikals **17** konnten aufgrund von Photoleitfähigkeitsmessungen erhalten werden.^[97, 103] Informationen über den Charakter der auftretenden Ladung wurden durch CIDNP-Untersuchungen gewonnen. Dabei gelang der direkte Nachweis des Radikalkations **19** ausgehend vom phosphorylierten Vorläufer **13** mit $R^2 = \text{OPO}(\text{OEt})_2$.^[85]

Im Modellsystem **13** konnte darüber hinaus durch konkurrenzkinetische Experimente mit Thiophenol als Wasserstoffdonor die Geschwindigkeitskonstante der β -Eliminierung abgeschätzt werden. Bei Untersuchungen an Verbindung **13** mit $R_2 = \text{OPO}(\text{OEt})_2$ in Methanol gelang es auch beim Einsatz von zehn Äquivalenten Thiophenol nicht, das gebildete Primärradikal **17** abzufangen. Mit der Rate der H-Abstraktion von Thiophenol und der Nachweisgrenze für die H-Einfangprodukte wurde geschlussfolgert, dass der C,O-Bindungsbruch im Radikal **17** mit $R_2 = \text{OPO}(\text{OEt})_2$ schneller als $3 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ abläuft.^[85]

4.1.3 Photochemie pivaloyl-modifizierter Radikalvorläufer

Ketone, wie die Modellverbindung **14**, können eine Reihe verschiedener Photoprozesse eingehen. Zu den wichtigsten Umsetzungen photochemisch angeregter Carbonylverbindungen gehören die Norrish-Photoeliminierungen.^[104] Der reaktive angeregte Zustand der Ketone ist in diesem Fall ein $n-\pi^*$ -Zustand. Dabei wird ein Elektron aus einem nichtbindenden Orbital des Sauerstoffs in das antibindende π^* -Orbital der Carbonylgruppe transferiert (Abbildung 4.1). Die benötigte Energie

für diesen $n-\pi^*$ -Übergang bei gesättigten Ketonen beträgt 340 - 360 kJ/mol. Die Bandenlage für die $n-\pi^*$ -Anregung des Pivaloylketons **14** liegt somit im UV-Bereich, mit einem Maximum bei 295 nm.^[103] Der $n-\pi^*$ -Übergang ist quantenmechanisch verboten. Dies äußert sich in einem geringen Extinktionskoeffizienten der entsprechenden Bande, der bei Verbindung **14** mit $R^2 = \text{OPO}(\text{OEt})_2$ zu $33 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt wurde.^[103]

Regt man im Radikalvorläufer **14** durch Licht geeigneter Wellenlänge einen $n-\pi^*$ -Übergang an, so beobachtet man eine Norrish-Typ-I-Reaktion: Es kommt zur Homolyse in α -Position zur Carbonylgruppe. In Schema 4.4 ist der Mechanismus der Norrish-Typ-I-Photoeliminierungen für Di-*tert.*-butylketon (**21**) dargestellt.

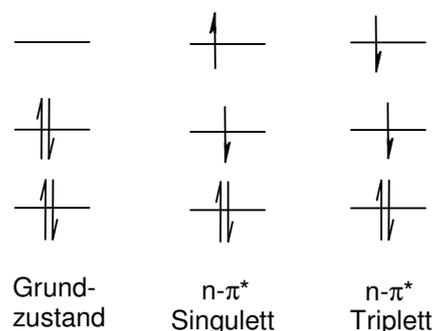
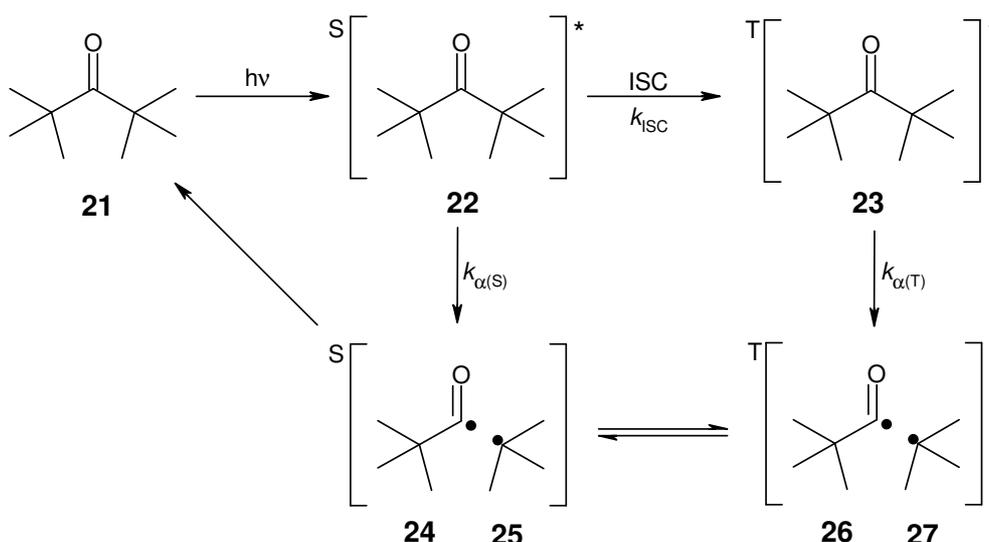


Abbildung 4.1: MO-Diagramme von angeregten $n-\pi^*$ Zuständen.



Schema 4.4: Verlauf der Norrish-Typ-I-Spaltung von Di-*tert.*-butylketon (**21**).

Nach der $n-\pi^*$ -Anregung geht Di-*tert.*-butylketon (**21**) zunächst in den angeregten Singulettzustand **22** über. Die Lebensdauer des Singulettzustands beträgt rund 5 ns. Mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $k_{ISC} = 1.3 - 1.6 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ erfolgt unter Spinwechsel (ISC) der Übergang zum angeregten Triplettzustand **23**. Aus dem angeregten Zustand **23** beobachtet man einen raschen Norrish-Typ-I-Prozess ($k_{\alpha(T)} = 7 - 9 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$) unter Bildung eines Triplettpaars, bestehend aus dem *tert.*-Butylradikal **27** und dem Pivaloylradikal **26**. Verglichen mit der Diffusion der beiden Radikale erfolgt die Spinumkehr zum Singuletttrikalpaar **24** und **25** langsam. Eine Rekombination der Radikale wird somit verhindert, so dass die α -Eliminierung über diesen Reaktionsweg irreversibel ist. Auch aus dem Singulettzustand **22** kann die Homolyse unter Bildung des Singuletttrikalpaars **24** und **25** stattfinden. Dieser Prozess ist allerdings rund zwei Zehnerpotenzen langsamer ($k_{\alpha(S)} = 6 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$) als der Bindungsbruch aus dem Triplettzustand und ist daher weniger wahrscheinlich. Die Quantenausbeute für den Gesamtprozess der Zersetzung von Di-*tert.*-butylketon (**21**) wurde zu $\Phi = 0.71$ bestimmt.^[105]

Für den Fall asymmetrisch substituierter Ketone, wie Verbindung **13** und **14**, ergeben sich zwei mögliche Richtungen des α -Bindungsbruchs. Die vorgeschlagene Eliminierung der Acylradikale **15** und **16** unter Ausbildung eines C-2-Tetrahydrofuranlyradikals **17** beruht auf Untersuchungen an strukturverwandten Systemen.^[106, 107] Dabei stellte man fest, dass α,β -dioxxygenierte Radikale wie das Furanylradikal **17** zusätzliche Stabilisierung durch die Sauerstoffsubstituenten aufgrund capto-dativer-Effekte erfahren.^[108]

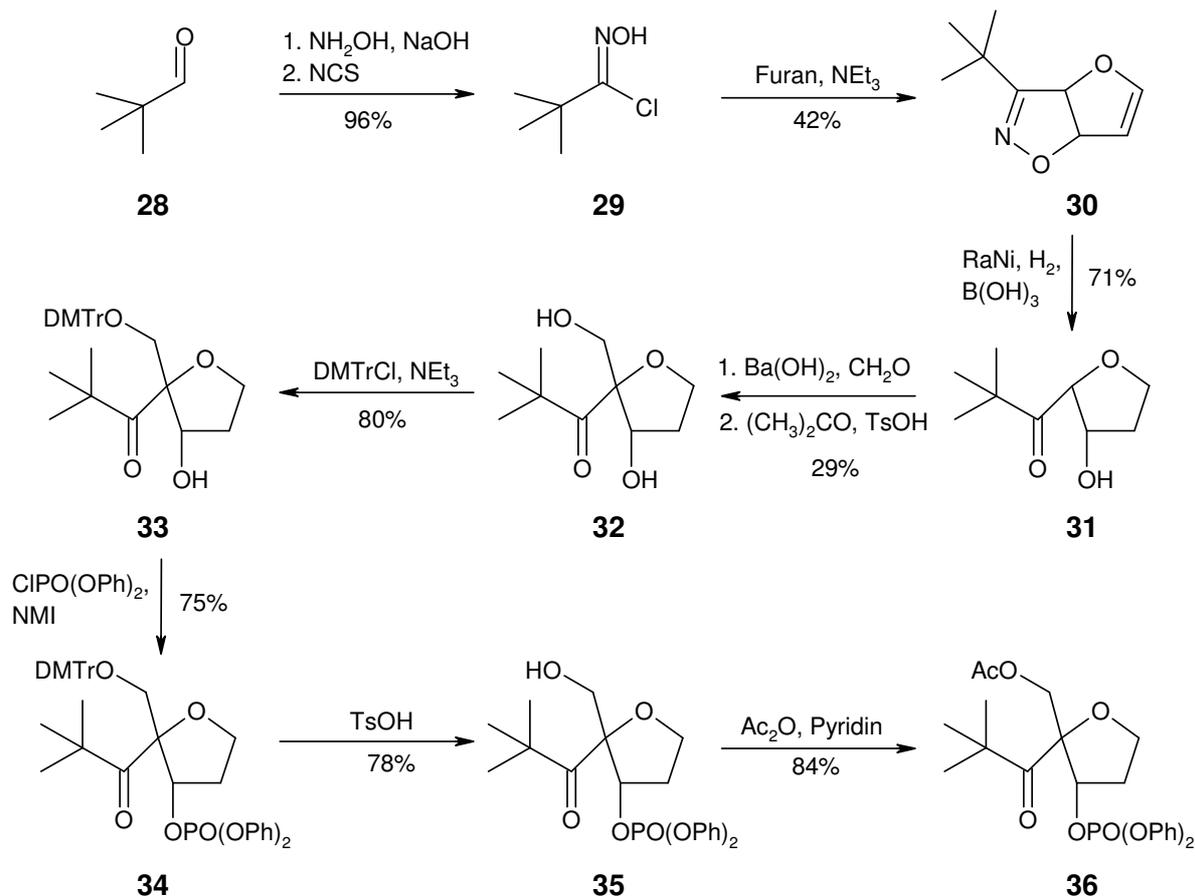
4.2 Erzeugung von Radikalkationen in Peptiden

4.2.1 Synthese des *tert.*-Butylketon-Radikalvorläufers **35**

Zur Darstellung des Radikalvorläufers **35** wurde ein Syntheseverfahren entwickelt, welches eine 1,3-dipolare Cycloaddition als Schlüsselschritt umfasste (Schema 4.5, S. 34). Dazu wurde Pivalaldehyd (**28**) mit Hydroxylamin Hydrochlorid in das korrespondierende Aldoxim und nachfolgend mit *N*-Chlorsuccinimid in das Hydroxamsäurederivat **29** mit einer Gesamtausbeute von 96% überführt. *In situ* Generierung des Nitriloxids der Verbindung **29** in Gegenwart von Triethylamin ermöglichte eine regioselektive Cycloaddition mit Furan. Das Isoxazolinderivat **30** konnte so in einer Ausbeute von 42% erhalten werden. Mit W-2 Raney-Nickel als Katalysator wurde der Heterocyclus **30** in saurem, wässrigem Methanol hydriert und geöffnet. Die Hydrolyse des intermediär gebildeten Imins lieferte das *cis*-2,3-disubstituierte Tetrahydrofuranerivat **31** in einer Gesamtausbeute von 71%.^[86] Zur weiteren Funktionalisierung des Kohlenstoffzentrums in C-2 Position erfolgte die Deprotonierung dieser C-H aziden Position in **31** durch Bariumhydroxid. Das resultierende Carbanion wurde mit Formaldehyd zur Reaktion gebracht. Die als Nebenprodukt entstandenen *2S,3S* und *2R,3R* Isomere der Verbindung **32** konnten durch die Reaktion mit Aceton in die entsprechenden Acetale überführt und abgetrennt werden. In einer Gesamtausbeute von 29% wurde so das Diol **32** als *2R,3S* und *2S,3R* Racemat erhalten. Die Stereochemie der Verbindungen wurde dabei durch ¹H-NOESY-Messungen geklärt.

Auf die Trennung der Enantiomere wurde verzichtet, da nach der Bestrahlung und radikalischen Fragmentierung die chirale Information des Heterocyclus verloren geht. Bei den untersuchten Folgereaktionen des Radikalkations **39** spielt die Stereochemie des Radikalvorläufers somit keine Rolle (Schema 4.6, S. 35).

Die primäre Hydroxylfunktionalität des Diols **32** wurde mit Hilfe von 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid und Triethylamin mit 80% Ausbeute selektiv in den Ether **33** überführt. Die verbleibende sekundäre Alkoholfunktionalität wurde im Anschluss mit Diphenylchlorophosphat in Gegenwart von *N*-Methylimidazol in 78% Ausbeute zum Phosphattriester **34** umgesetzt. Die saure Etherspaltung mit Toluol-4-sulfonsäure lieferte den Radikalvorläufer **35** in 78% Ausbeute. Die Referenzverbindung **36** wurde durch die Acetylierung mit Essigsäure in 84% Ausbeute synthetisiert.



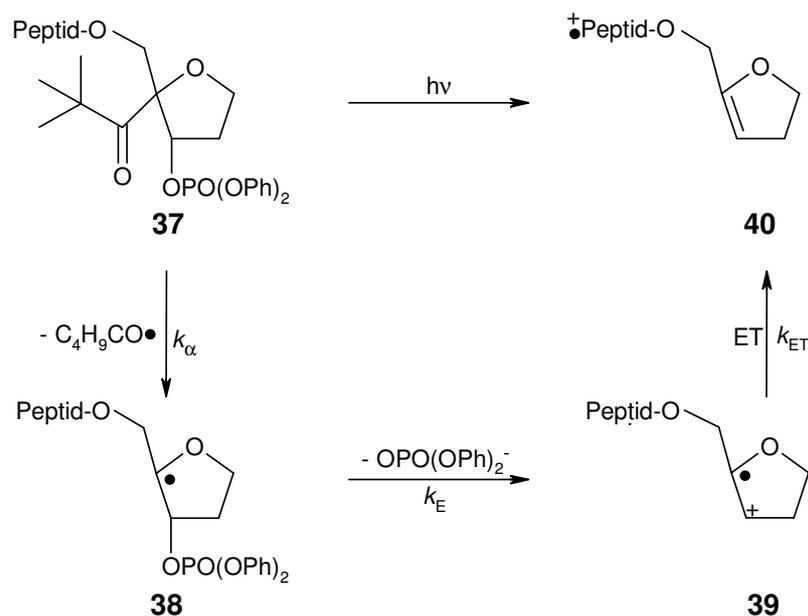
Schema 4.5: Synthese des 2-Pivaloyl-3-diphenoxyphosphoryl-tetrahydrofuranderivats **35**.

4.2.2 Einleitung

Die Photolyse pivaloyl-modifizierter Biopolymere wurde im Arbeitskreis Giese bereits erfolgreich zur selektiven Generierung von Radikalkationen in DNA eingesetzt.^[46, 87] Der Vorteile bei der photochemischen Erzeugung von Radikalen durch die Homolyse von Pivaloylketonen liegt bei den milden Reaktionsbedingungen, zum anderen kann durch die selektive Anregung des *tert.*-Butylketon-Chromophors das Radikal ortsselektiv erzeugt werden. Der Einsatz der Pivaloylgruppe als Radikalvorläufer führt darüber hinaus nur zu einer geringen Strukturveränderung im untersuchten Molekül.

Aufgrund dieser Vorteile und der detaillierten Vorkenntnisse im Bereich der Photochemie pivaloyl-modifizierter Biomoleküle wurde auch in der vorliegenden Arbeit bei der selektiven Erzeugung eines Elektronenakzeptors in Peptiden auf dieses Reaktionsprinzip zurückgegriffen.

4.2.3 Konzept der ortsselektiven Freisetzung positiver Ladung in Peptiden



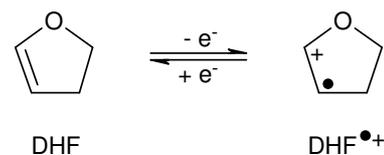
Schema 4.6: Reaktionssequenz für die ortsselektive Generierung des Radikalkations **39** am C-Terminus eines Modellpeptids, gefolgt von der Oxidation eines Elektronendonors im Peptidstrang.

Bei den untersuchten Modellverbindungen **37** wurde der pivaloyl-modifizierte Alkohol **35** über eine Esterbindung an den C-Terminus von Oligopeptiden gebunden (Schema 4.6). Es wurde erwartet, dass sich bei der Bestrahlung des Radikalvorläufers **37** mit einer Geschwindigkeit k_α in der Größenordnung von 10^8 s^{-1} durch Norrish-Typ-I-Eliminierung das Primärradikal **38** bildet.^[105] Um eine möglichst schnelle Bildung des Radikalkations **39** zu gewährleisten, wurde der Radikalvorläufer **37** mit einer Diphenylphosphat-Austrittsgruppe versehen. Der pK_a -Wert für $\text{HOPO}(\text{OEt})_2$ beträgt 3.15, wohingegen der pK_a -Wert für $\text{HOPO}(\text{OPh})_2$ zu 2.71 bestimmt wurde.^[109] Somit sollte beim Diphenylphosphat **37** eine noch raschere β -Eliminierung (k_E) zu beobachten sein, als dies bei der Modellverbindung **13** mit $\text{R}^2 = \text{OPO}(\text{OEt})_2$ gemessen wurde.^[85, 89] Ziel war es sicherzustellen, dass die folgenden kinetischen Untersuchungen schneller Elektronentransfer-Prozesse nicht durch eine langsamere, geschwindigkeitsbestimmende Erzeugung des Radikalkations **39** beeinträchtigt werden.

Das bei der radikalinduzierten Fragmentierung gebildete Radikalkation **39** hat stark oxidierende Eigenschaften. Mittels eines Vergleichs mit dem strukturverwandten Radikalkation von 2,3-Dihydrofuran ($\text{DHF}^{+\bullet}$, Schema 4.7, S. 36) kann das Reduktionspotential von **39** abgeschätzt werden. Durch die Reaktion von DHF mit

Thioanisol-Radikalkationen und 2'-Desoxyguanosin-Radikalen konnte das Reduktionspotential in den Bereich von $E_{\text{red}}(\text{DHF}^{\bullet+}/\text{DHF}) = 1.29 - 1.44 \text{ V (NHE)}$ eingeschränkt werden.^[78] Das Radikalkation **39** sollte somit in der Lage sein, die Seitenketten elektronenreicher aromatischer Aminosäuren im kovalent gebundenen Peptid zu oxidieren.^[110, 111] Als Produkt des erfolgreichen Elektronentransfers wird die Bildung des Enolethers **40** erwartet.

Die folgenden Kapitel beschäftigen sich mit der Suche nach natürlichen und nicht-natürlichen Aminosäuren, die zum Einsatz als Elektronendonoren geeignet sind. Weiter wird eine Methode vorgestellt, die es erlaubt, die Geschwindigkeit des intramolekularen Elektronentransfers (k_{ET}) zwischen dem Radikalkation **39** und einem geeigneten Elektronendonoren zu messen.



Schema 4.7: Redox-Prozess bei 2,3-Dihydrofuran (DHF).

4.3 Versuchsaufbau zur Durchführung zeitaufgelöster Laserexperimente

Ziel der Arbeit war die Bestimmung der absoluten Geschwindigkeit des Elektronentransfers in den untersuchten Modellsystemen. Dabei sollte eine Technik angewendet werden, die keine aufwendige Analyse der Photoprodukte des Elektronentransfers erfordert. Die Geschwindigkeitskonstante des Elektronentransfers sollte direkt bestimmt, und nicht als Verhältnis zur Geschwindigkeitskonstante einer Nebenreaktion abgeschätzt werden.^[87] Bei der Wahl einer geeigneten Messmethode fiel die Entscheidung zugunsten der Laser-Flash-Photolyse.^[112] Zur Untersuchung schneller Elektronentransfer-Prozesse wird dabei die photoinduzierte Fragmentierung in den Modellsystemen **37** durch einen Laserblitz eingeleitet. Die Probe wurde dazu in sauerstofffreiem Lösungsmittel in einer luftdicht verschlossenen Absorptionszelle mit einem XeCl-Excimer Laser bestrahlt (Abbildung 4.2, S. 37). Die Wellenlänge des eingestrahlten Lichts betrug dabei 308 nm bei einer Pulsdauer von etwa 25 ns und einer Pulsenergie von 100 - 150 mJ.

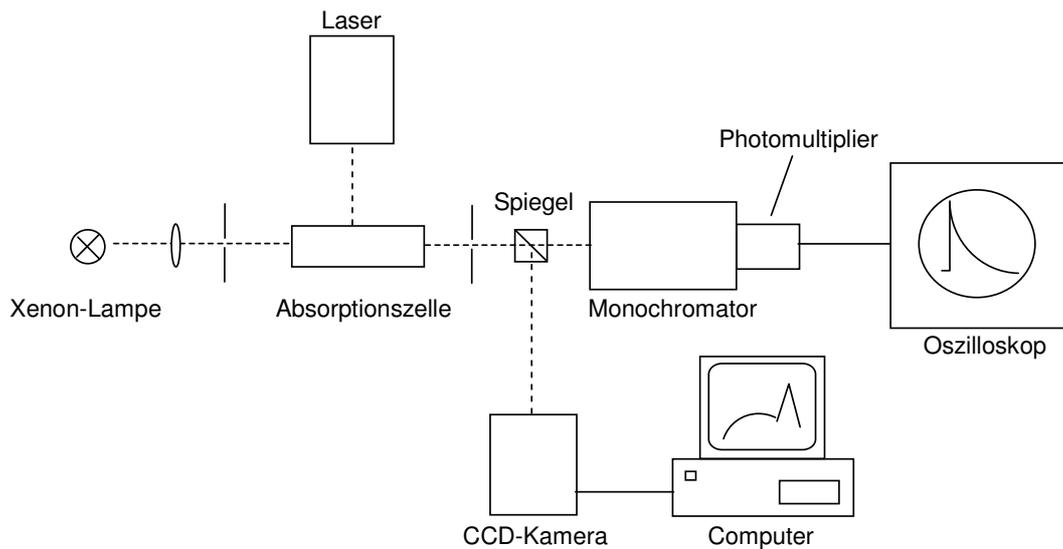


Abbildung 4.2: Schematischer Versuchsaufbau zur Durchführung von Laser-Flash-Experimenten.

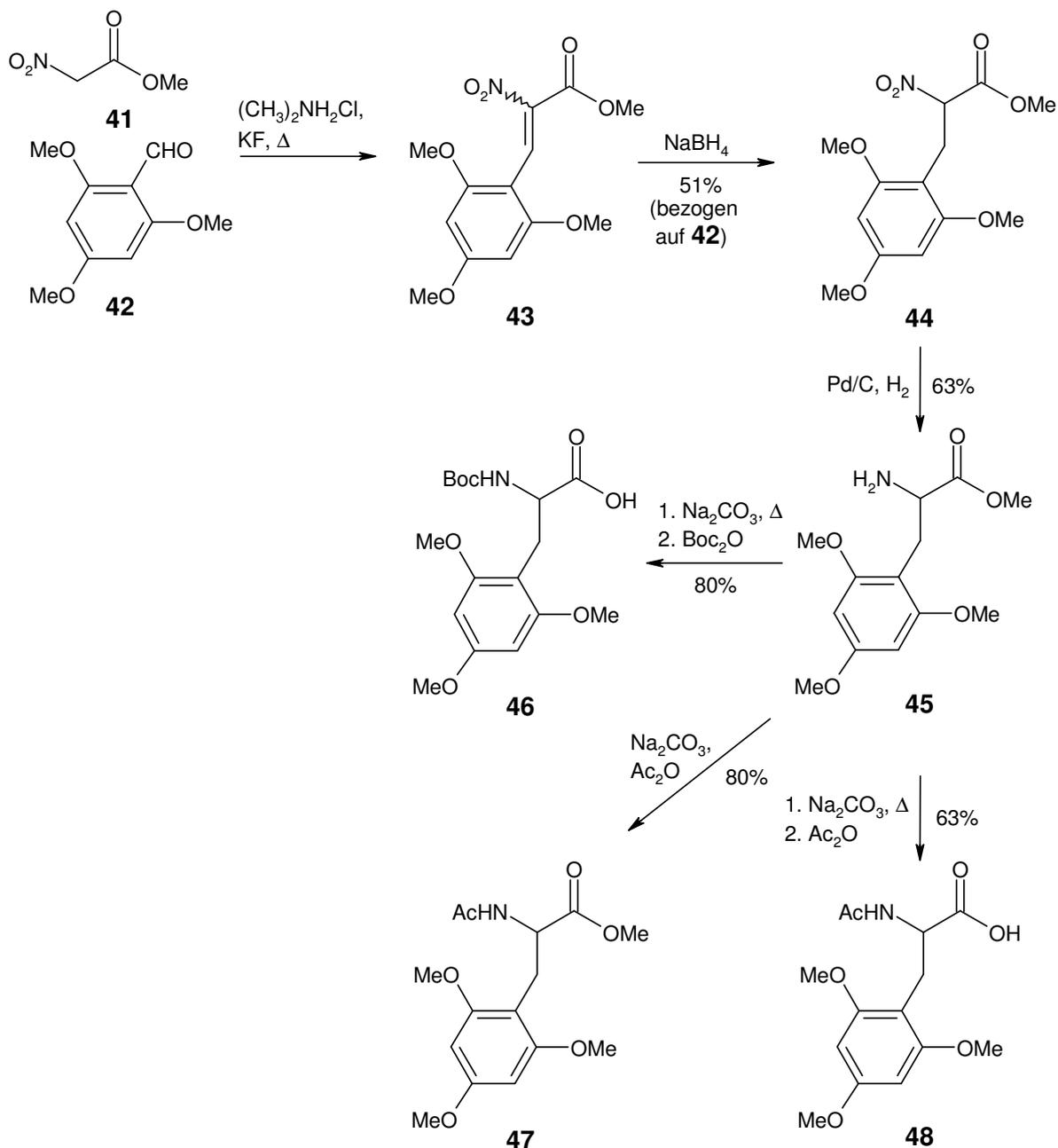
Orthogonal zum Laserstrahl wurde die Probe mit einer kontinuierlichen Lichtquelle durchleuchtet. Das Messlicht wurde nach dem Passieren der Absorptionszelle in einem Monochromator fokussiert. Zusammen mit einem Photomultiplier konnte so an einem Oszilloskop der zeitliche Absorptionsverlauf einer Wellenlänge verfolgt werden. Mit Hilfe eines Spiegels war es in einem anderen Versuchsaufbau möglich, das Messlicht nach dem Austritt aus der Absorptionszelle auf eine CCD-Kamera zu lenken. Diese Versuchsanordnung ermöglichte, nach der Auswertung der Messdaten an einem Computer, die Aufnahme eines Absorptions-Spektrums zu einem definierten Zeitpunkt nach dem Laserblitz.

Durch den vorgestellten Versuchsaufbau können, über die Änderung der Absorption, Prozesse mit einer Geschwindigkeit von bis zu $4 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ gemessen werden. Um möglichst viel Messlicht zur Verfügung zu haben, darf die Probe bei der zur Verfolgung der Reaktion gewählten Wellenlänge nicht zu stark absorbieren. Die Konzentration der Probe ist bei den Versuchen so zu wählen, dass das eingestrahelte Laserlicht in der Absorptionszelle eine möglichst homogene photochemische Reaktion eingeht. Der Einsatz einer CCD-Kamera zur Bestimmung der Absorptions-Spektren ist mit erheblichen Vorteilen verbunden. Im Vergleich zur punktuellen Messung der Absorption zu einem bestimmten Zeitpunkt bei einer festgelegten Wellenlänge^[75, 80] kann mit der CCD-Kamera wesentlich präziser das Absorptionsverhalten der generierten Spezies gemessen werden.

4.4 Aromatische Aminosäuren als Elektronendonoren

4.4.1 Synthese von 2,4,6-Trimethoxyphenylalaninderivaten

Das substituierte Phenylalaninderivat **45** wurde in einer vierstufigen Synthese, ausgehend von Nitroessigsäure-methylester (**41**) und 2,4,6-Trimethoxybenzaldehyd (**42**), hergestellt (Schema 4.8).^[113]



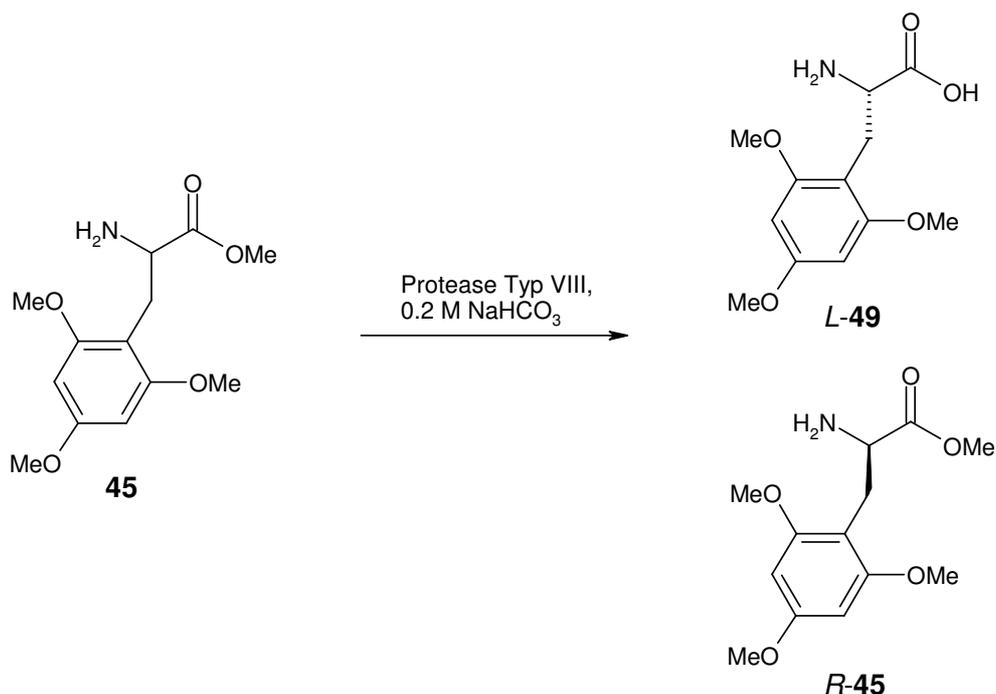
Schema 4.8: Synthese von nicht-natürlichen α -Aminosäuren mit 2,4,6-Trimethoxy-benzyl-Seitenketten.

Die Kondensation der Ausgangsverbindungen in Gegenwart von Dimethylaminhydrochlorid lieferte ein E/Z-Gemisch des α -Nitroacrylsäure-methylesters **43**. Durch die Umsetzung dieser ungesättigten Verbindung mit Natriumborhydrid konnte das racemische 2-Nitro-3-arylpropionat **44** in einer Gesamtausbeute von 51% erhalten werden. Die anschließende durch Palladium katalysierte Reduktion der Nitrofunktionalität lieferte mit 63% Ausbeute 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin-methylester (**45**). Es ist dabei festzustellen, dass die Hydrierung des α -Nitroacrylsäure-methylesters **43** zur Aminosäure **45** in zwei getrennten Stufen durchzuführen ist, da bei direkter Reduktion in alkoholischen Lösungsmitteln größere Mengen an Nebenprodukten gebildet werden.^[114]

Ausgehend von dem Aminosäure-methylester **45** wurden verschiedene Derivatisierungen vorgenommen. So konnte durch Acetylierung des *N*-Terminus der Verbindung **45** mit Essigsäureanhydrid in 80% Ausbeute die Referenzverbindung **47** dargestellt werden. Um den *C*-Terminus der nicht-natürlichen Aminosäure für weitere Manipulationen zugänglich zu machen, wurde der Methylester **45** mit Natriumcarbonat verseift. Durch die anschließende Reaktion mit Essigsäureanhydrid wurde in 63% Gesamtausbeute die acetylierte Aminosäure **48** hergestellt. Wurde nach der Verseifung von **45** die entstandene Carbonsäure mit Di-*tert.*-butyl-dicarbonat umgesetzt, konnte die *N*-terminal geschützte Aminosäure **46** in 80% Gesamtausbeute erhalten werden.

Im Anschluss an die racemische Synthese von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin-methylester (**45**) wurde das Isomerengemisch einer enzymatischen Hydrolyse unterworfen (Schema 4.9, S. 40). Dabei kam die kommerziell erhältliche Protease Typ VIII der Firma Sigma zum Einsatz, über deren erfolgreichen Einsatz bei der enantioselektiven Hydrolyse strukturverwandter Aminosäure-methylester berichtet wurde.^[115] Es konnten allerdings keine Bedingungen gefunden werden, bei denen eine deutliche Anreicherung der *L*-Aminosäure *L*-**49** zu beobachten war. Stattdessen fand unter den beschriebenen basischen Reaktionsbedingungen auch ohne Protease eine schnelle racemische Verseifung des Esters **45** statt.

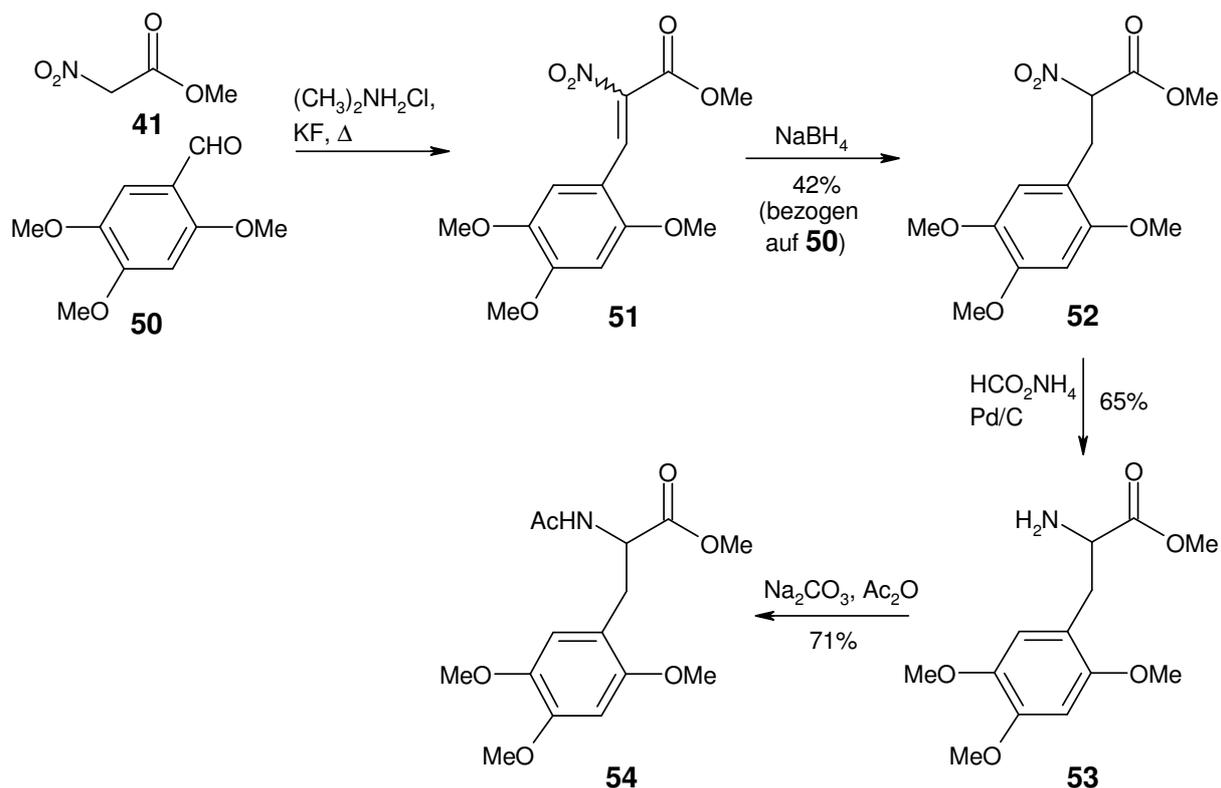
Durch die Überführung des freien Amins **45** in ein Benzylcarbammat konnte diese racemische Esterspaltung unter den gewählten Versuchsbedingungen verhindert werden. Beim Versuch der enantioselektiven Methylesterspaltung mit Hilfe der Protease Papain^[116] und Protease Typ VIII^[117] wurde allerdings kein Umsatz des Substrats beobachtet.



Schema 4.9: Versuch zur enzymatischen Racematspaltung des Methylesters **45** mit Protease Typ VIII (Sigma).

4.4.2 Synthese von 2,4,5-Trimethoxyphenylalaninderivaten

Bei der Synthese der 2,4,5-trisubstituierten Phenylalaninderivate **53** und **54** wurde auf die gleiche Synthesestrategie wie bei der Darstellung von **45** zurückgegriffen.^[113] Die Kondensation von Nitroessigsäure-methylester (**41**) mit 2,4,5-Trimethoxybenzaldehyd (**50**) und die anschließende Reduktion des intermediär gebildeten α -Nitroacrylsäure-methylesters **51** mit NaBH₄ lieferte mit 42% Gesamtausbeute das Arylpropionat **52** (Schema 4.10, S. 41). Durch die Hydrierung der Nitroverbindung **52** mit Palladium auf Aktivkohle, in Gegenwart von Ammoniumformiat als Wasserstoffquelle,^[118] konnte 2,4,5-Trimethoxyphenylalanin-methylester (**53**) in 65% Ausbeute erhalten werden. Die Referenzverbindung **54** wurde durch anschließende Acetylierung der Carbonsäure **53** mit Essigsäureanhydrid in 71% Ausbeute hergestellt.



Schema 4.10: Darstellung von nicht-natürlichen α -Aminosäuren mit 2,4,5-Trimethoxybenzyl-Seitenketten.

4.4.3 Einleitung

Nachdem in Kapitel 4.2.3 ein Konzept vorgestellt wurde, wie ortsspezifisch in Oligopeptiden ein Elektronendonator erzeugt werden kann, beschäftigt sich der folgende Abschnitt mit der Suche nach geeigneten Elektronendonatoren. Bei der Auswahl der Aminosäuren, die sich als Elektronendonatoren eignen, war eine ausgeprägte Absorption der oxidierten Aminosäuren ausschlaggebend. In den Modellverbindungen **37** (Schema 4.6, S. 36) sollte mit Hilfe der Laser-Transienten-Spektroskopie die Kinetik des Elektronentransfers anhand der zeitlichen Veränderung dieser Absorption untersucht werden.

Das bei der Bestrahlung der Radikalvorläufer **37** entstehende Radikalkation **39** sollte aufgrund seines hohen Reduktionspotentials [$E_{\text{red}}(\mathbf{39}^{+\bullet}/\mathbf{39}) = 1.3 - 1.5 \text{ V (NHE)}$]^[78] in der Lage sein, die natürlichen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Histidin zu oxidieren (Tabelle 4.1, S. 42).

Aminosäure	Oxidationspotential (pH = 7, NHE) / V	Referenz
Tyrosin	$E_{\text{ox}}[\text{Tyr}(\text{OH})/\text{Tyr}(\text{O}^{\bullet})] =$	0.93 [79]
Tryptophan	$E_{\text{ox}}(\text{TrpH}/\text{Trp}^{\bullet}) =$	1.02 [79]
Histidin	$E_{\text{ox}}(\text{His}/\text{His}^{\bullet+}) =$	1.17 [111]
Tyrosin(<i>O</i> -methyl)	$E_{\text{ox}}[\text{Tyr}(\text{OMe})/\text{Tyr}(\text{OMe})^{\bullet+}]^{\text{a}} \approx$	1.52 [128]
2,4,6-Trimethoxyphenylalanin	$E_{\text{ox}}(2,4,6\text{-Tmp}/2,4,6\text{-Tmp}^{\bullet+})^{\text{a}} \approx$	1.25 [128]
2,4,5-Trimethoxyphenylalanin	$E_{\text{ox}}(2,4,5\text{-Tmp}/2,4,5\text{-Tmp}^{\bullet+})^{\text{a}} \approx$	0.88 [128]

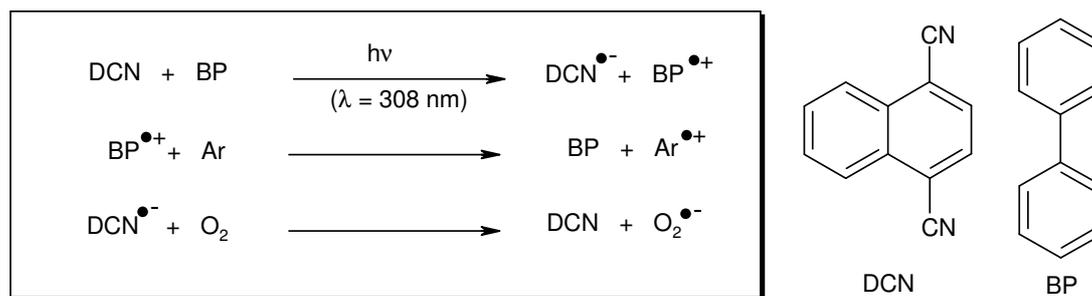
Tabelle 4.1: Oxidationspotentiale verschiedener natürlicher und nicht-natürlicher Aminosäuren. ^aAbschätzung durch den Vergleich mit E_{ox} der aromatischen Seitenkette.

Um ein möglichst großes Repertoire verschiedener Elektronendonoren zur Verfügung zu haben, wurden auch nicht-natürliche Aminosäuren auf ihre Eignung als Elektronendonator überprüft. Dabei boten sich Experimente mit Tyrosin(*O*-methyl), 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin sowie 2,4,5-Trimethoxyphenylalanin an, da diese Aminosäuren ein breites Spektrum bezüglich ihrer Oxidationspotentiale aufweisen und durch das Radikalkation **39** oxidiert werden sollten.

4.4.4 Erzeugung aromatischer Radikale und Radikalkationen durch photosensibilisierten Elektronentransfer

Für die geplanten Untersuchungen von mehrstufigen Elektronentransfer-Prozessen war neben einem geeigneten Oxidationspotential auch eine charakteristische Absorption der oxidierten Donoren erforderlich. Gesucht wurden zwei Aminosäuren, die in ihrer oxidierten Form stark verschiedene Absorptionsmaxima besitzen und dadurch nebeneinander zeitaufgelöst untersucht werden können. In Vorversuchen wurden deshalb die Radikale und Radikalkationen der Aminosäuren aus Tabelle 4.1 sowie deren aromatischer Seitenkette erzeugt und auf ihre Absorptionseigenschaften hin untersucht.

Es ist bekannt, dass elektronenreiche Aromaten mit Hilfe von 1,4-Dicyanonaphthalen (DCN) als Sensibilisator und Biphenyl (BP) als Codonor in polaren, nicht-wässrigen Lösungsmitteln durch photosensibilisierten Elektronentransfer oxidiert werden können (Schema 4.11, S. 43).^[119, 120]



Schema 4.11: Erzeugung aromatischer Radikale und Radikalkationen durch Photosensibilisierung mit 1,4-Dicyanonaphthalen (DCN) und Biphenyl (BP).

DCN wird dabei durch Bestrahlung ($\lambda = 308 \text{ nm}$) in den Singulettzustand angeregt. Durch einen raschen Elektronentransfer kommt es zur Löschung des Singulettzustands von DCN unter Bildung eines Biphenyl-Radikalkations ($\text{BP}^{\bullet+}$). Das dabei gebildete Radikalanion des Sensibilisators ($\text{DCN}^{\bullet-}$) kann in Gegenwart von Sauerstoff abgefangen werden. $\text{BP}^{\bullet+}$ ist ein starkes Oxidationsmittel [$E_{\text{ox}}(\text{BP}/\text{BP}^{\bullet+}) = 1.72 \text{ V (NHE)}$] und oxidiert die zu untersuchenden Aromaten (Ar) aus Tabelle 4.1 (S. 42) diffusionskontrolliert.^[120] Nach etwa $1 \mu\text{s}$ beobachtet man das quantitative Abfangen von $\text{BP}^{\bullet+}$ unter Oxidation der vorgelegten Aromaten.

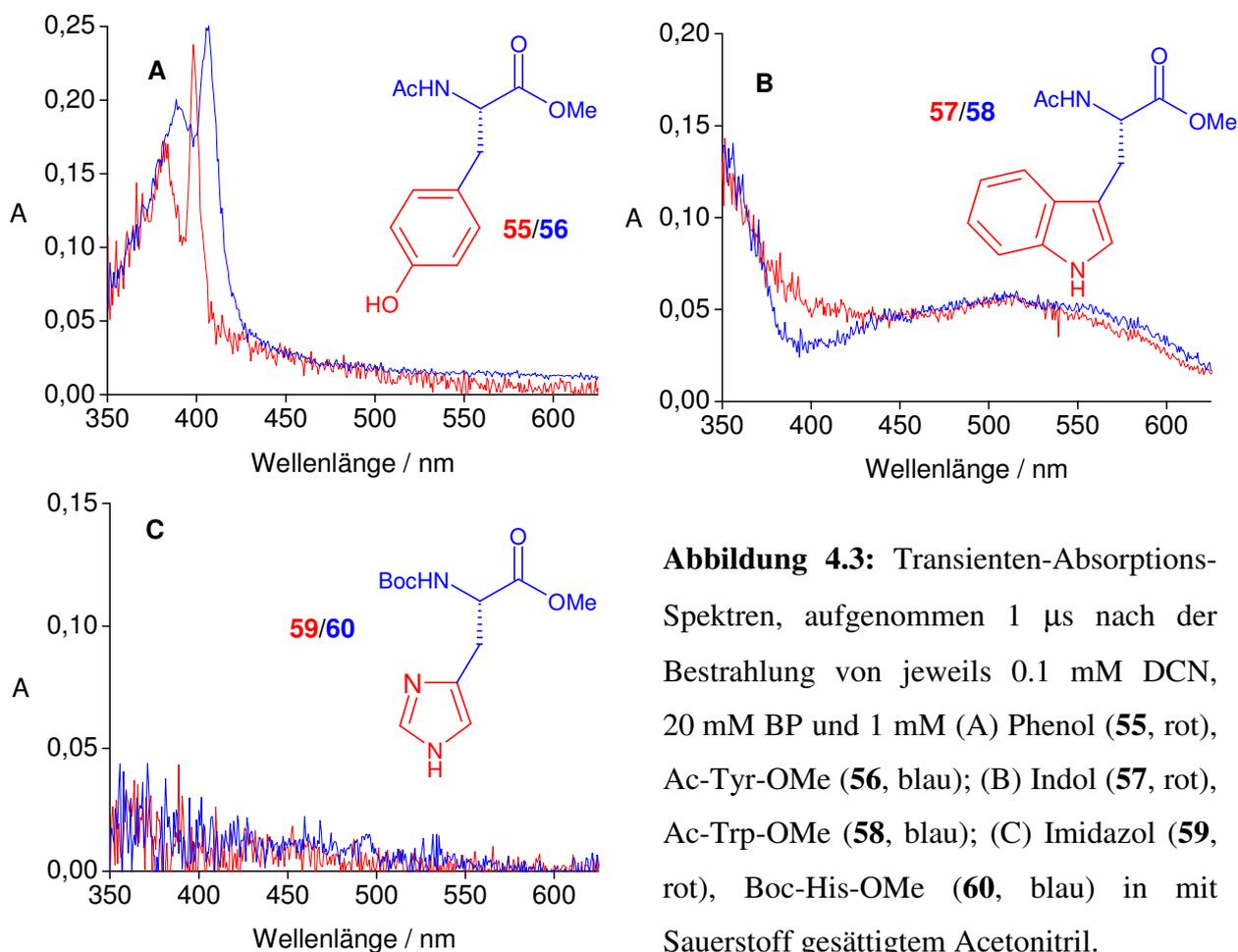
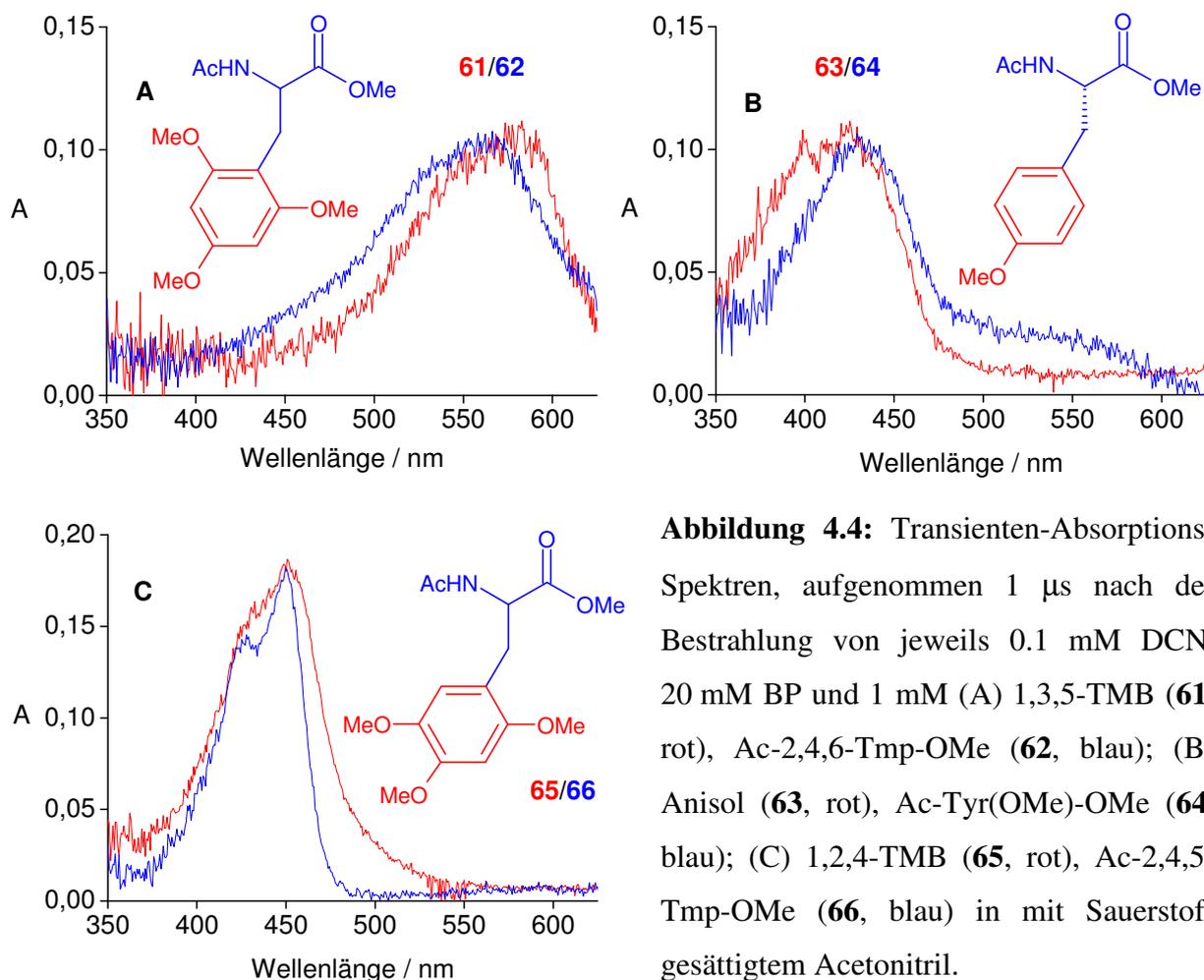


Abbildung 4.3 (S. 43) zeigt die nach 1 μ s erhaltenen Absorptions-Spektren oxidierter natürlicher Aminosäuren sowie deren oxidierten Seitenketten. In Abbildung 4.3 A (S. 43) sind die charakteristischen Spektren des Phenoxyradikals (rot) und des Tyrosylradikals (blau) mit einem scharfen Absorptions-Maximum bei 400 nm bzw. 407 nm zu erkennen.^[121] Abbildung 4.3 B (S. 43) zeigt die breiten Absorptionen mit einem Maximum bei 530 nm, die bei der Oxidation von Indol (**57**, rot) und *N*-Acetyl-tryptophan-methylester (**58**, blau) aufgenommen wurden.^[122] Hingegen konnte bei der Oxidation von *N*-*tert*-Butoxycarbonyl-histidin-methylester (**60**) und Imidazol (**59**) keine charakteristische Absorption zwischen 350 nm und 650 nm gemessen werden (Abbildung 4.3 C, S. 43). Dies steht im Einklang mit anderen Experimenten, wonach dem Radikalkation von Histidin eine schwache Absorption mit einem Maximum bei etwa 250 nm zugeschrieben wird.^[111, 123] Ein Signal in diesem Wellenlängenbereich kann aufgrund der starken Absorption der Probe zwischen 200 - 300 nm nicht verfolgt werden und schließt den Einsatz von Histidin als Elektronendonator für die folgenden Experimente aus.



In Abbildung 4.4 (S. 44) sind die Transienten-Absorptions-Spektren der oxidierten nicht-natürlichen Aminosäuren aus Tabelle 4.1 (S. 42) zusammen mit deren oxidierten Seitenketten dargestellt. Mit einer maximalen Absorption bei 580 nm bzw. 560 nm sind in Abbildung 4.4 A (S. 44) die Spektren des Radikalkations von 1,3,5-Trimethoxybenzol (**61**, rot)^[119] sowie des Radikalkations von *N*-Acetyl-2,4,6-trimethoxyphenylalanin-methylester (**62**, blau) dargestellt. Bei der Oxidation von Anisol (**63**, rot)^[124] und *N*-Acetyl-tyrosin(*O*-methyl)-methylester (**64**, blau) können Absorptions-Spektren mit einem Maximum bei etwa 430 nm festgestellt werden (Abbildung 4.4 B, S. 44). Abbildung 4.4 C (S. 44) zeigt das Transienten-Absorptions-Spektrum des Radikalkations von 1,2,4-Trimethoxybenzol (**65**, rot)^[125] und des Radikalkations von *N*-Acetyl-2,4,5-trimethoxyphenylalanin-methylester (**66**, blau).

Durch die Untersuchung der Absorptions-Spektren verschiedener oxidierte Aminosäuren konnte ein guter Eindruck gewonnen werden, welche oxidierten Spezies in späteren Experimenten nebeneinander beobachtet werden können. So sollte vor allem das scharfe Signal des Tyrosylradikals getrennt von den oxidierten Spezies mit einer Absorption zwischen 500 - 550 nm nachzuweisen sein. Darüber hinaus sollten die durchgeführten Untersuchungen zu einer zweifelsfreien Identifizierung der in späteren Experimenten erhaltenen Absorptions-Spektren beitragen.

4.4.5 UV-Spektren verschiedener natürlicher und nicht-natürlicher Aminosäuren

Vor den eigentlichen Laserexperimenten wurde das Absorptionsverhalten der in Frage kommenden Aminosäuren untersucht. Die Donoren dürfen bei der im Laserexperiment eingestrahlt Wellenlänge nicht absorbieren, da sonst dem Pivaloyl-Chromophor weniger Licht zur Verfügung steht. Bei einer Absorption der aromatischen Aminosäuren besteht zudem die Gefahr einer photochemischen Anregung^[126] oder direkten Photoionisation^[120, 122, 127] der Donoren. Eine Gegenüberstellung der UV-Spektren der Aminosäuren mit dem UV-Spektrum der Radikalvorläufer-Modellverbindung **36** sollte darüber hinaus klären, ob eine Wellenlänge von 308 nm für die Durchführung von Laser-Flash-Photolyseexperimenten geeignet ist.

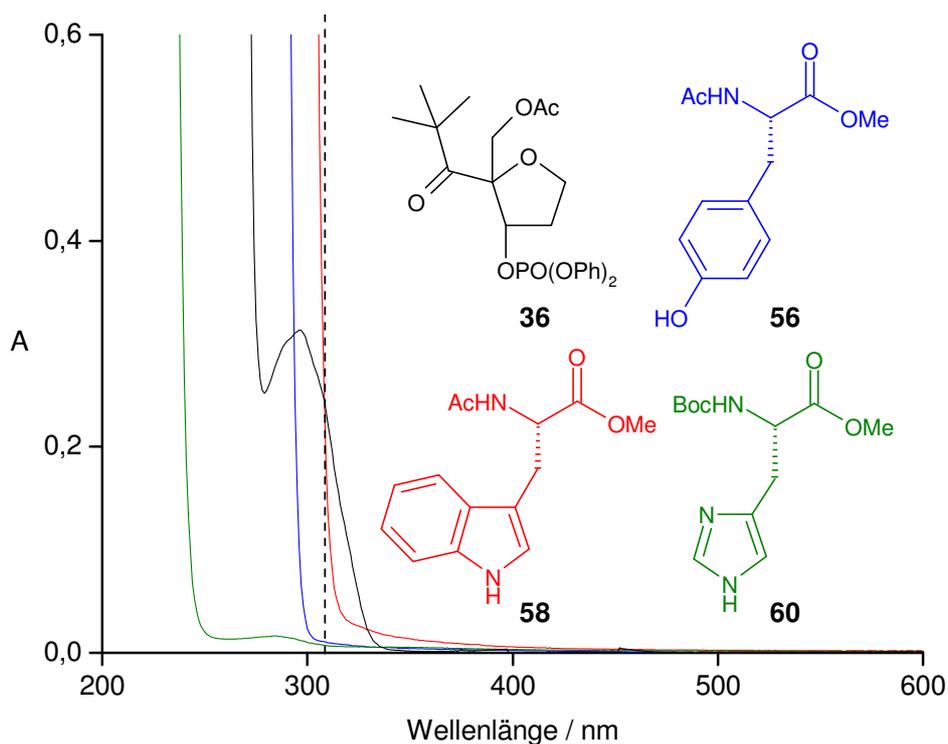


Abbildung 4.5: UV-Spektren einer jeweils 9 mM Lösung **36** (schwarz), **56** (blau), **58** (rot) und **60** (grün) in Acetonitril. Die gestrichelte Linie bei 308 nm symbolisiert das bei der Flash-Photolyse eingestrahelte Laserlicht.

Abbildung 4.5 zeigt die UV-Spektren von *N*-Acetyl-tyrosin-methylester (**56**, blau), *N*-Acetyltryptophan-methylester (**58**, rot) und *N*-*tert.*-Butoxycarbonyl-histidin-methylester (**60**, grün) sowie die Absorption der Radikalvorläufer-Modellverbindung **36** (schwarz).

Zu erkennen ist die $n\text{-}\pi^*$ -Bande des Pivaloylketons **36** mit einem Maximum bei 295 nm ($\epsilon = 33 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Es zeigt sich, dass eine Anregung bei 308 nm in die seitlich ausklingende $n\text{-}\pi^*$ -Bande einstrahlt, ohne nennenswerte Absorption durch die Aminosäuren Histidin (**60**) und Tyrosin (**56**) zu erfahren. Das Tryptophanderivat (**58**) hingegen absorbiert bei 308 nm etwa im gleichen Umfang wie der Pivaloyl-Chromophor in Verbindung **36**. Bei Laser-Flash-Photolyseexperimenten ($\lambda = 308 \text{ nm}$)

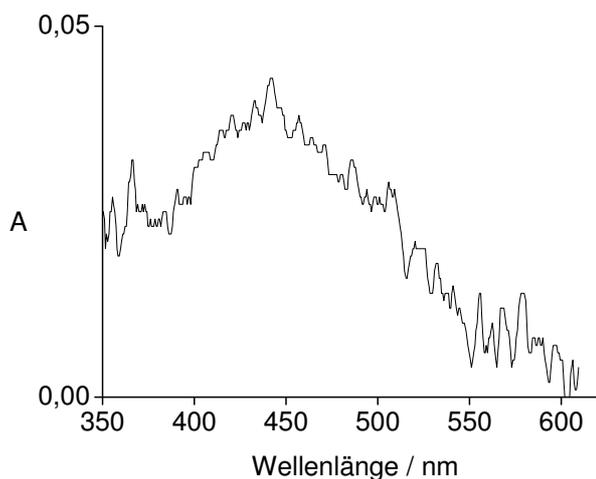


Abbildung 4.6: Transienten-Absorptionsspektrum, aufgenommen 500 ns nach der Bestrahlung ($\lambda = 308 \text{ nm}$) einer 2 mM Lösung Ac-Trp-OMe (**58**) in entgastem Acetonitril.

mit *N*-Acetyl-tryptophan-methylester (**58**) in sauerstofffreiem Acetonitril wurde die Bildung des langlebigen Triplettzustands mit einer charakteristischen Absorption zwischen 400 - 500 nm beobachtet (Abbildung 4.6, S. 46).^[126] Diese Tatsache macht Tryptophan für Laser-Experimente mit einer Anregungswellenlänge von 308 nm ungeeignet.

In Abbildung 4.7 sind die UV-Spektren der nicht-natürlichen Aminosäuren aus Tabelle 4.1 (S. 42) dargestellt. Es wird deutlich, dass weder das Tyrosin(*O*-methyl)-derivat **64** noch das 2,4,6-Trimethoxyphenylalaninderivat **62** bei 308 nm absorbieren. Hingegen zeigt *N*-Acetyl-2,4,5-Trimethoxyphenylalanin-methylester (**66**) bei 308 nm eine starke Absorption. Derivate dieser Aminosäure eignen sich daher nicht als Elektronendonoren in den geplanten Laserexperimenten mit einer Anregungswellenlänge von 308 nm.

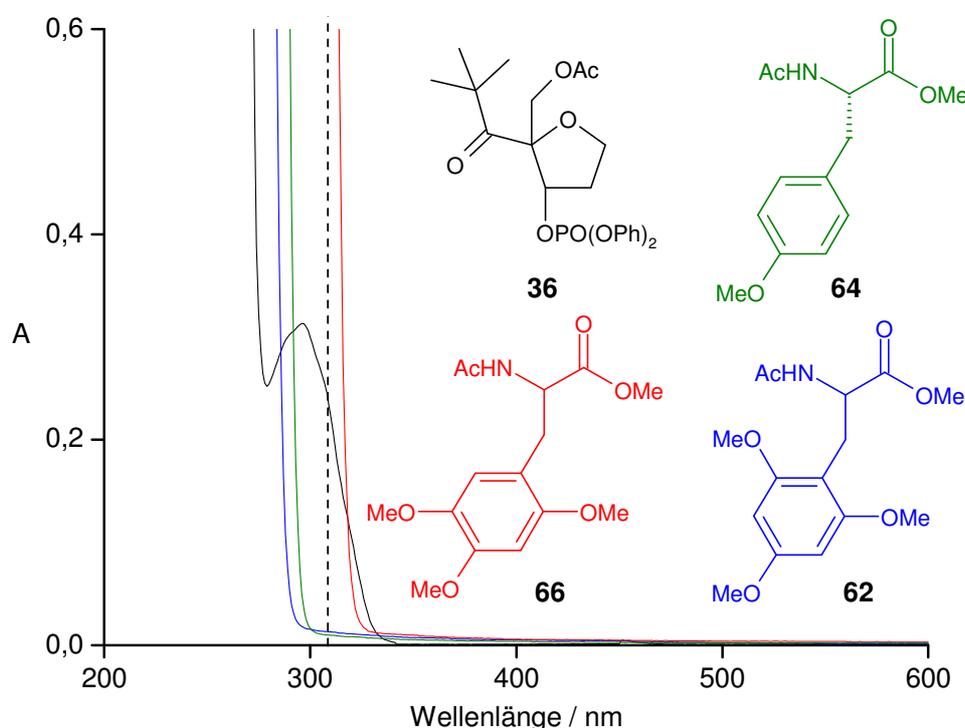


Abbildung 4.7: UV-Spektren einer jeweils 9 mM Lösung **36** (schwarz), **64** (grün), **66** (rot) und **62** (blau) in Acetonitril.

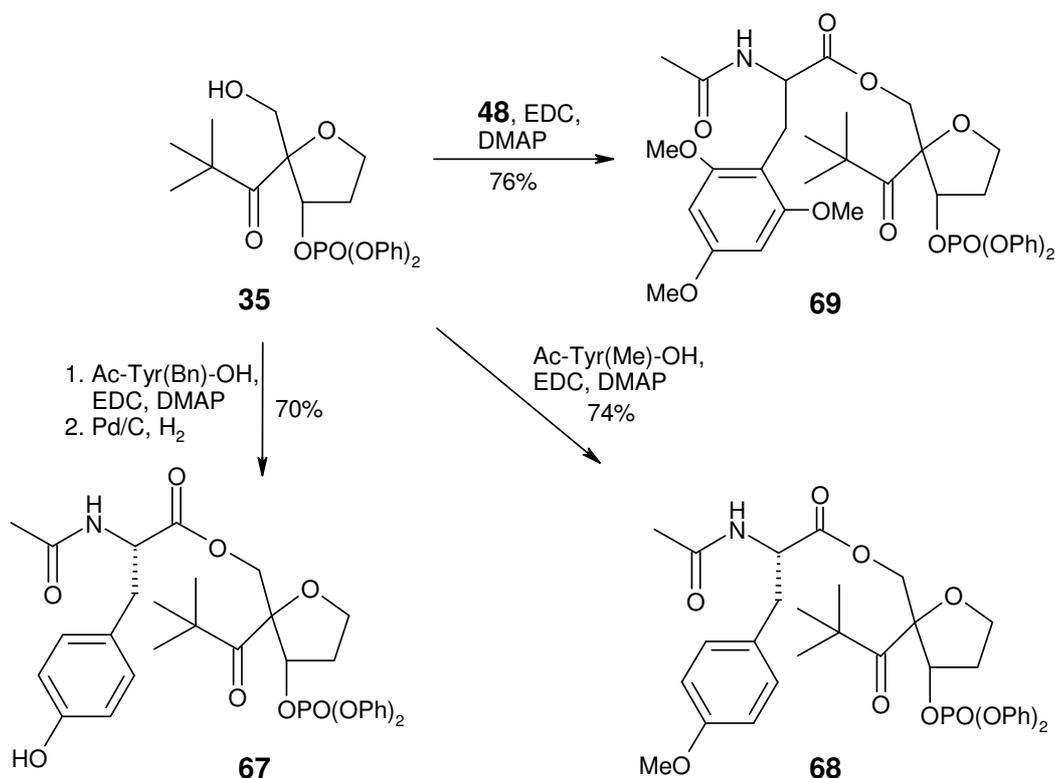
Eine Analyse der UV-Spektren in Abbildung 4.5 (S. 46) und Abbildung 4.7 macht deutlich, dass die Absorption der $n\text{-}\pi^*$ -Bande die Auswahl an potentiellen Elektronendonoren stark einschränkt. In Gegenwart geeigneter aromatischer Aminosäuren löst nur Licht mit einer Wellenlänge zwischen 300 - 320 nm die gewünschten photochemischen Prozesse aus. Der niedrige Extinktionskoeffizient des $n\text{-}\pi^*$ -Übergangs stellt darüber hinaus hohe Anforderungen an die Reinheit der zu bestrahlenden Verbindungen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass den Auswahlkriterien aus Kapitel 4.4.4 und 4.4.5 an die potentiellen Elektronendonoren nur Tyrosin, Tyrosin(*O*-methyl) und 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin standhalten können und für den Einsatz in den geplanten Untersuchungen in Frage kommen.

In den folgenden Experimenten sollten diese Aminosäuren kovalent an den Radikalvorläufer **35** gekuppelt werden. Bei anschließenden Laser-Flash-Photolyseexperimenten sollte in den Donor-Akzeptor-Modellsystemen der intramolekulare Elektronentransfer unter Oxidation der gebundenen Aminosäuren untersucht werden.

4.5 Beobachtung des Elektronentransfers in einfachen Donor-Akzeptor-Systemen

4.5.1 Synthese der Donor-Akzeptor-Systeme **67**, **68** und **69**



Schema 4.12: Veresterung verschiedener aromatischer Aminosäuren mit dem primären Alkohol **35**.

Die Veresterung des primären Alkohols **35** mit freien α -Aminosäuren gelang durch Aktivierung der Carbonsäuren mit *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethyl-carbodiimidhydrochlorid (EDC) und *N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP, Schema 4.12, S. 48).^[118] Gegenüber dem Einsatz anderer Carbodiimide wie z.B. *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) bietet der Einsatz von EDC einen Vorteil: Das bei der Reaktion entstehende EDC-Harnstoffderivat kann unter sauren Bedingungen am Amin-Stickstoff protoniert und anschließend durch wässrige Extraktion entfernt werden.

Mit Hilfe dieser Reaktionsbedingungen gelang die Umsetzung des Tetrahydrofuranderivats **35** und *N*-Acetyl-2,4,6-trimethoxyphenylalanin (**48**) zum Donor-Akzeptor-Modellsystem **69** mit 76% Ausbeute. Bei der Kondensation von **35** mit *N*-Acetyl-tyrosin-(*O*-methyl) wurde eine Ausbeute von 74% des Esters **68** erzielt. Die Veresterung von *N*-Acetyl-tyrosin-(*O*-benzyl) mit dem primären Alkohol **35** und anschließender Palladium-katalysierter Hydrogenolyse des aromatischen Benzylethers lieferte in 70% Gesamtausbeute den *N*-Acetyl-tyrosin-ester **67**.

4.5.2 Einleitung

In den Modellsystemen **67**, **68** und **69** wurden die in Vorversuchen auf ihre Eignung als Elektronendonoren hin überprüften Aminosäuren Tyrosin, Tyrosin(*O*-methyl) und 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin über ihren C-Terminus kovalent mit dem Radikalvorläufer **35** verknüpft. Anhand dieser einfachen Verbindungen sollte in Flash-Photolyseexperimenten geklärt werden, ob das nach der Bestrahlung entstehende Dihydrofuranosyl-Radikalkation tatsächlich in der Lage ist, die gebundenen Aminosäuren zu oxidieren. Die bei den Versuchen erhaltenen Transienten-Absorptions-Spektren sollten mit den durch photosensibilisierten Elektronentransfer erhaltenen UV-Spektren der oxidierten Aminosäuren verglichen werden. Durch zeitaufgelöste Messungen war geplant, einen Eindruck über die Geschwindigkeit des Elektronentransfers in den Modellsystemen zu erhalten. In Versuchsreihen sollte darüber hinaus der Einfluss des Lösungsmittels auf die Experimente untersucht werden. Schließlich sollte durch die Analyse der Photoprodukte der in Schema 4.6 (S. 35) vorgeschlagene Photolysemechanismus untermauert werden.

4.5.3 Photolyseexperimente

Die UV-Spektren der infolge der Laser-Flash-Photolyse von **67**, **68** und **69** entstandenen Radikale wurden in 8 mM Lösung aufgenommen (Abbildung 4.8). Diese relativ hohe Konzentration wurde aufgrund des niedrigen Extinktionskoeffizienten des Pivaloyl-Chromophors gewählt.

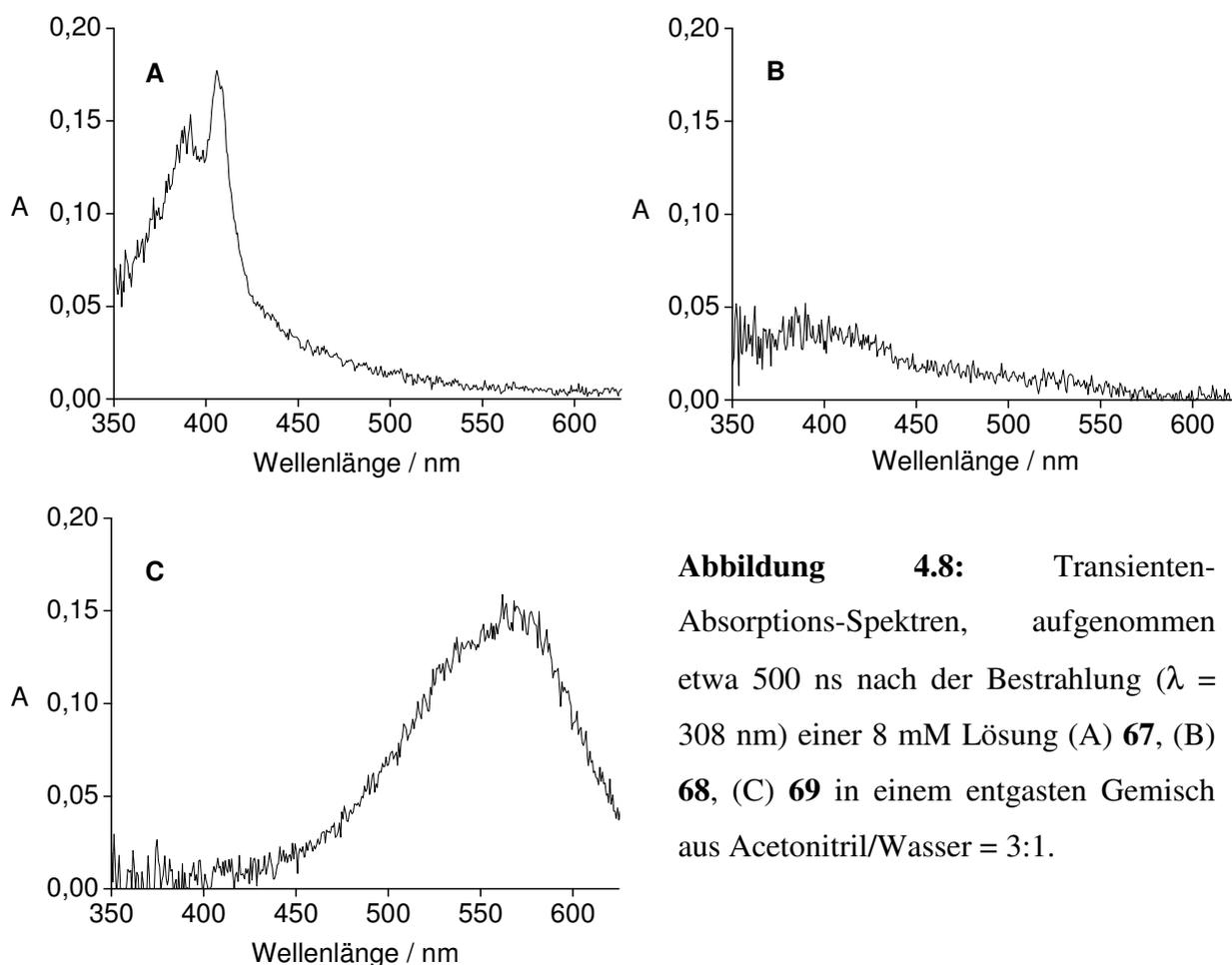


Abbildung 4.8: Transienten-Absorptions-Spektren, aufgenommen etwa 500 ns nach der Bestrahlung ($\lambda = 308$ nm) einer 8 mM Lösung (A) **67**, (B) **68**, (C) **69** in einem entgastem Gemisch aus Acetonitril/Wasser = 3:1.

Abbildung 4.8 A zeigt das nach der Bestrahlung des Modellsystems **67** erhaltene UV-Spektrum. Anhand der zuvor aufgenommenen Absorptions-Spektren oxidierter Aminosäuren kann dieses Spektrum einem Tyrosylradikal zugeordnet werden. Das Transienten-Absorptions-Spektrum der Verbindung **69** (Abbildung 4.8 C) kann durch einen Vergleich mit den Ergebnissen der Vorversuche dem Radikalkation von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin zugeschrieben werden. Die aufgenommenen Spektren liefern somit zusammen mit den Vorversuchen einen stichhaltigen Beleg für die Oxidation der aromatischen Seitenketten in den Modellsystemen **67** und **69**. Bei der Bestrahlung ($\lambda = 308$ nm) der in den Modellsystemen enthaltenen aromatischen Aminosäuren *N*-Acetyl-tyrosin-methylester und *N*-Acetyl-2,4,6-trimethoxyphenylalanin-methylester konnten keine charakteristischen UV-Absorptionen

beobachtet werden. Diese Ergebnisse machen es wahrscheinlich, dass ein Elektronentransfer in den Modellsystemen **67** und **69** für die Oxidation der Aminosäuren verantwortlich ist. Legt man das in Kapitel 4.2.3 abgeschätzte Reduktionspotential für das bei der Photolyse generierte Enolether-Radikalkation (**39**) und die in Tabelle 4.1 (S. 42) aufgeführten Oxidationspotentiale zugrunde, so kann die Triebkraft des Elektronentransfers abgeschätzt werden. Für **67** ergibt sich $-\Delta G = 0.4 - 0.5$ eV, für **69** erhält man $-\Delta G = 0.1 - 0.2$ eV.

Im Gegensatz zu den beiden anderen Verbindungen konnte nach der Bestrahlung von **68** nur eine sehr schwache Absorption festgestellt werden. Ein Vergleich mit dem Spektrum des Radikalkations von *N*-Acetyl-tyrosin(*O*-methyl)-methylester (Abbildung 4.4 B, S. 44) lässt vermuten, dass im Modellsystem **68** keine Oxidation der aromatischen Aminosäure stattfindet. Es ist anzunehmen, dass das Oxidationsvermögen des bei der Bestrahlung gebildeten Dihydrofuranil-Radikalkations (**39**) nicht ausreicht, um innerhalb dessen Lebensdauer die aromatische Seitenkette in **68** zu oxidieren [$E_{\text{ox}}(\text{Anisol}/\text{Anisol}^{\bullet+}) = 1.52$ V (NHE)]^[128]. Dieser Befund bestätigt den Wert, der bei der Abschätzung des Reduktionspotentials von $\text{DHF}^{\bullet+}$ erhalten [$E_{\text{red}}(\text{DHF}^{\bullet+}/\text{DHF}) = 1.29 - 1.44$ V (NHE)]^[78] und als Anhaltspunkt für das Reduktionspotential des Enolether-Radikalkations **39** herangezogen wurde.

Nach Berücksichtigung aller Auswahlkriterien konnte somit gezeigt werden, dass sich von den aromatischen Aminosäuren aus Tabelle 4.1 (S. 42) nur Tyrosin und 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin als Elektronendonoren für die geplanten Experimente eignen. Anhand der aufgenommenen UV-Spektren nach der Bestrahlung von **67** und **69** wird deutlich, dass die oxidierten Spezies dieser Aminosäuren ungestört nebeneinander nachzuweisen sein sollten. Die Experimente zeigen zudem, dass die Absorption des bei der Photolyse intermediär gebildeten Enolether-Radikalkations **39** die Messungen nicht beeinflusst. Die Absorption wird im Bereich von 250 nm erwartet und liegt damit außerhalb des Messbereichs.^[78]

4.5.4 Abhängigkeit von der Lösungsmittelpolarität

Bei der Durchführung von Laser-Flash-Photolyseexperimenten mit den Verbindungen **67** und **69** wurde ein starker Einfluss der Lösungsmittelpolarität auf die Intensität der beobachteten UV-Spektren festgestellt (Abbildung 4.9, S. 52).

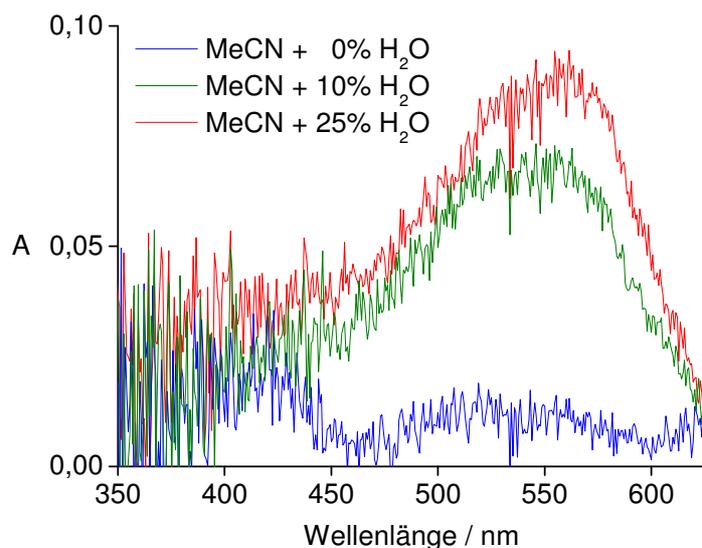
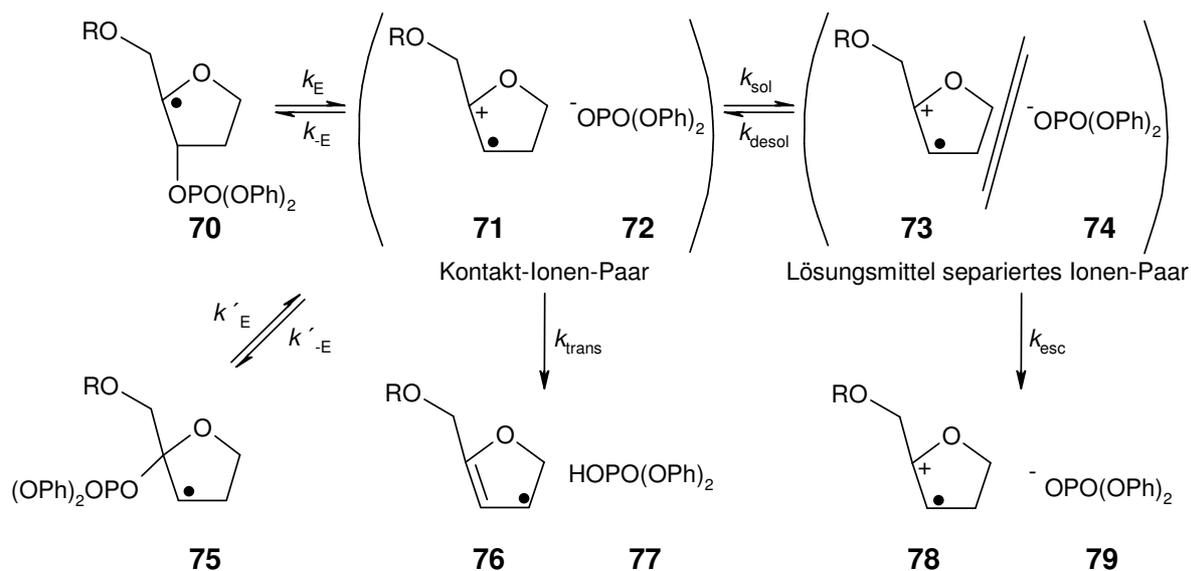


Abbildung 4.9: Transienten-Absorptions-Spektren, aufgenommen jeweils 200 ns nach der Bestrahlung ($\lambda = 308$ nm) einer 8 mM Lösung der Verbindung **69** in entgastem Acetonitril mit 0 - 25 % Citratpuffer (pH = 4).

Bei der Bestrahlung der Modellverbindung **69** wurde exemplarisch der Lösungsmiteleinfluss durch eine schrittweise Erhöhung der Polarität der Reaktionslösung untersucht. So zeigte sich im Vergleich zur entsprechenden Messung in Acetonitril ein starker Anstieg der UV-Absorption nach Zugabe von 10% Citratpuffer (pH = 4). Bei einem Anteil von 25% Citratpuffer in Acetonitril erreichte die Signalintensität ein Maximum, das auch durch Erhöhung des Citratpufferanteils nicht mehr verstärkt werden konnte. Ein analoges Verhalten der Signalintensität konnte in Gemischen aus Acetonitril und destilliertem Wasser beobachtet werden, so dass die folgenden Laser-Flash-Photolysen in einem Gemisch aus Acetonitril/Wasser = 3:1 durchgeführt wurden.

Der beobachtete Sachverhalt steht im Einklang mit neueren Untersuchungen der heterolytischen Spaltung von β -Phosphat-Radikalen.^[129-132] Werden die dort erhaltenen Ergebnisse auf das in dieser Arbeit untersuchte System übertragen, so stehen dem bei der Bestrahlung der Modellsysteme erhaltenen Radikal **70** eine Reihe verschiedener Reaktionspfade zur Verfügung (Schema 4.13, S. 53). So führt die radikalische Heterolyse zur Bildung eines Kontakt-Ionen-Paars (CIP, **71** und **72**), das zum Ausgangsradikal **70** bzw. dessen Isomer **75** rekombiniert, oder unter Bildung eines durch Lösungsmittel separierten Ionen-Paars (SSIP, **73** und **74**) reagiert. Die Bildung des SSIP steht darüber hinaus in Konkurrenz zu einem Protonentransfer unter Entstehung des Allylradikals **76** und des Phosphorsäureesters **77**. Wird das SSIP gebildet, so kann dieses entweder zum CIP zurückreagieren oder zu den freien Ionen **78** und **79** diffundieren.^[130]

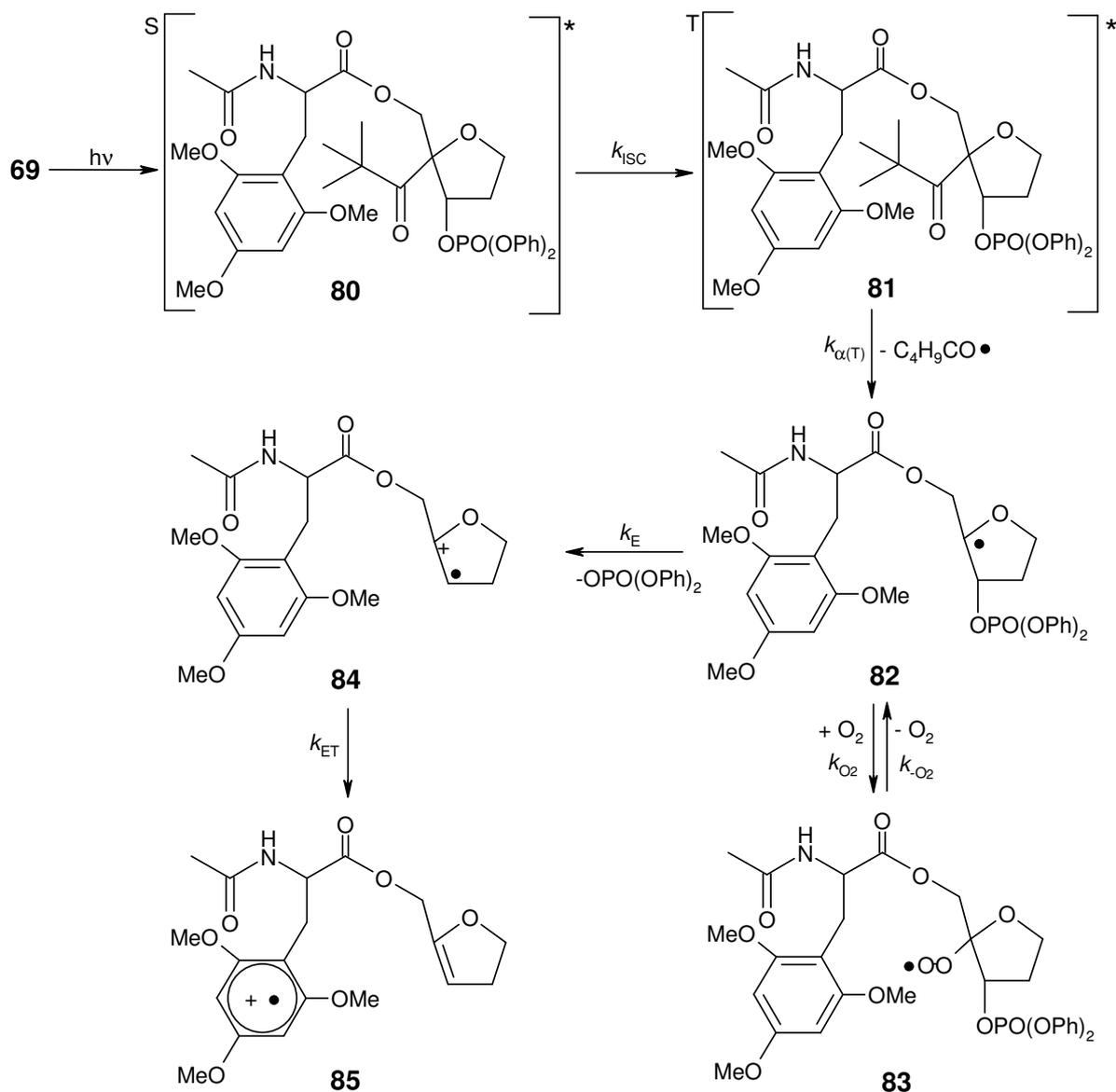


Schema 4.13: Darstellung der möglichen Reaktionspfade des Primärradikals **70**.

Newcomb *et al.* konnten zeigen, dass die Ausbeute an freien Ionen-Paaren (**78** und **79**) sowie die Eliminierungsgeschwindigkeit k_E steigt, wenn die Lösungsmittelpolarität erhöht wird.^[132] Diese Tatsache wird der besseren Solvatisierung der entstehenden Ionen zugeschrieben. Newcomb *et al.* kommen zu dem Schluss, dass für die effektive Heterolyse von β -Phosphat-Radikalen die Polarität von Acetonitril nicht ausreicht.^[129] Da für einen erfolgreichen Elektronentransfer eine hohe Ausbeute an freien Ionen der Art **78** erforderlich ist, ist die geringe Signalintensität bei der Laser-Flash-Photolyse von **69** in Acetonitril (Abbildung 4.9, S. 52) verständlich.

4.5.5 Bestimmung der Geschwindigkeit des β -Bindungsbruches

Neben den qualitativen Untersuchungen des Elektronentransfers in den Modellsystemen **67** und **69** sollte in weiteren Experimenten die Geschwindigkeit des Elektronentransfers bestimmt werden. Um sicherzustellen, dass die dabei gemessenen Werte nicht durch eine langsame Generierung des Radikalkations **39** beeinflusst werden, musste zuerst die Geschwindigkeit des heterolytischen C,O-Bindungsbruchs (k_E) im Primär-Radikal **38** abgeschätzt werden (Schema 4.6, S. 35). Dazu wurden Photolyseexperimente mit der Verbindung **69** in Gegenwart unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen durchgeführt (Schema 4.14, S. 54).



Schema 4.14: Photolysemechanismus von **69** unter aeroben Bedingungen.

Dem Versuch liegt die Tatsache zugrunde, dass das Primärradikal **82** in Gegenwart von Sauerstoff unter Bildung des Peroxids **83** abgefangen werden kann ($k_{O_2} = 2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).^[133] Die anderen Spezies in der Reaktionskaskade hin zum Radikalkation **85** werden in einer ersten Näherung durch Sauerstoff nicht beeinträchtigt. So sollte der intermediär gebildete Tripletzustand **81** aufgrund seiner geringen Lebensdauer ($k_{\alpha(T)} \approx 8 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$)^[105] nicht mit O_2 reagieren. In Vorversuchen wurde zudem sichergestellt, dass die Lebensdauer des Radikalkations **85** durch Sauerstoff nicht beeinflusst wird. Das Peroxid **83** vermag wieder zum Radikal **82** zurückzureagieren, wobei die Reaktion aber nur langsam abläuft ($k_{-O_2} = 1 \text{ s}^{-1}$)^[133] und im Zeitfenster von wenigen Nanosekunden daher vernachlässigt werden kann.

Unter diesen Bedingungen konnte die Geschwindigkeitskonstante der β -Eliminierung durch Variation der Sauerstoffkonzentration bestimmt werden. Dazu wurde in Laser-Flash-Photolyseexperimenten mit **69** anhand der maximalen Absorption bei 550 nm die Ausbeute des Radikalkations **85** in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration $[O_2]$ gemessen. Unter den gegebenen Umständen kann das Verhältnis der Quantenausbeute für das Radikalkation **85** unter anaeroben Bedingungen (Φ_{85}^0), zur entsprechenden Quantenausbeute bei einer bestimmten Sauerstoffkonzentration (Φ_{85}), mit dem Verhältnis der Quantenausbeute für die β -Eliminierung ohne (Φ_E^0) und mit Sauerstoff (Φ_E) gleichgesetzt werden.

$$\frac{\Phi_{85}^0}{\Phi_{85}} = \frac{\Phi_E^0}{\Phi_E} \quad (4.1)$$

Die Gleichung 4.1 kann mit dem Verhältnis der maximalen Absorption bei 550 nm ohne Sauerstoff (A_{\max}^0) zur entsprechenden maximalen Absorption in Gegenwart von Sauerstoff (A_{\max}) ausgedrückt werden und man erhält:

$$\frac{\Phi_E^0}{\Phi_E} = \frac{A_{\max}^0}{A_{\max}} = 1 + \frac{k_{O_2}[O_2]}{k_E} \quad (4.2) \quad \text{und} \quad \frac{1}{A_{\max}} = \frac{1}{A_{\max}^0} + \frac{k_{O_2}}{A_{\max}^0 k_E} [O_2] \quad (4.3).$$

Somit ist es möglich, durch Auftragung der reziproken maximalen Absorption bei 550 nm gegen die Sauerstoffkonzentration, aus der Steigung und dem Achsenabschnitt, die Geschwindigkeitskonstante der β -Eliminierung abzuschätzen (Abbildung 4.10).^[134]

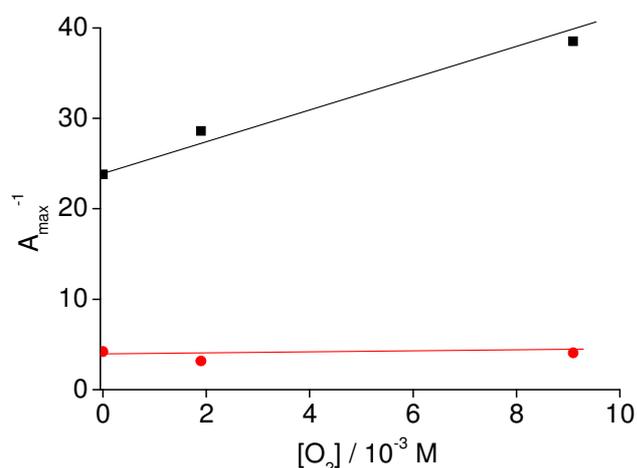


Abbildung 4.10: Auftragung der reziproken Absorptionsamplitude bei 550 nm, erhalten bei der Bestrahlung ($\lambda = 308 \text{ nm}$) einer Lösung aus **69** in Acetonitril (schwarz, $[69] = 8 \text{ mM}$) und Acetonitril/Wasser = 3:1 (rot, $[69] = 7 \text{ mM}$), gegen die Sauerstoffkonzentration.

Unter der Annahme, dass $k_{O_2} = 2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ^[133] ist erhält man in Acetonitril den Wert $k_E(\text{MeCN}) = 3 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$. In dem Gemisch aus Acetonitril/Wasser = 3:1 ist A_{\max}^{-1} im zugänglichen Konzentrationsbereich nahezu unabhängig von $[O_2]$. Dies lässt vermuten, dass unter diesen Bedingungen $k_E > k_{O_2}[O_2]$ gilt.

Eine Auswertung der in Abbildung 4.10 (S. 55) dargestellten Messwerte ermöglicht die Abschätzung: $k_E(\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O} = 3:1) \approx 3 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$. Damit ist sichergestellt, dass bei der Verfolgung von Elektronentransfer-Prozessen in Systemen vom Typ **37**, die Erzeugung des Enolether-Radikalkations (**39**) nicht geschwindigkeitsbestimmend ist, wenn $k_{\text{ET}} < 3 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ ist und als Lösungsmittel Acetonitril/Wasser = 3:1 gewählt wird.

4.5.6 Kinetische Messungen zur Geschwindigkeit des Elektronentransfers

In den Kapiteln 4.1.3 und 4.4.5 wurden die benötigten kinetischen Daten zur Generierung von positiver Ladung in den untersuchten Modellsystemen erarbeitet. Im Folgenden sollte die Geschwindigkeitskonstante des Elektronentransfers (k_{ET}) in den Verbindungen **67** und **69** untersucht werden. Dazu wurde die Oxidation der aromatischen Seitenketten in Laser-Flash-Photolyseexperimenten zeitaufgelöst verfolgt (Abbildung 4.11).

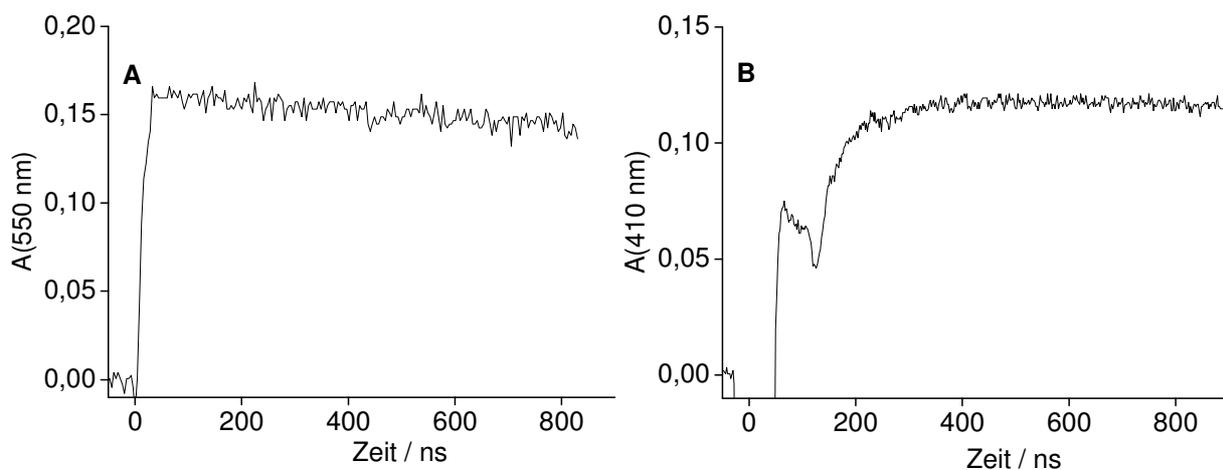


Abbildung 4.11: Zeitaufgelöste Beobachtung der Absorption bei der angegebenen Wellenlänge nach der Bestrahlung ($\lambda = 308 \text{ nm}$) einer (A) 8 mM Lösung aus **69** und (B) 5 mM Lösung aus **67** in einem entgasten Gemisch aus Acetonitril/Wasser = 3:1.

Wie in Abbildung 4.11 A zu erkennen ist, fand bei der Bestrahlung der Verbindung **69** die Oxidation der Seitenkette noch innerhalb des Laserblitzes (25 ns) statt. Somit konnte angenommen werden, dass $k_{\text{ET}}(\mathbf{69}) \geq 4 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ ist.

Anhand des geringeren Oxidationspotentials von Tyrosin im Vergleich zu 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin wurde bei **67** eine noch schnellere Kinetik für den Elektronentransfer erwartet. Bei der zeitlichen Verfolgung der Oxidation von Tyrosin in Verbindung **67** wurde allerdings ein komplizierter Anstieg der Absorption bei 410 nm beobachtet (Abbildung 4.11 B, S. 56). Erst nach etwa 250 ns wurde die maximale Absorption erreicht, sodass $k_{\text{ET}}(\mathbf{67}) \geq 4 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ abgeschätzt wurde. Eine genauere Bestimmung gelang aufgrund der starken Fluoreszenz des Pivaloyl-Chromophors mit einem Maximum bei etwa 410 nm nicht (Abbildung 4.12).

Wegen der starken Fluoreszenz der Probe kam es bei Messungen im Bereich um 400 nm zu einer Überlastung des Photomultipliers. Erst nach 200 - 300 ns lieferte das Gerät wieder verlässliche Werte. Bei 550 nm beobachtete man eine wesentlich geringere Fluoreszenz-Intensität. Daher wurden die kinetischen Messungen bei dieser Wellenlänge nur geringfügig von der Fluoreszenz beeinflusst.

Die Kinetik des Elektronentransfers in den Verbindungen **67** und **69** stellte sich als unabhängig von der Konzentration heraus. Daher wurden die erhaltenen Werte dem intramolekularen Elektronentransfer in den beiden Modellsystemen zugeschrieben.

Die Lebensdauer der gebildeten Radikale weist eine komplexe, von der Konzentration der Lösung abhängige Kinetik auf (Abbildung 4.13). So lässt sich im Fall von **69** das Abklingen des Signals nur durch eine triexponentielle Funktion beschreiben. Berücksichtigt man bei einer Konzentration von 0.5 mM nur

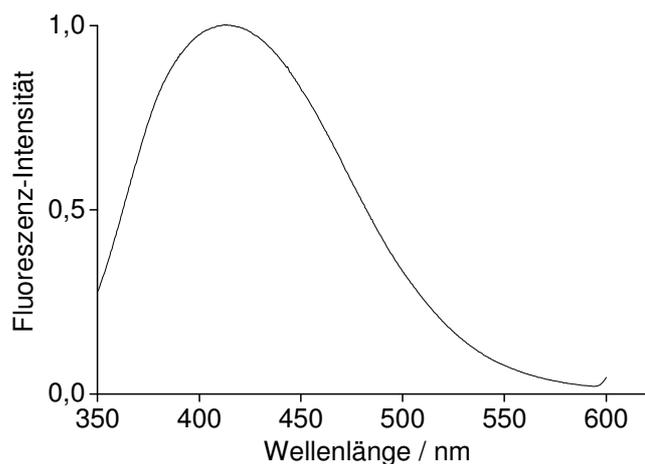


Abbildung 4.12: Fluoreszenz-Spektrum einer 7 mM Lösung der Modellverbindung **36** in Acetonitril. Die Anregungs-Wellenlänge betrug 308 nm.

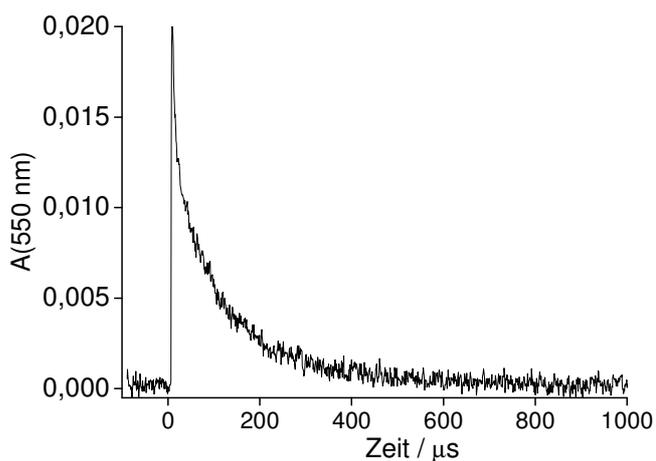


Abbildung 4.13: Zeitaufgelöste Messung der Absorption bei 550 nm nach der Bestrahlung ($\lambda = 308 \text{ nm}$) einer 0.5 mM Lösung von **69** in entgastem Acetonitril/Wasser = 3:1.

die Funktion, die aufgrund ihrer Amplitude den größten Beitrag zur Beschreibung des Abklingens des Signals leistet, so erhält man $k_{\text{decay}}(\mathbf{69}) = 1.1 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$. Die Lebensdauer des 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin-Radikalkations liegt somit im Bereich von 100 μs .

4.5.7 Analyse der Photoprodukte von **67** und **69**

Zur Untermauerung des in Kapitel 4.2.3 vorgeschlagenen Photolysemechanismus wurden die Photoprodukte der Verbindungen **67** und **69** untersucht. Abbildung 4.14 zeigt ein charakteristisches HPLC-Chromatogramm, das nach der Photolyse der Modellverbindung **67** gemessen wurde.

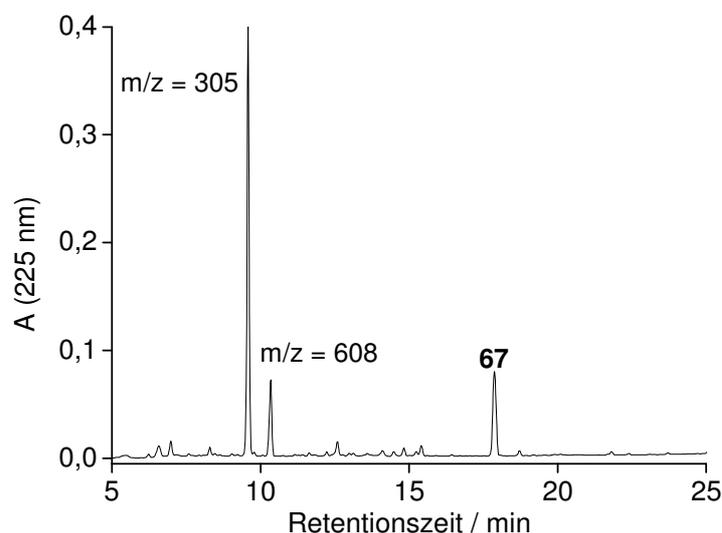
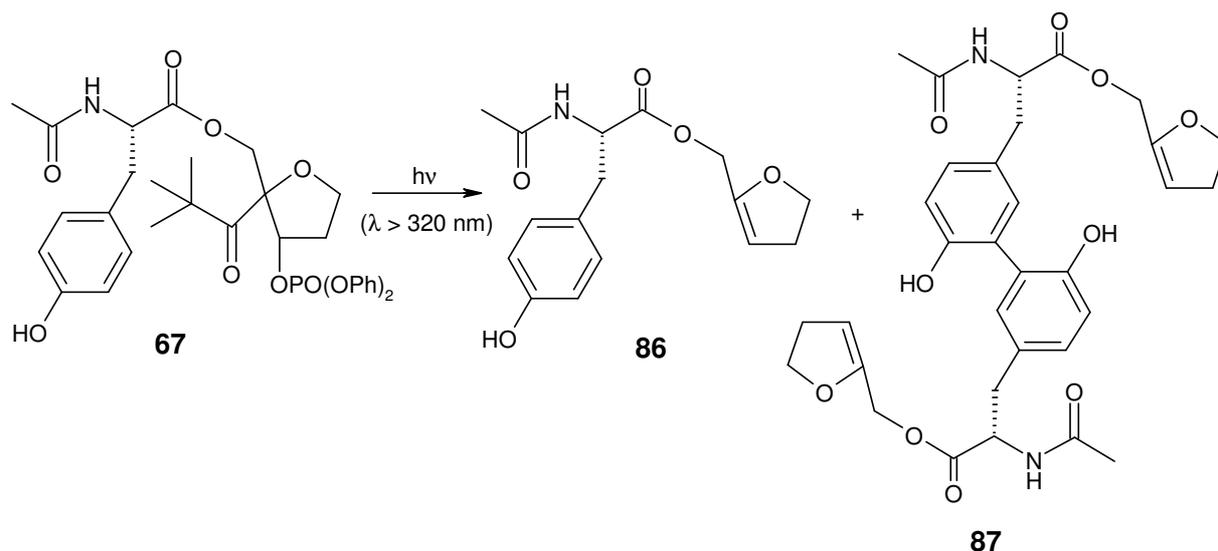


Abbildung 4.14: HPLC-Chromatogramm, erhalten nach der Bestrahlung (10 min / $\lambda \leq 320 \text{ nm}$) der Verbindung **67** in einem mit Argon gesättigten Gemisch aus Acetonitril/Citratpuffer (pH = 5) = 3:1.

Mit einer umsatzbezogenen Ausbeute von etwa 70% lieferte die Bestrahlung von **67** ein Photoprodukt mit $m/z = 305$. Diese Masse konnte dem für einen erfolgreichen Elektronentransfer sprechenden Enolether **86** zugeordnet werden (Schema 4.15, S. 59). Fast 10% umsatzbezogener Ausbeute wurden einem Nebenprodukt mit $m/z = 608$ zugeschrieben. Diese Masse wurde mit der Bildung des Dityrosinderivats des Enolethers (**87**) in Verbindung gebracht (Schema 4.15, S. 59). Über die Entstehung von Dityrosin bei der Bestrahlung von Tyrosinderivaten wurde kürzlich auch bei anderen Untersuchungen berichtet.^[135-137]



Schema 4.15: Photoprodukte bei der Bestrahlung der Modellverbindung **67**.

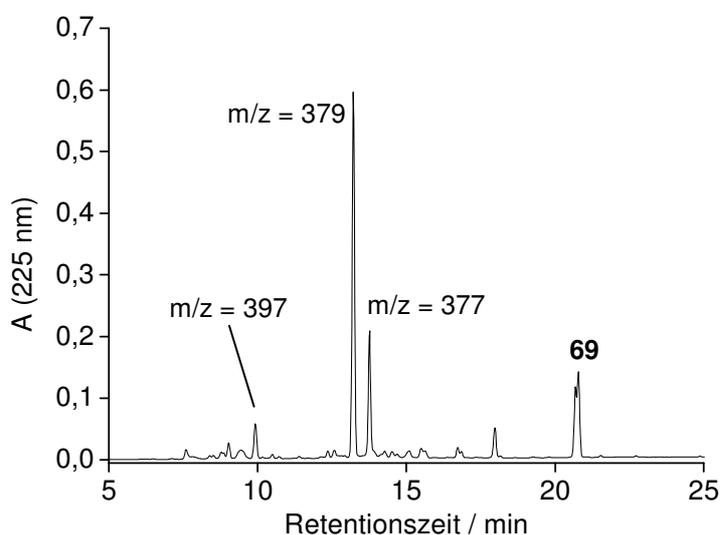
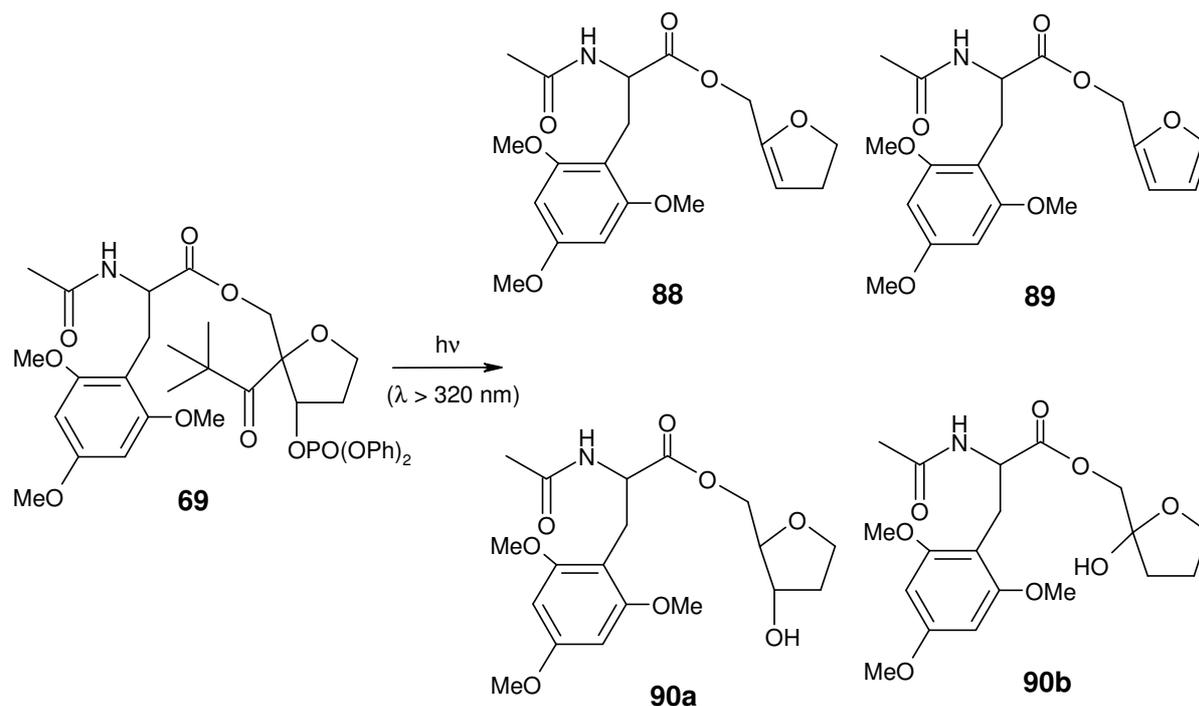


Abbildung 4.15: HPLC-Chromatogramm, erhalten nach der Bestrahlung (10 min / $\lambda \leq 320$ nm) der Verbindung **69** in einem mit Argon gesättigten Gemisch aus Acetonitril/Citratpuffer (pH = 4) = 3:1.

Das HPLC-Diagramm der Photoprodukte, die nach der Bestrahlung der Verbindung **69** erhalten wurden, ist in Abbildung 4.15 dargestellt. Mit 50% umsatzbezogener Ausbeute stellt der Enolether **88** ($m/z = 379$) das Hauptprodukt der Photolyse dar (Schema 4.16, S. 60). Rund 20% umsatzbezogener Ausbeute werden einer Verbindung mit $m/z = 377$ zugeschrieben. NMR-Untersuchungen zeigten, dass es sich bei diesem Produkt um das Furanderivat **89** handelt (Schema 4.16, S. 60). Es ist denkbar, dass sich diese Verbindung im Verlauf einer Nebenreaktion des Enolether-Radikalkations **84** bildet (Schema 4.14, S. 54). Die Radikale der Art **84** sind starke Säuren und können durch Deprotonierung zu einem Allylradikal reagieren.^[129] Eine anschließende Oxidation dieses Allylradikals könnte die Bildung des Photoprodukts **89** erklären. Mit weniger als 5% umsatzbezogener Ausbeute lieferte die Bestrahlung von **69** die Wasserabfangprodukte **90** und **90a** ($m/z = 397$, Schema 4.16, S. 60).^[87]



Schema 4.16: Photoprodukte bei der Bestrahlung der Modellverbindung **69**.

Die Analyse der Photoprodukte nach der Bestrahlung von **67** und **69** bekräftigt somit den in Schema 4.6 (S. 35) vorgeschlagenen Photolysemechanismus. Die Bildung der entsprechenden Enolether als Hauptprodukte der Photolyse von **67** und **69** weist auf einen effektiven Elektronentransfer in den Modellsystemen hin. Im Fall der Verbindung **67** spricht eine Enolether-Gesamtausbeute von rund 80% für einen ausgesprochen selektiven Ablauf des postulierten Photolysemechanismus.

Die bei der Bestrahlung von **69** beobachteten Nebenprodukte, sowie die im Vergleich zu **67** geringere Ausbeute an korrespondierendem Enolether, können durch die verminderte Triebkraft bei der Oxidation von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin erklärt werden. Das intermediär gebildete Radikalkation **84** wird in diesem Fall vermehrt durch Wasseraddition oder Deprotonierung abgefangen.

4.5.8 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Durch die Bestrahlung der Verbindungen **67** und **69** kommt es zu einem Elektronentransfer, in dessen Folge die aromatischen Seitenketten der gebundenen Aminosäuren oxidiert werden. Ein Mechanismus für den photoinduzierten Elektronentransfer wurde in Schema 4.6 (S. 35) vorgeschlagen, der durch eine Analyse der gebildeten Photoprodukte untermauert wurde. Bei der Untersuchung der Photoprodukte zeigte sich, dass der Elektronentransfer in den Modellsystemen mit hoher Effizienz abläuft.

Die Oxidation der aromatischen Aminosäuren in den Modellsystemen **67** und **69** wurde durch die Aufnahme von Transienten-Absorptions-Spektren verfolgt. Durch einen Vergleich der erhaltenen UV-Spektren mit Referenz-Spektren aus Vorversuchen konnten die erzeugten radikalischen Spezies zweifelsfrei als Tyrosylradikal bzw. Radikalkation von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin identifiziert werden. Der photoinduzierte Elektronentransfer in den untersuchten Modellsystemen ist aufgrund der Beteiligung ionischer Intermediate an der radikalischen Fragmentierung stark von der Polarität des Lösungsmittels abhängig. Es gelang ein Lösungsmittelgemisch zu finden, das optimale Reaktionsbedingungen für die Generierung von positiver Ladung in den Modellsystemen gewährleistet.

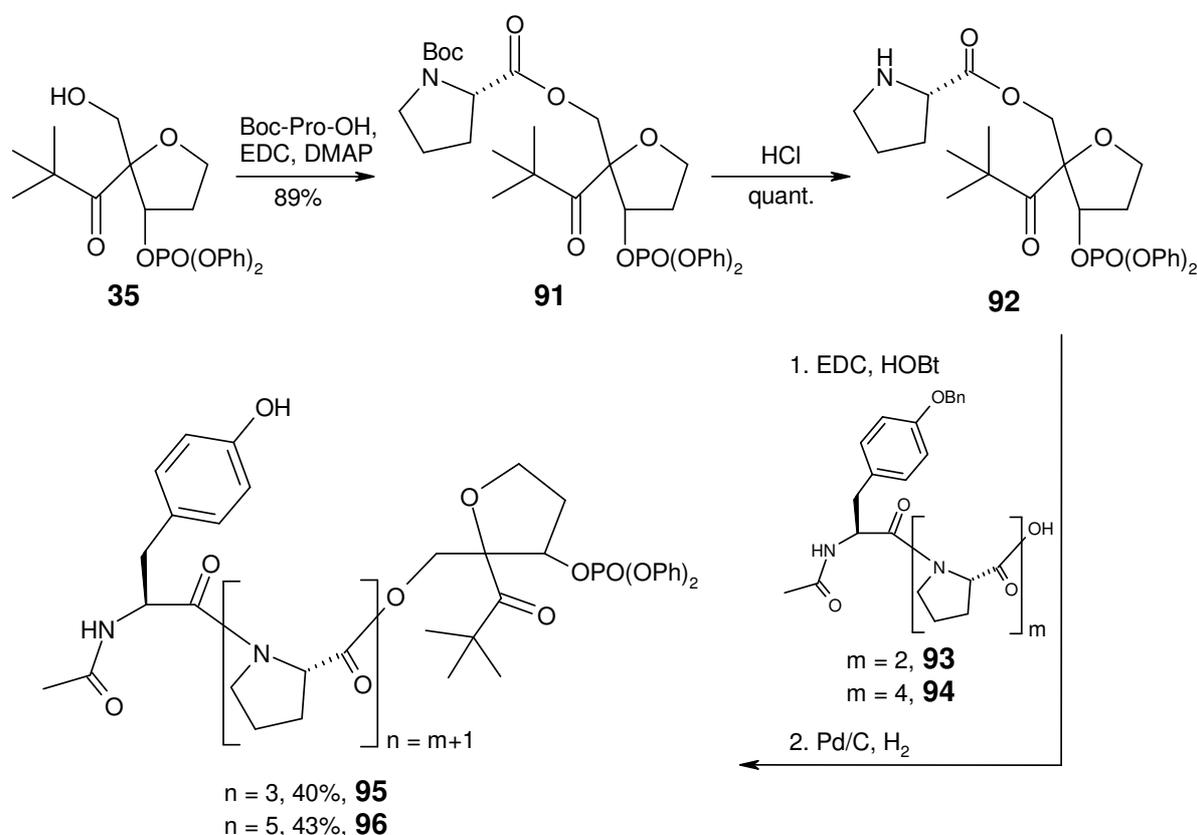
Durch das Abfangen des Primärradikals **82** mit Sauerstoff war es möglich, die Geschwindigkeit des C,O-Bindungsbruchs nach der Bestrahlung von **69** in Acetonitril/Wasser = 3:1 abzuschätzen (Schema 4.14, S. 54). Es wurde gezeigt, dass die positive Ladung in den Modellsystemen mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $k_E(\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O} = 3:1) \approx 3 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ generiert wird. Damit gelang es, die kinetischen Daten zu dem im Schema 4.6 (S. 35) dargestellten Photolysemechanismus zu vervollständigen.

Mit Hilfe zeitaufgelöster Laser-Flash-Photolyseexperimente wurde die Geschwindigkeit der Oxidation der Elektronendonoren in den Modellsystemen **67** und **69** verfolgt. Es zeigte sich, dass die radikalische Fragmentierung der eingesetzten Tetrahydrofuranerivate eine neue erfolgreiche Methode darstellt, Aminosäuren im Sub-Mikrosekunden Zeitraum zu oxidieren. Diese Tatsache erlaubt es, den schnellen Ladungstransfer in komplexeren Oligopeptiden zu untersuchen. Bisher sind nur sehr wenige Methoden bekannt, die Experimente dieser Art ermöglichen.^[84]

4.6 Beobachtung des Elektronentransfers in Oligopeptid-Modellsystemen mit Tyrosin als Elektronendonator

4.6.1 Synthese von Oligopeptid-Modellsystemen mit Tyrosin als Elektronendonator

Die Modellsysteme **95** und **96** konnten, ausgehend von dem Prolinderivat **92** und den Oligopeptiden **93** und **94** hergestellt werden (Schema 4.17). Dieser Syntheseweg wurde gewählt, da bei einer direkten Veresterung der Oligopeptide mit dem primären Alkohol **35** nur geringe Ausbeuten erzielt wurden.



Schema 4.17: Syntheseübersicht zur Darstellung von Oligopeptid-Modellsystemen mit Tyrosin als Elektronendonator.

In der ersten Stufe der Synthesesequenz gelang die Veresterung des Tetrahydrofuranderivats **35** mit *tert.*-Butyloxycarbonyl-prolin unter Aktivierung der Aminosäure mit EDC und DMAP. Das so in 89% Ausbeute zugängliche Boc-geschützte Prolinderivat **91** konnte anschließend mit HCl quantitativ in das freie sekundäre Amin **92** überführt werden. Für die Synthese der Modellverbindung **95**, in der die beiden Redoxzentren durch $n = 3$ Proline voneinander getrennt sind, wurde in einem ersten Schritt das geschützte Tripeptid **93** mit Hilfe der

Kupplungsreagenzien EDC und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) mit dem Amin **92** zur Reaktion gebracht.^[138, 139] Die Hydrierung der Benzylschutzgruppe mit Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle lieferte in einer Gesamtausbeute von 40% das Oligopeptid **95**. Analog konnte das Modellsystem **96** mit $n = 5$ aus dem Amin **92** und dem Pentapeptid **94** in einer Gesamtausbeute von 43% dargestellt werden.

4.6.2 Einleitung

In Kapitel 4.5 wurden die Eigenschaften und die Eignung 2-pivaloyl-modifizierter Tetrahydrofuranerivate als Elektronenakzeptorvorläufer untersucht. Dabei wurden geeignete Elektronendonoren direkt an das photolabile Tetrahydrofuranderivat **35** geknüpft.

In den Oligopeptiden **95** und **96** sind potentieller Elektronenakzeptor und Elektronendonator durch einen Polyprolin-Abstandshalter mit $n = 3$ bzw. 5 Prolineinheiten getrennt. Mittels zeitaufgelöster Laser-Flash-Photolyseexperimente sollte in diesen Oligopeptiden die Geschwindigkeit des Elektronentransfers und dessen Distanzabhängigkeit untersucht werden. Prolin wurde als verbrückende Einheit gewählt, da diese Aminosäure eine hohe Rigidität aufweist. Aufgrund der fixierten N-C α -Bindung zeichnet sich Prolin als die natürliche Aminosäure mit der geringsten Flexibilität aus.^[140]

Bei der Wahl des Elektronendonors in den Modellsystemen **95** und **96** fiel die Entscheidung wegen der hohen biologischen Relevanz auf Tyrosin. So beobachtet man die Oxidation von Tyrosin in einer Vielzahl biologischer Systeme wie etwa dem Photosystem II,^[141] der Ribonucleotid-Reduktase (Klasse I)^[4, 63] oder der Galactose-Oxidase.^[142] Dennoch sind bis heute nur wenige Methoden bekannt, die es erlauben, die Kinetik dieser Reaktionen zu untersuchen.^[84]

Am Anfang der Untersuchungen standen NMR-Experimente in Acetonitril, die die Struktur des Tetrapeptids **95** in Lösung klären sollten. Dabei machte man sich zu Nutze, dass die *cis*- und *trans*-Prolin-Isomere anhand der chemischen Verschiebung ihrer C α -H-Resonanz unterschieden werden können.^[69, 143] So konnte gezeigt werden, dass sich in der Verbindung **95** die zwei Peptidbindungen zwischen den drei Prolinen in *trans*-Konformation befinden. Durch ¹H-NOESY-Messungen gelang es, die Konfiguration der Tyr-Pro-Bindung zu ermitteln. Dabei wurde ein Verhältnis der *trans*- zur *cis*-Konformation von 8:2 festgestellt.

Somit liegt das Tetrapeptid **95** zu 80% in der all-*trans*-Konformation und zu 20% in der *cis-trans-trans*-Konformation vor (Abbildung 4.16).

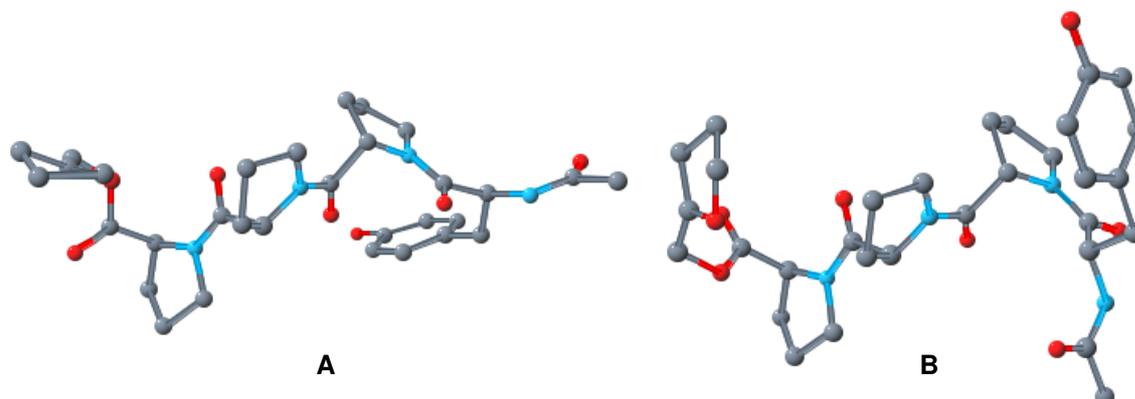


Abbildung 4.16: Berechnete Struktur der (A) all-*trans* Konformation, (B) *cis-trans-trans*-Konformation des Enolether-Radikalkations der Verbindung **95**. Die Konformationen stellen jeweils das globale Minimum dar, berechnet mit MacroModel 7.2 (OPLSAA).

Eine vergleichbare NMR-Untersuchung wurde auch beim Hexapeptid **96** durchgeführt. Die zweifelsfreie Bestimmung der Konformation jeder einzelnen Peptidbindung war hier aufgrund der Vielzahl an Resonanzen mit ähnlicher chemischer Verschiebung allerdings nicht möglich. Es ließen sich aber Anhaltspunkte dafür finden, dass auch diese Verbindung in Acetonitril zu rund 80% in all-*trans*-Konformation vorliegt. NMR-Messungen in Acetonitril/D₂O-Gemischen wurden nicht durchgeführt. Es ist aber zu erwarten, dass sich hier der Anteil an all-*trans*-Konformeren aufgrund der erhöhten Lösungsmittelpolarität weiter vergrößert.^[69]

4.6.3 Photolyseexperimente

Um die Distanzabhängigkeit des Elektronentransfers in den Modellsystemen **67**, **95** und **96** zu prüfen, wurden Lösungen gleicher Konzentration mit Hilfe der Laser-Flash-Photolyse untersucht. Bei der Aufnahme von Transienten-Absorptions-Spektren konnte nach der Bestrahlung in allen drei Modellsystemen die Bildung von Tyrosylradikalen nachgewiesen werden. Dies wurde als Indiz für einen erfolgreichen Elektronentransfer gewertet. Um die

Kinetik des Elektronentransfers in den Oligopeptiden **67**, **95** und **96** zu ermitteln, wurde die Absorption bei 410 nm zeitaufgelöst verfolgt (Abbildung 4.17).

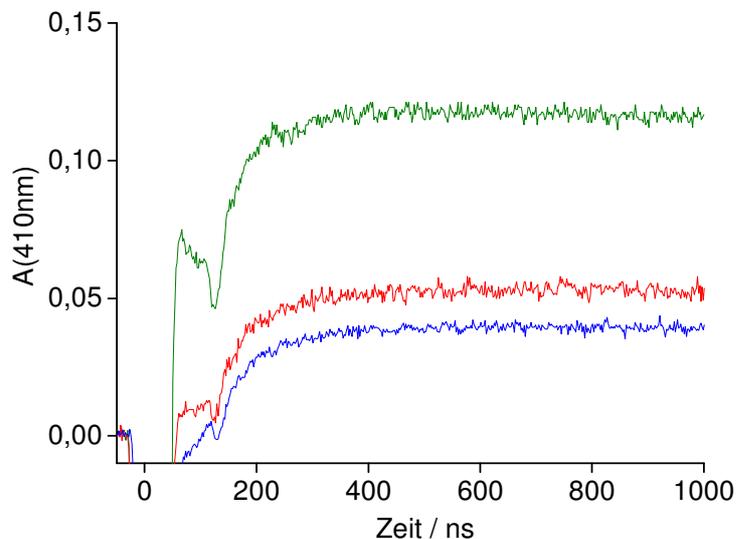


Abbildung 4.17: Zeitaufgelöste Messung der Absorption bei 410 nm nach der Bestrahlung ($\lambda = 308$ nm) von **67** (grün), **95** (rot) und **96** (blau) in entgastem Acetonitril/Wasser = 3:1, bei Konzentrationen von jeweils 4.5 mM.

In Abbildung 4.17 wird deutlich, dass die kinetischen Spuren aufgrund der starken Fluoreszenz der Probe (Abbildung 4.12, S. 57) nur stark gestört aufgenommen werden konnten. Der Anstieg der Signale erfolgt in den Oligopeptiden **67**, **95** und **96** im gleichen Zeitfenster, das der Photomultiplier zur Wiederherstellung der Messbereitschaft benötigt. Bei der zeitaufgelösten Verfolgung des Photomultiplier-Signals bei einer Bestrahlung ohne Messlicht, stellte sich heraus, dass die gemessenen Kinetiken sowie die charakteristischen Signalformen ausschließlich durch die Wechselwirkung der starken Fluoreszenz mit dem Photomultiplier verursacht wurden. Zur Kinetik des Elektronentransfers in den Modellsystemen kann nur gesagt werden, dass dieser in allen Fällen nach rund 400 ns abgeschlossen zu sein scheint. Daher kann vermutet werden, dass $k_{\text{ET}} \geq 3 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ für alle drei Systeme gültig ist. Weitere Aussagen aus dem Experiment lassen sich nur anhand der relativen maximalen Signalintensität des Tyrosylradikals einer Spezies mit $n = i$ Prolinen $[A_{\text{max}}(i)]$ bezüglich der maximalen Signalintensität des Tyrosylradikals einer Spezies mit $n = j$ Prolinen $[A_{\text{max}}(j)]$ erhalten. So entspricht diesem Verhältnis das entsprechende Verhältnis der Quantenausbeute des Elektronentransfers (Φ_{ET}) in den beiden Systemen, wenn man annimmt, dass die Quantenausbeuten für die Generierung des Enolether-Radikalkations ($\Phi_{\text{R}+}$) in beiden Fällen gleich groß sind

$$\frac{A_{\text{max}}(i)}{A_{\text{max}}(j)} = \frac{\Phi_{\text{R}+}(i)\Phi_{\text{ET}}(i)}{\Phi_{\text{R}+}(j)\Phi_{\text{ET}}(j)} = \frac{\Phi_{\text{ET}}(i)}{\Phi_{\text{ET}}(j)} \quad (4.4).$$

Nimmt man in einer Näherung an, dass $\Phi_{\text{ET}}(\mathbf{67}) = 1$ ist, was aufgrund der Photoprodukte von **67** gerechtfertigt zu sein scheint, so erhält man mit Hilfe der Gleichung 4.4 für $\Phi_{\text{ET}}(\mathbf{95}) = 0.46$

und $\Phi_{\text{ET}}(\mathbf{96}) = 0.34$. Die abnehmende Effizienz des Elektronentransfers kann dabei durch die zunehmende Distanz zwischen den Redoxzentren erklärt werden.

4.6.4 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Untersuchungen an den Modellverbindungen **95** und **96** lieferten wichtige Hinweise zur Struktur der Oligopeptide. So war es möglich zu zeigen, dass der Oligoprolin-Abstandshalter in den Modellsystemen unter den gewählten Bedingungen in der *all-trans*-Konformation vorliegt.

Die Aufnahmen von Transienten-Absorptions-Spektren nach der Bestrahlung der Verbindungen **67**, **95** und **96** belegten in allen drei Modellsystemen die Oxidation von Tyrosin. Bei den Experimenten konnte die Kinetik des Elektronentransfers allerdings nicht eindeutig bestimmt werden. Grund war die starke Fluoreszenz der Probe, mit einem Maximum im Wellenlängenbereich, in dem die Absorption der Tyrosylradikale zeitaufgelöst verfolgt werden sollte. Somit konnte nur ein Zeitfenster ermittelt werden, in dem der Elektronentransfer stattzufindet.

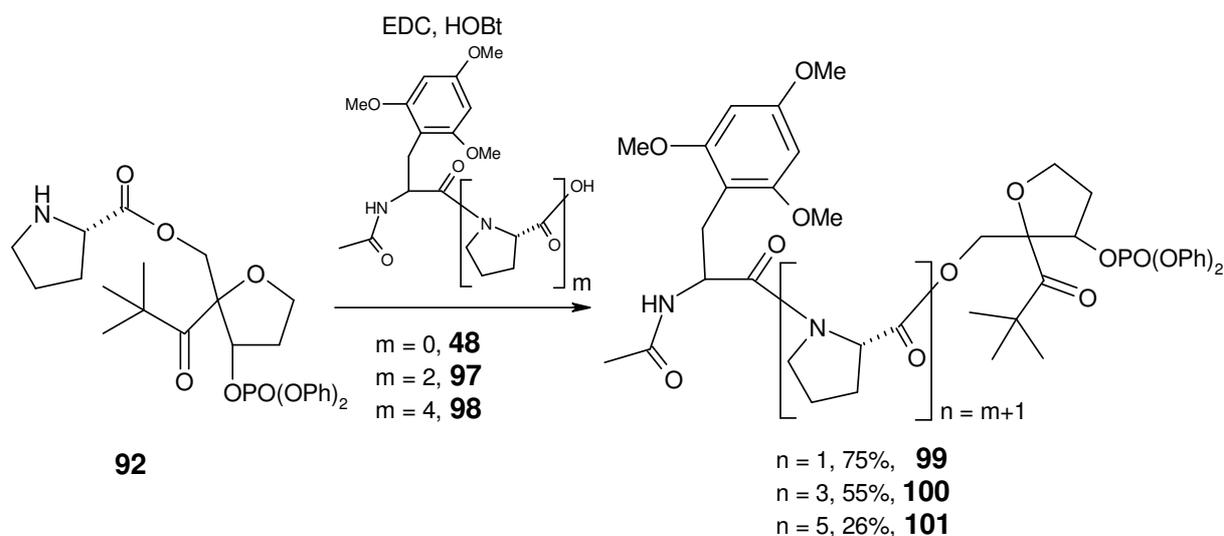
Ein Vergleich der maximalen Intensitäten des Tyrosylradikals lieferte einen Eindruck über die relative Effizienz des Elektronentransfers in den Modellsystemen. Unter der Annahme, dass die Quantenausbeute des Elektronentransfers in Verbindung **67** mit Eins gleichzusetzen ist, konnten absolute Werte für die Quantenausbeute des Elektronentransfers in den Oligopeptiden **95** und **96** abgeschätzt werden. Es wurde festgestellt, dass die Effizienz des Elektronentransfers mit der Anzahl an verbrückenden Prolineinheiten abnimmt.

Um die Kinetik schneller Elektronentransfer-Prozesse in künftigen Experimenten zeitaufgelöst verfolgen zu können, ist es erforderlich den Elektronendonator zu wechseln. Die Absorption des Radikalkations von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin liegt mit 550 nm weit von der maximalen Fluoreszenz der Pivaloylgruppe entfernt. Eine zeitaufgelöste Verfolgung der Oxidation von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin sollte somit nur geringfügig von der Fluoreszenz der Proben beeinträchtigt werden.

4.7 Beobachtung des Elektronentransfers in Oligopeptid-Modellsystemen mit 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin als Elektronendonator

4.7.1 Synthese von Oligopeptid-Modellsystemen mit 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin als Elektronendonator

Die Synthese der Modellverbindungen **99**, **100** und **101** erfolgte analog einer Synthesestrategie, die bereits in Kapitel 4.6.1 beschrieben wurde. Es gelang, das Prolinderivat **92** unter Aktivierung mit EDC und HOBT mit dem C-Terminus der Aminosäure **48** bzw. mit den Oligopeptiden **97** und **98** zu koppeln (Schema 4.18). So konnte ein variabler Abstand von $n = 1$, 3 und 5 Prolinen zwischen dem potentiellen Elektronenakzeptor 2-Pivaloyl-3-diphenoxyphosphoryl-tetrahydrofuran und dem Elektronendonator 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin realisiert werden. Dabei ging die Verlängerung des Polyprolin-Abstandshalters von $n = 1$ über $n = 3$ auf $n = 5$ mit einer Verringerung der Ausbeute von 75% (**99**) über 55% (**100**) bis auf 26% (**101**) einher.



Schema 4.18: Übersicht zur Darstellung der Modellsysteme mit 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin als Elektronendonator.

4.7.2 Einleitung

Das Radikalkation von *N*-Acetyl-2,4,6-trimethoxyphenylalanin-methylester (**62**) zeigt eine breite Absorption mit einem Maximum bei 550 nm (Abbildung 4.4 A, S. 44). Die Kinetik der

Radikalbildung im Verbindung **69** konnte daher weitgehend unbeeinflusst von der Fluoreszenz des Pivaloyl-Chromophors aufgenommen werden. Aus diesem Grund war geplant, die Versuche zur Bestimmung der Distanzabhängigkeit des Elektronentransfers an Donor-Brücke-Akzeptor-Modellsystemen mit 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin als Elektronendonator fortzusetzen. Der Aufbau der Modellsysteme **99**, **100** und **101** erfolgte in Analogie zu den bereits untersuchten Oligopeptiden **95** und **96**. So diente auch bei den im Folgenden behandelten Modellsystemen ein Oligoprolin-Abstandshalter zur Trennung der beiden Redoxzentren. Bei Untersuchungen der Modellsysteme **95** und **96** wurde festgestellt, dass diese Oligopeptide unter den gewählten Bedingungen hauptsächlich in der *all-trans*-Konformation vorliegen (Kapitel 4.6.2). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten der hier beschriebenen Oligopeptide mit den in Kapitel 4.6.2 untersuchten Verbindungen wurde auch für die Modellsysteme **99**, **100** und **101** eine bevorzugte *all-trans*-Konformation angenommen.

Durch die Verwendung von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin als Elektronendonator wurde auch eine mechanistische Vereinfachung der untersuchten Elektronentransfer-Prozesse erwartet. So ist die Oxidation von Tyrosin mit einer Deprotonierung des entstehenden Tyrosyl-Radikalkations gekoppelt.^[144, 145] Daraus resultierende Fragestellungen sind etwa die Reihenfolge des Protonen-gekoppelten-Elektronentransfers (PCET) sowie die Geschwindigkeit des Protonentransfers.^[146] Diese Fragen müssen beim Einsatz von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin als Donor nicht berücksichtigt werden.

4.7.3 Photolyseexperimente

Nach der Bestrahlung der Oligopeptide **69**, **99**, **100** und **101** wurde bei der Aufnahme von Transienten-Absorptions-Spektren in allen Fällen die Bildung des Radikalkations von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin festgestellt. Dies kann als Indiz für einen erfolgreichen Elektronentransfer gewertet werden. Zum Vergleich der Kinetik des Elektronentransfers in den Modellsystemen mit 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin als Donor wurden Lösungen gleicher Konzentration einer Laser-Flash-Photolyse unterworfen (Abbildung 4.18, S. 69).

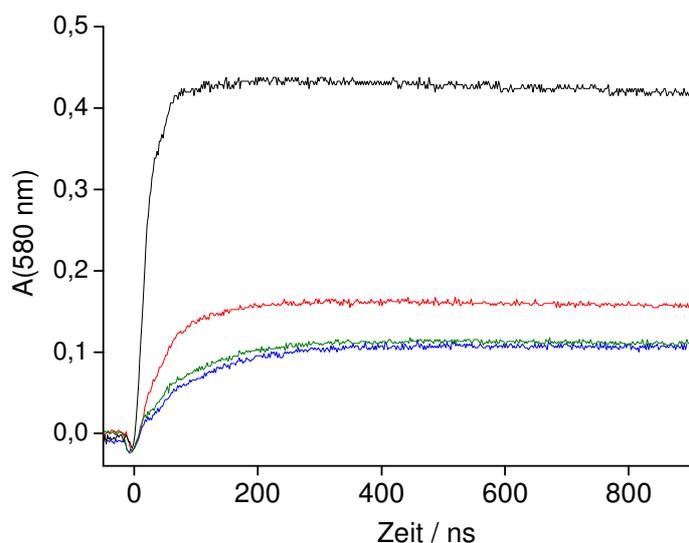


Abbildung 4.18: Zeitaufgelöste Messung der Absorption bei 580 nm nach der Bestrahlung ($\lambda = 308$ nm) von **69** (schwarz), **99** (rot), **100** (grün) und **101** (blau) in entgastem Acetonitril/Wasser = 3:1, bei Konzentrationen von jeweils 8.0 mM.

Verbindung	n	$k_{\text{obs}}^{\text{a}} / \text{s}^{-1}$	$A_{\text{max}}(580 \text{ nm})$
69	0	$> 4 \cdot 10^7$	0.43
99	1	$2.1 \cdot 10^7$	0.16
100	3	$1.3 \cdot 10^7$	0.11
101	5	$1.0 \cdot 10^7$	0.11

Tabelle 4.2: Auswertung der in Abbildung 4.18 dargestellten kinetischen Untersuchungen des Elektronentransfers in den Modellsystemen **69**, **99**, **100**, **101**. ^a Die Messwerte sind mit etwa 10% Fehler behaftet.

In Abbildung 4.18 erkennt man, dass bei 580 nm keine nennenswerte Störung der Messung durch die Fluoreszenz der Probe stattfindet. Die Kinetik der Elektronentransfer-Prozesse konnte somit in den vorliegenden Experimenten durch die Anpassung einer monoexponentiellen Funktion der Art

$$A_t = A_0 (1 - e^{-k_{\text{obs}} t}) \quad (4.5)$$

an den Anstieg der Absorption bei 580 nm bestimmt werden.

Abbildung 4.18 zeigt, dass nach der Bestrahlung der Verbindung **69** ein Signalanstieg bei 580 nm noch innerhalb des Laserblitzes stattfindet. Somit kann die Geschwindigkeit des Elektronentransfers in diesem Fall $\geq 4 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ abgeschätzt werden. Trennt man, wie in Verbindung **99** die beiden Redoxzentren durch eine Prolineinheit, so kann ein drastischer Rückgang der Absorptionsamplitude bei 580 nm beobachtet werden. Die Geschwindigkeit des Signalanstiegs wurde beim Modellsystem **99** zu $k_{\text{obs}} = 2.1 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Bei den Oligopeptiden mit $n = 3$ bzw. $n = 5$ verbrückenden Prolineinheiten konnte eine weitere Reduktion der Signalintensität beobachtet werden. Obwohl sich der Abstand zwischen den Redoxzentren in den Modellverbindungen **100** und **101** deutlich unterscheiden sollte, wurden

sowohl für die Kinetik des Signalanstiegs, als auch für die Absorptionsamplitude bei 580 nm sehr ähnliche Werte festgestellt. Keiner der beobachteten Prozesse scheint langsamer als $1.0 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ abzulaufen. Die gemessenen kinetischen Daten zeigten sich in folgenden Experimenten als konzentrationsunabhängig.

Zur Klärung des beobachteten Sachverhalts ist eine nähere Betrachtung der Reaktionskinetik erforderlich. So stehen den im Verlauf der Bestrahlung gebildeten Enolether-Radikalkationen der Art **39** in einem vereinfachten Reaktionsablauf zwei Reaktionsmöglichkeiten zur Verfügung (Schema 4.6, S. 35): Die Enolether-Radikalkationen können sich mit k_{ET} an einem Elektronentransfer-Prozess beteiligen. Alternativ kann die Ladung des Enolether-Radikalkations in einer Reaktion pseudo-erster Ordnung durch Wasseraddition mit der Geschwindigkeitskonstanten $k_{\text{H}_2\text{O}}$ gelöscht werden.^[86, 87] Das Geschwindigkeitsgesetz bezüglich der Konzentration der Enolether-Radikalkationen $[\text{EE}^{+\bullet}]$ kann daher wie folgt formuliert werden:

$$-\frac{d[\text{EE}^{+\bullet}]}{dt} = k_{\text{ET}}[\text{EE}^{+\bullet}] + k_{\text{H}_2\text{O}}[\text{EE}^{+\bullet}] \quad (4.6).$$

Die Integration der Gleichung 4.6 ergibt

$$\int_{c(\text{EE}^{+\bullet})_0}^{c(\text{EE}^{+\bullet})_t} \frac{d[\text{EE}^{+\bullet}]}{[\text{EE}^{+\bullet}]} = -\int_0^t (k_{\text{ET}} + k_{\text{H}_2\text{O}}) dt \quad (4.7) \quad \text{oder} \quad [\text{EE}^{+\bullet}]_t = [\text{EE}^{+\bullet}]_0 e^{-(k_{\text{ET}} + k_{\text{H}_2\text{O}})t} \quad (4.8).$$

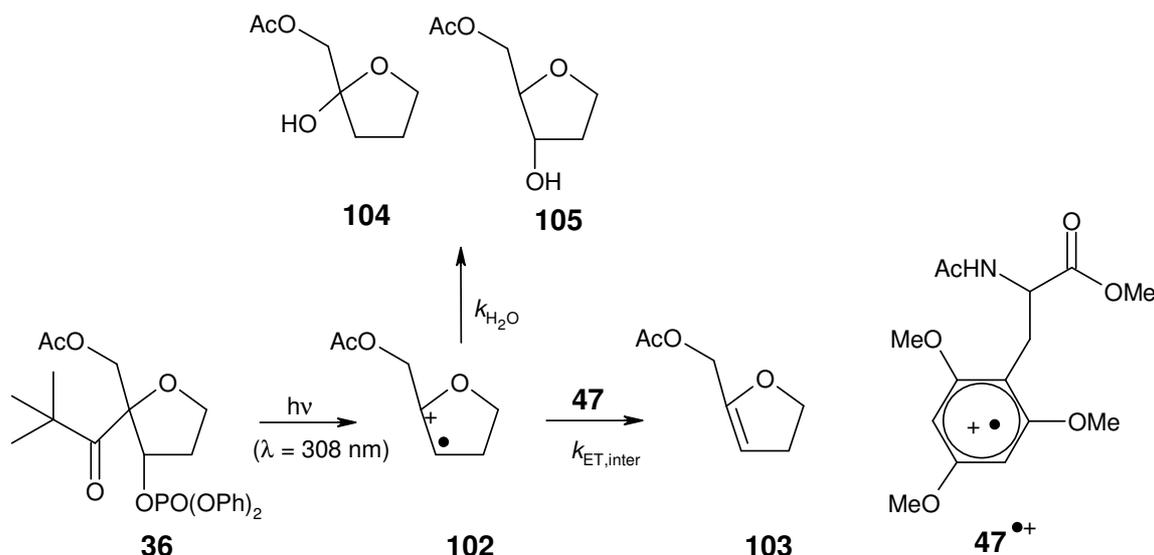
Es kann gezeigt werden,^[147] dass sich aus Gleichung 4.8 für die Konzentration der Radikalkationen von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin $[\text{Tmp}^{+\bullet}]$ im Verlauf des Elektronentransfer-Prozesses folgende Beschreibung ergibt:

$$[\text{Tmp}^{+\bullet}]_t = \frac{k_{\text{ET}}[\text{EE}^{+\bullet}]_0}{(k_{\text{ET}} + k_{\text{H}_2\text{O}})} (1 - e^{-(k_{\text{ET}} + k_{\text{H}_2\text{O}})t}) \quad (4.9).$$

Da nach dem Lambert-Beerschen Gesetz^[147] $[\text{Tmp}^{+\bullet}]$ proportional zu $A(580 \text{ nm})$ ist, kann aus Gleichung 4.9 und Gleichung 4.5 (S. 69) gefolgert werden, dass

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{ET}} + k_{\text{H}_2\text{O}} \quad (4.10).$$

Um den Wert von $k_{\text{H}_2\text{O}}$ zu bestimmen, wurden Bestrahlungen der Radikalvorläufer-Modellverbindung **36** bei unterschiedlichen Konzentrationen an *N*-Acetyl-2,4,6-trimethoxyphenylalanin-methylester (**47**) durchgeführt. Durch die zeitaufgelöste Beobachtung des Signalanstiegs der Absorption bei 550 nm (k'_{obs}) wurde die Oxidation von **47** infolge intermolekularen Elektronentransfers untersucht (Schema 4.19, S. 70).



Schema 4.19: Reaktionsschema des intermolekularen Elektronentransfers zwischen dem Enolether-Radikalkation **102** und der aromatischen Aminosäure **47**.

Eine Argumentation wie die in den Gleichungen 4.6 - 4.10 (S. 70) erläuterte, kann auch zur Beschreibung der bei den folgenden Versuchen gemessenen Geschwindigkeitskonstanten angewendet werden. k'_{obs} ist danach von der Geschwindigkeit der Wasseraddition an das Radikalkation **102** ($k'_{\text{H}_2\text{O}}$), sowie vom Produkt der Geschwindigkeit des intermolekularen Elektronentransfers ($k_{\text{ET,inter}}$) mit der Konzentration des Elektronendonors **47** abhängig:

$$k'_{\text{obs}} = k'_{\text{H}_2\text{O}} + k_{\text{ET,inter}} [\mathbf{47}] \quad (4.11).$$

Trägt man daher k'_{obs} gegen die Konzentration des Elektronendonors **47** auf, so kann aus dem Achsenabschnitt $k'_{\text{H}_2\text{O}}$ abgeschätzt werden (Abbildung 4.19). Für die Geschwindigkeitskonstante $k'_{\text{H}_2\text{O}}$ wurde so ein Wert von rund $8 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ ermittelt. Aus der Steigung der Kurve sollte ein Rückschluss auf $k_{\text{ET,inter}}$ möglich sein. Anscheinend ist das Produkt $k_{\text{ET,inter}} [\mathbf{47}]$ bei den untersuchten Konzentrationen von **47** allerdings deutlich kleiner als $8 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$. Daher ist k'_{obs} im beobachteten Konzentrationsbereich unabhängig von **47**, und eine Bestimmung von $k_{\text{ET,inter}}$ ist aus den vorliegenden Daten nicht möglich. Der ermittelte Wert für $k'_{\text{H}_2\text{O}}$ liegt in der

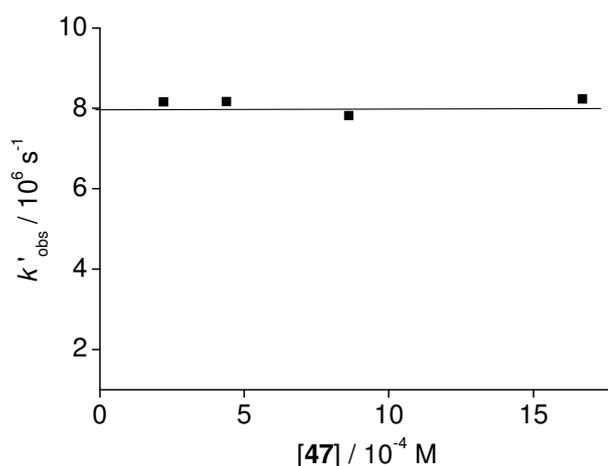


Abbildung 4.19: Auftragung zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten $k'_{\text{H}_2\text{O}}$ bei der Bestrahlung von **36** in Gegenwart von **47**.

gleichen Größenordnung wie andere Messwerte der Wasserabfangreaktion, die bei Versuchen an ähnlichen Systemen erhalten wurden. So wurde für die Geschwindigkeit der Wasserabfangreaktion im Fall des Radikalkations von 4,5-Dihydro-2-methylfuran in Wasser ein Wert von $k_{\text{H}_2\text{O}} = 1 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ gemessen.^[78]

Was können die erarbeiteten Daten zur Klärung der in Tabelle 4.2 (S. 69) aufgeführten Messwerte beitragen? Nimmt man für die untersuchten Modellsysteme **69**, **99**, **100** und **101** ebenfalls eine Geschwindigkeitskonstante von $k_{\text{H}_2\text{O}} = 1 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ für die Wasseraddition an, so erhält man durch Einsetzen in Gleichung 4.9 (S. 70):

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{ET}} + 1 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1} \quad (4.12).$$

Findet demnach in einem der beschriebenen Modellsysteme ein Elektronentransfer-Prozess mit einer Geschwindigkeit deutlich kleiner als $1 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ statt, so bildet die gemessene Geschwindigkeit k_{obs} nur die Wasserabfangreaktion ab, nicht aber k_{ET} .

4.7.4 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

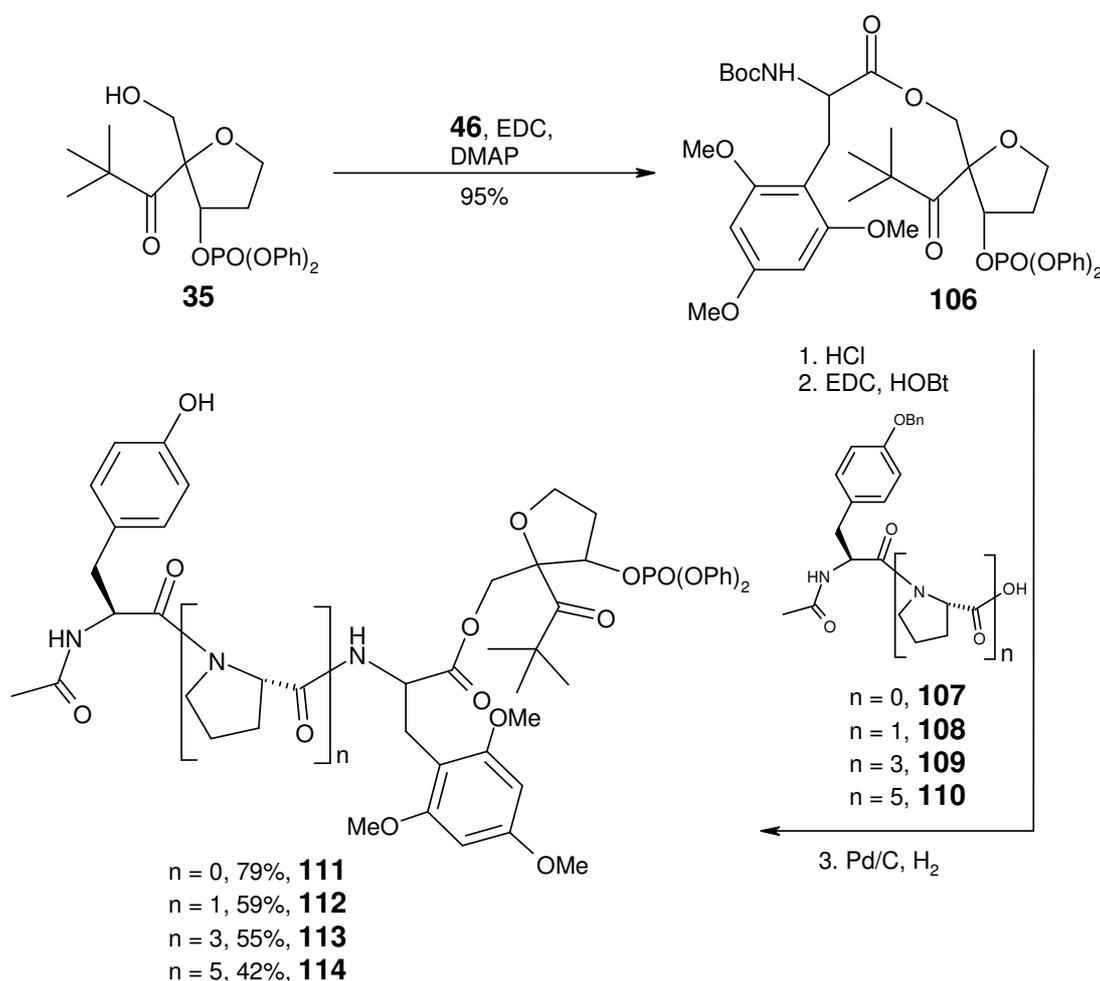
Der Einsatz von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin in den Oligopeptiden **69**, **99**, **100** und **101** ermöglichte die Messung der Kinetik von Elektronentransfer-Prozessen ohne Beeinträchtigung durch die Fluoreszenz der Proben. Dabei fiel auf, dass trotz Unterschiede bei der Anzahl der verbrückenden Prolineinheiten in den Modellsystemen **99** ($n = 1$), **100** ($n = 3$) und **101** ($n = 5$), ähnliche Geschwindigkeitskonstanten für den Signalanstieg bei 580 nm beobachtet werden konnten. Keiner der untersuchten Prozesse schien langsamer als $1 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ abzulaufen.

Es wurde deutlich, dass die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) als Summe der Geschwindigkeitskonstanten des Elektronentransfers (k_{ET}) und der Wasserabfangreaktion der Enolether-Radikalkationen ($k_{\text{H}_2\text{O}}$) beschrieben werden können. Durch eigene Messungen und vergleichbare Messungen in der Literatur^[78] wurde $k_{\text{H}_2\text{O}} \approx 1 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ abgeschätzt. Die Lebensdauer $\tau = 1/k_{\text{H}_2\text{O}}$ von Radikalkationen der Art **102** in Wasser beträgt somit nur rund 100 ns. Die Wasseraddition überlagert daher in den Verbindungen **99**, **100** und **101** Elektronentransfer-Prozesse, die langsamer als $1 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ ablaufen. Die gemessenen Signale unterscheiden sich somit nicht mehr in der Kinetik, nur noch in der Absorptionsamplitude.

4.8 Untersuchung mehrstufiger Elektronentransfer-Prozesse

4.8.1 Synthese von Oligopeptid-Modellsystemen mit 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin als intermediärem und Tyrosin als finalem Elektronendonator

Ziel der Synthese war die Darstellung von Oligopeptiden, in denen die beiden aromatischen Aminosäuren 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin und Tyrosin durch eine variable Anzahl von *n* Prolinen voneinander getrennt werden. Dazu wurde in einem ersten Schritt *N*-tert.-Butyloxycarbonyl-2,4,6-trimethoxyphenylalanin (**46**) unter Aktivierung mit EDC und DMAP in einer Ausbeute von 95% mit dem Alkohol **35** verestert (Schema 4.20).



Schema 4.20: Synthese der Oligopeptid-Modellsysteme **111** - **114** zur Untersuchung von Elektronentransfer-Kaskaden.

Mit HCl konnte im Anschluss der *N*-Terminus der Verbindung **106** quantitativ freigesetzt werden. Das entstandene Hydrochlorid wurde mit Hilfe der Kupplungsreagenzien EDC und HOBT mit der Aminosäure **107** bzw. den Oligopeptiden **108**, **109** und **110** zur Reaktion

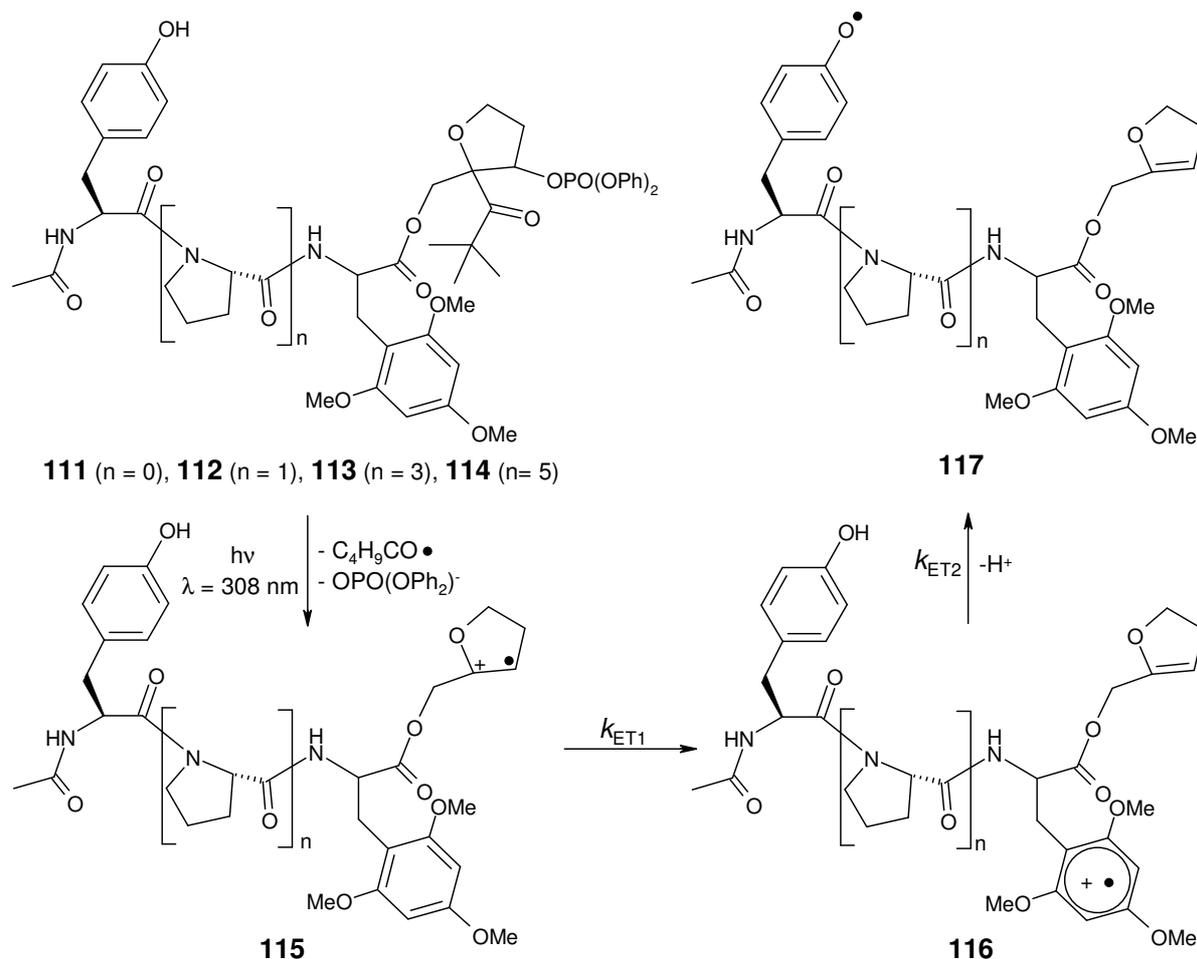
gebracht. Der Abstand zwischen den Redoxzentren in den Zielmolekülen ist dabei durch die Anzahl n der Prolinbausteine in den gekuppelten Oligopeptiden bestimmt. In der letzten Stufe führte die Palladium-katalysierte Hydrogenolyse der Tyrosin-(*O*-benzyl)-ether in Gesamtausbeuten von 79% (**111**) bis 42% (**114**) zu den Zielverbindungen.

4.8.2 Einleitung

In den folgenden Experimenten sollten mehrstufige Elektronentransfer-Prozesse untersucht werden. Ziel war es, die bei der Bestrahlung der Modellsysteme generierte positive Ladung in einem ersten Elektronentransfer-Schritt zu einem intermediären Elektronendonator zu übertragen. In einem zweiten Schritt sollte die Ladung zu einem finalen Elektronendonator transportiert werden. Es war geplant, diesen Prozess mit Hilfe der Laser-Flash-Photolyse zeitaufgelöst zu beobachten. Im Kapitel 4.4.4 konnte bereits gezeigt werden, dass das Radikalkation des 2,4,6-Trimethoxyphenylalaninderivats **62** eine charakteristische Absorption mit einem Maximum bei 550 nm aufweist. Das durch Oxidation der Verbindung **56** generierte Tyrosylradikal zeigt eine scharfe Absorption bei 410 nm. Die beiden oxidierten Spezies sollten somit ungestört nebeneinander nachzuweisen sein. Die Oxidationspotentiale der beiden Aminosäuren machten es erforderlich, in einem ersten Schritt 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin zu oxidieren. Das dabei gebildete Radikalkation $[E_{\text{ox}}(2,4,6\text{-Tmp}/2,4,6\text{-Tmp}^{\bullet+}) \approx 1.25 \text{ V (NHE)}]^{[128]}$ sollte in der Lage sein, in einem zweiten Elektronentransfer-Schritt Tyrosin zu oxidieren $\{E_{\text{ox}}[\text{Tyr}(\text{OH})/\text{Tyr}(\text{O}^{\bullet})] = 0.93 \text{ V (NHE, pH = 7)}\}^{[79]}$. Der geplante Reaktionsablauf hat Modellcharakter für Elektronentransfer-Kaskaden in biologischen Systemen. So steht zum Beispiel auch bei der Photoaktivierung von DNA-Photolyase aus *A. nidulans* die Oxidation von Tyrosin am Ende eines mehrstufigen Elektronentransfer-Prozesses^[67]. Die Ladung wird dabei analog Schema 2.9 (S. 17) entlang einer konservierten Tryptophan-Triade an die Oberfläche des Enzyms geleitet. Im Enzym sind im Umkreis von 5 Å um die an der Kaskade beteiligten Tryptophane keine Protonenakzeptoren vorhanden. Daher wird vermutet, dass die am Elektronentransfer-Prozess teilhabenden Tryptophan-Radikalkationen keine Möglichkeit zur Deprotonierung ($\text{p}K_{\text{a}} = 4.5$)^[63] haben und damit in protonierter Form an der Kaskade partizipieren. Ein protoniertes Tryptophan-Radikalkation ist ein stärkeres Oxidationsmittel $[E_{\text{ox}}(\text{TrpH}/\text{TrpH}^{\bullet+}) = 1.15 \text{ V (NHE)}]^{[148]}$ als das neutrale deprotonierte Tryptophanyl-Radikal

$[E_{\text{ox}}(\text{TrpH}/\text{Trp}^\bullet) = 0.89 \text{ V (NHE)}]^{[63]}$ und kann daher im Redoxverhalten durchaus mit 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin verglichen werden.

In den geplanten Kaskaden-Experimenten war es erforderlich, die Ladung der durch Bestrahlung der Modellsysteme **111** - **114** entstandenen Enolether-Radikalkationen (**115**) schnell auf einen intermediären Elektronendonator zu übertragen (Schema 4.21).



Schema 4.21: Reaktionsablauf des mehrstufigen Elektronentransfers nach der Bestrahlung der Oligopeptid-Modellsysteme **111** - **114**.

In den untersuchten Modellsystemen wurde 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin daher direkt an den Radikalvorläufer **35** geknüpft. Damit sollte gewährleistet werden, dass es innerhalb der Lebensdauer der Enolether-Radikalkationen **115** ($\tau \approx 100 \text{ ns}$, Kapitel 4.7.3) zum ersten Elektronentransfer-Schritt (k_{ET1}) mit hoher Effizienz kommt. Das dabei gebildete Radikalkation von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin (**116**) hat eine Lebensdauer von rund $100 \mu\text{s}$ (Abbildung 4.13, S. 57). Diese Tatsache sollte es ermöglichen, im Folgenden auch langsame Elektronentransfer-Prozesse ($k_{\text{ET2}} > 10^4 \text{ s}^{-1}$) zwischen dem intermediären und dem finalen Elektronendonator zeitaufgelöst zu beobachten. Zur Untersuchung der Distanzabhängigkeit des

Elektronentransfers wurde in den Oligopeptiden **111** - **114** der Abstand des intermediären Elektronendonors zum finalen Elektronendonator variiert. Zum Einsatz kamen dabei $n = 0, 1, 3$ und 5 verbrückende Prolineinheiten.

4.8.3 Photolyseexperimente

Erste Laser-Flash-Photolyseexperimente wurden in 8 mM Lösung der Verbindung **113** ($n = 3$) in Acetonitril/Wasser = 3:1 durchgeführt (Abbildung 4.20).

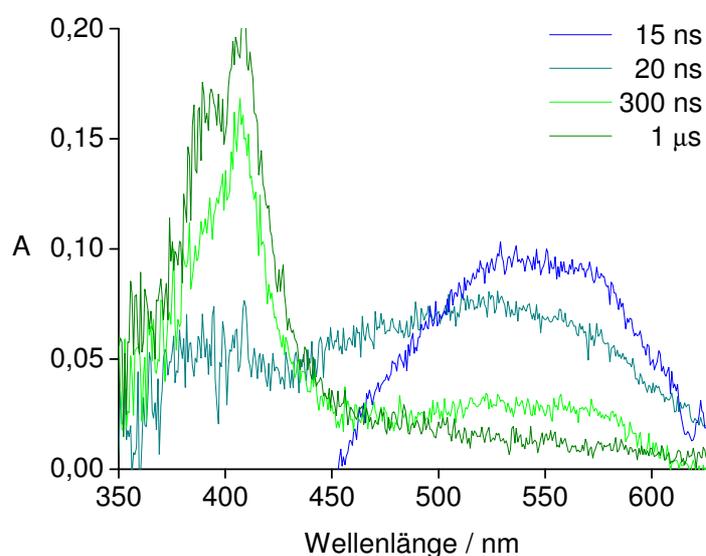


Abbildung 4.20: Transienten-Absorptions-Spektren, aufgenommen zu verschiedenen Zeiten nach der Bestrahlung ($\lambda = 308$ nm) einer 8 mM Lösung der Modellverbindung **113** in entgastem Acetonitril/Wasser = 3:1.

In Abbildung 4.20 ist 15 ns nach der Bestrahlung die charakteristische Absorption des Radikalkations von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin mit einem Maximum bei 550 nm zu erkennen. Im Wellenlängenbereich kleiner 450 nm konnte in diesem frühen Stadium eine negative Absorption infolge der Fluoreszenz der Modellverbindung beobachtet werden. Rund 20 ns nach dem Laserblitz zeigte das Absorptions-Spektrum bei 400 nm keine Fluoreszenz mehr. Stattdessen konnte ein Abklingen des Signals um 550 nm bei gleichzeitigem Anstieg der Absorption im Bereich von 400 nm beobachtet werden. Nach 1 μ s hatte sich das Absorptions-Spektrum der Probe vollständig zum charakteristischen Signal des Tyrosylradikals gewandelt. Anhand der Transienten-Absorptions-Spektren der Verbindung **113** ließ sich somit zweifelsfrei die anfängliche Oxidation des intermediären Elektronendonors belegen. Innerhalb von etwa 1 μ s wurde die Ladung unter Bildung eines Tyrosylradikals zum finalen Elektronendonator transportiert.

Abbildung 4.20 zeigt, dass die oxidierten Spezies der beiden Elektronendonoren bei 410 nm und 550 nm vollständig ungestört nebeneinander untersucht werden können. Um die Kinetik

des mehrstufigen Elektronentransfer-Prozesses zu messen, wurde die Absorption bei diesen beiden Wellenlängen nach der Bestrahlung einer 7 mM Lösung der Verbindung **113** zeitaufgelöst aufgezeichnet (Abbildung 4.21).

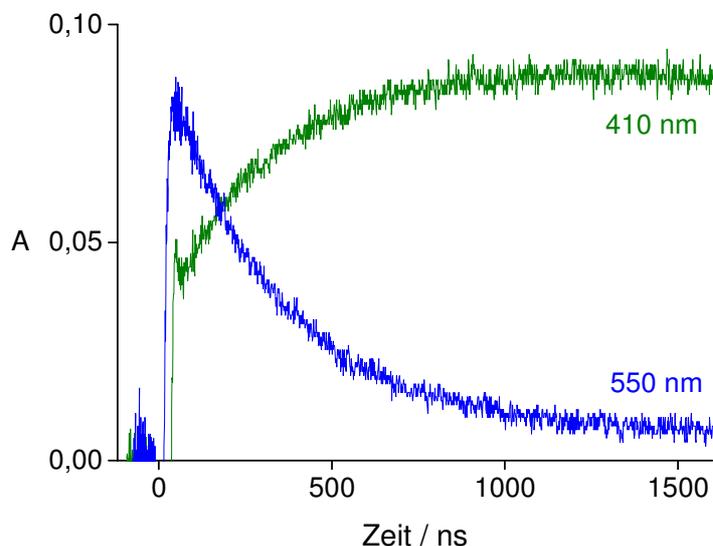


Abbildung 4.21: Zeitaufgelöste Messung der Absorption bei 550 nm (blau) und 410 nm (grün) nach der Bestrahlung ($\lambda = 308$ nm) von Verbindung **113** in entgastem Acetonitril/Wasser = 3:1, bei einer Konzentration von 7 mM.

Abbildung 4.21 belegt durch einen Signalanstieg bei 550 nm innerhalb des Laserblitzes eine Oxidation von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin mit $k_{\text{ET1}} \geq 4 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$. Dieser Sachverhalt steht im Einklang mit kinetischen Messungen des Elektronentransfers in der Modellverbindung **69** (Abbildung 4.11 A, S. 56). In den Vorversuchen mit Verbindung **69** wurde die Lebensdauer des gebildeten Radikalkations von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin [$\tau(\text{Tmp}^{+\bullet})$] zu rund 100 μs bestimmt (Abbildung 4.13, S. 57). Beim Oligopeptid **113** konnte durch den Elektronentransfer zur Tyrosinseitenkette eine Reduktion von $\tau(\text{Tmp}^{+\bullet})$ auf rund 300 ns festgestellt werden. An der abklingenden Absorption bei 550 nm wurde $k_{\text{obs}}(550 \text{ nm}) = 3.1 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ ermittelt. Das Ankommen der Ladung am finalen Elektronendonator wurde durch die Absorption des Tyrosylradikals bei 410 nm verfolgt. Aus dem Signalanstieg bei 410 nm erhält man $k_{\text{obs}}(410 \text{ nm}) = 3.4 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$. Für die geringfügige Abweichung in der Kinetik bei 550 nm und 410 nm wurde der störende Einfluss der Fluoreszenz bei 410 nm verantwortlich gemacht. Aufgrund der Beeinträchtigung bei 410 nm wurde k_{obs} bei den folgenden Experimenten anhand des Abklingens der Absorption bei 550 nm bestimmt.

Bei anschließenden Versuchen mit der Modellverbindung **113** wurde festgestellt, dass sich k_{ET1} unabhängig von der Konzentration der bestrahlten Lösung (**113**) verhält. Hingegen wurde für k_{obs} eine starke Abhängigkeit von **113** beobachtet. Der zweite Elektronentransfer-Schritt im Oligopeptid **113** scheint damit sowohl durch eine intramolekulare als auch durch eine intermolekulare Komponente beeinflusst zu sein. So kann das gebildete Radikalkation von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin ($\text{Tmp}^{+\bullet}$) nicht nur Tyrosin im gleichen Molekül ($k_{ET2,intra}$), sondern auch die Tyrosinseitenkette eines anderen Moleküls ($k_{ET2,inter}$) oxidieren. Nach der erfolgreichen intramolekularen Oxidation von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin im ersten Elektronentransfer-Schritt kann das Geschwindigkeitsgesetz für das Abklingen von $[\text{Tmp}^{+\bullet}]$ im Oligopeptid **113** daher wie folgt beschrieben werden:

$$-\frac{d[\text{Tmp}^{+\bullet}]}{dt} = k_{ET2,intra} [\text{Tmp}^{+\bullet}] + k_{ET2,inter} [\mathbf{113}] [\text{Tmp}^{+\bullet}] \quad (4.13).$$

Die Integration der Gleichung 4.13 ergibt:

$$[\text{Tmp}^{+\bullet}]_t = [\text{Tmp}^{+\bullet}]_0 \exp\{k_{ET2,intra} + k_{ET2,inter} [\mathbf{113}]\} \quad (4.14).$$

Unter Zuhilfenahme der in Kapitel 4.7.3 vorgestellten Argumentation wird klar, dass die im Versuch gemessene Geschwindigkeitskonstante für das Abklingen des Signals bei 550 nm definiert ist als:

$$k_{obs} = k_{ET2,intra} + k_{ET2,inter} [\mathbf{113}] \quad (4.15).$$

Um einen direkten Zugang zu $k_{ET2,intra}$ zu erhalten, wurde in einigen Experimenten versucht, die Viskosität des Lösungsmittels durch Zugabe von Glycerin zu erhöhen. Die Geschwindigkeit des intermolekularen Elektronentransfers sollte so reduziert werden. Diese Versuche scheiterten, da die Erhöhung der Viskosität mit einem drastischen Rückgang der Signalintensität verbunden war. Schema 4.13 (S. 53) zeigt, dass für eine effektive Generierung der positiven Ladung in den Modellsystemen eine schnelle Diffusion des durch Lösungsmittel separierten Ionenpaars erforderlich ist. Dies konnte offensichtlich in den Lösungsmittel-Gemischen mit Glycerin nicht gewährleistet werden.

Es war daher erforderlich, die Geschwindigkeitskonstante k_{obs} in den Oligopeptiden **111** - **114** bei verschiedenen Konzentrationen in Acetonitril/Wasser = 3:1 zu messen und gegen die Konzentration der Lösung aufzutragen (Abbildung 4.22, S. 79). Durch die Messwerte wurde eine Gerade gelegt, deren Steigung nach Gleichung 4.15 mit $k_{ET2,inter}$ gleichzusetzen ist. Aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse erhält man den Wert für $k_{ET2,intra}$.^[12, 82] Die Ergebnisse der Versuche an den Modellsystemen **111** - **114** sind in Tabelle 4.3 (S. 79) zusammengefasst.

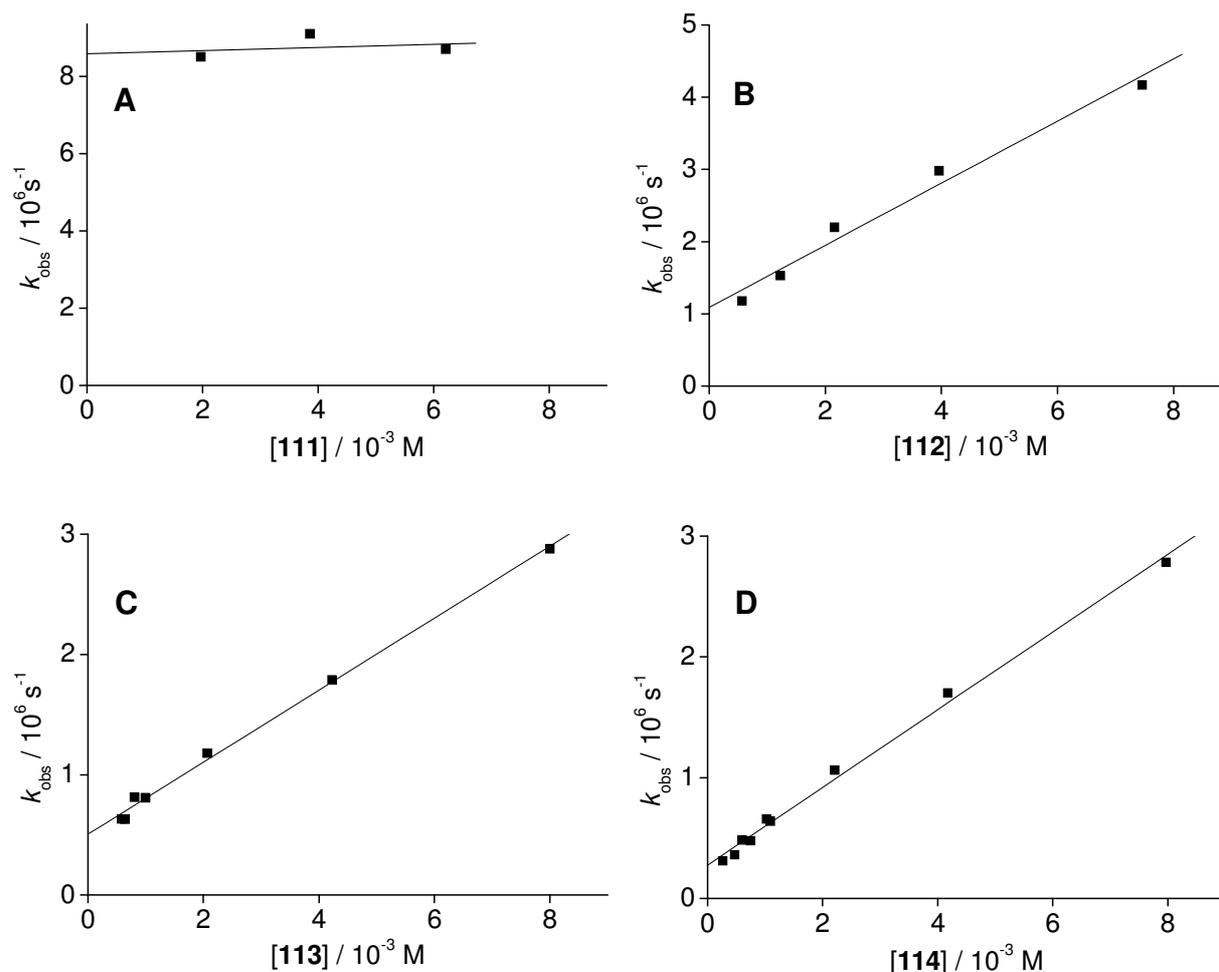


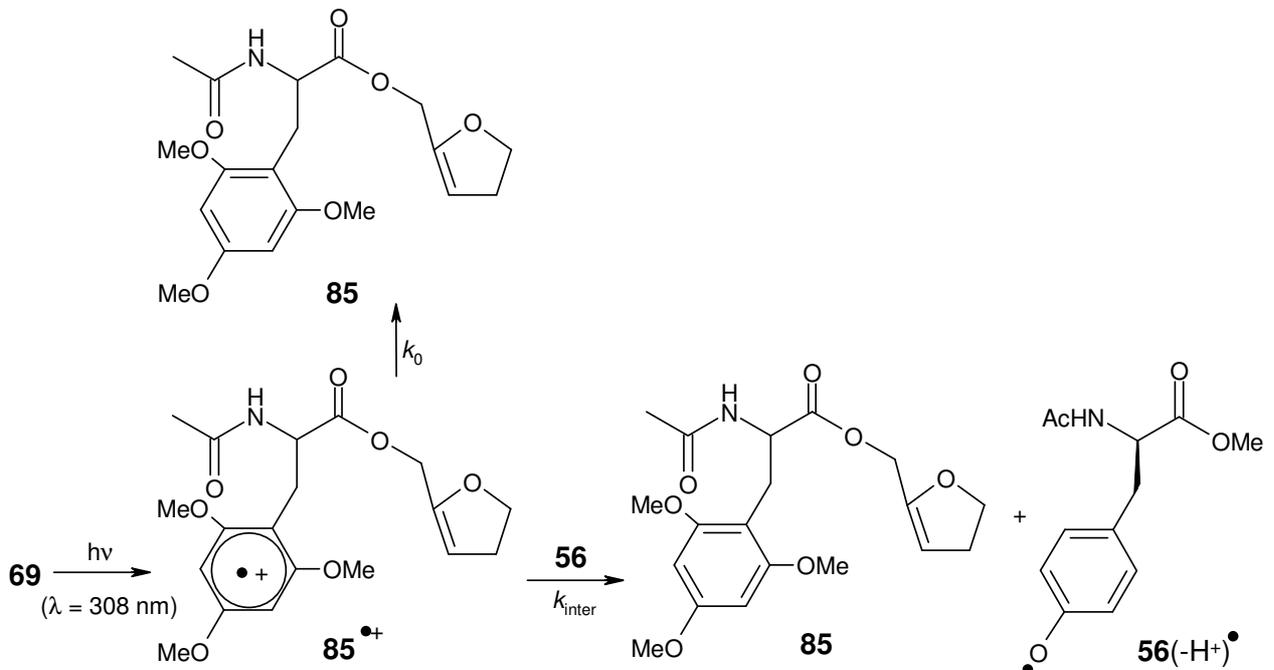
Abbildung 4.22: Konzentrationsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} in den Modellsystemen **111** - **114**. k_{obs} wurde beim Abklingen des Signals bei 550 nm bestimmt.

Verbindung	n	$k_{\text{ET1}} / \text{s}^{-1}$	$k_{\text{ET2,intra}}^{\text{a}} / \text{s}^{-1}$	$k_{\text{ET2,inter}} / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
111	0	$\geq 4 \cdot 10^7$	$8.6 \cdot 10^6$	- ^b
112	1	$\geq 4 \cdot 10^7$	$1.1 \cdot 10^6$	$4.3 \cdot 10^8$
113	3	$\geq 4 \cdot 10^7$	$5.0 \cdot 10^5$	$3.0 \cdot 10^8$
114	5	$\geq 4 \cdot 10^7$	$2.7 \cdot 10^5$	$3.2 \cdot 10^8$

Tabelle 4.3: Durch Auswertung der Konzentrationsabhängigkeit von k_{obs} (Abbildung 4.22) erhaltene Geschwindigkeitskonstanten des mehrstufigen Elektronentransfers in den Modellsystemen **111** - **114**. ^aDie Messwerte sind mit einem Fehler von rund 10% behaftet. ^bDie Geschwindigkeitskonstante ist unabhängig von der Konzentration der Lösung.

Tabelle 4.3 zeigt, dass der erste Elektronentransfer-Schritt in allen untersuchten Modellsystemen innerhalb des Laserblitzes mit $k_{ET1} \geq 4 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ abläuft. Der zweite intramolekulare Elektronentransfer-Schritt zeigt eine Abhängigkeit von der Anzahl n der intermediären und finalen Elektronendonoren verbrückenden Aminosäuren. Die Werte bewegen sich dabei von $8.6 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ für $n = 0$ bis $2.7 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ für $n = 5$. Die in Tabelle 4.3 aufgeführten Werte für $k_{ET2,intra}$ wurden bereits um die Lebensdauer des Radikalkations von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin in Abwesenheit eines weiteren Elektronendonors korrigiert. Dazu wurde die in Kapitel 4.5.6 bestimmte Geschwindigkeitskonstante von $k_{decay}(69) = 1.1 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ von den Werten abgezogen, die durch Ermittlung der Schnittpunkte mit der y-Achse erhalten werden konnten. Aufgrund der langen Lebensdauer des Radikalkations von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin sind die resultierenden Veränderungen allerdings minimal und betreffen nur die Messwerte für $k_{ET2,intra}$ der Oligopeptide **113** und **114**. Abbildung 4.22 A (S. 79) zeigt, dass k_{obs} im Fall des Modellsystems **111** ($n = 0$) keine Konzentrationsabhängigkeit aufweist. Bei den anderen Verbindungen konnte eine nahezu diffusionskontrollierte Geschwindigkeitskonstante $k_{ET2,inter}$ ermittelt werden.

Die Werte für den intramolekularen Elektronentransfer zwischen einem Radikalkation von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin und einer Tyrosinseitenkette (k_{intra}) sollte durch Bestrahlungen der Verbindung **69** bei verschiedenen Konzentrationen an *N*-Acetyl-tyrosin-methylester (**56**) überprüft werden (Schema 4.22).



Schema 4.22: Reaktionsverlauf bei der Bestrahlung der Verbindung **69** in Gegenwart von *N*-Acetyl-tyrosin-methylester (**56**).

Dabei ist die beobachtete Geschwindigkeitskonstante (k'_{obs}) für das Abklingen der Absorption des Radikalkations von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin ($85^{+\bullet}$) gegeben durch:

$$k'_{\text{obs}} = k_0 + k_{\text{inter}} \quad [56] \quad (4.16).$$

Bei der Auftragung von k'_{obs} gegen die Konzentration der Aminosäure **56** konnte aus der Steigung der Messwerte k_{inter} zu $6.4 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden (Abbildung 4.23). Dieser Wert ist etwa um den Faktor zwei größer als die in Tabelle 4.3 (S. 79) dargestellten Werte für $k_{\text{ET2,inter}}$ in den Oligopeptiden **112** - **114**. Die Differenz ist wahrscheinlich auf die Unterschiede in der Molekülgröße und dem daraus resultierenden unterschiedlichen Diffusionsverhalten der beiden Systeme zurückzuführen.

Um einen Eindruck von der Distanzabhängigkeit des zweiten Elektronentransfer-Schrittes in den Modellsystemen **111** - **114** zu gewinnen, wurde in Abbildung 4.24 $\ln k_{\text{ET2,intra}}$ gegen die Anzahl der verbrückenden Prolineinheiten aufgetragen. Dabei wurde mit Ausnahme von $n = 0$ eine exponentielle Abhängigkeit von $k_{\text{ET2,intra}}$ mit der Anzahl der Prolineinheiten festgestellt.

Von einer Distanzabhängigkeit des Elektronentransfers nach diesem Muster wurde auch bei Versuchen mit Oligopeptiden der Art TyrOH-(Pro)_n-TrpH berichtet (Abbildung 2.8, S. 23).^[12] Dabei wurde ein β -Wert von 0.23 \AA^{-1} abgeschätzt. Auch bei Experimenten mit Übergangsmetall-modifizierten Polyprolinen vom Typ (bpy)₂Ru(II)L-(Pro)_n-Co(III)(NH₃)₅ wurde ab $n = 3$ nur eine geringe Abhängigkeit der Geschwindigkeit des Elektronentransfers von n

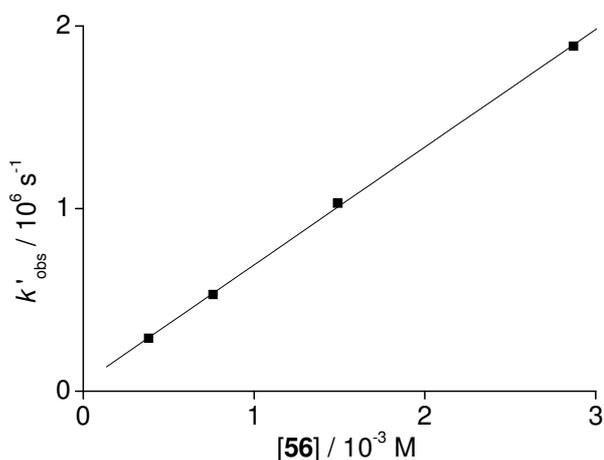


Abbildung 4.23: Auftragung von k'_{obs} gegen die Konzentration der Aminosäure **56**.

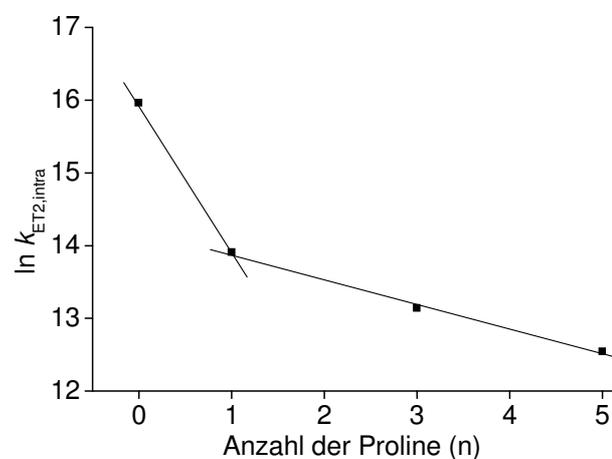


Abbildung 4.24: Auftragung von $\ln k_{\text{ET2,intra}}$ gegen die Anzahl der verbrückenden Prolineinheiten in den Modellsystemen **111** - **114**.

beobachtet (Abbildung 2.7, S. 22).^[74] Die Autoren berichteten hier von $\beta = 0.3 \text{ \AA}^{-1}$ für $n \geq 3$. Auf die verschiedenen Erklärungsversuche dieser Beobachtungen wurde in Kapitel 2.7.2 bereits eingegangen.

Welche Schlussfolgerungen lassen sich aus den in Tabelle 4.3 (S. 79) aufgeführten Ergebnissen ziehen, ohne sich an den in Kapitel 2.7.2 geäußerten Spekulationen zu beteiligen? Für eine schlüssige Interpretation der Messwerte ist es erforderlich auf das Tunnel-Pfad-Konzept zurückzugreifen, das schon in Kapitel 2.5 vorgestellt wurde. Der Tunnel-Pfad wird dabei als ein effektiver Tunnel-Pfad bestehend aus n kovalenten Bindungen mit der Gesamtlänge von σ_1 beschrieben.^[3] Jede Bindung trägt dabei 1.4 \AA zu σ_1 bei.

$$H_{AD} \propto (\epsilon_C)^n \quad (4.17)$$

$$\sigma_1 = n \cdot 1.4 \text{ \AA} / \text{Bindung} \quad (4.18)$$

Das Tunnel-Pfad-Konzept sagt vorher, dass $\ln k_{ET}$ in linearem Verhältnis zu σ_1 steht, wobei die Steigung β' beträgt. Mit einem Wert von 0.6 für die Abklingkonstante ϵ_C ergibt sich $\beta' = 0.73 \text{ \AA}^{-1}$.^[149] Das bedeutet, dass bei einem intramolekularen Elektronentransfer durch das σ -Gerüst k_{ET} um zwei Größenordnungen sinkt, wenn sich σ_1 um 6.3 \AA erhöht.^[150] In Abbildung 4.25 ist mittels einer gestrichelten Geraden dargestellt wie sich eine Distanzabhängigkeit von $\beta' = 0.73 \text{ \AA}^{-1}$ auf die Geschwindigkeitskonstante des Elektronentransfers entlang eines Tunnel-Pfads der Länge σ_1 auswirkt. Dabei wurde für k_{ET} im Fall des direkten Kontakts der Redoxzentren ein Wert von $3 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1}$ angenommen.^[151]

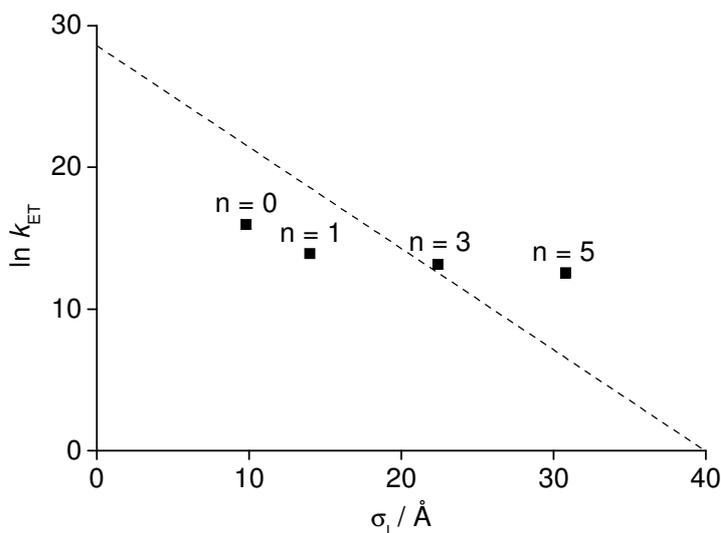


Abbildung 4.25: (■) Messwerte für $k_{ET2,inter}$ in den Modellsystemen **111 - 114** aufgetragen gegen die Länge des Tunnel-Pfads σ_1 . Die gestrichelte Gerade besitzt die Steigung $\beta' = 0.73 \text{ \AA}^{-1}$. Der Schnittpunkt mit der y-Achse liegt bei $k_{ET} = 3 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1}$.

Für die Modellsysteme **111** - **114** wurde nach die entsprechende Tunnel-Pfadlänge σ_1 anhand der Bindungen zwischen den aromatischen Seitenketten des intermediären und finalen Elektronendonors bestimmt. Die ermittelten Pfadlängen für die Oligopeptide sind in Abbildung 4.25 (S. 84) zusammen mit der gemessenen Werten für $k_{ET2,intra}$ eingetragen. Es wird deutlich, dass die bei den Verbindungen **111** - **114** beobachtete Distanzabhängigkeit nicht mit der für einen Elektronentransfer durch die Bindung erwarteten Distanzabhängigkeit in Einklang zu bringen ist. So führt etwa die Verlängerung von σ_1 um 8.4 \AA bei $n = 3$ (**113**) auf $n = 5$ (**114**) nur zu einer Halbierung von $k_{ET2,intra}$ (Tabelle 4.3, S. 79). Bei einem Elektronentransfer durch das σ -Gerüst mit $\beta = 0.73 \text{ \AA}^{-1}$ wird auf der gleichen Distanz ein Abfall von $k_{ET2,intra}$ um den Faktor 500 vorhergesagt.

Diskrepanzen dieser Art wurden auch beim Elektronentransfer durch andere helicale Peptide beobachtet und dort mit der Beteiligung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen am Tunnel-Pfad erklärt.^[152] Dies ist im vorliegenden Fall nicht möglich, da im Polyprolin-Abstandshalter keine Amid-Protonen für Wasserstoffbrücken zur Verfügung stehen. Damit ist eine Erklärung der beobachteten Distanzabhängigkeit von $k_{ET2,intra}$ auf der Basis des Elektronentransfers durch die Bindungen nicht möglich. Vielmehr muss ein Elektronentransfer durch den Raum angenommen werden.

Rechnungen sollten einen ersten Eindruck von der Struktur der untersuchten Oligopeptide vermitteln. Dabei wurde eine *all-trans*-Konfiguration für die Oligopeptide **111** - **114** angenommen (Kapitel 4.6.2) und bei den Berechnungen fixiert. In den Konformeren deren Energie bis zu 1 kcal/mol vom globalen Minimum entfernt lag wurde der Abstand zwischen der aromatischen Seitenkette des intermediären und des finalen Elektronendonors bestimmt. Dazu wurde die Distanz (d) zwischen dem C-4 des aromatischen Rings von Tyrosin und dem C-4 des aromatischen Rings von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin ermittelt. Abbildung 4.26 (S. 84) zeigt die Häufigkeit mit der in den einzelnen Modellsystemen gewisse Abstände auftreten. Es wird deutlich, dass in den Systemen **111** - **114** auch unter der Annahme eines absolut rigiden Prolin-Abstandshalters ein breites Spektrum an Distanzen realisiert werden kann. Dies ist auf die Drehbarkeit der aromatischen Seitenketten um die beiden C-C-Bindungen des benzyllischen Kohlenstoffatoms zurückzuführen. Besonders stark ist dieser Einfluss auf die Abstände in den Oligopeptiden **113** und **114**. Bei Verbindung **113** ($n = 3$) können Abstände zwischen $11.0 - 16.0 \text{ \AA}$ gemessen werden (Abbildung 4.26 C, S. 84).

Abbildung 4.26 D zeigt, dass sich das Spektrum an möglichen Abständen nahezu nicht verändert, wenn man zwischen dem intermediären und finalen Elektronendonator zwei weitere Prolineinheiten einbaut. Bei Verbindung **114** ($n = 5$) erhält man Abstände zwischen 10.2 - 15.4 Å.

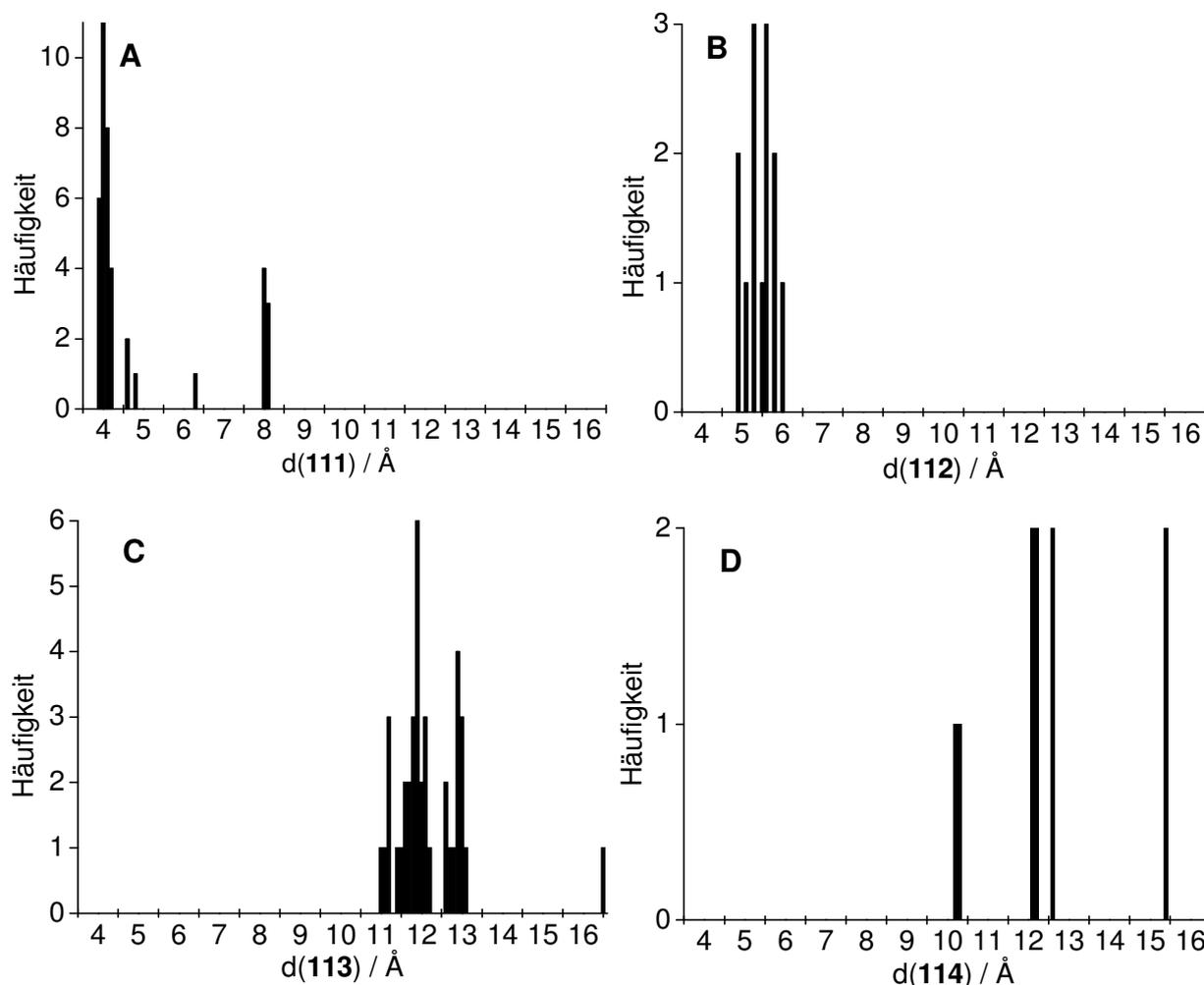


Abbildung 4.26: Verteilung der Distanzen (d) zwischen den aromatischen Seitenketten des intermediären und des finalen Elektronendonors in den all-*trans* Konformeren der Verbindungen **111** - **114** deren Energie bis zu 1 kcal/mol vom globalen Minimum entfernt liegt (MacroModel 7.2).

Stellt man den errechneten Werte für die Distanz d in den Modellsystemen **111** - **114** die gemessenen Werte für $k_{ET2,intra}$ gegenüber, so wird deutlich, dass die erwartete Distanzabhängigkeit für einen Elektronentransfer durch den Raum ($\beta = 1.4 \text{ \AA}^{-1}$ in Wasser)^[15] durch keine Kombination der errechneten Distanzen erhalten werden kann. Es ist allerdings denkbar, dass die Oligopeptide **113** und **114** zu einem geringen Anteil in einer energetisch ungünstigeren Konformation vorliegen, bei der die Seitenketten des intermediären und finalen Elektronendonors in einem deutlich geringeren Abstand zueinander stehen, als dies die

Rechnungen vermuten lassen. Die gemessenen Werte für $k_{\text{ET2,intra}}$ in den Modellsystemen **113** und **114** könnten ausschließlich durch Elektronentransfer in diesen Konformeren verursacht werden. Aus der Abbildung 4.27 wird ersichtlich, welche Abstände d in den Modellsystemen **111** - **114** realisiert werden müssten, um zusammen mit den gemessenen Werten für $k_{\text{ET2,intra}}$ die erwartete Distanzabhängigkeit von $\beta = 1.4 \text{ \AA}^{-1}$ zu erhalten. Es wird deutlich, dass die Distanz d in den Oligopeptiden **113** und **114** deutlich kleiner als die berechneten Werte um 10 \AA sein müsste, um die Werte für $k_{\text{ET2,intra}}$ über Elektronentransfer durch den Raum erklären zu können.

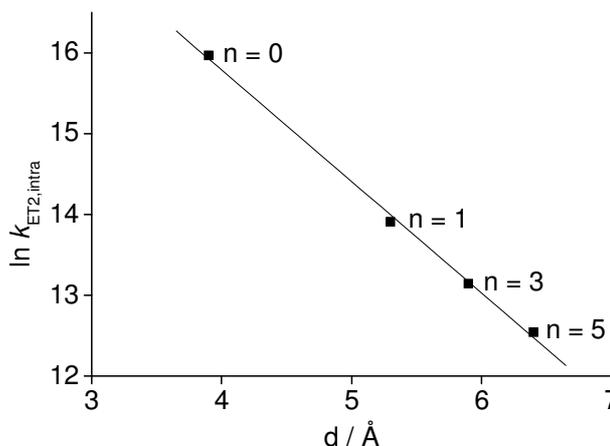


Abbildung 4.27: Distanzabhängigkeit des Elektronentransfers in den Modellsystemen **111** - **114** mit $\beta = 1.4 \text{ \AA}^{-1}$.

Um die aufgeworfenen Fragen bezüglich der Struktur der Modellsysteme beantworten zu können, sind weitere Untersuchungen der Oligopeptide **111** - **114** in Lösung erforderlich. Dabei sind Messungen des Zirkulardichroismus^[72] der bestrahlten Lösungen nicht ausreichend, da diese nur qualitative Aussagen über die Struktur zulassen.^[153] Auch eine Röntgenstrukturanalyse von Einkristallen der Oligopeptide kann keine gesicherte Information über die verschiedenen Konformationen der Verbindungen **111** - **114** in Lösung liefern. Aussagen über die unterschiedlichen Konformationen der Modellsysteme in Acetonitril/Wasser = 3:1 können nur auf der Basis von NMR-Untersuchungen mit hoher Auflösung gemacht werden. Dazu ist es allerdings erforderlich die Verbindungen **111** - **114** enantiomerenrein herzustellen um die Signalmultiplizität im NMR-Spektrum zu reduzieren.

Ein Aspekt, der bei der Interpretation der erhaltenen Daten bisher noch keine Berücksichtigung gefunden hat, ist die Flexibilität des Polyprolin-Abstandshalters. Wie bereits in Kapitel 2.7.2 erwähnt, nimmt Prolin eine Sonderstellung unter den Aminosäuren ein. In Prolin ist der Torsions-Winkel ϕ auf $-63^\circ (\pm 15^\circ)$ limitiert (Abbildung 4.28).^[154] Durch Drehung um den Winkel ω entstehen die isomeren *cis-trans*-Konformere des Diprolins. Die Umwandlung der Konformere bedarf der Überwindung einer Energiebarriere ΔG^\ddagger von etwa 20 kcal/mol und verläuft

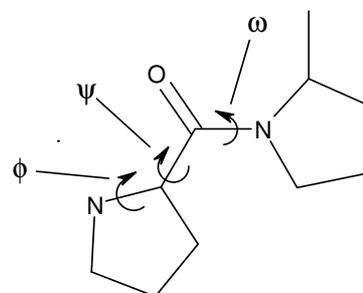


Abbildung 4.28: Torsions-Winkel in Diprolin.

bei Raumtemperatur in einem Zeitraum von zwei Minuten.^[10] Für eine schnelle Konformationsänderung im Polyprolin-Rückgrat steht damit nur der Bindungswinkel ψ zur Verfügung.^[155, 156] Diese Tatsache führt dazu, dass Polyprolin das mit Abstand rigideste Homopolymer aus natürlichen Aminosäuren darstellt.^[140]

Die Kollisions-Geschwindigkeit der Enden verschiedener Oligopeptide mit unterschiedlicher Anzahl an Prolinen wurde mit Hilfe photochemischer Techniken untersucht.^[157-159] Nau und Mitarbeiter verknüpften dazu Oligopeptide mit 2,3-Diazabicyclo[2.2.2]oct-2-en (DBO), einem Fluorophor mit verhältnismäßig langer Fluoreszenz-Lebensdauer (1 μ s, Abbildung 4.29).^[157]

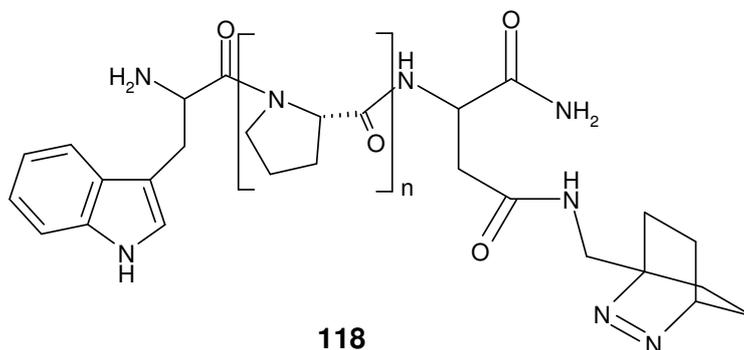


Abbildung 4.29: 2,3-Diazabicyclo[2.2.2]oct-2-en (DBO) modifiziertes Oligopeptid.

In Modellverbindungen der Art **118** wurde die intramolekulare Fluoreszenz-Löschung durch Tryptophan zeitaufgelöst beobachtet. Aus der Geschwindigkeit der Fluoreszenz-Löschung gelingt es, Rückschlüsse auf die Kollisionsgeschwindigkeit (k_c) von Tryptophan und DBO an den Enden der Oligopeptide zu ziehen (Tabelle 4.4).

Peptid	$k_c / 10^6 \text{ s}^{-1}$	Referenz
Trp-Pro ₂ -DBO	1.1	[159]
Trp-Pro ₄ -DBO	0.2	[157]
Trp-Pro ₆ -DBO	< 0.1	[140]

Tabelle 4.4: Resultate von Nau *et al.* zur intramolekularen Fluoreszenz-Löschung in modifizierten Oligopeptiden der Art **118**.

Anhand der Ergebnisse von Nau *et al.* wird deutlich, dass die Struktur von Oligoprolin-Abstandshaltern nicht vollständig bewegungsfrei ist. Die Kollisionsgeschwindigkeiten der Oligopeptid-Enden im Fall von $n = 2$ und $n = 4$ Prolineinheiten liegen bei den Oligopeptiden vom Typ **118** in der gleichen Größenordnung wie $k_{\text{ET2,intra}}$ in den Modellsystemen **112** und

113. Dies deutet darauf hin, dass vor allem in den Oligopeptiden mit $k_{\text{ET2,intra}} \leq 1 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ die Konformation im Zeitfenster des Elektronentransfers als relativ flexibel anzusehen ist. Die Flexibilität des Prolin-Abstandshalters könnte in den Oligopeptiden **113** und **114** Konformationen ermöglichen, in denen die Distanz zwischen intermediärem und finalelem Elektronendonator deutlich geringer ist, als es die Rechnungen vermuten lassen. Die bei der Untersuchung der Modellsysteme **111** - **114** beobachtete Distanzabhängigkeit von $k_{\text{ET2,intra}}$ könnte über Elektronentransfer durch den Raum in solchen Konformationen erklärt werden.

4.8.4 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

An den Modellsystemen **111** - **114** wurden mit Hilfe der Laser-Flash-Photolyse mehrstufige Elektronentransfer-Prozesse untersucht. In Schema 4.21 (S. 75) wurde ein Mechanismus für den Reaktionsablauf vorgeschlagen. Demnach oxidiert das durch Photolyse gebildete Enolether-Radikalkation **115** in einem ersten Schritt die Seitenkette von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin. Das dabei gebildete Radikalkation **116** fungiert als intermediärer Elektronendonator und gibt die Ladung durch Oxidation von Tyrosin an den finalen Elektronendonator weiter. Durch die Aufnahme von Transienten-Absorptions-Spektren konnte dieser Reaktionsablauf bestätigt werden. Dabei gelang es die Oxidation und Reduktion des intermediären Elektronendonors im Verlauf des mehrstufigen Elektronentransfer-Prozesses ungestört zu beobachten (Abbildung 4.20, S. 76). Die spektralen Eigenschaften der beteiligten oxidierten Spezies machten es möglich, die Kinetik der Redoxprozesse des intermediären und finalen Elektronendonors getrennt voneinander aufzuzeichnen (Abbildung 4.21, S. 77). Es zeigte sich, dass die Geschwindigkeit des ersten Elektronentransfer-Schritts (k_{ET1}) zwischen dem Enolether-Radikalkation und der aromatischen Seitenkette von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin unabhängig von der Konzentration der Lösung ist. Bei allen Modellsystemen wurde $k_{\text{ET1}} \geq 4 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Die Geschwindigkeit des zweiten Elektronentransfer-Schritts zeigte sich nur im Oligopeptid **111** als konzentrationsunabhängig. Bei den Verbindungen **112** - **114** konnte durch Auftragung der beobachteten Geschwindigkeit (k_{obs}) für den zweiten Elektronentransfer-Schritt gegen die Konzentration der Lösung die Geschwindigkeitskonstante für den intramolekularen Elektronentransfer ($k_{\text{ET2,intra}}$) ermittelt werden. Dabei ermöglichte die Auftragung zusätzliche

Aussagen über die Geschwindigkeitskonstante des intermolekularen Elektronentransfers ($k_{\text{ET2,inter}}$) in den Modellsystemen **112** - **114**.

Die gemessenen Daten wurden hinsichtlich der Distanzabhängigkeit von $k_{\text{ET2,intra}}$ ausgewertet. Bringt man $k_{\text{ET2,intra}}$ mit der Anzahl n der verbrückenden Prolineinheiten zwischen dem intermediären und finalen Elektronendonator in Verbindung (Abbildung 4.24, S. 81), so zeigt sich ein ähnliches Verhalten wie dies bereits bei Untersuchungen an anderen Modellsystemen beobachtet wurde.^[12, 74] Eine Auftragung der gemessenen Werte für $k_{\text{ET2,intra}}$ gegen die Länge des Tunnel-Pfads σ_1 in den Modellsystemen **111** - **114** machte deutlich, dass die gemessene Distanzabhängigkeit nicht auf der Basis eines Elektronentransfers durch die Bindung erklärt werden kann (Abbildung 4.25, S. 82). Um zu untersuchen, ob die Messungen von $k_{\text{ET2,intra}}$ in den Oligopeptiden alternativ durch einen Elektronentransfer durch den Raum zu deuten sind, wurden Rechnungen zur Struktur der Modellsysteme **111** - **114** durchgeführt. Es zeigte sich, dass in den untersuchten Oligopeptiden alleine aufgrund der Drehbarkeit der aromatischen Seitenketten ein breites Spektrum an Abständen zwischen dem intermediären und finalen Elektronendonator realisiert werden kann (Abbildung 4.26, S. 84). Eine vereinfachende Abschätzung der Distanz in den Modellsystemen^[80] scheint daher nicht zulässig zu sein.

Ein Elektronentransfer durch den Raum in den errechneten Konformationen von **111** - **114** kann allerdings nicht zur Deutung der Distanzabhängigkeit herangezogen werden. Der Elektronentransfer durch den Raum hat eine größere Distanzabhängigkeit als der Elektronentransfer durch die Bindung. Daher muss der Elektronentransfer, falls dieser durch den Raum abläuft, in Konformationen mit noch geringerem Abstand zwischen den Redoxzentren ablaufen. Untersuchungen der Flexibilität von Oligoprolin-Modellsystemen zeigen, dass Konformationen, in denen die Enden der Oligopeptide in geringem Abstand zueinander vorliegen, im Zeitfenster des beobachteten Elektronentransfers erreicht werden können. Für eine stichhaltige Aussage über den Mechanismus des Elektronentransfers in den Modellsystemen **111** - **114** sind allerdings zusätzliche Informationen über die Konformation der Verbindungen in Lösung erforderlich. Auch sollten weitere Experimente an Oligopeptiden mit $n > 5$ durchgeführt werden, um mehr Datenpunkte für eine gesicherte Analyse zur Verfügung zu haben.

4.9 Ergänzende Experimente zum Mechanismus der beobachteten mehrstufigen Elektronentransfer-Prozesse

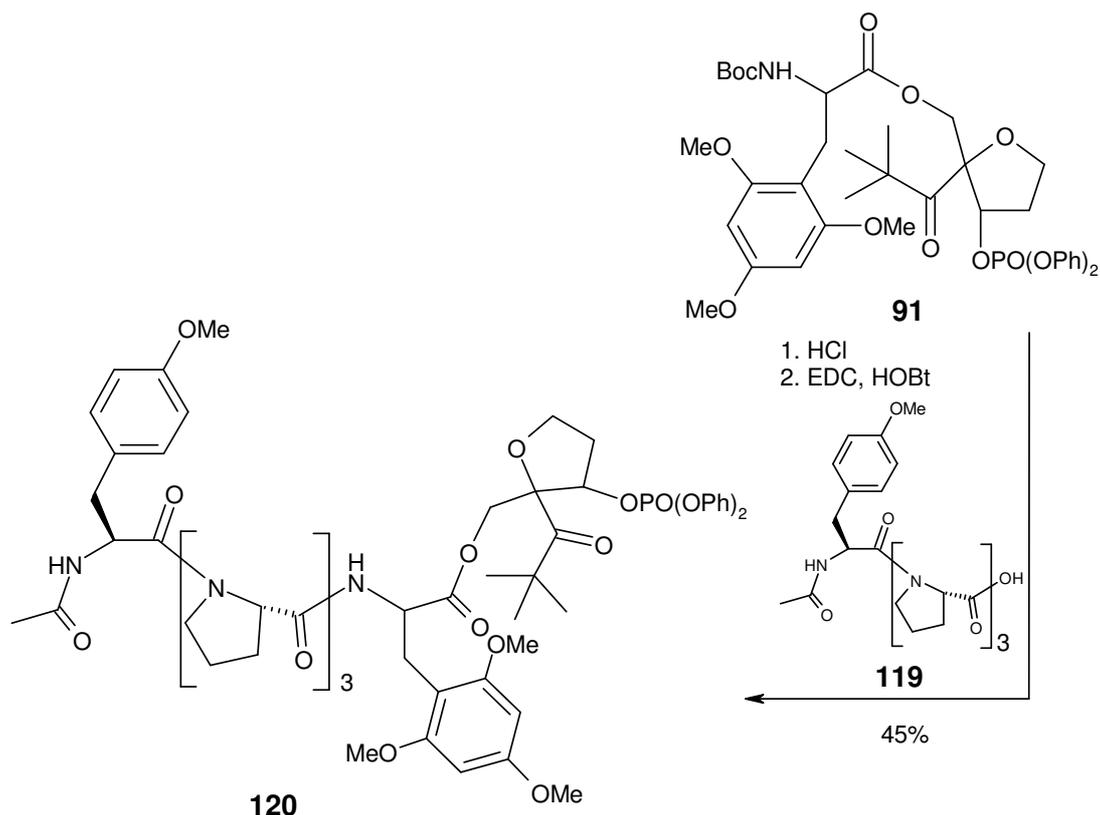
4.9.1 Einleitung

Im folgenden Kapitel sollten Detailfragen zu dem in Schema 4.21, (S. 75) dargestellten Reaktionsmechanismus des mehrstufigen Elektronentransfer-Prozesses in den Modellsystemen **111** - **114** geklärt werden. Der Schwerpunkt der Fragestellung lag bei der Untersuchung des Mechanismus der Oxidation von Tyrosin im Verlauf des zweiten Elektronentransfer-Schritts. Die Oxidation von Tyrosin in wässrigem Medium ist ein wichtiger Schlüsselschritt in einer Reihe von Prozessen mit hoher biologischer Relevanz und spielt beispielsweise im Photosystem II eine wichtige Rolle.^[141] Die Untersuchung licht-induzierter Oxidationsprozesse von Tyrosin hat aus diesem Grund in letzter Zeit großes Interesse hervorgerufen.^[145, 146, 160]

In einem ersten Experiment sollte geklärt werden, von welcher Bedeutung die Deprotonierung des intermediär gebildeten Tyrosyl-Radikalkations für die Oxidation von Tyrosin in den Modellverbindungen **111** - **114** ist. Bei weiteren Bestrahlungs-Experimenten in D₂O war das Ziel, mit Hilfe des Isotopeneffekts, Informationen über die Beteiligung des phenolischen Protons an einem möglichen Protonen-gekoppelten-Elektronentransfer-Prozess zu erhalten.

4.9.2 Synthese von Oligopeptid-Modellsystemen mit 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin als intermediärem und Tyrosin(*O*-methyl) als finalem Elektronendonator

Im Pentapeptid **120** ist die nicht-natürliche Aminosäure 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin durch drei Proline vom *N*-terminalen Tyrosin-(*O*-methyl) getrennt (Schema 4.23, S. 90). Zu Beginn der Synthese stand die Reaktion des Boc-geschützten Aminosäurederivats **91** mit Salzsäure. Das unter diesen Bedingungen quantitativ zugängliche korrespondierende freie Amin der Verbindung **91** wurde im Anschluss mit dem Tetrapeptid **119** zur Reaktion gebracht. Dabei konnte mit einer Gesamtausbeute von 45% das Oligopeptid **120** erhalten werden.



Schema 4.23: Synthese des Pentapeptids **120** durch Verknüpfung des Tetrapeptids **119** mit dem 2,4,6-Triphenylalaninderivat **91**.

4.9.3 Photolyseexperimente mit der Modellverbindung **120**

Das Pentapeptid **120** wurde in Analogie zum Oligopeptid **113** synthetisiert. Dabei wurde in der Verbindung **120** - im Vergleich zu **113** - Tyrosin durch Tyrosin-(*O*-methyl) ausgetauscht. Mit Hilfe der Laser-Flash-Photolyse sollte geklärt werden, ob auch Tyrosin-(*O*-methyl) an einer Elektronentransfer-Kaskade partizipieren kann, wie diese in Schema 4.21 (S. 75) vorgeschlagen wurde. Dazu wurden, nach der Bestrahlung des Oligopeptids **120**, zu verschiedenen Zeiten Transienten-Absorptions-Spektren aufgezeichnet (Abbildung 4.30, S. 91). Analog zur Bestrahlung der Modellverbindung **113** beobachtet man kurz nach dem Laserblitz auch bei **120** die charakteristische Absorption des Radikalkations von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin mit einem Maximum bei 550 nm.

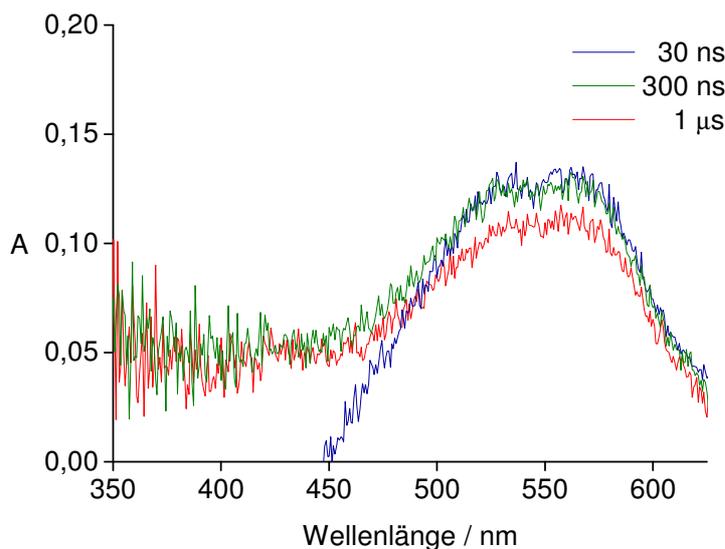


Abbildung 4.30: Transienten-Absorptions-Spektren, aufgenommen zu verschiedenen Zeiten nach der Bestrahlung ($\lambda = 308$ nm) einer 8 mM Lösung des Oligopeptids **120** in entgastem Acetonitril/Wasser = 3:1.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit Verbindung **113** findet nach der Bestrahlung von **120** allerdings nicht die anschließende Oxidation des finalen Elektronendonors statt. Die Absorption der oxidierten Seitenkette von Tyrosin-(*O*-methyl) wird bei 425 nm erwartet (Abbildung 4.4 B, S. 44), und sollte neben der Absorption von 550 nm unschwer zu erkennen sein. Vielmehr bleibt die Absorption der Probe bei 550 nm auch 300 ns nach der Bestrahlung nahezu unverändert. Erst nach 1 μ s ist eine leichte Abnahme der Absorption bei 550 nm festzustellen.

Abbildung 4.31 zeigt, dass die Lebensdauer des Signals bei 550 nm in dem Oligopeptid **120** (rot) im Vergleich zur entsprechenden Lebensdauer in der Modellverbindung **69** (grün), die keinen finalen Elektronendonor besitzt, nahezu identisch ist.

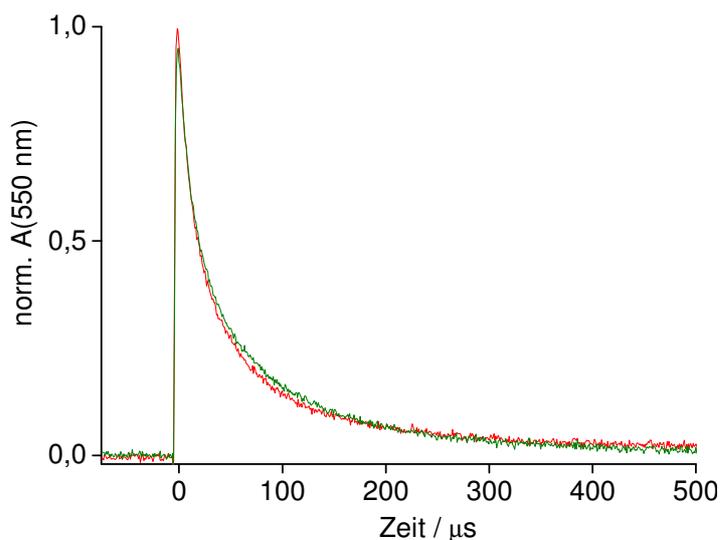


Abbildung 4.31: Vergleich der normierten Absorption bei 550 nm, aufgenommen nach der Bestrahlung ($\lambda = 308$ nm) einer jeweils 8 mM Lösung des Oligopeptids **120** (rot) sowie des Donor-Akzeptor-Modellsystems **69** (grün) in entgastem Acetonitril/Wasser = 3:1.

Diese Beobachtung kann als Hinweis dafür gewertet werden, dass in Verbindung **120** kein mehrstufiger Elektronentransfer-Prozess zu beobachten ist. Das nach der Bestrahlung von **120** erzeugte Radikalkation von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin ist nicht in der Lage den finalen

Elektronendonator Tyrosin-(*O*-methyl) zu oxidieren. Dadurch wird die Elektronentransfer-Kaskade unterbrochen. Der Versuch macht deutlich, dass bei der Oxidation von Tyrosin durch den intermediären Elektronendonator die Möglichkeit der Deprotonierung für das gebildete Radikalkation von Tyrosin von großer Bedeutung ist. Dieser Sachverhalt spiegelt sich auch in den Oxidationspotentialen der verschiedenen Tyrosinderivate in Tabelle 4.1 (S. 42) wieder.

4.9.4 Isotopeneffekt bei der Photolyse von **113**

Um die Beteiligung des phenolischen Protons am Ablauf des mehrstufigen Elektronentransfer-Prozesses in den Modellverbindungen **111** - **114** zu untersuchen, wurde exemplarisch Verbindung **113** in D₂O bestrahlt. Die Geschwindigkeitskonstante des intramolekularen Elektronentransfers [$k_{\text{ET2,intra}}(\text{D}_2\text{O})$] wurde in D₂O durch eine Auftragung der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} gegen die Konzentration der Lösung ermittelt (Abbildung 4.32).

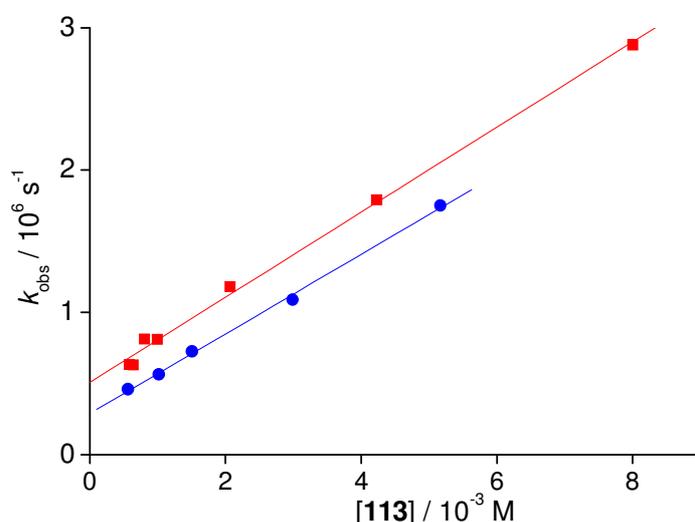
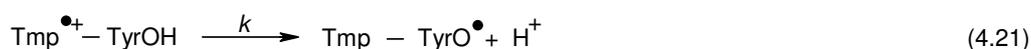
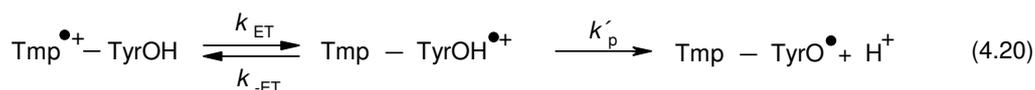
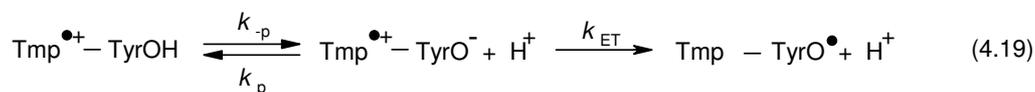


Abbildung 4.32: Konzentrationsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} im Oligopeptid **113** in H₂O (rot) und D₂O (blau). k_{obs} wurde jeweils beim Abklingen des Signals bei 550 nm bestimmt.

Im Vergleich zum Messwert in Wasser [$k_{\text{ET2,intra}}(\text{H}_2\text{O}) = 5,0 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$], beträgt die Geschwindigkeitskonstante des zweiten Elektronentransfer-Schritts im Oligopeptid **113** $k_{\text{ET2,intra}}(\text{D}_2\text{O}) = 2,8 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$, wenn die Bestrahlung in D₂O durchgeführt wird. Der Isotopeneffekt^[161] $k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ besitzt somit den Wert 1,8. Ein Deuterium-Isotopeneffekt in Bereich von 2 - 2,5 wurde kürzlich auch in einem anderen System bei der photoinduzierten Oxidation von Tyrosin in wässrigem Medium beobachtet.^[145]

Dabei wird dieser signifikante Isotopeneffekt als Indiz für die Beteiligung einer Protonenbewegung im Übergangszustand der Oxidation von Tyrosin gewertet. Bei einer Protonen-gekoppelten Oxidation von Tyrosin stellt sich die Frage, in welcher Reihenfolge der Oxidations-Prozess abläuft (Schema 4.24).



Schema 4.24: Mögliche Reaktionsabfolgen bei der Oxidation von Tyrosin durch das Radikalkation von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin ($\text{Tmp}^{\bullet+}$) beim mehrstufigen Elektronentransfer in der Modellverbindung **113**.

Kommt es im Modellsystem **113**, wie in Gleichung 4.19 dargestellt, erst nach der Deprotonierung von Tyrosin zur Oxidation durch das Radikalkation von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin? Findet die Oxidation von Tyrosin vor der Deprotonierung statt (Gleichung 4.20)? Oder läuft die Oxidation nach einem konzertierten Elektronentransfer-Deprotonierungs-Mechanismus ab (Gleichung 4.21)?

Eine Reaktion gemäß Gleichung 4.19 bedeutet, dass die Oxidation von Tyrosin nicht schneller als die Deprotonierung der phenolischen OH-Funktionalität erfolgen kann. Aufgrund des pK_a -Werts von Tyrosin ($\text{pK}_a = 10$)^[11] folgt, dass $K_a = k_{-p}/k_p = 1 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ ist. Selbst bei einer diffusionskontrollierten Protonierung ($k_p \leq 1 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ist die Geschwindigkeitskonstante der Deprotonierung limitiert auf $k_{-p} \leq 10 \text{ s}^{-1}$. Eine Reaktionsabfolge wie in Gleichung 4.19 dargestellt kann daher nicht die gemessenen Werte für $k_{\text{ET2,intra}}$ erklären.

Bei dem in Gleichung 4.20 formulierten Mechanismus kommt es nach der Oxidation von Tyrosin zur Deprotonierung des intermediär gebildeten Radikalkations. Die Deprotonierung von Phenol-Radikalkationen (k'_p) verläuft aufgrund der hohen Azidität der Intermediate in protischen Lösungsmitteln diffusionskontrolliert und ist im Gesamtprozess nicht geschwindigkeitsbestimmend.^[162] Würde die Oxidation von Tyrosin im Oligopeptid **113** nach diesem Mechanismus ablaufen, so könnte kein signifikanter Deuterium-Isotopeneffekt beobachtet werden.

Die Versuchsergebnisse machen daher einen konzertierten Elektronentransfer-Deprotonierungs-Mechanismus wahrscheinlich. Zu diesem Ergebnis kommen auch andere Studien zur photoinduzierten Oxidation von Tyrosin in wässrigem Medium.^[144-146]

4.9.5 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Das vorangegangene Kapitel beschäftigt sich mit dem detaillierten Mechanismus der Oxidation von Tyrosin in Verlauf des mehrstufigen Elektronentransfer-Prozesses in den Modellverbindungen **111** - **114**. Das Oligopeptid **120**, das im Gegensatz zum Modellsystem **113** nicht Tyrosin, sondern Tyrosin(*O*-methyl) als finalen Elektronendonator besitzt, wurde synthetisiert. Bei der Bestrahlung der Verbindung **120** wurde die Oxidation der aromatischen Seitenkette von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin beobachtet (Abbildung 4.30, S. 91). Das gebildete Radikalkation war allerdings nicht in der Lage in einem zweiten Elektronentransfer-Schritt Tyrosin(*O*-methyl) zu oxidieren. In Tyrosin(*O*-methyl) ist im Gegensatz zu Tyrosin keine Deprotonierung des gebildeten Radikalkations möglich. Diese Tatsache hat einen großen Einfluss auf das Redoxverhalten von Tyrosinderivaten (Tabelle 4.1, S. 42). Der Versuch verdeutlicht, welche Bedeutung der Protonierungszustand für das Redoxverhalten von Tyrosin hat.

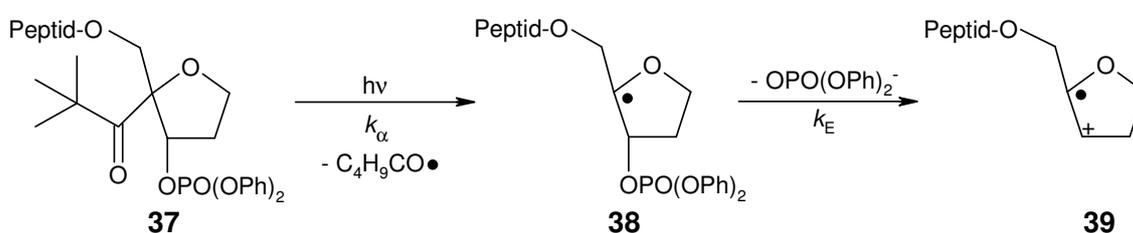
Mit Hilfe von Laser-Flash-Photolyseexperimenten in D₂O konnte bei der Bestrahlung der Modellverbindung **113** ein signifikanter Deuterium-Isotopeneffekt festgestellt werden. Diese Beobachtung wurde mit einer Protonenbewegung im Übergangszustand der Oxidation von Tyrosin in Verbindung gebracht. Bei dem mehrstufigen Elektronentransfer in den Modellverbindungen **111** - **114** handelt es sich damit um einen Protonen-gekoppelten-Elektronentransfer (PCET).

Überlegungen unter Berücksichtigung des pK_a-Werts der phenolischen Hydroxy-Funktionalität legen die Vermutung nahe, dass die Oxidation von Tyrosin im vorliegenden Fall nach einem konzertierten Elektronentransfer-Deprotonierungs-Mechanismus abläuft.^[146]

5. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Dissertation wurde ein Konzept vorgestellt, das es ermöglicht in einem Oligopeptid im Sub-Mikrosekunden Zeitraum ein Radikalkation zu erzeugen. Die entwickelte Methode zeichnet sich dabei durch die hohe Regioselektivität sowie die milden Reaktionsbedingungen aus.

Bei den untersuchten Modellverbindungen von Typ **37** wurde der C-Terminus von Oligopeptiden mit einem 2-pivaloyl-modifizierten Tetrahydrofuranerivat verknüpft (Schema 5.1). Bei der Bestrahlung des Radikalvorläufers **37** kommt es nach einer Norrish-Typ-I-Eliminierung (k_{α}) und anschließender radikalinduzierter β -Eliminierung der Diphenylphosphat-Austrittsgruppe (k_E) zur Bildung eines Radikalkations der Art **39**.



Schema 5.1: Reaktionssequenz bei der ortsselektiven Generierung eines Radikalkations am C-Terminus eines Oligopeptids.

Das infolge der Fragmentierung gebildete Radikalkation **39** hat stark oxidierende Eigenschaften und vermag die Seitenketten geeigneter aromatischer Aminosäuren zu oxidieren. Bei Flash-Photolyseexperimenten (XeCl-Excimer Laser, $\lambda = 308$ nm) mit den Modellverbindungen **67** und **69** (Schema 5.1) konnte gezeigt werden, dass die gebundenen Aminosäuren Tyrosin und 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin, durch das infolge der Bestrahlung gebildeten Radikalkations der Art **39**, oxidiert werden können.

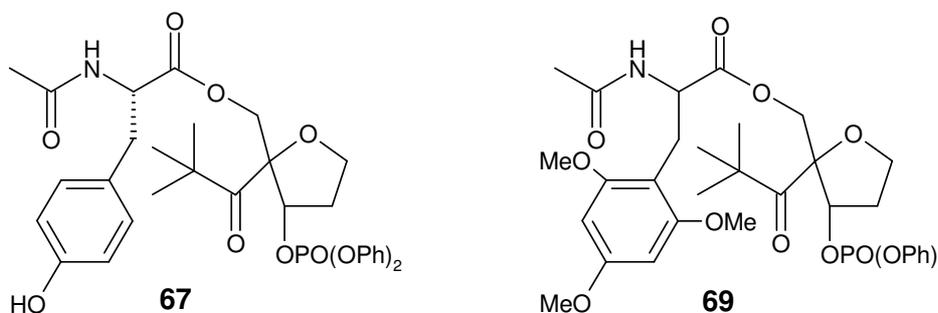
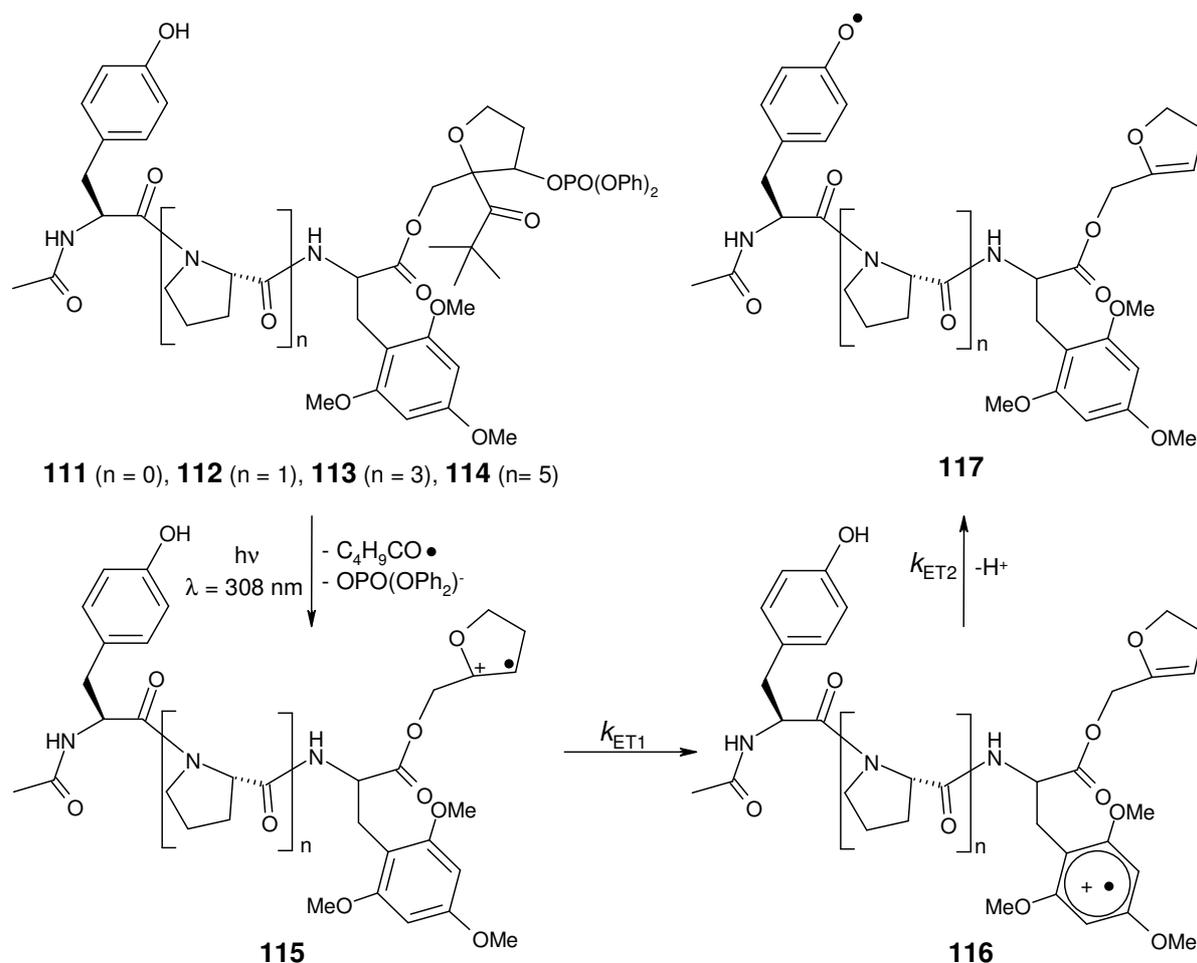


Abbildung 5.1: Struktur der Modellverbindungen **67** und **69** mit Tyrosin und 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin als Elektronendonoren.

Dieser Vorgang wurde anhand der charakteristischen Absorption des gebildeten Tyrosylradikals ($\lambda_{\max} = 410 \text{ nm}$) bzw. des erzeugten Radikalkations von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin ($\lambda_{\max} = 550 \text{ nm}$) verfolgt.

Bei anschließenden Experimenten stand die Untersuchung mehrstufiger Elektronentransfer-Prozesse im Mittelpunkt. Dazu wurden die Modellsysteme **111** - **114** synthetisiert, die drei verschiedene Redoxzentren aufweisen (Schema 5.2).



Schema 5.2: Ablauf des mehrstufigen Elektronentransfers nach der Bestrahlung ($\lambda = 308 \text{ nm}$) der Oligopeptid-Modellsysteme **111** - **114**.

In den durchgeführten Kaskaden-Experimenten oxidiert das nach der Bestrahlung der Oligopeptide **111** - **114** entstehende Enolether-Radikalkation **115** in einem ersten Elektronentransfer-Schritt (k_{ET1}) die Seitenkette von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin. Das dabei gebildete Radikalkation des intermediären Elektronendonors (**116**) gibt in einem zweiten Elektronentransfer-Schritt (k_{ET2}) die Ladung an Tyrosin, den finalen Elektronendonator, weiter. Der Abstand des intermediären Elektronendonors zum finalen Elektronendonator wurde in den Modellsystemen **111** - **114** variiert. Zum Einsatz kamen dabei $n = 0, 1, 3$ und 5 verbrückende Prolineinheiten.

Der in Schema 5.2 (S. 96) dargestellte Reaktionsablauf konnte durch die Aufnahme von Transienten-Absorptions-Spektren bestätigt werden (Abbildung 5.2 A). Dabei war es möglich, die Oxidation und anschließende Reduktion des intermediären Elektronendonors im Verlauf des mehrstufigen Elektronentransfer-Prozesses zu verfolgen. Aufgrund der spektralen Eigenschaften der oxidierten Aminosäuren gelang es, den Redoxprozess von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin unbeeinflusst vom Redoxprozess des finalen Elektronendonors Tyrosin zeitaufgelöst zu untersuchen (Abbildung 5.2 B).

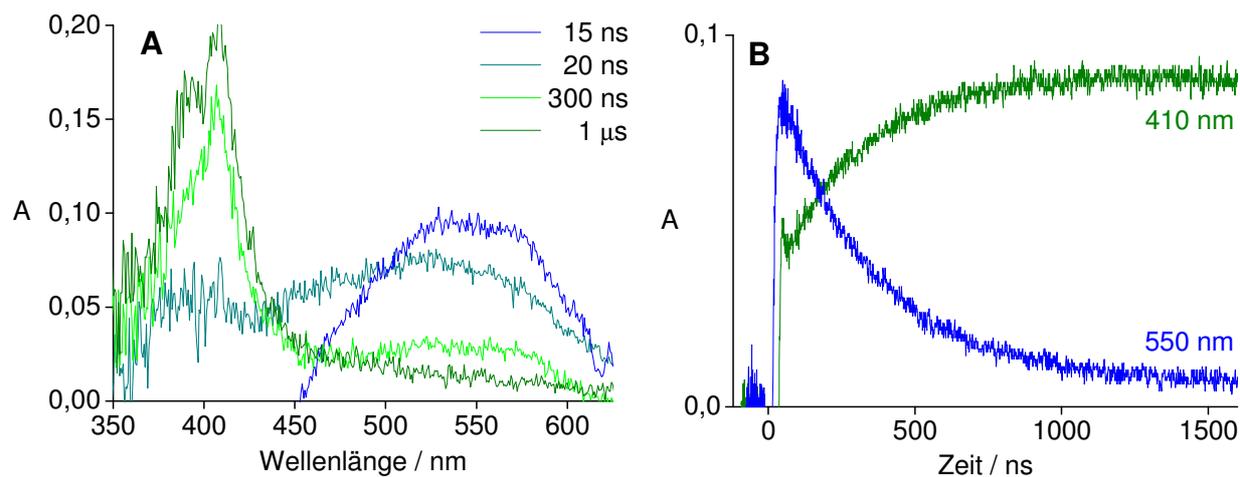


Abbildung 5.2: (A) Transienten-Absorptions-Spektren aufgenommen zu verschiedenen Zeiten nach der Bestrahlung ($\lambda = 308$ nm) von **113** (8 mM). (B) Zeitaufgelöste Messung der Absorption bei 410 nm (grün) und 550 nm (blau) nach der Bestrahlung ($\lambda = 308$ nm) von **113** (7 mM).

Es wurde festgestellt, dass der erste Elektronentransfer-Schritt in den Modellsystemen **113** - **114** konzentrationsunabhängig mit $k_{ET1} \geq 4 \cdot 10^7$ s⁻¹ abläuft. Durch Auftragung der beobachteten Geschwindigkeit des zweiten Elektronentransfer-Schritts gegen die Konzentration gelang es die Geschwindigkeitskonstante für den intramolekularen Elektronentransfer zwischen dem finalen und intermediären Elektronendonator ($k_{ET2,intra}$) zu ermitteln. Darüber hinaus konnten durch die Auftragung Informationen zur Geschwindigkeit des intermolekularen Elektronentransfers ($k_{ET2,inter}$) gewonnen werden (Tabelle 5.1, S. 98). Die Werte für $k_{ET2,intra}$ wurden bezüglich ihrer Distanzabhängigkeit untersucht. Dabei wurde nur eine schwache Abhängigkeit von $k_{ET2,intra}$ gegenüber der Anzahl n der verbrückenden Prolineinheiten zwischen dem intermediären und finalen Elektronendonator festgestellt. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Untersuchungen des Elektronentransfers in anderen Prolin-verbrückten Modellsystemen.^[12, 74]

Verbindung	n	k_{ET1} / s^{-1}	$k_{ET2,intra}^a / s^{-1}$	$k_{ET2,inter} / M^{-1}s^{-1}$
111	0	$\geq 4 \cdot 10^7$	$8.6 \cdot 10^6$	- ^b
112	1	$\geq 4 \cdot 10^7$	$1.1 \cdot 10^6$	$4.3 \cdot 10^8$
113	3	$\geq 4 \cdot 10^7$	$5.0 \cdot 10^5$	$3.0 \cdot 10^8$
114	5	$\geq 4 \cdot 10^7$	$2.7 \cdot 10^5$	$3.2 \cdot 10^8$

Tabelle 5.1: Ermittelte Geschwindigkeitskonstanten des mehrstufigen Elektronentransfers in den Modellsystemen **111** - **114**. ^aDie Messwerte sind mit einem Fehler von rund 10% behaftet. ^bGeschwindigkeitskonstante konzentrationsunabhängig.

Die beobachtete Distanzabhängigkeit kann nicht auf der Grundlage eines Elektronentransfers durch die Bindung erklärt werden. Vielmehr deuten die Versuchsergebnisse auf einen Elektronentransfer durch den Raum hin. Dazu müssen in den Modellsystemen **111** - **114** Konformationen realisiert werden, bei denen die Redoxzentren deutlich geringere Abstände aufweisen, als diese Rechnungen vermuten lassen. Bei Untersuchungen der Flexibilität von Oligoprolin-Modellsystemen wurde kürzlich gezeigt, dass Konformationen, bei denen die Enden der Oligopeptide in geringem Abstand zueinander vorliegen, im Zeitfenster des beobachteten Elektronentransfers erreicht werden können.^[157-159] Um ein umfassenderes Bild vom Mechanismus des Elektronentransfers in den Oligopeptiden **111** - **114** zu erhalten, ist es erforderlich weitere Untersuchungen zur Struktur der Verbindungen in Lösung durchzuführen.

Damit exakte Messungen der Distanzabhängigkeit des Elektronentransfers in Modellsystemen der Art **111** - **114** durchgeführt werden können, muss der Polyprolin-Abstandshalter durch ein rigideres Strukturelement ersetzt werden. Dabei bietet sich der Einsatz von stabilisierten Peptidstrukturen mit bekannter Röntgenstruktur an.^[163]

Darüber hinaus könnte in zukünftigen Experimenten eine Aminosäure mit 2,4-Dimethoxybenzylseitenketten zum Einsatz kommen. Die erwartete Absorption des bei der Oxidation dieser Aminosäure entstehenden Radikalkations liegt bei etwa 430 nm.^[124] Eventuell kann der Redoxprozess dieser Aminosäure ungestört neben dem Tyrosylradikal und dem Radikalkation von 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin untersucht werden. Damit wäre die Synthese von Peptiden möglich, in denen drei Elektronentransfer-Schritte nebeneinander zeitaufgelöst verfolgt werden können.

6. Experimenteller Teil

6.1 Messgeräte und Hilfsmittel

Kernresonanzspektroskopie

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden mit folgenden Geräten gemessen:

Bruker DRX 500 500 MHz (^1H), 125.6 MHz (^{13}C) und 202.4 MHz (^{31}P)

Varian Gemini VXR 400 400 MHz (^1H), 100.6 MHz (^{13}C) und 162.0 MHz (^{31}P)

Bruker DRX 250 250 MHz (^1H), 101.2 MHz (^{31}P)

^1H -NMR-Spektroskopie: Die chemischen Verschiebungen (δ) sind in ppm angegeben, bezogen auf zugesetztes Tetramethylsilan ($\delta = 0$) beziehungsweise auf die Restprotonensignale der deuterierten Lösungsmittel. Die Kopplungskonstanten (J) sind in Hertz angegeben. Signalmultiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett; d = Dublett; dd = Doppeldublett; t = Triplett; td = Triplett von Duplett; q = Quartett; quin = Quintett; br = breit; m = Multipllett.

^{13}C -NMR-Spektroskopie: Die chemischen Verschiebungen der Signale sind in ppm angegeben. Als interner Standard dienten die Kohlenstoffatome des verwendeten Lösungsmittels. Alle Spektren wurden breitbandenkoppelt aufgenommen. Die Signalzuordnung wurde durch DEPT-Experimente (135° , 90°) unterstützt. Angegeben sind der Substitutionsgrad (C_q , C_t , C_s , C_p) sowie die chemische Verschiebung. Beim Auftreten von Kohlenstoff/Phosphor-Kopplungen wurden die chemischen Verschiebungen durch das arithmetische Mittel der jeweiligen Signallinien charakterisiert.

^{31}P -NMR-Spektroskopie: Die chemischen Verschiebungen der Signale sind in ppm angegeben und beziehen sich auf Triphenylphosphat ($\delta = -18.0$) als externe Referenz in Chloroform- d_1 als Lösungsmittel. Die Spektren wurden breitbandenkoppelt aufgenommen.

IR-Spektroskopie

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte mit einem Perkin-Elmer-1600 Series Fourier-Transform-IR-Spektrometer. Die Banden sind in Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ in cm^{-1} angegeben. Flüssigkeiten wurden als dünner Film zwischen Natriumchloridplatten, Festkörper als Kaliumbromidpressling gemessen.

UV/VIS-Spektroskopie

Die UV-Spektren wurden mit einem UV/VIS-Spektrometer der Firma Perkin Elmer Typ Lambda Bio 40 aufgenommen. Die Wellenlänge (λ) der Absorptions-Maxima ist in nm angegeben, Extinktionskoeffizienten (ϵ) in $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Fluoreszenz-Spektroskopie

Die Fluoreszenzspektren wurden mit einem FluoroMax-2 der Firma ISA Jobin Yvon-Spex in 10 mm Quarz-Küvetten gemessen.

Massenspektroskopie

Die Massenspektren wurden mit einem VG70-250 und einem Finnigan MAT MS 312 Spektrometer von Herrn Dr. H. Nadig am Departement Chemie der Universität Basel aufgenommen.

Die Elektrospray Ionisations Massenspektren wurden an einem Finnigan MAT LCQ Massenspektrometer gemessen.

Alle Angaben erfolgen in atomaren Masseneinheiten pro Ladung (m/z). Die relativen Intensitäten der Signale, bezogen auf den Basispeak, sind angegeben.

Elementaranalyse

Die Elementaranalyse wurde in einem Verbrennungsautomaten der Firma Leco von Herrn W. Kirsch am Departement Chemie der Universität Basel durchgeführt. Die Angaben erfolgen in Massenprozent.

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Büchi Schmelzpunktgerät 530 ermittelt und sind nicht korrigiert.

Chromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgelplatten der Firma Merck verwendet (Kieselgel 60 F₂₅₄). Die Detektion erfolgte unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm und 366 nm. Die Detektion von nicht UV-aktiven Verbindungen erfolgte durch Eintauchen in eine Permanganatlösung (3 g Kaliumpermanganat, 5 ml 5%-ige Natronlauge, 20 g Kaliumcarbonat und 300 ml Wasser) und anschließende Erwärmung.

Bei der präparativen Dünnschichtchromatographie wurden PSC-Platten der Firma Merck (Kieselgel 60 F₂₅₄) mit einer Schichtdicke von 0.2 mm verwendet.

Zur säulenchromatographischen Trennung kam Kieselgel der Firma Merck (Kieselgel 60, 30 - 63 µm) und Kieselgel der Firma Uetikon (C-Gel, 40-63 µm) zum Einsatz. Die jeweils verwendeten Eluentien sind angegeben. Die angegebenen Lösungsmittelverhältnisse bei Gemischen beziehen sich auf Volumenanteile.

Die analytischen HPLC Trennungen wurden mit einem Waters 2690 Separations Module und einem Photodioden Array Detektor durchgeführt. Dabei kam eine LiChroCART 250-4 Säule (LiChrospher 100, RP-18e, 5 µm, 250 mm · 4 mm) der Firma Merck zum Einsatz. Bei einem Fluss von 1 ml/min wurde dabei ein Gradientenprogramm verwendet, bei dem die Lösungsmittelverhältnisse von 90% Wasser und 10% Acetonitril innerhalb von 25 min auf 100 % Acetonitril verändert wurden.

Die Analyse chiraler Aminosäuren wurde mit einer CROWNPAK CR(+) Säule (5 µm, 150 mm · 4 mm) bei einem Lösungsmittelfluss von 0.8 ml [85% wässrige Perchloressigsäure (pH = 1), 15% Methanol] durchgeführt.

Lösungsmittel

Die verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und gegebenenfalls nach Literaturverfahren absolutiert.^[164] Für die Laserexperimente wurde Acetonitril AC0333 der Firma Scharlau verwendet.

Laserapparatur

Die Laserexperimente wurden mit einem COMPex 205 XeCl-Excimer Laser der Firma Lambda Physik in der Gruppe von Professor J. Wirz am Departement Chemie der Universität Basel durchgeführt. Die Emissionswellenlänge betrug 308 nm bei einer Pulsenergie von 100-150 mJ pro Puls und einer Halbwertsbreite des Pulses von etwa 25 ns. Die Proben wurden bei

Raumtemperatur in einer Quarzglas Küvette mit den Abmessungen 4.5 cm x 1 cm x 1 cm gemessen. Durch wiederholtes Einfrieren der Proben in flüssigem Stickstoff und anschließendem Evakuieren mit einer Diffusionspumpe wurden die Proben vor der Messung entgast. Zur Beobachtung der Kinetik bei einer bestimmten Wellenlänge umfasste der Versuchsaufbau eine gepulste Xenon Lampe, einen Monochromator sowie einen 1P28 Photomultiplier. Der Einsatz eines iStar 720 ICCD Detektors der Firma Andor ermöglichte die Aufnahme eines Transienten-Spektrums zu einem gewählten Zeitpunkt. Bei den Versuchen wurde das Messlicht auf einen Durchmesser von etwa 1 cm fokussiert und parallel zur Längsrichtung ($l = 4.5$ cm) durch die Küvette gestrahlt. Orthogonal dazu wurde die Probe mit einem Laserstrahl, der auf die Abmessungen der Probe justiert wurde, bestrahlt. Die Messdaten wurden mit MacFitFlash 2.0.1 aufbereitet und bearbeitet.

Analytische Belichtungsapparatur

Bei der analytischen Bestrahlung kam der Bestrahlungsstand 68810 der Firma Oriel mit einer Quecksilberhochdrucklampe (Osram, 500 W, Abbildung 6.1 A) zum Einsatz. Es wurde ein 320 nm Steilkantenfilter (3 mm · 50 mm · 50 mm) der Firma Schott verwendet. Bei der angegebenen Wellenlänge beträgt die Lichtdurchlässigkeit dabei etwa 50 % (Abbildung 6.1 B). Die Bestrahlungen wurden bei 20°C in einer 3 ml Quarzglas Küvette der Firma Hellma durchgeführt. Die Entgasung der Proben erfolgte dabei durch Einleiten von Argon über einen Zeitraum von 10 Minuten.

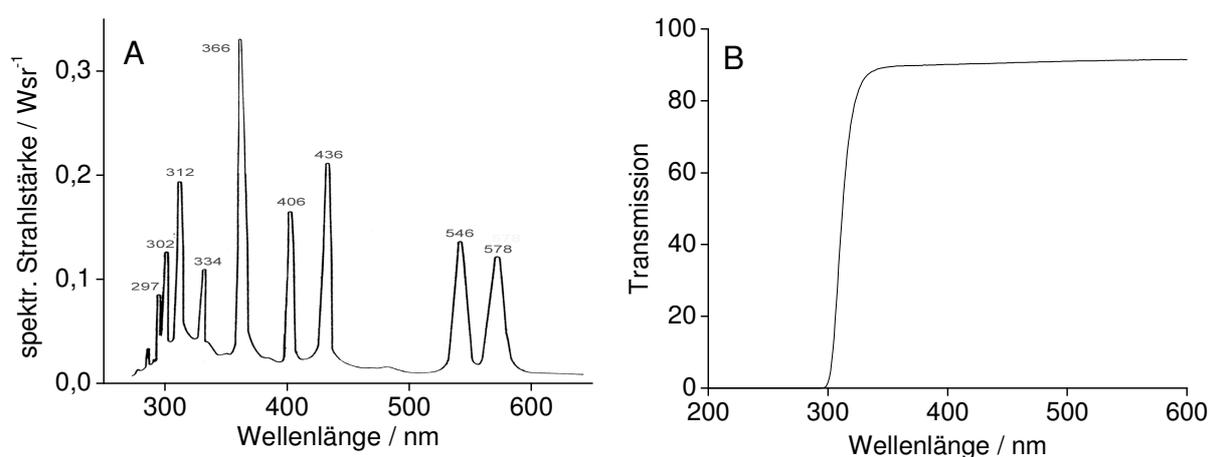


Abbildung 6.1: (A) Spektrale Strahlungsverteilung einer Osram 500 W Quecksilberdampf- lampe bei Nennleistung. (B) Optische Durchlässigkeit eines 320 nm Steilkantenfilter der Firma Schott.

Nomenklatur

Die Nomenklatur der beschriebenen Verbindungen orientiert sich an den aktuellen Regeln der IUPAC und ihren Bestimmungen (Abbildung 6.2). Die Wasserstoffatome in den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren werden mit den gleichen Nummern versehen wie die entsprechenden Kohlenstoffatome. In Polypeptiden werden die Aminosäuren vom N- zum C-Terminus nummeriert. Werden für geminale Wasserstoffatome zwei getrennte Signale im Spektrum beobachtet, so wird das tieffeldverschobene Wasserstoffatom mit einem „a“ und das hochfeldverschobene Wasserstoffatom entsprechend mit einem „b“ als Index gekennzeichnet. Bei monosubstituierten Aromaten werden die Bezeichnungen *ipso*, *ortho*, *meta* und *para*, bei mehrfach substituierten Aromaten die IUPAC-Nummerierung verwendet. Bei nicht eindeutig zuzuordnenden aromatischen Signalen werden die Substituentennamen in Klammern angegeben z.B. $\text{H}_{\text{Ar}}(\text{Ph})$.

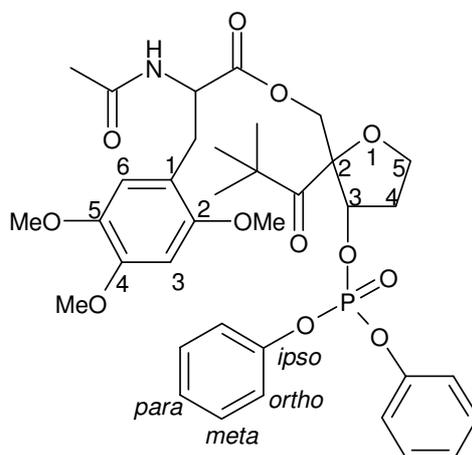


Abbildung 6.2: Die für die Interpretation der NMR-Spektren verwendete Nummerierung.

6.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

6.2.1 AAV1: Amidknüpfung zwischen dem C- und N-Terminus zweier Aminosäuren

Unter Schutzgasatmosphäre und Kühlung auf 0°C wurden, falls nicht anders angegeben, ein Äquivalent freier Säure, 1.2 Äquivalente HOBt und 1.1 Äquivalente EDC in DMF (abs.) gelöst.^[138, 139] Nach Zugabe von einem Äquivalent des freienamins wurde das Reaktionsgemisch 15-20 h gerührt und auf Raumtemperatur erwärmt. Lag das Amin in Form eines Hydrochlorids vor, so wurde der Reaktionslösung außerdem ein Äquivalent Triethylamin zugesetzt. Nach Abschluss der Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand konnte in Essigester aufgenommen und mehrfach mit gesättigter NH₄Cl- und NaHCO₃-Lösung ausgeschüttelt werden. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels unter vermindertem Druck chromatographisch an Kieselgel gereinigt.

6.2.2 AAV2: *tert.*-Butylesterspaltung mit Trifluoressigsäure

Zur Entschützung der *tert.*-Butylester wurden diese in einem Gemisch gleicher Volumenanteile Trifluoressigsäure und Dichlormethan gelöst.^[165] Nach 15 - 30 Minuten rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und mit Toluol coevaporiert. Das Rohprodukt wurde gegebenenfalls säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

6.2.3 AAV3: Benzyletherspaltung durch Hydrogenolyse

Zum Benzylether wurden 10 Gewichtsprozent Palladium auf Aktivkohle (10 % Pd) gegeben und in Methanol unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur 2 h geschüttelt.^[166] Anschließend konnte der Katalysator durch Filtration über Celite vom Reaktionsgemisch entfernt werden. Man destillierte das Lösungsmittel unter vermindertem Druck ab und reinigte das Rohprodukt chromatographisch an Kieselgel.

6.2.4 AAV4: Veresterung mit DMAP als Acylierungskatalysator

Falls nicht anders angegeben, wurde ein Äquivalent Carbonsäure mit 1.1 Äquivalenten EDC in DMF gelöst und bei Raumtemperatur 15 min unter Argonatmosphäre gerührt.^[167] Im Anschluss wurde der Reaktionslösung unter Eiskühlung ein Äquivalent des Alkohols und ein Äquivalent DMAP zugegeben. Unter Rühren wurde die Reaktion innerhalb von 15-20 h auf Raumtemperatur erwärmt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in Essigester aufgenommen und mit gesättigter NH_4Cl - und NaHCO_3 -Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase konnte über MgSO_4 getrocknet werden und nach dem Aufkonzentrieren im Vakuum gegebenenfalls an Kieselgel chromatographiert werden.

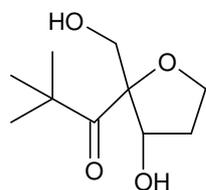
6.2.5 AAV5: Freisetzung *tert.*-Butyloxycarbonyl-geschützter Amine mit HCl

Das Boc-geschützte Amin wurde unter Eiskühlung mit 4 M Chlorwasserstofflösung in 1,4-Dioxan versetzt, auf Raumtemperatur erwärmt und für 15 min gerührt.^[168, 169] Überschüssiger Chlorwasserstoff konnte an der Wasserstrahlpumpe entfernt werden. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht und mit Toluol coevaporiert.

6.3 Synthese des *tert.*-Butylketon-Radikalvorläufers **35**

(*2R,3S*)-2-*tert.*-Butylcarbonyl-3-hydroxy-2-hydroxymethyl-tetrahydrofuran;

(*2S,3R*)-2-*tert.*-Butylcarbonyl-3-hydroxy-2-hydroxymethyl-tetrahydrofuran (**32**)



5 g (29.03 mmol) (*2R,3S*)-2-*tert.*-Butylcarbonyl-3-hydroxy-tetrahydrofuran (**31**)^[86] wurden in 18 ml Dioxan gelöst und zu einer Lösung aus 13.8 g (43.74 mmol) Bariumhydroxid Octahydrat in 82 ml Wasser gegeben. 2.85 ml (34.84 mmol) 37%-ige wässrige Formaldehyd-Lösung

32 wurden langsam zugetropft und die Mischung bei Raumtemperatur 3 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 ml gesättigter NH₄Cl-Lösung abgebrochen und bis zum Aufklaren der Suspension gerührt. Das Reaktionsgemisch konnte mit konz. HCl neutralisiert und im Anschluss dreimal mit Essigester extrahiert werden. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum aufkonzentriert. Das Rohprodukt wurde anschließend in einem Gemisch aus 2.76 g (14.51 mmol) Toluol-4-sulfonsäure Monohydrat in 200 ml Aceton gelöst und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels wurde der Rückstand an Uetikon Kieselgel mit Essigester/Pentan = 2:1 → 1:1 als Laufmittel chromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 1.73 g (8.55 mmol, 29%) **32** als gelblicher Feststoff.

C₁₀H₁₈O₄ (202.25);

ber.: C 59.39, H 8.97, O 31.64;

gef.: C 59.52, H 9.04, O 31.60.

R_f (Pentan/Essigester 1:1) = 0.26.

Smp: 62 - 64°C.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

4.42 (dd, *J* = 5.3, 1.7, 1H, H-3); 4.20 (ddd, *J* = 10.6, 8.2, 6.0, 1H, H-5_a); 4.07 (ddd, *J* = 8.4, 8.4, 2.5, 1H, H-5_b); 3.60 (d, *J* = 11.4, 1H, C-2-CH_aH_b); 3.44 (d, *J* = 11.4, 1H, C-2-CH_aH_b); 2.73 (br, 1H, C-3-OH); 2.14 (dddd, *J* = 13.4, 10.4, 8.3, 5.3, 1H, H-4_a); 1.91 (dddd, *J* = 13.1, 6.1, 2.8, 1.8, 1H, H-4_b); 1.18 (s, 9H, C(CH₃)₃).

Die Stereochemie der Verbindung **32** wurde anhand von ¹H-NOESY Messungen geklärt.

^{13}C -NMR (125.8 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

220.1 (C_q , 1C, C-2- $\underline{\text{C}}\text{O}$); 98.1 (C_q , 1C, C-2); 76.2 (C_t , 1C, C-3); 68.4 (C_s , 1C, C-5); 67.2 (C_s , 1C, C-2- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 45.5 (C_q , 1C, $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$); 33.8 (C_s , 1C, C-4); 25.7 (C_p , 3C, $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$).

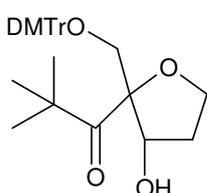
IR (NaCl, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$):

3443; 2969; 1688; 1484; 1392; 1360; 1110; 1035; 907.

MS (FAB, m/z):

203 (MH^+ , 51); 185 (27); 137 (9); 129 (11); 117 (65); 99 (20); 85 (13); 77 (11); 71 (12); 57 (100).

**(2R,3S)-2-tert.-Butylcarbonyl-2-dimethoxytrityloxymethyl-3-hydroxy-tetrahydrofuran;
(2S,3R)-2-tert.-Butylcarbonyl-2-dimethoxytrityloxymethyl-3-hydroxy-tetrahydrofuran
(33)**



33

1.73 g (8.55 mmol) Diol **32** wurden zusammen mit 2.90 g (8.55 mmol) 4,4'-Dimethoxy-triphenylchlormethan unter Argon-Atmosphäre in 80 ml Dichlormethan (abs.) gelöst. Nach der Zugabe von 1.31 ml (952 mg, 9.41 mmol) Triethylamin wurde das Gemisch 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden die flüchtigen Bestandteile unter

vermindertem Druck abdestilliert, das resultierende Öl in Essigester aufgenommen und mit ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde abgetrennt, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand konnte an Merck Kieselgel mit Essigester/Pentan = 3:1 + 1% Triethylamin als Laufmittel chromatographiert werden.

Ausbeute: 3.45 g (6.84 mmol, 80%) **33** als farbloser Feststoff.

$\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{O}_6$ (504.62) · 1/7 H_2O ;

ber.: C 73.41, H 7.21, O 19.38;

gef.: C 73.12, H 7.22, O 19.38.

R_f (Pentan/Essigester 1:1) = 0.66.

Smp: 50°C.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

7.42 (m, 2H, H_{Ar}); 7.29 (m, 6H, H_{Ar}); 7.20 (m, 1H, H_{Ar}); 6.81 (m, 4H, H_{Ar}); 4.36 (dt, $J = 5.8$, 2.0, 1H, H-3); 4.22 (ddd, $J = 9.8$, 8.3, 6.3, 1H, H-5_a); 4.11 (dt, $J = 8.3$, 3.3, 1H, H-5_b); 3.79 (s, 6H, 2 x $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 3.25 (d, $J = 9.6$, 1H, C-2- CH_aH_b); 3.08 (d, $J = 9.6$, 1H, C-2- CH_aH_b); 2.26 (br, 1H, C-3-OH); 2.22 (m, 1H, H-4_a); 1.91 (m, 1H, H-4_b); 1.20 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

218.6 (C_q , 1C, C-2-CO); 158.6 (C_q , 2C, C_{Ar}); 144.7 (C_q , 1C, C_{Ar}); 136.0 (C_q , 1C, C_{Ar}); 135.9 (C_q , 1C, C_{Ar}); 130.3 (C_t , 4C, C_{Ar}); 128.4 (C_t , 2C, C_{Ar}); 127.9 (C_t , 2C, C_{Ar}); 126.9 (C_t , 1C, C_{Ar}); 113.2 (C_t , 4C, C_{Ar}); 98.0 (C_q , 1C, C-2); 86.7 (C_q , 1C, O- C_{Ar}); 77.0 (C_t , 1C, C-3); 68.3, 68.0 (C_s , 2C, C-5, C-2- CH_2); 55.3 (C_p , 2C, 2 x $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 45.8 (C_q , 1C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 33.6 (C_s , 1C, C-4); 26.2 (C_p , 3C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$):

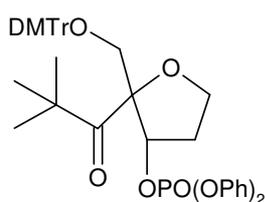
3450; 3058; 2957; 1693; 1608; 1511; 1446; 1251; 1036.

MS (FAB, m/z):

505 (MH^+ , 1); 303 (100); 273 (2); 207 (8); 195 (3); 165 (3); 135 (7); 105 (6); 77 (8); 57 (48).

(2R,3S)-2-tert.-Butylcarbonyl-2-dimethoxytrityloxymethyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran;

(2S,3R)-2-tert.-Butylcarbonyl-2-dimethoxytrityloxymethyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran (34)



34

3.45 g (6.84 mmol) des Alkohols **33** wurden unter Eiskühlung in 80 ml Dichlormethan (abs.) vorgelegt und mit 2.71 ml (2.81 g, 34.20 mmol) 1-Methyl-imidazol und 4.24 ml (5.51 g, 20.52 mmol) Phosphorsäure-diphenylester-chlorid versetzt. Nach 15 Minuten wurde das Gemisch auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 18 h gerührt. Die Reaktionslösung konnte anschließend mit ges. NaHCO_3 -Lösung gewaschen und die organische Phase über MgSO_4 getrocknet werden. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels

am Rotationsverdampfer wurde das Rohprodukt an Merck Kieselgel mit Essigester/Pentan = 3:1 + 1% Triethylamin als Laufmittel gereinigt.

Ausbeute: 3.78 g (5.13 mmol, 75%) **34** als farbloser Feststoff.

$C_{43}H_{45}O_9P$ (736.81) · 1/8 H_2O ;

ber.: C 69.88, H 6.17, O 19.75;

gef.: C 69.97, H 6.16, O 19.77.

R_f (Pentan/Essigester 1:1) = 0.66.

Smp: 39°C.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

7.42-7.05 (m, 18 H, C_{Ar}); 6.80 (m, 5 H, C_{Ar}); 5.13 (t, $J = 5.6$, 1H, H-3); 4.22 (m, 1H, H-5_a); 4.13 (m, 1H, H-5_b); 3.80, 3.78 (s, 6H, 2 x $C_{Ar}-OCH_3$); 3.33 (d, $J = 9.6$, 1H, C-2- CH_aH_b); 3.17 (d, $J = 9.6$, 1H, C-2- CH_aH_b); 2.42 (m, 1H, H-4_a); 2.17 (m, 1H, H-4_b); 1.14 (s, 9H, $C(CH_3)_3$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

213.0 (C_q , 1C, C-2- \underline{CO}); 158.9 (C_q , 2C, C_{Ar} (DMTr)); 150.9, (C_q , 1C, C_{Ar} (Ph)); 150.7 (C_q , 1C, C_{Ar} (Ph)); 144.8 (C_q , 1C, C_{Ar} (DMTr)); 136.0 (C_q , 1C, C_{Ar} (DMTr)); 135.8 (C_q , 1C, C_{Ar} (DMTr)); 130.5 (C_t , 4C, C_{Ar} (DMTr)); 130.5 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 130.0 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 128.6 (C_t , 2C, C_{Ar} (DMTr)); 128.1 (C_t , 2C, C_{Ar} (DMTr)); 127.1 (C_t , 1C, C_{Ar} (DMTr)); 125.7 (C_t , 1C, C_{Ar} (Ph)); 125.6 (C_t , 1C, C_{Ar} (Ph)); 120.6 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 120.5 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 113.5 (C_t , 4C, C_{Ar} (DMTr)); 97.1 (C_q , 1C, C-2); 87.4 (C_q , 1C, O- \underline{C}_{Ar3}); 85.4 (C_t , 1C, C-3); 68.6, 68.5 (C_s , 2C, C-5, C-2- \underline{CH}_2); 55.5 (C_p , 2C, 2 x $C_{Ar}-OCH_3$); 45.6 (C_q , 1C, $\underline{C}(CH_3)_3$); 33.8 (C_s , 1C, C-4); 26.4 (C_p , 3C, $C(\underline{CH}_3)_3$).

^{31}P -NMR (162.0 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

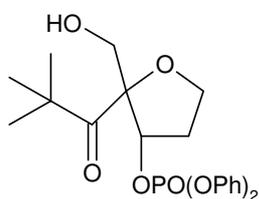
-13.54 ($OPO(OPh)_2$).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}/cm^{-1}$):

3062; 2960; 1699; 1604; 1507; 1250; 1185; 1031; 761.

MS (FAB+KCl, m/z):

775 (MK^+ , 3); 303 (100); 289 (5); 251 (10); 189 (6); 135 (5); 105 (5); 89 (6); 77 (12); 57 (31).

(2R,3S)-2-tert.-Butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-2-hydroxymethyl-tetrahydrofuran;**(2S,3R)-2-tert.-Butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-2-hydroxymethyl-tetrahydrofuran (35)****35**

Einer Lösung von 2.60 g (3.53 mmol) der Dimethoxytrityl-geschützten Verbindung **34** in 20 ml Methanol wurden 10 ml einer 2%-igen Toluol-4-sulfonsäure Monohydrat Lösung in einem Gemisch aus Dichlormethan/Methanol = 4:1 zugesetzt. Die sich sofort orange verfärbende Mischung wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss tropfenweise mit Triethylamin versetzt, bis eine Entfärbung des Reaktionsgemisches zu beobachten war. Die Lösung wurde im Vakuum zur Trockne gebracht und der Rückstand durch Chromatographie an Uetikon Kieselgel gereinigt (Essigester/Pentan = 1:1).

Ausbeute: 1.19 g (2.74 mmol, 78%) **35** als farbloses Öl.

$C_{22}H_{27}O_7P$ (434.43);

ber.: C 60.83, H 6.26, O 25.78;

gef.: C 60.72, H 6.33, O 26.01.

R_f (Pentan/Essigester 1:1) = 0.13.

1H -NMR (400 MHz, Methanol- d_4 , δ /ppm):

7.40 (pseudo t, $J = 7.8$, 4H, H_{Ar}); 7.21 (m, 6H, H_{Ar}); 5.20 (t, $J = 5.8$, 1H, H-3); 4.20 (m, 1H, H-5_a); 4.10 (m, 1H, H-5_b); 3.71 (d, $J = 11.5$, 1H, C-2- \underline{CH}_aH_b); 3.58 (d, $J = 11.5$, 1H, C-2- \underline{CH}_aH_b); 2.37 (m, 1H, H-4_a); 2.15 (m, 1H, H-4_b); 1.15 (s, 9H, C(\underline{CH}_3)₃).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, Methanol- d_4 , δ /ppm):

215.3 (C_q , 1C, C-2- \underline{CO}); 151.6 (C_q , 2C, C_{Ar}); 131.1 (C_t , 2C, C_{Ar}); 131.0 (C_t , 2C, C_{Ar}); 126.9 (C_t , 1C, C_{Ar}); 126.8 (C_t , 1C, C_{Ar}); 121.3 (C_t , 2C, C_{Ar}); 121.2 (C_t , 2C, C_{Ar}); 99.2 (C_q , 1C, C-2); 86.3 (C_t , 1C, C-3); 68.9, 68.1 (C_s , 2C, C-5, C-2- \underline{CH}_2); 46.1 (C_q , 1C, $\underline{C}(\underline{CH}_3)_3$); 34.4 (C_s , 1C, C-4), 26.3 (C_p , 3C, C(\underline{CH}_3)₃).

^{31}P -NMR (162.0 MHz, Methanol- d_4 , δ /ppm):

-13.58 ($\underline{OPO}(\underline{OPh})_2$).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$):

3439; 3069; 2966; 1946; 1695; 1592; 1488; 1282; 769.

UV/VIS (Acetonitril)

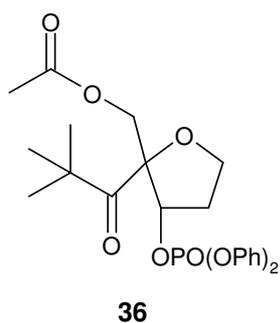
308 nm ($\epsilon = 36 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

MS (FAB, m/z):

435 (MH^+ , 43); 251 (100); 185 (18); 167 (29); 155 (11); 113 (21); 89 (8); 85 (17); 77 (17); 57 (90).

Essigsäure-[(2*R*,3*S*)-2-*tert*.-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester;

Essigsäure-[(2*S*,3*R*)-2-*tert*.-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester (36**)**



200 mg (0.460 mmol) des primären Alkohols **35** wurden in 2 ml Dichlormethan (abs.) gelöst und mit 87 μl (94 mg, 0.921 mmol) Essigsäureanhydrid und 74 μl (73 mg, 0.921 mmol) Pyridin versetzt. Nach 2 h rühren bei Raumtemperatur wurden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Toluol coevaporiert. Das Rohprodukt konnte an Merck Kieselgel mit

Dichlormethan/Methanol = 300:1 \rightarrow 200:1 als Laufmittel chromatographisch gereinigt werden.

Ausbeute: 185 mg (0.388 mmol, 84%) **36** als farbloses Öl.

$\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{O}_8\text{P}$ (476.47);

ber.: C 60.50, H 6.13, O 26.86;

gef.: C 60.50, H 6.16, O 27.00.

R_f (Hexan/Aceton 5:1) = 0.11.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, Methanol- d_4 , δ/ppm):

7.43 (m, 4H, H_{Ar}); 7.25 (m, 6H, H_{Ar}); 5.27 (m, 1H, H-3); 4.29 (d, $J = 11.4$, 1H, C-2- CH_aH_b); 4.18 (d, $J = 11.4$, 1H, C-2- CH_aH_b); 4.15 (m, 2H, H-5); 2.43 (m, 1H, H-4 $_a$); 2.20 (m, 1H, H-4 $_b$); 2.05 (s, 3H, CH_3CO); 1.20 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, Methanol- d_4 , δ/ppm):

214.2 (C_q , 1C, C-2- C=O); 171.8 (C_q , 1C, $\text{CH}_3\text{C=O}$); 151.5 (C_q , 2C, C_{Ar}); 131.1 (C_t , 2C, C_{Ar}); 131.1 (C_t , 2C, C_{Ar}); 127.0 (C_t , 1C, C_{Ar}); 126.9 (C_t , 1C, C_{Ar}); 121.3 (C_t , 2C, C_{Ar}); 121.2 (C_t , 2C, C_{Ar}); 96.6 (C_q , 1C, C-2); 85.6 (C_t , 1C, C-3); 68.9, 67.8 (C_s , 2C, C-5, C-2- CH_2); 46.3 (C_q , 1C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 33.8 (C_s , 1C, C-4); 26.3 (C_p , 3C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 20.7 (C_p , 1C, CH_3CO).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162.0 MHz, Methanol- d_4 , δ/ppm):

-13.60 ($\text{OPO}(\text{OPh})_2$).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$):

3072; 2972; 1749; 1590; 1488; 1289; 1223; 1189.

UV/VIS (Acetonitril)

300 nm ($\epsilon = 33 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

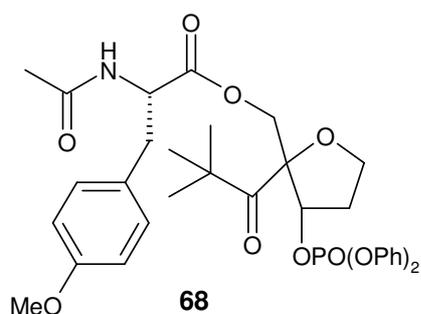
MS (ESI, MeOH, m/z):

499.4 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100), 975.0 ($[\text{2M}+\text{Na}]^+$, 7).

6.4 Synthese eines Modellsystems mit Tyrosin(*O*-methyl) als Elektronendonator

N-Acetyl-tyrosin-(*O*-methyl)-[(2*R*,3*S*)-2-*tert.*-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester;

N-Acetyl-tyrosin-(*O*-methyl)-[(2*S*,3*R*)-2-*tert.*-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester (**68**)



Nach **AAV4** konnten 120 mg (0.506 mmol) *N*-Acetyl-(*O*-methyl)-tyrosin mit 39 mg (0.253 mmol) EDC und 28 mg (0.230 mmol) DMAP in 3 ml DMF (abs.) mit 120 mg (0.230 mmol) des Furanderivates **35** verestert werden. Das nach der Aufarbeitung erhaltene Rohprodukt wurde an Merck Kieselgel chromatographisch gereinigt

(Dichlormethan/Aceton = 20:1 → 5:1).

Ausbeute: 112 mg (0.171 mmol, 74%) **68** als farbloses Öl.

$C_{34}H_{40}NO_{10}P$ (653.67);

ber.: C 62.47, H 6.17, N 2.14, O 24.48;

gef.: C 62.33, H 6.25, N 2.09, O 24.65.

R_f (Dichlormethan/Aceton 10:1) = 0.14.

1H -NMR (400 MHz, Methanol- d_4 , δ /ppm):

7.40 (m, 4H, H_{Ar} (Ph)); 7.21 (m, 6H, H_{Ar} (Ph)); 7.10, 7.07 (2 x d, $J = 8.6$, 2H, ortho- H_{Ar} (Tyr)); 6.83, 6.81 (2 x d, $J = 8.6$, 2H, meta- H_{Ar} (Tyr)); 5.23 (m, 1H, H-3); 4.56 (m, 1H, $CH(CH_2C_{Ar})$); 4.24 (m, 1H, C-2- CH_aH_b); 4.12 (m, 3H, C-2- CH_aH_b , H-5); 3.75, 3.74 (2 x s, 3H, $C_{Ar}-OCH_3$); 3.05 (m, 1H, $CH(CH_3H_bC_{Ar})$); 2.86 (m, 1H, $CH(CH_aH_bC_{Ar})$); 2.35 (m, 1H, H-4_a); 2.15 (m, 1H, H-4_b); 1.89, 1.89 (2 x s, 3H, CH_3CO); 1.16 (s, 9H, $C(CH_3)_3$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, Methanol- d_4 , δ /ppm):

213.9, 213.9 (C_q , 1C, C-2- $\underline{C}O$); 173.1, 173.0 (C_q , 1C, $CH_3\underline{C}O$); 172.6 (C_q , 1C, $\underline{C}OO$); 160.1 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 151.7, 151.6 (C_q , 1C, C_{Ar} (Ph)); 151.6, 151.5 (C_q , 1C, C_{Ar} (Ph)); 131.2, 131.2 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 131.1, 131.0 (C_t , 4C, C_{Ar} (Ph)); 129.9, 129.8 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 127.0, 126.9 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 121.3, 121.2 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 121.2, 121.1 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 114.9 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 96.2 (C_q , 1C, C-2); 85.8, 85.7 (C_t , 1C, C-3); 69.1, 69.0 (C_s , 1C, C-5); 68.7, 68.5, (C_s , 1C, C-2- $\underline{C}H_2$); 55.6 (C_t , 1C, $\underline{C}H(CH_2C_{Ar})$); 55.6 (C_p , 1C, C_{Ar} -

OCH₃); 46.3 (C_q, 1C, C(CH₃)₃); 37.6, 37.6 (C_s, 1C, CH(CH₂C_{Ar})); 33.8, 33.8 (C_s, 1C, C-4), 26.4 (C_p, 3C, C(CH₃)₃); 22.2, 22.2 (C_p, 1C, CH₃CO).

³¹P-NMR (162.0 MHz, Methanol-d₄, δ/ppm):

-13.64 (OPO(OPh)₂).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹):

3313; 3066; 2964; 1747; 1666; 1489; 1287; 1188; 1020.

UV/VIS (Acetonitril)

308 nm ($\epsilon = 38 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

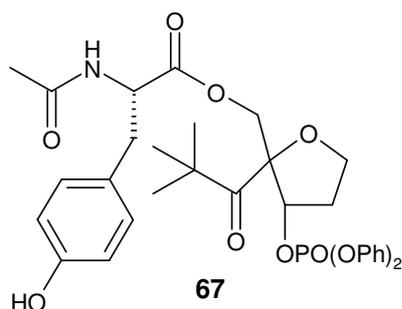
MS (FAB, m/z):

654 (MH⁺, 31); 251 (29); 220 (12); 192 (21); 167 (20); 161 (24); 150 (22); 121 (26); 93 (11); 57 (100).

6.5 Synthese von Oligopeptid-Modellsystemen mit Tyrosin als Elektronendonator

***N*-Acetyl-tyrosin-[(2*R*,3*S*)-2-*tert.*-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester;**

***N*-Acetyl-tyrosin-[(2*S*,3*R*)-2-*tert.*-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester (67)**



376 mg (1.20 mmol) *N*-Acetyl-(*O*-benzyl)-tyrosin wurden nach **AAV4** mit 253 mg (1.32 mmol) EDC und 147 mg (1.20 mmol) DMAP in 10 ml DMF (abs.) mit 522 mg (1.20 mmol) des primären Alkohols **35** verestert. Das so erhaltene Rohprodukt konnte nach der Aufarbeitung ohne anschließende chromatographische Reinigung weiter umgesetzt werden. Dazu wurde der erhaltene Ester zur Benzyletherspaltung nach **AAV3** in 5 ml Methanol zur Reaktion gebracht. Der nach der Aufarbeitung erhaltene Rückstand wurde mit Dichlormethan/Methanol = 50:1 als Laufmittel an Merck Kieselgel chromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 537 mg (0.84 mmol, 70% über zwei Stufen) **67** als farbloser Feststoff.

$C_{33}H_{38}NO_{10}P$ (639.64) · 1/4 H_2O ;

ber.: C 61.53, H 6.02, N 2.17, O 25.46;

gef.: C 61.36, H 6.20, N 2.16, O 25.43.

R_f (Dichlormethan/Methanol 50:1) = 0.11.

Smp: 55°C.

1H -NMR (400 MHz, Methanol- d_4 , δ /ppm):

7.38 (m, 4H, H_{Ar} (Ph)); 7.23 (m, 6H, H_{Ar} (Ph)); 7.00, 6.98 (2 x d, $J = 8.6$, 2H, ortho- H_{Ar} (Tyr)); 6.71, 6.69 (2 x d, $J = 8.6$, 2H, meta- H_{Ar} (Tyr)); 5.24 (m, 1H, H-3); 4.56 (m, 1H, $\underline{CH}(\underline{CH_2C_{Ar}})$); 4.25 (m, 1H, C-2- $\underline{CH_aH_b}$); 4.12 (m, 3H, C-2- $\underline{CH_aH_b}$, H-5); 3.02 (m, 1H, $\underline{CH}(\underline{CH_aH_bC_{Ar}})$); 2.83 (m, 1H, $\underline{CH}(\underline{CH_aH_bC_{Ar}})$); 2.36 (m, 1H, H-4_a); 2.16 (m, 1H, H-4_b); 1.89, 1.88 (2 x s, 3H, $\underline{CH_3CO}$); 1.17 (s, 9H, $C(\underline{CH_3})_3$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, Methanol- d_4 , δ /ppm):

213.9, 213.9 (C_q , 1C, C-2- \underline{CO}); 173.0, 173.0 (C_q , 1C, $\underline{CH_3CO}$); 172.6, 172.6 (C_q , 1C, \underline{COO}); 157.4 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 151.7, 151.6 (C_q , 1C, C_{Ar} (Ph)); 151.6, 151.5 (C_q , 1C, C_{Ar} (Ph)); 131.2, 131.2 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 131.1, 131.0 (C_t , 4C, C_{Ar} (Ph)); 128.6, 128.5 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 127.0, 126.9 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 121.3, 121.2 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 121.1, 121.1 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 116.3, 116.3 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 96.2, 96.1 (C_q , 1C, C-2); 85.8, 85.7 (C_t , 1C, C-3); 69.1, 69.0, (C_s , 1C, C-5); 68.7, 68.5 (C_s , 1C, C-2- $\underline{CH_2}$); 55.6, 55.6 (C_t , 1C, $\underline{CH}(\underline{CH_2C_{Ar}})$); 46.3 (C_q , 1C, $\underline{C}(\underline{CH_3})_3$); 37.6, 37.6 (C_s , 1C, $\underline{CH}(\underline{CH_2C_{Ar}})$); 33.8, 33.8 (C_s , 1C, C-4), 26.4, 26.4 (C_p , 3C, $\underline{C}(\underline{CH_3})_3$); 22.3, 22.2 (C_p , 1C, $\underline{CH_3CO}$).

^{31}P -NMR (162.0 MHz, Methanol- d_4 , δ /ppm):

-13.66 ($\underline{OPO}(\underline{OPh})_2$).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$):

3309; 2966; 1747; 1655; 1489; 1275; 1188; 1020; 767.

UV/VIS (Acetonitril)

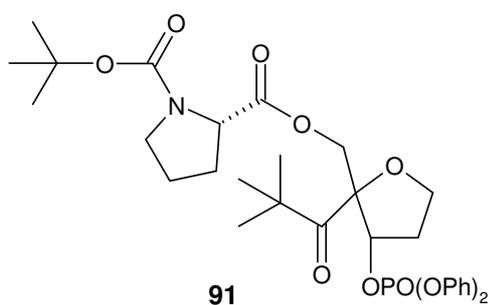
308 nm ($\epsilon = 37 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

MS (FAB, m/z):

640 (MH⁺, 30); 251 (38); 206 (12); 178 (18); 167 (18); 147 (17); 107 (11); 83 (17); 77 (13); 57 (100).

***N*-tert.-Butyloxycarbonyl-prolin-[(2*R*,3*S*)-2-*tert*.-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester;**

***N*-tert.-Butyloxycarbonyl-prolin-[(2*S*,3*R*)-2-*tert*.-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester (**91**)**



1.24 g (5.74 mmol) *N*-tert.-Butyloxycarbonyl-prolin wurden nach **AAV4** mit 446 mg (2.87 mmol) EDC und 319 mg (2.61 mmol) DMAP in 30 ml DMF (abs.) mit 1.13 mg (2.61 mmol) des primären Alkohols **35** zur Reaktion gebracht. Das nach der Aufarbeitung erhaltene Rohprodukt wurde durch Säulen-

chromatographie an Merck Kieselgel gereinigt (Dichlormethan/Aceton = 40:1 → 20:1). Dabei konnten 560 mg (1.29 mmol, 49%) **35** reisoliert werden.

Ausbeute: 740 mg (1.17 mmol, 89% umsatzbezogen) **91** als farbloser Feststoff.

C₃₂H₄₂NO₁₀P (631.66);

ber.: C 60.85, H 6.70, N 2.22, O 25.33;

gef.: C 61.07, H 6.62, N 2.20, O 25.07.

R_f (Dichlormethan/Aceton 10:1) = 0.32.

Smp: 53°C.

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, δ/ppm):

7.40 (m, 4H, H_{Ar} (Ph)); 7.21 (m, 6H, H_{Ar} (Ph)); 5.27 (m, 1H, H-3); 4.33 (m, 2H, C-2-CH₂); 4.15 (m, 3H, H-5, H-2 (Pro)); 3.40 (m, 2H, H-5 (Pro)); 2.41 (m, 1H, H-3_a (Pro)); 2.22 (m, 2H, H-3_b (Pro), H-4_a); 1.98 (m, 3H, H-4 (Pro), H-4_b); 1.42 (s, 3H, COOC(CH₃)₃); 1.41 (s, 3H, COOC(CH₃)₃); 1.40 (s, 3H, COOC(CH₃)₃); 1.17 (s, 9H, COC(CH₃)₃).

^{13}C -NMR (100.1 MHz, Methanol- d_4 , δ/ppm):

213.9, 213.8 (C_q , 1C, C-2-CO); 193.6 (C_q , 1C, COOC(CH $_3$) $_3$); 174.1, 173.8 (C_q , 1C, C-2-O $\underline{\text{C}}\text{O}$); 151.7, 151.6 (C_q , 1C, C_{Ar} (Ph)); 151.6, 151.5 (C_q , 1C, C_{Ar} (Ph)); 131.1, 131.1 (C_t , 4C, C_{Ar} (Ph)); 127.1, 127.0 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 121.3, 121.2 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 121.2, 121.1 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 96.3, 96.2, 96.1, 96.0 (C_q , 1C, C-2); 85.9, 85.5 (C_t , 1C, C-3); 81.7, 81.6, 81.4 (C_q , 1C, COOC(CH $_3$) $_3$); 69.1, 69.0, 68.6, 68.3 (C_s , 2C, C-5, C-2- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 60.6, 60.5, 60.2 (C_t , 1C, C-2 (Pro)); 47.8, 47.5 (C_s , 1C, C-5 (Pro)); 46.3, 46.3, 46.2 (C_q , 1C, CO $\underline{\text{C}}$ (CH $_3$) $_3$); 33.8, 33.7 (C_s , 1C, C-4); 31.7, 30.8 (C_s , 1C, C-3 (Pro)); 28.7, 28.6, 28.6 (C_p , 3C, COOC($\underline{\text{C}}\text{H}_3$) $_3$); 26.4 (C_q , 3C, COC($\underline{\text{C}}\text{H}_3$) $_3$); 25.2, 24.5, 24.5 (C_s , 1C, C-4 (Pro)).

^{31}P -NMR (162.0 MHz, Methanol- d_4 , δ/ppm):

-13.58 (OPO(OPh) $_2$).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$):

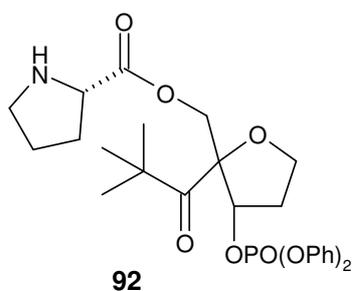
2978; 1754; 1701; 1591; 1489; 1396; 1189; 1023; 957.

MS (ESI, MeOH, m/z):

654.4 ([M+Na] $^+$, 100), 670.3 ([M+K] $^+$, 3).

Prolin-[(2*R*,3*S*)-2-*tert*-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester;

Prolin-[(2*S*,3*R*)-2-*tert*-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester (92**)**



700 mg (1.11 mmol) des *tert*-Butylcarbamat **91** wurden nach **AAV5** in 4 ml einer 4 M Lösung HCl in 1,4-Dioxan umgesetzt. Das so erhaltene Hydrochlorid konnte nach der Aufarbeitung in 20 ml Dichlormethan und 20 ml gesättigter NaHCO $_3$ -Lösung aufgenommen und in das freie Amin überführt werden. Die wässrige Phase wurde anschließend mehrfach mit

Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 590 mg (1.17 mmol, quant.) **92** als farbloses Öl.

$C_{27}H_{34}NO_8P$ (531.55) · 1/6 H_2O ;

ber.: C 60.67, H 6.47, N 2.62, O 24.44;

gef.: C 60.86, H 6.50, N 2.54, O 24.44.

R_f (Dichlormethan/Methanol 10:1) = 0.31.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

7.32 (m, 4H, H_{Ar} (Ph)); 7.19 (m, 6H, H_{Ar} (Ph)); 5.17 (m, 1H, H-3); 4.23 (m, 2H, C-2- $\underline{CH_2}$); 4.09 (m, 2H, H-5); 3.71 (m, 1H, H-2 (Pro)); 3.03 (m, 1H, H-5_a (Pro)); 2.89 (m, 1H, H-5_b (Pro)); 2.31 (m, 2H, H-4); 2.07 (m, 1H, H-3_a (Pro)); 1.88 (m, 1H, H-3_b (Pro)); 1.73 (m, 2H, H-4 (Pro)); 1.16 (s, 9H, C($\underline{CH_3}$)₃).

^{13}C -NMR (100.1 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

212.9, 212.8 (C_q , 1C, C-2- \underline{CO}); 175.3, 175.3 (C_q , 1C, \underline{COO}); 150.8, 150.7 (C_q , 1C, C_{Ar} (Ph)); 150.7, 150.6 (C_q , 1C, C_{Ar} (Ph)); 130.2 (C_t , 4C, C_{Ar} (Ph)); 126.0, 125.8 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 120.6 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 120.5 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 95.3, 95.2 (C_q , 1C, C-2); 84.2, 84.1 (C_t , 1C, C-3); 68.5, 68.4 (C_s , 1C, C-5); 67.8, 67.7 (C_s , 1C, C-2- $\underline{CH_2}$); 60.0, 59.9 (C_t , 1C, C-2 (Pro)); 47.4, 47.4 (C_s , 1C, C-5 (Pro)); 45.7, 45.6 (C_q , 1C, $\underline{C(CH_3)_3}$); 33.5 (C_s , 1C, C-4); 30.5 (C_s , 1C, C-3 (Pro)); 26.2, 26.2 (C_p , 3C, C($\underline{CH_3}$)₃); 25.9, 25.9 (C_s , 1C, C-4 (Pro)).

^{31}P -NMR (162.0 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

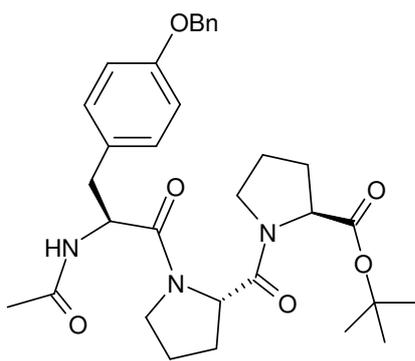
-13.38 ($\underline{OPO(OPh)_2}$).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}/cm^{-1}$):

3443; 2971; 1739; 1698; 1591; 1488; 1288; 1190; 1023.

MS (FAB, m/z):

532 (MH^+ , 56); 435 (22); 251 (74); 185 (10); 167 (29); 155 (5); 136 (5); 116 (12); 70 (88); 57 (78).

***N*-Acetyl-tyrosinyl-(*O*-benzyl)-prolinyl-prolin-*tert*.-butylester (**121**)****121**

580 mg (1.11 mmol) *N-tert*.-Butyloxycarbonyl-tyrosinyl-(*O*-benzyl)-prolin-*tert*.-butylester wurden nach **AAV5** in 4 ml einer 4 M Lösung HCl in 1,4-Dioxan umgesetzt. Nach dem Entfernen der flüchtigen Bestandteile im Vakuum wurde der Rückstand in 2 ml (1.51 g, 11.68 mmol) *N*-Ethyl-diisopropylamin vorgelegt und langsam mit 1.05 ml (1.13 g, 11.10 mmol) Essigsäureanhydrid versetzt. Nach 40 min wurde das Reaktionsgemisch unter vermindertem Druck zur

Trockne gebracht, in Essigester aufgenommen und mit gesättigter NaHCO₃- und NH₄Cl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand an Uetikon Kieselgel chromatographisch gereinigt (Dichlormethan/Methanol =97:3 → 95:5). Der so erhaltene *tert*.-Butylester wurde nach **AAV2** mit 2 ml Trifluoressigsäure und 2 ml Dichlormethan in die freie Carbonsäure überführt. Das Dipeptid wurde anschließend mit 84 mg (0.491 mmol) Prolin-*tert*.-butylester, 103 mg (0.540 mmol) EDC, 80 mg (0.589 mmol) HOBt und 68 µl (49 mg, 0.491 mmol) Triethylamin in 2 ml DMF (abs.) nach **AAV1** umgesetzt und an Uetikon Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 93:7 als Laufmittel gereinigt.

Ausbeute: 139 mg (0.247 mmol, 22% über vier Stufen) **121** als farbloses Öl.

C₃₂H₄₁N₃O₆ (563.68);

R_f (Dichlormethan/Methanol 10:1) = 0.30.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

7.33 (m, 5H, C_{Ar} (Bn)); 7.10 (d, *J* = 8.6, 2H, H_{Ar} (Tyr)); 6.85 (d, *J* = 8.6, 2H, H_{Ar} (Tyr)); 6.62, 6.45 (m, 1H, CONH); 5.04, 4.98 (2 x s, 2H, Ph-CH₂); 4.91, 4.65, 4.45, 4.37, 4.29 (5 x m, 3H, CH(CH₂C_{Ar}), H-2(Pro)); 3.79-3.24 (m, 4H, H-5 (Pro)); 3.07 (m, 1H, CH(CH_aH_bC_{Ar})); 2.83 (m, 1H, CH(CH_aH_bC_{Ar})); 2.19-1.91 (m, 8H, H-3 (Pro), H-4 (Pro)); 1.89, 1.86 (2 x s, 3H, CH₃CO); 1.42, 1.36 (2 x s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

171.7, 171.6, 170.5, 170.3, 170.1, 169.9 (C_q, 4C, C=O); 158.1, 158.0 (C_q, 1C, C_{Ar} (Tyr)); 137.6, 137.4 (C_q, 1C, C_{Ar} (Tyr)); 131.2, 130.8 (C_t, 2C, C_{Ar} (Tyr)); 129.0, 128.9, 128.9, 127.89, 127.7

(C_t, 5C, C_{Ar} (Bn)); 128.3, 128.2 (C_q, 1C, C_{Ar} (Bn)); 115.3, 115.0 (C_t, 2C, C_{Ar} (Tyr)); 81.5, 81.4 (C_q, 1C, C(CH₃)₃); 70.3, 70.2 (C_s, 1C, Ph-CH₂O); 60.0, 59.9, 58.3, 58.2 (C_t, 2C, C-2 (Pro)); 53.9, 53.6, 52.2 (C_t, 1C, CH(CH₂C_{Ar})); 47.7, 47.0, 46.8 (C_s, 2C, C-5 (Pro)); 40.2, 37.2, 36.8 (C_s, 1C, CH(CH₂C_{Ar})); 29.3, 29.1, 28.7 (C_s, 2C, C-3 (Pro)); 28.4, 28.3 (C_p, 2C, C(CH₃)₃); 25.3, 25.3, 25.1 (C_s, 2C, C-4 (Pro)); 23.4, 22.4 (C_p, 1C, CH₃CO).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$):

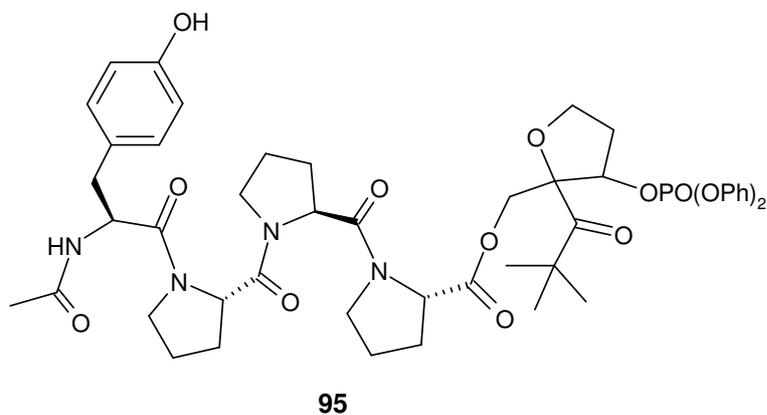
3489; 3300; 2978; 1733; 1644; 1511; 1433; 1156; 728.

MS (FAB, m/z):

564 (MH⁺, 14); 306 (4); 269 (17); 237 (9); 213 (55); 211 (7); 116 (7); 91 (35); 70 (100); 57 (12).

***N*-Acetyl-tyrosinyl-prolinyl-prolinyl-prolin-[(2*R*,3*S*)-2-*tert*-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester;**

***N*-Acetyl-tyrosinyl-prolinyl-prolinyl-prolin-[(2*S*,3*R*)-2-*tert*-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester (**95**)**



106 mg (0.188 mmol) des Tripeptids **121** wurden nach **AAV2** mit 1 ml Trifluoressigsäure in 1 ml Dichlormethan zur entsprechenden freien Säure (**93**) umgesetzt. Diese wurde zusammen mit 100 mg (0.188 mmol) des

sekundären Amins **92**, 32 mg (0.207 mmol) EDC, 31 mg (0.226 mmol) HOBt und 26 μl (19 mg, 0.188 mmol) Triethylamin nach **AAV1** zur Reaktion gebracht. Nach der Aufarbeitung konnte das Rohprodukt an Merck Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol = 30:1 \rightarrow 20:1 säulenchromatographisch gereinigt werden. Zur Spaltung der Benzylether-Schutzgruppe wurde die Verbindung anschließend nach **AAV3** umgesetzt. Das so erhaltene Endprodukt **95** wurde an Merck Kieselgel chromatographisch gereinigt (Dichlormethan/Methanol = 30:1 \rightarrow 20:1).

Ausbeute: 70 mg (0.075 mmol, 40% über zwei Stufen) **95** als farbloser Feststoff.

$C_{48}H_{59}N_4O_{13}P$ (930.97) · 1/2 H_2O ;

ber.: C 61.33, H 6.43, N 5.96, O 22.98;

gef.: C 61.39, H 6.39, N 5.94, O 22.94.

R_f (Dichlormethan/Methanol 10:1) = 0.32.

Smp: 115°C.

1H -NMR (500 MHz, Acetonitril- d_3 , δ /ppm):

all-trans-Konformation: 7.55 (s, 1H, OH); 7.40 (m, 4H, C_{Ar} (Ph)); 7.22 (m, 6H, C_{Ar} (Ph)); 7.07 (m, 2H, H_{Ar} (Tyr)); 6.73 (m, 1H, CONH); 6.66 (m, 2H, H_{Ar} (Tyr)); 5.21 (m, 1H, H-3); 4.76 (dt, $J = 4.9, 3.1$, 1H, CH(CH $_2$ C_{Ar})); 4.65, 4.64 (2 x m, 1H, H-2 (Pro-1)); 4.59 (m, 1H, H-2 (Pro-2)); 4.26, 4.24 (2 x m, 1H, H-2 (Pro-3)); 4.23-4.10 (m, 2H, C-2-CH $_2$); 4.11 (m, 2H, H-5); 3.70 (m, 2H, H-5 (Pro-2)); 3.69 (m, 1H, H-5 $_a$ (Pro-3)); 3.68 (m, 1H, H-5 $_a$ (Pro-1)); 3.65 (m, 1H, H-5 $_b$ (Pro-1)); 3.50 (m, 1H, H-5 $_b$ (Pro-3)); 2.95 (dd, $J = 14.1, 4.7$, 1H, CH(CH $_a$ H $_b$ C_{Ar})); 2.68 (dd, $J = 14.1, 8.7$, 1H, CH(CH $_a$ H $_b$ C_{Ar})); 2.40-2.31 (m, 2H, H-4); 1.99-1.75 (m, 12H, H-3 (Pro), H-4 (Pro)); 1.79 (s, 3H, CH $_3$ CO); 1.15 (s, 9H, C(CH $_3$) $_3$).

cis-trans-trans-Konformation: 7.55 (s, 1H, OH); 7.40 (m, 4H, C_{Ar} (Ph)), 7.22 (m, 6H, H_{Ar} (Ph)); 7.01 (m, 2H, H_{Ar} (Tyr)); 6.76 (m, 1H, CONH); 6.72 (m, 2H, H_{Ar} (Tyr)); 5.21 (m, 1H, H-3); 4.45 (dt, $J = 4.9, 3.1$, 1H, CH(CH $_2$ C_{Ar})); 3.95 (m, 1H, H-2 (Pro-1)); 4.53 (m, 1H, H-2 (Pro-2)); 4.23 (m, 1H, H-2 (Pro-3)); 4.23-4.10 (m, 2H, C-2-CH $_2$); 4.11 (m, 2H, H-5); 3.48 (m, 1H, H-5 $_a$ (Pro-2)); 3.62 (m, 1H, H-5 $_a$ (Pro-3)); 3.50 (m, 1H, H-5 $_b$ (Pro-3)); 3.42-3.32 (m, 2H, H-5 (Pro-1)); 3.32 (m, 1H, H-5 $_b$ (Pro-2)); 2.81-2.73 (m, 2H, CH(CH $_2$ C_{Ar})); 2.40-2.31 (m, 2H, H-4); 2.12-1.60 (m, 12H, H-3 (Pro), H-4(Pro)); 1.81 (s, 3H, CH $_3$ CO); 1.15 (s, 9H, C(CH $_3$) $_3$).

Das Signalverhältnis der *all-trans*- zur *cis-trans-trans*-Konformation beträgt 8:2

^{13}C -NMR (125.1 MHz, Acetonitril- d_3 , δ /ppm):

213.5, 213.5 (C_q , 1C, C-2-CO); 172.7, 172.6, 172.6, 171.4, 171.4, 171.4, 171.0, 171.0, 170.8, 170.7, 170.7, 170.6, 170.5, 170.3, 169.7 (C_q , 5C, CO); 157.0, 156.8 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 151.4, 151.4, 151.3, 151.2 (C_q , 2C, C_{Ar} (Ph)); 131.7, 131.4 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 131.0, 131.0 (C_t , 4C, C_{Ar} (Ph)); 129.2, 129.1, 129.1 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 126.7, 126.6 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 121.1, 121.1, 121.0, 121.0, 120.9, 120.9 (C_t , 4C, C_{Ar} (Ph)); 116.1, 115.9, 115.9 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 96.1, 96.0, 96.0, 95.9 (C_q , 1C, C-2); 85.0, 85.0, 84.8, 84.8 (C_t , 1C, C-3); 69.0, 68.9 (C_s , 1C,

C-5); 68.3, 67.8 (C_s, 1C, C-2-CH₂); 59.8, 59.7, 59.7, 59.7 (C_t, 2C, C-2 (Pro)); 59.0, 59.0, 58.8 (C_t, 1C, C-2 (Pro-2)); 53.6, 53.3 (C_t, 1C, CH(CH₂C_{Ar})); 48.2, 47.8, 47.5 (C_s, 3C, C-5 (Pro)); 45.9, 45.9 (C_q, 1C, C(CH₃)₃); 40.0, 37.2 (C_s, 1C, CH(CH₂C_{Ar})); 33.7, 33.6 (C_s, 1C, C-4); 30.9 (C_s, 1C, C-3 (Pro-1)); 29.5, 29.4, 28.9, 28.9, 28.8, 28.8, 28.7 (C_s, 2C, C-3 (Pro)); 26.3, 26.2, 26.2 (C_p, 3C, C(CH₃)₃); 25.7, 25.7, 25.5, 25.5 (C_s, 2C, C-4 (Pro)); 23.0 (C_s, 1C, C-4 (Pro-1)); 22.9, 22.7 (C_p, 1C, CH₃CO).

³¹P-NMR (101.2 MHz, Acetonitril-*d*₃, δ/ppm):

-13.12, -13.22 (OPO(OPh)₂).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹):

3293; 2971; 1749; 1642; 1445; 1277; 1188; 958; 734.

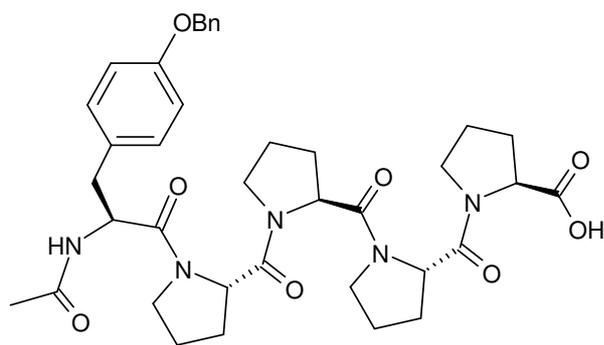
UV/VIS (Acetonitril)

308 nm ($\epsilon = 32 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

MS (ESI, MeOH, m/z):

953.4 ([M+Na]⁺, 100).

N-Acetyl-tyrosinyl-(*O*-benzyl)-prolinyl-prolinyl-prolinyl-prolin (94)



94

Nach der Vorgehensweise, die bei Verbindung **121** beschrieben wurde, konnten 360 mg (0.877 mmol) *N*-Acetyl-tyrosinyl-(*O*-benzyl)-prolin ausgehend von *N*-*tert*. Butyloxy-carbonyl-tyrosinyl-(*O*-benzyl)-prolin-*tert*.-butylester synthetisiert werden. Das so erhaltene Dipeptid wurde anschließend mit 353 mg (0.877 mmol) Prolin-prolinyl-prolinyl-*tert*.-butylester-hydrochlorid, 149 mg (0.965 mmol) EDC, 142 mg (1.052 mmol) HOBt und 122 μ l (89 mg, 0.877 mmol) Triethylamin in 3 ml DMF (abs.) nach **AAV1** umgesetzt und an Merck Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 20:1 \rightarrow 15:1 als Laufmittel gereinigt. Das so zugängliche Pentapeptid wurde anschließend analog **AAV2** mit 5 ml

Trifluoressigsäure und 5 ml Dichlormethan in die entsprechende freie Säure überführt. Nach der Aufarbeitung war keine weitere chromatographische Reinigung erforderlich.

Ausbeute: 333 mg (0.475 mmol, 54% über zwei Stufen) **94** als farbloser Feststoff.

$C_{38}H_{47}N_5O_8$ (701.83);

R_f (Dichlormethan/Methanol 10:1) = 0.14.

Smp: 107°C.

1H -NMR (400 MHz, Methanol- d_4 , δ /ppm):

7.35 (m, 5H, C_{Ar} (Bn)); 7.17 (m, 2H, H_{Ar} (Tyr)); 6.91 (m, 2H, H_{Ar} (Tyr)); 5.04 (s, 2H, Ph- \underline{CH}_2); 4.78, 4.68, 4.49, 4.42 (4 x m, 5H, $\underline{CH}(\underline{CH}_2C_{Ar})$, H-2(Pro)); 3.90-3.25 (m, 8H, H-5 (Pro)); 3.21 (m, 1H, $\underline{CH}(\underline{H}_aH_bC_{Ar})$); 2.79 (m, 1H, $\underline{CH}(\underline{H}_aH_bC_{Ar})$); 2.30-1.90 (m, 16H, H-3 (Pro), H-4 (Pro)); 1.91, 1.87 (2 x s, 3H, \underline{CH}_3CO).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, Methanol- d_4 , δ /ppm):

171.4, 171.2, 171.2, 171.1, 171.0, 179.8, 170.3 (C_q , 6C, \underline{CO}); 158.9, 158.5, 158.2, 158.2 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 137.8 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 130.5, 130.5, 130.4 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 129.7 (C_q , 1C, C_{Ar} (Bn)); 128.6, 128.5, 127.9, 127.9, 127.6, 127.5 (C_t , 5C, C_{Ar} (Bn)); 115.3, 115.1, 115.0 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 70.0, 69.7 (C_s , 1C, Ph- \underline{CH}_2O); 59.3, 58.7, 58.7, 58.6 (C_t , 4C, C-2 (Pro)); 53.4 (C_t , 1C, $\underline{CH}(\underline{CH}_2C_{Ar})$); 47.7, 47.5, 47.4, 47.0 (C_s , 4C, C-5 (Pro)); 39.5, 36.3 (C_s , 1C, $\underline{CH}(\underline{CH}_2C_{Ar})$); 30.1, 29.5, 29.0, 28.3, 28.1, 28.0 (C_s , 4C, C-3 (Pro)); 24.8, 24.8 (C_s , 4C, C-4 (Pro)); 21.5, 21.2 (C_p , 1C, \underline{CH}_3CO).

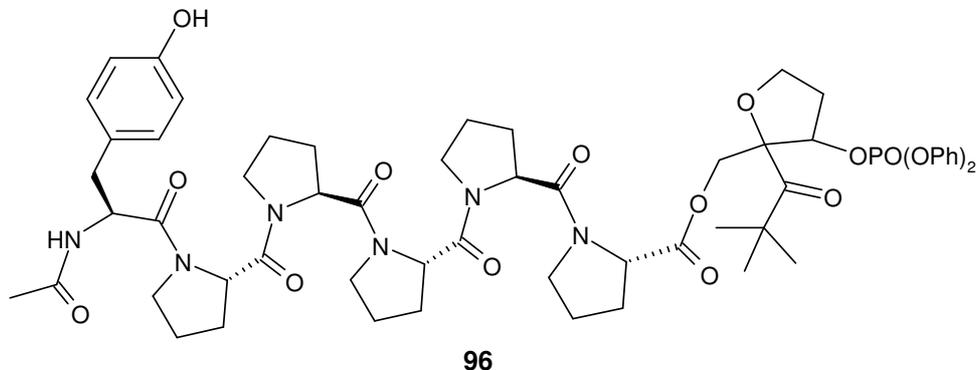
IR (NaCl, $\tilde{\nu}/cm^{-1}$):

3282; 2977; 2883; 1779; 1615; 1512; 1322; 1161; 694.

MS (FAB, m/z):

702 (MH^+ , 14); 407 (9); 394(3); 310 (3); 226 (6); 213 (3); 165 (3); 91 (41); 77 (7); 70 (100).

N-Acetyl-tyrosinyl-prolinyl-prolinyl-prolinyl-prolinyl-prolin-[(2*R*,3*S*)-2-*tert.*-butyl-carbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester;
N-Acetyl-tyrosinyl-prolinyl-prolinyl-prolinyl-prolinyl-prolin-[(2*S*,3*R*)-2-*tert.*-butyl-carbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester (**96**)



158 mg (0.226 mmol) des Pentapeptids **94** wurden zusammen mit 120 mg (0.226 mmol) des Prolinderivats **92**, 38 mg (0.245 mmol) EDC, 37 mg (0.271 mmol) HOBt und 32 μ l (23 mg, 0.226 mmol) Triethylamin nach **AAV1** umgesetzt. Nach der Aufarbeitung konnte das Rohprodukt an Merck Kieselgel chromatographisch gereinigt werden (Dichlormethan/Methanol = 20:1 \rightarrow 10:1). Zur Spaltung der Benzylether-Schutzgruppe wurde die Verbindung im Anschluss nach **AAV3** behandelt. Das so erhaltene Endprodukt **96** wurde durch Chromatographie an Merck Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol = 20:1 \rightarrow 10:1 als Laufmittel gereinigt.

Ausbeute: 109 mg (0.097 mmol, 43% über zwei Stufen) **96** als farbloser Feststoff.

$C_{58}H_{73}N_6O_{15}P \cdot 3/2 H_2O$;

ber.: C 60.46, H 6.65, N 7.29, O 22.91;

gef.: C 60.54, H 6.61, N 7.20, O 22.81.

R_f (Dichlormethan/Methanol 10:1) = 0.25.

Smp: 131°C.

1H -NMR (500 MHz, Acetonitril- d_3 , δ /ppm):

7.49 (s, 1H, OH); 7.40 (m, 4H, C_{Ar} (Ph)); 7.22 (m, 6H, C_{Ar} (Ph)); 7.07, 6.99 (2 x m, 2H, H_{Ar} (Tyr)); 6.72 (m, 1H, CONH); 6.67 (m, 2H, H_{Ar} (Tyr)); 5.19 (m, 1H, H-3); 4.76 (dt, $J = 4.9$, 3.0, 1H, $CH(CH_2C_{Ar})$); 4.63, 4.56 (2 x m, 4H, H-2 (Pro)); 4.30-4.08 (m, 5H, C-2- CH_2 , H-5, H-2 (Pro)); 3.73-3.33 (m, 10H, H-5 (Pro)); 2.95, 2.77, 2.66 (3 x m, 2H, $CH(CH_2C_{Ar})$); 2.40-

1.80 (m, 22H, H-4, H-3 (Pro), H-4 (Pro)); 1.81, 1.79 (s, 3H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$); 1.16, 1.15, 1.14 (s, 9H, $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$).

^{13}C -NMR (125.1 MHz, Acetonitril- d_3 , δ/ppm):

213.5, 213.5 (C_q , 1C, C-2- $\underline{\text{C}}\text{O}$); 172.7, 172.6, 171.4, 171.4, 170.9, 170.9, 170.9, 170.7, 170.6, 170.4, 170.2, 169.7 (C_q , 7C, $\underline{\text{C}}\text{O}$); 157.0, 156.7 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 151.4, 151.4 (C_q , 2C, C_{Ar} (Ph)); 131.7, 131.4 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 131.0, 131.0 (C_t , 4C, C_{Ar} (Ph)); 129.2, 129.2 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 126.9, 126.7, 126.6 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 121.2, 121.1, 121.1, 121.1, 121.0, 121.0, 121.0, 120.9 (C_t , 4C, C_{Ar} (Ph)); 116.1, 115.9 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 96.0, 96.0, 95.9 (C_q , 1C, C-2); 85.0, 85.0, 84.8, 84.8 (C_t , 1C, C-3); 69.0, 68.9 (C_s , 1C, C-5); 68.3, 67.8 (C_s , 1C, C-2- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 59.8, 59.7, 59.1, 59.0, 58.9, 58.9, 58.9, 58.7 (C_t , 5C, C-2 (Pro)); 53.6, 53.3 (C_t , 1C, $\underline{\text{C}}\text{H}(\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{C}_{\text{Ar}})$); 48.1, 47.8, 47.8, 47.7, 47.5 (C_s , 5C, C-5 (Pro)); 45.9, 45.9 (C_q , 1C, $\underline{\text{C}}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 40.1, 37.3 (C_s , 1C, $\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{C}_{\text{Ar}})$); 33.7, 33.6 (C_s , 1C, C-4); 30.9, 30.4, 30.4, 30.4, 30.1, 29.5, 29.4, 28.9, 28.7, 28.7, 28.6 (C_s , 5C, C-3 (Pro)); 26.3, 26.2 (C_p , 3C, $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 25.7, 25.7, 25.6, 25.5, 25.5, 25.4 (C_s , 5C, C-4 (Pro)); 23.1, 22.9 (C_p , 1C, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$).

^{31}P -NMR (162.0 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

-13.37, -13.54 ($\text{O}\underline{\text{P}}\text{O}(\text{O}\text{Ph})_2$).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$):

3293; 2970; 1749; 1641; 1446; 1188; 1020; 958; 770.

UV/VIS (Acetonitril)

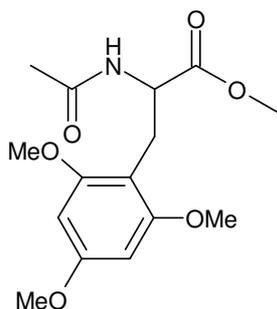
308 nm ($\epsilon = 35 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

MS (ESI, MeOH, m/z):

1147.7 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100), 1163.5 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, 10).

6.6 Synthese von 2,4,6-Trimethoxyphenylalaninderivaten

N-Acetyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxyphenylalanin-methylester (**47**)

**47**

64 mg (*rac*)-2,4,6-Trimethoxyphenylalanin-methylester (**45**)^[113] (0.238 mmol) wurden in 2 ml gesättigter Natriumcarbonat-Lösung/Dioxan = 1:1 suspendiert und mit 100 µl (108 mg, 1.06 mmol) Essigsäureanhydrid versetzt. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung unter vermindertem Druck von Dioxan befreit und die verbleibende wässrige Suspension dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde an Merck Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol = 200:1 → 100:1 säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 59 mg (0.190 mmol, 80%) **47** als farbloser Feststoff.

C₁₅H₂₁NO₆ (311.34);

ber.: C 57.87, H 6.80, N 4.50, O 30.83;

gef.: C 57.76, H 6.64, N 4.32, O 31.00.

R_f (Dichlormethan/Methanol 200:1) = 0.09.

Smp: 132°C.

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, δ/ppm):

6.18 (s, 2H, H_{Ar}); 4.44 (t, *J* = 7.6, 1H, CH(CH₂C_{Ar})); 3.78 (s, 6H, 2 x C_{Ar}-OCH₃); 3.77 (s, 3H, C_{Ar}-OCH₃); 3.63 (s, 3H, COOCH₃); 3.05 (dd, *J* = 13.2, 7.6, 1H, CH(CH_aH_bC_{Ar})); 2.93 (dd, *J* = 13.2, 7.6, 1H, CH(CH_aH_bC_{Ar})); 1.89 (s, 3H, CH₃CO).

¹³C-NMR (100.6 MHz, Methanol-d₄, δ/ppm):

174.3 (C_q, 1C, COOCH₃); 173.0 (C_q, 1C, CH₃CO); 162.0 (C_q, 1C, para-C_{Ar}); 160.5 (C_q, 2C, ortho-C_{Ar}); 106.0 (C_q, 1C, ipso-C_{Ar}); 91.4 (C_t, 2C, meta-C_{Ar}); 56.1 (C_p, 2C, 2 x C_{Ar}-OCH₃); 55.7 (C_p, 1C, C_{Ar}-OCH₃); 54.0 (C_t, 1C, CH(CH₂C_{Ar})); 52.4 (C_p, 1C, COOCH₃); 25.8 (C_s, 1C, CH(CH₂C_{Ar})); 22.3 (C_p, 1C, CH₃CO).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$):

2948; 2450; 1743; 1657; 1610; 1456; 1419; 1206; 1150.

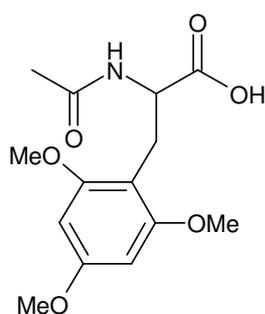
UV/VIS (Acetonitril)

308 nm ($\epsilon = 0 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

MS (ESI, MeOH, m/z):

334.3 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 24); 645.0 ($[\text{2M}+\text{Na}]^+$, 100).

N-Acetyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxyphenylalanin (**48**)



48

400 mg (*rac*)-2,4,6-Trimethoxyphenylalanin-methylester (**45**)^[113] (1.49 mmol) wurden in 20 ml gesättigter Na_2CO_3 -Lösung 5 h bei 50°C gerührt. Nach einer Extraktion des Reaktionsgemisches mit Dichlormethan wurde die wässrige Phase mit 300 μl (324 mg, 3.18 mmol) Essigsäureanhydrid versetzt und weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Ansäuern der Lösung mit 2 M HCl auf $\text{pH} = 1$ abgebrochen. Das

Reaktionsgemisch wurde erneut mit Dichlormethan extrahiert, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand konnte aus Aceton umkristallisiert werden.

Ausbeute: 280 mg (0.942 mmol, 63% über zwei Stufen) **48** als leicht gelblicher Feststoff.

$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_6$ (297.31) \cdot 1/3 H_2O ;

ber.: C 55.44, H 6.54, N 4.62, O 33.41;

gef.: C 55.38, H 6.53, N 4.47, O 33.38.

R_f (Dichlormethan/Methanol 10:1) = 0.23.

Smp: 135°C .

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4 , δ/ppm):

6.18 (s, 2H, H_{Ar}); 4.38 (dd, $J = 10.2, 4.8$, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}})$); 3.80 (s, 6H, 2 x $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 3.77 (s, 3H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 3.11 (dd, $J = 13.4, 4.8$, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_a\text{H}_b\text{C}_{\text{Ar}})$); 2.91 (dd, $J = 13.4, 10.2$, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_a\text{H}_b\text{C}_{\text{Ar}})$); 1.84 (s, 3H, CH_3CO).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, Methanol- d_4 , δ/ppm):

178.9 (C_q , 1C, COOH); 172.8 (C_q , 1C, CH_3CO); 161.8 (C_q , 1C, para- C_{Ar}); 160.5 (C_q , 2C, ortho- C_{Ar}); 107.3 (C_q , 1C, ipso- C_{Ar}); 91.6 (C_t , 2C, meta- C_{Ar}); 56.1 (C_p , 2C, 2 x $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 56.0 (C_t , 1C, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}})$); 55.7 (C_p , 1C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 26.2 (C_s , 1C, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}})$); 22.7 (C_p , 1C, CH_3CO).

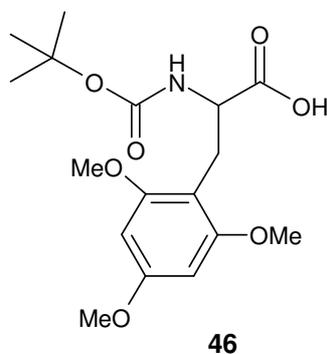
IR (NaCl, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$):

3390; 2940; 1614; 1454; 1418; 1206; 1150; 1059; 735.

MS (ESI, MeOH, m/z):

269.6 ($[\text{M-H}]^-$, 100); 593.4 ($[\text{2M-H}]^-$, 74).

N-tert.-Butyloxycarbonyl-(rac)-2,4,6-trimethoxyphenylalanin (46)



500 mg (*rac*)-2,4,6-Trimethoxyphenylalanin-methylester (**45**)^[113] (1.86 mmol) wurden in 25 ml gesättigter Na_2CO_3 -Lösung suspendiert und 5 h bei 50°C gerührt. Nach einer Extraktion des Reaktionsgemisches mit Dichlormethan wurden der wässrigen Phase 15 ml Dioxan sowie 810 mg (3.71 mmol) Di-*tert.*-butyl-dicarbonat zugegeben und weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde nach Beendigung der Reaktion mit

2 M HCl auf $\text{pH} = 1$ gebracht und anschließend mit Essigester extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck zur Trockne gebracht.

Ausbeute: 525 mg (1.48 mmol, 80% über zwei Stufen) **46** als farbloser Feststoff.

$\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{NO}_7$ (355.39);

ber.: C 57.45, H 7.09, N 3.94, O 31.51;

gef.: C 57.43, H 6.93, N 3.91, O 31.80.

R_f (Dichlormethan/Methanol 20:1) = 0.11.

Smp: 178°C.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

6.12 (s, 2H, H_{Ar}); 5.42 (d, $J = 6.6$, 1H, NH); 4.30 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}})$); 3.80 (s, 9H, 3 x $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 3.16 (dd, $J = 13.6$, 4.8, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_a\text{H}_b\text{C}_{\text{Ar}})$); 2.99 (dd, $J = 13.6$, 9.1, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_a\text{H}_b\text{C}_{\text{Ar}})$); 1.38 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

178.5 (C_q , 1C, COOH); 160.8 (C_q , 1C, para- C_{Ar}); 159.5 (C_q , 2C, ortho- C_{Ar}); 156.5 (C_q , 1C, NHCOO); 105.4 (C_q , 1C, ipso- C_{Ar}); 90.8 (C_t , 2C, meta- C_{Ar}); 80.1 (C_q , 1C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 55.9 (C_p , 2C, 2 x $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 55.7 (C_p , 1C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 54.5 (C_t , 1C, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}})$); 28.7 (C_p , 3C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 24.9 (C_s , 1C, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}})$).

IR (KBr, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$):

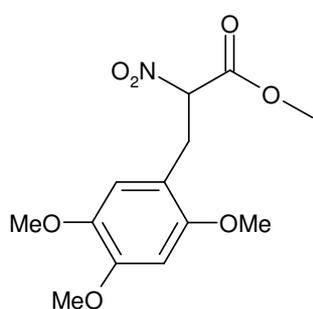
3411; 2978; 1732; 1703; 1613; 1499; 1234; 1157; 1059.

MS (ESI, MeOH, m/z):

378.1 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100).

6.7 Synthese von 2,4,5-Trimethoxyphenylalaninderivaten

(rac)-2-Nitro-3-(2,4,6-trimethoxyphenyl)-propionsäure-methylester (52)



52

2 ml (2.58 g, 21.73 mmol) Nitroessigsäure-methylester (**41**), 3.55 g (18.11 mmol) 2,4,5-Trimethoxybenzaldehyd (**50**), 158 mg (2.72 mmol) Kaliumfluorid und 2.95 g (36.22 mmol) Dimethylaminhydrochlorid wurden in 100 ml Toluol suspendiert und 24 h in einem Kolben mit Wasserabscheider unter Rückfluss erhitzt.^[113] Am Rotationsverdampfer wurden die flüchtigen Bestandteile abdestilliert und der Rückstand anschließend in 10 ml

Wasser und 40 ml Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wurde abgetrennt und

die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert. Die organischen Extrakte wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck von den flüchtigen Bestandteilen befreit. Man erhält (E/Z)-2-Nitro-3-(2,4,6-trimethoxyphenyl)-acrylsäuremethylester als rotes Öl, das ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt wurde. Das Rohprodukt wurde dazu in einem Gemisch aus 230 ml Chloroform und 68 ml Isopropylalkohol gelöst und unter Rühren mit 36 g Merck Kieselgel und portionsweise über einen Zeitraum von 5 min mit 3.43 g (90.60 mmol) Natriumborhydrid versetzt. Die Suspension wurde weitere 2 h gerührt. Anschließend wurden vorsichtig 6 ml Essigsäure zugegeben, die unlöslichen Bestandteile abfiltriert und die Mutterlauge unter reduziertem Druck zur Trockne gebracht. Das erhaltene Rohprodukt wurde in 10 ml Wasser und 50 ml Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und der Rückstand an Uetikon Kieselgel mit Essigester/Pentan = 1:3 → 1:2 als Laufmittel chromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 2.70 g (9.02 mmol, 42% über zwei Stufen) **52** als gelber Feststoff.

$C_{13}H_{17}NO_7$ (299.28);

ber.: C 52.17, H 5.73, N 4.68, O 37.42; gef.: C 52.16, H 5.92, N 4.69, O 37.36.

R_f (Pentan/Essigester 5:1) = 0.10.

Smp: 81°C.

1H -NMR (400 MHz, Methanol- d_4 , δ /ppm):

6.72 (s, 1H, ortho- H_{Ar}); 6.65 (s, 1H, meta- H_{Ar}); 5.59 (dd, $J = 9.4, 6.1$, 1H, $\underline{CH}(\underline{CH}_2C_{Ar})$); 3.83 (s, 6H, 2 x $C_{Ar}-O\underline{CH}_3$); 3.77 (s, 3H, $C_{Ar}-O\underline{CH}_3$); 3.73 (s, 3H, $COO\underline{CH}_3$); 3.42 (dd, $J = 14.2, 6.1$, 1H, $\underline{CH}(\underline{C}_aH_bC_{Ar})$); 3.35 (dd, $J = 14.2, 9.4$, 1H, $\underline{CH}(\underline{C}_a\underline{H}_bC_{Ar})$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, Methanol- d_4 , δ /ppm):

166.6 (C_q , 1C, \underline{COOCH}_3); 153.7 (C_q , 1C, ortho- $\underline{C}_{Ar}-O\underline{CH}_3$); 151.2 (C_q , 1C, para- $\underline{C}_{Ar}-O\underline{CH}_3$); 144.1 (C_q , 1C, meta- $\underline{C}_{Ar}-O\underline{CH}_3$); 117.2 (C_t , 1C, ortho- C_{Ar}); 114.7 (C_q , 1C, ipso- C_{Ar}); 98.7 (C_t , 1C, meta- C_{Ar}); 88.6 (C_t , 1C, $\underline{CH}(\underline{CH}_2C_{Ar})$); 57.5 (C_p , 1C, $C_{Ar}-O\underline{CH}_3$); 56.7 (C_p , 1C, $C_{Ar}-O\underline{CH}_3$); 56.5 (C_p , 1C, $C_{Ar}-O\underline{CH}_3$); 53.9 (C_p , 1C, $COO\underline{CH}_3$); 32.5 (C_s , 1C, $\underline{CH}(\underline{CH}_2C_{Ar})$).

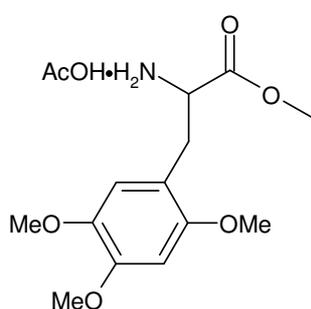
IR (KBr, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$):

3456; 3000; 2922; 1744; 1556; 1517; 1456; 1222; 1028.

MS (FAB, m/z):

299 (M^+ , 100); 253 (13); 221 (6); 211 (10); 194 (4); 181 (50); 168 (4); 151 (5); 77 (7); 51 (6).

(rac)-2,4,5-Trimethoxyphenylalanin-methylester-acetat (53**)**



53

Zu 2.52 g (8.42 mmol) des Arylpropionats **52** in 70 ml Methanol/Essigsäure = 10:1 wurden 2.13 g (33.71 mmol) Ammoniumformiat und 250 mg Palladium auf Aktivkohle zugegeben.^[118] Nach 2 d Rühren bei Raumtemperatur wurden die festen Bestandteile durch Filtration über Celite entfernt und die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand konnte in 20 ml Wasser und 100 ml

Chloroform aufgenommen werden. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit Essigsäure auf pH = 4 angesäuert. Die wässrige Phase wurde mehrfach mit Chloroform extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte über MgSO_4 getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand an Uetikon Kieselgel durch Chromatographie gereinigt (Dichlormethan/Methanol = 97:3 \rightarrow 96:4).

Ausbeute: 1.79 g (5.44 mmol, 65%) **53** als farbloser Feststoff.

$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ (269.3) \cdot CH_3COOH ;

ber.: C 54.70, H 7.04, N 4.25, O 34.00;

gef.: C 54.82, H 6.82, N 4.29, O 34.01.

R_f (Pentan/Essigester 2:1) = 0.12.

Smp: 111°C.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4 , δ/ppm):

6.75 (s, 1H, ortho- H_{Ar}); 6.66 (s, 1H, meta- H_{Ar}); 4.05 (t, $J = 6.4$, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}})$); 3.84 (s, 3H, $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{OCH}_3$); 3.82 (s, 3H, $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{OCH}_3$); 3.76 (s, 3H, $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{OCH}_3$); 3.73 (s, 3H, COOCH_3);

3.12 (dd, $J = 13.9, 6.4$, 1H, CH(CH_aH_bC_{Ar})); 2.97 (dd, $J = 13.9, 6.4$, 1H, CH(CH_aH_bC_{Ar})); 1.91 (s, 3H, Acetat).

¹³C-NMR (100.6 MHz, Methanol-d₄, δ/ppm):

178.6, 172.9 (C_q, 2C, COOCH₃, Acetat); 153.8 (C_q, 1C, ortho-C_{Ar}-OCH₃); 151.0 (C_q, 1C, para-C_{Ar}-OCH₃); 144.2 (C_q, 1C, meta-C_{Ar}-OCH₃); 117.4 (C_t, 1C, ortho-C_{Ar}); 115.6 (C_q, 1C, ipso-C_{Ar}); 98.9 (C_t, 1C, meta-C_{Ar}); 57.5 (C_p, 1C, C_{Ar}-OCH₃); 56.7 (C_p, 1C, C_{Ar}-OCH₃); 56.5 (C_p, 1C, C_{Ar}-OCH₃); 54.7 (C_t, 1C, CH(CH₂C_{Ar})); 53.0 (C_p, 1C, COOCH₃); 33.7 (C_s, 1C, CH(CH₂C_{Ar})), 23.0 (C_p, 1C, Acetat).

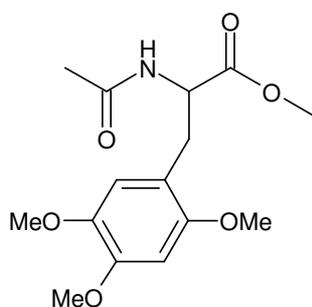
IR (KBr, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$):

3433; 2956; 1739; 1522; 1406; 1322; 1211; 1028; 850.

MS (ESI, MeOH, m/z):

270.2 ([M+H]⁺, 100).

N-Acetyl-(*rac*)-2,4,5-trimethoxyphenylalanin-methylester (**54**)



54

150 mg (0.557 mmol) (*rac*)-2,4,5-Trimethoxyphenylalanin-methylester (**54**) wurden in 2 ml eines Gemisches aus gesättigter Natriumcarbonat-Lösung/Dioxan = 1:1 suspendiert und mit 200 μl (216 mg, 2.12 mmol) Essigsäureanhydrid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur 2 h gerührt und anschließend unter vermindertem Druck das Dioxan abdestilliert. Die verbleibende wässrige Suspension wurde dreimal mit

Dichlormethan extrahiert und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand an Merck Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol = 50:1 \rightarrow 20:1 chromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 123 mg (0.395 mmol, 71%) **54** als farbloser Feststoff.

C₁₅H₂₁NO₆ (311.34);

ber.: C 57.87, H 6.80, N 4.50, O 30.83;

gef.: C 57.46, H 6.76, N 4.33, O 30.44.

R_f (Dichlormethan/Methanol 20:1) = 0.39.

Smp: 143°C.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4 , δ /ppm):

6.72 (s, 1H, ortho- H_{Ar}); 6.63 (s, 1H, meta- H_{Ar}); 4.64 (dd, $J = 8.6, 6.1$, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}})$); 3.82 (s, 3H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 3.81 (s, 3H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 3.75 (s, 3H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 3.66 (s, 3H, COOCH_3); 3.09 (dd, $J = 13.7, 6.1$, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_a\text{H}_b\text{C}_{\text{Ar}})$); 2.82 (dd, $J = 13.7, 8.6$, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_a\text{H}_b\text{C}_{\text{Ar}})$); 1.89 (s, 3H, CH_3CO).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, Methanol- d_4 , δ /ppm):

173.9 (C_q , 1C, COOCH_3); 173.0 (C_q , 1C, CH_3CO); 153.7 (C_q , 1C, ortho- $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 150.5 (C_q , 1C, para- $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 144.0 (C_q , 1C, meta- $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 117.5 (C_q , 1C, ipso- C_{Ar}); 117.3 (C_t , 1C, ortho- C_{Ar}); 98.9 (C_t , 1C, meta- C_{Ar}); 57.6 (C_p , 1C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 56.7 (C_p , 1C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 56.5 (C_p , 1C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 54.2 (C_t , 1C, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}})$); 52.6 (C_p , 1C, COOCH_3); 33.0 (C_s , 1C, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}})$), 22.3 (C_p , 1C, CH_3CO).

IR (KBr, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$):

3411; 3256; 3089; 1744; 1650; 1516; 1228; 1206; 1039.

UV/VIS (Acetonitril)

308 nm ($\epsilon \gg 300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

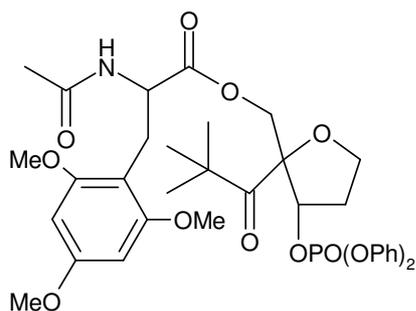
MS (ESI, MeOH, m/z):

334.3 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100), 645.2 ($[\text{2M}+\text{Na}]^+$, 56).

6.8 Synthese von Oligopeptid-Modellsystemen mit 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin als Elektronendonator

N-Acetyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxyphenylalanin-[(2*R*,3*S*)-2-*tert.*-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester;

N-Acetyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxyphenylalanin-[(2*S*,3*R*)-2-*tert.*-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester (**69**)



69

60 mg (0.202 mmol) *N*-Acetyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxyphenylalanin (**48**) konnten nach **AAV4** mit 43 mg (0.222 mmol) EDC und 25 mg (0.202 mmol) DMAP in 2 ml DMF (abs.) mit 88 mg (0.202 mmol) des primären Alkohols **35** verestert werden. Das nach der Aufarbeitung erhaltene Rohprodukt wurde an Merck Kieselgel durch Chromatographie gereinigt (Dichlormethan/Methanol =

100:1 → 50:1).

Ausbeute: 109 mg (0.153 mmol, 76%) **69** als farbloser Feststoff.

$C_{36}H_{44}NO_{12}P \cdot 1/5 H_2O$; (713.73)

ber.: C 60.28, H 6.24, N 1.95, O 27.21;

gef.: C 60.26, H 6.23, N 1.95, O 27.03.

R_f (Dichlormethan/Aceton 10:1) = 0.23.

Smp: 49°C.

1H -NMR (250 MHz, Methanol- d_4 , δ /ppm):

7.43 (m, 4H, H_{Ar} (Ph)); 7.25 (m, 6H, H_{Ar} (Ph)); 6.23, 6.21 (2 x s, 2H, H_{Ar} (Tmp)); 5.27, 5.16 (2 x m, 1H, H-3); 4.45 (m, 1H, $CH(CH_2C_{Ar})$); 4.30-4.00 (m, 4H, H-5, C-2- CH_2); 3.82, 3.81 (2 x s, 6H, 2 x ortho- $C_{Ar}-OCH_3$); 3.81, 3.79 (2 x s, 3H, para- $C_{Ar}-OCH_3$); 3.05 (m, 1H, $CH(CH_2H_bC_{Ar})$); 2.95 (m, 1H, $CH(CH_aH_bC_{Ar})$); 2.38 (m, 1H, H-4_a); 2.18 (m, 1H, H-4_b); 1.92 (s, 3H, CH_3CO); 1.18, 1.16 (2 x s, 9H, $C(CH_3)_3$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, Methanol- d_4 , δ /ppm):

214.1 (C_q , 1C, C-2- \underline{CO}); 173.3, 173.3 (C_q , 1C, $CH_3\underline{CO}$); 172.9 (C_q , 1C, \underline{COO}); 162.1, 162.0 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tmp)); 160.4 (C_q , 2C, C_{Ar} (Tmp)); 151.7, 151.6 (C_q , 2C, C_{Ar} (Ph)); 131.1, 131.1

(C_t, 4C, C_{Ar} (Ph)); 127.0, 126.9 (C_t, 2C, C_{Ar} (Ph)); 121.3, 121.2 (C_t, 2C, C_{Ar} (Ph)); 121.1, 121.1 (C_t, 2C, C_{Ar} (Ph)); 105.8, 105.8 (C_q, 1C, C_{Ar} (Tmp)); 96.4, 96.3 (C_q, 1C, C-2); 91.5 (C_t, 2C, C_{Ar} (Tmp)); 86.2, 85.9 (C_t, 1C, C-3); 69.2, 69.0 (C_s, 2C, C-5, C-2-CH₂); 56.2, 56.1 (C_p, 2C, 2 x C_{Ar}-OCH₃); 55.8, 55.8 (C_p, 1C, C_{Ar}-OCH₃); 54.1, 54.0 (C_t, 1C, CH(CH₂C_{Ar})); 46.2 (C_q, 1C, C(CH₃)₃); 34.0 (C_s, 1C, C-4), 26.4 (C_p, 3C, C(CH₃)₃); 25.8 (C_s, 1C, CH(CH₂C_{Ar})); 22.3 (C_p, 1C, CH₃CO).

³¹P-NMR (162.0 MHz, Methanol-d₄, δ/ppm):

-13.68, -13.71 (OPO(OPh)₂).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹):

3397; 2967; 1750; 1685; 1596; 1489; 1289; 1151; 958.

UV/VIS (Acetonitril)

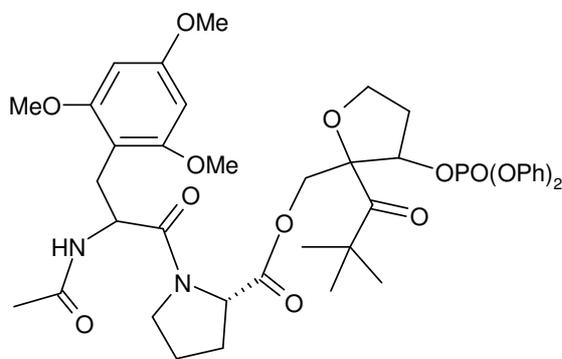
308 nm ($\epsilon = 33 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

MS (ESI, MeOH, m/z):

714.4 ([M+H]⁺, 9); 736.5 ([M+Na]⁺, 100); 752.4 ([M+K]⁺, 5).

***N*-Acetyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxyphenylalaninyl-prolin-[(2*R*,3*S*)-2-*tert*.-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester;**

***N*-Acetyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxyphenylalaninyl-prolin-[(2*S*,3*R*)-2-*tert*.-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester (**99**)**



99

61 mg (0.206 mmol) *N*-Acetyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxyphenylalanin (**48**) wurden zusammen mit 43 mg (0.227 mmol) EDC, 33 mg (0.247 mmol) HOBt und 28 μ l (21 mg, 0.206 mmol) Triethylamin nach **AAV1** mit 117 mg (0.206 mmol) des Prolinderivates **92** in 3 ml DMF (abs.) umgesetzt. Nach der Aufarbeitung erfolgte eine chromatographische

Reinigung an Merck Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol = 99:1 \rightarrow 95:5 als Laufmittel.

Ausbeute: 125 mg (0.154 mmol, 75%) **99** als farbloser Feststoff.

$C_{41}H_{51}N_2O_{13}P$ (810.84);

ber.: C 60.73, H 6.34, N 3.45, O 25.65;

gef.: C 60.57, H 6.31, N 3.42, O 25.64.

R_f (Dichlormethan/Methanol 10:1) = 0.74.

Smp: 65°C.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

7.32 (m, 4H, H_{Ar} (Ph)); 7.18 (m, 6H, H_{Ar} (Ph)); 6.48 (m, 1H, NH); 6.12, 6.08 (2 x s, 2H, H_{Ar} (Tmp)); 5.22 (m, 1H, H-3); 4.91, 4.63, 4.55 (3 x m, 2H, $CH(CH_2C_{Ar})$, H-2 (Pro)); 4.35-4.05 (m, 4H, H-5, C-2- CH_2); 3.87 (m, 1H, H-5 (Pro)); 3.80, 3.80, 3.79 (3 x s, 6H, 2 x ortho- $C_{Ar}-OCH_3$); 3.78, 3.77, 3.77 (3 x s, 3H, para- $C_{Ar}-OCH_3$); 3.49 (m, 1H, H-5 (Pro)) 2.93 (m, 2H, $CH(CH_2C_{Ar})$); 2.35-1.93 (m, 6H, H-4, H-4 (Pro), H-3 (Pro)); 1.85, 1.84, 1.82, 1.82 (4 x s, 3H, CH_3CO); 1.17, 1.16, 1.15, 1.14 (4 x s, 9H, $C(CH_3)_3$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

212.8, 212.4 (C_q , 1C, C-2- \underline{CO}); 171.7, 171.3 (C_q , 3C, \underline{CO}); 160.4, 160.3 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tmp)); 159.3, 159.0 (C_q , 2C, C_{Ar} (Tmp)); 150.4, 150.3 (C_q , 2C, C_{Ar} (Ph)); 129.9 (C_t , 4C, C_{Ar} (Ph)); 125.6, 125.5 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 120.3, 120.3 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 120.3, 120.2 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 106.1, 105.4 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tmp)); 95.0, 95.0, 94.8 (C_q , 1C, C-2); 90.8, 90.5 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tmp)); 83.9 (C_t , 1C, C-3); 68.3, 68.2 (C_s , 2C, C-5, C-2- $\underline{CH_2}$); 59.1, 59.1, 58.8, 58.7 (C_t , 1C, C-2 (Pro)); 55.8 (C_p , 2C, 2 x $C_{Ar}-OCH_3$); 55.4 (C_p , 1C, $C_{Ar}-OCH_3$); 52.5, 52.4 (C_t , 1C, $CH(CH_2C_{Ar})$); 46.9, 46.8 (C_s , 1C, C-5 (Pro)); 45.4, 45.3 (C_q , 1C, $\underline{C}(CH_3)_3$); 33.2, 33.0 (C_s , 1C, C-4), 29.2, 29.0, 28.9 (C_s , 1C, C-3 (Pro)); 25.9, 25.9, 25.8, 25.8 (C_p , 3C, $C(CH_3)_3$); 25.1, 25.1, 24.9, 24.5 (C_s , 2C, C-4 (Pro), $CH(CH_2C_{Ar})$); 22.9, 22.9 (C_p , 1C, $\underline{CH_3CO}$).

^{31}P -NMR (162.0 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

-13.33, -13.37, -13.52, -13.54 ($OPO(OPh)_2$).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}/cm^{-1}$):

3326; 2965; 1751; 1647, 1595; 1489; 1288; 1190; 1023.

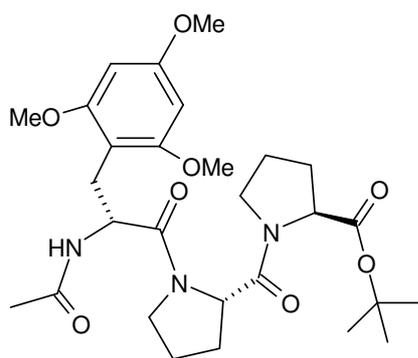
UV/VIS (Acetonitril)

308 nm ($\epsilon = 37 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

MS (ESI, MeOH, m/z):

833.5 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100); 849.4 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, 5).

***N*-Acetyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxyphenylalaninyl-prolinyl-prolin-*tert.*-butylester (**122**)**



122

100 mg (0.336 mmol) *N*-Acetyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxyphenylalanin (**48**) wurden nach **AAV1** zusammen mit 71 mg (0.370 mmol) EDC, 55 mg HOBt (0.404 mmol) und 47 μl (34 mg, 0.336 mmol) Triethylamin mit 103 mg (0.336 mmol) Prolinyl-prolin-*tert.*-butylester-hydrochlorid umgesetzt. Nach der Aufarbeitung wurde der Rückstand an Uetikon Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol = 20:1 als Laufmittel

chromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 145 mg (0.265 mmol, 79%) **122** als farbloser Feststoff.

$\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_8$ (547.65);

R_f (Dichlormethan/Methanol 20:1) = 0.12.

Smp: 82°C.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

6.10, 6.07 (2 x s, 2H, H_{Ar}); 5.85 (br, 1H, NH); 4.92, 4.72, 4.64, 4.55, 4.46 (5 x m, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}})$, H-2 (Pro)); 3.95-3.75 (m, 2H, H-5 (Pro)); 3.78 (s, 9H, 3 x $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 3.62-3.48 (m, 2H, H-5 (Pro)); 2.96 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}})$); 2.30-1.80 (m, 8H, H-3 (Pro), H-4 (Pro)); 1.87, 1.86, (2 x s, 3H, CH_3CO); 1.42 (2 x s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

171.4, 171.4, 170.9, 170.3, 170.1 (C_q , 4C, $\underline{\text{C}}\text{O}$); 160.4, 160.3 (C_q , 1C, C_{Ar}); 159.3, 159.0 (C_q , 2C, C_{Ar}); 106.2, 105.4 (C_q , 1C, C_{Ar}); 91.1, 90.5 (C_t , 2C, C_{Ar}); 81.4, 81.3, 81.1 (C_q , 1C, $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$); 59.6, 59.5, 58.2, 57.9 (C_t , 2C, C-2 (Pro)); 56.0, 55.8 (C_p , 2C, 2 x $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 55.4 (C_p , 1C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 52.7, 51.4 (C_t , 1C, $\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}})$); 47.3, 47.1, 46.8 (C_s , 2C, C-5 (Pro)); 29.0, 28.9, 28.6, 28.4 (C_s , 2C, C-3 (Pro)); 28.1, 28.1 (C_p , 3C, $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 25.7, 25.0, 24.9, 24.9, 24.8, 24.4 (C_s , 3C, C-4 (Pro), $\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{C}_{\text{Ar}})$); 22.8, 22.7 (C_p , 1C, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$):

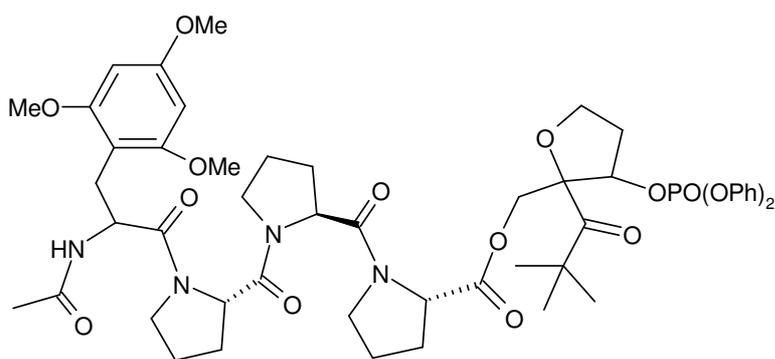
3419; 2975; 1733; 1651; 1455; 1206; 1151; 1058; 814

MS (ESI, MeOH, m/z):

570.4 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100); 586.4 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, 9).

***N*-Acetyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxyphenylalaninyl-prolinyl-prolinyl-prolin-[(2*R*,3*S*)-2-*tert*-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester;**

***N*-Acetyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxyphenylalaninyl-prolinyl-prolinyl-prolin-[(2*S*,3*R*)-2-*tert*-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester (**100**)**



100

118 mg (0.216 mmol) des *tert*-Butylesters **122** wurden nach **AAV2** mit 1 ml Trifluoressigsäure in 1 ml Dichlormethan zur entsprechenden freien Carbonsäure (**97**) umgesetzt. Diese wurde nach der Aufarbeitung mit 122 mg

(0.216 mmol) des sekundären Amins **92**, 45 mg (0.237 mmol) EDC, 35 mg (0.259 mmol) HOBt und 30 μl (22 mg, 0.216 mmol) Triethylamin nach **AAV1** zur Reaktion gebracht. Der nach der Aufarbeitung erhaltene Rückstand wurde an Merck Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan/DMF = 40:1 \rightarrow 10:1).

Ausbeute: 119 mg (0.1195 mmol, 55%) **100** als farbloser Feststoff.

$C_{51}H_{65}N_4O_{15}P$ (1005.08) · 3/2 H_2O ;

ber.: C 59.35, H 6.64, N 5.43, O 25.58;

gef.: C 59.13, H 6.53, N 5.36, O 25.62.

R_f (Dichlormethan/Methanol 20:1) = 0.14.

Smp: 91°C.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ/ppm):

7.32 (m, 4H, H_{Ar} (Ph)); 7.18 (m, 6H, H_{Ar} (Ph)); 6.16 (br, 1H, NH); 6.10, 6.09 (2 x s, 2H, H_{Ar} (Tmp)); 5.17 (m, 1H, H-3); 4.84, 4.73, 4.50 (3 x m, 4H, $CH(CH_2C_{Ar})$, H-2 (Pro)); 4.35-4.00 (m, 4H, H-5, C-2- CH_2); 3.95-3.66 (m, 3H, H-5 (Pro)); 3.78 (s, 9H, 3 x $C_{Ar}-OCH_3$); 3.65-3.48 (m, 3H, H-5 (Pro)) 2.95 (m, 2H, $CH(CH_2C_{Ar})$); 2.33-1.80 (m, 14H, H-4, H-4 (Pro), H-3 (Pro)); 1.93, 1.89, (2 x s, 3H, CH_3CO); 1.14, 1.13 (2 x s, 9H, $C(CH_3)_3$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$, δ/ppm):

214.4, 212.9, 212.2 (C_q , 1C, C-2- \underline{CO}); 171.8, 171.7, 171.7, 171.1 (C_q , 5C, \underline{CO}); 160.8, 160.6, 160.4 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tmp)); 159.2, 159.0 (C_q , 2C, C_{Ar} (Tmp)); 150.5, 150.4, 150.4, 150.3 (C_q , 2C, C_{Ar} (Ph)); 129.9, 129.9 (C_t , 4C, C_{Ar} (Ph)); 125.7, 125.5 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 120.3, 120.2 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 120.2, 120.2 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 105.0 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tmp)); 95.0, 94.7 (C_q , 1C, C-2); 90.8, 90.6 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tmp)); 84.1, 83.6 (C_t , 1C, C-3); 68.2, 68.0 (C_s , 2C, C-5, C-2- CH_2); 58.7, 58.6, 58.4, 58.3, 58.1, 58.0 (C_t , 3C, C-2 (Pro)); 55.8, 55.8 (C_p , 2C, 2 x $C_{Ar}-OCH_3$); 55.4 (C_p , 1C, $C_{Ar}-OCH_3$); 52.8, 52.0 (C_t , 1C, $CH(CH_2C_{Ar})$); 47.4, 47.2, 47.1, 46.8, 46.6, 46.3 (C_s , 3C, C-5 (Pro)); 45.4, 45.3 (C_q , 1C, $\underline{C(CH_3)_3}$); 33.1, 32.9 (C_s , 1C, C-4), 28.7, 28.6, 28.5, 28.3, 28.1 (C_s , 3C, C-3 (Pro)); 25.9, 25.9, 25.8 (C_p , 3C, $C(\underline{CH_3})_3$); 25.4, 24.9, 24.9, 24.3 (C_s , 4C, C-4 (Pro), $CH(\underline{CH_2C_{Ar}})$); 22.7, 22.7 (C_p , 1C, $\underline{CH_3CO}$).

^{31}P -NMR (162.0 MHz, $CDCl_3$, δ/ppm):

-13.33, -13.51 ($OPO(OPh)_2$).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}/cm^{-1}$):

3424; 2971; 1750; 1651; 1594; 1489; 1287; 1189; 1024.

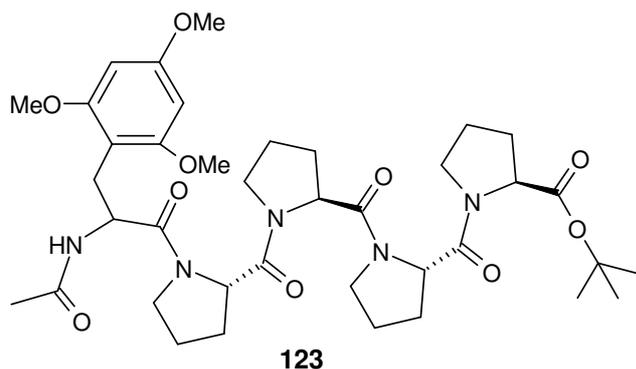
UV/VIS (Acetonitril)

308 nm ($\epsilon = 38 M^{-1}cm^{-1}$).

MS (ESI, MeOH, m/z):

1027.7 ($[M+Na]^+$, 100); 1043.6 ($[M+K]^+$, 10).

***N*-Acetyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxyphenylalaninyl-prolinyl-prolinyl-prolinyl-Prolin-*tert*-butylester (**123**)**



170 mg (0.311 mmol) des Tripetids **122** wurden gemäß **AAV2** mit 3 ml Trifluoressigsäure in 3 ml Dichlormethan behandelt. Das Produkt (**97**) wurde nach der Aufarbeitung analog **AAV1** zusammen mit 66 mg (0.342 mmol) EDC, 50 mg (0.373 mmol) HOBt und 43 μ l

(31 mg, 0.311 mmol) Triethylamin mit 95 mg (0.311 mmol) Prolinyl-prolin-*tert*-butylesterhydrochlorid umgesetzt. Nach der Aufarbeitung wurde das Rohprodukt an Merck Kieselgel chromatographiert (Dichlormethan/DMF = 100:3 \rightarrow 100:5).

Ausbeute: 127 mg (0.171 mmol, 55%) **123** als farbloser Feststoff.

$C_{38}H_{55}N_5O_{10} \cdot 3 H_2O$; (741.89)

ber.: C 57.34, H 7.73, N 8.80, O 26.13;

gef.: C 57.82, H 7.67, N 8.72, O 25.90.

R_f (Dichlormethan/Methanol 90:10) = 0.34.

Smp: 120°C.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

6.39, 6.25 (2 x d, $J = 7.1, 8.3$, 1H, NH); 6.09, 6.06 (2 x s, 2H, H_{Ar}); 4.92, 4.72, 4.63, 4.55, 4.41 (5 x m, 5H, $\underline{CH}(CH_2C_{Ar})$, H-2 (Pro)); 3.95-3.45 (m, 8H, H-5 (Pro)); 3.77 (s, 9H, 3 x $C_{Ar}-OCH_3$); 2.94 (m, 1H, $\underline{CH}(CH_aH_bC_{Ar})$); 2.84 (m, 1H, $\underline{CH}(CH_aH_bC_{Ar})$); 2.30-1.85 (m, 16H, H-3 (Pro), H-4 (Pro)); 1.79, 1.79, (2 x s, 3H, $\underline{CH_3CO}$); 1.40 (2 x s, 9H, $C(\underline{CH_3})_3$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

170.6, 170.5, 170.3, 170.3, 170.3, 170.0, 169.0 (C_q , 6C, $\underline{\text{CO}}$); 160.3, 160.2 (C_q , 1C, C_{Ar}); 159.3, 159.0 (C_q , 2C, C_{Ar}); 106.5, 105.8 (C_q , 1C, C_{Ar}); 90.7, 90.4 (C_t , 2C, C_{Ar}); 81.4 (C_q , 1C, $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$); 59.5, 59.4 (C_t , 4C, C-2 (Pro)); 55.7, 55.7 (C_p , 2C, 2 x $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 55.4, 55.4 (C_p , 1C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 52.4, 50.9 (C_t , 1C, $\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}})$); 47.2, 47.1, 47.0, 46.6 (C_s , 4C, C-5 (Pro)); 28.9, 28.6, 28.4, 28.1, 28.1 (C_s , 4C, C-3 (Pro)); 28.0, 28.0 (C_p , 3C, $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 26.0, 25.2, 25.0, 24.9, 24.9, 24.7, 24.6 (C_s , 5C, C-4 (Pro), $\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{C}_{\text{Ar}})$); 23.2, 23.1 (C_p , 1C, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$).

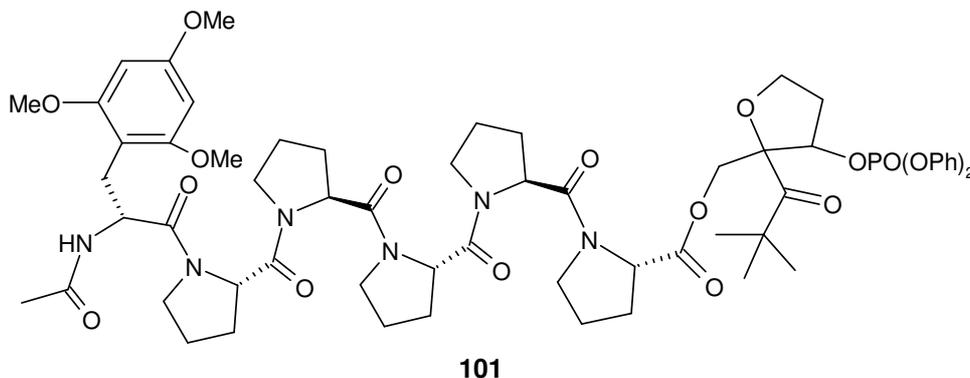
IR (NaCl, n/cm^{-1}):

3500; 3054; 2975; 1732; 1660; 1463; 1205; 1151; 1057.

MS (ESI, MeOH, m/z):

764.4 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100); 1505.1 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, 9).

***N*-Acetyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxyphenylalaninyl-prolinyl-prolinyl-prolinyl-prolinyl-prolin-[(2*S*,3*R*)-2-*tert*.-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester (**101**)**



126 mg (0.169 mmol) des Pentapeptids **123** wurden zur *tert*.-Butylesterspaltung nach **AAV2** mit 1 ml Trifluoressigsäure in 1 ml Dichlormethan behandelt. Das Produkt (**98**) wurde nach der Aufarbeitung mit 90 mg (0.169 mmol) des sekundären Amins **92**, 36 mg (0.186 mmol) EDC, 27 mg (0.203 mmol) HOBt und 23 μl (17 mg, 0.169 mmol) Triethylamin analog **AAV1** umgesetzt. Der nach der Aufarbeitung erhaltene Rückstand wurde an Merck Kieselgel mit Dichlormethan/DMF = 97:3 \rightarrow 93:7 als Laufmittel chromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 53 mg (0.044 mmol, 26%) **101** als farbloser Feststoff.

$C_{61}H_{79}N_6O_{16}P$ (1199.31) · 3/2 H_2O ;

ber.: C 59.75, H 6.74, N 6.85, O 24.14;

gef.: C 59.90, H 6.63, N 6.84, O 24.24.

R_f (Dichlormethan/Dimethylformamid 10:1) = 0.15.

Smp: 123°C.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ/ppm):

7.35 (m, 4H, H_{Ar} (Ph)); 7.18 (m, 6H, H_{Ar} (Ph)); 6.53, 6.48 (2 x br, 1H, NH); 6.10, 6.08 (2 x s, 2H, H_{Ar} (Tmp)); 5.16 (m, 1H, H-3); 4.94, 4.68, 4.55 (3 x m, 6H, $CH(CH_2C_{Ar})$, H-2 (Pro)); 4.29, 4.07 (2 x m, 4H, H-5, C-2- CH_2); 3.95-3.45 (m, 10H, H-5 (Pro)); 3.78, 3.78, 3.77 (3 x s, 9H, 3 x $C_{Ar}-OCH_3$); 2.98 (m, 2H, $CH(CH_2C_{Ar})$); 2.30-1.85 (m, 22H, H-4, H-4 (Pro), H-3 (Pro)); 1.82, (s, 3H, CH_3CO); 1.14, 1.13 (2 x s, 9H, $C(CH_3)_3$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$, δ/ppm):

214.5 (C_q , 1C, C-2- \underline{CO}); 171.8, 171.7, 171.1, 170.6, 170.3 (C_q , 7C, \underline{CO}); 160.4 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tmp)); 159.3, 159.0 (C_q , 2C, C_{Ar} (Tmp)); 150.7, 150.5, 150.4, 150.4 (C_q , 2C, C_{Ar} (Ph)); 129.9, 129.9 (C_t , 4C, C_{Ar} (Ph)); 125.7, 125.6 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 120.3, 120.3, 120.3, 120.2 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 120.2, 120.2, 120.2 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 105.1 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tmp)); 94.7 (C_q , 1C, C-2); 90.8, 90.5 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tmp)); 83.6 (C_t , 1C, C-3); 68.2, 68.1, 67.9, 66.8 (C_s , 2C, C-5, C-2- CH_2); 58.7, 58.6, 58.1, 57.9 (C_t , 5C, C-2 (Pro)); 55.8, 55.7 (C_p , 2C, 2 x $C_{Ar}-OCH_3$); 55.4, 55.4 (C_p , 1C, $C_{Ar}-OCH_3$); 52.8, 52.0 (C_t , 1C, $CH(CH_2C_{Ar})$); 47.3, 46.9, 46.6, 46.5 (C_s , 5C, C-5 (Pro)); 45.4, 45.3 (C_q , 1C, $\underline{C(CH_3)_3}$); 33.2, 33.0 (C_s , 1C, C-4), 28.7, 28.6, 28.4, 28.1, 28.0 (C_s , 5C, C-3 (Pro)); 25.9, 25.8 (C_p , 3C, $C(\underline{CH_3})_3$); 25.0, 24.9, 24.7, 24.4 (C_s , 6C, C-4 (Pro), $CH(\underline{CH_2C_{Ar}})$); 22.9 (C_p , 1C, $\underline{CH_3CO}$).

^{31}P -NMR (162.0 MHz, $CDCl_3$, δ/ppm):

-13.51, -13.53 ($OPO(OPh)_2$).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}/cm^{-1}$):

3306; 2971; 1749; 1651; 1454; 1287; 1189; 1151; 1023.

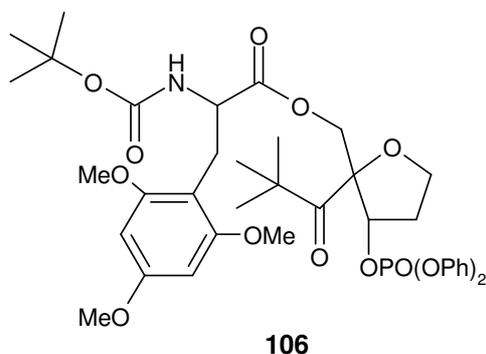
UV/VIS (Acetonitril)

308 nm ($\epsilon = 34 M^{-1}cm^{-1}$).

MS (ESI, MeOH, m/z):
1221.8 ($[M+Na]^+$, 100).

6.9 Synthese von Oligopeptid-Modellsystemen mit 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin als intermediärem und Tyrosin als finalem Elektronendonator

***N*-tert.-Butyloxycarbonyl-(rac)-2,4,6-trimethoxyphenylalanin-[(2*R*,3*S*)-2-*tert.*-butyl-carbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester;**
***N*-tert.-Butyloxycarbonyl-(rac)-2,4,6-trimethoxyphenylalanin-[(2*S*,3*R*)-2-*tert.*-butyl-carbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester (106)**



282 mg (0.794 mmol) *N*-tert.-Butoxycarbonyl-(rac)-2,4,6-trimethoxyphenylalanin (**46**) konnten nach **AAV4** mit 152 mg (0.794 mmol) EDC und 88 mg (0.794 mmol) DMAP in 3 ml DMF (abs.) mit 313 mg (0.721 mmol) des primären Alkohols **35** verestert werden. Das nach der Aufarbeitung erhaltene Rohprodukt wurde mit Essigester/Hexan = 2:3 → 1:1

als Laufmittel an Uetikon Kieselgel chromatographisch gereinigt. Dabei konnten 100 mg (0.230 mmol, 32%) des Edukts **35** reisoliert werden.

Ausbeute: 362 mg (0.469 mmol, 95% umsatzbezogen) **106** als farbloser Feststoff.

$C_{39}H_{50}NO_{13}P$ (771.81);

ber.: C 60.69, H 6.53, N 1.81, O 26.95;

gef.: C 60.49, H 6.45, N 1.83, O 26.82.

R_f (Essigester/Hexan 1:1) = 0.41.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

7.32 (m, 4H, H_{Ar} (Ph)); 7.19 (m, 6H, H_{Ar} (Ph)); 6.11 (s, 2H, H_{Ar} (Tmp)); 5.31 (m, 1H, NH); 5.20 (m, 1H, H-3); 4.16 (m, 5H, $CH(CH_2C_{Ar})$, H-5, C-2- CH_2); 3.79, 3.78 (2 x s, 9H, 3 x $C_{Ar}-OCH_3$); 3.05 (m, 1H, $CH(CH_aH_bC_{Ar})$); 2.89 (m, 1H, $CH(CH_aH_bC_{Ar})$); 2.33 (m, 1H, H-4_a); 2.20 (m, 1H, H-4_b); 1.34 (s, 9H, $OC(CH_3)_3$); 1.19, 1.17 (2 x s, 9H, $COC(CH_3)_3$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

212.8 (C_q , 1C, C-2- CO); 172.6 (C_q , 1C, C-2- $\text{CH}_2\text{O}\text{C}\text{O}$); 160.4 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tmp)); 159.2 (C_q , 2C, C_{Ar} (Tmp)); 155.6 (C_q , 1C, $\text{NH}\text{C}\text{O}$); 150.6, 150.5 (C_q , 2C, C_{Ar} (Ph)); 129.9 (C_t , 4C, C_{Ar} (Ph)); 125.6, 125.5 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 120.3, 120.3 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 120.2, 120.2 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 105.1 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tmp)); 95.3, 95.2 (C_q , 1C, C-2); 90.6 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tmp)); 84.4, 84.4 (C_t , 1C, C-3); 79.4 (C_q , 1C, $\text{O}\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 68.5, 68.4 (C_s , 2C, C-5, C-2- CH_2); 55.7, 55.7 (C_p , 2C, 2 x $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-O}\text{C}\text{H}_3$); 55.5 (C_p , 1C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-O}\text{C}\text{H}_3$); 54.2, 54.2 (C_t , 1C, $\text{C}\text{H}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}})$); 45.4, 45.4 (C_q , 1C, $\text{C}\text{O}\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 33.3 (C_s , 1C, C-4); 28.4, 28.2 (C_p , 3C, $\text{O}\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 26.0, 25.9 (C_p , 3C, $\text{C}\text{O}\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 25.2 (C_s , 1C, $\text{C}\text{H}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}})$).

^{31}P -NMR (162.0 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

-13.49 ($\text{O}\text{P}\text{O}(\text{O}\text{Ph})_2$).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$):

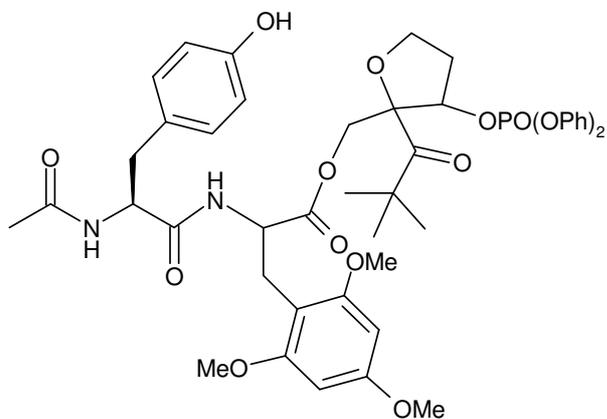
3422; 2967; 1711; 1594; 1489; 1456; 1289; 1194; 1150; 1022.

MS (ESI, MeOH, m/z):

794.3 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100); 810.3 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, 7).

***N*-Acetyl-tyrosinyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxyphenylalanin-[(2*R*,3*S*)-2-*tert.*-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester;**

***N*-Acetyl-tyrosinyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxyphenylalanin-[(2*S*,3*R*)-2-*tert.*-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester (111)**



111

119 mg (0.154 mmol) des *tert.*-Butyloxycarbonyl-geschützten Aminosäurederivats **106** wurden nach **AAV5** mit 2 ml einer 4 M HCl-Lösung in 1,4-Dioxan quantitativ in das Hydrochlorid des entsprechendenamins überführt. Gemäß **AAV1** wurde anschließend das erhaltene Hydrochlorid mit 54 mg (0.173 mmol) *N*-Acetyl-tyrosin-(*O*-benzyl), 48 mg

(0.249 mmol) EDC, 37 mg (0.271 mmol) HOBt und 32 μ l (22 mg, 0.226 mmol) Triethylamin in 3 ml DMF (abs.) zur Reaktion gebracht. Nach der Aufarbeitung wurde das Rohprodukt zur Spaltung des Benzylethers nach **AAV3** in 10 ml Methanol umgesetzt. Der nach der Aufarbeitung erhaltene Rückstand wurde chromatographisch (Dichlormethan/Methanol = 99:1 \rightarrow 97:3) an Merck Kieselgel gereinigt.

Ausbeute: 107 mg (0.122 mmol, 79% über zwei Stufen) **111** als farbloser Feststoff.

$C_{45}H_{53}N_2O_{14}P$ (876.88) $\cdot H_2O$;

ber.: C 60.40, H 6.19, N 3.13, O 26.82;

gef.: C 60.39, H 6.19, N 3.19, O 26.76.

R_f (Dichlormethan/Methanol 95:5) = 0.50.

Smp: 86°C.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

7.33 (m, 4H, H_{Ar} (Ph)); 7.20 (m, 6H, H_{Ar} (Ph)); 6.67 (m, 2H, H_{Ar} (Tyr)); 6.52 (m, 2H, H_{Ar} (Tyr)); 6.07 (m, 2H, H_{Ar} (Tmp)); 5.23 (m, 1H, H-3); 4.60 (m, 1H; NH); 4.42 (m, 2H, $\underline{CH}(CH_2C_{Ar}(Tyr))$, $\underline{CH}(CH_2C_{Ar}(Tmp))$), 4.12 (m, 4H, H-5, C-2- $\underline{CH_2}$); 3.75 (m, 6H, 2 x $C_{Ar}-O\underline{CH_3}$); 3.69 (m, 3H, $C_{Ar}-O\underline{CH_3}$); 2.95-2.65 (m, 4H, $\underline{CH}(CH_2C_{Ar}(Tyr))$, $\underline{CH}(CH_2C_{Ar}(Tmp))$); 2.28 (m, 1H, H-4_a); 2.15 (m, 1H, H-4_b); 1.89 (m, 3H, $\underline{CH_3CO}$); 1.18 (m, 9H, $C(\underline{CH_3})_3$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

212.8, 212.8, 212.2, 212.5 (C_q , 1C, C-2- \underline{CO}); 171.6, 171.6, 171.3, 171.2, 171.1, 171.0, 170.6, 170.4, 170.0 (C_q , 3C, \underline{CO}); 160.7, 160.7 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tmp)); 159.0, 159.0, 158.9 (C_q , 2C, C_{Ar} (Tmp)); 155.8, 155.7, 155.5 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 150.4, 150.4, 150.3, 150.2, 150.2 (C_q , 2C, C_{Ar} (Ph)); 130.6, 130.3 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 129.9, 129.9 (C_t , 4C, C_{Ar} (Ph)); 127.6, 127.4, 127.3 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 125.8, 125.6 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 120.3, 120.2, 120.2, 120.1 (C_t , 4C, C_{Ar} (Ph)); 115.5, 115.5, 115.4, 115.4 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 104.8, 104.7, 104.5, 104.4 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tmp)); 95.3, 95.2, 95.1, 95.0, 94.9, 94.8 (C_q , 1C, C-2); 90.9, 90.8, 90.7 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tmp)); 84.6, 84.4, 84.4, 84.3, 84.0 (C_t , 1C, C-3); 68.4, 68.4, 68.3, 68.2, 68.0 (C_s , 2C, C-5, C-2- $\underline{CH_2}$); 55.9, 55.8, 55.8 (C_p , 2C, 2 x $C_{Ar}-O\underline{CH_3}$); 55.7 (C_p , 1C, $C_{Ar}-O\underline{CH_3}$); 55.4, 54.7, 54.6, 54.1, 54.1, 53.7, 53.6, 53.4, 53.3 (C_t , 2C, $\underline{CH}(CH_2C_{Ar}(Tmp))$, $\underline{CH}(CH_2C_{Ar}(Tyr))$); 45.4 (C_q , 1C, $\underline{C}(\underline{CH_3})_3$); 38.4, 38.3, 37.3, 37.1 (C_s , 1C, $\underline{CH}(\underline{CH_2C_{Ar}(Tyr)})$); 33.3, 33.1 (C_s , 1C, C-4); 25.9 (C_p , 3C, $\underline{C}(\underline{CH_3})_3$); 24.7, 24.6, 24.4 (C_s , 1C, $\underline{CH}(\underline{CH_2C_{Ar}(Tmp)})$); 23.1, 23.1 (C_p , 1C, $\underline{CH_3CO}$).

^{31}P -NMR (162.0 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

-13.33 ($\text{OPO}(\text{OPh})_2$).

IR (NaCl , $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$):

3301; 2958; 1748; 1614; 1516; 1455; 1277; 1189; 958.

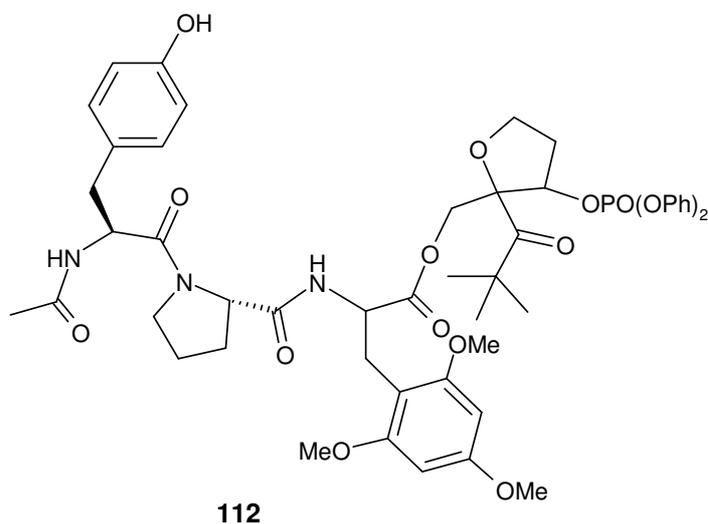
UV/VIS (Acetonitril)

308 nm ($\epsilon = 38 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

MS (ESI, MeOH, m/z):

899.3 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100); 1774.6 ($[\text{2M}+\text{Na}]^+$, 34).

***N*-Acetyl-tyrosinyl-prolinyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxyphenylalanin-[(2*R*,3*S*)-2-*tert.*-butyl-carbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester;**
***N*-Acetyl-tyrosinyl-prolinyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxyphenylalanin-[(2*S*,3*R*)-2-*tert.*-butyl-carbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester (**112**)**



Die Behandlung von 107 mg (0.139 mmol) des *tert.*-Butyloxycarbonyl-geschützten Aminosäurederivats **106** analog **AAV5** mit 2 ml einer 4 M HCl-Lösung in 1,4-Dioxan lieferte quantitativ das Hydrochlorid des entsprechenden Amins. Das Hydrochlorid wurde mit 79 mg (0.152 mmol) *N*-Acetyltyrosinyl(*O*-benzyl)-prolin (**108**)

nach **AAV1** mit 33 mg (0.166 mmol) EDC, 25 mg (0.180 mmol) HOBt und 20 μl (14 mg, 0.139 mmol) Triethylamin in 3 ml DMF (abs.) umgesetzt. Nach der Aufarbeitung wurde das Rohprodukt zur Benzyletherspaltung nach **AAV3** in 5 ml Methanol zur Reaktion gebracht. Das nach der Aufarbeitung erhaltene Rohprodukt konnte mit Dichlormethan/Methanol = 99:1 \rightarrow 96:4 als Laufmittel an Merck Kieselgel chromatographisch gereinigt werden.

Ausbeute: 80 mg (0.082 mmol, 59% über zwei Stufen) **112** als farbloser Feststoff.

$C_{50}H_{60}N_3O_{15}P$ (974.00) · 3/2 H_2O ;

ber.: C 59.99, H 6.34, N 4.20, O 26.37;

gef.: C 60.03, H 6.35, N 4.19, O 26.37.

R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0.52.

Smp: 95°C.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ/ppm):

7.34 (m, 4H, H_{Ar} (Ph)); 7.16 (m, 6H, H_{Ar} (Ph)); 6.96 (m, 2H, H_{Ar} (Tyr)); 6.64 (m, 2H, H_{Ar} (Tyr)); 6.08 (m, 2H, H_{Ar} (Tmp)); 5.77, 5.56 (2 x m, 1H, H-3); 5.32, 5.22, 4.82, 4.56 (4 x m, 3H, $\underline{CH}(\underline{CH_2C_{Ar}}(\text{Tyr}))$, $\underline{CH}(\underline{CH_2C_{Ar}}(\text{Tmp}))$, H-2(Pro)), 4.10 (m, 4H, H-5, C-2- $\underline{CH_2}$); 3.77 (m, 9H, 3 x $C_{Ar}-O\underline{CH_3}$); 3.77-3.30 (m, 2H, H-5 (Pro)); 2.95-2.70 (m, 4H, $\underline{CH}(\underline{CH_2C_{Ar}}(\text{Tyr}))$, $\underline{CH}(\underline{CH_2C_{Ar}}(\text{Tmp}))$); 2.45-1.65 (m, 6H, H-4, H-3 (Pro), H-4 (Pro)); 2.03 (m, 3H, $\underline{CH_3CO}$); 1.15 (m, 9H, $C(\underline{CH_3})_3$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$, δ/ppm):

213.2, 212.6 (C_q , 1C, C-2- \underline{CO}); 171.7, 171.6, 171.5, 171.3, 170.5, 170.5, 170.0 (C_q , 4C, \underline{CO}); 160.5, 160.4 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tmp)); 159.3, 159.2 (C_q , 2C, C_{Ar} (Tmp)); 156.0 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 150.4, 150.3, 150.3 (C_q , 2C, C_{Ar} (Ph)); 130.5, 130.4 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 129.9, 129.8 (C_t , 4C, C_{Ar} (Ph)); 127.0 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 125.7, 125.7, 125.5 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 120.3, 120.3, 120.2, 120.2, 120.1, 120.1 (C_t , 4C, C_{Ar} (Ph)); 115.6, 115.5 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 105.1, 104.9 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tmp)); 95.4, 95.2 (C_q , 1C, C-2); 90.7, 90.5, 90.4 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tmp)); 85.1, 85.1, 84.5 (C_t , 1C, C-3); 68.4 (C_s , 2C, C-5, C-2- $\underline{CH_2}$); 60.5 (C_t , 1C, C-2(Pro)); 55.7, 55.7 (C_p , 2C, 2 x $C_{Ar}-O\underline{CH_3}$); 55.4 (C_p , 1C, $C_{Ar}-O\underline{CH_3}$); 53.1, 52.3 (C_t , 2C, $\underline{CH}(\underline{CH_2C_{Ar}}(\text{Tmp}))$, $\underline{CH}(\underline{CH_2C_{Ar}}(\text{Tyr}))$); 47.2 (C_s , 1C, C-5 (Pro)); 45.4, 45.4 (C_q , 1C, $\underline{C}(\underline{CH_3})_3$); 38.4, 38.0 (C_s , 1C, $\underline{CH}(\underline{CH_2C_{Ar}}(\text{Tyr}))$); 33.3 (C_s , 1C, C-4); 27.3, 26.9 (C_s , 1C, C-3 (Pro)); 25.8 (C_p , 3C, $C(\underline{CH_3})_3$); 25.1, 24.9 (C_s , 2C, $\underline{CH}(\underline{CH_2C_{Ar}}(\text{Tmp}))$, C-4 (Pro)); 22.6, 21.1 (C_p , 1C, $\underline{CH_3CO}$).

^{31}P -NMR (162.0 MHz, $CDCl_3$, δ/ppm):

-13.64 ($O\underline{PO}(\underline{OPh})_2$).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}/cm^{-1}$):

3299; 2960; 1749; 1698; 1614; 1516; 1455; 1189; 1023.

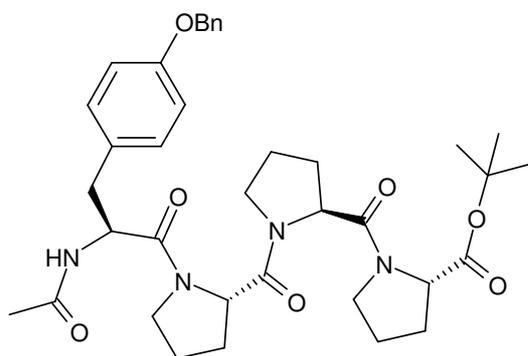
UV/VIS (Acetonitril)

308 nm ($\epsilon = 37 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

MS (ESI, MeOH, m/z):

996.4 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100); 1012.4 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, 4).

***N*-Acetyl-tyrosinyl-(*O*-benzyl)-prolinyl-prolinyl-prolin-*tert.*-butylester (**124**)**



124

654 mg (1.63 mmol) Prolin-prolinyl-prolinyl-*tert.*-butylester-hydrochlorid wurden nach **AAV1** zusammen mit 277 mg (1.79 mmol) EDC, 264 mg (1.95 mmol) HOBt und 226 μl (165 mg, 1.63 mmol) Triethylamin mit 654 mg (1.63 mmol) *N*-*tert.*-Butyloxycarbonyl-tyrosin-(*O*-benzyl) umgesetzt. Das erhaltene Tetrapeptid wurde nach der Aufarbeitung analog **AAV5** in

5 ml einer 4 M Lösung HCl in 1,4-Dioxan umgesetzt. Das so zugängliche Hydrochlorid wurde in 5 ml Dichlormethan suspendiert und mit 1.5 ml (1.62 g, 15.90 mmol) Essigsäureanhydrid und 2 ml (1.45 g, 14.37 mmol) Triethylamin versetzt. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wurden die flüchtigen Bestandteile des Reaktionsgemisches unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand an Uetikon Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol = 40:1 \rightarrow 20:1 chromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 559 mg (0.846 mmol, 52% über drei Stufen) **124** als leicht bräunlicher Feststoff.

$\text{C}_{37}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_7$ (660.81);

R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0.45.

Smp: 65°C.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

7.37 (m, 5H, C_{Ar} (Bn)); 7.12 (d, $J = 8.6$, 2H, H_{Ar} (Tyr)); 6.89, 6.85 (2 x d, $J = 8.6$, 8.6, 2H, H_{Ar} (Tyr)); 6.37 (m, 1H, CONH); 5.08, 5.01 (2 x s, 2H, Ph-CH_2); 4.96, 4.76, 4.69, 4.63, 4.45, 4.38 (6 x m, 4H, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}})$, H-2(Pro)); 3.77-3.27 (m, 6H, H-5 (Pro)); 3.11 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_a\text{H}_b\text{C}_{\text{Ar}})$); 2.87 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_a\text{H}_b\text{C}_{\text{Ar}})$); 2.35-1.90 (m, 12H, H-3 (Pro), H-4 (Pro)); 1.91 (s, 3H, CH_3CO); 1.42, 1.43 (2 x s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

171.4, 170.2, 170.2, 169.9, 169.8, 169.2 (C_q , 5C, CO); 157.8 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 137.2, 137.0 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 130.9, 130.5 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 128.1, 128.7, 128.7, 128.0, 127.6, 127.4 (C_t , 5C, C_{Ar} (Bn)); 128.4, 128.1 (C_q , 1C, C_{Ar} (Bn)); 115.0, 114.7 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 81.2 (C_q , 1C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 70.0 (C_s , 1C, $\text{Ph-CH}_2\text{O}$); 59.5, 59.4, 58.2, 58.1, 58.0 (C_t , 3C, C-2 (Pro)); 53.6, 51.8 (C_t , 1C, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}})$); 47.6, 47.1, 46.9, 46.8, 46.7, 46.7 (C_s , 3C, C-5 (Pro)); 40.0, 36.7 (C_s , 1C, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}})$); 28.9, 28.4, 28.1 (C_s , 3C, C-3 (Pro)); 28.1, 28.1, 28.0 (C_p , 3C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 25.1, 25.0, 24.8, 24.7 (C_s , 3C, C-4 (Pro)); 23.1, 22.4 (C_p , 1C, CH_3CO).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$):

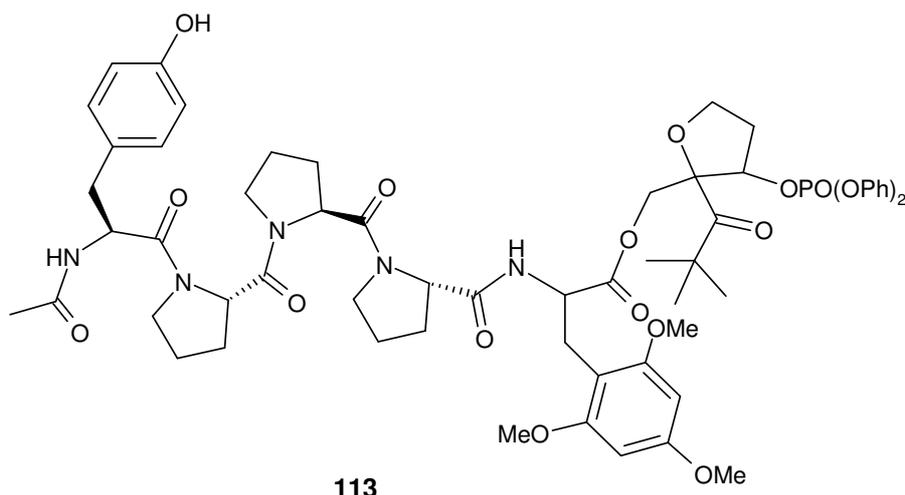
3300; 2976; 1735; 1650; 1511; 1434; 1241; 1154; 734.

MS (ESI, MeOH, m/z):

683.4 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100).

***N*-Acetyl-tyrosinyl-prolinyl-prolinyl-prolinyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxyphenylalanin-[(2*R*,3*S*)-2-*tert.*-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester;**

***N*-Acetyl-tyrosinyl-prolinyl-prolinyl-prolinyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxyphenylalanin-[(2*S*,3*R*)-2-*tert.*-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester (113)**



134 mg (0.226 mmol) des geschützten Tetrapeptids **124** wurden nach **AAV2** mit 2 ml Trifluoressigsäure und 2 ml Dichlormethan in die freie Carbonsäure **109** überführt. Nach **AAV5** konnten 174 mg (0.226 mmol) des *tert.*-Butyloxycarbonyl-geschützten Trimethoxyphenylalaninderivats **106** mit 2 ml einer 4 M HCl-Lösung in 1,4-Dioxan quantitativ in das Hydrochlorid des entsprechenden Amins überführt werden. Die Carbonsäure und das Hydrochlorid wurden nach **AAV1** mit Hilfe von 48 mg (0.249 mmol) EDC, 37 mg (0.271 mmol) HOBt sowie 32 µl (22 mg, 0.226 mmol) Triethylamin in 3 ml DMF (abs.) kondensiert. Nach der Aufarbeitung wurde das Rohprodukt zur Benzyletherspaltung nach **AAV3** in 10 ml Methanol umgesetzt. Der nach der Aufarbeitung erhaltene Rückstand wurde mit Dichlormethan/DMF = 95:5 → 90:10 als Laufmittel an Merck Kieselgel chromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 145 mg (0.124 mmol, 55% über zwei Stufen) **113** als farbloser Feststoff.

$C_{60}H_{74}N_5O_{17}P \cdot H_2O$ (1168.26) · H₂O;

ber.: C 60.75, H 6.46, N 5.90, O 24.28;

gef.: C 60.62, H 6.40, N 5.80, O 24.58.

R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0.35.

Smp: 110°C.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

7.41 (m, 4H, H_{Ar} (Ph)); 7.19 (m, 6H, H_{Ar} (Ph)); 7.03 (m, 2H, H_{Ar} (Tyr)); 6.64 (m, 2H, H_{Ar} (Tyr)); 6.19 (m, 1H, NH); 6.07 (m, 2H, H_{Ar} (Tmp)); 5.18 (m, 1H, H-3); 4.94, 4.68, 4.49, 4.41 (4 x m, 5H, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}(\text{Tyr}))$, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}(\text{Tmp}))$, H-2(Pro)), 4.15 (m, 4H, H-5, C-2- CH_2); 3.77 (m, 9H, 3 x $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 3.77-3.35 (m, 6H, H-5 (Pro)); 2.95 (m, 4H, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}(\text{Tyr}))$, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}(\text{Tmp}))$); 2.35-1.75 (m, 14H, H-4, H-3 (Pro), H-4 (Pro)); 1.90 (m, 3H, CH_3CO); 1.16 (m, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

213.0, 212.8 (C_q , 1C, C-2- CO); 171.9, 171.8, 171.4, 171.4, 171.3, 171.1, 170.8, 170.2, 170.1, 169.9 (C_q , 6C, CO); 160.5, 160.4 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tmp)); 159.3, 159.2, 159.2 (C_q , 2C, C_{Ar} (Tmp)); 156.0 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 150.6, 150.4 (C_q , 2C, C_{Ar} (Ph)); 130.8 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 129.9 (C_t , 4C, C_{Ar} (Ph)); 126.9 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 125.6, 125.5 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 120.3, 120.3, 120.2, 120.2, 120.2 (C_t , 4C, C_{Ar} (Ph)); 115.4 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 105.0, 104.7 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tmp)); 95.5, 95.4, 95.3, 95.2 (C_q , 1C, C-2); 90.6, 90.4 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tmp)); 84.7, 84.4 (C_t , 1C, C-3); 68.7, 68.5 (C_s , 2C, C-5, C-2- CH_2); 60.5, 58.3, 58.3 (C_t , 3C, C-2(Pro)); 55.8, 55.7 (C_p , 2C, 2 x $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 55.6, 55.4 (C_p , 1C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 52.6, 52.0 (C_t , 2C, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}(\text{Tmp}))$, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}(\text{Tyr}))$); 47.6, 47.2 (C_s , 3C, C-5 (Pro)); 45.4, 45.4, 45.3 (C_q , 1C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 37.3 (C_s , 1C, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}(\text{Tyr}))$); 33.4 (C_s , 1C, C-4); 28.3 (C_s , 3C, C-3 (Pro)); 25.9, 25.9 (C_p , 3C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 25.1, 25.0, 24.7, 24.6 (C_s , 4C, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}(\text{Tmp}))$, C-4 (Pro)); 23.2, 21.2 (C_p , 1C, CH_3CO).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162.0 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

-13.47, -13.51 ($\text{OPO}(\text{OPh})_2$).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$):

3300; 2956; 1750; 1644; 1517; 1489; 1450; 1194; 1017; 956.

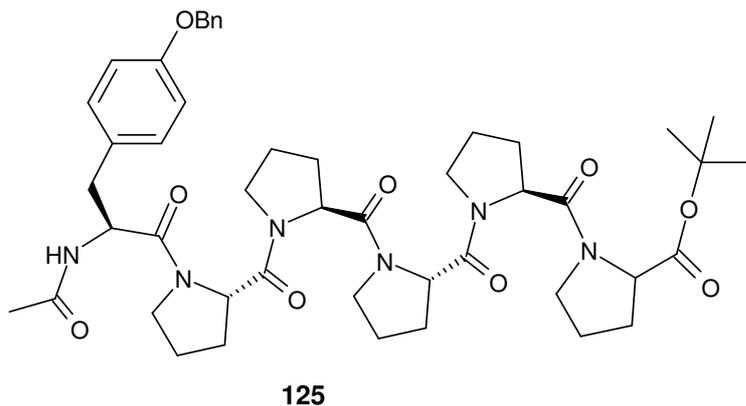
UV/VIS (Acetonitril)

308 nm ($\epsilon = 37 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

MS (ESI, MeOH, m/z):

1190.7 ($[M+Na]^+$, 100); 1206.6 ($[M+K]^+$, 11).

***N*-Acetyl-tyrosinyl-(*O*-benzyl)-prolinyl-prolinyl-prolinyl-prolin-*tert.*-butylester
(125)**



372 mg (0.562 mmol) des *tert.*-Butylester-geschützten Tetrapeptids **124** konnten nach **AAV2** mit 5 ml Trifluoressigsäure und 5 ml Dichlormethan quantitativ in die freie Carbonsäure **109** überführt werden. Im Anschluss an die

Aufarbeitung wurde die Säure analog **AAV1** mit 119 mg (0.619 mmol) EDC, 92 mg HOBt und 87 μ l (62 mg, 0.619 mmol) Triethylamin in 5 ml DMF (abs.) mit 189 mg (0.619 mmol) Prolinyl-prolin-*tert.*-butylester-hydrochlorid umgesetzt. Nach der Aufarbeitung wurde das Rohprodukt an Uetikon Kieselgel chromatographisch gereinigt (Dichlormethan/Methanol = 97:3 \rightarrow 93:7).

Ausbeute: 298 mg (0.349 mmol, 62%) **125** als farbloser Feststoff.

$C_{47}H_{62}N_6O_9$ (855.03) \cdot 2 H_2O ;

ber.: C 63.35, H 7.47, N 9.43, O 19.75;

gef.: C 63.14, H 7.44, N 9.25, O 19.70.

R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0.44.

Smp: 127°C.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

7.36 (m, 5H, C_{Ar} (Bn)); 7.13 (d, $J = 8.6$, 2H, H_{Ar} (Tyr)); 6.84 (m, 2H, H_{Ar} (Tyr)); 6.41, 6.15 (m, 1H, CONH); 5.06, 5.00 (2 x s, 2H, Ph- \underline{CH}_2); 4.96 (m, 1H, \underline{CH} (CH_2C_{Ar})); 4.73, 4.42, 4.35 (3 x m, 5H, H-2(Pro)); 3.80-3.15 (m, 10H, H-5 (Pro)); 3.10 (m, 1H, \underline{CH} ($\underline{CH}_aH_bC_{Ar}$)); 2.80 (m,

^1H , $\text{CH}(\text{CH}_3\text{H}_b\text{C}_{\text{Ar}})$); 2.25-1.90 (m, 20H, H-3 (Pro), H-4 (Pro)); 1.89 (s, 3H, CH_3CO); 1.41 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

170.0, 169.9, 169.9, 169.5, 169.2, 168.9 (C_q , 7C, CO); 157.8 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 137.2 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 131.0, 130.5 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 128.7, 128.7, 128.0, 127.6, 127.4 (C_t , 5C, C_{Ar} (Bn)); 128.4, 128.1 (C_q , 1C, C_{Ar} (Bn)); 115.0, 114.7 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 81.2 (C_q , 1C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 70.0 (C_s , 1C, $\text{Ph-CH}_2\text{O}$); 60.5, 59.5, 58.1, 58.1, 58.0, 57.8 (C_t , 5C, C-2 (Pro)); 53.5, 51.6 (C_t , 1C, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}})$); 47.5, 47.2, 47.1, 46.8, 46.5 (C_s , 5C, C-5 (Pro)); 36.7 (C_s , 1C, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}})$); 28.9, 28.4, 28.1, 28.0, 28.0 (C_s , 5C, C-3 (Pro)); 28.1 (C_p , 3C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 25.2, 24.9, 24.8, 24.7, 24.6 (C_s , 5C, C-4 (Pro)); 23.3 (C_p , 1C, CH_3CO).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$):

3496; 3300; 2975; 1735; 1651; 1433; 1242; 1155; 734.

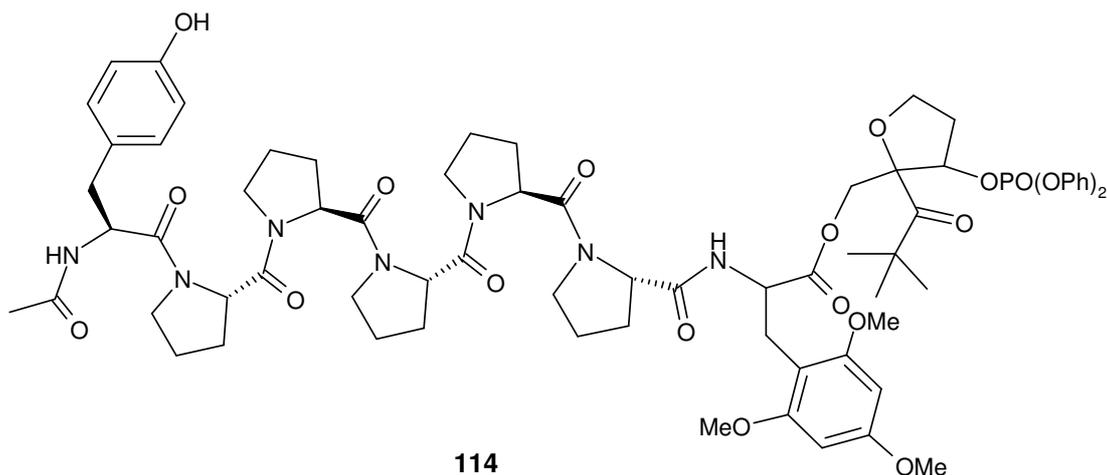
MS (ESI, MeOH, m/z):

878.5 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100).

***N*-Acetyl-tyrosinyl-prolinyl-prolinyl-prolinyl-prolinyl-prolinyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxy-phenylalanin-[(2*R*,3*S*)-2-*tert.*-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester;**

***N*-Acetyl-tyrosinyl-prolinyl-prolinyl-prolinyl-prolinyl-prolinyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxy-phenylalanin-[(2*S*,3*R*)-2-*tert.*-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester (114)**

260 mg (0.304 mmol) des *tert.*-Butylester-geschützten Oligopeptids **125** wurden nach **AAV2** mit 2 ml Trifluoressigsäure und 2 ml Dichlormethan in die freie Carbonsäure **110** überführt. Nach **AAV5** konnten aus 218 mg (0.282 mmol) des *tert.*-Butyloxycarbonyl-geschützten Aminosäurederivats **106** mit 2 ml einer 4 M HCl-Lösung in 1,4-Dioxan quantitativ das Hydrochlorid des entsprechendenamins erzeugt werden. Die Carbonsäure und das Hydrochlorid wurden nach **AAV1** mit 65 mg (0.339 mmol) EDC, 50 mg (0.370 mmol) HOBT



und 40 μl (29 mg, 0.287 mmol) Triethylamin in 3 ml DMF (abs.) zur Reaktion gebracht. Nach der Aufarbeitung wurde das Rohprodukt zur Benzyletherspaltung nach **AAV3** in 10 ml Methanol umgesetzt. Der nach der Aufarbeitung erhaltene Rückstand wurde mit präparativer Dünnschichtchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 93:7/90:1), sowie säulenchromatographisch (Dichlormethan/DMF = 93:7) an Merck Kieselgel gereinigt. Ausbeute: 162 mg (0.119 mmol, 42% über zwei Stufen) **114** als farbloser Feststoff.

$\text{C}_{70}\text{H}_{88}\text{N}_7\text{O}_{19}\text{P}$ (1362.46) \cdot 3 H_2O ;

ber.: C 59.35, H 6.69, N 6.92, O 24.85;

gef.: C 59.31, H 6.69, N 6.81, O 24.56.

R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0.30.

Smp: 133°C.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

7.41 (t, $J = 7.3$, 1H, NH); 7.32 (m, 4H, H_{Ar} (Ph)); 7.19 (m, 6H, H_{Ar} (Ph)); 7.02 (m, 2H, H_{Ar} (Tyr)); 6.64 (m, 2H, H_{Ar} (Tyr)); 6.28 (m, 1H, NH); 6.08 (m, 2H, H_{Ar} (Tmp)); 5.19 (m, 1H, H-3); 4.91, 4.74, 4.66, 4.50 (4 x m, 7H, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}(\text{Tyr}))$, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}(\text{Tmp}))$, H-2(Pro)), 4.10 (m, 4H, H-5, C-2- CH_2); 3.77 (m, 9H, 3 x $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OCH}_3$); 3.77-3.20 (m, 10H, H-5 (Pro)); 2.92 (m, 4H, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}(\text{Tyr}))$, $\text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}(\text{Tmp}))$); 2.40-1.65 (m, 22H, H-4, H-3 (Pro), H-4 (Pro)); 1.89 (m, 3H, CH_3CO); 1.17 (m, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

213.0 (C_q , 1C, C-2- CO); 171.8; 171.6, 171.1, 170.2, 170.1, 169.8 (C_q , 8C, CO); 160.4, 160.4 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tmp)); 159.2, 159.2, (C_q , 2C, C_{Ar} (Tmp)); 156.0 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 150.5,

150.5, 150.3 (C_q , 2C, C_{Ar} (Ph)); 130.8 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 129.9 (C_t , 4C, C_{Ar} (Ph)); 127.0 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 125.6, 125.5 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 120.3, 120.3, 120.2, 120.2, 120.2 (C_t , 4C, C_{Ar} (Ph)); 115.5 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 105.0 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tmp)); 95.4, 95.3 (C_q , 1C, C-2); 90.6, 90.3 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tmp)); 84.7, 84.4 (C_t , 1C, C-3); 68.7, 68.5, 68.3 (C_s , 2C, C-5, C-2- \underline{CH}_2); 58.7, 58.3, 58.1 (C_t , 5C, C-2(Pro)); 55.7 (C_p , 2C, 2 x C_{Ar} -O \underline{CH}_3); 55.4 (C_p , 1C, C_{Ar} -O \underline{CH}_3); 52.6, 52.1 (C_t , 2C, $\underline{CH}(\underline{CH}_2C_{Ar}(\text{Tmp}))$, $\underline{CH}(\underline{CH}_2C_{Ar}(\text{Tyr}))$); 47.6, 47.3, 47.1, 46.9 (C_s , 5C, C-5 (Pro)); 45.4, 45.4 (C_q , 1C, $\underline{C}(\underline{CH}_3)_3$); 37.4 (C_s , 1C, $\underline{CH}(\underline{CH}_2C_{Ar}(\text{Tyr}))$); 33.4 (C_s , 1C, C-4); 28.4, 28.2, 28.1 (C_s , 5C, C-3 (Pro)); 25.9, 25.9 (C_p , 3C, $\underline{C}(\underline{CH}_3)_3$); 25.1, 24.9, 24.7, 24.5 (C_s , 6C, $\underline{CH}(\underline{CH}_2C_{Ar}(\text{Tmp}))$, C-4 (Pro)); 23.2 (C_p , 1C, $\underline{CH}_3\text{CO}$).

^{31}P -NMR (162.0 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

-13.47 (O \underline{P} O(O \underline{P} h) $_2$).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$):

3301; 2958; 1748; 1614; 1516; 1488; 1455; 1277; 1189.

UV/VIS (Acetonitril)

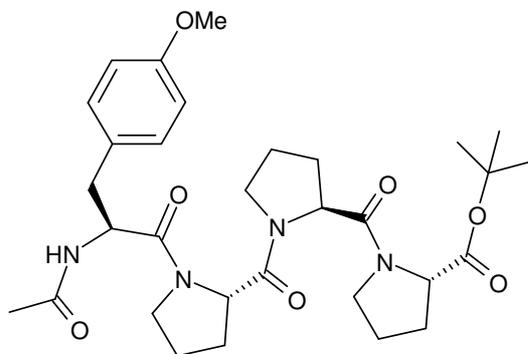
308 nm ($\epsilon = 38 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

MS (ESI, MeOH, m/z):

1384.6 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100); 1401.5 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, 6).

6.10 Synthese von Oligopeptid-Modellsystemen mit 2,4,6-Trimethoxyphenylalanin als intermediärem- und Tyrosin(*O*-methyl) als finalem Elektronendonor

N-Acetyl-tyrosinyl-(*O*-methyl)-prolinyl-prolinyl-prolin-*tert.*-butylester (**126**)

**126**

147 mg (0.366 mmol) Prolin-prolinyl-prolinyl-*tert.*-butylester-hydrochlorid wurden gemäß **AAV1** zusammen mit 77 mg (0.402 mmol) EDC, 60 mg (0.439 mmol) HOBt sowie 51 μ l (37 mg, 0.366 mmol) Triethylamin mit 108 mg (0.366 mmol) *N-tert.*-Butyloxycarbonyl-tyrosin-(*O*-methyl) umgesetzt. Das erhaltene Tetrapeptid wurde nach der Aufarbeitung analog **AAV5** in

1 ml einer 4 M Lösung HCl in 1,4-Dioxan zur Reaktion gebracht. Das so zugängliche Hydrochlorid wurde in 2 ml Dichlormethan suspendiert und mit 210 μ l (227 mg, 2.21 mmol) Essigsäureanhydrid und 310 μ l (225 mg, 2.22 mmol) Triethylamin versetzt. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wurden die flüchtigen Bestandteile des Reaktionsgemisches unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand an Uetikon Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol = 97:3 chromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 107 mg (0.183 mmol, 50% über drei Stufen) **126** als farbloser Feststoff.

$C_{31}H_{44}N_4O_7 \cdot 3/2 H_2O$; (584.70)

ber.: C 60.87, H 7.74, N 9.16, O 22.23;

gef.: C 60.81, H 7.78, N 8.89, O 22.23.

R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0.61.

Smp: 105°C.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

7.12 (d, $J = 8.7$, 2H, H_{Ar}); 6.83, 6.76 (2 x d, $J = 8.7, 8.7$, 2H, H_{Ar}); 6.47, 6.22 (2 x d, $J = 7.8, 7.8$, 1H, NH); 4.93, 4.74, 4.67, 4.60, 4.45, 4.38 (6 x m, 4H, $CH(CH_2C_{Ar})$, H-2(Pro)); 3.74 (s, 3H, $C_{Ar}-OCH_3$); 3.74-3.30 (m, 6H, H-5 (Pro)); 3.10, 2.96 (2 x dd, $J = 14.4, 5.1$; 12.9, 4.1, 1H, $CH(CH_aH_bC_{Ar})$); 2.82 (dd, $J = 14.4, 6.8$, 1H, $CH(CH_aH_bC_{Ar})$); 2.25-1.90 (m, 12H, H-3 (Pro), H-4 (Pro)); 1.88 (s, 3H, CH_3CO); 1.41, 1.39 (2 x s, 9H, $C(CH_3)_3$).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , δ/ppm):

170.1, 170.0, 169.9, 169.6, 169.3, 169.0 (C_q , 5C, $\underline{\text{CO}}$); 158.8, 158.5 (C_q , 1C, C_{Ar}); 130.9, 130.5 (C_t , 2C, C_{Ar}); 129.1, 128.2 (C_q , 1C, C_{Ar}); 113.7 (C_t , 2C, C_{Ar}); 81.2 (C_q , 1C, $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$); 59.5, 59.4, 58.1, 58.0, 57.9 (C_t , 3C, C-2 (Pro)); 55.5, 55.2 (C_p , 1C, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-CH}_3$); 51.7 (C_t , 1C, $\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}})$); 47.5, 47.1, 46.9, 46.8, 46.6 (C_s , 3C, C-5 (Pro)); 40.0, 36.7 (C_s , 1C, $\underline{\text{C}}\text{H}(\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{C}_{\text{Ar}})$); 28.9, 28.4, 28.1 (C_s , 3C, C-3 (Pro)); 28.1, 28.1, 28.0 (C_p , 3C, $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 25.1, 25.0, 24.8, 24.7 (C_s , 3C, C-4 (Pro)); 23.2, 22.4 (C_p , 1C, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$):

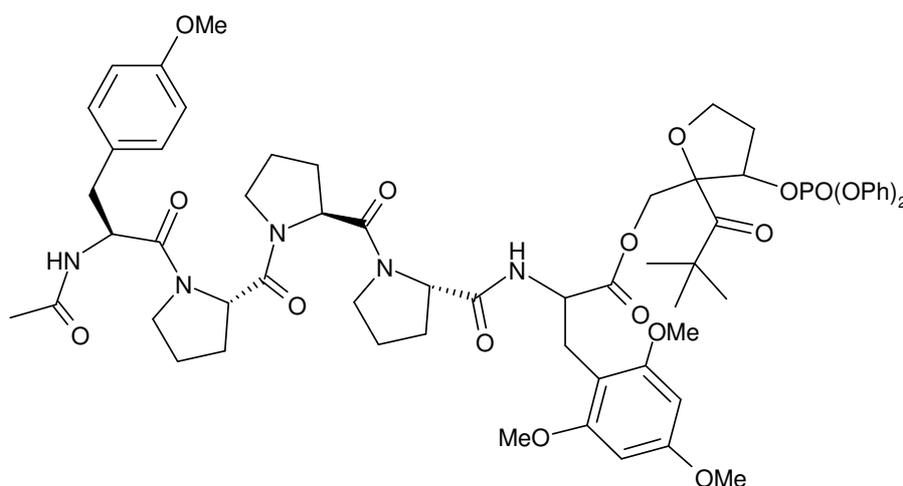
3500; 3055; 2976; 1738; 1644; 1455; 1325; 1205; 1151.

MS (ESI, MeOH, m/z):

607.2 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100); 1191.0 ($[\text{2M}+\text{Na}]^+$, 16).

***N*-Acetyl-tyrosinyl-(*O*-methyl)-prolinyl-prolinyl-prolinyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxy-phenylalanin-[(2*R*,3*S*)-2-*tert.*-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester;**

***N*-Acetyl-tyrosinyl-(*O*-methyl)-prolinyl-prolinyl-prolinyl-(*rac*)-2,4,6-trimethoxy-phenylalanin-[(2*S*,3*R*)-2-*tert.*-butylcarbonyl-3-diphenoxyphosphoryloxy-tetrahydrofuran-2-yl]-methylester (120)**



120

102 mg (0.157 mmol) des *tert.*-Butylester-geschützten Tetrapeptids **126** wurde nach **AAV2** mit 2 ml Trifluoressigsäure und 2 ml Dichlormethan in die freie Säure **119** umgewandelt. Die Behandlung von 121 mg

(0.157 mmol) des *tert.*-Butyloxycarbonyl-geschützten Aminosäurederivats **91** analog **AAV5** mit 2 ml einer 4 M HCl-Lösung in 1,4-Dioxan lieferte quantitativ das Hydrochlorid des

Amins **92**. Die Carbonsäure und das Hydrochlorid wurden gemäß **AAV1** mit 37 mg (0.249 mmol) EDC, 29 mg (0.271 mmol) HOBt und 22 μ l (16 mg, 0.226 mmol) Triethylamin in 2 ml DMF (abs.) kondensiert. Nach der Aufarbeitung konnte das Rohprodukt durch präparative Dünnschichtchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 93:7) sowie durch Säulenchromatographie mit Dichlormethan/Methanol = 97:3 \rightarrow 96:4 als Laufmittel an Merck Kieselgel gereinigt werden.

Ausbeute: 93 mg (0.079 mmol, 45% über zwei Stufen) **120** als farbloser Feststoff.

$C_{61}H_{76}N_5O_{17}P \cdot 2 H_2O$;

ber.: C 60.14, H 6.62, N 5.75, O 24.95;

gef.: C 60.03, H 6.59, N 5.68, O 24.90.

R_f (Dichlormethan/Methanol 9:1) = 0.64.

Smp: 95°C.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

7.44 (t, $J = 8.3$, 1H, NH); 7.32 (m, 4H, H_{Ar} (Ph)); 7.19 (m, 8H, H_{Ar} (Ph), H_{Ar} (Tyr)); 6.84, 6.77 (2 x m, 2H, H_{Ar} (Tyr)); 6.16 (m, 1H, NH); 6.06 (m, 2H, H_{Ar} (Tmp)); 5.18 (m, 1H, H-3); 4.94, 4.69, 4.55, 4.48 (4 x m, 5H, CH(CH_2C_{Ar} (Tyr)), CH(CH_2C_{Ar} (Tmp)), H-2(Pro)), 4.11 (m, 4H, H-5, C-2-CH₂); 3.78 (m, 12H, 4 x C_{Ar} -OCH₃); 3.78-3.30 (m, 6H, H-5 (Pro)); 2.98 (m, 4H, CH(CH_2C_{Ar} (Tyr)), CH(CH_2C_{Ar} (Tmp))); 2.40-1.60 (m, 14H, H-4, H-3 (Pro), H-4 (Pro)); 1.89 (m, 3H, CH₃CO); 1.16 (m, 9H, C(CH₃)₃).

^{13}C -NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$, δ /ppm):

213.3, 213.1 (C_q , 1C, C-2-CO); 172.2, 172.1, 172.0, 171.9, 171.7, 171.3, 170.3, 170, 3, 169.9 (C_q , 6C, CO); 160.7, 160.7 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tmp)); 159.6, 159.5, 159.5 (C_q , 2C, C_{Ar} (Tmp)); 158.8 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 150.7, 150.6 (C_q , 2C, C_{Ar} (Ph)); 131.2 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 130.2, 130.2 (C_t , 4C, C_{Ar} (Ph)); 128.4 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tyr)); 125.9, 125.8 (C_t , 2C, C_{Ar} (Ph)); 120.6, 120.6, 120.5, 120.5, 120.4 (C_t , 4C, C_{Ar} (Ph)); 114.2, 114.0 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tyr)); 105.3, 105.0 (C_q , 1C, C_{Ar} (Tmp)); 95.8, 95.7, 95.6, 95.5 (C_q , 1C, C-2); 90.9, 90.7, 90.6, 90.6 (C_t , 2C, C_{Ar} (Tmp)); 85.1, 85.0, 84.6 (C_t , 1C, C-3); 68.8 (C_s , 2C, C-5, C-2-CH₂); 59.2, 58.4, 58.4 (C_t , 3C, C-2(Pro)); 56.1, 56.0, 55.9 (C_p , 2C, 2 x C_{Ar} -OCH₃); 55.7 (C_p , 1C, C_{Ar} -OCH₃); 55.5 (C_p , 1C, C_{Ar} -OCH₃); 52.9, 52.0 (C_t , 2C, CH(CH_2C_{Ar} (Tmp)), CH(CH_2C_{Ar} (Tyr))); 47.8, 47.4 (C_s , 3C, C-5 (Pro)); 45.7, 45.7 (C_q , 1C, C(CH_3)₃); 37.1 (C_s , 1C, CH(CH_2C_{Ar} (Tyr))); 33.7 (C_s , 1C, C-4);

28.7, 28.6 (C_s, 3C, C-3 (Pro)); 26.2, 26.1 (C_p, 3C, C(CH₃)₃); 25.5, 25.4, 25.1, 25.0 (C_s, 4C, CH(CH₂C_{Ar}(Tmp), C-4 (Pro)); 23.6 (C_p, 1C, CH₃CO).

³¹P-NMR (162.0 MHz, CDCl₃, δ/ppm):

-13.46 (OPO(OPh)₂).

IR (NaCl, $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹):

3306; 2957; 1748; 1644; 1514; 1455; 1189; 1024; 956.

UV/VIS (Acetonitril)

308 nm ($\epsilon = 38 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

MS (ESI, MeOH, m/z):

1204.5 ([M+Na]⁺, 100); 1221.5 ([M+K]⁺, 5).

7. Literaturverzeichnis

- [1] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, **1994**.
- [2] N. Krauß, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 540.
- [3] J. R. Winkler, A. J. Di Bilio, N. A. Farrow, J. H. Richards, H. B. Gray, *Pure Appl. Chem.* **1999**, 71, 1753.
- [4] J. Stubbe, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 183.
- [5] H. B. Gray, J. R. Winkler, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, 65, 537.
- [6] C. C. Page, C. C. Moser, X. Chen, P. L. Dutton, *Nature* **1999**, 402, 47.
- [7] U. Uhlin, H. Eklund, *Nature* **1994**, 370, 533.
- [8] R. J. P. Williams, *Bioinorg. Chem.* **1997**, 2, 373.
- [9] V. Balzani, *Electron Transfer in Chemistry, Vol. 3*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2001**.
- [10] S. S. Isied, M. Y. Ogawa, J. F. Wishart, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 381.
- [11] G. Jones II, X. Zhou, V. I. Vullev, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, 2, 1080.
- [12] M. R. DeFelippis, M. Faraggi, M. H. Klapper, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 119, 5640.
- [13] S. Williams, T. P. Causgrove, R. Gilmanishin, K. S. Fang, R. H. Callender, W. H. Woodruff, R. B. Dyer, *Biochemistry* **1996**, 35, 691.
- [14] R. A. Marcus, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 1111.
- [15] R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 811, 265.
- [16] V. G. Levich, *Adv. Electrochem. Electrochem. Eng.* **1966**, 4, 249.
- [17] D. G. Nocera, J. R. Winkler, K. M. Yocom, E. Bordignon, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 5145.
- [18] J. R. Winkler, D. G. Nocera, K. M. Yocom, E. Bordignon, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 5798.
- [19] J. R. Winkler, H. B. Gray, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 369.
- [20] G. A. Mines, M. J. Bjerrum, M. G. Hill, D. R. Casimiro, I.-J. Chang, J. R. Winkler, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 1961.
- [21] J. L. Karas, C. M. Lieber, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 599.
- [22] A. W. Axup, M. Albin, S. L. Mayo, R. J. Crutchley, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 435.
- [23] J. A. Cowan, R. K. Upmacis, D. N. Beratan, J. N. Onuchic, H. B. Gray, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1989**, 550, 68.
- [24] B. A. Jacobs, M. R. Mauk, W. D. Funk, R. T. MacGillivray, A. G. Mauk, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4390.

- [25] A. J. Di Bilio, M. G. Hill, B. G. Bonander, R. M. Karlsson, R. M. Villahermosa, B. G. Malmström, J. R. Winkler, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9921.
- [26] L. K. Skov, T. Pascher, J. R. Winkler, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1102.
- [27] J. J. Regan, A. J. Di Bilio, R. Langen, L. K. Skov, J. R. Winkler, H. B. Gray, J. N. Onuchic, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 489.
- [28] R. Langen, I.-J. Chang, J. H. Germanas, J. H. Richards, J. R. Winkler, H. B. Gray, *Science* **1995**, *268*, 1733.
- [29] O. Farver, I. Pecht, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86*, 6968.
- [30] M. P. Jackman, J. McGinnis, R. Pows, G. A. Salmon, A. G. Sykes, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5880.
- [31] B. Durham, M. Fairris, M. McLean, F. Millett, J. R. Scott, S. G. Sligar, A. Willie, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1995**, *27*, 331.
- [32] F. Millett, M. A. Miller, L. Geren, B. Durham, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1995**, *27*, 341.
- [33] F. A. Tezcan, B. R. Crane, J. R. Winkler, H. B. Gray, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 5002.
- [34] L. P. Pan, S. Hibdon, R.-Q. Liu, B. Durham, F. Millett, *Biochemistry* **1993**, *32*, 8492.
- [35] B. Durham, F. Millett, *J. Chem. Educ.* **1997**, *74*, 636.
- [36] M. R. Gunner, P. L. Dutton, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3400.
- [37] E. Babini, I. Bertini, M. Borsari, F. Capozzi, C. Luchinat, X. Zhang, G. L. C. Moura, I. V. Kurnikova, D. N. Beratan, A. Ponce, A. J. Di Bilio, J. R. Winkler, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4532.
- [38] C. C. Moser, J. M. Keske, K. Warncke, R. S. Farid, P. L. Dutton, *Nature* **1992**, *355*, 796.
- [39] J. N. Onuchic, D. N. Beratan, J. R. Winkler, H. B. Gray, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, *21*, 349.
- [40] H. M. McConnell, *J. Chem. Phys.* **1961**, *35*, 508.
- [41] D. N. Beratan, J. N. Onuchic, J. R. Winkler, H. B. Gray, *Science* **1992**, *258*, 1740.
- [42] J. N. Onuchic, D. N. Beratan, J. R. Winkler, H. B. Gray, *Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, *21*, 3640.
- [43] J. R. Winkler, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 192.
- [44] C. C. Page, C. C. Moser, P. L. Dutton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 551.
- [45] P. Siddarth, R. A. Marcus, *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 2985.
- [46] B. Giese, J. Amaudrut, A.-K. Köhler, M. Spormann, S. Wessely, *Nature* **2001**, *412*, 318.

- [47] B. Giese, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 51.
- [48] B. Giese, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 612.
- [49] B. Giese, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 631.
- [50] F. D. Lewis, R. L. Letsinger, M. R. Wasielewski, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 159.
- [51] M. E. Nunez, J. K. Barton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 199.
- [52] E. M. Boon, J. K. Barton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 320.
- [53] C. R. Treadway, M. G. Hill, J. K. Barton, *Chem. Phys.* **2002**, *281*, 409.
- [54] D. B. Hall, R. E. Holmlin, J. K. Barton, *Science* **1999**, *283*, 375.
- [55] B. Giese, E. Meggers, S. Wessely, M. Spormann, A. Biland, *Chimia* **2000**, *54*, 547.
- [56] M. Bixon, B. Giese, S. Wessely, T. Langenbacher, M. E. Michel-Beyerle, J. Jortner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 11713.
- [57] E. Meggers, M. E. Michel-Beyerle, B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12950.
- [58] M. Bixon, J. Jortner, *J. Chem. Phys.* **2002**, *281*, 393.
- [59] M. Bixon, J. Jortner, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12556.
- [60] B. Giese, M. Spichthy, *Chem. Phys. Chem.* **2000**, *1*, 195.
- [61] H. Eklund, U. Uhlin, M. Farnegardh, D. T. Logan, P. Nordlund, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2001**, *77*, 177.
- [62] A. Jordan, P. Reichard, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 71.
- [63] J. Stubbe, D. G. Nocera, C. S. Yee, M. C. Y. Chang, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2167.
- [64] C. Aubert, M. H. Vos, P. Mathis, A. P. M. Eker, K. Brettel, *Nature* **2000**, *405*, 586.
- [65] T. Carell, L. T. Burgdorf, L. M. Kundu, M. Chichon, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 491.
- [66] A. Sancar, *Science* **1996**, *272*, 48.
- [67] C. Aubert, P. Mathis, A. P. M. Eker, K. Brettel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *121*, 8659.
- [68] J. E. Miller, A. J. Di Bilio, W. A. Wehbi, M. T. Green, A. K. Museth, J. R. Richards, J. R. Winkler, H. B. Gray, *Biochim. Biophys. Acta.* **2004**, *1655*, 59.
- [69] M. Rothe, M. Rotte, *Angew. Chem.* **1976**, *88*, 844.
- [70] H. C. Chiu, R. Bersohn, *Biopolymers* **1977**, *16*, 277.
- [71] B. J. Stapley, T. Creamer, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 587.
- [72] S. S. Isied, A. Vassilian, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1732.
- [73] S. S. Isied, A. Vassilian, R. H. Magnuson, H. A. Schwarz, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7432.

- [74] S. S. Isied, I. Moreira, M. Y. Ogawa, A. Vassilian, B. Arbo, J. Sun, *J. Photochem. Photobiol. A* **1994**, *82*, 203.
- [75] M. Y. Ogawa, J. F. Wishart, Z. Young, J. R. Miller, S. S. Isied, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 11456.
- [76] Y. K. Shin, M. D. Newton, S. S. Isied, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3722.
- [77] E. G. Petrov, V. May, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 10176.
- [78] K. Bernhard, J. Geimer, M. Canle-Lopez, J. Reynisson, D. Beckert, R. Gleiter, S. Steenken, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 4640.
- [79] A. Harriman, *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 6102.
- [80] M. Faraggi, M. R. DeFelippis, M. H. Klapper, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5141.
- [81] A. K. Mishra, R. Chandrasekar, M. Faraggi, M. H. Klapper, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1414.
- [82] H. Lee, M. Faraggi, M. H. Klapper, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1159*, 286.
- [83] M. L. Jones, I. V. Kurnikov, D. N. Beratan, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 2002.
- [84] M. Y. Chang, S. E. Miller, S. D. Carpenter, J. Stubbe, D. G. Nocera, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6820.
- [85] A. Gugger, R. Batra, P. Rzadek, G. Rist, B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8740.
- [86] R. Glatthar, M. Spichty, A. Gugger, R. Batra, W. Damm, M. Mohr, H. Zipse, B. Giese, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 4117.
- [87] E. Meggers, A. Dussy, T. Schäfer, B. Giese, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 485.
- [88] R. W. Sloper, E. J. Land, *Photochem. Photobiol.* **1980**, *32*, 687.
- [89] B. Giese, X. Beyrich-Graf, J. Burger, C. Kesselheim, M. Senn, T. Schäfer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1742.
- [90] B. Giese, A. Dussy, E. Meggers, M. Petretta, U. Schwitter, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11130.
- [91] W. K. Pogozelski, T. D. Tullius, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1089.
- [92] D. Schulte-Frohlinde, *Radioprotectors and Anticarcinogens*, Academic Press, New York, **1986**.
- [93] C. von Sonntag, *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor & Francis, London, **1987**.
- [94] C. E. Burchill, K. M. Perron, *Can. J. Chem.* **1971**, *49*, 2382.
- [95] C. von Sonntag, E. Z. Thomas, *Naturforsch. B* **1970**, *25*, 1405.
- [96] B. Giese, J. Burger, T. W. Kang, C. Kesselheim, T. Schäfer, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7322.

- [97] B. Giese, P. Erdmann, L. Giraud, T. Göbel, M. Petretta, T. Schäfer, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2683.
- [98] B. Giese, A. Dussy, C. Elie, P. Erdmann, U. Schwitter, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1861.
- [99] B. Giese, X. Beyrich-Graf, P. Erdmann, M. Petretta, U. Schwitter, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 367.
- [100] B. Giese, X. Beyrich-Graf, P. Erdmann, L. Giraud, P. Imwinkelried, S. N. Müller, U. Schwitter, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6146.
- [101] S. Peukert, B. Giese, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4365.
- [102] S. Peukert, R. Batra, B. Giese, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3507.
- [103] A. Gugger, *Dissertation*, Universität Basel, **2000**.
- [104] F. A. Carey, R. J. Sundberg, *Organische Chemie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, **1995**.
- [105] N. C. Yang, E. D. Feit, M. H. Hui, N. J. Turro, J. C. Dalton, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6974.
- [106] N. C. Yang, E. D. Feit, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 504.
- [107] W. A. J. Noye, G. B. Porter, J. E. Jolley, *Chem. Rev.* **1956**, *56*, 49.
- [108] M. Regitz, B. Giese, *Houben-Weyl: Methoden der Organischen Chemie, E19a*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1989**.
- [109] T. A. Mastryukova, T. A. Melent'eva, A. E. Shipov, M. Kabachnik, *Obshch. Khim.* **1959**, *29*, 2178.
- [110] J. Stubbe, W. A. van der Donk, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 705.
- [111] S. Navaratnam, B. J. Parson, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1998**, *94*, 2577.
- [112] G. G. Hammes, *Techniques of chemistry, Vol. VI*, John Wiley & Sons, New York, **1974**.
- [113] D. Dauzonne, R. Royer, *Synthesis* **1987**, 399.
- [114] K. Yamamura, S. Watarai, T. Kinugasa, *B. Chem. Soc. Jpn.* **1971**, *44*, 2440.
- [115] A. Torrado, B. Imperiali, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8940.
- [116] T. Miyazawa, H. Iwanaga, T. Yamada, S. Kuwata, *Biotechnol. Lett.* **1994**, *16*, 373.
- [117] T. Miyazawa, *Amino Acids* **1999**, *16*, 191.
- [118] S. Ram, R. E. Ehrenkauffer, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 3415.
- [119] N. Ichinose, T. Tanaka, S. Kawanishi, T. Suzuki, K. Endo, *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 7923.
- [120] T. A. Gadosy, D. Shukla, L. J. Johnston, *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 8834.

- [121] K. M. Bansal, R. W. Fessenden, *Radiat. Res.* **1976**, 67, 1.
- [122] D. V. Bent, E. Hayon, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 2612.
- [123] B. J. Parson, S. Navaratnam, Z. Zhao, L. Chen, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1994**, 90, 2467.
- [124] P. O'Neill, S. Steenken, D. Schulte-Frohlinde, *J. Phys. Chem.* **1975**, 79, 2773.
- [125] Y. Yagci, W. Schnabel, A. Wilpert, J. Bendig, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1994**, 90, 287.
- [126] Y. P. Tsentalovich, O. A. Snytnikova, R. Z. Sagdeen, *Photochem. Photobiol. A.* **2004**, 162, 371.
- [127] D. Creed, *Photochem. Photobiol.* **1984**, 39, 563.
- [128] A. Zweig, W. G. Hodgson, W. H. Jura, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 4124.
- [129] E. Taxil, L. Bagnol, J. H. Horner, M. Newcomb, *Org. Lett.* **2003**, 5, 827.
- [130] L. Bagnol, J. H. Horner, M. Newcomb, *Org. Lett.* **2003**, 5, 5055.
- [131] M. Newcomb, N. Miranda, X. Huang, D. Crich, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 6128.
- [132] J. H. Horner, E. Taxil, M. Newcomb, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 5402.
- [133] A. Dussy, E. Meggers, B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7399.
- [134] S. L. Murov, I. Carmichael, G. L. Hug, *Handbook of Photochemistry*, Marcel Dekker Inc., New York, **1984**.
- [135] L. Gossi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 68, 6349.
- [136] M. Audett, Y. Blouquit, C. Houee-Levin, *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, 376, 217.
- [137] H. Eickhoff, G. Jung, A. Rieker, *Tetrahedron* **2001**, 57, 353.
- [138] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, 103, 788.
- [139] J. C. Sheehan, S. L. Ledis, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 875.
- [140] F. Huang, W. M. Nau, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 2371.
- [141] C. Tommos, G. T. Babcock, *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 18.
- [142] J. W. Whittaker, *Methods Enzymol.* **1995**, 258, 262.
- [143] C. Grathwohl, K. Wüthrich, *Biopolymers* **1976**, 15, 2025.
- [144] C. Carra, N. Iordanova, S. Hammes-Schiffer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 10429.
- [145] M. Sjödin, S. Styring, B. Akermark, L. Sun, L. Hammarström, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **2002**, 357, 1471.
- [146] M. Sjödin, S. Styring, B. Akermark, L. Sun, L. Hammarström, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 3932.
- [147] G. Wedler, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **1997**.

- [148] M. R. DeFilippis, C. P. Murthy, F. Broitman, D. Weinraub, M. Faraggi, M. H. Klapper, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 3416.
- [149] D. N. Beratan, J. N. Betts, J. N. Onuchic, *Science* **1991**, *252*, 1285.
- [150] D. R. Casimiro, L. L. Wong, J. L. Colon, T. E. Zewert, J. H. Richard, I.-J. Chang, J. R. Winkler, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1485.
- [151] D. S. Wuttke, M. J. Bjerrum, J. R. Winkler, C. Grathwohl, *Science* **1992**, *256*, 1007.
- [152] S. Antonello, F. Formaggio, A. Moretto, C. Toniolo, F. Maran, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2874.
- [153] T. Kiefhaber, *persönliche Mitteilung*.
- [154] M. W. MacArthur, J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 397.
- [155] S. F. Sneddon, C. L. Brooks III, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8220.
- [156] K. Bobrowski, J. Poznanski, J. Holcman, K. L. Wierzchowski, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 10316.
- [157] R. R. Hudgins, F. Huang, G. Gramlich, W. M. Nau, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 556.
- [158] W. M. Nau, F. Huang, W. Xiaojuan, H. Bakirici, G. Gramlich, C. Marquez, *Chimia* **2003**, *57*, 161.
- [159] F. Huang, W. M. Nau, *unveröffentlichte Resultate*.
- [160] A. Magnuson, Y. Frapart, M. Abrahamsson, O. Horner, B. Akermark, L. Sun, J.-J. Girerd, L. Hammarström, S. Styring, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 89.
- [161] K. B. Wiberg, *Chem. Rev.* **1955**, *55*, 713.
- [162] M. R. Ganapathi, S. Naumov, R. Hermann, O. Brede, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *337*, 335.
- [163] G. Trojandt, U. Herr, K. Polborn, W. Steglich, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1254.
- [164] D. D. Perin, W. L. F. Armstrong, *Purification of laboratory chemicals*, Pergamon Press, Oxford, **1988**.
- [165] D. B. Bryan, R. F. Hall, K. G. Holden, W. F. Huffman, J. G. Gleason, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2353.
- [166] C. H. Heathcock, R. Ratcliffe, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 1746.
- [167] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1978**, *17*, 522.
- [168] G. Han, M. Tamaki, V. Hruby, *J. Pept. Res.* **2001**, *58*, 338.
- [169] C. J. Gray, A. M. Khoujah, *Tetrahedron Lett.* **1969**, 2647.

8. Anhang

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

δ	chemische Verschiebung [ppm] bei NMR-Daten
λ	Wellenlänge
A	dekadisches Absorptionsvermögen
abs.	absolut
Ac	Acetyl
Ar	aromatisch
ATP	Adenosin-Triphosphat
ber.	berechnet
br	breit
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
CIDNP	chemically induced dynamic nuclear polarization
DEPT	distortionless enhancement by polarisation transfer
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMTr	4,4'-Dimethoxy-triphenylmethyl
ϵ	molarer dekadischer Absorptionskoeffizient
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethyl-carbodiimid-hydrochlorid
ESI MS	electrospray ionization mass spectroscopy
ESR	Elektronenspinresonanz
Essigester	Essigsäureethylester
Et	Ethyl
eV	Elektronenvolt
FAB MS	fast atom bombardment mass spectroscopy
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
h	Stunde(n), Plancksche-Konstante
h ν	Licht
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Hz	Hertz
IR	Infrarot
ISC	intersystem crossing
k_B	Boltzmann-Konstante
M	Molarität
Me	Methyl
min	Minute(n)
NCS	<i>N</i> -Chlorsuccinimid
NHE	Normal-Wasserstoffelektrode
NMI	1-Methyl-imidazol
NMR	Kernmagnetische Resonanz
NOESY	nuclear Overhauser effect spectroscopy
Ph	Phenyl
ppm	parts per million
Pro	Prolin
R	Gaskonstante
<i>rac</i>	racemisch
RaNi	W-2 Raney-Nickel
R_f	Retentionsfaktor
S	Singulett
Smp	Schmelzpunkt
T	Triplett
TBDMS	<i>tert.</i> -Butyldimethylsilyl
TFA	Trifluoressigsäure
Tmp	2,4,6-Trimethoxyphenylalanin
TMB	Trimethoxybenzol
Tyr	Tyrosin
TsOH	Toluol-4-sulfonsäure
UV	Ultraviolett
V	Volt

Dipl.-Chem. Matthias Napp

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die Dissertation selbständig nur mit der darin angegebenen Hilfe verfasst und bei keiner anderen Fakultät eingereicht habe.

Basel, den 16. November 2004

(Matthias Napp)

Lebenslauf

Matthias Napp

geb. am 9. Juli 1974 in Stuttgart, Deutschland

Schulbildung

08.1981 – 07.1985 Grundschule Hochfeldschule, Ludwigshafen
08.1985 – 06.1994 Heinrich-Böll-Gymnasium, Ludwigshafen
06.1994 Abitur

Wehrdienst

07.1994 – 06.1995 Wehrdienst im III./LwAusbRgt 3, Germersheim

Studium

08.1995 – 08.2000 Studium der Chemie an der Universität Karlsruhe, Deutschland
10.1997 Vordiplom
02.2000 – 08.2000 Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität
Karlsruhe im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. Albrecht: Aminosäure-
verbrückte Brenzkatechinderivate und deren zweikernige
Metallkomplexe
08.2000 Diplom

Promotion

11.2000 – 11.2004 Doktorarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität
Basel, Schweiz, im Arbeitskreis von Prof. Dr. B. Giese:
Elektronentransfer durch Oligopeptide: Synthese und kinetische
Untersuchung von Polyprolin-Modellsystemen

An meiner Universitätsausbildung waren folgende Dozenten beteiligt:

Universität Karlsruhe: R. Ahlrichs, M. Albrecht, H. Bärnighausen, U. Brinkschulte,
W. de Boer, D. Fenske, W. Freyland, A. Giannis, M. Kappes, P. Krebs, H.-J. Knölker,
J. Rétey, H. Schnöckel, U. Schober, G. Schröder, H. Hippler, O. Seitz, H. Waldmann

Universität Basel: B. Giese, J. Wirz

Basel, den 16. November 2004