universität wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Arbeiten zur Synthese potentiell bioaktiver Verbindungen: Wege zur Herstellung ^{13}C-Lysin und Ornithin“

Verfasserin

Svitlana Vogl

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 066 862
Studienrichtung lt. Studienblatt:	Masterstudium Chemie
Betreuer:	Univ.-Prof. Mag. Dr. Walther Schmid

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung meiner Masterarbeit direkt oder moralisch unterstützt haben.

An erste Stelle bedanke ich mich bei meinen Ehemann Christian, der es mir durch seine Unterstützung ermöglicht hat, mich voll auf mein Studium zu konzentrieren und bis zur Masterarbeit voranzutreiben. Einen besonderen und tiefen Dank für die Geduld und das in mich gesetzte Vertrauen.

Ein herzliches Dankeschön geht an Prof. Walther Schmid, für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Betreuung meiner Masterarbeit und seine fachliche Unterstützung.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer Roman Lichtenecker für die praktische Beratung, die vielen wertvollen Hinweise und Tipps, und den immer freundlichen Umgang.

Danke an meine weiteren Arbeitskollegen T. Nowikow, F. Cappa, M. Fischer, C. Schmölzer, C. Albler und G. Benesch für das gute Arbeitsklima und die praktischen Ratschläge.

Außerdem möchte ich mich bei der NMR- und Massenspektroskopie Abteilung für die Aufnahme zahlreicher Spektren bedanken, im Besonderen bei Prof. H. Kählig für die Interpretation von komplexen Spektren.

Nicht zuletzt schicke ich ein Dankeschön an meine Eltern in die Ukraine, die mir geografisch zwar weit entfernt, aber moralisch umso näher zur Seite standen.

Zum Schluss möchte ich mich bei allen meinen Freundinnen und Freunden bedanken, die mir während der Entstehung dieser Arbeit mit ihrem Optimismus über manchen Selbstzweifel hinweghalfen.

Inhalt

1 Einleitung 1

1.1 Verwendung von isotopenmarkierten Aminosäuren 2

1.2 Biosynthese von Lysin in *Escherichia coli* 3

1.3 Biologische Funktion von Lysin 5

1.4 Verwendung und Synthese von isotopenmarkiertem Lysin 7

1.5 Biosynthese, Vorkommen und Bedeutung von Ornithin 12

2 Theoretischer Hintergrund 17

2.1 Schlüsselschritte aus eigener Synthese 17

2.1.1 Claisen-Johnson Umlagerung 17

2.1.2 Reduktion der Azide zu Aminen 21

3 Eigene Experimente 25

3.1 Zielsetzung 25

3.2 Beschreibung der durchgeführten Synthesen 26

4 Experimenteller Teil 35

4.1 Allgemeine Methoden 35

4.2 Durchgeführte Reaktionen 36

4.2.1 tert-Butylbromacetat (1) 36

4.2.2 tert-Butyl-2-(diethylphosphono)acetat (2) 38

4.2.3 tert-Butyl-2-(hydroxymethyl)acrylat (3) 39

4.2.4 1-tert-Butyl-5-methyl-2-methylenpentandioat (4) 41

4.2.5 tert-Butyl-5-hydroxy-2-methylenpentanoat (5) 43

4.2.6 tert-Butyl-2-hydroxytetrahydrofuran-2-carboxylat (7) 45

4.2.7 tert-Butyl-2-methylen-5-[(methylsulfonyl)oxy]pentanoat (8) 46

4.2.8 tert-Butyl-2-methylen-5-[((methylphenyl)sulfonyl)oxy]pentanoat (9) 48

4.2.9 tert-Butyl-5-[((methylphenyl)sulfonyl)oxy]-2-oxopentanoat (9.1) 49

4.2.10 tert-Butyl-5-[(methylsulfonyl)oxy]-2-oxopentanoat (10) 51

4.2.11 tert-Butyl-2-cyanotetrahydrofuran-2-carboxylat (13) 52

4.2.12 tert-Butyl-5-azido-2-oxopentanoat (14) 53

4.2.13 tert-Butyl-5-azido-2-(2,2-dimethylhydrazono)pentanoat (15) 54

4.2.14 5-Azido-2-oxopentansäure (17) 56

4.2.15 Ammonium-2-amino-5-azidopentanoat (18) 57

4.2.16 Ammonium-2,5-diaminopentanoat (19) 59

5 Zusammenfassung 61

6 Abkürzungsverzeichnis 63

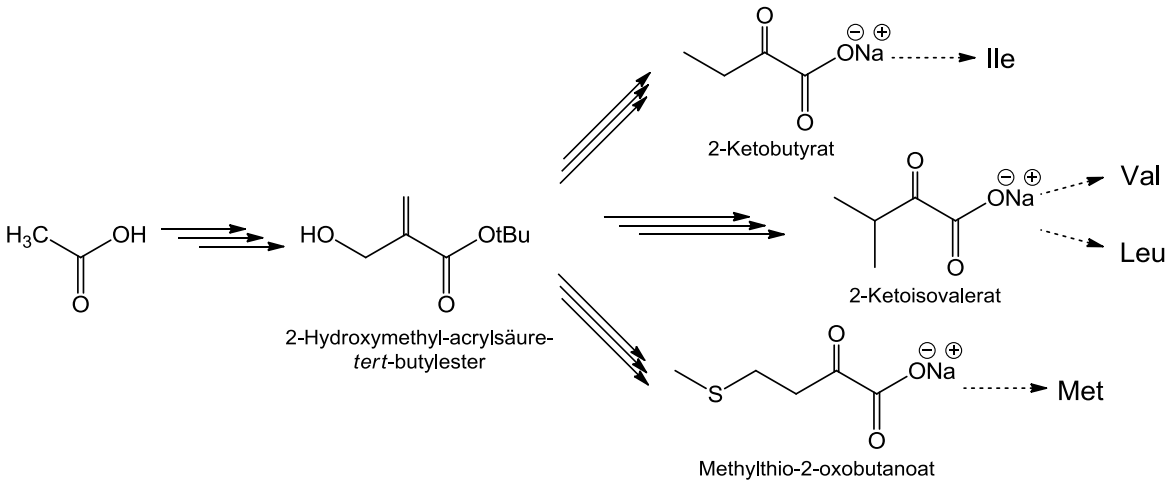
7 Literatur 65

8 NMR-Spektren 71

1 Einleitung

In der Vergangenheit wurde bereits von den Arbeitsgruppen Schmid und Konrat über die Anwendung von 2-Hydroxymethyl-acrylsäure-*tert*-butylester (Schema 1) als Ausgangsmaterial für die Synthese von verschiedenen isotopenmarkierten biosynthetischen Vorstufen der Aminosäuren berichtet.[1,2,3] Die chemisch synthetisierten ^{2}H- und ^{13}C-markierten α-Ketocarbonsäuren wurden für die Synthese von isotopenmarkierten Proteinen dem Bakterium *E. coli* zur Verfügung gestellt. Sie werden *in vivo* in entsprechende Aminosäuren umgewandelt, die dann als Bausteine für die Biosynthese der gewünschten Proteine dienen. Die Synthese von selektiv isotopenmarkierten Proteinen in Kombination mit moderner Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie, engl. „nuclear magnetic resonance“) dient heutzutage als eine der Methoden zu Strukturaufklärung von Proteinkomplexen.[4]

Die in der erwähnten Literatur beschriebenen α-Ketocarbonsäuren-Synthesen basieren auf Essigsäure als Ausgangsprodukt, verlaufen über 2-Hydroxymethyl-acrylsäure-*tert*-butylester und liefern die biosynthetischen Vorstufen für die Aminosäuren Methionin[2], Leucin, Isoleucin und Valin[3] (Schema 1).



Schema 1: Synthesewege zu potentiell isotopenmarkierten Aminosäuren mit 2-Hydroxymethyl-acrylsäure-*tert*-butylester als zentrale Zwischenstufe.

Eine andere Möglichkeit zur Herstellung isotopenmarkierter Proteine besteht darin, den Mikroorganismen direkt die markierten Aminosäuren zum Aufbau der Proteine in das Nährmedium zuzugeben. Als Ergänzung zu den Synthesen im Schema 1 werden in dieser Arbeit Möglichkeiten zur Synthese von potentiell ^{2}H- und ^{13}C-markierten Aminosäuren Lysin und Ornithin über 2-Hydroxymethyl-acrylsäure-*tert*-butylester vorgestellt.

1.1 Verwendung von isotopenmarkierten Aminosäuren

Aminosäuren sind elementare Bausteine von Proteinen und biosynthetisches Ausgangsmaterial für eine Reihe von biologisch wichtigen primären und sekundären Metaboliten. Selektiv ^{2}H, ^{13}C und ^{15}N markierte Peptide und Proteine werden in unterschiedlichen Methoden (NMR, IR und MS) zur Untersuchung von Biosynthesewegen, Bindungsaffinitäten und dynamischen Phänomenen, sowie der Strukturaufklärung verwendet.

Eine der gebräuchlichen NMR-Methoden zur Strukturaufklärung von Proteinen in Lösung beruht auf dem Kern-Overhauser-Effekt (NOE, engl. „nuclear Overhauser effect“). Besonders in NOE-Spektren wächst mit steigender Proteingröße die Anzahl der Signale. Das führt zu einer Linien-Verbreiterung und zur Überlappung der Signale und erschwert die Signal-Zuordnung und Spektreninterpretation, oder macht diese sogar unmöglich. Die Verwendung von isotopenmarkierten Proteinen führt zu erhöhter Empfindlichkeit und Auflösung der Spektren.[2,5]

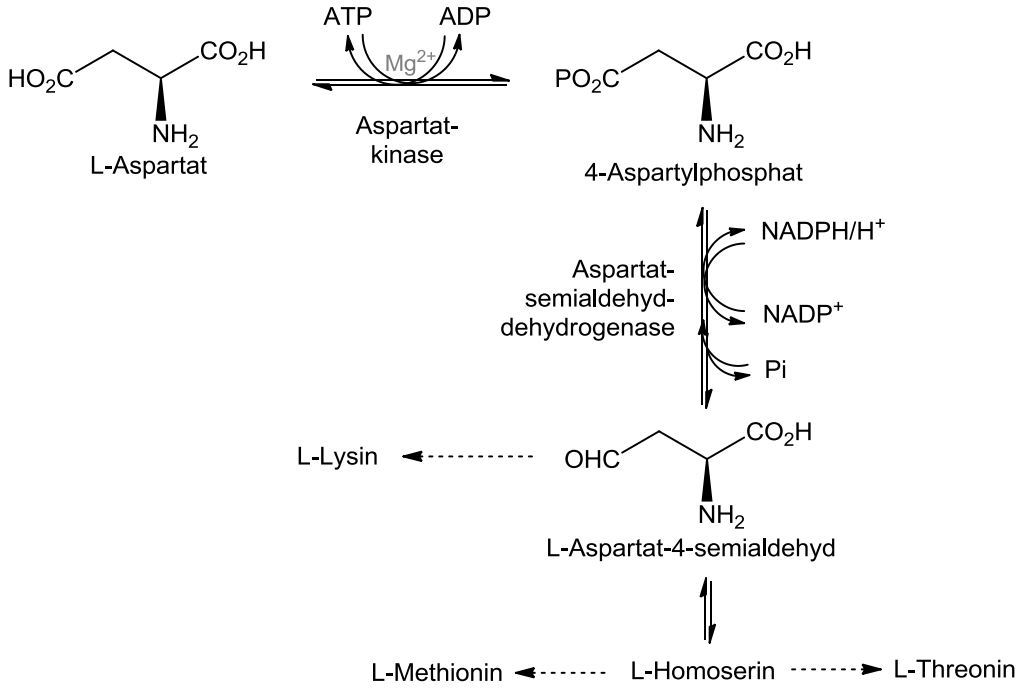
Die isotopenunterstützten NMR-Verfahren in Verbindung mit regioselektiven und stereoselektiven isotopenmarkierten Aminosäuren ermöglichen sowohl die lokale, als auch die umfassende Strukturaufklärung von Proteinen, wie zum Beispiel Konformationen von Seitenketten der einzelnen Reste.[6,7]

Mit Festkörper-NMR-Methoden können Proben sehr großer Membranproteine analysiert werden. Sie können lagespezifische Informationen über die Substrat-Protein-Wechselwirkungen und Konformationsänderungen liefern. Die Kombination von MAS-NMR (MAS für engl. „magic angle spinning“) und Isotopenmarkierung erlaubt die Strukturaufklärung von bis zu 60 KDa großen Membranproteinen.[8]

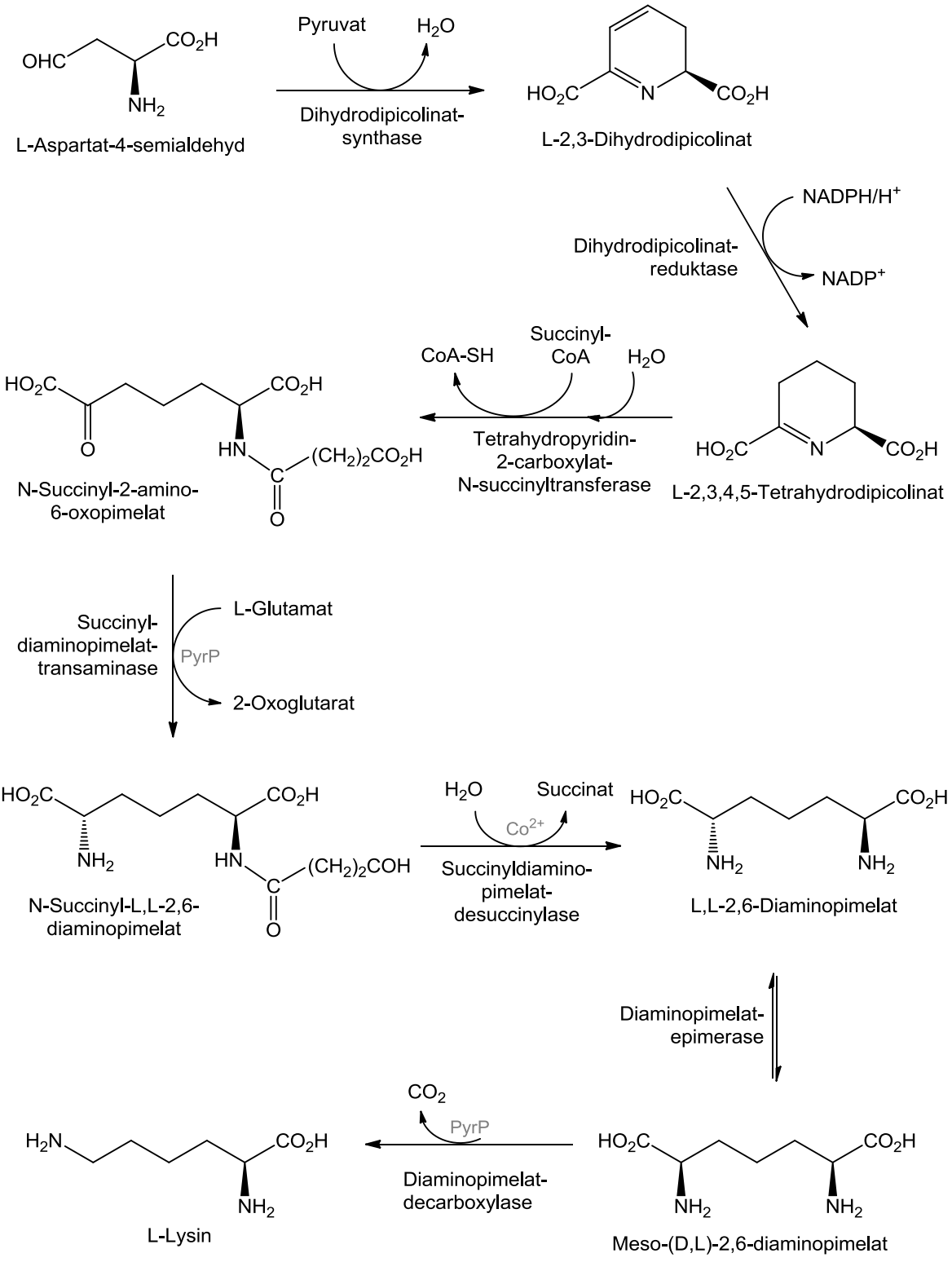
Eine vielgenutzte Methode zur quantitativen Untersuchung des Proteoms ist die Verwendung von stabil isotopenmarkierten Aminosäuren in Zellkulturen (SILAC, von engl. „stable isotope labeling amino acids in cell cultures“) mit anschließender MS. Bei dieser Methode werden Zellproben, die in einem Kulturmedium einmal mit isotopenmarkierten Aminosäuren und einmal mit unmarkierten Aminosäuren hergestellt wurden, vor der MS-Analyse gemischt. Paare chemisch identer Peptide mit unterschiedlicher Stabilisotopen-Zusammensetzung können aufgrund ihrer Massendifferenz im Massenspektrometer unterschieden werden.[9,10]

1.2 Biosynthese von Lysin in *Escherichia coli*

Die ersten zwei Stufen der Biosynthese der Aminosäure Lysin in *E. coli* sind identisch mit jenen des Methionins und Threonins (Schema 2). Die Biosynthese beginnt mit Phosphorylierung von L-Aspartat. Die Phosphorylierung liefert als Zwischenprodukt 4-Aspartylphosphat, welches dann durch die NADPH-unterstützte Reduktion und unter Abspaltung von Phosphat zu Aspartat-4-semialdehyd umgewandelt wird. Nach diesen zwei Schritten zweigt der individuelle Lysin-Biosyntheseweg ab (Schema 3). Aspartat-4-semialdehyd kondensiert mit Pyruvat und ein zyklisches Produkt wird gebildet. Infolge der Reduktion einer der Doppelbindungen des zyklischen 2,3-Dihydrodipicolinates und der Übertragung eines Succinylrestes vom Succinyl-CoA auf das Stickstoffatom entsteht eine stabilisierte, nicht-zyklische Verbindung. Die folgende Übertragung einer Aminogruppe von L-Glutamat auf die 6-Carbonylgruppe des gebildeten N-Succinyl-2-amino-6-oxopimelats wird von einer Transaminase katalysiert. Im nächsten Schritt wird das Succinat durch Einwirken einer Desuccinylase abgespalten. Das entstandene L,L-2,6-Diaminopimelat wird zu D,L-2,6-Diaminopimelat isomerisiert. In der letzten Stufe wird durch eine Pyridoxalphosphat-abhängige Decarboxylase die C_6-Carboxylgruppe des Diaminopimelates abgespalten und L-Lysin gebildet (Schema 3).[11]



Schema 2: Lysin-Biosynthese im Bakterium *E. coli.*



Schema 3: Lysin-Biosynthese im Bakterium *E. coli* (Fortsetzung).

1.3 Biologische Funktion von Lysin

Die Aminosäure Lysin besitzt eine vergleichsweise lange Seitenkette mit positiv geladenem Ende (ε-Aminogruppe) bei neutralem pH-Wert und dementsprechend hydrophilen Eigenschaften.[12]

Für den Menschen ist Lysin eine der neun essenziellen Aminosäuren, die der Körper nicht selbst aufbauen kann aber für seine Aufrechterhaltung benötigt. Die Aminosäure Lysin ist eine ketogene Aminosäure, da diese zu Acetyl-CoA abgebaut wird, aus welchem Ketonkörper hervorgehen können.[13]

Lysin spielt eine wichtige Rolle bei katalytischen Prozessen vieler enzymatischer Umwandlungen. So wird z.B. bei der Transaldolasereaktion, die einen wichtigen Teil des Pentosephosphatwegs darstellt, eine C_3-Einheit (Dihydroxyaceton) von einem Ketosedonor auf einen Aldoseakzeptor übertragen. Dabei bildet sich im ersten Schritt zwischen der ε-Aminogruppe eines Lysinrestes im Aktivzentrum des Enzyms Transaldolase und der Carbonylgruppe des Ketosesubstrats eine Schiff-Base.[14]

Ein anderes Beispiel sind Transaminasen, auch Aminotransferasen genannt, die unerlässlich für den Aminosäurestoffwechsel sind. Von den Aminotransferasen wird der Transfer einer α-Aminogruppe von einer Aminosäure auf eine α-Ketosäure katalysiert. Zu Beginn der Transaminierungsreaktion erhalten alle Aminotransferasen Pyridoxalphosphat als prostetische Gruppe, das über seine Aldehydgruppe an die ε-Aminogruppe eines spezifischen Lysinrestes am aktiven Zentrum des Enzyms kovalent gebunden ist. Die ε-Aminogruppe des Lysins wird vom aktiven Zentrum des Enzyms durch die α-Aminogruppe einer Aminosäure verdrängt. [15]

Das Enzym Pyruvat-Carboxylase katalysiert den ersten Schritt der Gluconeogenese. Dieses Enzym besitzt eine Biotinbindungsdomäne (kovalent gebundene prostetische Gruppe als Träger von aktiven CO_2), in der die ε-Aminogruppe eines spezifischen Lysinrestes über eine Amidbindung mit der Carboxylatgruppe des Biotins verknüpft ist.[16]

Das 11-cis-Retinal ist ebenfalls über eine kovalente Bindung an einen Lysinrest (Lysin-296) des Proteins Opsin gebunden und stellt damit das Sehpigment Rhodopsin dar. Rhodopsin ist ein Pigment in der Netzhaut (Retina) der Augen von Wirbeltieren, das für das Hell-Dunkel-Sehen verantwortlich ist.[17]

Ein kleines, in allen Eukaryotenzellen vorkommendes Protein namens Ubiquitin dient als Marker für die Kennzeichnung von Proteinen, die abgebaut werden sollen (nicht benötigte oder defekte Proteine). Nach der Aktivierung der terminalen Carboxylgruppe des Ubiquitins, wird dieses auf eine ε-Aminogruppe eines Lysinrestes des Zielproteins

transferiert. Über das an das Zielprotein gebundene Ubiquitin können weitere Ubiquitinmoleküle gebunden werden. Diese Verknüpfung erfolgt über die ε-Aminogruppe des Lysin-48 eines schon am Zielprotein gebundenes Ubiquitins und über terminales Carboxylat eines weiteren Ubiquitinmoleküls. Eine Ubiquitin-Kette aus vier oder mehr Resten signalisiert die Notwendigkeit des Abbaus des markierten Proteins. [18]

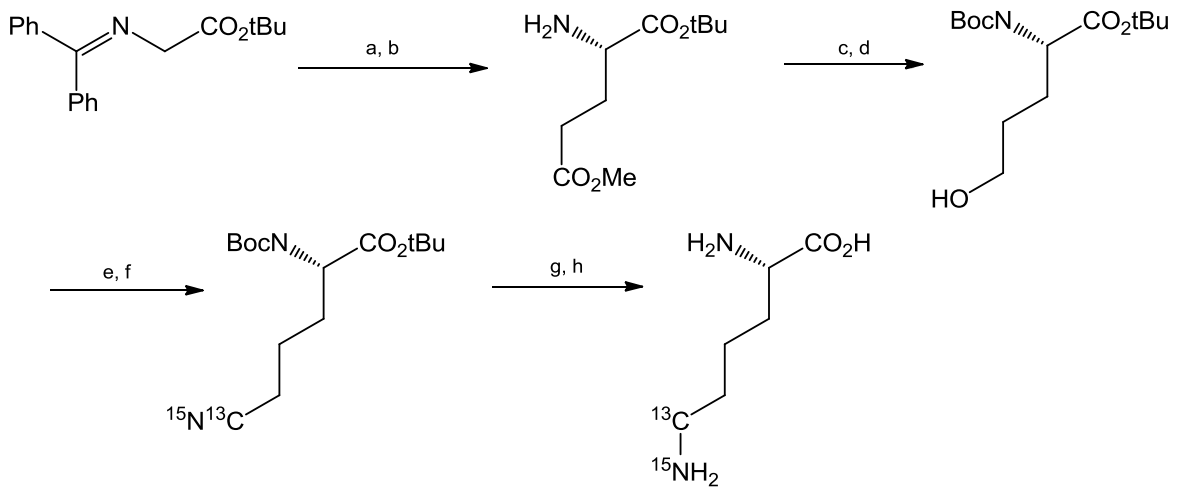
Lysin spielt eine wichtige Rolle im Aufbau des fibrillären Protein – „Kollagens“, das Hauptbestandteil des Bindegewebes der Haut, der Blutgefäße etc. ist. Die Lysinreste im Procollagen, der Kollagen-Vorstufe, tragen zur Bildung tripelhelikaler Kollagenmoleküle bei. Nachdem die Lysinreste der einzelnen Helices zunächst 5-hydroxyliert und dann glycosyliert wurden, kommt es zur endgültigen Faltung der Kollagen-Dreifachhelix.[11]

Aus der Aminosäure Lysin wird Carnitin gebildet. Carnitin ist eine natürlich vorkommende Verbindung, die für den Fettsäuretransport über die mitochondriale Membran bei dem β-Oxidationsweg dient. Die Biosynthese von Carnitin erfolgt über 3-Hydroxylierung von trimethyliertem L-Lysin.[11]

1.4 Verwendung und Synthese von isotopenmarkiertem Lysin

Lysin ist ein Bestandteil des aktiven Zentrums einiger Enzyme und auch anderer wichtiger Komponenten der biologischen Systemen, weshalb die Synthese seiner ^{13}C-, ^{2}H- und ^{15}N-Isotopomere, die für verschiedene Metabolismus-Studien und Untersuchungen mit spektroskopischen Methoden herangezogen werden, von großem Interesse ist.

Rhodopsin ist ein photosensitives Pigment in der Netzhaut der Augen von Wirbeltieren, das für das Hell-Dunkel-Sehen verantwortlich ist. Es gehört zur großen Familie von G-proteingekoppelten Membranrezeptoren (GPCR von engl. „G protein-coupled receptor“). Rhodopsin besteht aus einem Protein Opsin, das in seinem Aktivteil einen Lysinrest enthält (Lysin-296), an welchen über die Aldimin-Schiff'sche Base 11-cis-Retinal gebunden ist. Um die Rolle des Aktivzentrums des Photorezeptors Rhodopsin mithilfe ^{1}H und ^{13}C Festkörper-NMR zu untersuchen, wurde es von Siebum *et al.* ε-^{13}C,ε-^{15}N-L-Lysin synthetisiert (Schema 4).[17]



Schema 4: Synthese von ε-^{13}C,ε-^{15}N-L-Lysin nach Siebum *et al.;* Reagenzien und Bedingungen: a) Acrylsäuremethylester, 50 % KOH, chirale PTC (92%); b) H_3O^+ (96%); c) $(Boc)_2O$, Et_3N (94%); d) $NaBH_4$/LiCl (70%); e) Ph_3P, Br_2 (81%); f) $K^{13}C^{15}N$ (80%); g) H_2/PtO (95%); h) TFA (97%).

Im ersten Schritt wird an ein C2-Atom des geschützten Glycins der Acrylsäuremethylester angekoppelt. Bevor der Methylester mir $NaBH_4$/LiCl reduziert wird, sollte die Diphenylmethylen-Schutzgruppe durch eine Boc-Gruppe ersetzt werden. Nach der Reduktion des Methylesters zum Alkohol wird die Hydroxygruppe zunächst als Bromid aktiviert und dann mit isotopenmarkiertem Kaliumcyanid umgesetzt. Schließlich wird das Cyanid zur Aminogruppe reduziert und die *tert*-Butyl-Schutzgruppe abgespalten. Acrylsäuremethylester, der zu Beginn der Synthese eingesetzt wird, kann auch

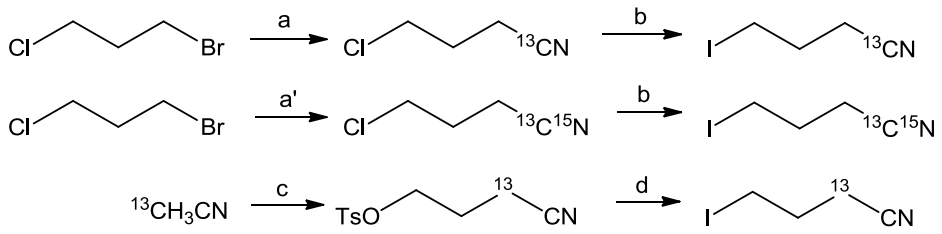
isotopenmarkiert hergestellt werden und somit die Synthese von L-Lysin mit der Markierung an anderen Stellen der Seitenkette ermöglichen.

Das aktive Zentrum des Photorezeptors Bakteriorhodopsin enthält ebenfalls das Chromophor Retinal, das an die ε-Aminogruppe des Lysins-216 kovalent gebunden ist. Bakteriorhodopsin ist ein Membranprotein der phototrophen Organismen, wie zum Beispiel *Halobacterium halobium*, und konvertiert Lichtenergie in einen Protonen-gradienten. Die Energie, die beim Abbau des Protonengradienten entsteht, dient zur Synthese von Adenosintriphosphat, eines Energiespeichers. Somit wird die Lichtenergie in solchen Organismen direkt für den Stoffwechsel genutzt. Aufgrund seiner außergewöhnlichen Funktionalität ist das Protein von großem wissenschaftlichem Interesse.

Resonanz-Raman Spektroskopie von ε-^{15}N-Lysin-markiertem Bakteriumrhodopsin lieferte die genauen Informationen über die detaillierte Struktur des Photorezeptors. Die *in situ* Untersuchungen bestätigten, dass das Chromophor Retinal über eine ε-Aminogruppe des Lysinrestes als Aldimin-Schiff'sche Base an das Protein gebunden ist.[19]

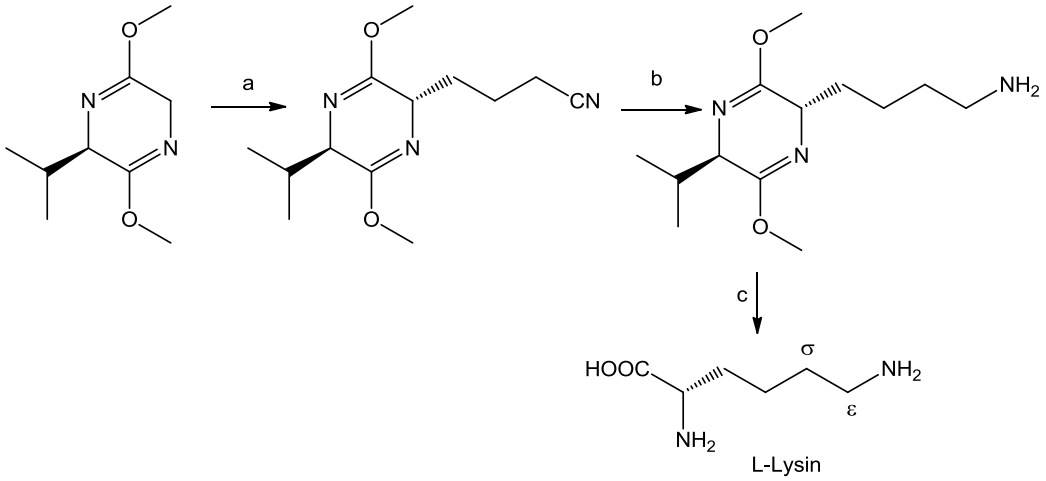
Mit Hilfe hochauflösender Festkörper-^{15}N-NMR-Spektroskopie wurde die Anisotropie der chemischen Verschiebung von der Schiff'sche Base in Bakteriorohdopsin und in einer Reihe von Modell-Verbindungen untersucht und verglichen.[20] Diese Methode ermöglichte den protonierten Zustand der ε-^{15}N-markierten Schiff'sche-Base-Verknüpfung des Retinals an das Protein und seine Wechselwirkung mit einem Gegenion aufzuklären. Für diese Untersuchung wurde ε-^{15}N-Lysin-markiertes Bakteriorhodopsin hergestellt. Dafür wurde dem künstlichen Nährmedium des *Halobacterium halobium*, das in der Lage ist, das gewünschte Bakteriorhodopsin zu synthetisieren, anstatt normalen Lysins das ε-^{15}N-markierte Lysin zugefügt. Die Modell-Verbindungen wurden ebenfalls als ^{15}N-markierte Verbindungen verwendet. Die Festkörper-NMR-Spektroskopie bei niedrigen Temperaturen erwies sich als eine wichtige Methode zur Untersuchung der Membranproteine.

Zur Studie über des primären Photoproduktes von Bakteriorodopsin und die genaue Konformation und Konfiguration seines [C14-C15=N-Cε]-Fragments wurde eine Reihe von δ- und ε-L-Lysin ^{13}C- und ^{2}H-Isotopomeren synthetisiert: (ε-^{13}C)-L-Lysin, (ε-^{13}C, ε-^{15}N)-L-Lysin, (δ-^{13}C)-L-Lysin, (ε-^{2}H)-L-Lysin, (ε-^{13}C, ε-^{2}H)-L-Lysin[21]. Im ersten Teil der Synthese wurden drei verschiedene isotopenmarkierte 4-Iodobutyronitrile, ausgehend von K^{13}CN, K^{13}C^{15}N und 2-^{13}C-Acetonitril, hergestellt (Schema 5).



Schema 5: Synthese von isotopenmarkierten 4-Iodobutyronitrile nach Raap *et al.*; Reagenzien und Bedingungen: a) K^{13}CN; a') Na$^{13}C^{15}$N; b) KI; c) i) n-BuLi, ii) Ethylenoxid, iii) TsCl; d) NaI.

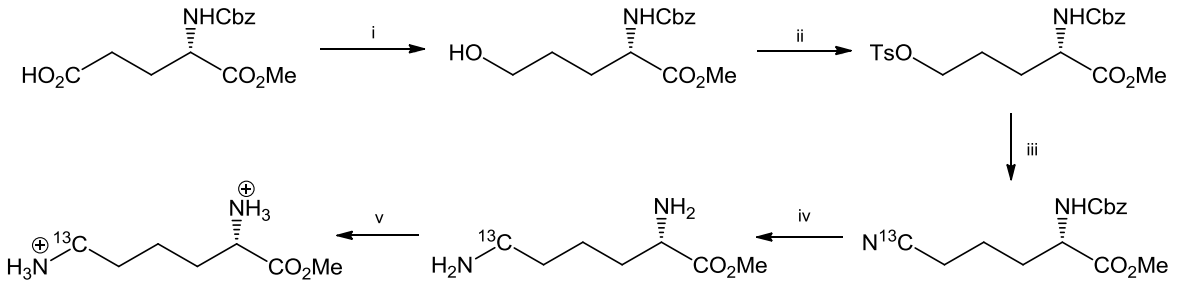
Im zweiten Syntheseteil wurden die 4-Iodobutyronitrile dem Bislactim-ether des Zyklodipeptids von Glycin und Valin zugesetzt. Die Alkylgruppe wird mit hoher Stereoselektivität in die 5-Position des Dihydropyrazinrings eingeführt. Infolge der Reduktion der Cyanide mit $LiAlD_4$ anstelle nichtdeuteriertem $LiAlH_4$ wurden weitere ^{2}H-markierte L-Lysine erhalten (Schema 6). Die Gesamtausbeute von δ- und ε-L-Lysin ^{13}C- und ^{2}H-Isotopomeren nach dieser Synthese (ausgehend von isotopenmarkierten K^{13}CN, Na$^{13}C^{15}$N und $^{13}CH_3CN$) betrug 35-40%.



Schema 6: Synthese von L-Lysin-Isotopomere nach Raap *et al.*; Reagenzien und Bedingungen: a) i) n-BuLi, ii) I(CH$_2$)$_3$CN-Isotopomere; b) $LiAlH_4$ oder $LiAlD_4$; c) i) 6N HCl, ii) Ionenaustauscher.

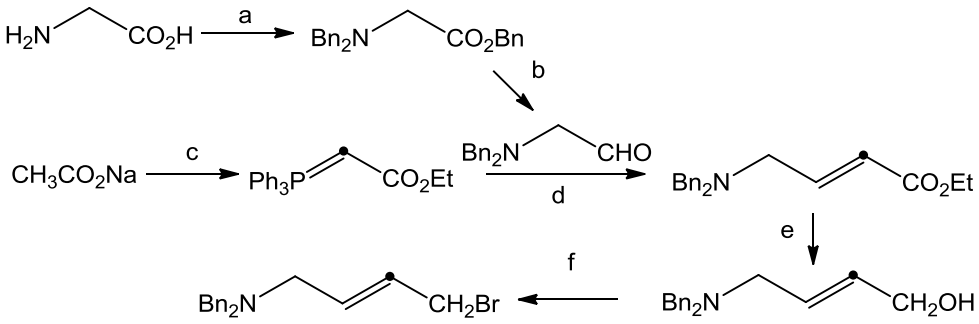
Lysin stellt einen der Hauptbestandteile des Kollagens und somit der Augengewebe dar, weshalb es eine wichtige Rolle bei Untersuchungen im Bereich der Augenerkrankungen wie Glaukom und Miopie spielt. Lysinoxidase katalysiert die oxidative Desaminierung von Lysinresten der Kollagenmoleküle, wodurch diese zu δ-Glutamatsemialdehydresten werden und schließlich durch die Kondensation quer verknüpft werden. Solche Quervernetzungen stabilisieren das Kollagen und erhöhen die Dehnbarkeit des Gewebes. Für eine Studie über den Vergleich von Kollagenstruktur des normalen und des

erkrankten Augengewebes mit NMR-Spektroskopie wurde von Sutherland *et al.* 6-^{13}C-L-Lysin hergestellt.[22] Die vorgestellte Synthese geht von kommerziell erhältlicher, geschützter Glutaminsäure aus und besteht aus fünf Stufen, wobei die ^{13}C-Markierung im dritten Schritt durch ^{13}C-markiertes Natriumcyanid eingeführt wird (Schema 7).



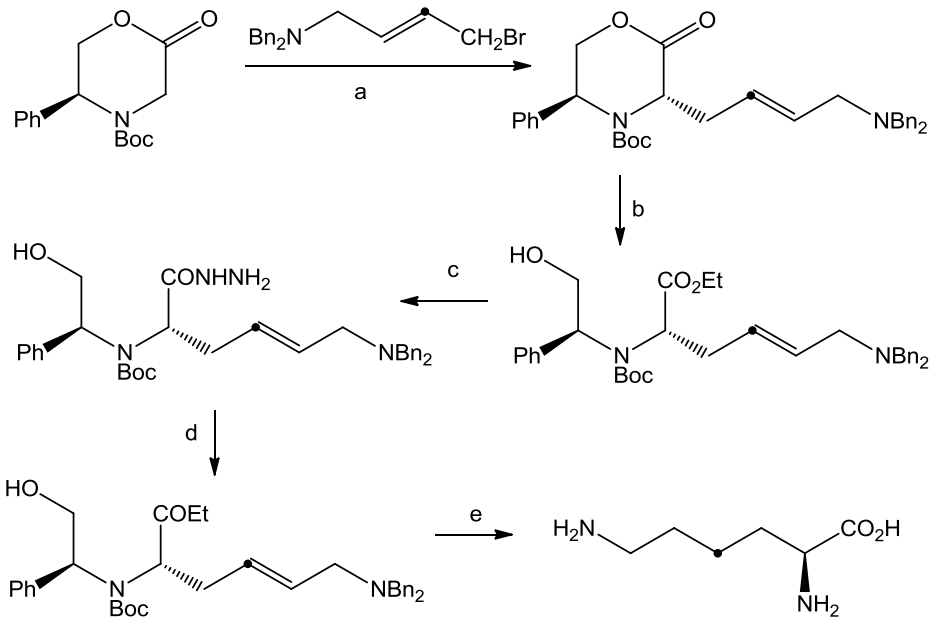
Schema 7: Syntese von 6-^{13}C-L-Lysin nach Sutherland *et al.;* Reagenzien und Bedingungen: i) $ClCO_2Et$, $NaBH_4$ (60%); ii) TsCl, Pyridin; iii) $Na^{13}CN$, DMF (55%); iv) H_2/PtO; v) 6N HCl.

Takatori *et al.* gelang in einer Reihe von asymmetrischen Synthesen isotopenmarkierter Aminosäuren auch eine Synthese von L-[4-^{13}C]-Lysin zu entwickeln. Aus dem [2-^{13}C]-markierten Natriumacetat und Glycin wird ein α,β-ungesättigtes Zwischenprodukt hergestellt (Schema 8), das nach der Aktivierung einem Oxazinon zugesetzt wird.



Schema 8: Synthese von α,β-ungesättigtem Zwischenprodukt für die Lysin-Synthese nach Takatori *et al.*; Reagenzien und Bedingungen: a) BnCl, K_2CO_3 (96%); b) i) $LiAlH_4$ (85%), ii) DMSO, $(COCl)_2$, Et_3N (quant.); c) i) PhCOBr, $PhCO_2H$, ii) Br_2, iii) EtOH, iv) Ph_3P, v) NaOH (71%); d) Benzol (94%); e) DIBAL (81%); f) LiBr, MsCl, Et_3N (71%).

Die Alkylierung von Oxazinon verläuft mit hoher Diastereoselektivität. Nach Öffnung des Oxazinon-Ringes, Hydrierung der Doppelbindung, Entfernung der chiralen Hilfsgruppe und Hydrolyse wurde [4-^{13}C]-markiertes L-Lysin erhalten (Schema 9). Mit der vorgestellten Synthese ist es möglich, ^{13}C auch in durch andere Methoden nicht zugänglichen Positionen in L-Lysin einzuführen. Bei der Verwendung von anderen Isotopomeren von Natriumacetat und Glycin, die kommerziell erhältlich sind, kann die Synthese zur Herstellung von anderen spezifischen Isotopenmarkierungen des L-Lysins dienen.



Schema 9: Synthese von (3-^{13}C)-L-Lysin nach Takatori *et al.;* Reagenzien und Bedingungen: a) LiHMDS, HMPA, -40 °C (86%); b) HCl/EtOH (73%); c) $KO_2CN{=}NCO_2K$, AcOH; d) HCl/EtOH (73%); e) i) H_2, $Pd(OH)_2$, ii) 6M HCl (51%).

1.5 Biosynthese, Vorkommen und Bedeutung von Ornithin

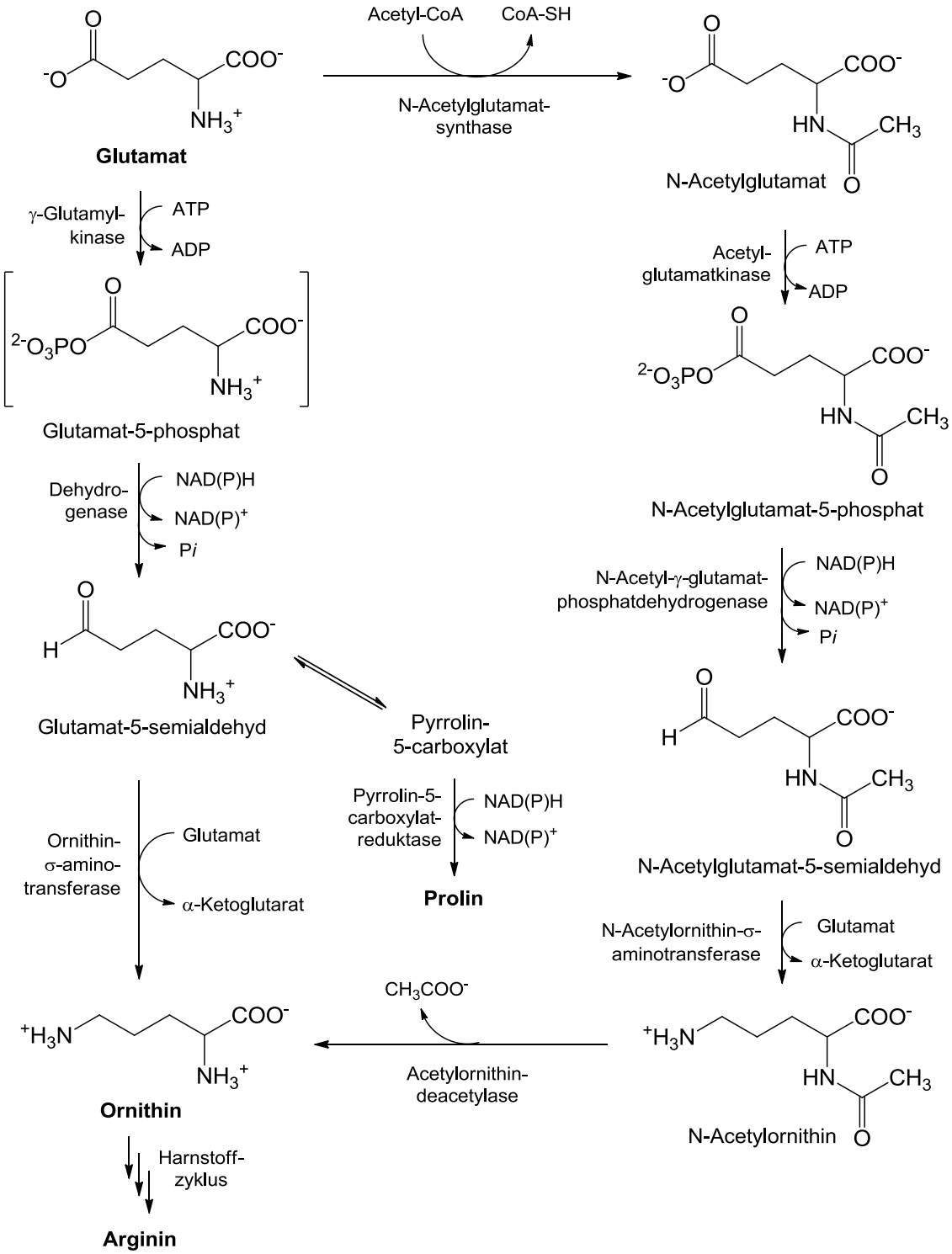
Die Aminosäure Ornithin gehört nicht zu den proteinogenen Aminosäuren, jedoch spielt sie eine wichtige Rolle bei anderen metabolitischen Prozessen. Sie ist ein wichtiges Zwischenprodukt im Harnstoffzyklus und auch eine Vorstufe der proteinogenen Aminosäure Arginin.

Die Biosynthese der Aminosäure Ornithin, wie auch von Prolin und Arginin, geht von Glutamat aus, weshalb die drei Aminosäuren zur Glutamat-Familie gehören. Beim Menschen beginnt der Syntheseweg mit der Reduktion der vorab phosphorylierten γ-Carboxygruppe des Glutamats zum Aldehyd (Schema 10). Das entstandene Glutamat-5-semialdehyd kann nun entweder vom Enzym Ornithin-δ-Aminotransferase direkt zu Ornithin transaminiert werden oder spontan zu einer cyclischen Schiff'sche Base (Pyrrolin-5-carboxylat) schließen, aus der Prolin gebildet wird. In *E. coli*. beginnt die Synthese mit der Acetylierung der Glutamat-Aminogruppe zu N-Acetylglutamat. Das gebildete N-Acetylglutamat wird ebenfalls über die vorausgehende Phosphorylierung der γ-Carboxygruppe zu N-Acetylglutamat-5-semialdehyd reduziert. Die Acetylierung der Aminogruppe des Glutamats im ersten Schritt verhindert eine spontane Cyclisierung des Zwischenproduktes N-Acetylglutamat-5-semialdehydes. Die folgende Transaminierung des N-Acetylglutamat-5-semialdehydes liefert N-Acetylornithin. Die schützende Acetylgruppe wird nun durch die Hydrolyse abgespalten und es bildet sich Ornithin. Die Aminosäure Ornithin wird im Harnstoffzyklus zu Arginin umgewandelt (Schema 10).[23]

Während des Aminosäurestoffwechsels werden die als Bausteine für Biosynthese nicht benötigten Aminosäuren zu Verbindungen abgebaut, die in andere Stoffwechselwege eingeschleust werden können. Im ersten Schritt des Aminosäureabbaus wird die α-Aminogruppe abgespalten, wobei neben dem verbleibenden Kohlenstoffkörper ein Ammoniumion entsteht. Ein Teil des gebildeten Ammoniumions wird zur Biosynthese stickstoffhaltiger Verbindungen und neuer Aminosäuren aus den α-Ketosäuren verwendet. Das übriggebliebene Ammoniumion, das im Gleichgewicht mit Ammoniak vorliegt ($NH_4^+ \Leftrightarrow NH_3 + H_2O$), muss aus dem Körper ausgeschieden werden, da Ammoniak schon in kleinen Konzentrationen für die Zellen giftig ist. Beim Mensch und anderen Säugetieren geschieht dies durch Bildung von Harnstoff im Harnstoffzyklus, bei dem die Aminosäure Ornithin ein wichtiges Zwischenprodukt darstellt.[12,23]

Zu Beginn des Harnstoffzyklus wird Ammoniak mit dem Hydrogencarbonat-Ion enzymatisch unter Verbrauch von zwei ATP-Molekülen in der Mitochondrienmatrix der Zellen zu Carbamoylphosphat verbunden. Danach wird die Carbamoylgruppe des Carbamoylphosphates auf die δ-Aminogruppe des Ornithins übertragen, wobei die

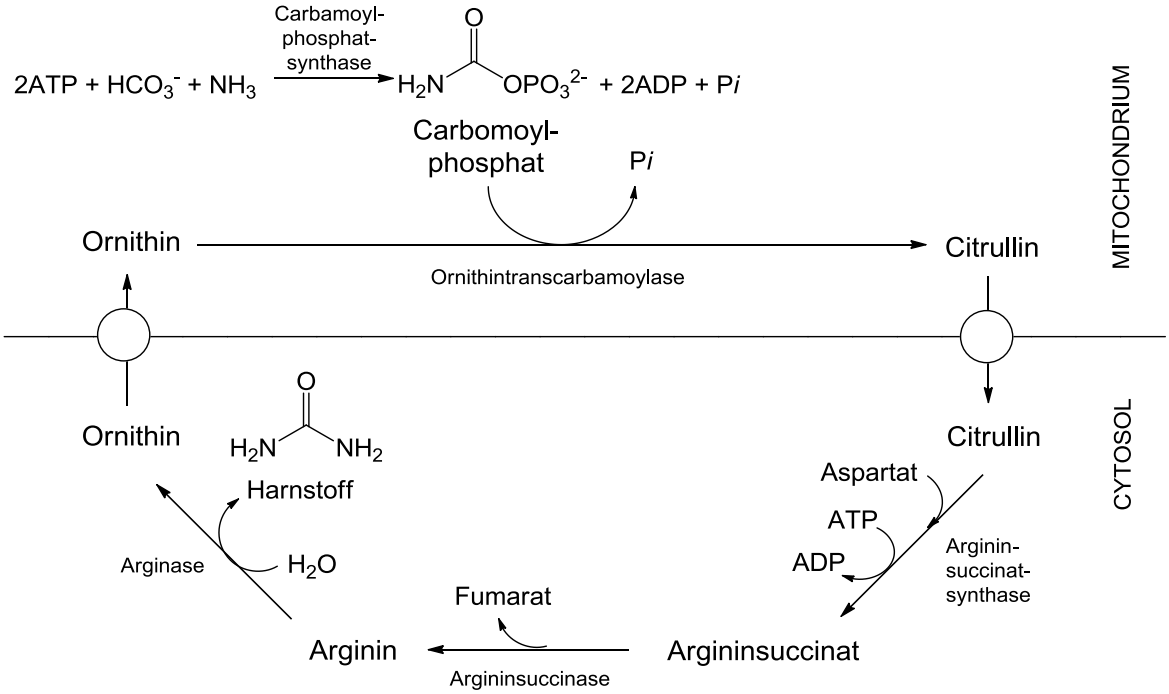
ebenfalls nicht proteinogene Aminosäure Citrullin entsteht. Für die nächsten drei Reaktionen des Harnstoffzyklus wird Citrullin zum Cytoplasma transportiert.



Schema 10: Biosynthese von Ornithin im Menschen (links) und in *E. coli* (rechts).

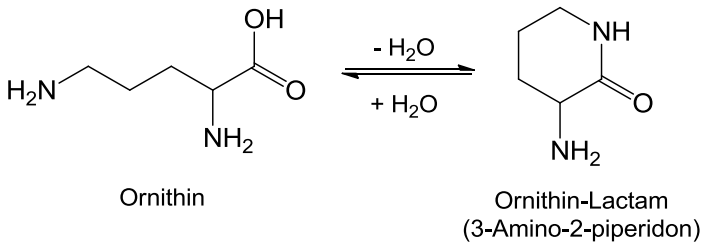
Hier kondensiert Citrullin mit Aspartat zu Argininosuccinat. Dieses wird durch das Enzym Argininosuccinase in Arginin und Fumarat gespalten. Das Arginin ist unmittelbare Vorstufe

des Harnstoffs und wird durch eine enzymatische Reduktion zu Ornithin und Harnstoff hydrolysiert. Das Ornithin wird anschließend wieder ins Mitochondrium transportiert und geht erneut in den Zyklus ein (Schema 11). Der Harnstoffzyklus verläuft in der Leber, wobei der gebildete Harnstoff über die Nieren ausgeschieden wird.[12,23]



Schema 11: Der Harnstoffzyklus verläuft teils im Mitochondrium, teils im Cytosol.

Aus chemischer Sicht ist Ornithin eine α,δ-Diaminocarbonsäure, die bei der Abspaltung eines Wassermoleküls ein relativ stabiles δ-Lactam bilden kann (Schema 12).



Schema 12: Bildung des Ornithin-Lactams aus Ornithin.

Die nicht proteinogene Aminosäure Ornithin ist nicht nur als biochemische Quelle der Aminosäuren Arginin, Prolin und von Glutamat wichtig, sondern auch als Bestandteil von Antibiotika und Alkaloiden. Das isotopenmarkierte Ornithin wurde bei einigen biosynthetischen Studien über Antibiotika wie Clavulansäure, Sinefungin und anderen schützenden Alkaloiden eingesetzt.[24]

In der Studie von Martens-Lobenhoffer *et al.* wird eine Methode zur Detektion und Quantifizierung des Ornithin-Lactams-Gehaltes im menschlichen Plasma mit Hilfe von LC-

MS/MS vorgestellt. Für diesen Zweck wurde isotopenmarkiertes Ornithin (3,3,4,4,5,5-D_6) verwendet.[25]

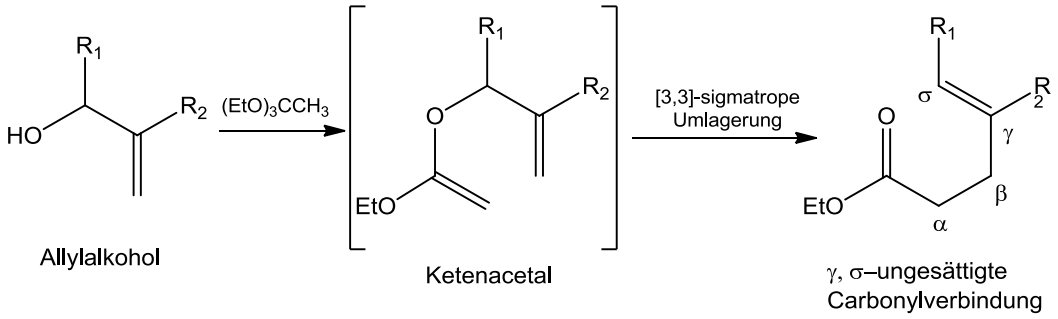
Hyperargininämia ist eine Störung des Harnstoffzyklus, die sich aufgrund des Mangels an Arginase, einem der Harnstoffzyklusenzyme (siehe Schema 11), ergibt. In einer Studie wurde gezeigt, wie sich die Konzentration von Arginin und Ornithin in Plasma, in den Nieren und im Gehirn von Knockout-Mäusen durch den Mangel an Arginase A-I und A-II verändert und welche Folgen sich daraus für die gezüchteten Tiere ergibt.[26]

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Schlüsselschritte aus eigener Synthese

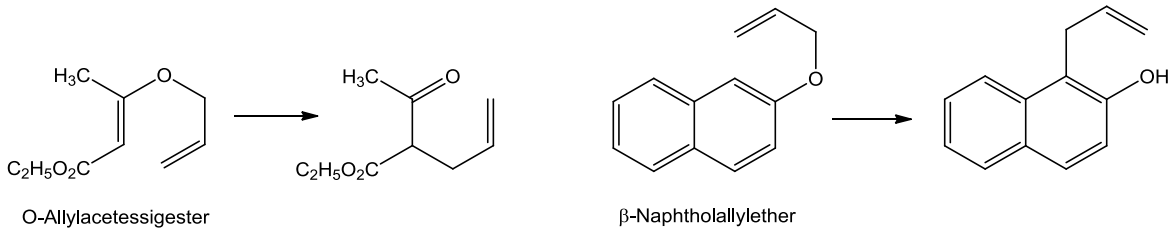
2.1.1 Claisen-Johnson Umlagerung[27]

In der Synthesechemie ist die Bildung der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung häufig einer der Schlüssel-Schritte der Reaktionssequenz. Unter der Mannigfaltigkeit der Möglichkeiten zur Bildung der C-C-Bindung ist die Claisen-Johnson Umlagerung eine in der organischen Synthese verbreitete Methode. Bei dieser Reaktion wird ein Ketenacetal, das infolge der Kondensation eines Orthoesters mit einem Allylalkohol entstand, durch eine [3,3]-sigmatrope Umlagerung in eine ungesättigte Carbonylverbindung umgewandelt (Schema 13). Der wesentliche Teil der Claisen-Johnson Reaktion ist die [3,3]-sigmatrope Umlagerung, die hier die Claisen Umlagerung und eine Umwandlung eines Allylvinyl-Fragmentes in eine ungesättigte Carbonylverbindung darstellt.



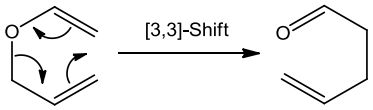
Schema 13: Claisen-Johnson Umlagerung.

Die Claisen Umlagerung wurde vom deutschen Chemiker Ludwig Claisen im Jahr 1912 entdeckt.[28] Während seiner Experimente mit Acyl- und Allyl-Derivaten des Acetessigesters bemerkte Claisen, dass ungesättigte Derivate, die O-Allylacetessigester, im Gegensatz zu gesättigten O-Acylacetessigestern beim Destillieren eine Neigung zur „Isomerisierung“, wie er es damals nannte, in C-Allylderivate zeigten. Eine ähnliche Neigung zur solchen Umlagerung zeigten auch Phenolether (Schema 14). Die Claisen Umlagerung ist eine thermische Umwandlung eines aliphatischen oder aromatischen Allylvinylethers in eine γ,δ-ungesättigte Carbonylverbindung.



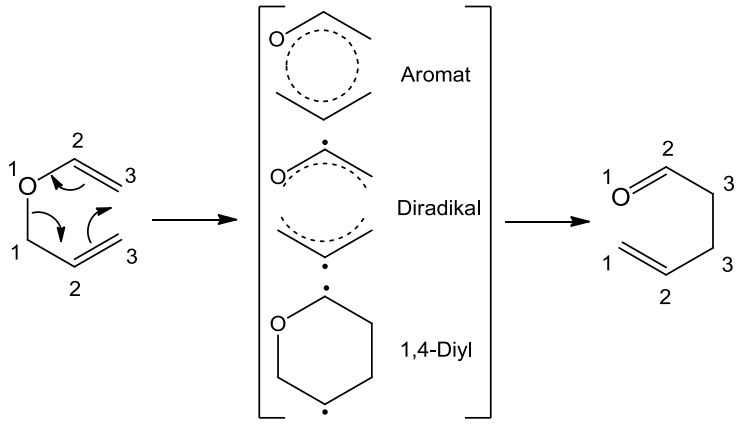
Schema 14: Claisen Umlagerung des aliphatischen (links) und aromatischen (rechts) Allylvinylethers beim Destillieren.

Die Claisen Umlagerung ist eine [3,3]-sigmatrope Umlagerung (oder [3,3]-Shift). Dabei handelt es sich um eine intramolekulare irreversible Umlagerung, bei der eine σ-Bindung aufgelöst wird und gleichzeitig eine neue σ-Bindung an einer anderen Stelle entsteht. Gleichzeitig kommt es zur Verschiebung der π-Bindungen. Insgesamt bleibt die Anzahl der σ- und π-Bindungen gleich.[29]



Schema 15: Claisen Umlagerung als ein [3,3]-sigmatroper Shift.

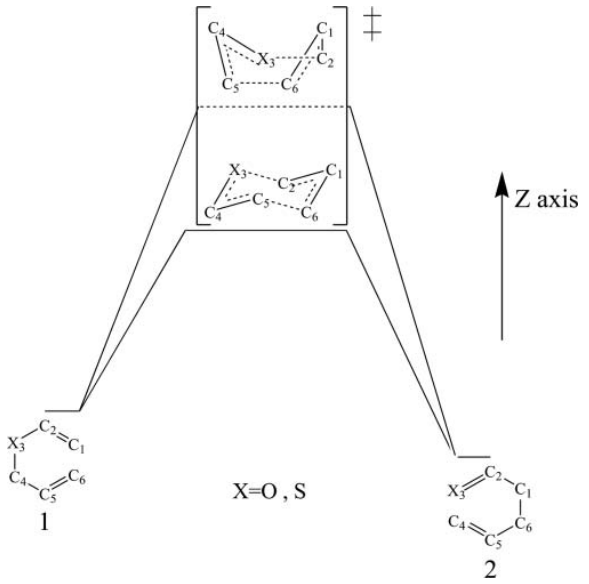
Offensichtlich ist der genaue Übergangszustand immer noch nicht bekannt, obwohl er mit verschiedenen rechnerischen Methoden in zahlreichen theoretischen Studien zu ermitteln versucht wurde.[29] Es ist nicht klar, ob die Umlagerung über einen aromatischen Übergangszustand, ein Diradikal oder ein 1,4-Diyl verläuft (Schema 16).[29b,30] Es kann aber eindeutig vermerkt werden, dass es sich dabei um einen sechs-gliedrigen Übergangszustand handelt, der entweder in der sessel- oder bootförmigen Konformation vorliegt (Schema 17).[29b,30b,31]



Schema 16: Mögliche Übergangszustände der Claisen Umlagerung.

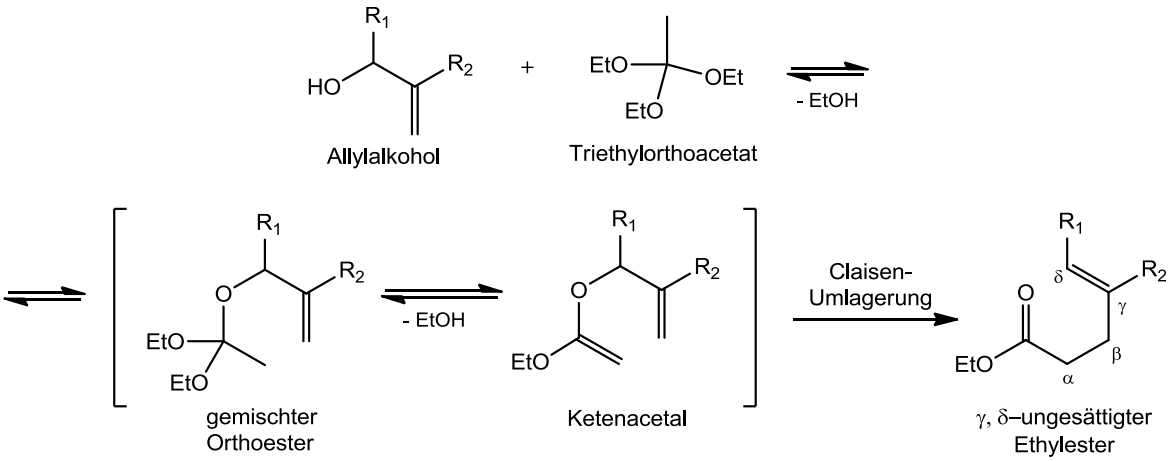
Der energetische Unterschied zwischen der sessel- und der bootförmigen Konformation beträgt bei der Umlagerung ungefähr 3 Kcal/Mol.[31] Somit ist die Sessel-Geometrie

bevorzugt, aber die Boot-Form nicht ausgeschlossen. Der energetische Übergang vom Edukt zum Produkt ist in folgendem Diagramm abgebildet (Schema 17). Da das Produkt thermisch stabiler als das Edukt ist, ist die Reaktion irreversibel.



Schema 17: Claisen Umlagerung via den zwei möglichen Konformationen des Übergangszustands (oben: Boot-, unten: Sessel-Konformation).[29a]

Die Johnson Variante der Claisen Umlagerung ist die Reaktion eines Allylalkohols mit einem Orthoester, infolge dessen ein Ketenacetal als Zwischenstufe gebildet wird. Dieses wird dann über die [3,3]-sigmatrope Umlagerung in eine γ,δ-ungesättigte Carbonyl-verbindung umgewandelt (Schema 18).



Schema 18: Claisen-Johnson Umlagerung (R_1= CH_3; R_2= $(CH_2)_2CH(CH_3)=CH_2$).

Die Umlagerung wurde im Jahr 1970 von Johnson *et al*. als eine hoch stereoselektive Variante der Claisen Umlagerung für die Synthese von *trans*-dreifach substituierten olefinischen Verbindungen beschrieben.[32] In dieser Reaktion sind die Bildung von

gemischtem Orthoester, die Abspaltung von Ethanol und die Bindung von Ketenacetal reversible Prozesse. Der letzte Teil – die eigentliche Umlagerung – ist irreversibel.

Die typische praktische Durchführung dieser Reaktion geschieht durch Erhitzen eines Allylalkohols mit Überschuss eines Orthoester (meistens Trimethyl- oder Triethylorthoacetat) und katalytischen Mengen einer schwachen Säure (klassisch Propionsäure) bei Temperaturen zwischen 140-200 °C. Dabei kann die Reaktion einige Stunden oder sogar Tage dauern. Die Durchführung in der Mikrowellen-Apparatur beschleunigt die Reaktion drastisch. In den meisten Fällen wurde nicht nur die Zeit der Reaktion von Stunden auf Minuten verkürzt, sondern auch die Ausbeute des Produktes im Vergleich zur klassischen Thermolyse verbessert.[33]

Die Claisen-Johnson Umlagerung findet vielseitige Verwendung in der synthetischen Chemie. Trotz ihrer nicht milden Reaktionsbedingungen (hohe Temperaturen, Säure-Katalyse) wird die Reaktion wegen der einfachen „Eintopf“-Durchführung oft eingesetzt. Außerdem sind Orthoester entweder kommerziell erhältlich oder unkompliziert herzustellen (z.B. durch die Pinner-Reaktion[34]), und die Reaktionsbedingungen verlangen keine strengen wasserfreien Bedingungen.

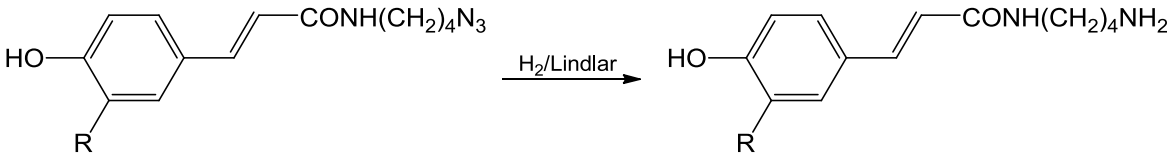
2.1.2 Reduktion der Azide zu Aminen[35]

Organische Azide bieten die Möglichkeit zur Einführung einer primären Aminogruppe. Primäre Amine sind oft Bestandteile biologisch aktiver Verbindungen. Aufgrund der unkomplizierten Herstellung der Azide ist deren Reduktion zu Aminen von wesentlicher Bedeutung in der bioorganischen Synthese.

Azide sind stabil gegenüber vielen Reagenzien und können bei hydrolytischen Bedingungen leicht zu primären Aminen reduziert werden, häufig auch selektiv bei Anwesenheit anderer reduzierbarer funktioneller Gruppen. Die Azid-Gruppe wird durch die nukleophile Substitution mit einem anorganischen Azid eingeführt.[36]

Für die Reduktion der Azide können verschiedene Reduktionsmittel verwendet werden.

Eine der Methoden der Reduktion der Azide zu Aminen ist die metallkatalytische Hydrogenolyse. Da im Laufe der Hydrogenolyse der Azide Stickstoff freigesetzt wird, ist es nicht möglich, die normale Hydrogenolyse-Apparatur zu verwenden. Der genaue Mechanismus der Hydrogenolyse ist noch nicht etabliert. Möglicherweise verläuft die Reaktion über eine Triazen-Zwischenstufe.[35] Palladium- oder Platin-katalysierte Hydrogenolyse ist zwar eine effektive, aber nicht immer passende Möglichkeit zur Reduktion der Azide, die auch andere reduzierbare Gruppen erhalten. Selektive Hydrogenolyse der Azido-Gruppe bei Anwesenheit der Doppelbindung kann mit dem Lindlar-Katalysator erreicht werden (Schema 19).[37]

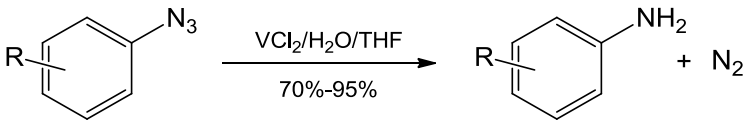


Schema 19: Reduktion der Azidgruppe mit Lindlar-Katalysator (R= H, 95%; R= OCH_3, 97%).

Die Anwendung von Palladium auf Kohle als Katalysator ermöglicht die selektive Reduktion von Aziden ohne dabei andere sensitive Gruppen anzugreifen, wie zum Beispiel die Benzyloxycarbonyl-Gruppe.[38] Der Raney-Nickel-Katalysator kann ebenfalls für die selektive Reduktion der Azid-Verbindungen verwendet werden, die auch Doppelbindungen oder Benzyloxy-Gruppen enthalten.[39]

Eine andere Möglichkeit Azide in Amine zu überführen ist die Reduktion mit anorganischen Verbindungen niedervalenter Metalle. Zinn(II)chlorid reduziert eine Reihe von Alkyl- und Arylaziden zu entsprechenden Aminen bei Raumtemperatur, wobei für

weniger reaktive Azide katalytische Mengen an Aluminiumchlorid zugesetzt werden sollen.[40] Vanadium(II)chlorid hat sich als nützliches Reduktionsmittel von Arylaziden in wässriger Lösung bewiesen (Schema 20).[41] Die Heteroaryl- und Arenosulfonylazide können ebenfalls im wässrigen Medium mit Titanum(III)chlorid reduziert werden.[42]

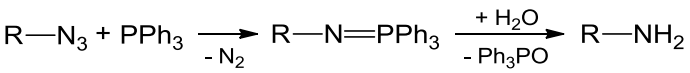


Schema 20: Reduktion von Arylaziden mit Vanadium(II)chlorid (R= H, 70%; R= 2-CH_3, 85%; R= 2,4-di-CH_3 76%; R= 4-Cl, 78%, R= 4-F, 95%, R= 2-CF_3, 78%,).

Eine chemoselektive Reduktion der Azidopyrazine ist mit einem Fe/NH_4Cl-Reduktionssystem in einem Zwei-Phasen-Lösungsmittel-System von Ethylacetat und Wasser möglich.[43] Ein Zn/NH_4Cl-Reduktionssystem in Ethanol/Wasser hat sich im Vergleich zu einem Eisen/Ammoniumchlorid-System als aktiver erwiesen.[44]

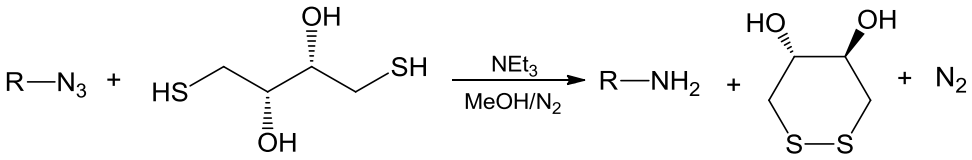
Die Metallhydride und Borhydride werden ebenfalls für die Herstellung primärer Amine aus Aziden verwendet. Lithiumaluminiumhydrid ist ein gutes Reduktionsmittel für Azide, für welche keine Chemoselektivität erforderlich ist.[45] Natriumborhydrid wurde erfolgreich für die Reduktion eine Reihe von Aryl-, Alkyl- und Sulfonylaziden im THF/MeOH-System eingesetzt.[46]

Die sogenannte Staudinger-Reaktion ist eine hochselektive Reduktionsmethode zur Überführung von Aziden zu primären Aminen. Als Reduktionsmittel werden dabei Triphenyl- oder Trialkylphosphine in THF mit geringem Überschuss an Wasser verwendet.[47] Phosphine reagieren mit Aziden zu Phosphazenen, die bei Anwesenheit von Wasser sofort zu Aminen hydrolysieren (Schema 21). Bei dieser Methode bleiben viele andere sensitive funktionelle Gruppen unbeeinflusst, wie zum Beispiel Nitro-, Alkoxycarbonyl- und Epoxid-Gruppen.[48]



Schema 21: Staudinger-Reduktion von Aziden zu primären Aminen.

Die Reduktion von Aziden mit Hydrogensulfid ist eine seit Jahren verwendete, chemoselektive Methode zur Herstellung von Aminen. Sie erlaubt eine selektive Reduktion der Azidogruppe in Gegenwart anderer empfindlicher funktioneller Gruppen wie zum Beispiel die Reduktion von ungesättigten Azid-Nukleosiden oder von Azidothiophenen, die eine Cyanogruppe besitzen.[49]
Ein anderes schwefelhaltiges Reduktionsmittel mit noch höherer Selektivität zu Azidogruppen ist Dithiothreitol (Schema 22).



Schema 22: Reduktion der Azide mit Dithiothreitol.

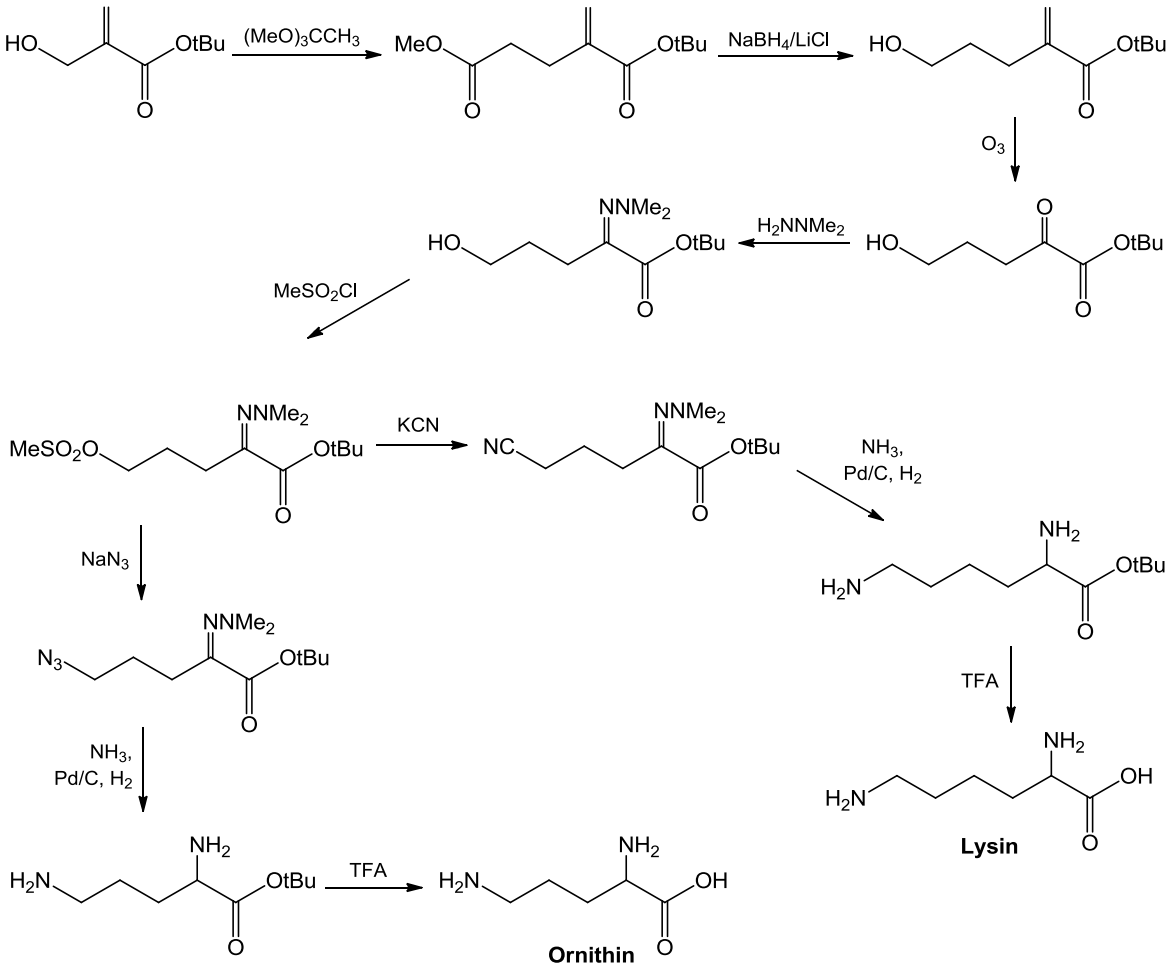
Die Durchführung dieser Reduktion unter Inertgas-Atmosphäre in Methanol oder Wasser mit Dithiothreitol und einer Base (Triethylamin oder Diisopropylamin) erlaubt eine selektive Reduktion der Azidogruppe in Anwesenheit der Doppel- und Dreifachbindungen, Nitro-, Cyano- und Carbonylgruppen.[50]

3 Eigene Experimente

3.1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, Synthesewege von 13-C und Deuterium markierten Aminosäuren Lysin und Ornithin zu erarbeiten. Eine Hauptbedingung dieser Arbeit war, genannte Synthesen mit preisgünstigen potenziellen Isotopenquellen in möglichst hohen Ausbeuten durchzuführen.

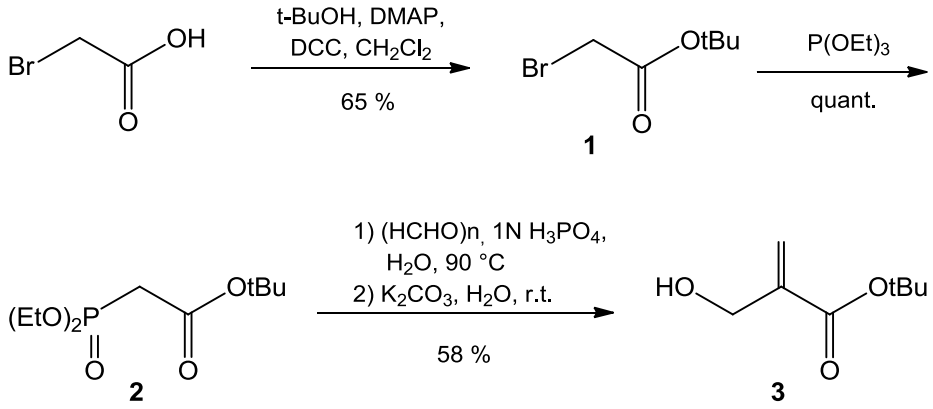
Die vorgenommene Synthesesequenz sollte jeweils in acht Schritten zu den gewünschten Aminosäuren Lysin bzw. Ornithin führen (Schema 23). Die Reaktionen wurden mit unmarkierten Substanzen erarbeitet.



Schema 23: Geplanter Syntheseweg zu Lysin und Ornithin.

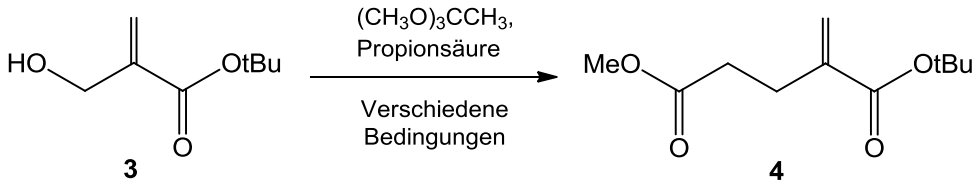
3.2 Beschreibung der durchgeführten Synthesen

Das Ausgangsmaterial für die Synthese – 2-Hydroxymethyl-acrylsäure-*tert*-butylester **3** – wurde in drei Schritten nach bekannten und bereits optimierten Vorschriften hergestellt[51] (Schema 24). Dabei wurde Bromessigsäure zuerst zum *tert*-Butylester **1** verestert[52] und dann das entstandene *tert*-Butylbromacetat **1** durch Anwendung einer Arbusov-Reaktion mit Triethylphosphit zu *tert*-Butylphosphonoacetat **2** umgesetzt[53]. Dieses wurde anschließend durch eine Horner-Wadsworth-Emmons Reaktion mit Paraformaldehyd und Kaliumcarbonat zu 2-Hydroxymethyl-acrylsäure-*tert*-butylester **3** umgewandelt[54].



Schema 24: Synthese des Ausgangsmaterials.

Allylalkohol **3** wurde in einer Claisen-Johnson Umlagerung (Schema 25) mit Trimethylorthoacetat umgesetzt.[32] Die Reaktion wurde ohne Lösungsmittel bei verschiedenen Temperaturen und mit unterschiedlichen Mengen an Orthoester durchgeführt. Als Katalysator wurde Propionsäure verwendet. Der Versuch, das Erhitzen im Ölbad durch Erwärmung in der Mikrowellen-Apparatur[55,56,57] zu ersetzen brachte keinen Erfolg. Sämtliche Reaktionen in der Mikrowellen-Apparatur ergaben unvollständigen Umsatz. Außerdem wurde eine Polymerisierung, vermutlich des Allylalkohols, beobachtet. Eine Übersicht der Ergebnisse der Optimierung der Claisen-Johnson Umlagerung ist in Tabelle 1 dargestellt.



Schema 25: Claisen-Johnson Umlagerung von 2-Hydroxymethyl-acrylsäure-*tert*-butylester (3).

Tabelle 1: Versuche zur Optimierung der Claisen-Johnson Reaktion.

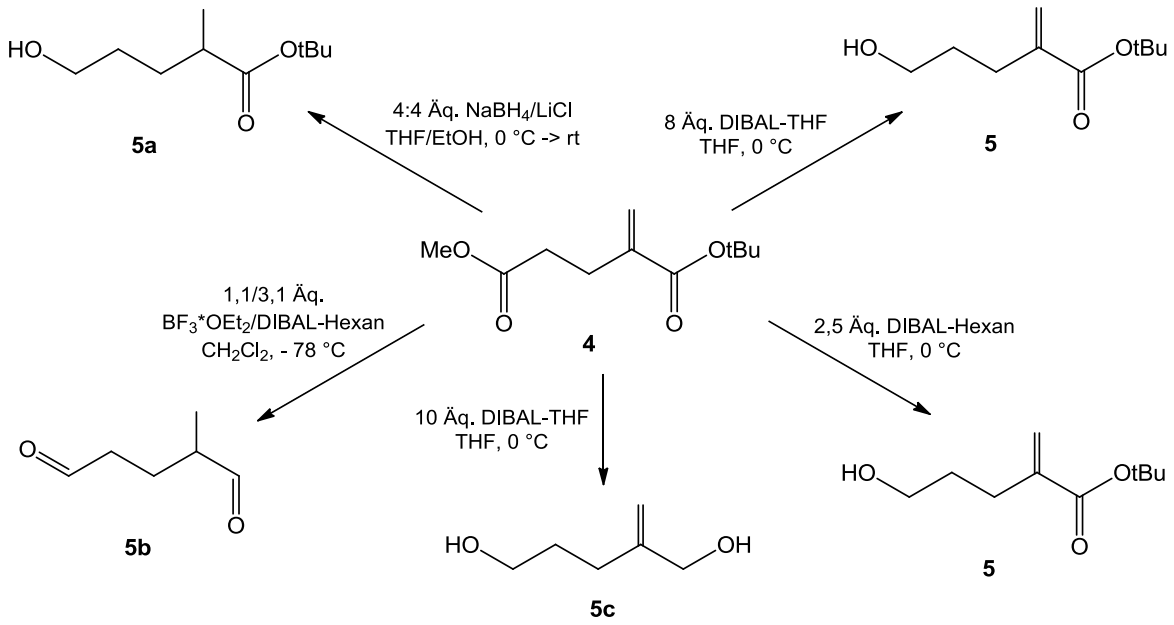
Temp. °C	Reaktionszeit	Äq. TMOA	Produkt/ Edukt	Rohprodukt	
150° C MW	10 min	10	1:1	(polym.)	
180 °C MW	15 min	10	1:0,15	(polym.)	
160 °C MW	15 min	7	1:0,14	(polym.)	
160 °C MW	15 min	14	1:1	(polym.)	
95-100 °C	2,5 St	5	1:0;8	55 %	
ca. 105 °C	6 St	5	1:0,014	52 %	
105-110 °C	3,5 St	7	1:0,8	79 %	
105-110 °C	18 St	7	1:0,015	79 %	
105-110 °C	6 St	7	1:0	61 %	*
120 °C	2,5 St	5	1:0	81 %	*
120 °C	3 St	3	1:0,03	(polym.)	*
100-105 °C	20 St	3	1:0,2	(polym.)	
110-115 °C	3 St	4	1:0,013	73 %	*
110-115 °C	3 St	5	1:0	75 %	*

TMOA – Trimethylorthoacetat; *Portionierte Zugabe an Katalysator; (polym.) – Polymerisation des Produktes.

Es zeigte sich, dass die portionsweise Zugabe von Katalysator bessere Ausbeuten ergab. In Bezug auf die Möglichkeit der Anwendung des Orthoesters als Isotopenmarkierungsquelle wurde versucht, den Überschuss an Trimethylorthoacetat zu minimieren. Dabei zeigte sich die Polymerisierung des Eduktes schon bei Einsatz von 3 Äquivalenten an Orthoester, was als mögliche Folge der erhöhten Konzentration des Allylalkohols interpretiert werden kann. Folgende Reaktionsbedingungen erwiesen sich demnach als optimal: eine Temperatur von 120 °C, 5 Äquivalente an Trimethylorthoacetat und portionsweise Katalysatorzugabe, womit eine Ausbeute von ca. 80 % des Produkts **4** erreicht werden konnte.

Die folgende Umsetzung des Methylesters **4** zum Alkohol **5** sollte eine selektive Reduktion sein, da die Verbindung **4** drei reduzierbare Gruppen enthält (Methylester, *tert.*-Butylester und eine Doppelbindung). Die unterschiedlichen Reaktionsbedingungen zur Umsetzung von **4** zu **5** sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Nachdem das geplante Natriumhydroborat-Lithiumchlorid-Reduktionssystem[58] im Lösungsmittel THF:MeOH nicht das gewünschte Produkt lieferte und im Lösungsmittel THF:EtOH zusätzlich zur Methylester-Gruppe auch die Doppelbindung reduzierte, wobei als Nebenprodukt Substanz **5a** gebildet wurde, wurde zu anderen Reduktionsmitteln gegriffen (Schema 26). Die Reduktion mit Natriumborhydrid in Ethanol führte ebenso zur Bildung von

Nebenprodukt **5a**. Das BF_3*OEt_2/DIBAL-System[59,60] reduzierte das Substrat **4** vollständig sogar bei -78 °C und lieferte ein Dialdehyd **5b** (Schema 26).



Schema 26: Reduktion von Methylester (4).

Nur die Versuche mit DIBAL führen zur gewünschten selektiven Reduktion von Methylester **4** (Schema 26). Wurde 1 M DIBAL-Lösung in THF in kleineren Mengen zugesetzt (3,5 Äq.) kam es zur unvollständigen Reaktion. Erst bei der Zugabe von 8 Äq. wurde ein vollständiger Edukt-Umsatz erreicht und ergab das gewünschte Produkt **5**. Der größere Überschuss an diesem Reduktionsmittel (10 Äq.) lieferte Nebenprodukt **5c**, bei dem beide Methyl- und *tert*-Butylester zu den Alkoholgruppen reduziert wurden (Schema 26). Bei der Anwendung von 1M DIBAL in Hexan reichten 2,5 Äquivalente für den vollständigen Umsatz des Methylesters **4** zu Alkohol **5**.

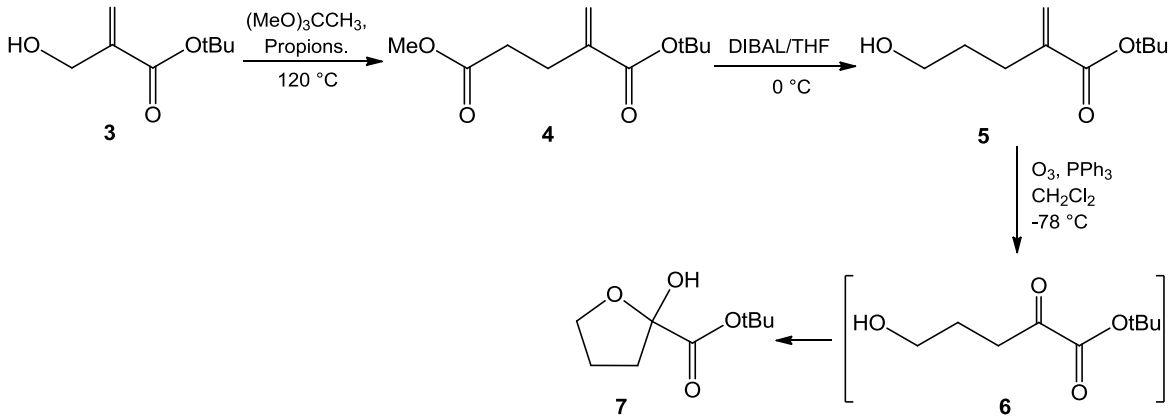
Somit zeigten sich die folgenden Reaktionsbedingungen für die Reduktion von Methylester **4** zu dem Alkohol **5** als optimal: eine Temperatur von 0 °C, 2,5 Äquivalente an 1 M DIBAL-Lösung in Hexan und das langsame Zutropfen von Reduktionsmittel (ca. ein Tropfen pro Sekunde). Ein vollständiger Umsatz von Substrat war unmittelbar nach der Reduktionsmittel-Zugabe durch Dünnschichtchromatographie zu detektieren. Die besten Ausbeuten wurden durch die Verwendung von wenigen Tropfen konzentrierter Essigsäure für eine bessere Phasentrennung während der Aufarbeitung erreicht.

Tabelle 2: Versuche zur Reduktion von 1-tert-Butyl-5-methyl-2-methylenpentadioat (4).

Reduktionsmittel	Äqui-valente	Lösungsmittel	Tempe-ratur	Zeit	Ergebnis
$NaBH_4$/LiCl	4/4	THF:MeOH (2:1)	0 °C→rt	18h	Kein Umsatz
$NaBH_4$/LiCl	4/4	THF:EtOH (2:1)	0 °C→rt	17h	**4, 5, 5a** (0,5:1:1)
$NaBH_4$	5	EtOH	0 °C→rt	18h	**4, 5, 5a** (0,1:0,1:1)
1M DIBAL-Toluol	2,5	CH_2Cl_2	0 °C→rt	2,5h	**4, 5** stark verunreinigt
1M DIBAL-Hexan	2,5	CH_2Cl_2	0 °C→rt	2,5h	**5c**
BF3*OEt2/1M DIBAL-Hexan	1,1/3,1	CH_2Cl_2	-78 °C	5h	**5b**
1 M DIBAL-THF	1,2	THF	-17→0 °C	4h	Kein Umsatz
1 M DIBAL-THF	1,5	THF	-17→rt	5h	Kein Umsatz
1 M DIBAL-THF	3,5	THF	0 °C→rt	3,5h	**4, 5** (1:1)
1 M DIBAL-THF	4	THF	0 °C→rt	3,5h	**4, 5** (1:1,1)
1 M DIBAL-THF	6	THF	0 °C→rt	3,5h	**4, 5** (0,25:1)
1 M DIBAL-THF	4	THF	0 °C→rt	17h	**4, 5** (1:1)
1 M DIBAL-THF	10	THF	0 °C	1,5h	**5, 5c** (1:1,13)
1 M DIBAL-THF	8	THF	0 °C	1,5h	**5** (53 %)
1 M DIBAL-THF	8	THF	0 °C→rt	13h	**5c** (33 %)
1 M DIBAL-THF	8	THF	0 °C	1,5h	**5** (50 %)
1 M DIBAL-THF	8 + 0,5	THF	0 °C	4h	**5** * (82 %)
1 M DIBAL-Hexan	1,5+1,5	THF	0 °C	DC	**5** * (48 %)
1 M DIBAL-Hexan	2,5	THF	0 °C	DC	**5** (57 %)
1 M DIBAL-Hexan	2,5	THF	0 °C	DC	**5** * (74 %)
1 M DIBAL-Hexan	2,5	THF	0 °C	DC	**5** * (70 %)

* Aufarbeitung mit Essigsäure; DC – Kontrolle durch Dünnschichtchromatographie; die Zahlen in der Spalte „Ergebnis“ beziehen sich auf die Substanzen aus dem Schema 26.

Durch die Ozonolyse von Verbindung **5** bei -78 °C mit anschließender Reaktion mit Triphenylphosphin sollte die Doppelbindung in die α-Ketogruppe umgewandelt werden. Wahrscheinlich schließt die Verbindung **6**, die nicht isoliert wurde, sofort nach ihrer Bildung in einen 5-gliedrigen Ring **7** (Schema 27). Die Struktur von zyklischem Isomer **7** wurde mittels NMR-Spektroskopie bestätigt. Die erhaltene ^{13}C- und ^{1}H-NMR-Spektren stimmen mit den publizierten Literaturdaten überein.[61]

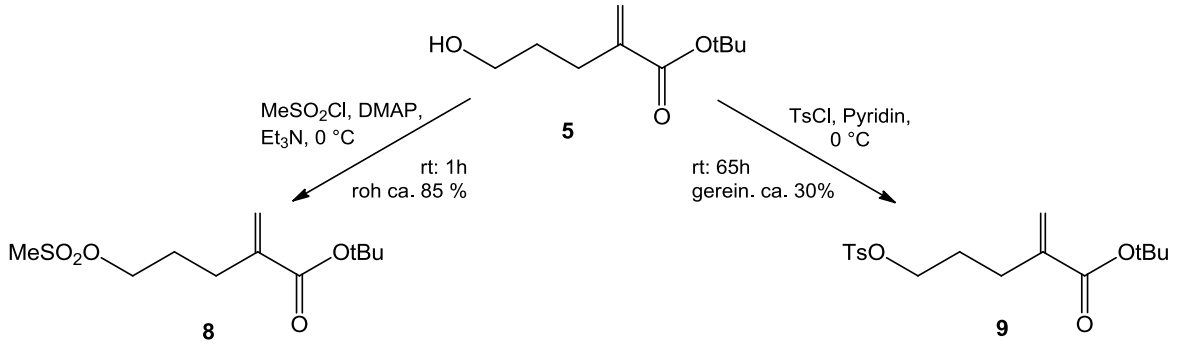


Schema 27: Claisen-Johnson Umlagerung, Reduktion und Ozonolyse.

Vermutlich entsteht dieser 5-gliedrige Ring durch Bildung eines Halbacetals zwischen der neugebildeten α-Carbonylgruppe an dem C_2-Atom und der Hydroxygruppe des C_5-Atoms. Um einen Ringschluss zu vermeiden, wurde die C_5-Hydroxygruppe der Verbindung **5** vor der Ozonolyse in den Mesylester **8** überführt (Schema 28).

Die Einführung des Mesylats ist für die Aktivierung der Hydroxygruppe zur folgenden nukleophilen Substitution durch ein Cyanid notwendig (Schema 23) und wurde in Dichlormethan bei 0 °C durch Zugabe von katalytischen Mengen an Dimethylaminopyridin, Triethylamin und Methansulfonylchlorid durchgeführt.[62] Die Reinheit des Produktes konnte durch NMR-Spektroskopie bestätigt werden, sodass das Rohprodukt ohne weitere Reinigungsschritte in der anschließenden Ozonolyse eingesetzt werden konnte.

Alternativ zur Mesylat-Gruppe wurde die Aktivierung der Hydroxygruppe über eine Tosylat-Gruppe durchgeführt. Die Reaktion von Alkohol **5** mit *p*-Toluolsulfonylchlorid in Dichlormethan in Anwesenheit von Pyridin als Base[63] brachte keine guten Ausbeuten an Tosylether **9** (Schema 28). Außerdem dauerte die Reaktion bis zu 65 Stunden. Im Gegensatz zu Mesylat war es notwendig, das tosylierte Rohprodukt **9** vor der weiteren Ozonolyse zu reinigen. Aus diesen Gründen wurde im weiteren Verlauf der Synthese nur mehr die Mesylierungsreaktion verwendet.



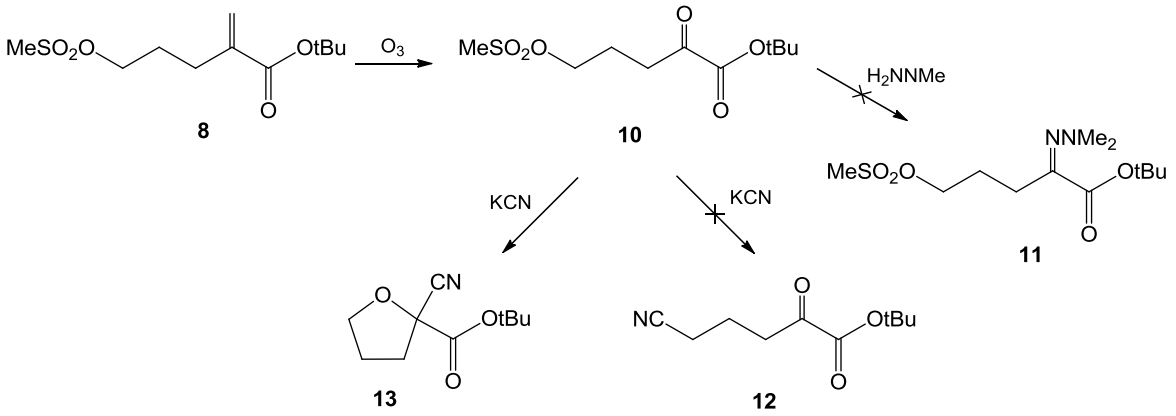
Schema 28: Vergleich Mesylierungs- und Tosylierungs-Reaktionen.

Die Ozonolyse des Mesylesters **8** wurde bei -78 °C in abs. Dichlormethan durchgeführt. Ozon wurde bis zur Sättigung der Lösung (Blaufärbung) eingeleitet und anschließend durch Zugabe von Triphenylphosphin das intermediative Ozonoid umgesetzt. Säulenchromatographische Reinigung ergab Verbindung **10** als offenkettige Verbindung (Schema 29).

Im nächsten Schritt sollte die α-Ketogruppe durch N,N-Dimethylhydrazon ersetzt werden (**10** →**11** Schema 29). Die Reaktion mit N,N-Dimethylhydrazin wurde bei Raumtemperatur in Diethylether als Lösungsmittel über Nacht durchgeführt. Nachdem die Bildung des Hydrazons an dieser Stufe erfolglos war, wurde zunächst die Cyanierung des Methylsulfonylesters versucht (**10** → **12** Schema 29).

Die Cyanierung wurde nach der Vorschrift aus der Arbeit von Utech *et al.*[63] durchgeführt. Hierbei wurde das Substrat mit 10-fachem Äquivalent-Überschuss von KCN in Dimethylformamid als Lösungsmittel versetzt und bis auf 120 °C erhitzt. In späteren Versuchen stellte sich heraus, dass für den Ablauf der Reaktion ein Erhitzen auf 80-90 °C ausreichend war.

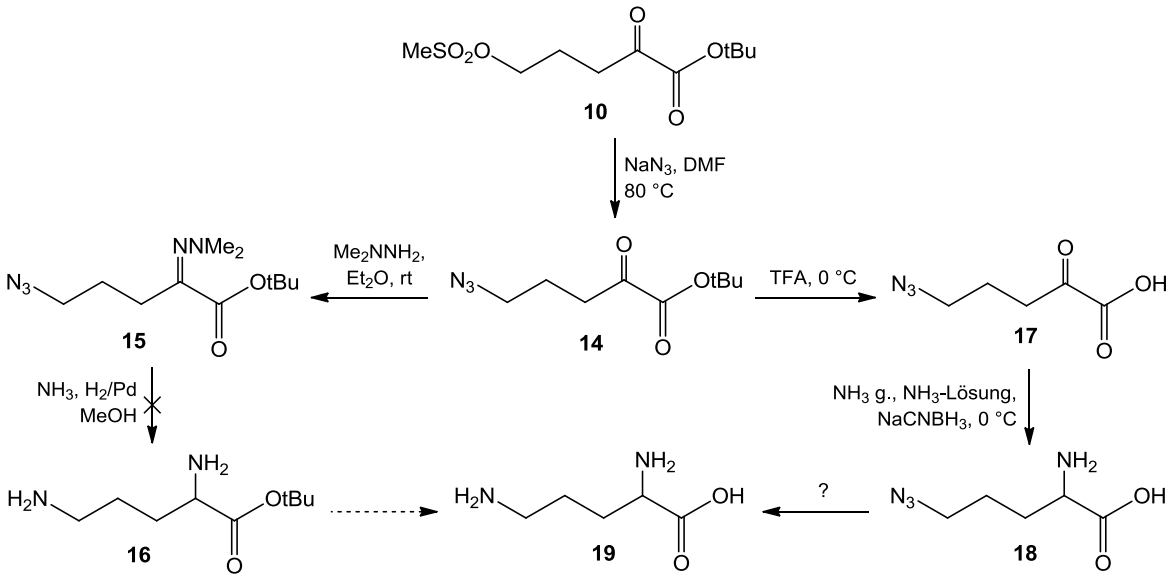
Grundsätzlich hätte auch Kaliumcyanid als weitere günstige Isotopenquelle verwendet werden können. Unter diesem Gesichtspunkt und unter Berücksichtigung der sehr geringen Löslichkeit des Kaliumcyanids in organischen Lösungsmitteln war geplant, den minimal notwendigen Überschuss an KCN zu bestimmen. Dieser Plan wurde schlussendlich jedoch nicht umgesetzt, da die Cyanierungsreaktion zu einem unerwarteten Ergebnis führte: Anstelle des gewünschten Cyanids **12** bildete sich wieder eine zyklische Verbindung **13** (Schema 29). Die Struktur der Verbindung **13** wurde durch NMR-Spektroskopische Methoden aufgeklärt. Die erhaltenen spektroskopischen Daten zeigten Analogie zu dem in der Literatur beschriebenen zyklischen Cyanid.[64] Es wird vermutet, dass bei diesen Reaktionsbedingungen die Bildung des 5-gliedrigen Rings noch vor der nukleophilen Substitution stattfindet.



Schema 29: Ozonolyse, Reaktion mit Hydrazin und Cyanierungsreaktion.

Die Herausforderung dieser Reaktionsfolge und die Reaktionsbedingungen zur Einführung des Cyanids, der Umsetzung zum Hydrazon und Optimierung der anschließenden Reduktion zum Amin müssen in zukünftiger Forschungsarbeit gelöst werden.

Zur Synthese von Ornithin wurde die Mesylestergruppe der Verbindung **10** durch ein Azid ersetzt (**10** → **14** Schema 30). Die Verbindung **10** wurde dazu mit Natriumazid in Dimethylformamid als Lösungsmittel bei 80 °C für ca. zwei Stunden erhitzt.[63] Nach der säulenchromatographischen Reinigung wurde Azid **14** erhalten. In den nachfolgenden Schritten wurde angestrebt, die α-Ketogruppe der Verbindung **14** durch zwei mögliche Wege in eine α-Aminogruppe umzusetzen (Schema 30).



Schema 30: Reaktion mit Azid und zwei mögliche Synthesewege zu Aminosäure Ornithin.

Der erste Weg erfolgte über die Reaktion mit N,N-Dimethylhydrazin[65] mit nachfolgender Reduktion durch den Wasserstoff, bei der sowohl die Dimethylhydrazyl- als auch die Azid-

Gruppe, in Aminogruppen überführt werden sollten. Hydrazon **15** wurde nach der säulenchromatographischen Reinigung mit einer Ausbeute von nur 22 % erhalten und die Reduktion von **15** mit H_2/Pd in der Durchflusshydrierapparatur lieferte nicht das gewünschte Ergebnis (**15** → **16** Schema 30).

Im zweiten Weg wurde versucht, die α-Ketogruppe der Verbindung **14** durch eine reduktive Aminierung in eine Aminogruppe umzuwandeln. Dafür sollte der *tert*-Butylester zunächst abgespalten werden. Während die Abspaltung des *tert*-Butylesters mit gasförmiger HCl[1] nicht zum gewünschten Produkt führte, erhielt man durch die Reaktion mit Trifluoressigsäure[66] bei 0 °C eine qualitative Ausbeute von **17**.

Die reduktive Aminierung erfolgte in konzentrierter Ammoniaklösung unter Zugabe von $CuSO_4$ und NH_4Cl durch Durchblasen von Ammoniak-Gas und anschließender Zugabe des Reduktionsmittels.[51] Bei Verwendung von Natriumborhydrid als Reduktionsmittel wurde ein Gemisch aus Ornithin **19** und Azidoaminosäure **18** erhalten (ermittelt durch NMR-Analyse). Eine selektive Reduktion gelang mit Natriumcyanoborhydrid, wobei ausschließlich die α-Carbonylgruppe des Substrats **17** reduziert wurde, was nur ein Produkt **18** lieferte.

Es gibt zahlreiche Möglichkeiten ein Azid in eine Aminogruppe umzuwandeln (siehe Seite 21). Die meisten davon eignen sich für Azide mit guter Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, aber in vorliegendem Fall löste sich die Verbindung **18** in organischen Lösungsmitteln sehr schlecht oder gar nicht. Um Azid **18** zu reduzieren, wurden mehrere Methoden herangezogen (Tabelle 3): Reduktion mit Wasserstoff, Staudinger-Reduktion mit Triaklyl- und Triarylphosphinen, Reduktion mit Dithiothreitol (DTT), Reduktion mit Zink und mit Natriumborhydrid.

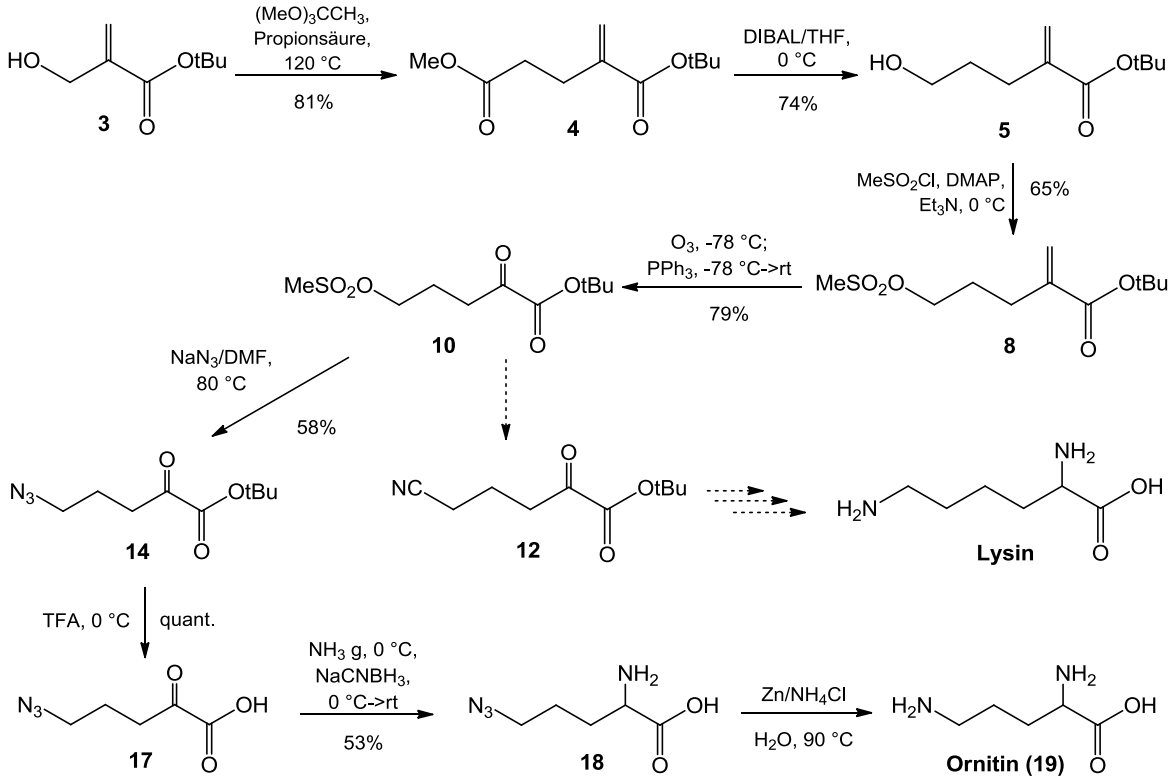
In Tabelle 3 sind die erprobten Reaktionen zusammengefasst. Die Reduktion mit Zink-Staub in Wasser mit NH_4Cl bei 100 °C ergab die besten Ergebnisse. Dass bis zu 75 % des gewünschten Produkts **19** entsteht, wurde mit ^{1}H-NMR- und Massenspektroskopischen Methoden nachgewiesen, wenn auch die Reproduzierbarkeit dieser Reaktion durch nachfolgende Experimente noch zu optimieren ist (Tabelle 3).

In Schema 31 sind die durchgeführten Reaktionen des Synthesewegs zu Aminosäuren Ornithin und Lysin zusammengefasst. Die zu optimierenden Stufen im Syntheseweg zu Lysin sind durch punktierten Pfeil dargestellt.

Tabelle 3: Versuche zur Reduktion von Azid zu Amin.

Methode	Lösungsmittel	Bedingungen	Ergebnis laut NMR
H_2/Pd	H_2O	rt	unident. NP, **19**
H_2/Re-Ni	H_2O:MeOH (1/1)	rt	unident. NP
PPh_3	THF:H_2O (1/2)	20h; rt	kein Umsatz
PPh_3	THF:0,1M NaOH (1/2)	18h; rt	uniden.NP
P(n-Bu)$_3$	THF:0,1M NaOH (1/2)	18h; rt	uniden.NP
Zn/NH_4Cl	EtOH:H_2O	1h; 90 °C	**18**, Spur von **19**
Zn/NH_4Cl	H_2O	6h 100 °C	**18**/**19** (1/1)
Zn/NH_4Cl	H_2O	19h; 90 °C	**19** (75 %)
Zn/NH_4Cl	H_2O	19h; 90 °C	wenig Umsatz
Zn/NH_4Cl	H_2O	19h; 90 °C	wenig Umsatz
DTT	H_2O:DIPA= 3/1	3h; rt	uniden. NP
$NaBH_4$/ $CoCl_2$*6H_2O	H_2O	1h; rt	uniden. NP

unident. NP – Nebenprodukt wurde nicht identifiziert; DTT – Dithiothreitol; **18** – Azidonorvalin; **19** – Ornithin.



Schema 31: Zusammenfassung der durchgeführten Reaktionen.

4 Experimenteller Teil

4.1 Allgemeine Methoden

Die ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren wurden auf einem „Avance DPX 400“ Spektrometer der Firma Bruker aufgenommen. Alle Messungen wurden standardmäßig bei 298 K durchgeführt. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm (parts per million) angegeben und die Kopplungskonstanten J in Hz (Herz). Das Referenzieren erfolgte auf das entsprechende deuterierte Lösungsmittel ($CDCl_3$: ^{1}H-Spektren δ= 7,26; ^{13}C-Spektren δ= 77,16; D_2O: ^{1}H-Spektren δ= 4,79).

Elektronenstoß-Ionisations-Massenspektren wurden mit einem Finnigan MAT 8230-Gerät aufgenommen.

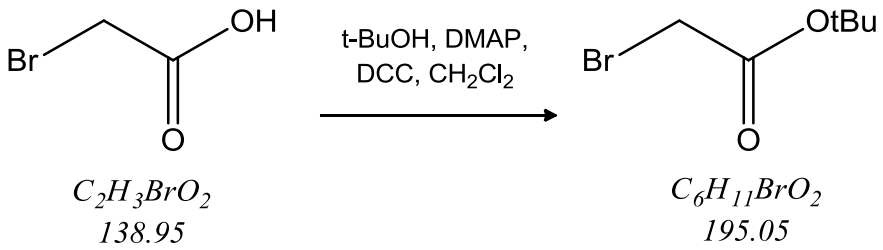
Zur Dünnschichtchromatographie dienten mit Kieselgel 60 und Fluoreszenz-Indikator UV_{254} beschichtete Aluminium-Fertigfolien der Firma Macherey-Nagel. Die Detektion erfolgte durch Eintauchen in $KMnO_4$-Lösung (1,5 g $KMnO_4$, 10 g K_2CO_3, 1,25 mL 10 %-iger NaOH, 200 mL H_2O) bzw. Ammoniummolibdat-Cersulfat-Lösung mit anschließender Verkohlung mittels Hotgun oder Einfärben mit Ninhydrin.

Die säulenchromatographische Trennung wurde mit Merk-Kieselgel 60 (0,0040-0,0063 mm) durchgeführt.

Die verwendeten Lösungsmittel wurden destilliert. Die absolutierten Lösungsmittel wurden über 4Å Molekularsieb aufbewahrt. Dichlormhetan wurde vor dem Gebrauch über Alox filtriert. Triethylamin wurde durch Destillieren über Calciumhydrid getrocknet. Wasserfreies Tetrahydrofuran wurde entweder bei den Firmen Acros oder Fluka erworben.

4.2 Durchgeführte Reaktionen

4.2.1 tert-Butylbromacetat (1)



$C_2H_3BrO_2$
138.95

$C_6H_{11}BrO_2$
195.05

Ausgangsstoff, Reagenzien und Lösungen

Bromessigsäure ($C_2H_3BrO_2$; 138,95 g/mol; 1 Äq.; 22,013 g; 0,158 mol)

tert-Butanol ($C_4H_{10}O$; 74,12 g/mol; 0,775 g/mL; 2 Äq.; 0,317 mol; 35 mL)

Dimethylaminopyridin ($C_7H_{10}N_2$; 122,17 g/mol; 0,1 Äq.; 0,016 mol; 1,93 g)

Dicyclohexylcarbodiimid ($C_{13}H_{22}N_2$; 206,33 g/mol; 0,95 g/mL; 1,03 Äq.; 0,163 mol; 35 mL)

Dichlormethan abs.; HCl 0,5 M; $NaHCO_3$ 2% Lösung; H_2O 40 mL

Durchführung:

Bromessigsäure, *tert*-Butanol und DMAP wurden in einem 500 mL Dreihalskolben in 100 mL abs. Dichlormethan gelöst. Der Kolben wurde mit einem großen Magnetrührkern und einem Tropftrichter ausgerüstet. In den Tropftrichter wurde das in 100 mL abs. Dichlormethan gelöste DCC gegeben (vorher im Wasserbad bei 45 °C geschmolzen). Nachdem das Reaktionsgefäß unter Argon-Atmosphäre auf 0 °C gebracht wurde, wurde die DCC-Lösung langsam zugetropft. Nach der Zugabe von DCC wurde die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Danach wurde die Reaktionsmischung in ca. 240 mL Dichlormethan aufgenommen und der gebildete Niederschlag (Dicyclohexylharnstoff) abfiltriert. Das Filtrat wurde mit 0,5 M HCl-Lösung (3 x 120 mL), 2% $NaHCO_3$ (3 x 120 mL) und schließlich mit Wasser (1 x 120 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Das Rohprodukt wurde mittels Kugelrohrdestillation gereinigt (bei ca. 12 Torr, bis auf 100 °C). Es wurde eine farblose, fruchtig riechende Flüssigkeit erhalten.

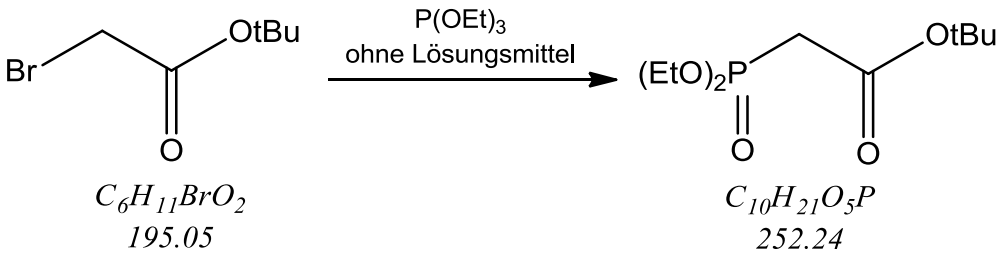
Ausbeute: 21,054 g, 68 % d. Th.

^{1}H-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 3.74 (s, 2H, Br-C**H$_2$**-); 1.48 (s, 9H, -C(C**H$_3$**)$_3$)

^{13}C-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 166.39 (>**C**=O); 83.01(-**C**$(CH_3)_3$); 27.97 (Br-**C**H_2-); 27.79 (-C(**C**H_3)$_3$)

EI-MS: m/z [Interpretation] rel. Intensität: 216.98 $[M+Na]^+$ 3 %; 160.92 $[M+Na-C_8H_{10}]^+$ 1,5 %

4.2.2 tert-Butyl-2-(diethylphosphono)acetat (2)



$C_6H_{11}BrO_2$
195.05

$C_{10}H_{21}O_5P$
252.24

Ausgangsstoff, Reagenzien und Lösungen

tert-Butyl-2-bromacetat (1) ($C_6H_{11}BrO_2$, 195,05 g/mol; 1 Äq.; 20,972 g; 0,108 mol;)

Triethylphosphit ($C_6H_{15}O_3P$; 166,157 g/mol; 0,97 g/mL; 1,02 Äq.; 0,110 mol; 20 mL)

Durchführung

tert-Butyl-2-bromacetat und Triethylphosphit wurden in einen 100 mL Zweihalskolben (mit Rückflusskühler) gegeben und 6h bei 65 °C gerührt. Das entstandene Ethylbromid wurde am Rotationsverdampfer entfernt (60 °C, 20 mbar, ca. 1h).

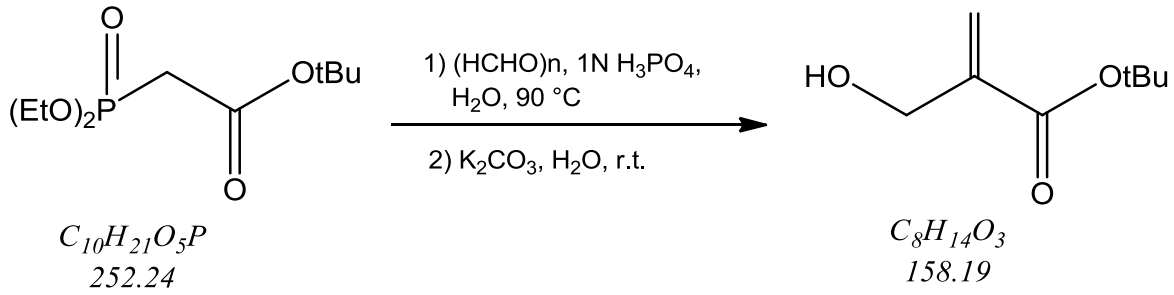
Ausbeute: 27,118 g, quantitativ.

^{1}H-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 4.16 (quint., 4H, J= 7.05 Hz, (CH_3-C**H$_2$**O)$_2$-); 2.87 (d, 2H, J= 21.41 Hz, >P(=O)-C**H$_2$**-); 1.47 (s, 9H, -C(C**H$_3$**)$_3$); 1.34 (t, 6H, J= 7.02 Hz, (C**H$_3$**-CH_2O)$_2$-)

^{13}C-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 165.05 (d, J= 6.60 Hz, -**C**O$_2$tBu); 82.12 (s, -**C**(CH_3)$_3$); 62.60 (d, J= 6.43 Hz, (CH_3-**C**H_2O)$_2$-); 35.76 (d, J= 132.98 Hz, >P(=O)-**C**H_2-); 28.08 (s, -C(**C**H_3)$_3$); 16.48 (d, J= 6.31 Hz, (**C**H_3-CH_2O)$_2$-)

EI-MS: m/z [Interpretation]: 275.10 $[M+Na]^+$

4.2.3 tert-Butyl-2-(hydroxymethyl)acrylat (3)



$C_{10}H_{21}O_5P$
252.24

$C_8H_{14}O_3$
158.19

Ausgangsstoff, Reagenzien und Lösungen

tert-Butyl-2-(diethylphosphono)acetat (2) ($C_{10}H_{21}O_3P$; 252,24 g/mol; 1 Äq.; 24,121 g; 0,095 mol)

Paraformaldehyd ((HCHO)n; 30,03 g/mol; 4 Äq.; 0,380 mol; 11,40 g)

Kaliumcarbonat (K_2CO_3; 138,20 g/mol; 1,6 Äq.; 0,152 mol; 20,98 g)

1N Phosphorsäure; H_2O dest.; Diethylether dest.; NaCl gesättigte wässrige Lösung

Durchführung

In einen 500 mL-Dreihalskolben mit einem Rückflusskühler wurden Paraformaldehyd, 90 mL H_2O und 1 mL 1N H_3PO_4 gegeben und unter ständigem Rühren auf 90 °C erhitzt. Nachdem Paraformaldehyd depolymerisiert worden war (ca. 2,5h) und die Lösung klar geworden war, wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur gekühlt. Dann wurde *tert*-Butyl-2-(diethylphosphono)acetat mithilfe des Tropftrichters zugegeben und anschließend die K_2CO_3-Lösung (in ca. 15 mL H_2O) langsam zugetropft, sodass eine Temperatur der Reaktionsmischung von 35-40 °C nicht überschritten wurde. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht (ca. 18h) bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Reaktionsmischung in 140 mL Diethylether aufgenommen und mit 90 mL gesättigter NaCl Lösung gewaschen. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde mit Diethylether gewaschen (3 x 90 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden noch einmal mit 60 mL gesättigter NaCl Lösung gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt (ölartige, leicht gelb gefärbte Flüssigkeit) wurde mittels Destillation gereinigt. Um Polymerisation zu vermeiden, wurde dem Rohprodukt vor der Destillation etwas Hydrochinon zugesetzt (eine Spatelspitze).

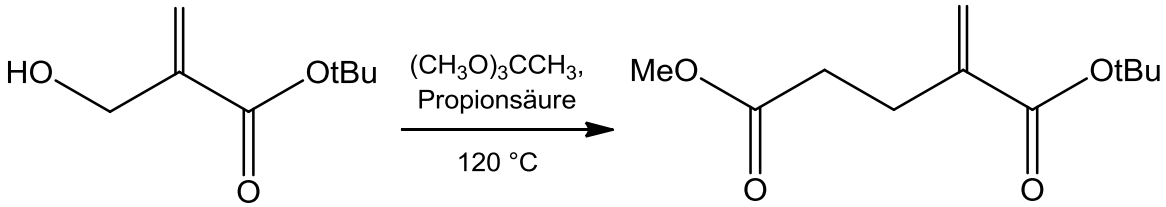
Ausbeute: 8,774 g, 58 % d. Th.

^{1}H-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 6.15 (s, 1H, >C=C**H**$_2$); 5.74 (s, 1H, >C=C**H**$_2$); 4.29 (s, 2H, -C**H**$_2$OH); 2.27 (br. s, 1H, -O**H**); 1.51(s, 9H, -C(C**H**$_3$)$_3$)

^{13}C-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 165.86 (>**C**=O); 141.00 (>**C**=CH_2); 124.97 (>C=**C**H_2); 81.56 (-**C**$(CH_3)_3$); 63.03 (-**C**H_2OH); 28.24 (-C(**C**H_3)$_3$)

EI-MS: m/z [Interpretation]: 181.09 $[M+Na]^+$

4.2.4 1-tert-Butyl-5-methyl-2-methylenpentandioat (4)



$C_8H_{14}O_3$
158.19

$C_{11}H_{18}O_4$
214.26

Ausgangsstoff, Reagenzien und Lösungen

tert-Butyl-2-(hydroxymethyl)acrylat (3) ($C_8H_{14}O_3$, 158,19 g/mol; 1 Äq; 1,454 g; 9,19*10^{-3} mol)

Trimethylortoacetat ($C_5H_{12}O_3$, 120,15; 0,956 g/mL; 5 Äq; 4,59*10^{-2} mol; 5,80 mL)

Propionsäure ($C_3H_6O_2$, 74,08; 0,99 g/mL; 0,1 Äq; 9,19*10^{-4}; 68 µL (= 17 µLx 4)

1 M HCl-Lösung; NaCl gesättigte wässrige Lösung; Diethylether dest.

Durchführung

tert-Butyl-2-(hydroxymethyl)acrylat, Trimethylorthoacetat und das erste Aliquot Propionsäure (17 µL) wurden in einen Zweihalsrundkolben gegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 120 °C 5h gerührt, wobei die drei restlichen Aliquote an Propionsäure in einstündigem Abstand zugegeben wurden. Der Verlauf der Reaktion wurde mittels DC kontrolliert (Laufmittel PE:EE=8:2, Färbereagenz $KMnO_4$). Nach der Beendigung der Reaktion wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur gekühlt und aufgearbeitet. Dazu wurde die Reaktionsmischung im Diethylether aufgenommen (ca. 15 mL). Für die Hydrolyse des überschüssigen Orthoester wurden ca. 15 mL 1 M HCl zugegeben. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl Lösung gewaschen (3 x 15 mL). Die wässrige Phase wurde noch ein Mal mit Ether extrahiert und verworfen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Produkt ergab eine klare, ölige Substanz.

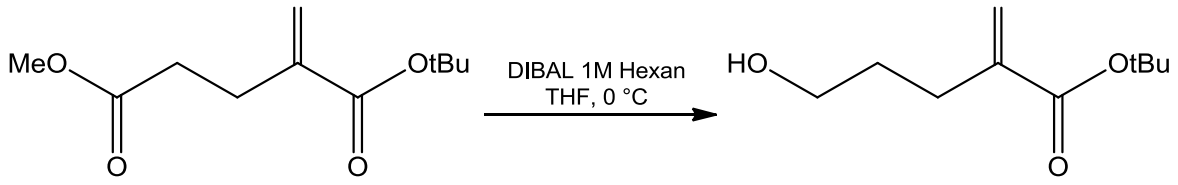
Ausbeute: 1,683 g, 81 % d. Th.

^{1}H-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 6.09 (s, 1H, >C=C**H**$_2$); 5.50 (s, 1H, >C=C**H**$_2$); 3.67 (s, 3H, -OC**H$_3$**); 2.62-2.58 (m, 2H, MeO_2C-C**H$_2$**-CH_2-); 2.53-2.49 (m, 2H, -CH_2-**CH_2**-C(=CH_2)-); 1.49 (s, 9H, -C(C**H$_3$**)$_3$)

^{13}C-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 173.43 (-**C**O_2Me); 166.08 (-**C**O_2tBu); 140.72 (>**C**=CH_2); 124.83 (>C=**C**H_2); 80.95 (-**C**$(CH_3)_3$); 51.72 (-O**C**H_3); 33.24 (MeO_2C-**C**H_2-CH_2-); 28.22 (-C(**C**$H_3)_3$); 27.59 (-CH_2-**C**H_2-C(=CH_2)-)

EI-MS: m/z [Interpretation] rel. Intensität: 181.05 $[M+Na-C_4H_8]^+$ 3.2 %; 237.11 $[M+Na]^+$ 3.3 %; 253.08 $[M+K]^+$ 0.5 %

4.2.5 tert-Butyl-5-hydroxy-2-methylenpentanoat (5)



$C_{11}H_{18}O_4$
214.26

$C_{10}H_{18}O_3$
186.25

Ausgangsstoff, Reagenzien und Lösungen

1-*tert*-Butyl-5-methyl-2-methylenpentadioat (4) ($C_{11}H_{18}O_4$, 214,26 g/mol; 1 Äq.; 5,745 g; 0,028 mol)

DIBAL 1 M Hexan-Lösung (2,5 Äq; 0,067 mol; 67 mL)

THF wasserfrei 50 mL

1 M HCl-Lösung; Ethylacetat; NaCl gesättigte wässrige Lösung

Durchführung

In einem Dreihalskolben wurde 1-*tert*-Butyl-5-methyl-2-methylenpentanoat abgewogen. Der Kolben wurde mit einem Rührkern, einem Septum und einem Tropftrichter ausgerüstet und unter Argon-Atmosphäre gebracht. THF wurde mithilfe einer Spritze zugegeben und das gelöste Substrat wurde auf 0 °C gekühlt. DIBAL-Lösung wurde mittels einer Spritze in den Tropftrichter gegeben. Dann wurde DIBAL langsam zur gekühlten Reaktionsmischung zugetropft (1 Tropfen pro Sekunde). Nach vollständiger Zugabe von DIBAL wurde eine DC-Kontrolle gemacht (Laufmittel EE:PE= 2:8, Färbereagenz $KMnO_4$-Lösung), die zeigte, dass der Ausgangsstoff verbraucht war. Dann wurde die Reaktionsmischung in 50 mL Ethylacetat aufgenommen und 20 mL 1 M HCl zugegeben. Die Phasen wurden getrennt (bei schlechter Phasentrennung wurde konzentrierte Essigsäure zugesetzt). Die organische Phase wurde 3 Mal mit 1 M HCl gewaschen (je 30 mL), über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt (Essigsäure wurde an der Pumpe entfernt).

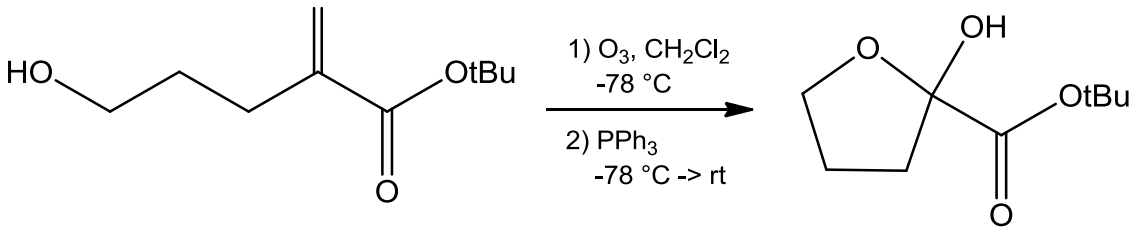
Ausbeute: 4,477 g, 89 % d. Th.

^{1}H-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 6.08 (s, 1H, >C=C**H**$_2$); 5.51 (s, 1H, >C=C**H**$_2$); 3.64 (t, 2H, J= 6.32 Hz, -C**H**$_2$OH); 2.37 (t, 2H, J= 7.46 Hz, -CH_2-C**H**$_2$-C(=CH_2)-); 1.74 (quint., 2H, J= 7.46 Hz, J= 6.32 Hz, -CH_2-C**H**$_2$-CH_2-); 1.50 (s, 9H, -C(C**H**$_3$)$_3$)

^{13}C-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 166.99 (>**C**=O); 141.94 (>**C**=CH_2); 124.46 (>C=**C**H_2); 80.89 (-**C**$(CH_3)_3$); 62.01 (-**C**H_2OH); 32.19 (-CH_2-**C**H_2-CH_2-); 28.21(-C(**C**$H_3)_3$); 28.08 (-**C**H_2-C(=CH_2)-)

EI-MS: m/z [Interpretation] rel. Intensität: 209.11 $[M+Na]^+$ 2.2 %; 225.11 $[M+K]^+$ 0.4 %

4.2.6 tert-Butyl-2-hydroxytetrahydrofuran-2-carboxylat (7)



$C_{10}H_{18}O_3$
186.25

$C_9H_{16}O_4$
188.22

Ausgangsstoff, Reagenzien und Lösungen

tert-Butyl-5-hydroxy-2-methylenpentanoat (5) ($C_{11}H_{18}O_3$; 186,25 g/mol; 1 Äq.; 0,034 g; 1,83*10^{-4} mol)

Triphenylphosphin ($C_{18}H_{15}P$; 262,29 g/mol; 2 Äq.; 3,65*10^{-4} mol; 0,096 g)

Dichlormethan abs. 25 mL

Durchführung

tert-Butyl-5-hydroxy-2-methylenpentanoat wurde in Dichlormethan in einem 100 mL-Dreihalskolben gelöst, unter Argon-Atmosphäre gebracht und auf -78 °C gekühlt. Durch die Lösung wurde Ozon geleitet, bis sich diese blau verfärbte. Danach wurde Luft durch die Lösung geleitet, bis die Lösung wieder farblos geworden war. Anschließend wurde Triphenylphosphin zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht gerührt, wobei die Temperatur langsam auf Raumtemperatur stieg. Methylenchlorid wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt (Laufmittel: PE:EE=7:1).

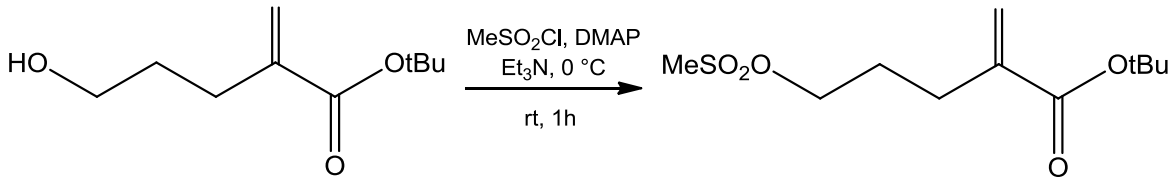
Ausbeute: 0,022 g, 64 % d. Th.

^{1}H-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 4.13-4.07 (m, 1H, -OC**H**$_2$-); 3.98-3.92 (m, 1H, -OC**H**$_2$-); 2.38-2.31 (m, 1H, -CH_2-C**H**$_2$-CH_2-); 2.14-2.07 (m, 1H, -CH_2-C**H**$_2$-CH_2-); 2.05-1.97 (m, 2H, -C**H$_2$**-CO(OH)-); 1.50 (s, 9H, -C(C**H$_3$**)$_3$)

^{13}C-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 170.66 (-**C**O_2tBu); 102.71 (tBuO_2C-**C**(OH)-O-); 83.37 (-**C**$(CH_3)_3$); 69.66 (-O**C**H_2-); 35.27 (-**C**H_2-CO(OH)-); 28.14 (-C(**C**$H_3)_3$); 25.72 (-CH_2-**C**H_2-CH_2-)

EI-MS: m/z [Interpretation] rel. Intensität: 57.1 $[C_4H_9]^+$ 80 %; 87.1 $[M\text{-}CO_2\text{-}C_4H_9]^+$ 100 %

4.2.7 tert-Butyl-2-methylen-5-[(methylsulfonyl)oxy]pentanoat (8)



$C_{10}H_{18}O_3$
186.25

$C_{11}H_{20}O_5S$
264.34

Ausgangsstoff, Reagenzien und Lösungen

tert-Butyl-5-hydroxy-2-methylenpentanoat (5) ($C_{10}H_{18}O_3$, 186,25 g/mol; 1 Äq.; 8,05*10^{-4} mol; 0,151 g)

Methansulfonylchlorid (CH_3ClO_2S; 114,55 g/mol; 1,48 g/mL; 2 Äq.; 1,61*10^{-3} mol; 125 µL)

N,N-Dimethylaminopyridin ($C_7H_{10}N_2$, 122,17 g/mol; 0,1 Äq.; 8,05*10^{-5} mol; 0,01 g)

Triethylamin (Et_3N; $C_6H_{15}N$; 101,19 g/mol; 0,73 g/mL; 3 Äq.; 2,42*10^{-3} mol; 335 µL)

Dichlormethan abs., Ethylacetat, 1 M HCl, 5 % $NaHCO_3$, H_2O dest.

Durchführung

Das Substrat wurde in einem Dreihalskolben in 10 mL Dichlormethan abs. gelöst, unter Argon-Atmosphäre gebracht und auf 0 °C gekühlt. Dann wurden DMAP, Et_3N und MsCl zugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur 1h gerührt (DC-Kontrolle: Laufmittel PE:EE= 8:2, Entwicklungsmittel $KMnO_4$-Lösung). Dann wurde die Reaktionsmischung mit 10 mL EE verdünnt und mit 10 mL H_2O extrahiert. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase wurde je 1 Mal mit 10 mL 1 M HCl, 10 mL 3 % $NaHCO_3$ und 10 mL H_2O gewaschen. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt entweder mittels Säulenchromatografie gereinigt (Laufmittel: PE:EE= 7:3) oder als Rohprodukt weiter zur Ozonolyse eingesetzt.

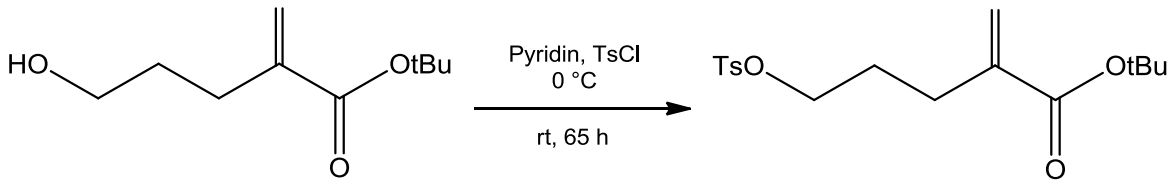
Ausbeute: 0,138 g, 65 % d. Th.

^{1}H-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 6.11 (s, 1H, >C=C**H**$_2$); 5.52 (s, 1H, >C=C**H**$_2$); 4.24 (t, 2H, J= 6.35 Hz, -C**H**$_2$OMs); 3.01 (s, 3H, -SO_3C**H**$_3$); 2.40 (t, 2H, J= 7.65 Hz, -C**H**$_2$C(=CH_2)-); 1.94 (quint., 2H, J= 7.56 Hz, J= 6.35 Hz, -CH_2-C**H**$_2$-CH_2-); 1.49 (s, 9H, -C(C**H**$_3$)$_3$)

^{13}C-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 166.18 (-**C**O_2tBu); 140.63 (>**C**=CH_2); 125.14 (>C=**C**H_2); 81.02 (-**C**$(CH_3)_3$); 69.36 (-**C**H_2OMs); 37.58 (-SO_3**C**H_3); 28.31 (-CH_2-**C**H_2-CH_2-); 28.31 (-CH_2-**C**H_2-CO_2tBu); 28.21 (-C(**C**$H_3)_3$)

EI-MS: m/z [Interpretation] rel. Intensität: 287.09 $[M+Na]^+$ 1.6 %; 303.07 $[M+K]^+$ 1.1 %

4.2.8 tert-Butyl-2-methylen-5-[((methylphenyl)sulfonyl)oxy]pentanoat (9)



$C_{10}H_{18}O_3$
186.25

$C_{17}H_{24}O_5S$
340.43

Ausgangsstoff, Reagenzien und Lösungen

tert-Butyl-5-hydroxy-2-methylenpentanoat (5) ($C_{10}H_{18}O_3$; 186,25 g/mol; 1 Äq.; 1,53 g; 8,2*10^{-3} mol)

p-Toluolsulfonsäurechlorid ($C_7H_7ClO_2S$; 190,64 g/mol; 2 Äq.; 1,64*10^{-2} mol; 3,13 g)

Pyridin abs. (C_5H_5N; 79,1 g/mol; 0,98 g/mL; 4 Äq.; 3,23*10^{-2} mol; 2,65 mL)

Dichlormethan abs., Diethylether, H_2O dest.

Durchführung

tert-Butyl-5-hydroxy-2-methylenpentanoat wurde in einem 25 mL-Dreihalskolben im 8 mL Methylenchlorid aufgelöst, unter Argon-Atmosphäre gebracht und auf 0 °C gekühlt. Zunächst wurde Pyridin mit Hilfe einer Spritze zugegeben und anschließend TsCl zügig zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 65h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Reaktionsmischung in 20 mL Et_2O aufgenommen und mit 20 mL H_2O gewaschen. Die wässrige Phase wurde 3 Mal mit Et_2O (je 10 mL) gewaschen und die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Vakuum abgezogen und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt (Laufmittel: EE:PE=2:8).

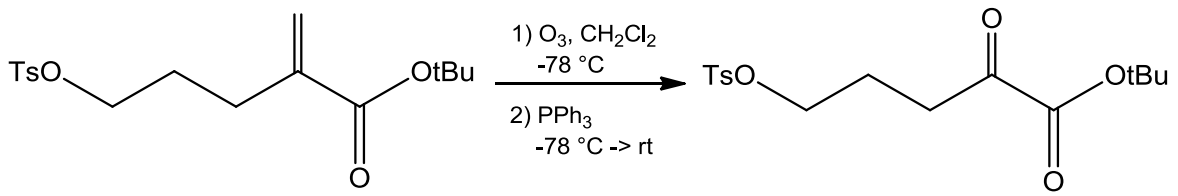
Ausbeute: 0,811 g, 29 % d. Th.

^{1}H-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.78 (d, 2H, J= 8.26 Hz, 2x(-C**H**=C(SO_3-)-); 7.34 (d, 2H, J= 8.26 Hz, 2x(-C**H**=C(CH_3)-); 6.04 (s, 1H, >C=C**H**$_2$); 5.39 (s, 1H, >C=C**H**$_2$); 4.03 (t, 2H, J= 6.31 Hz, -C**H**$_2$OTs); 2.45 (s, 3H, =C(C**H**$_3$)-); 2.29 (t, 2H, J= 7.36 Hz, -C**H**$_2$C(=CH_2)-); 1.82 (quint., 2H, J= 7.36 Hz, J= 6.31 Hz, -CH_2-C**H**$_2$-CH_2-); 1.46 (s, 9H, -C(C**H**$_3$)$_3$)

^{13}C-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 166.14 (-**C**O_2tBu); 144.85 (-CH=**C**(SO_3)-; 140.58 (-CH=**C**(CH_3)-); 133.33 (>**C**=CH_2); 129.98 (-**C**H=C(CH_3)-); 128.05 (-**C**H=C(SO_3)-); 125.02 (>C=**C**H$_2$); 80.90 (-**C**(CH_3)$_3$); 69.88 (-**C**H$_2$OTs); 28.21 (-CH_2-**C**H$_2$-C(=CH_2)-); 28.18 (-CH=C(**C**H$_3$)-); 27.92 (-CH_2-**C**H$_2$-CH_2-); 27.76 (-C(**C**H$_3$)$_3$)

EI-MS: m/z [Interpretation] rel. Intensität: 363.12 [M+Na]$^+$ 1.7 %; 379.10 [M+K]$^+$ 0.6 %

4.2.9 tert-Butyl-5-[((methylphenyl)sulfonyl)oxy]-2-oxopentanoat (9.1)



$C_{17}H_{24}O_5S$
340.43

$C_{16}H_{22}O_6S$
342.41

Ausgangsstoff, Reagenzien und Lösungen

tert-Butyl-2-methylen-5-[((methylphenyl)sulfonyl)oxy]-pentanoat (9) ($C_{17}H_{24}O_5S$, 340,43 g/mol; 1 Äq.; 0,44 g, $1{,}29*10^{-3}$ mol)

Triphenylphosphin ($C_{18}H_{15}P$, 262,29 g/mol; 2 Äq.; $2{,}58*10^{-3}$ mol; 0,678 g)

Dichlormethan abs. 30 mL

Durchführung

tert-Butyl-2-methylen-5-[((methylphenyl)sulfonyl)oxy]-pentanoat wurde in Methylenchlorid in einem 100 mL-Dreihalskolben gelöst, unter Argon-Atmosphäre gebracht und auf -78 °C gekühlt. Durch die Lösung wurde Ozon geleitet, bis sich diese blau verfärbte. Danach wurde Luft durch die Lösung geleitet, bis die Lösung wieder farblos geworden war. Anschließend wurde Triphenylphosphin zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht (ca. 18h) gerührt, wobei die Temperatur langsam auf Raumtemperatur stieg. Methylenchlorid wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (Laufmittel: EE:PE=4:6).

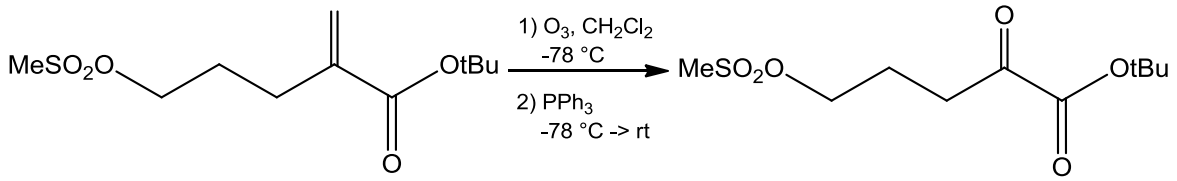
Ausbeute: 0,326 g, 73 % d. Th.

^{1}H-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.78 (d, 2H, J= 8.38 Hz, 2x(-C**H**=C(SO_3)-); 7.35 (d, 2H, J= 8.47 Hz, 2x(-C**H**=C(CH_3)-); 4.07 (t, 2H, J= 6.07 Hz, -C**H$_2$**OTs); 2.88 (t, 2H, J= 7.01 Hz, -C**H$_2$**C(=CH_2)-); 2.45 (s, 3H, =C(C**H$_3$**)-); 1.97 (quint., 2H, J= 6.95 Hz, J= 6.15 Hz, -CH_2-C**H$_2$**-CH_2-); 1.54 (s, 9H, -C(C**H$_3$**)$_3$)

^{13}C-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 194.27 (-**C**(=O)CO_2tBu); 160.17 (-**C**O_2tBu); 145.05 (-CH=**C**(SO_3)-); 133.09 (-CH=**C**(CH_3)-); 130.06 (-**C**H=C(CH_3)-); 128.06 (-**C**H=C(SO_3)-); 84.42 (-**C**(CH_3)$_3$); 69.21 (-**C**H_2OTs); 35.05 (-CH_2-**C**H_2-C(=CH_2)-); 27.94 (-CH=C(**C**H_3)-); 22.68 (-CH_2-**C**H_2-CH_2-); 21.79 (-C(**C**H_3)$_3$)

EI-MS: m/z [Interpretation] rel. Intensität: 309.04 $[M+Na-C_4H_8]^+$ 2.5 %; 365.10 $[M+Na]^+$ 2.6 %; 381.08 $[M+K]^+$ 1 %;

4.2.10 tert-Butyl-5-[(methylsulfonyl)oxy]-2-oxopentanoat (10)



$C_{11}H_{20}O_5S$
264.34

$C_{10}H_{18}O_6S$
266.31

Ausgangsstoff, Reagenzien und Lösungen

tert-Butyl-2-methylen-5-[(methylsulfonyl)oxy]-pentanoat (8) ($C_{11}H_{20}O_5S$; 264,34 g/mol; 1 Äq.; 1,168 g, 8,05*10^{-4} mol)

Triphenylphosphin ($C_{18}H_{15}P$; 262,29 g/mol; 2 Äq.; 8,84*10^{-3} mol; 2,318 g)

Dichlormethan abs. 30 mL

Durchführung

tert-Butyl-2-methylen-5-[(methylsulfonyl)oxy]-pentanoat wurde in Dichlormethan in einem 100 mL-Dreihalskolben gelöst, unter Argon-Atmosphäre gebracht und auf -78 °C gekühlt. Durch die Lösung wurde Ozon geleitet, bis sich diese blau verfärbte. Danach wurde Luft durch die Lösung geleitet, bis die Lösung wieder farblos geworden war. Anschließend wurde Triphenylphosphin zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht gerührt, wobei die Temperatur langsam auf Raumtemperatur stieg. Methylenchlorid wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (Laufmittel: EE:PE=4:6).

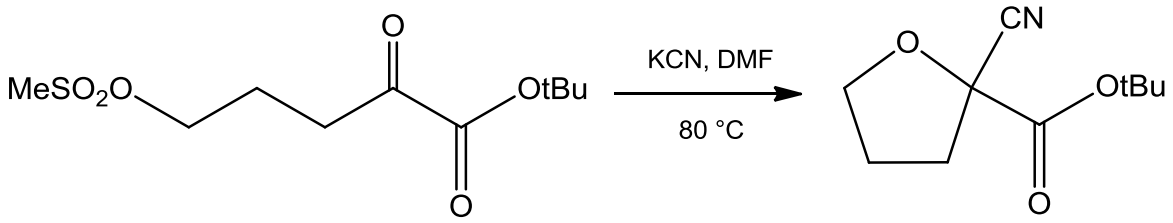
Ausbeute: 0,935 g, 79 % d. Th.

^{1}H-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 4.28 (t, 2H, J= 6.11 Hz, -C**H$_2$**OMs); 3.01 (s, 3H, -SO_3C**H$_3$**,); 2.96 (t, 2H, J= 6.93 Hz, -C**H$_2$**C(=O)-); 2.09 (quint., 2H, J= 6.50 Hz, -CH_2-C**H$_2$**-CH_2-); 1.55 (s, 9H, -C(C**H$_3$**)$_3$)

^{13}C-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 194.35 (-**C**(=O)CO_2tBu); 160.26 (-**C**O_2tBu); 84.53 (-**C**$(CH_3)_3$); 68.62 (-**C**H_2OMs); 37.56 (-SO_3**C**H_3); 35.05 (-**C**H_2C(=O)-); 27.94 (-C(**C**$H_3)_3$); 23.00 (-CH_2-**C**H_2-CH_2-)

EI-MS: m/z [Interpretation] rel. Intensität: 233.0 $[M+Na-C_4H_8]^+$ 6 %; 289.07 $[M+Na]^+$ 5 %; 305.04 $[M+K]^+$ 2 %

4.2.11 tert-Butyl-2-cyanotetrahydrofuran-2-carboxylat (13)



$C_{10}H_{18}O_6S$
266.31

$C_{10}H_{15}NO_3$
197.23

Ausgangsstoff, Reagenzien und Lösungen

tert-Butyl-5-[(methylsulfonyl)oxy]-2-oxopentanoat (10) ($C_{10}H_{18}O_5S$; 266,31 g/mol; 1 Äq.; 0,102 g, $3{,}83*10^{-4}$ mol)

Kaliumcyanid (KCN; 65,12 g/mol; 10 Äq.; $3{,}83*10^{-3}$ mol; 0,249 g)

N,N-Dimethylformamid abs. 2 mL

Durchführung

In einem Zweihalskolben wurde *tert*-Butyl-5-[(metylsulfonyl)oxy]-2-oxopentanoat und Kaliumcyanid eingewogen. Nachdem der Kolben unter Argon-Atmosphäre gebracht wurde, wurde DMF mit einer Spritze zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 80 °C mit einem Rückflusskühler über Nacht (ca. 18h) gerührt. Dann wurde diese auf Raumtemperatur gekühlt, in 10 mL EE aufgenommen und mit 10 mL H_2O gewaschen. Nach der Extraktion wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase noch einmal mit 10 mL EE gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit je 10 mL H_2O gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum abgezogen (30 min, 60 °C).

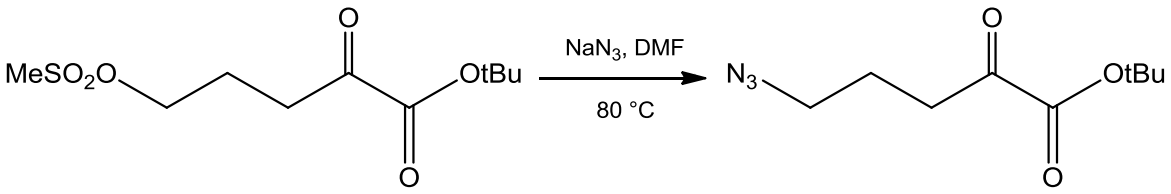
Ausbeute: 0,043 g, 57 % d. Th.

^{1}H-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 4.14 (t, 2H, J= 6.75 Hz, -OC**H**$_2$-); 2.60-2.54 (m, 1H, -C**H**$_2$-C(CN)<); 2.41-2.34 m, 1H, -C**H**$_2$-C(CN)<); 2.20-2.08 (m, 2H, -CH_2-C**H**$_2$-CH_2-); 1.53 (s, 9H, -C(C**H**$_3$)$_3$)

^{13}C-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 165.71 (-**C**O_2tBu); 118.05 (-**C**N); 84.96 (-**C**$(CH_3)_3$); 78.11 (-**C**(CN)<); 71.24 (-O**C**H_2-); 38.00 (-**C**H_2-C(CN)<); 27.88 (-C(**C**$H_3)_3$); 25.53 (-CH_2-**C**H_2-CH_2-)

EI-MS: m/z [Interpretation] rel. Intensität: 164.03 $[M+Na-C_4H_8]^+$ 4.5 %; 220.09 $[M+Na]^+$ 4.5 %; 236.06 $[M+K]^+$ 1%; 278.06 $[M+Na+C_4H_{10}]^+$ 6 %

4.2.12 tert-Butyl-5-azido-2-oxopentanoat (14)



$C_{10}H_{18}O_6S$
266.31

$C_9H_{15}N_3O_3$
213.23

Ausgangsstoff, Reagenzien und Lösungen

tert-Butyl-5-[(methylsulfonyl)oxy]-2-oxopentanoat (10) ($C_{10}H_{18}O_6S$, 266,31 g/mol; 1 Äq.; 0,85 g, $3{,}19*10^{-3}$ mol)

Natriumazid (NaN_3; 65,01 g/mol; 6 Äq.; $1{,}92*10^{-2}$ mol; 1,245 g)

N,N-Dimethylformanid abs. 6 mL

Durchführung

In einem Zweihalskolben wurde *tert*-Butyl-5-[(metylsulfonyl)oxy]-2-oxopentanoat und Natriumazid eingewogen. Nachdem der Kolben unter Argon-Atmosphäre gebracht wurde, wurde DMF mit einer Spritze zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 80 °C mit einem Rückflusskühler über Nacht (ca. 16h) gerührt. Dann wurde diese auf Raumtemperatur gekühlt, in 20 mL Ethylacetat aufgenommen und mit 10 mL H_2O gewaschen. Nach der Extraktion wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase noch einmal mit 10 mL Ethylacetat gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel unter Vakuum abgezogen (15 min, 60 °C). Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (Laufmittel: EE:PE= 2:8).

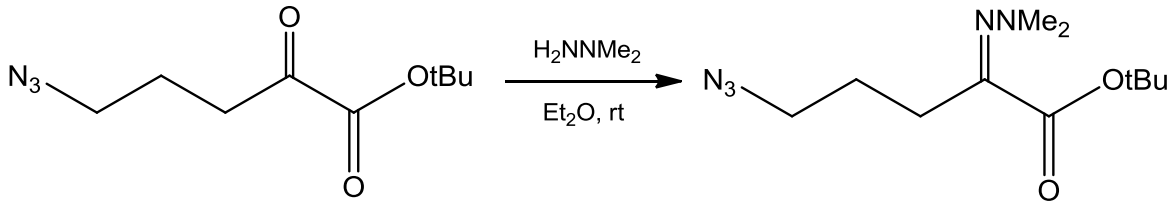
Ausbeute: 0,406 g, 58 % d. Th.

^{1}H-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 3.36 (t, 2H, J= 6.63 Hz, -C**H$_2$**N_3); 2.89 (t, 2H, J= 7.03 Hz, -C**H$_2$**C(=O)-); 1.91 (quint., 2H, J= 6.73 Hz, J= 6.91 Hz, -CH_2-C**H$_2$**-CH_2-); 1.55 (s, 9H, -C(C**H$_3$**)$_3$)

^{13}C-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 194.62 (-**C**(=O)CO_2tBu); 160.43 (-**C**O_2tBu); 84.36 (-**C**$(CH_3)_3$); 50.59 (-**C**H_2N_3); 36.11 (-**C**H_2C(=O)-); 27.96 (-C(**C**H_3)$_3$); 22.74 (-CH_2-**C**H_2-CH_2-)

EI-MS: m/z [Interpretation] rel. Intensität: 236.10 $[M+Na]^+$ 6.5 %; 252.07$[M+K]^+$ 2 %

4.2.13 tert-Butyl-5-azido-2-(2,2-dimethylhydrazono)pentanoat (15)



$C_9H_{15}N_3O_3$
213.23

$C_{11}H_{21}N_5O_2$
255.32

Ausgangsstoff, Reagenzien und Lösungen

tert-Butyl-5-azido-2-oxopentanoat (14) ($C_9H_{15}NO_3$; 212,331 g/mol; 1 Äq.; 0,257 g; 1,21*10^{-3} mol)
1,1-Dimethylhydrazin ($C_6H_8N_2$; 60,10 g/mol; 1,5 Äq.; 1,81*10^{-3} mol; 0,78 g/mL; 0,07 mL)
Diethylether abs. 10 mL

Durchführung

In einem Rundkolben wurde *tert*-Butyl-5-azido-2-oxopentanoat in Et_2O gelöst und unter Argon-Atmosphäre gebracht. Dimethylhydrazin wurde mit Hilfe einer Spritze zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht (ca. 17h) bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Reaktionsmischung mit 10 mL Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 10 mL Et_2O extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt.

Ausbeute: 0,043 g, 27 % d. Th.

^{1}H-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm] (major): 3.32 (t, 2H, -C**H$_2$**N$_3$); 2.83 (s, 6H, -N(C**H$_3$**)$_2$); 2.64 (t, 2H, -C**H$_2$**C(=NNMe$_2$)-); 1.79 (quint., 2H, -CH$_2$-C**H$_2$**-CH$_2$-); 1.52 (s, 9H, -C(C**H$_3$**)$_3$)

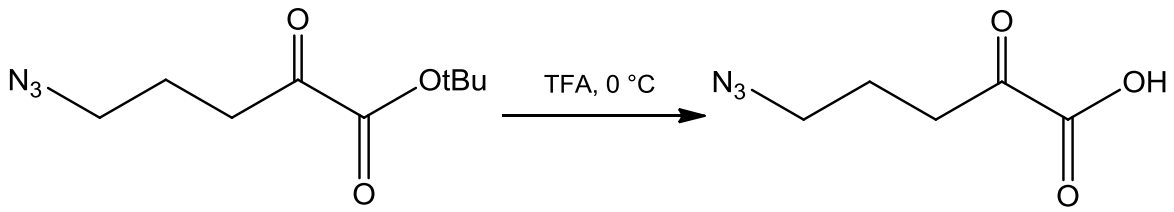
^{1}H-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm] (minor): 3.33 (t, -C**H$_2$**N$_3$); 2.57 (s, -N(C**H$_3$**)$_2$); 2.23 (t, -C**H$_2$**C(=NNMe$_2$)-); 1.86 (quint., -CH$_2$-C**H$_2$**-CH$_2$-); 1.52 (s, -C(C**H$_3$**)$_3$)

^{13}C-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm] (major): 164.24(-**C**O$_2$tBu); 148.47 (>**C**=NMMe$_2$); 81.82 (-**C**(CH$_3$)$_3$); 51.43 (-**C**H$_2$N$_3$); 47.66 (-N(**C**H$_3$)$_2$); 28.27 (-C(**C**H$_3$)$_3$); 26.49 (-CH$_2$-**C**H$_2$-CH$_2$-); 26.05 (-**C**H$_2$-C(=NNMe$_2$)-)

^{13}C-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm] (minor): 165.08 (-**C**O$_2$tBu); 155.28 (>**C**=NMMe$_2$); 82.75 (-**C**(CH$_3$)$_3$); 50.68 (-**C**H$_2$N$_3$); 47.58 (-N(**C**H$_3$)$_2$); 30.88 (-**C**H$_2$-C(=NNMe$_2$)-); 28.20 (-C(**C**H$_3$)$_3$); 25.77 (-CH$_2$-**C**H$_2$-CH$_2$-)

EI-MS: m/z [Interpretation] rel. Intensität: 256.18 $[M+H]^+$ 0.45 %; 278.16 $[M+Na]^+$ 0.5 %; 200.11 $[M+H-C_4H_8]^+$ 2.8 %

4.2.14 5-Azido-2-oxopentansäure (17)



$C_9H_{15}N_3O_3$
213.23

$C_5H_7N_3O_3$
157.13

Ausgangsstoff, Reagenzien und Lösungen

tert-Butyl-5-azido-2-oxopentanoat (14) ($C_9H_{15}N_3O_3$, 213,23 g/mol; 1 Äq.; 0,155 g, 7,27*10^{-4} mol)
Trifluoressigsäure 3 mL, Diethylether dest.

Durchführung

tert-Butyl-5-azido-2-oxopentanoat wurde in einen Zweihalskolben gegeben und unter Argon-Atmosphäre gebracht. Dann wurde das Edukt auf 0 °C gekühlt, mit TFA versetzt und bei 0 °C eine Stunde gerührt (DC-Kontrolle: EE:PE= 4:6; Färbereagenz $KMnO_4$-Lösung). Danach wurde die Reaktionsmischung in Et_2O aufgenommen und das Lösungsmittel und TFA am Rotationsverdampfer (bei 40 °C) abgezogen.

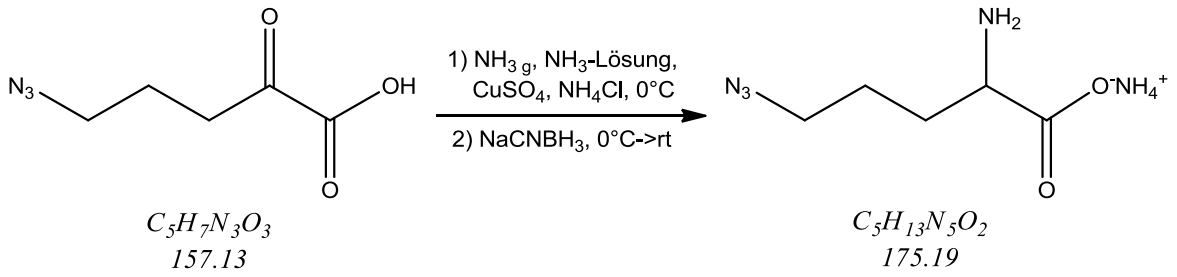
Ausbeute: 0,113 g, quantitativ.

^{1}H-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 3.40 (t, 2H, J= 6.50 Hz, -C**H$_2$**N_3); 3.06 (t, 2H, J= 6.99 Hz -C**H$_2$**C(=O)-); 1.98 (quint., 2H, J= 6.68 Hz, J= 6.81 Hz, -CH_2-C**H$_2$**-CH_2-)

^{13}C-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 195.36 (-**C**(=O)CO_2tBu); 160.57 (-**C**O_2tBu); 50.50 (-**C**H_2N_3); 35.21(-**C**H_2C(=O)-); 22.92 (-CH_2-**C**H_2-CH_2-)

EI-MS: m/z [Interpretation]: 156.04 $[M-H]^-$

4.2.15 Ammonium-2-amino-5-azidopentanoat (18)



$C_5H_7N_3O_3$
157.13

$C_5H_{13}N_5O_2$
175.19

Ausgangsstoff, Reagenzien und Lösungen

5-Azido-2-oxopentansäure (17) ($C_5H_6N_3NaO_3$; 179,11 g/mol; 1 Äq.; $1{,}23*10^{-4}$ mol; 0,022 g)

Kupfersulfat ($CuSO_4*5H_2O$; 249,69 g/mol; 0,4 Äq.; $3{,}1{,}81*10^{-5}$ mol; 0,012 g)

Ammoniumchlorid (NH_4Cl; 53,49 g/mol; 14 Äq.; $1{,}81*10^{-4}$ mol; 0,096 g)

Natriumcyanoborhydrid ($NaCNBH_3$; 62,84 g/mo; 4,2 Äq.l; $5{,}16*10^{-4}$ mol; 0,013 g)

NH_3-Gas, NH_3 24,5 % Lösung, NH_3 12 % Lösung; 1M HCl, $NaHCO_3$ gesätt. Lösung

Durchführung

5-Azido-2-oxopentansäure, Kupfersulfat und Ammoniumchlorid wurden in einen Zweihalskolben gegeben und mit Ammoniak-Lösung versetzt. Die Reaktionsmischung wurde auf 0 °C gekühlt und Ammoniak-Gas 45 min durch die Reaktionsmischung geleitet. Während der nächsten 45 min wurde die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur ohne Rühren stehen gelassen und anschließend nochmals Ammoniak-Gas bei 0 °C 15 min durchgeleitet. Danach wurde $NaCNBH_3$ bei 0 °C zugegeben und über Nacht (15h) gerührt, wobei die Temperatur auf Raumtemperatur stieg. Durch die Zugabe von halbkonzentrierter HCl wurde der pH-Wert der Reaktionslösung auf 1 eingestellt. Der eventuell ausgefallene Niederschlag wurde mittels Filtration abgetrennt. Dann wurde der pH-Wert des Filtrates durch die Zugabe von gesättigter $NaHCO_3$ Lösung eingestellt (pH= 6) und im Vakuum eingeengt, bis ein weißer Rückstand entstand. Es wurde eine Ionenaustauscher-Säule vorbereitet (ca. 10 g DOWEX 50Wx8,50-100 mesh), die zuerst mit 1 M HCl konditioniert und dann mit Wasser neutral gewaschen wurde. Der Rückstand wurde in 1 M HCl aufgelöst und auf die Säule aufgetragen. Dann wurde die Säule mit Wasser gewaschen bis der pH des Eluates neutral wurde. Schließlich wurde das Produkt mit ½ konz. NH_3-Lösung eluiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt an der Pumpe getrocknet.

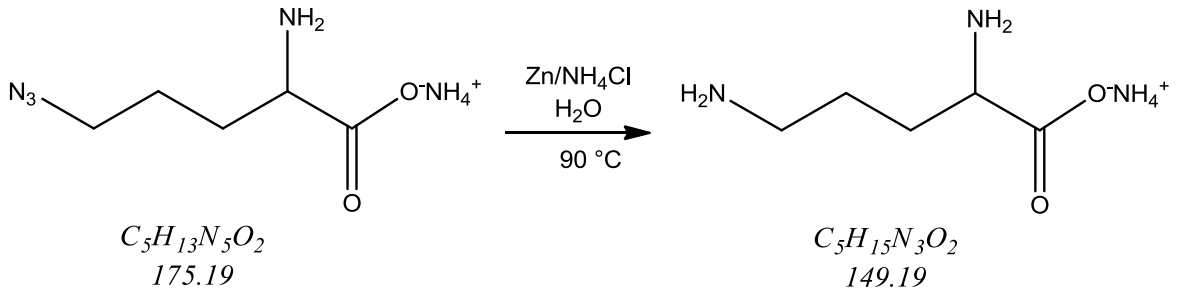
Ausbeute: 0,009 g, 53% d.Th.

^{1}H-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 3.81 (t, 1H, J= 6.16 Hz, >C**H**(NH_2)); 3.45 (t, 2H, J= 6.65 Hz, -C**H$_2$**N_3); 2.01-1.19 (m, 2H, -C**H$_2$**CH(NH_2)-); 1.80-1.70 (m, 2H, -CH_2-C**H$_2$**-CH_2-)

^{13}C-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 174.82 (>**C**=O); 54.81 (>**C**H(NH_2)); 50.92 (-**C**H_2N_3); 28.17 (-**C**H_2C(=O)-); 24.43 (-CH_2-**C**H_2-CH_2-)

EI-MS: m/z [Interpretation]: 181.07 $[M+Na-NH_3]^+$

4.2.16 Ammonium-2,5-diaminopentanoat (19)



$C_5H_{13}N_5O_2$
175.19

$C_5H_{15}N_3O_2$
149.19

Ausgangsstoff, Reagenzien und Lösungen

Ammonium-2-amino-5-azidopentanoat (18) ($C_5H_{13}N_5O_2$; 175,19 g/mol; 1 Äq.; 0,018 g; $1,07*10^{-4}$ mol)

Zn-Staub (65,4 g/mol; 2,4 Äq.; $2,60*10^{-4}$ mol; 0,017 g)

Ammoniumchlorid (NH_4Cl; 53,49 g/mol; 2,5 Äq.; $2,71*10^{-4}$ mol; 0,015 g)

NH_3-Lösung konz., H_2O dest.

Durchführung

Ammonium-2-amino-5-azidopentanoat wurde in einem Zweihalskolben in 5 mL H_2O gelöst. Zink-Staub und Ammoniumchlorid wurden zugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei 95–100 °C über Nacht gerührt (ca. 16 h). Dann wurde der Zink-Staub abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotavapor bei 40 °C entfernt. Eine Säule mit dem Ionenaustauscher wurde vorbereitet (ca. 20 g DOWEX 50W, 50-100 mesh, mit 1 M HCl konditioniert). Der weiße Rückstand wurde in 1 M HCl aufgelöst und auf den Ionenaustauscher übertragen. Dann wurde der Ionenaustauscher mit Wasser gewaschen bis der pH-Wert des Eluates neutral wurde. Schließlich wurde das Produkt mit 1:10 verdünnter konz. NH_3-Lösung eluiert. Das Eluat wurde am Rotavapor eingeengt. Anschließend wurde das weiße Produkt an der Pumpe getrocknet.

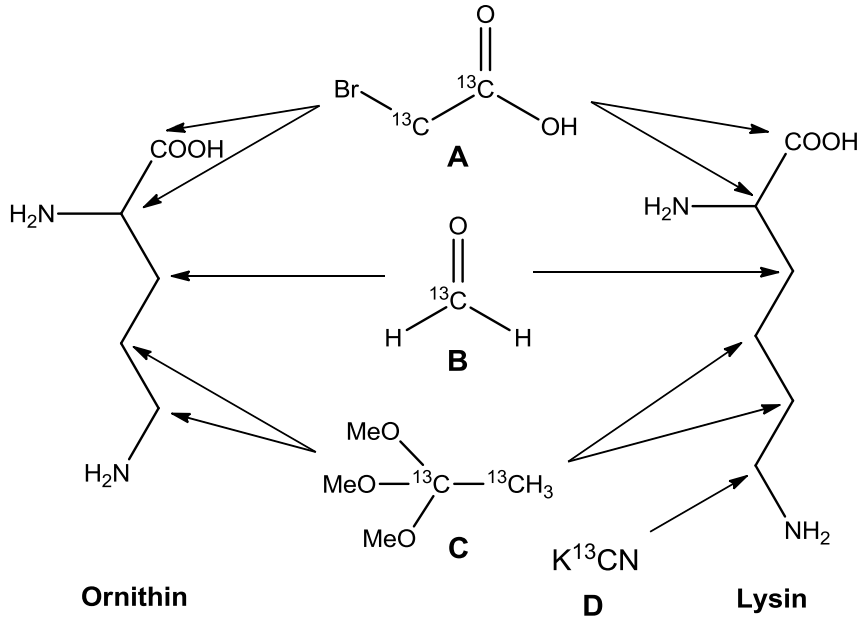
^{1}H-NMR (400 MHz; $CDCl_3$) δ [ppm]: 3.82 (t, 1 H, J= 6.05 Hz, >C**H**(NH_2)); 3.09 (t, 2H, J= 7.48 Hz, -C**H$_2$**NH_2); 2.01-1.95 (m, 2H, -C**H$_2$**CH(NH_2)-); 1.89-1.77 (m, 2H, -CH_2-C**H$_2$**-CH_2-)

EI-MS: m/z [Interpretation] rel. Intensität: 133.1 $[M+H-NH_3]^+$ 3.2 %; 188.12 $[M+K]^+$ 0.6 %

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegender Arbeit war es geeignete Synthesewege zur Herstellung ^{13}C-markierter Aminosäuren Lysin und Ornithin zu erarbeiten, die in weiterer Folge für NMR Untersuchungen an Proteinen herangezogen werden sollen.

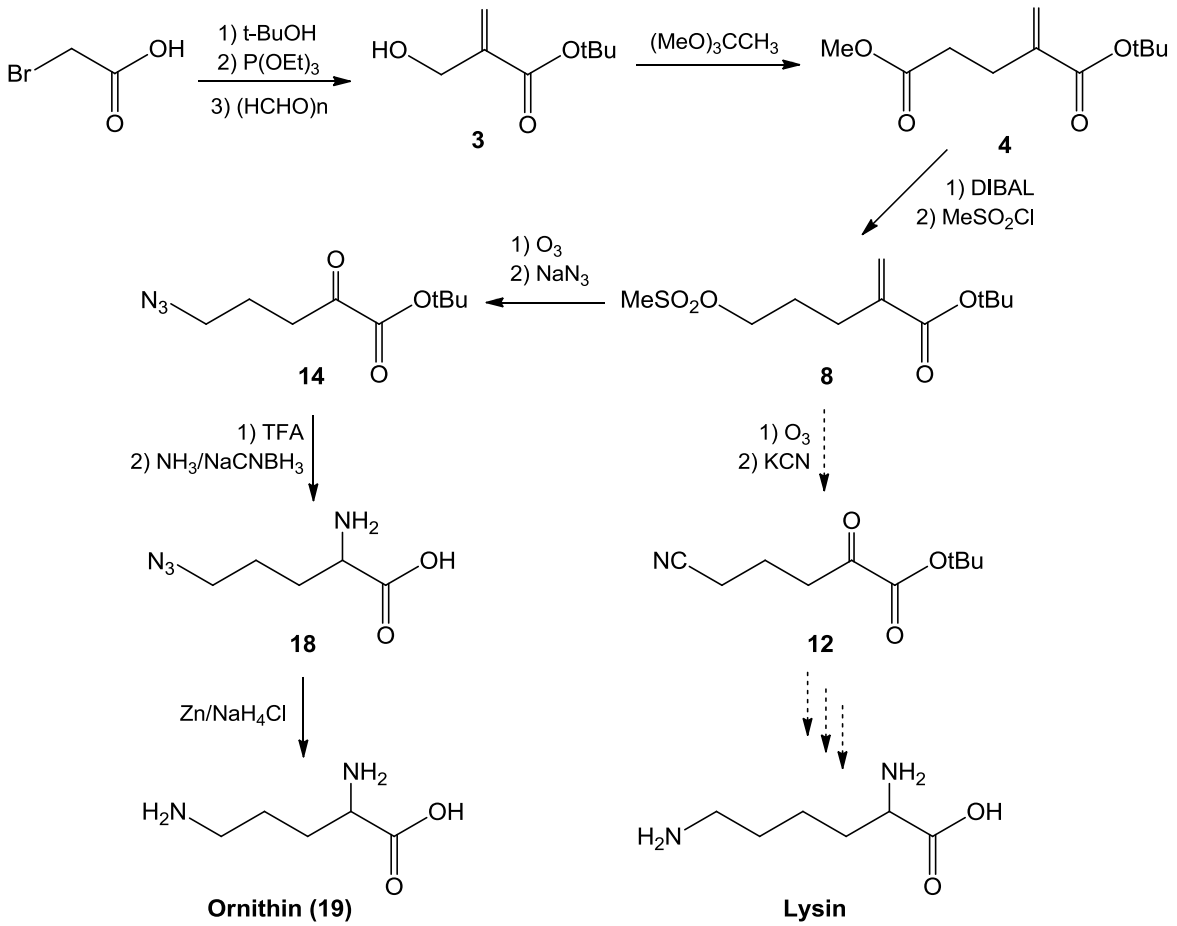
Als stabile Isotopenquellen in der vorgeschlagenen Variante finden folgende relativ kostengünstige Verbindungen Verwendung: Bromessigsäure (**A**), Formaldehyd (**B**), Trimethylorthoester (**C**) und in der Synthese des Lysins Kaliumcyanid (**D**) (Schema 32).



Schema 32: Mögliche ^{13}C-Isotopenmarkierung der Aminosäuren Lysin und Ornithin

Allylalkohol **3** als Ausgangsstoff für die Synthese wurde in drei Stufen aus Bromessigsäure und Paraformaldehyd hergestellt (Schema 33), wodurch die ersten drei potentiell ^{13}C-markierten Positionen eingeführt wurden. In der folgenden Claisen-Johnson Reaktion des Allylalkohols **3** mit Trimethylorthoacetat wurden zwei weitere Kohlenstoffatome eingeführt, die zum Einbringen von ^{13}C in die Lysin und Ornithin Seitenkette genutzt werden können. Die Methylestergruppe der Verbindung **4** wurde selektiv zum Alkohol reduziert und das Molekül durch Einführung eines Mesylesters aktiviert (**8**). Nach der Ozonolyse wurde der Mesylester als gute Abgangsgruppe durch eine Azidogruppe in einer nukleophilen Substitution ersetzt (**14**). Für die Aminosäure Lysin sollte der Kohlenstoff an der ε-Position durch die Reaktion mit KCN eingeführt werden (**12**). Um die α-Ketogruppe in die Aminogruppe zu überführen wurde eine reduktive Aminierung angewendet. Hierfür wurde die *tert*-Butylschutzgruppe zunächst abgespalten und die α-Ketogruppe selektiv mit Natriumcyanoborhydrid zur gewünschten α-Aminogruppe reduziert (**18**). Zum Schluss musste die Azidogruppe zur Aminogruppe

reduziert werden. Für diesen Zweck erwies sich ein Zink-Ammoniumchlorid-System als das am besten geeignete Reduktionsmittel.



Schema 33: Zusammenfassung der durchgeführten Reaktionen.

Die geplante Synthesesequenz wurde an die Herausforderungen und Bedingungen der Durchführung angepasst und entsprechend verändert. Dadurch gelang es, die Synthese von Ornithin ausgehend von 2-Hydroxymethyl-acrylsäure-*tert*-butylester **3** in acht Stufen durchzuführen. Die letzten Syntheseschritte, die zur Aminosäure Lysin führen, müssen in weiterführender zukünftiger Forschungsarbeit vervollständigt werden.

6 Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolutiert
ADP	Adenosindiphosphat
Äq.	Äquivalent
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	*tert*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe
Cbz	Carboxybenzyl-Schutzgruppe
CoA-SH	Koenzym-A
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DIBAL	Diisobutylaluminiumhydrid
DIPA	Diisopropylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	*N,N*-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EE	Ethylacetat
EI-MS	Elektronenstoß-Ionisations-Massenspektrometrie
Et_3N	Triethylamin
HMPA	Hexamethylphosphoramid
IR	Infrarotspektroskopie
kDa	Kilodalton
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung
LiHMDS	Lithiumbis(trimethylsilyl)amid (**Li**thium **H**exa**M**ethyl**D**i**S**ilazide)
MS	Massenspektrometrie
MsCl	Methynsulfonylchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)

$NADP^+$	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NMR	nuclear magnetic resonance
PE	Petrolether (Hexan)
Ph_3P	Triphenylphosphin
PTC	Phasentransferkatalyse
PyrP	Phyridoxalphosphat
quant.	quantitativ
rt	Raumtemperatur
n-BuLi	*n*-Butyllithium
*t*Bu	*tert*-Butyl-Gruppe
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TsCl	*p*-Toluolsulfonylchlorid

7 Literatur

[1] Lichtenecker, R., Ludwiczek, M., Schmid, W., Konrat, R.; Simplification of Protein NOESY Spectra Using Bioorganic Precursor Synthesis and NMR Spectral Editing. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 17, 5348-5349.

[2] Fischer, M., Kloiber, K., Häusler, J., Ledolter, K., Konrat, R., Schmid, W.; Synthesis of a ^{13}C-Methyl-Group-Labeled Methionine Precursor as a Useful Tool for Simplifying Protein Structural Analysis by NMR Spectroscopy. *ChemBIoChem*, **2007**, 8, 610-612.

[3] Schedlbauer, A., Auer, R., Ledolter, K., Tollinger, M., Kloiber, K., Lichtenecker, R., Ruedisser, S., Hommel, U., Schmid W., Konrat, R., Kontaxis, G.; Direct methods and residue type specific isotope labeling in NMR structure determination and model-driven sequential assignment. *J. Biomol. NMR,* **2008,** 42, 111–127.

[4] Wüthrich, K.; J Biomol. NMR, 2003, 27, 13-39.

[5] Torizawa, T., Ono, A., Terauchi T., Kainosho, M.; NMR Assignment Methods for the Aromatic Ring Resonances of Phenylalanine and Tyrosine Residues in Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 12620-12626.

[6] Kainosho, M.; Isotope Labeling of Macromolecules for Structural Determination. *Nat. Struct. Biol.*, **1997**, 4, 858-861.

[7] Wüthrich, K.; *NMR of Proteins and Nucleic Acids.* **1986**, John Wiley&Sons: New York

[8] Mason, J., Siarheyeva, A., Haase, W., Lorch, M., Veen, H., Glaubitz, C.;Amino Acid Type selective Isotope Labelling of the Multidrug ABC transporter LmrA for solid-state NMR Studies. *FEBS Letters*, **2004**, 568, 117-121.

[9] Ong, S., Blagoev, B., Kratchamarova, I., Kristensen, D., Stehen, H., Pandey, A., Mann, M.; Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Appproach to Expression Proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics*, **2002**, 1(5), 376-386.

[10] Bicho, C., de Lima Alves, F., Chen, Z., Rappsilber, J., Sawin, K.; A Genetic Engineering Solution to the “Arginine Conversion Problem” in SILAC. *Molecular and Cellular Proteomics*, **2010**, 9(7), 1567-1577.

[11] Michal G.; *Biochemical Pathways*; **1999**; Spektrum.

[12] Berg, J., M., Tymoczko, J., L., Stryer, L.; *Biochemie*, 6. Auflage, **2007**; Elsevier Spektrum akademischer Verlag.

[13] D’Andrea, G.; Classifying Amino Acids as Gluco(Glyco)genic, Ketogenic, or Both. *Biochemical education*, **2000**, 28(1), 27-28.

[14] a) Lehwess-Litzmann, A., Neumann, P., Parthier, C., Luedtke, S., Golbik, R., Ficner, R., Tittmann, K.; Twisted Schiff Base Intermediates as Substrate Locale Revise Transaldolase

Mechanism. *Nature Chemical Biology*, **2011**, 7(10), 678-684. b) Schneider, G., Sperenger, G.; Transaldolase B: Trappong of Schiff Base Intermediate Between Dihydroxyacetone and ε-Amino Grop of active-site Lysine Residue by Boreohydride Reduction. *Methods in Enzymology*, **2002**, 354, 197-201.

[15] a) Yoshikane, Y., Yokochi, N., Ohnishi, K., Hayashi, H., Yagi, T.; Molecular Cloning, Expression and Characterization of Pyridoxymine-Pyruvate Aminotransferase. *Biochemical Journal*, **2006**, 396(3), 499-507. b) Coon, M., Robinson, W.; Amino Acid Metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, **1958**, 27, 561-612.

[16] a) Jitrapakdee, S., Vidal-Puing, A., Wallace, J.; Anaplerotic Roles of Pyruvate Carboxylase in Mammalian Tissues. *Cell. Mol. Life Sci.,* **2006**, 63(7-8), 843-845. b) Yu, L., Xiang, S., Lasso, G., Gil, D., Valle, M., Tong, L.; A Symmetrical Tetramer for *S. aureus* Pyruvate Carboxylase in Complex with Coenzyme A. *Stucture*, **2009**, 17(6), 823-832.

[17] Siebum, A., Tsang, R., van der Steen, R., Raap, J., Lugtenburg, J.; Synthesis of (ε-^{13}C-, ε-^{15}N)-Enriched L-Lysine. *Eur. J. Org. Chem.*, **2004,** 4391-4396.

[18] a) Xu, P., Peng, J.; Characterization of Polyubuquitin Chain Structure by Middle-down Mass Spectrometry. *Analytical chemistry*, **2008**, 80 (9), 3438–3444. b) Peng, J., Schwartz, D., Elias, J., Thoreen, C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., Steven, P.; A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nature biotechnology*, **2003**, 21 (8) 921-926.

[19] Argade, P., Rothschild, K., Kawamoto, A., Herzfeld, J., Herlihy, W.; Resonance Raman Spektroscopy of Specifically [ε-^{15}N]Lysin-Labeled Bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1981**, 78,3, 1643-1646.

[20] Goot, H., Harbison, G., Herzfeld, J., Griffin, R.; Nuclear Megnetic Resonance Study of the Schiff Base in Bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 1989, 28, 3346-3353

[21] Raap. J. *et al.*; Enantioselective Synthesis of isotopically labelled α-Amino acids. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1990**, 109, 277-286.

[22] Sutherland, A., Willis, C.; Synthesis of [6-^{13}C]-Lysine. *J. Label. Compd. Radiopharm*. **1995**, 1, 95-102.

[23] Voet, D., Voet, J.; *Biochemie*. **1992**, VCH.

[24] a) Parry, R. *et al.*; Biosynthesis of Sinefungin: On the Mode of Incorporation of Ornithine. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 8981-8982. b) Baldwin, J. *et al*.; Synthesis on L-Ornithines Stereospecifically Deuterated at C-3. *Tertahedron Lett.*, **1993**, 34(24), 3919-3920. c) Camarano, S. *et al*.; Origig of Epolachna Paenulata Defensive Alkaloids. *J.Insect Physiol.*, **2012**, 58, 110-115. d)

[25] Martens-Lobenhoffer, J. *et al.*; Identification and Quantification oft the Atypical Metabolite Ornithin-Lactam in Human Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *J. CHromatogr. B.*, **2009**, 877, 2284-2289.

[26] Deignan, J. et al.; Ornithine Deficiency in the Arginase Double Knockout Mouse. *Molecular Genetics and Metabolism*, **2006**, 89, 87-96.

[27] Hiersemann, M., Nubbemeyer, U.; The Claisen Rearrangement. Methods and Applications, Wiley-VCH, 2007.

[28] Claisen, L.; Über Umlagerung von Phenolallyläthern in C-Allylphenole. *Chem. Ber*., 1912, 45, 3157-3166.

[29] a) Zahedi, E. et al; A DFT Study of NBO and NICS Analysis of the Allylic Rearrangements of 3-(Vinyloxy)prop-1-ene and Allyl Vinyl Sulfide. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon*, **2011**, 186, 159-170. b) Vance, R. et al. Transition Structures for the Claisn Rearrengement. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 2314-2315.

[30] a) Dewar, M. *et al*.; Mechanism of the Claisen Rearrangement of Allyl Vinyl Esthers. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 511-519. b) Wiest, O. *et al*.; Density Functional Theory Isotope Effects and Activation Energies for the Cope and Claisen Rearrangements. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 10336-10337. c) Meyer, M. *et al*.; Reinvestigation of the Isotope Effects for the Claisen and Aromatic Claisen Rearrangements: The Nature of the Claisen Transition States. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 10865-10874.

[31] Khaledy, M. et al.; Origins of Boat or Chair Preferences in the Ireland-Claisen Rearrangements of Cyclohexenyl Esters. *J. Org. Cjhem.*, **2003**, 68(2), 572-577.

[32] Johnson, W. et al.; A Simple Stereoselective Version of the Claisen Rearrangement Leading to *trans*-Trisubstituted Olefinic Bond. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 741-743.

[33] a) Huber, R. *et al*.; Acceleration of the Orthoester Claisen Rearrangement by Clay Catalyzed Microwave Thermolysis: Expeditious Route to Bicyclic Lyctones. *J. Org. Chem.*, **1992**, 57(21), 5779-5781. b) Srikrishna, A. *et al*.; Acceleration of ortho ester Claisen Rearrangement by a Commercial Microwave Oven. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1*, **1992**, 3, 311-312. c) Jones, G. *et al*.; The Claisen Rearrangement in Synthesis: Acceleration of the Johnson Orthoester Protocol *en route* to Bicyclic Lactones. *Tertahedron*, **1993**, 49(2), 369-380. d) Srikrishna, A. *et al*.; Acceleration of Microwave Heating for Rapid Synthesis of γ,δ-Unsaturated Esters. *Tertahedron*, **1995**, 51(6), 1809-1816. e) Mehl, F. *et al.*; Optimization of the Microwave-Assisted Ortho Ester Claisen Rearrangement: Application to Monoterpenols. *Synthetic Communications*, **2010**, 40, 462-468.

[34] Pinner A. et al.; Ueber die Umwandlung der Nitrile in Imide. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft,* **1883**, 16(2), 1643–1655.

[35] Barry, M. Trost; *Comprehensive Organic Synthesis; Vol. 8: Reduction*. **1993**, Pergamon Press.

[36] a) Swetha, M., Venkata, R., Shirodkar, S.; Simple and Efficient Method for the Synthesis of Azides in Water-THF Solvent System. *Organic Preparations and Procedures International,* **2011**, 43(4), 348-353. b) Hansen, S., Jensen H.; Microwave Irradiation as an Effective Means of

Synthesizing Unsuvstituted N-Linked 1,2,3-Triazoles from Vinyl Acetat and Azides. *Synlett*, **2009**, 20, 3275-3278.

[37] Kunesch, G., An efficient systhesis of some biologically important monoacylated diamines. *Tertahedron Lett*., **1983**, 24(47), 5211-5214

[38] Goani, Y.; Regiospecific additions of hydrazoic acid and benzylamine to 1-(arylsulfonyl)-bicyclo[1.1.0]Butanes. *Tertahedron Lett*., **1988**, 29(13), 1591-1594.

[39] Balderman, D., Kalir, A.; Selective Reduction of Azides. Improved Preparation of α,α-Disubstituted Benzylamines. *Synthesis*, **1978**, 1, 24-26.

[40] a) Maiti, S., Spevak, P., Reddy, N.; Alkaline Earth Metal Mediated Reduction of Azides to Amines. *Synth. Commun*., **1988,** 18(11), 1201-1206. b) Maiti, S., Singh, M., Micetich, R.; Facile conversion of azides to amines*. Tertahedron Lett*., **1986**, 27(13), 1423-1424

[41] Ho, T., Henninger, M., Olah, A.; Synthetic Methods and Reactions: Reduction of Aryl Azides to Arylamines with Vanadium(II) Chloride. *Synthesis*, **1976**, 12, 815-816.

[42] Stanovnik, B., Tisler, M., Polanc S., Gracner, M.; Reduction of Heterocyclic Azides into Amines with Titanium(III) Chloride. *Synthesis*, **1978**, 1, 65-66.

[43] Cho, S., Choi, W., Lee, S., Yoon, Y., Shin, S.; Chemoselective reduction of highly-functionalized azidopyridazines to corresponding aminopyridazines using Fe/NH4Cl in organic solvent-water two-phase solution. *Tetrahedron Lett.,* **1996**, 37(39), 7059-7060.

[44] Lin, W., Zhang, X., He, Z., Jin, Y., Gong, L., Mi, A.; Reduction of Azides to Amines or Amides with Zinc and Ammonium Chloride as Reducing Agent. *Synthetic Communications,* **2002**, 32, 3279-3284.

[45] a) Bose, A., Kistner, J., Farber, L.; A Convenient Synthesis of Axial Amines. *J. Org. Chem*., **1962**, 27, 2925-2927. b) Boyer, J.; Reduction of Organic Azides to Primary Amines with Lithium Aluminium Hydride. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 5865-5866.

[46] Soai, K., Yokoyama, S., Ookawa, A.; Reduction of Azides to Amines with Sodium Borohydride in Tetrahydrofuran with Dropwise Addition of Methanol. *Synthesis*, **1987**, 48-49.

[47] a) Wallace, K., Hanes, R., Anslyn, E., Morey, J., Kilway, K., Siegel, J.; Preparation of 1,3,5-Tris(aminomethyl)-2,4,6-triethylbenzene From Two Versatile 1,3,5-tri(halo-substituted) 2,4,6-Triethylbenzene Derivatives. *Synthesis*, **2005**, 12, 2080-2083. b) Gololobov, Y., Zhumurova, I., Kashukin, L.; Sixty Years of Staudinger Reaction. *Tetrahedron*, **1981**, 37, 437.

[48] a) Knouzi, N., Vaultier,M., Carrie, R.; Reduction of Azides by Triphenylphosphine in the Presence of Water. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1985**, 815. b) Pal, B., Jaisankar, P., Giri, V.; Versatile Reagent for Reduction of Azides to Amines. *Synthetic Communications,* **2004**, 34, 1317-1323. c) Papageorgiou, G., Corrie, J; Synthesis of an anionically substituted nitroindoline-caged GABA reagent that has reduced affinity for GABA receptors. *Tertahedron*, **2007**, 63, 9668-9676.

[49] a) Adachi, T., Yamada, Y., Inoue, L., Saneyoshi, M.; An Alternative Methodfor the Selective Reduction of Unsaturated Nucleoside Azides to the Amines *Synthesis*, **1977**, 45-46. b) Gronowitz, S., Westerlund, C., Hörnfeldt, A.; Preparation and reduction of some 3-azido-2-substituted furans, thiophenes, and selenophenes. *Acta Chem. Scand., Ser. B*, **1975**, 29, 224-232.

[50] a) Bayley, H., Standring, D., Knowles, J.; Propane-1,3-dithiol: A Selective Reagent for the Efficient Reduction of Alkyl and Aryl Azides to Amines. *Tertahedron Letters*, **1878**, 39, 3633-3634. b) Blaukopf, M.; Synthesis of Ara4N Containing Inner Core LPS Structures. *Ph.D.Thesis* (University BOKU Vienna), **2011.**

[51] Lichtenecker R.; Synthesis and Application of chemical Tools for Adressing Biological Problems. *Ph.D.Thesis* (University of Vienna), **2008**.

[52] Shelkov, R., Nahmany, M., Melman, A.; Acylation through Ketene Intermediates. *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 8975-8982.

[53] Rademann, J., Meldal, M., Bock, K.; Solid-Phase Synthesis of Peptide Isosters by Nucleophilic Reactions with *N*-Terminal Peptide Aldehydes on a Polar Support Tailored for Solid-Phase Organic Chemistry. *Chem. Eur. J.,* **1999**, 5, 1218-1225.

[54] Villieras, J., Rambaud, M.; Wittig-Horner Reaction in Heterogenous Media; 1. An Easy Synthesis of Ethyl α-Hydroxymethylacrylate and Ethyl α-Halomethylacrylates using Formaldehyde in Water. *Synthesis*, **1982**, 924-926.

[55] Jones, G., Huber, R., Chau, S.; The Claisen Rearrangement in Synthesis: Acceleration of the Jonson Orthoester Protocol en route to Bicyclic Lactones. *Tetrahedron,* **1993**, 49, 369-380.

[56] Srikrishna, A., Nagaraju, S.; Acceleration of Ortho Ester Claisen Rearrangement by a Commercial Microwave Oven. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1,* **1992**, 311-312.

[57] Srikrishna, A., Nagaraju, S., Kondaiah, P.; Application of Microwave Heating Technique for Rapid Synthesis of γ,β-Unsaturated Esters. *Tetrahedron,* **1995**, 51, 1809-1816.

[58] Chauvel, E., Lorens-Cortés, C., Coric, R., Wilk, S., Roques, B., Fourniè-Zaluski, M.-C.; Differentio Inhibition of Aminopeptidase A and Aminopeptidase N by New β-Amino Thiols. *J. Med.Chem.*, **1994**, 37, 2950-2957.

[59] Craig, D., Hyland, C., Ward, S.; Stereoselective Synthesis of (–)-Trachelanthamidine via Palladium-Catalysed Intramolecular Allylation. *Synlett*, **2006**, 13, 2142-2144.

[60] Moriwake, T., Hamano, S.; Miki, D., Saito, S., Torii, S.; A Selective 1,2-Reduction of γ-Amino-α,β-unsaturated Esters by Means of BF_3*OEt_2-DIBAL-H System. *Chemistry Letters*, **1986**, 815-818.

[61] Nakamura, A., Lectard, S., Hashizume, D., Hamashima, Y., Sodeoka, M.; Diastereo- and Enantioselective Conjugate Addition of α-Ketoesters to Nitroalkenes Catalyzed by a Chiral $Ni(OAc)_2$ Complex under Mild Conditions. *J. Am. Chem. Soc.,* **2010**, 132, 12, 4036-4037.

[62] Polyak, F., Lubell, W.; Mimicry of Peptide Backbone Geometry and Heteroatomic Side-Chain Functionality. *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 1171-1180.

[63] Utech, T., Köhler, J., Wünsch, B.; Synthesis of 4-(aminoalkyl) Substituted 1,3-Dioxanes as Potent NMDA and δ Receptor Antagonists. *Eur. J. of Med. Chem.*, **2011**, 2157-2169.

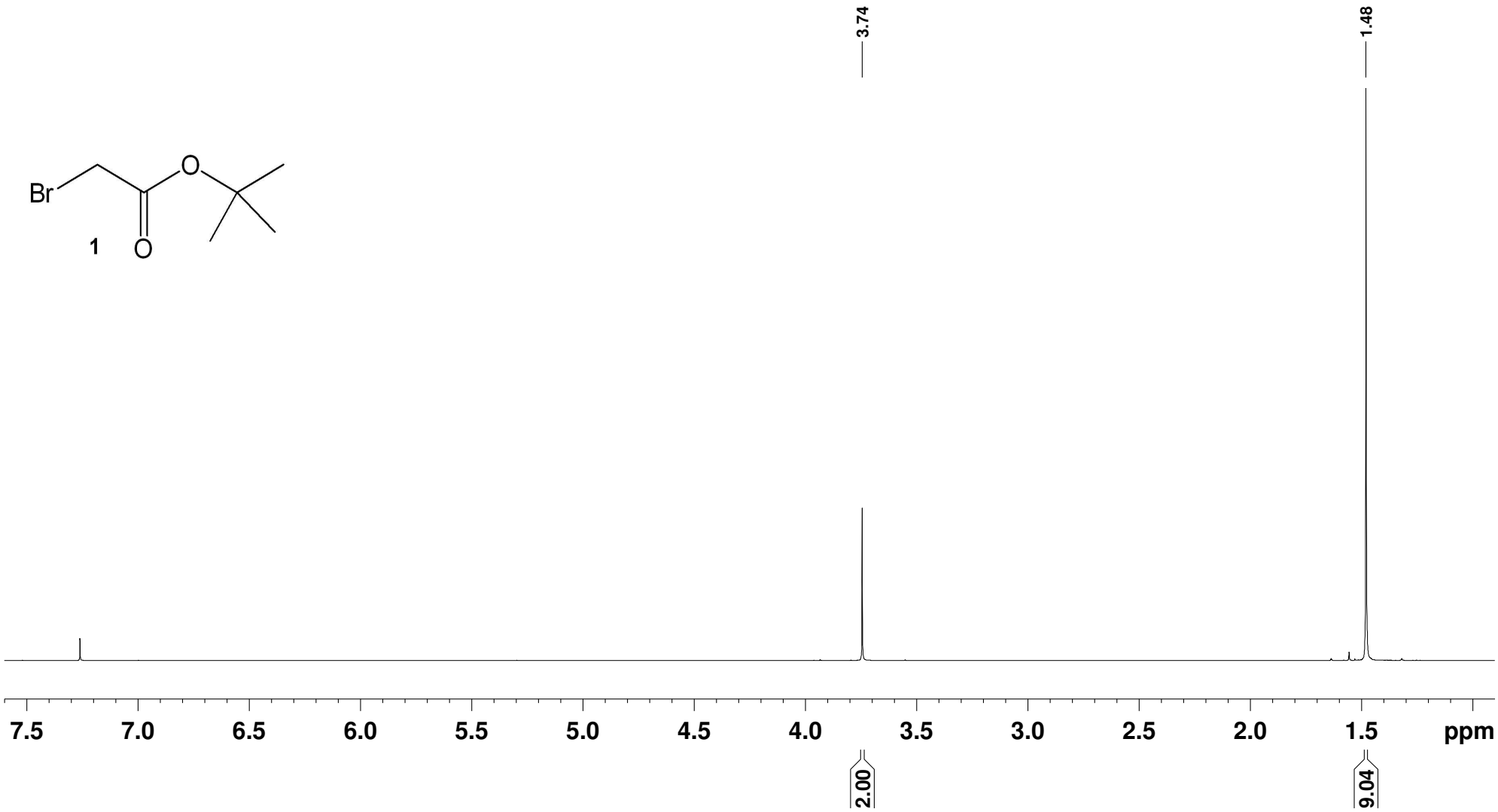
[64] Ishibashi, M., Wagner, A., Mioskowski, C., Sylvain, C.; Preparation of Carboxytetrahydro-furanone Derivatives as Selective Preventives/Remedies for Progresive lesions after Organ Damage. *PCT Int. Appl.*, WO 2001072730 A1 20011004, **2001.**

[65] Fischer, M., Kloiber, K., Häusler, J., Ledolter, K., Konrat, R., Schmid, W.; Synthesis of a ^{13}C-Mhethyl-Group-Labeled Methionine Precursor as a Useful Tool for Simplifying Protein Structural Anylysis by NMR Spectroscopy. *ChemBIoChem*, **2007**, 8, 610-612.

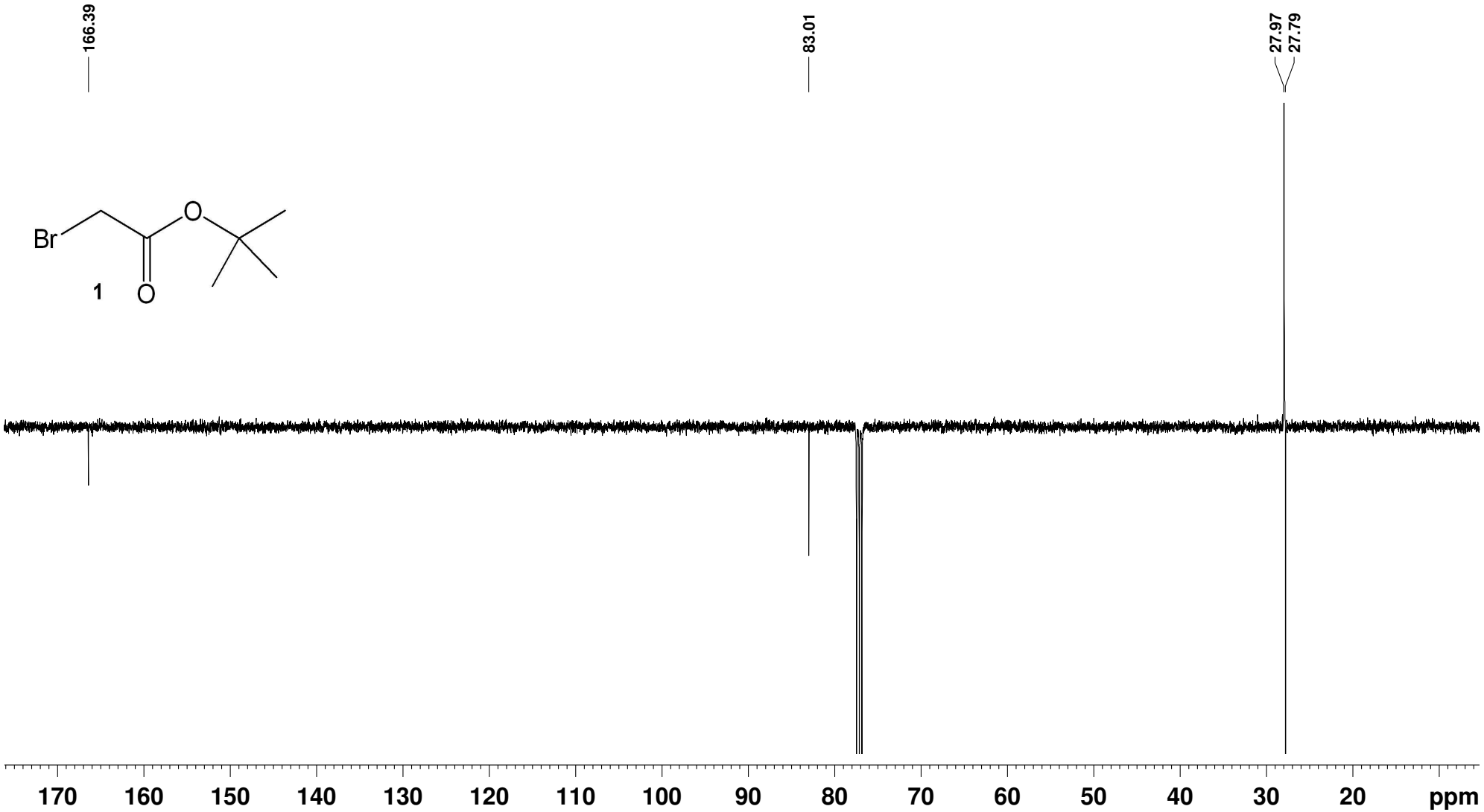
[66] Nimitz, J., Mosher, H.; A New Synthesis of α-Keto Esters and Acids. *J. Am. Chem. Soc.,* **1981**, 46, 211-213.

8 NMR-Spektren

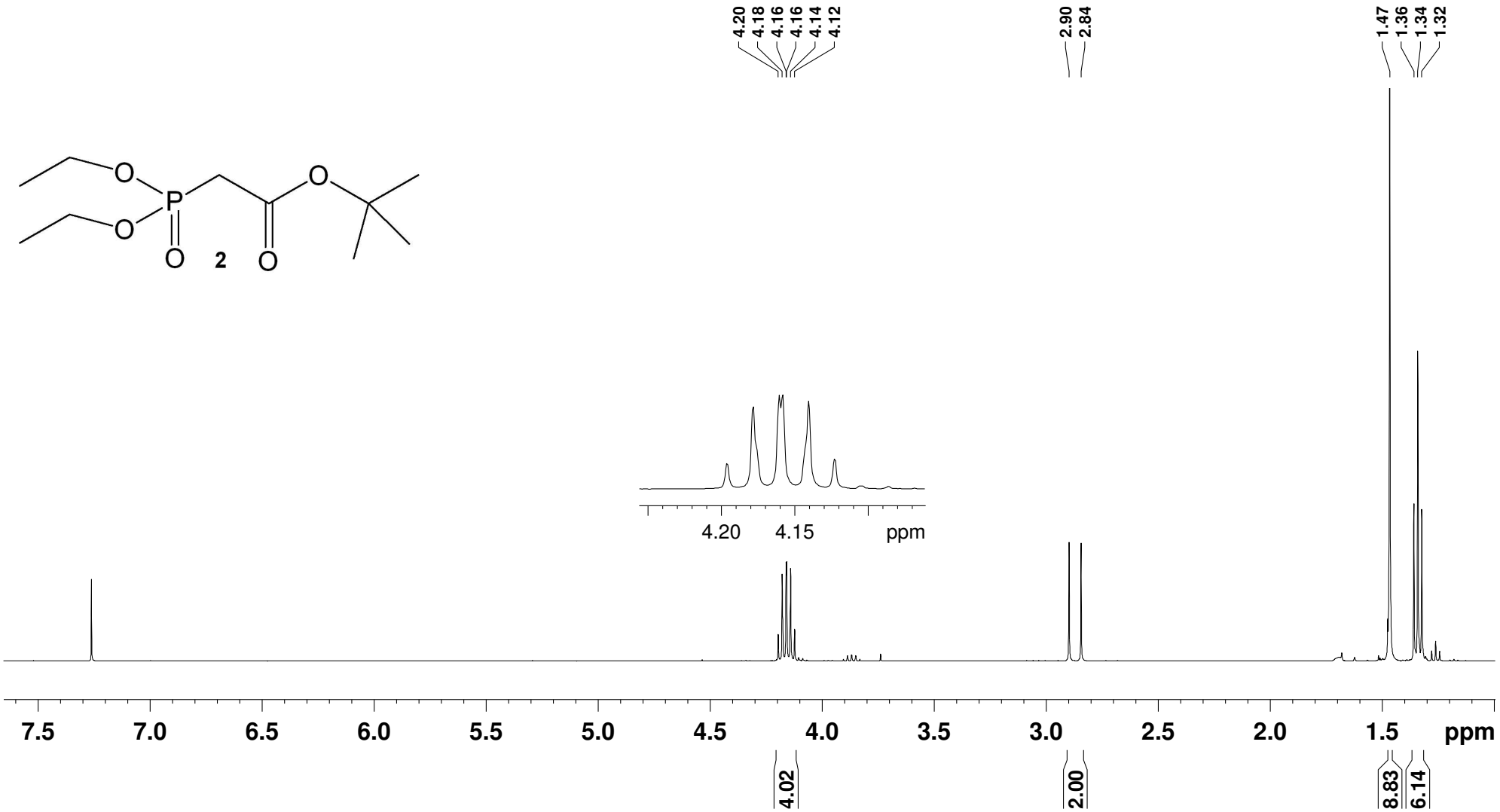
^{1}H-NMR: *tert*-Butyl-2-bromacetat (1) ($CDCl_3$)



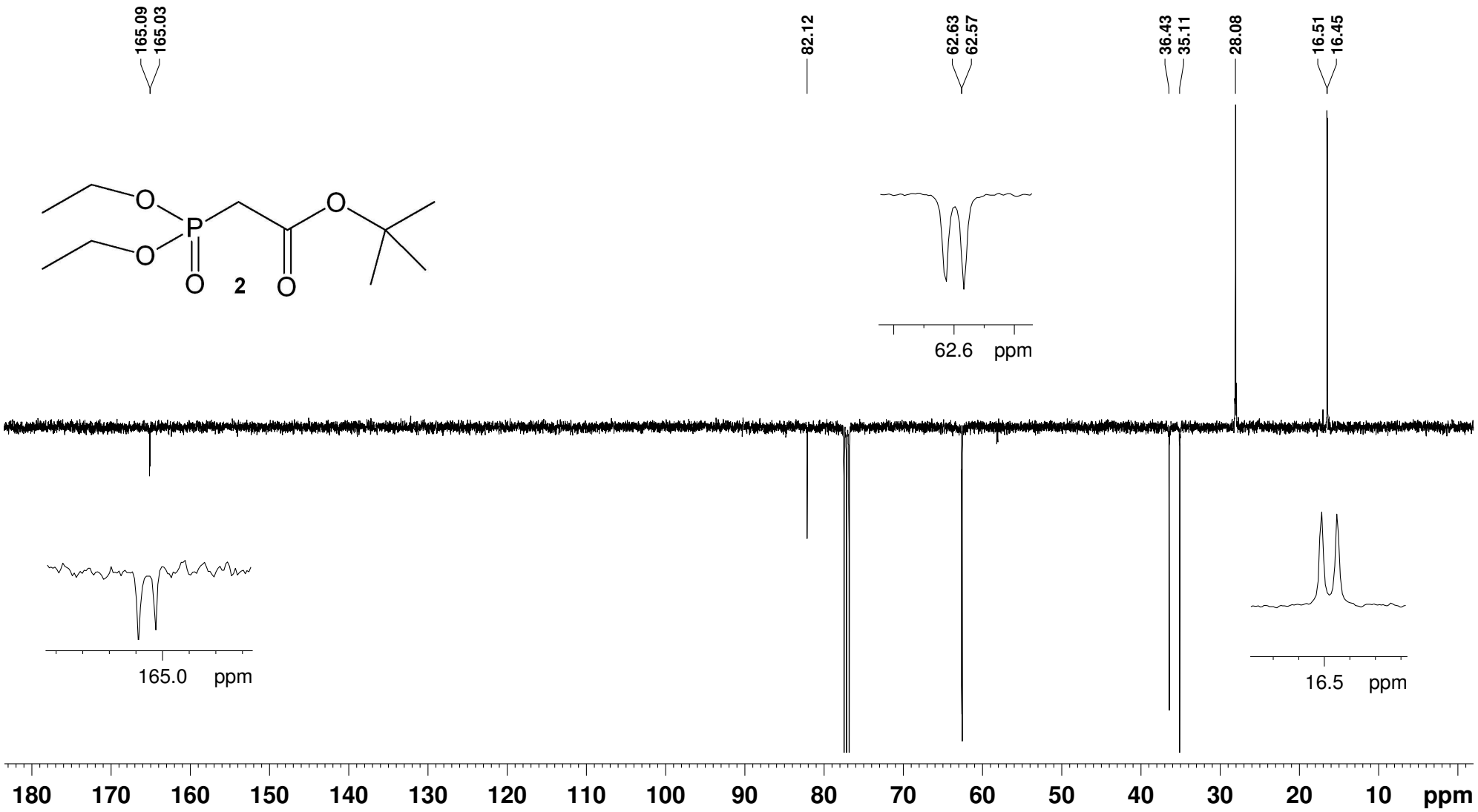
^{13}C-NMR: *tert*-Butyl-2-bromacetat (1) ($CDCl_3$)



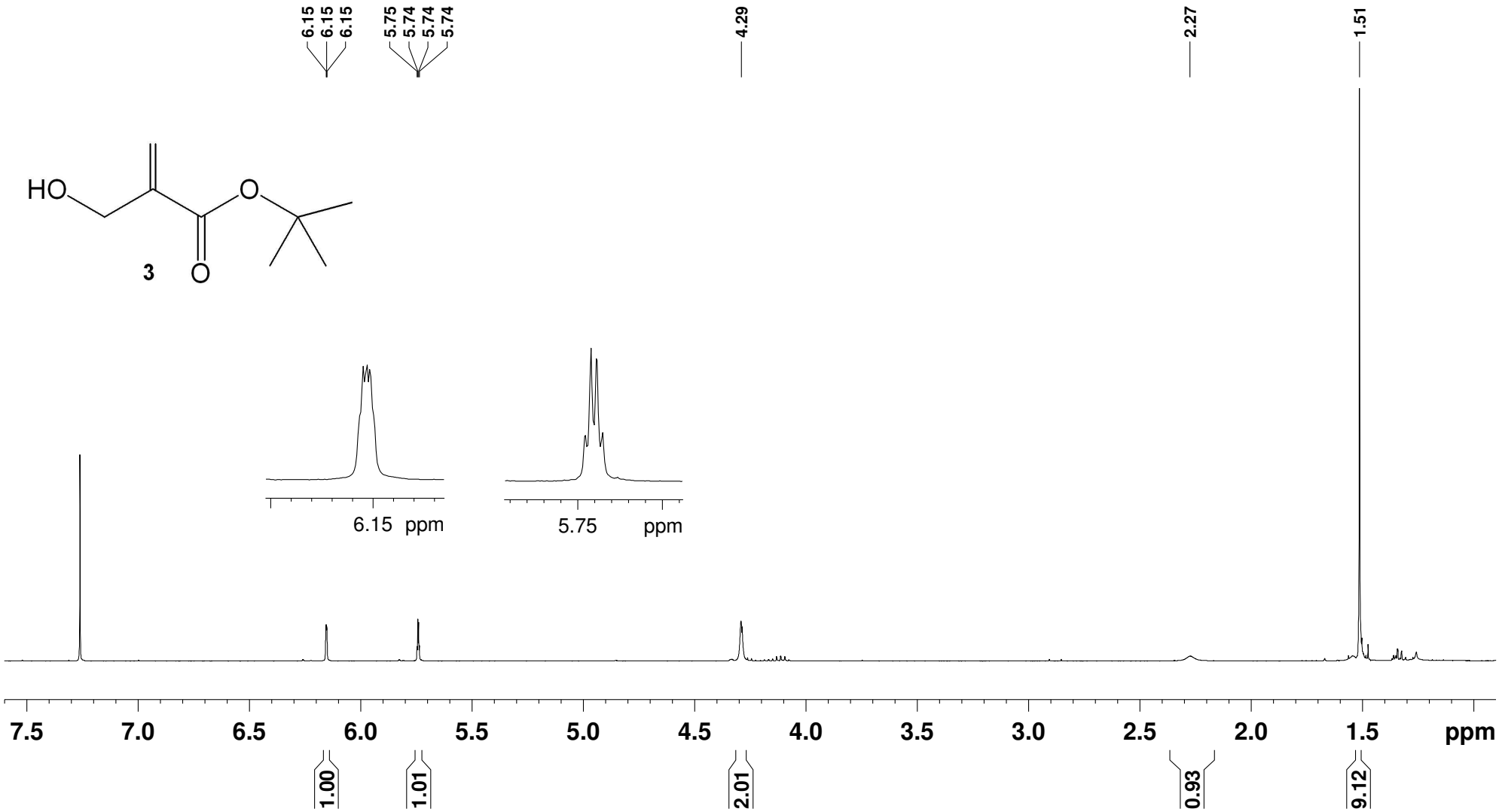
^{1}H-NMR: *tert*-Butyl-2-(diethylphosphono)acetat (2) ($CDCl_3$)



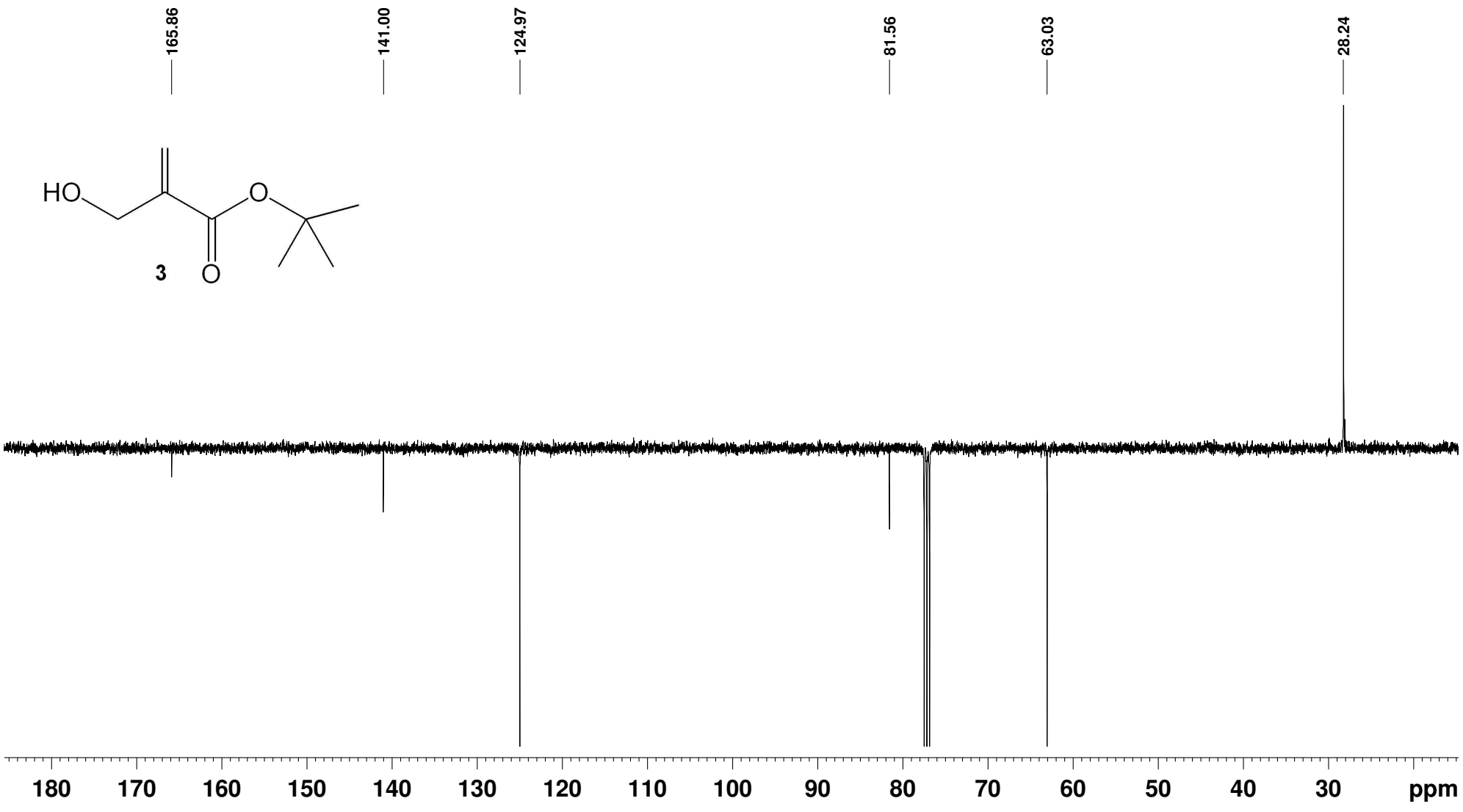
^{13}C-NMR: *tert*-Butyl-2-(diethylphosphono)acetat (2) ($CDCl_3$)



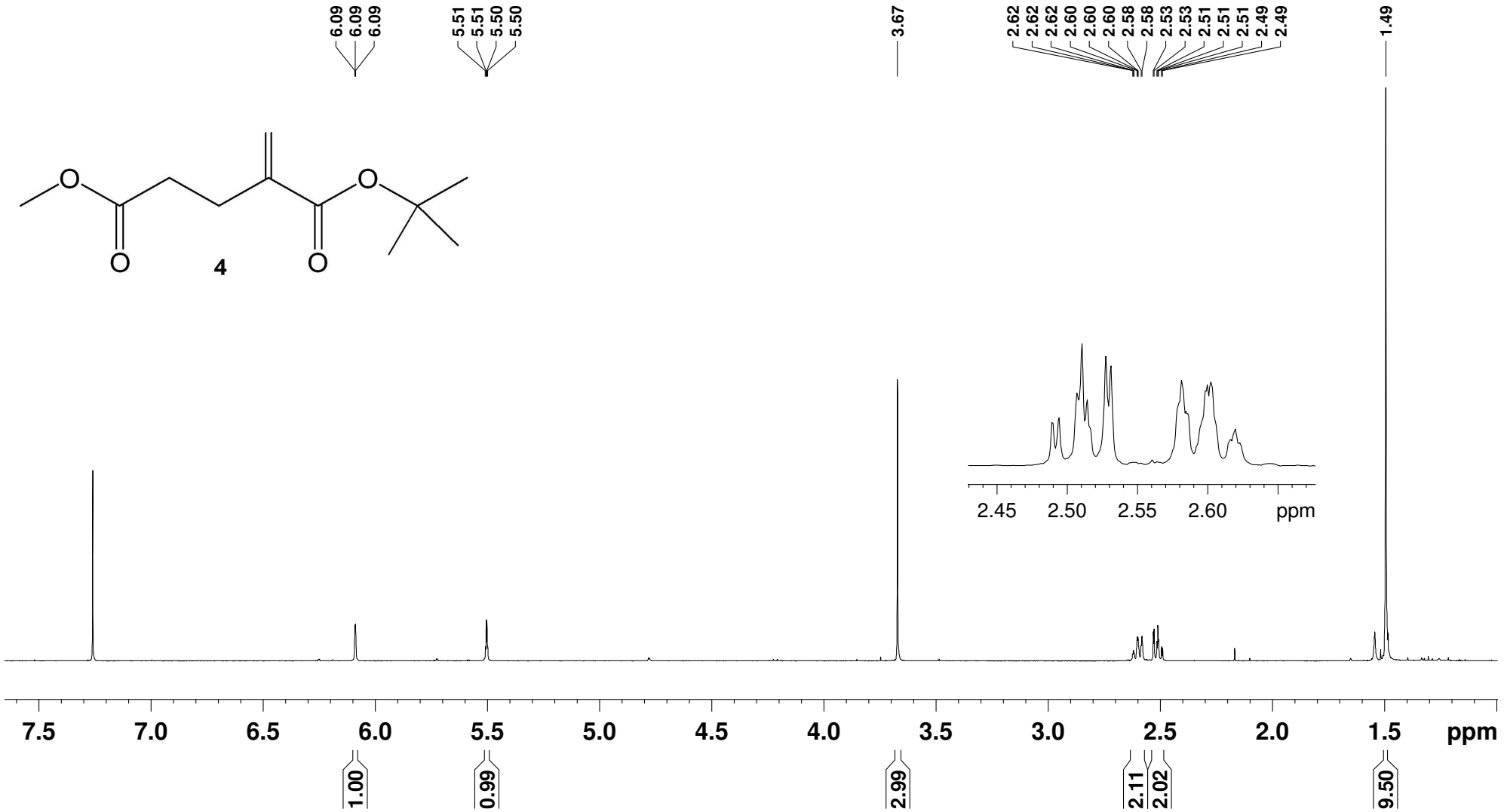
^{1}H-NMR: *tert*-Butyl-2-(hydroxymethyl)acrylat (3) ($CDCl_3$)



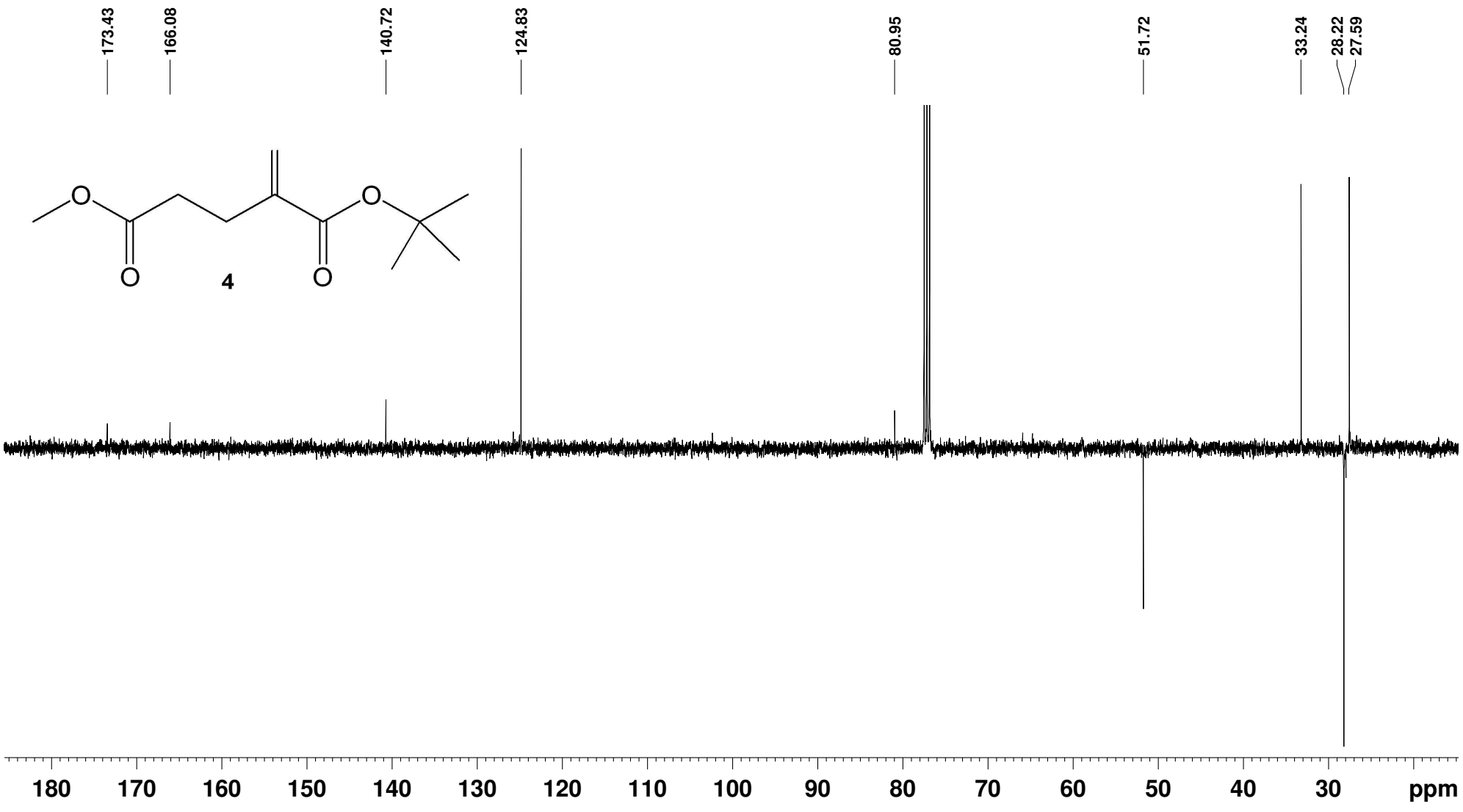
^{13}C-NMR: *tert*-Butyl-2-(hydroxymethyl)acrylat (3) ($CDCl_3$)



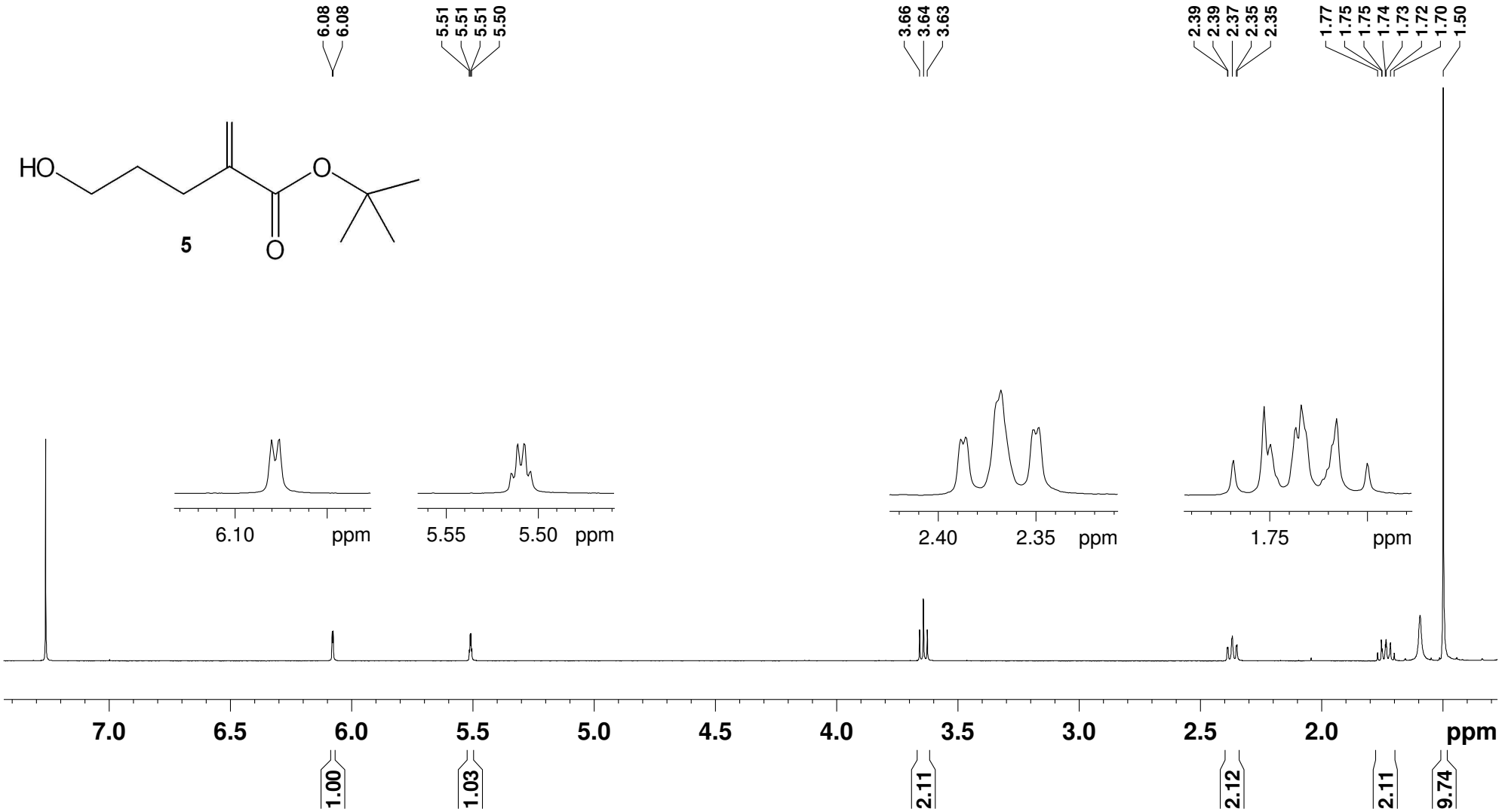
^{1}H-NMR: 1-*tert*-Butyl-5-methyl-2-methylenpentandioat (4) ($CDCl_3$)



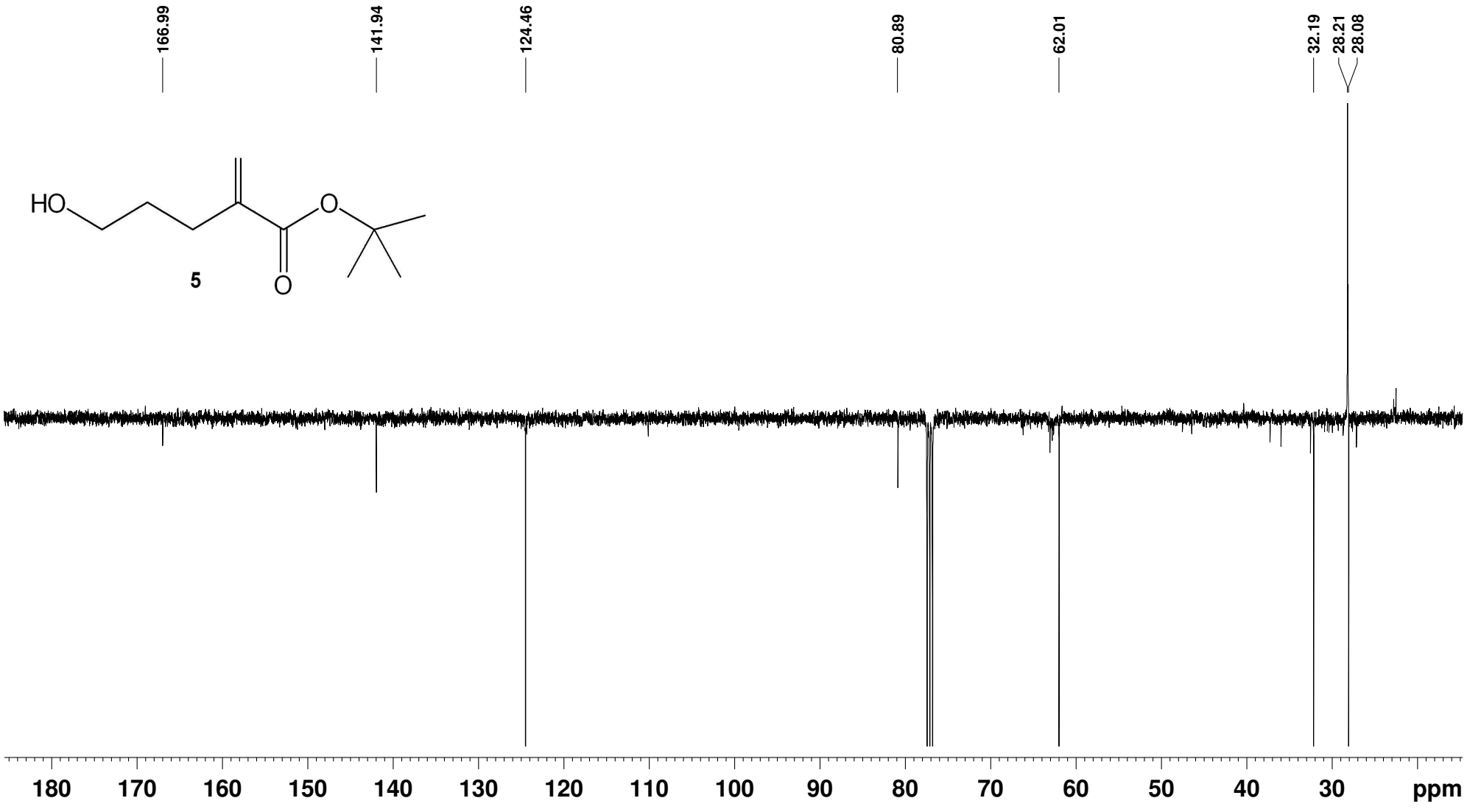
^{13}C-NMR: 1-*tert*-Butyl-5-methyl-2-methylenpentandioat (4) ($CDCl_3$)



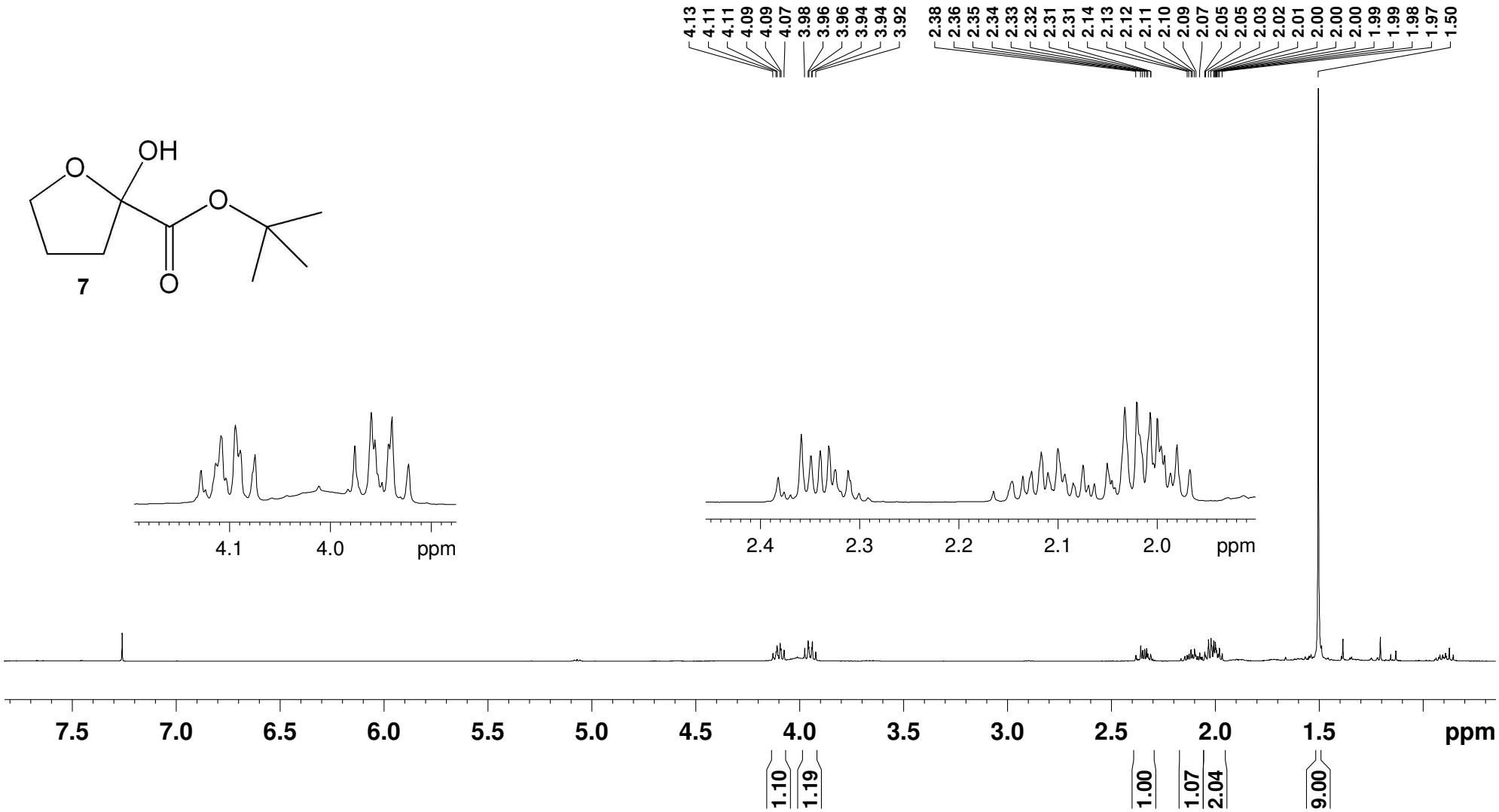
^{1}H-NMR: *tert*-Butyl-5-hydroxy-2-methylenpentanoat (5) ($CDCl_3$)



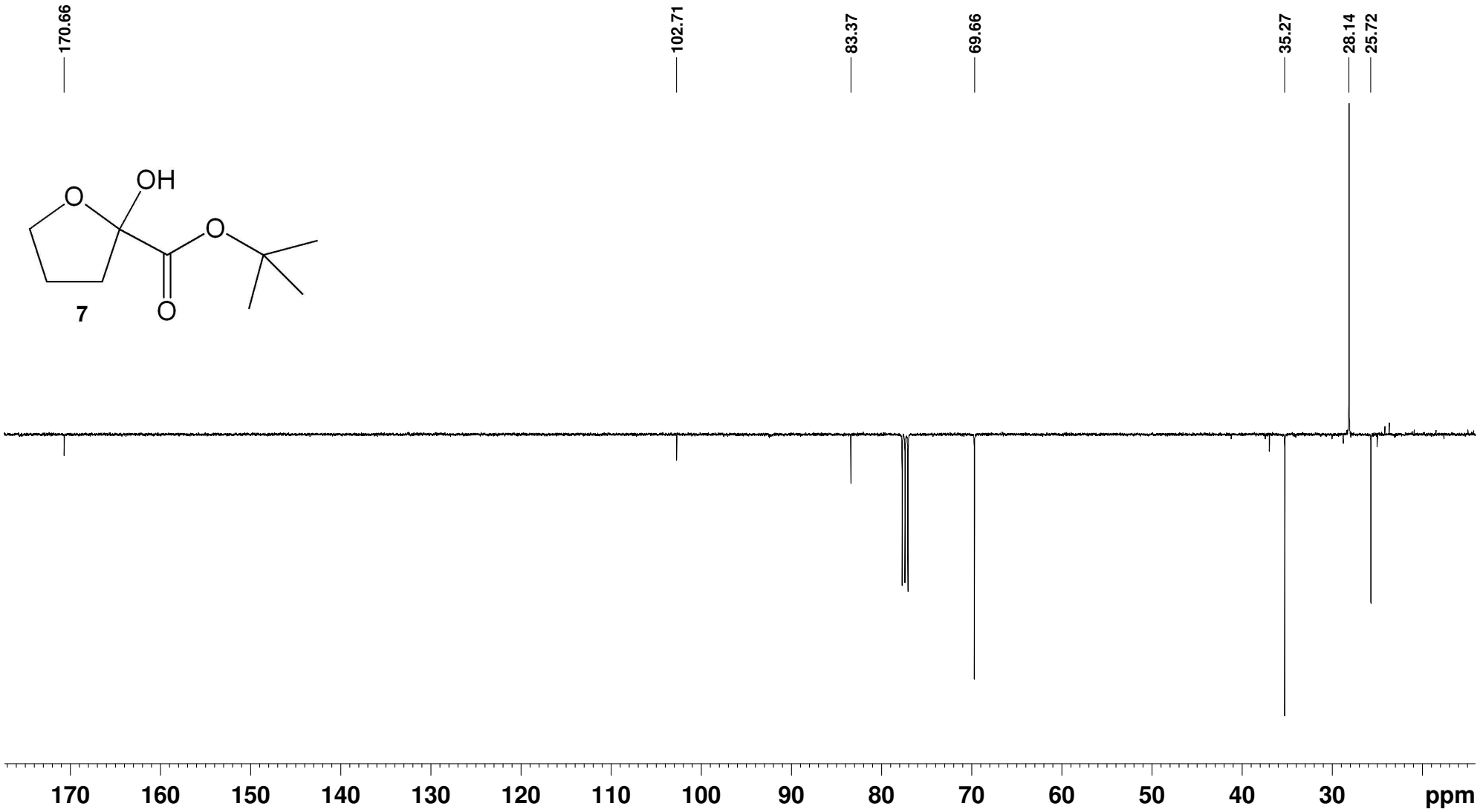
^{13}C-NMR: *tert*-Butyl-5-hydroxy-2-methylenpentanoat (5) ($CDCl_3$)



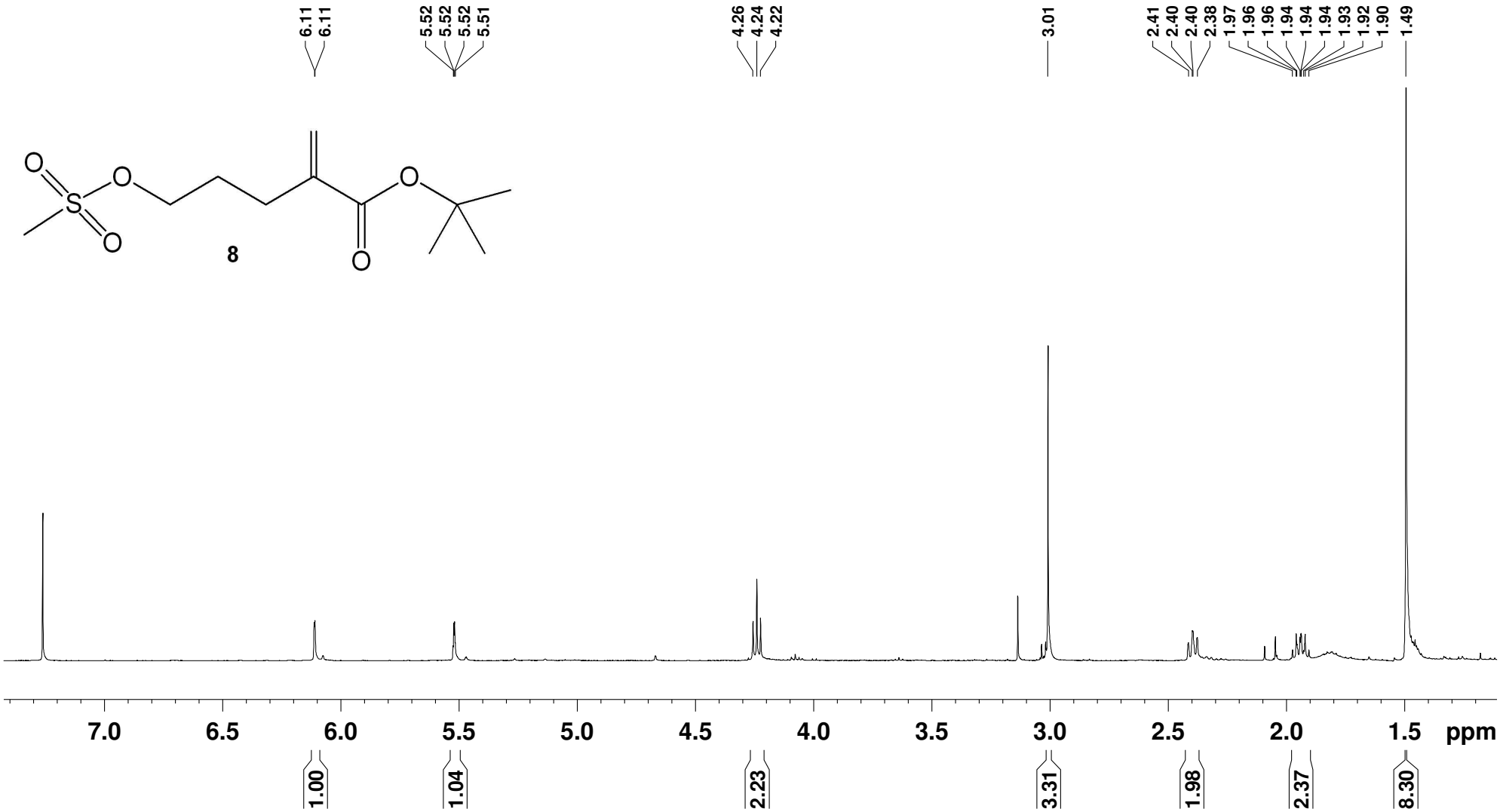
^{1}H-NMR: *tert*-Butyl-2-hydroxytetrahydrofuran-2-carboxylat (7) ($CDCl_3$)



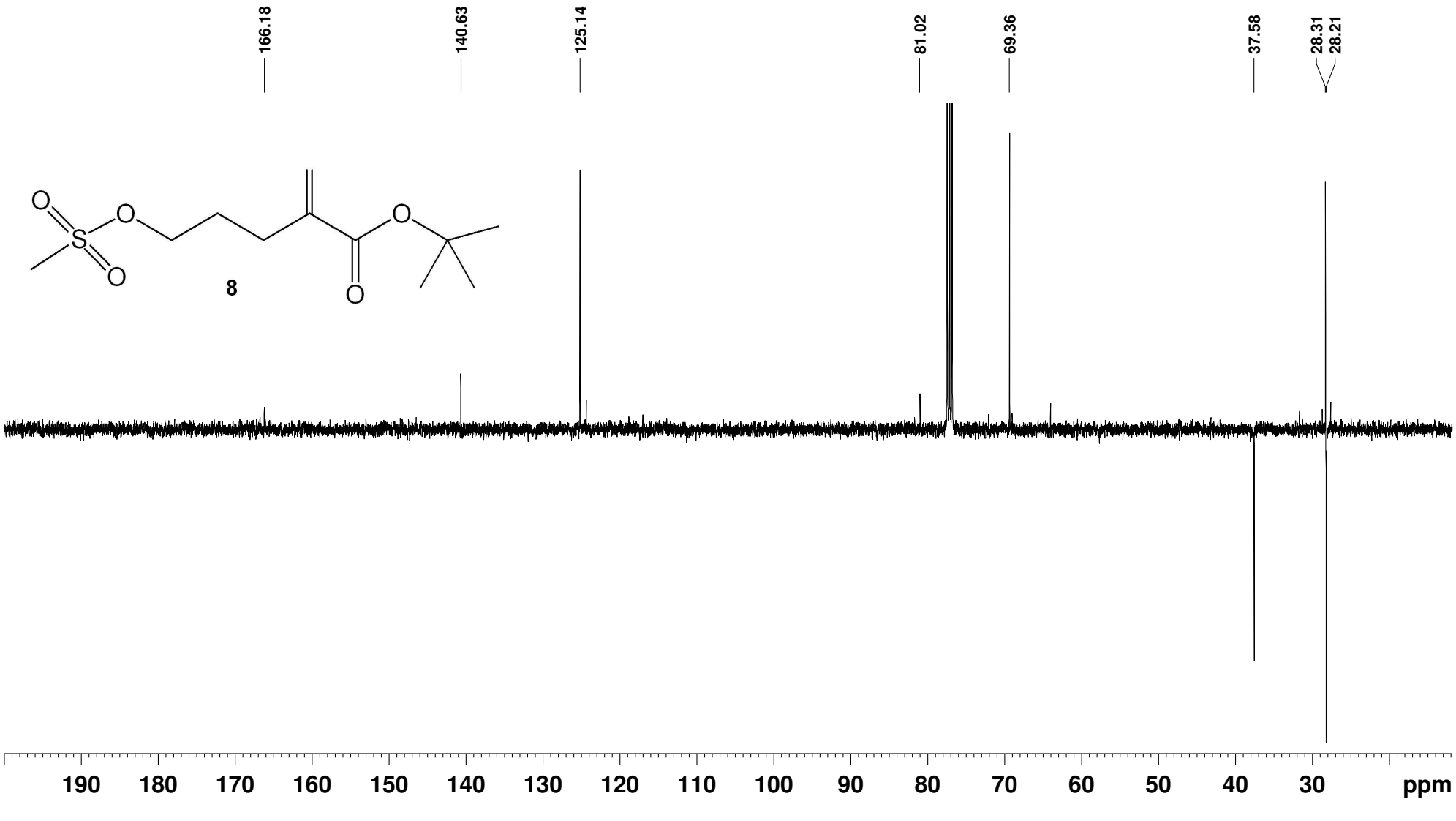
^{13}C-NMR: *tert*-Butyl-2-hydroxytetrahydrofuran-2-carboxylat (7) ($CDCl_3$)



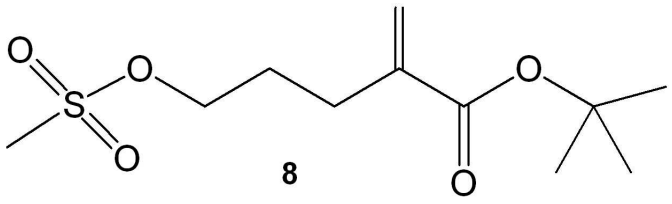
^{1}H-NMR: *tert*-Butyl-2-methylen-5-[(methylsulfonyl)oxy]pentanoat (8) ($CDCl_3$)



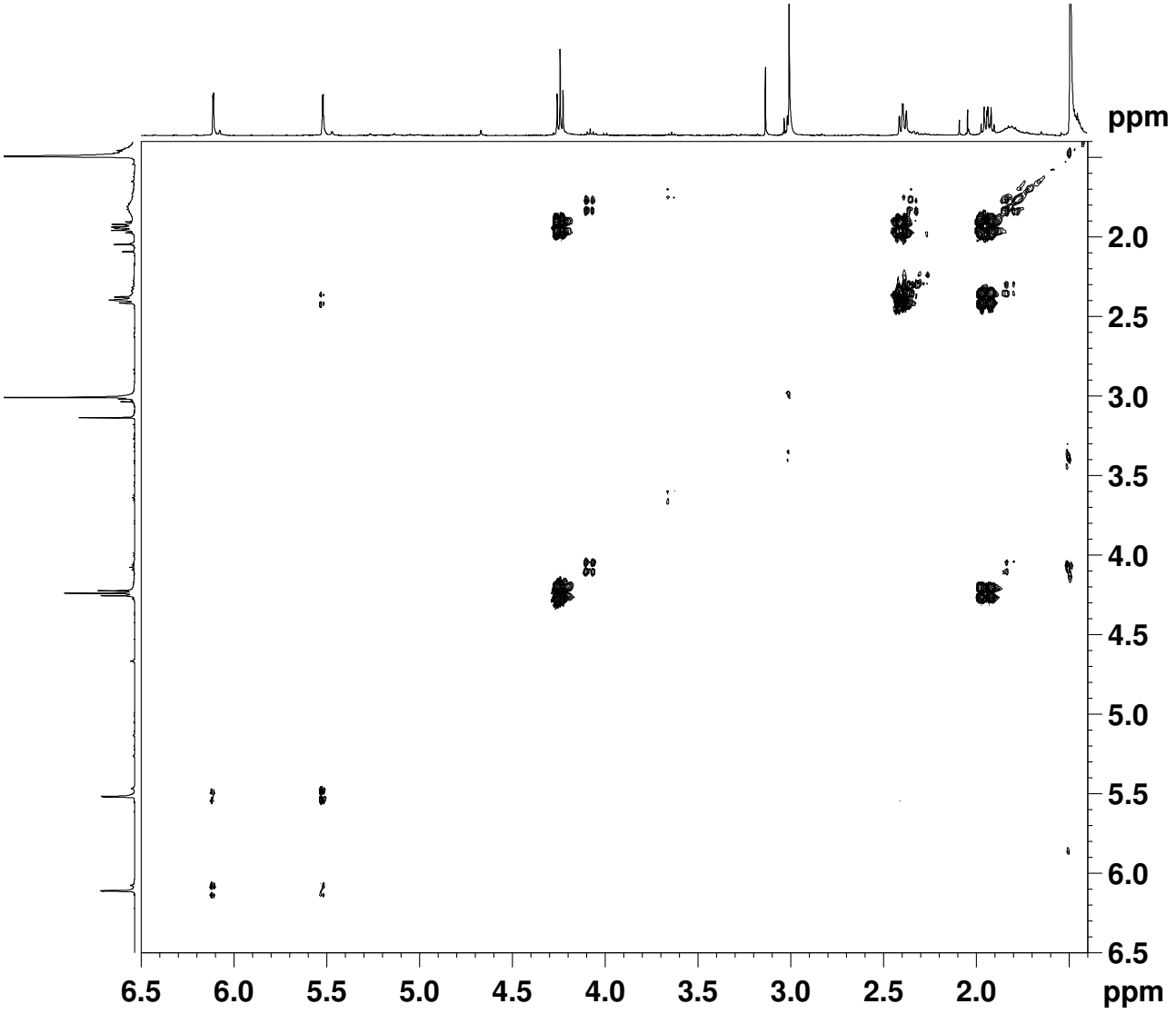
^{13}C-NMR: *tert*-Butyl-2-methylen-5-[(methylsulfonyl)oxy]pentanoat (8) ($CDCl_3$)



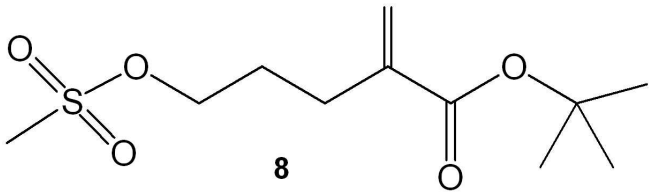
COSY: *tert*-Butyl-2-methylen-5-[(methylsulfonyl)oxy]pentanoat (8) ($CDCl_3$)



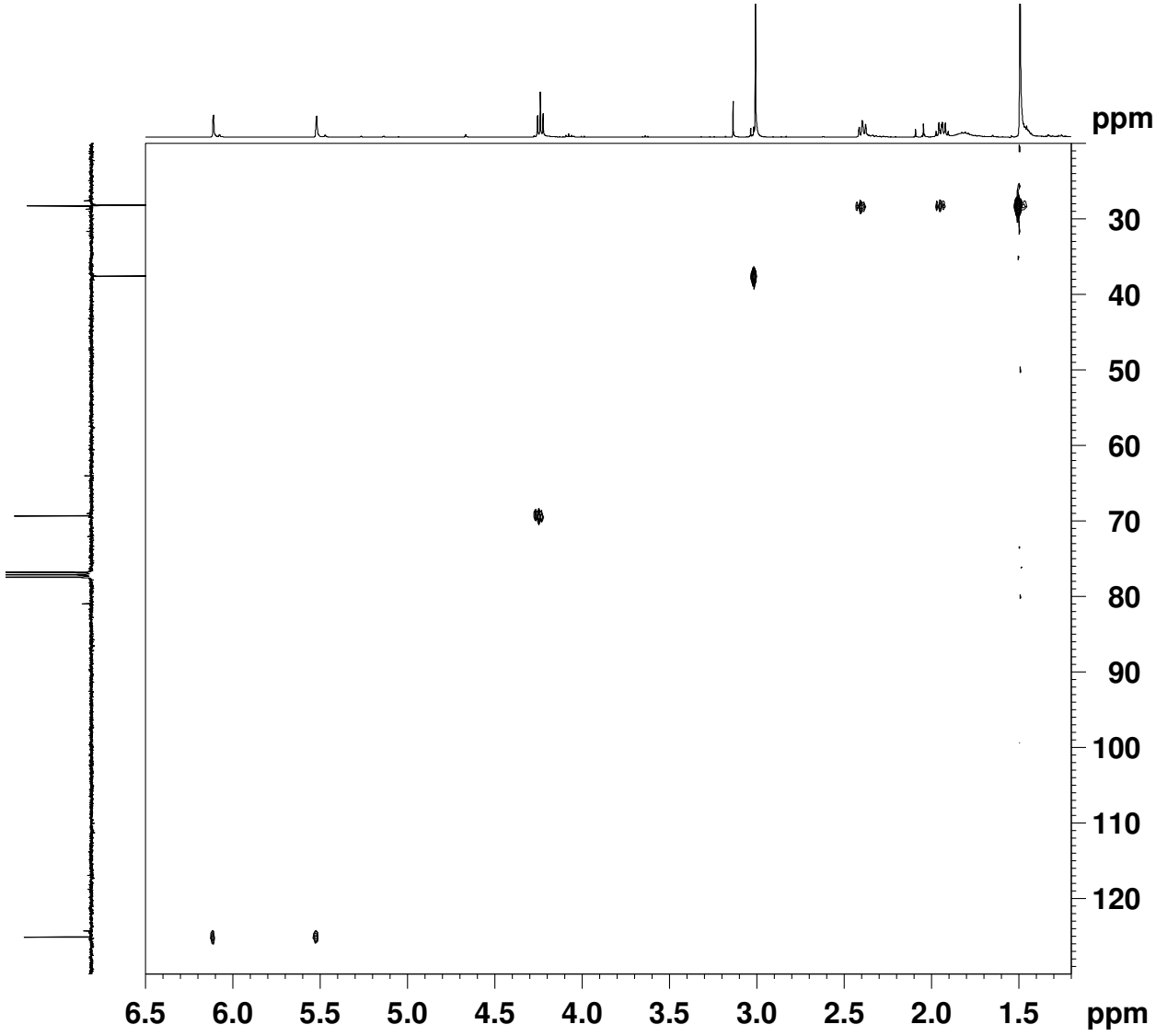
8



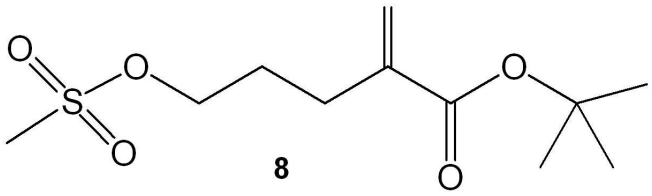
HSQC: *tert*-Butyl-2-methylen-5-[(methylsulfonyl)oxy]pentanoat (8) ($CDCl_3$)



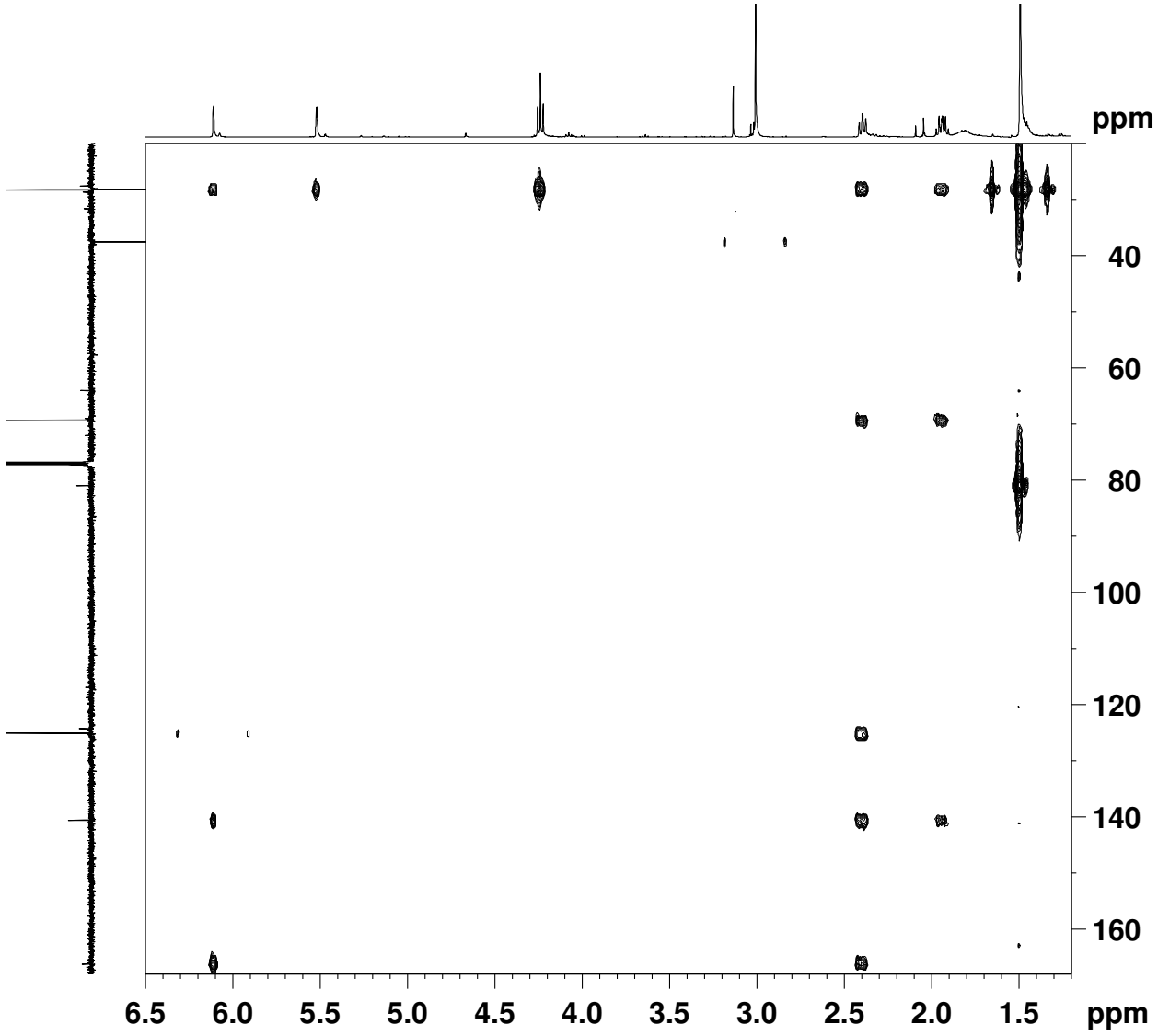
8



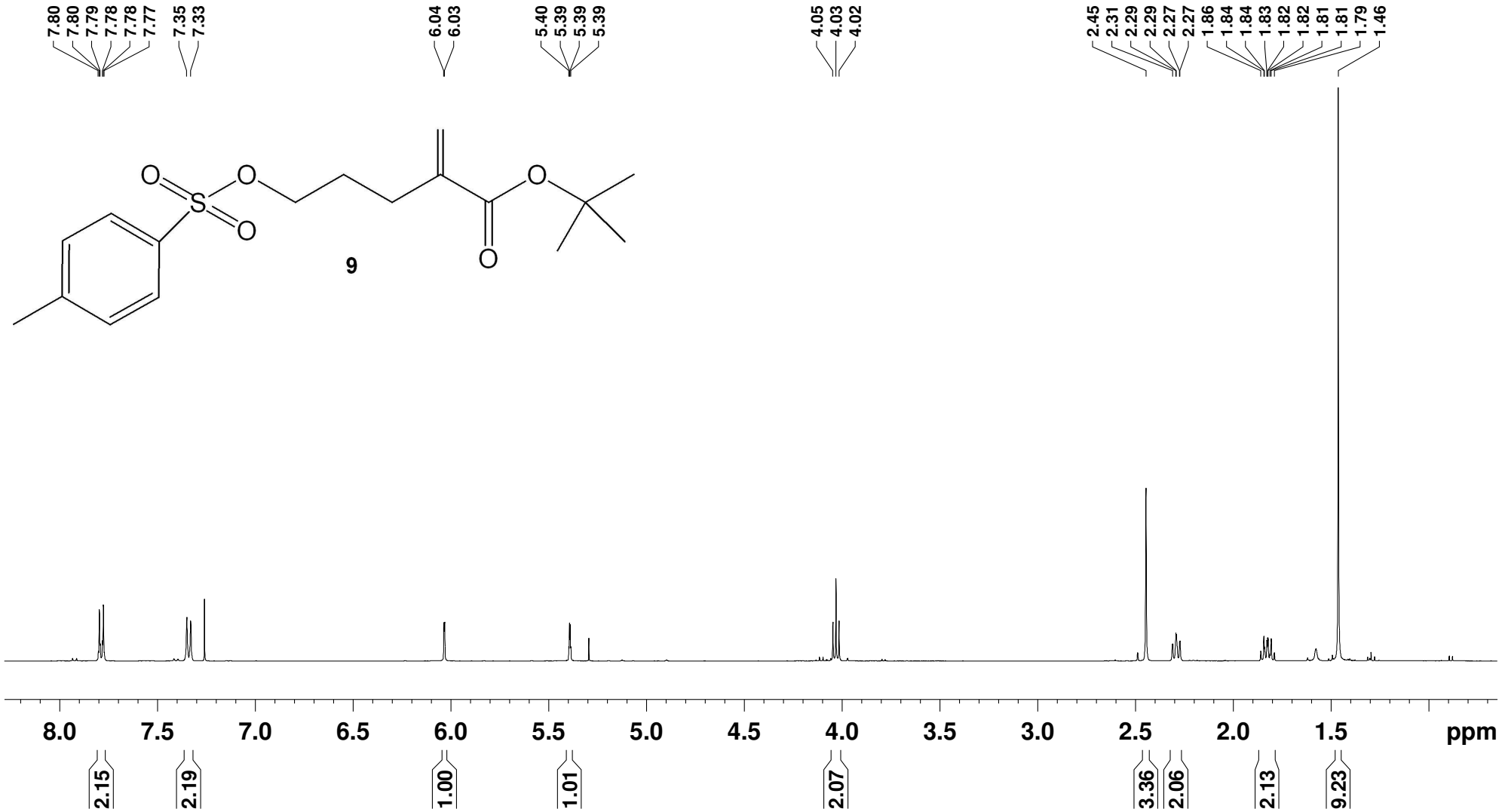
HMBC: *tert*-Butyl-2-methylen-5-[(methylsulfonyl)oxy]pentanoat (8) ($CDCl_3$)



8

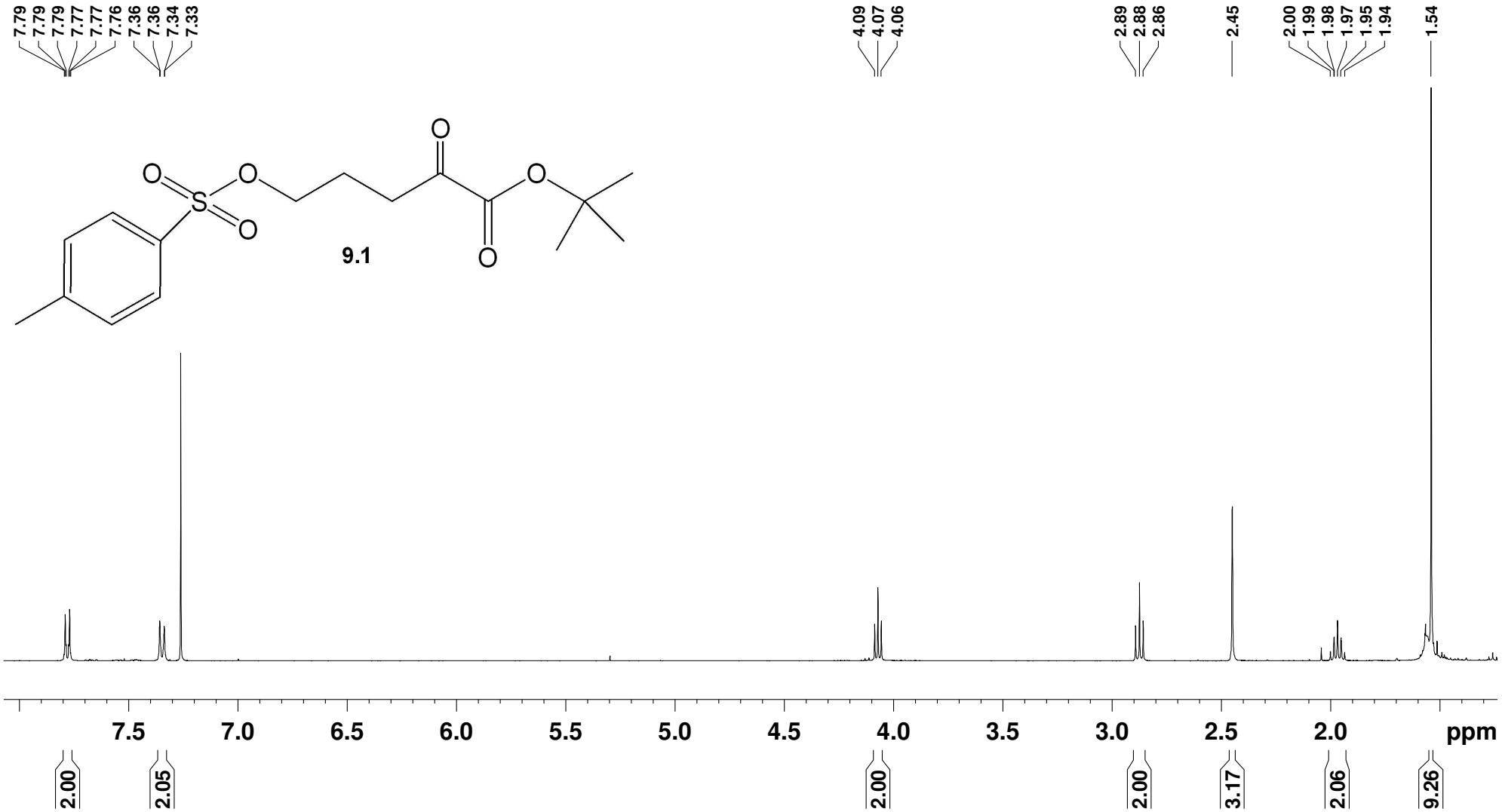


^{1}H-NMR: *tert*-Butyl-2-methylen-5-[((methylphenyl)sulfonyl)oxy]pentanoat (9) ($CDCl_3$)

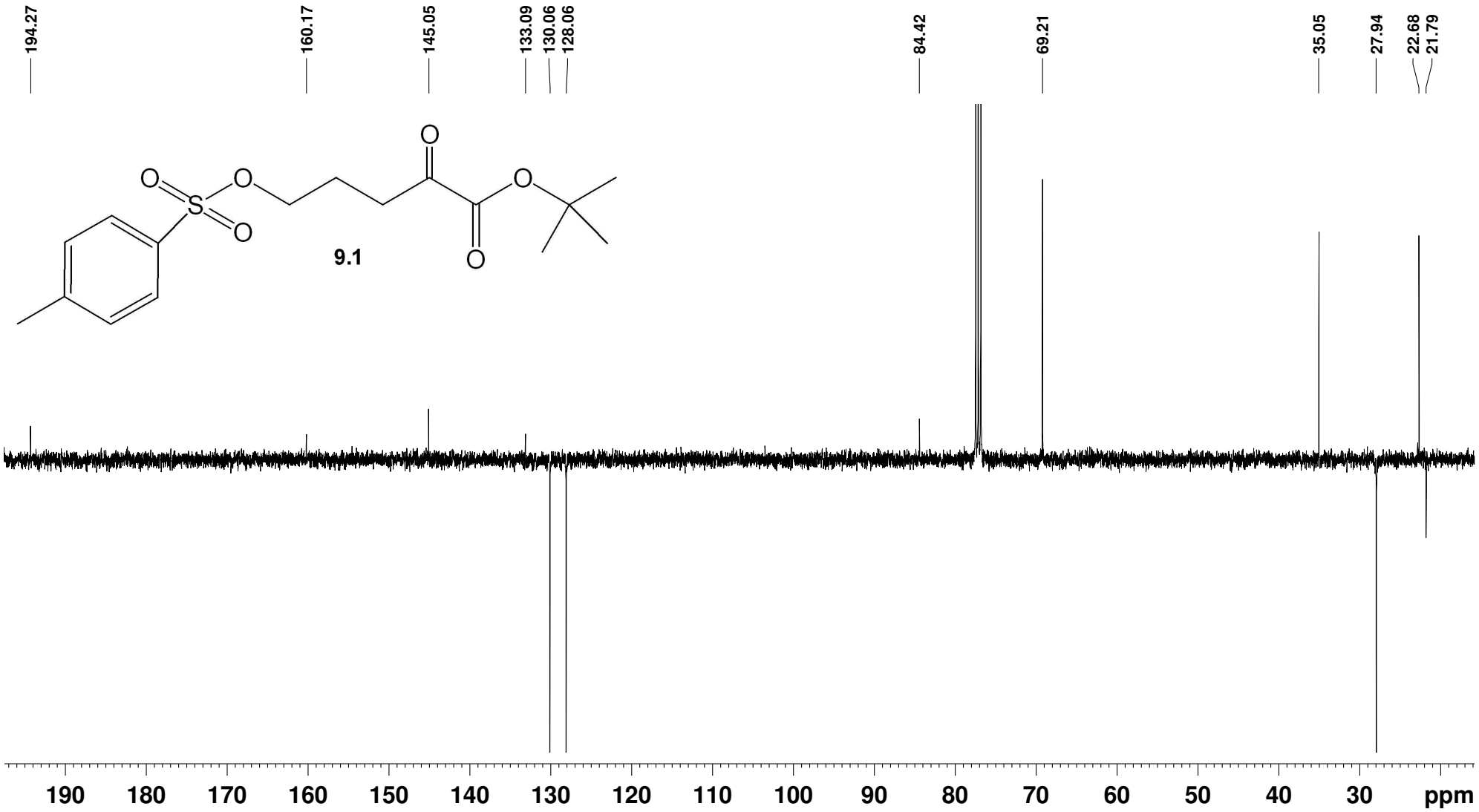


^{13}C-NMR: *tert*-Butyl-2-methylen-5-[((methylphenyl)sulfonyl)oxy]pentanoat (9) ($CDCl_3$)

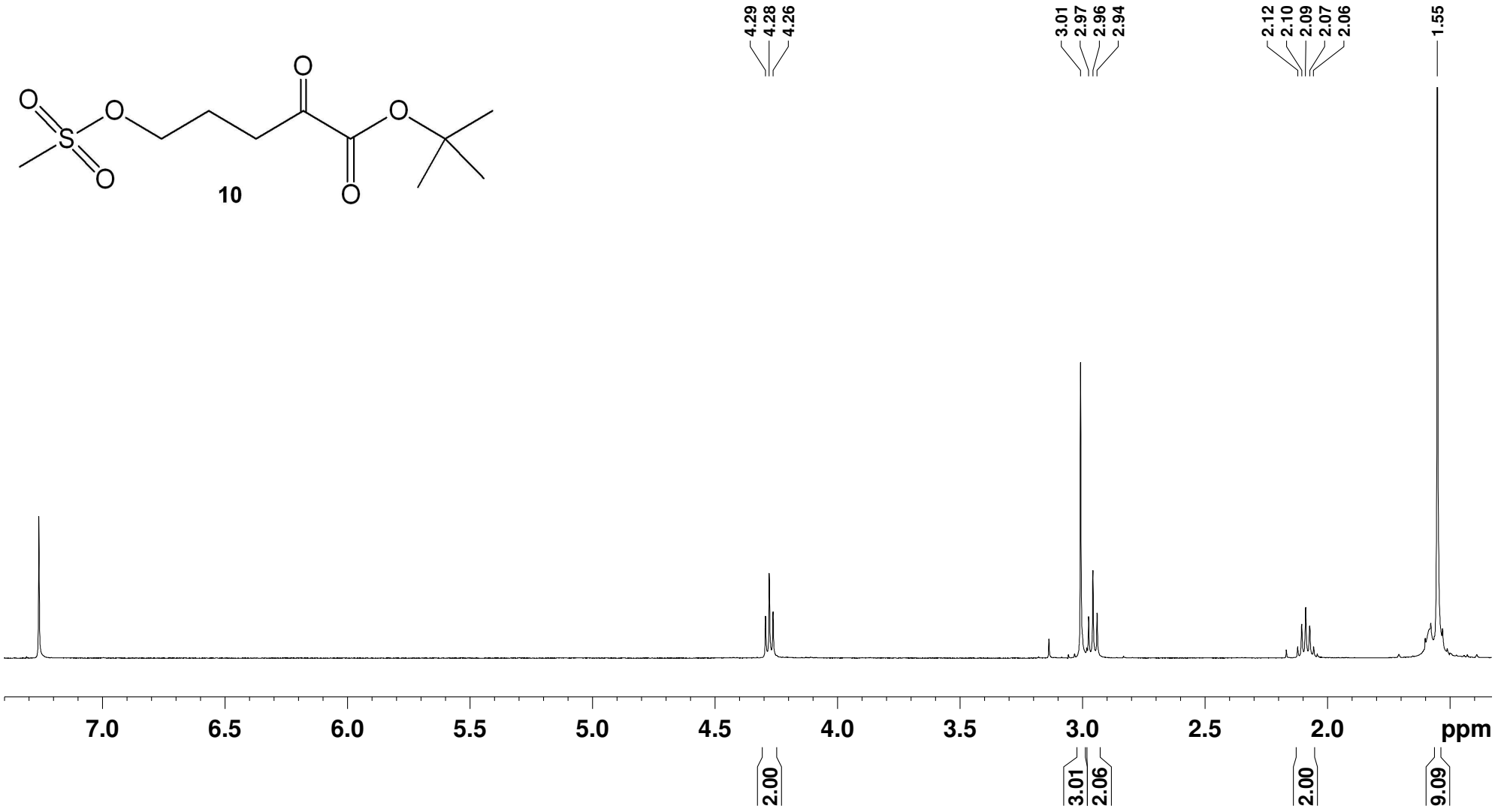
^{1}H-NMR: *tert*-Butyl-5-[((methylphenyl)sulfonyl)oxy]-2-oxopentanoat (9.1) ($CDCl_3$)



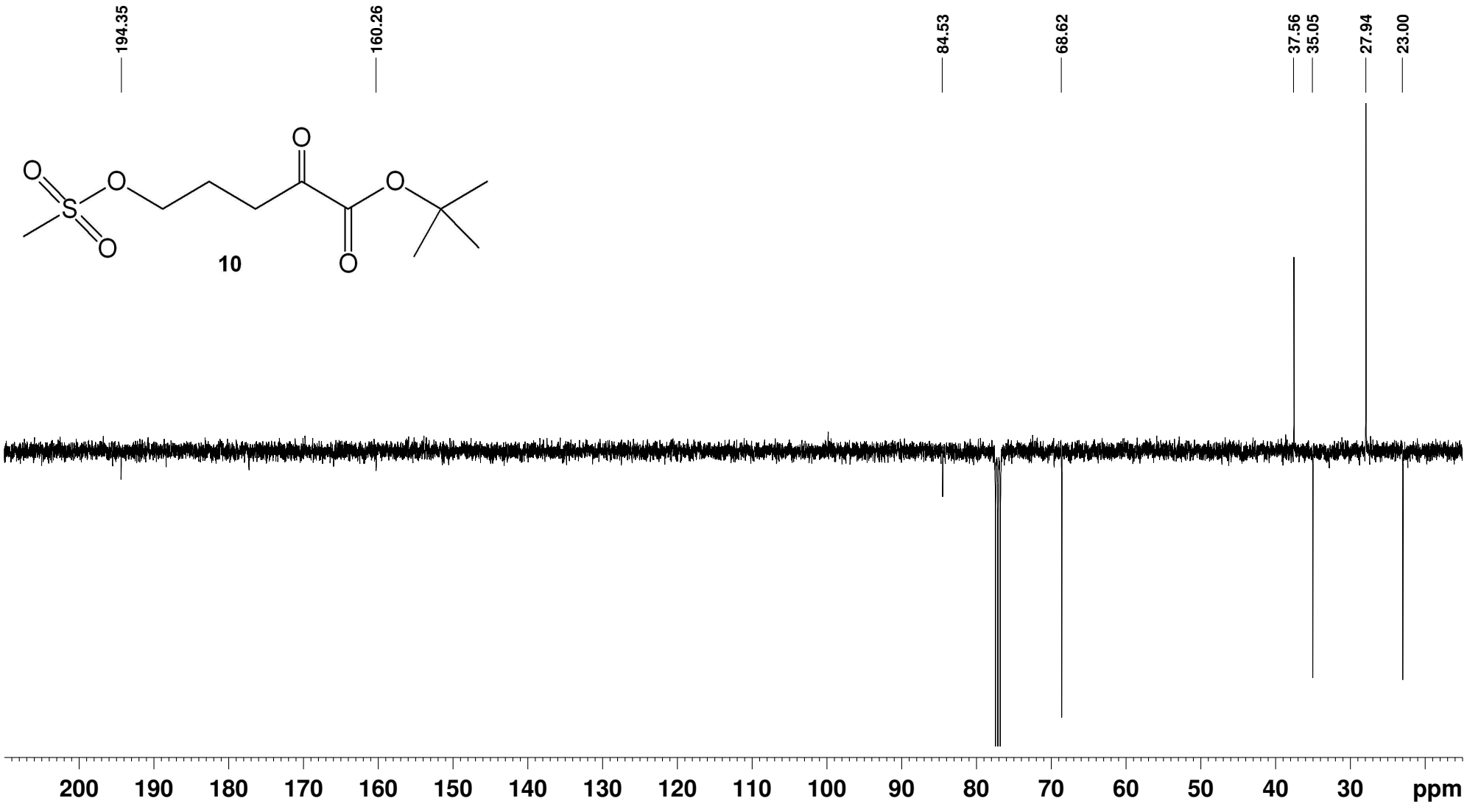
^{13}C-NMR: *tert*-Butyl-5-[((methylphenyl)sulfonyl)oxy]-2-oxopentanoat (9.1) ($CDCl_3$)



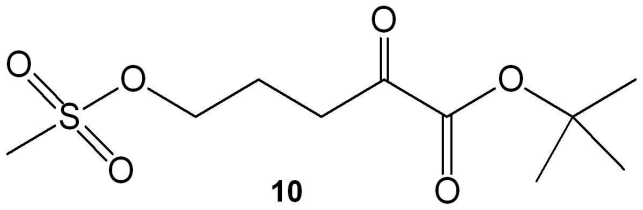
^{1}H-NMR: *tert*-Butyl-5-[(methylsulfonyl)oxy]-2-oxopentanoat (10) ($CDCl_3$)



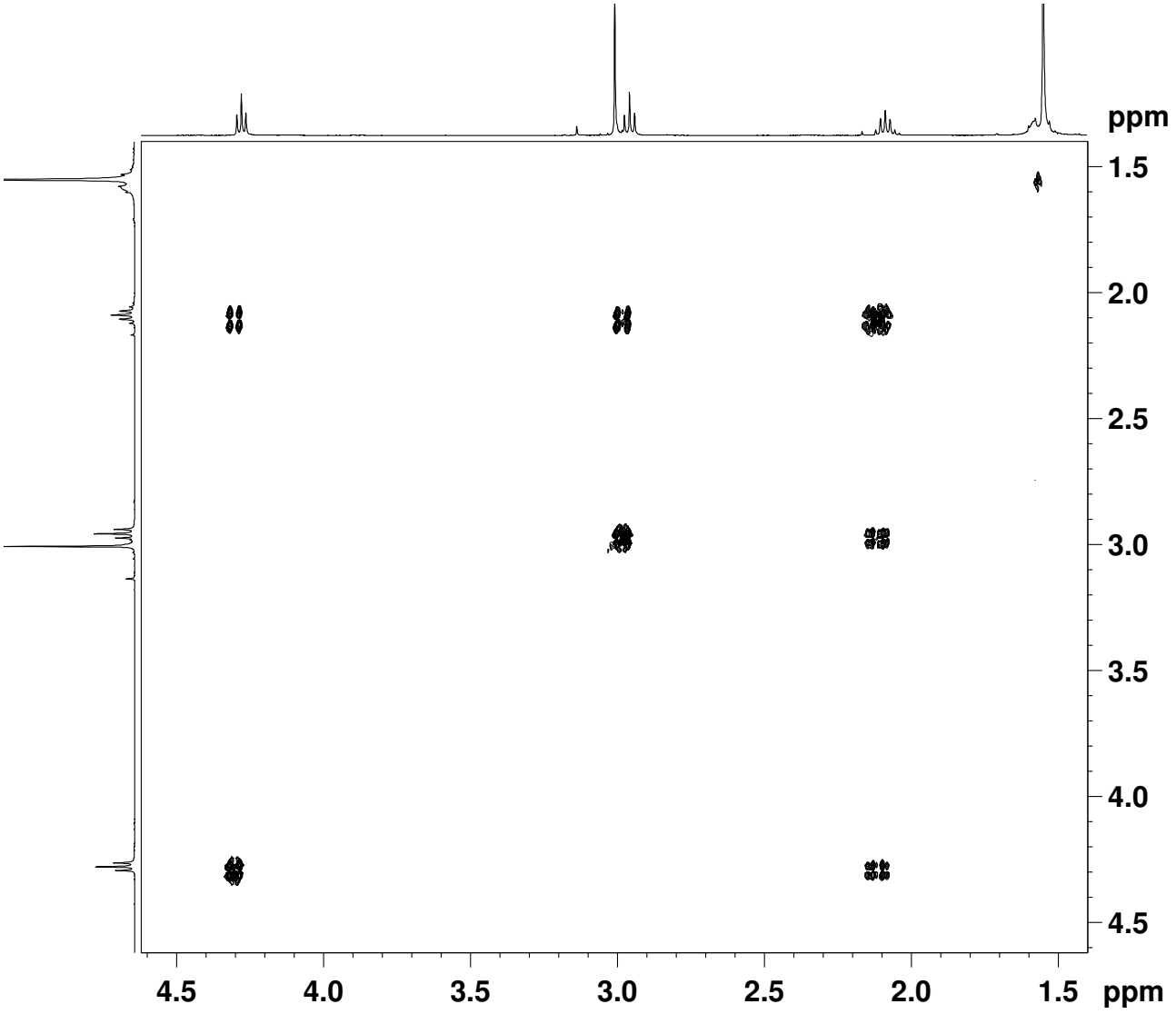
^{13}C-NMR: *tert*-Butyl-5-[(methylsulfonyl)oxy]-2-oxopentanoat (10) ($CDCl_3$)



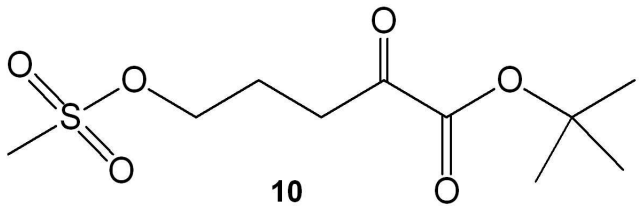
COSY: *tert*-Butyl-5-[(methylsulfonyl)oxy]-2-oxopentanoat (10) ($CDCl_3$)



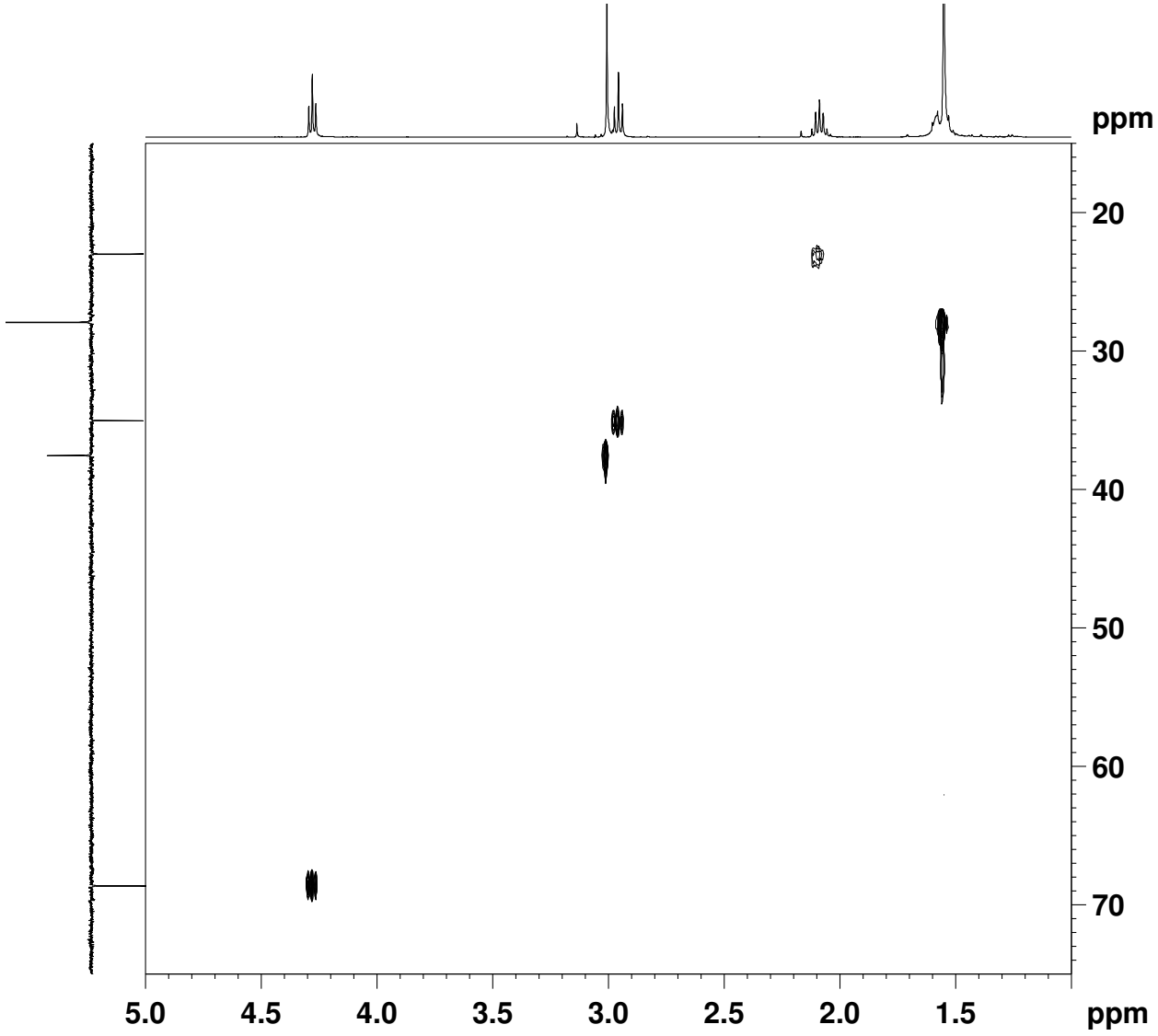
10



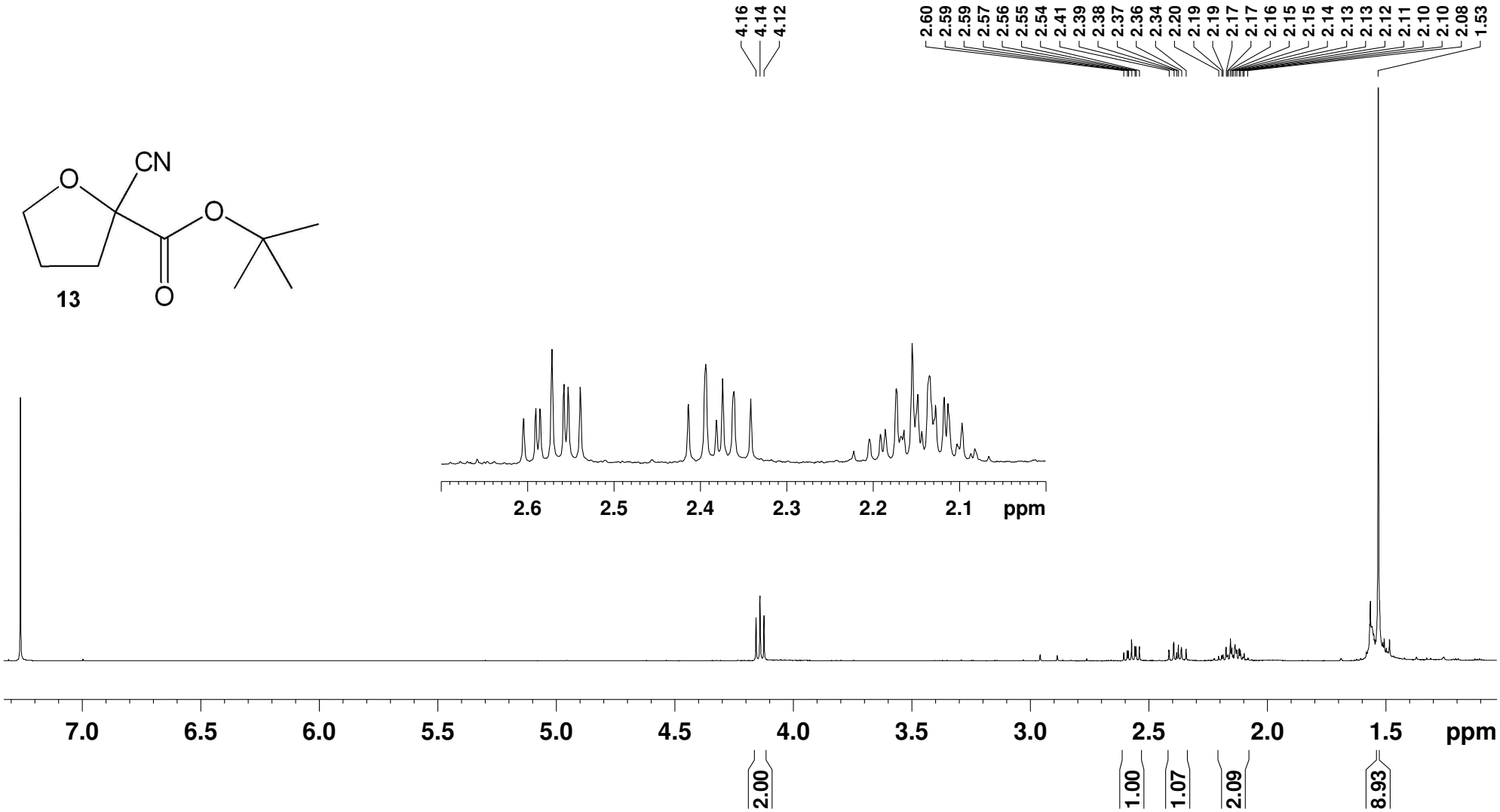
HSQC: *tert*-Butyl-5-[(methylsulfonyl)oxy]-2-oxopentanoat (10) ($CDCl_3$)



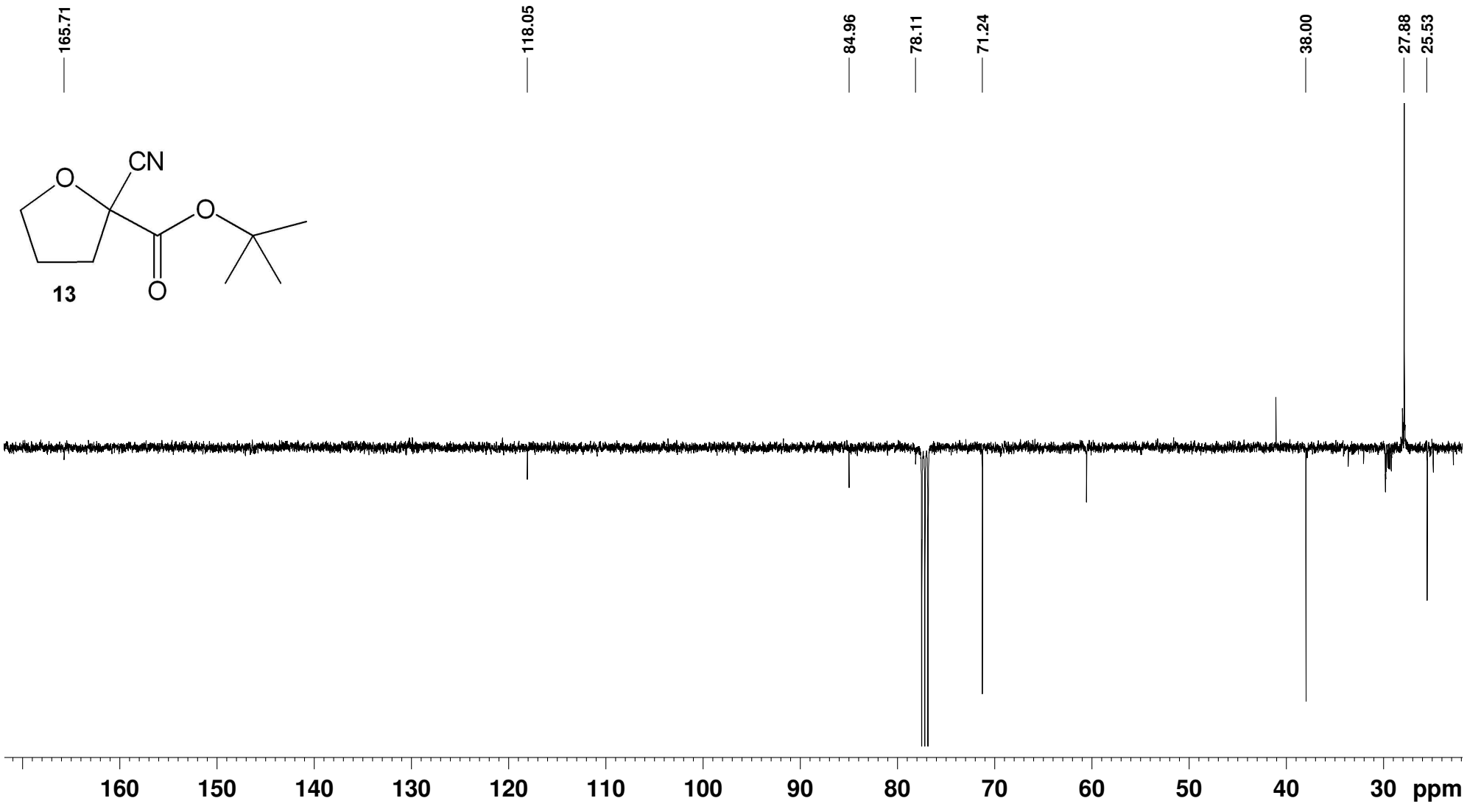
10



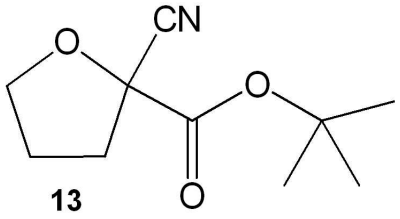
^{1}H-NMR: *tert*-Butyl-2-cyanotetrahydrofuran-2-carboxylat (13) ($CDCl_3$)



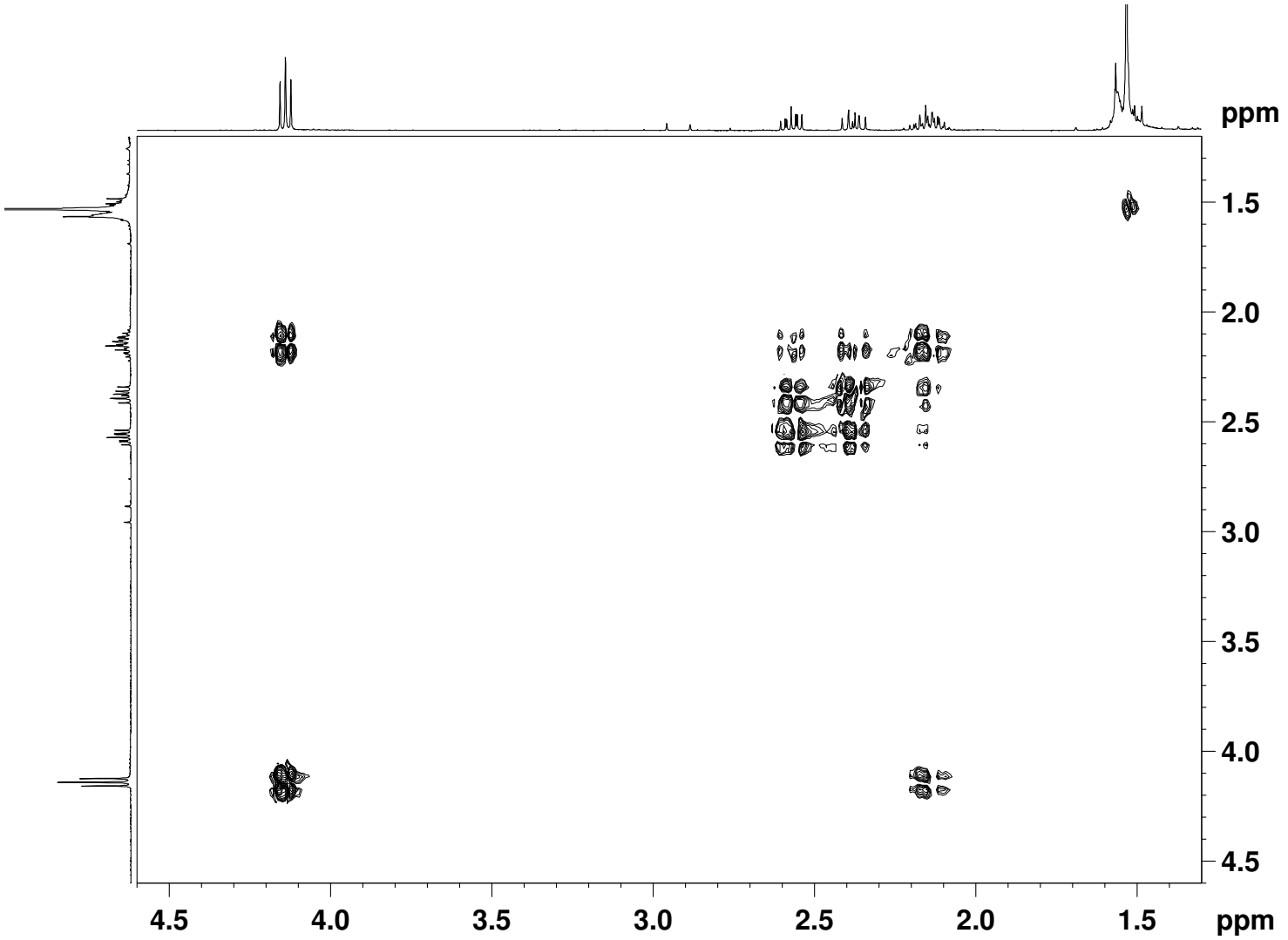
^{13}C-NMR: *tert*-Butyl-2-cyanotetrahydrofuran-2-carboxylat (13) ($CDCl_3$)



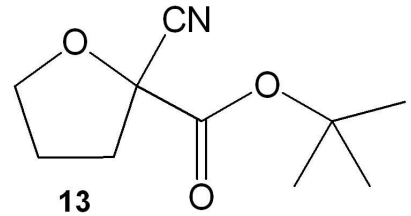
COSY: *tert*-Butyl-2-cyanotetrahydrofuran-2-carboxylat (13) ($CDCl_3$)



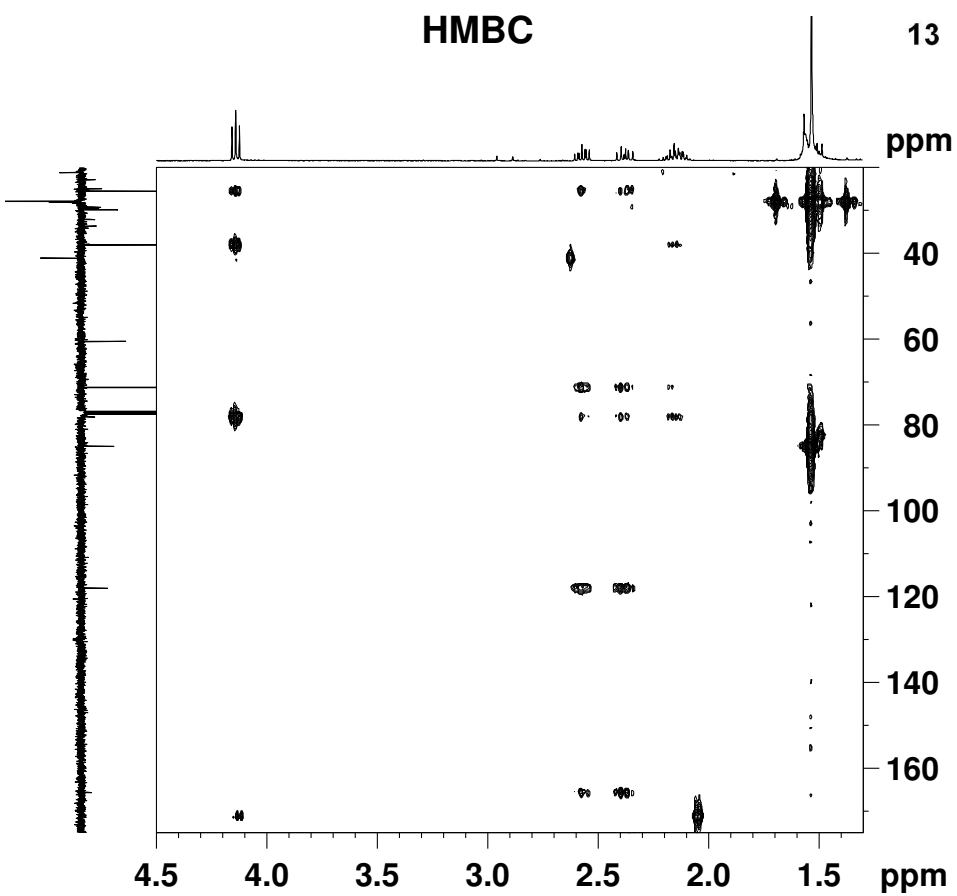
13

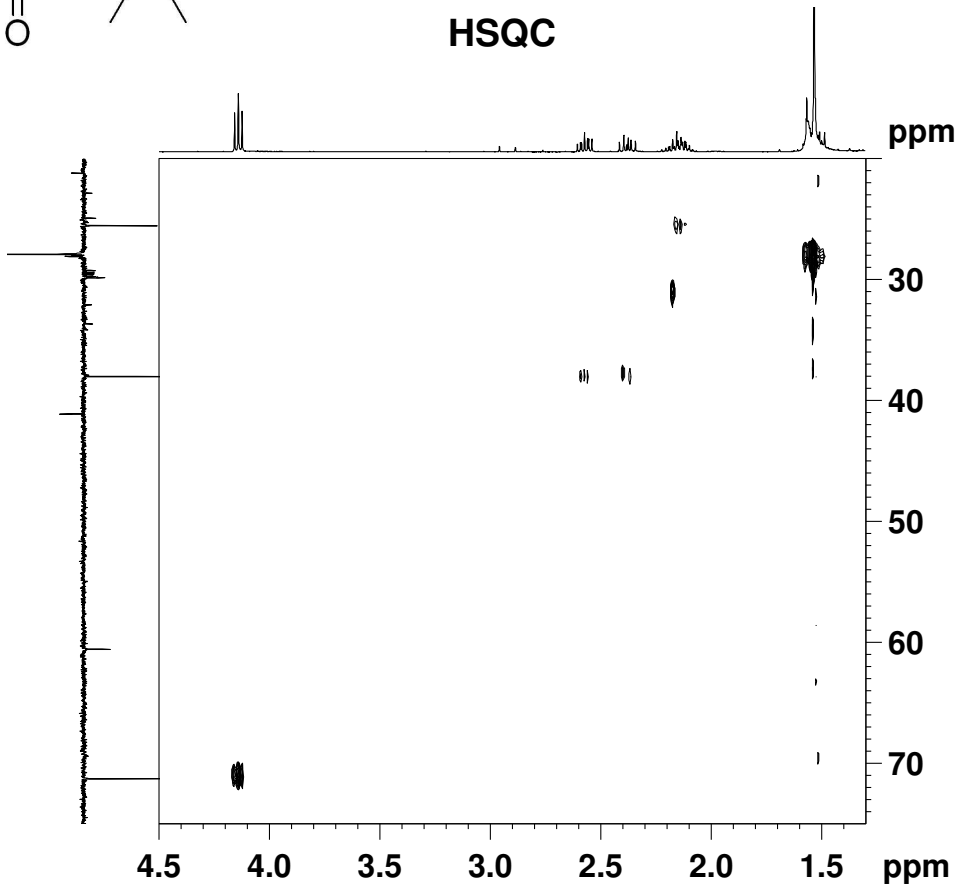


2D-NMR: *tert*-Butyl-2-cyanotetrahydrofuran-2-carboxylat (13) ($CDCl_3$)

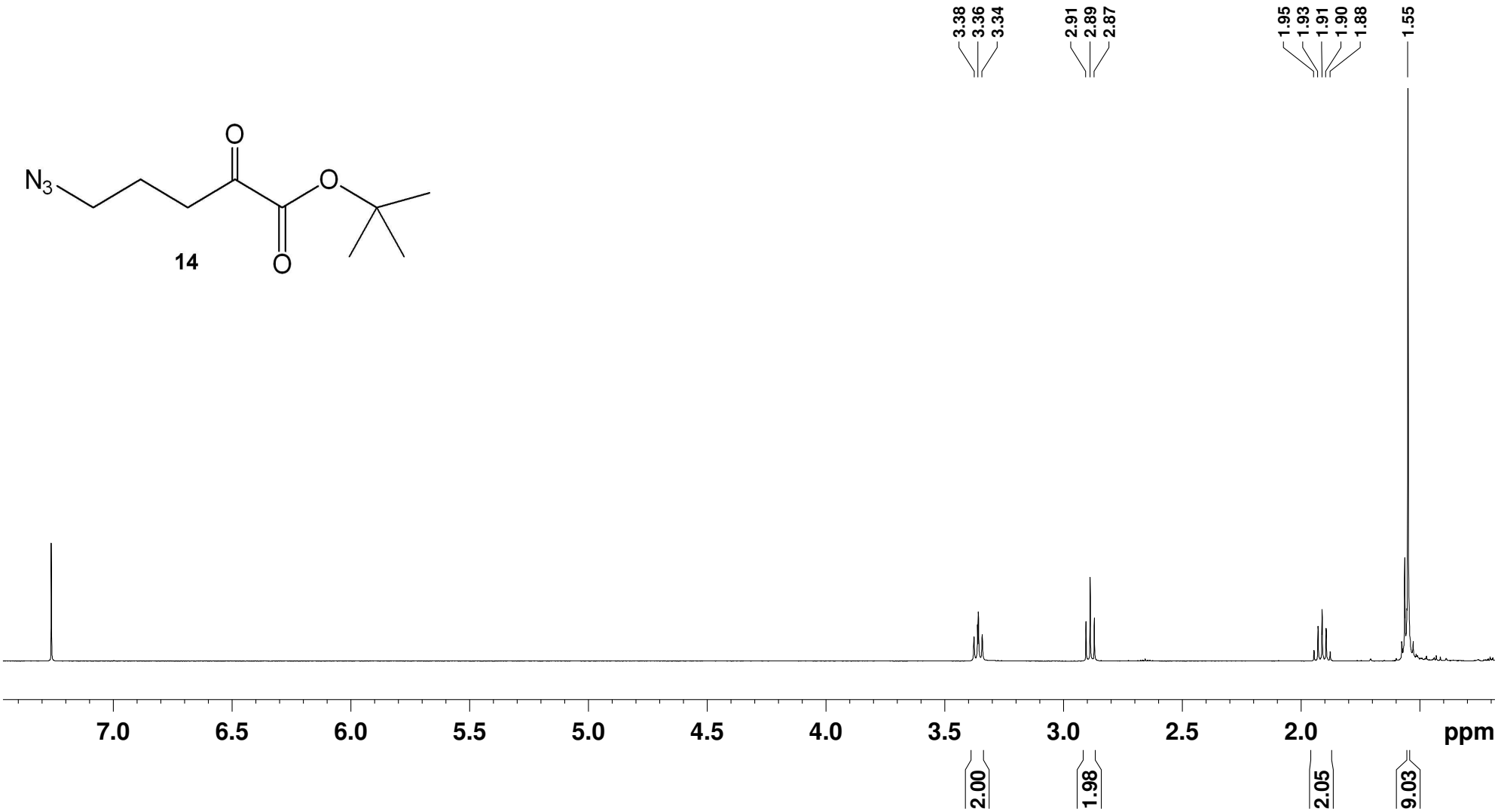


13

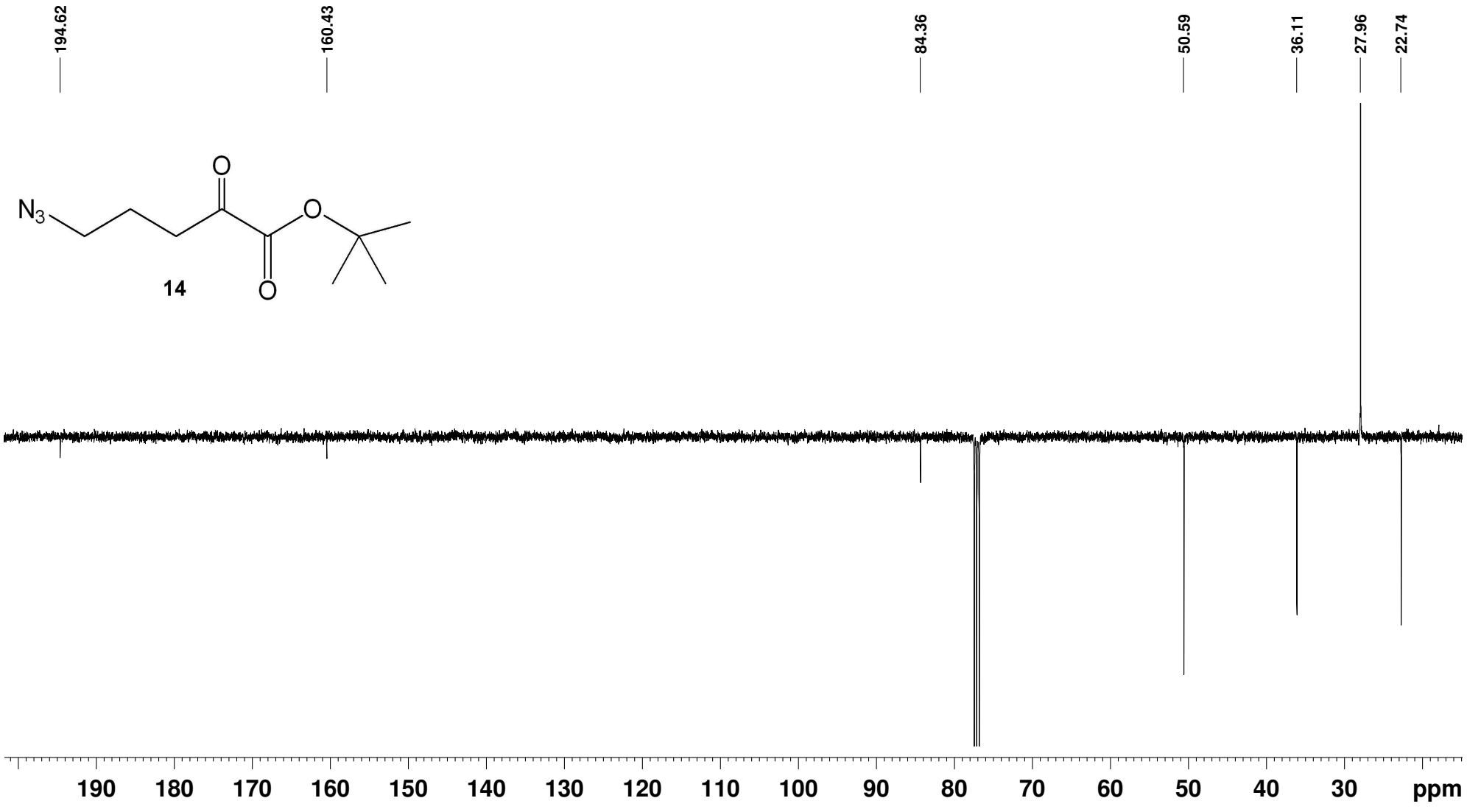




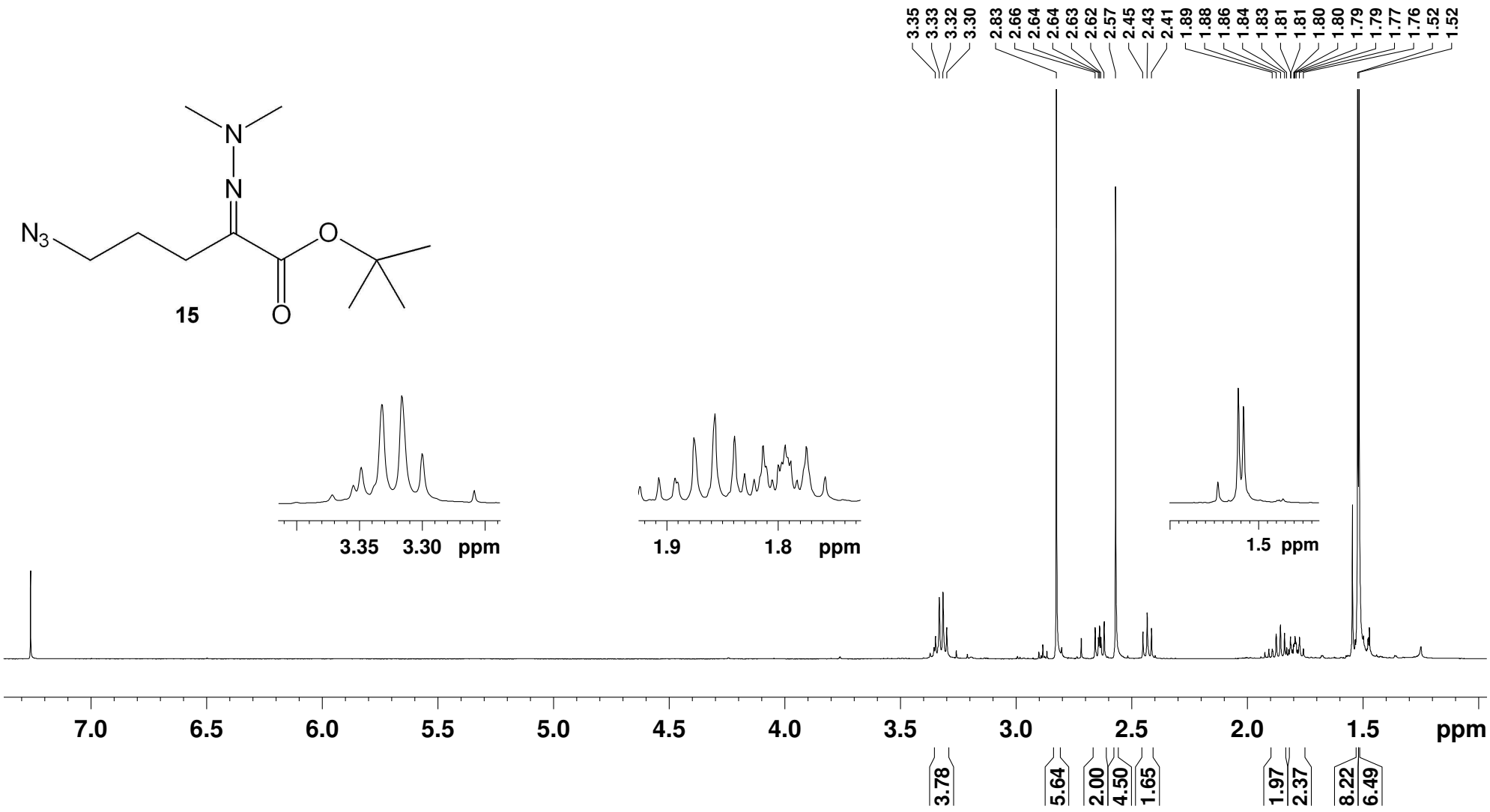
^{1}H-NMR: *tert*-Butyl-5-azido-2-oxopentanoat (14) ($CDCl_3$)



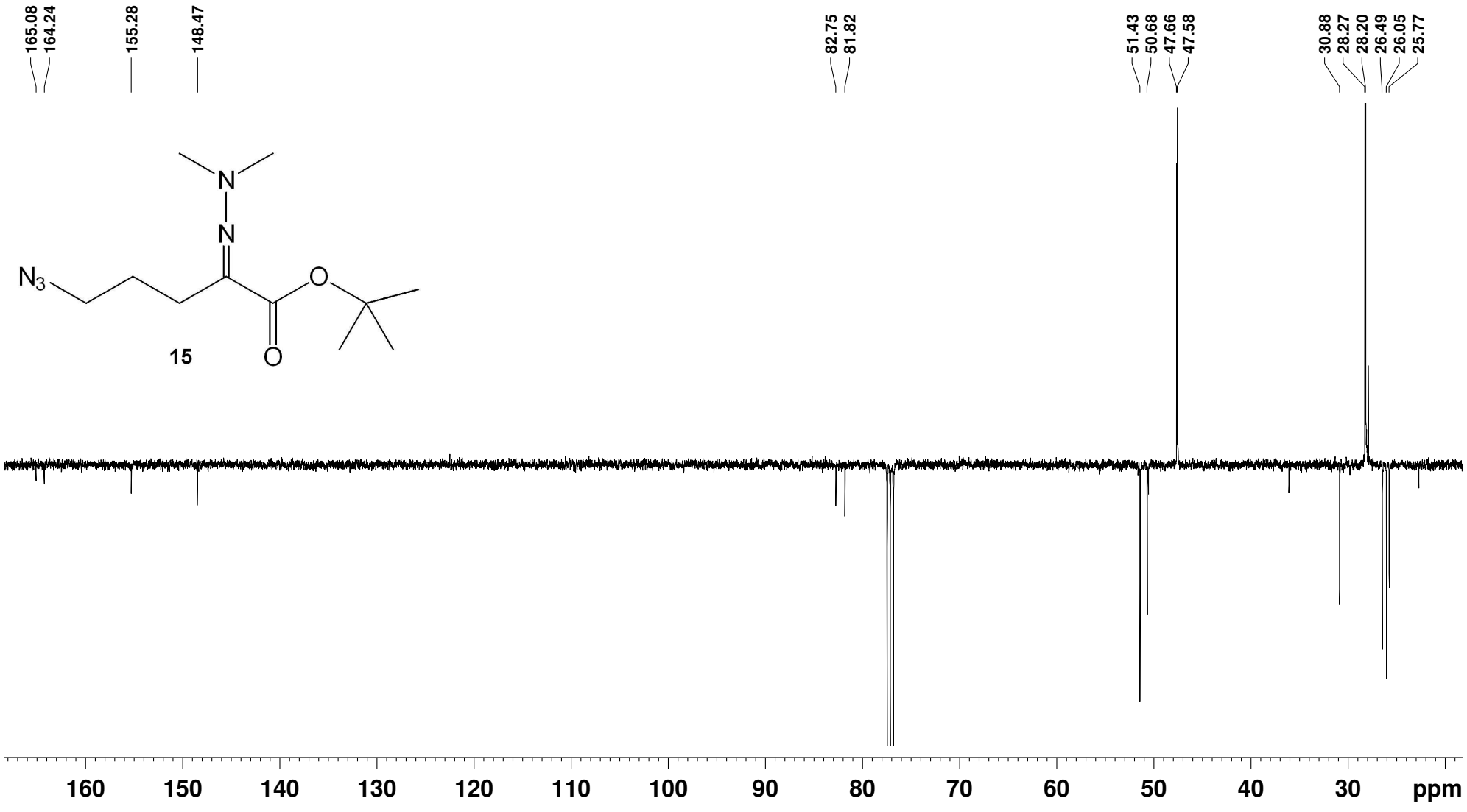
^{13}C-NMR: *tert*-Butyl-5-azido-2-oxopentanoat (14) ($CDCl_3$)



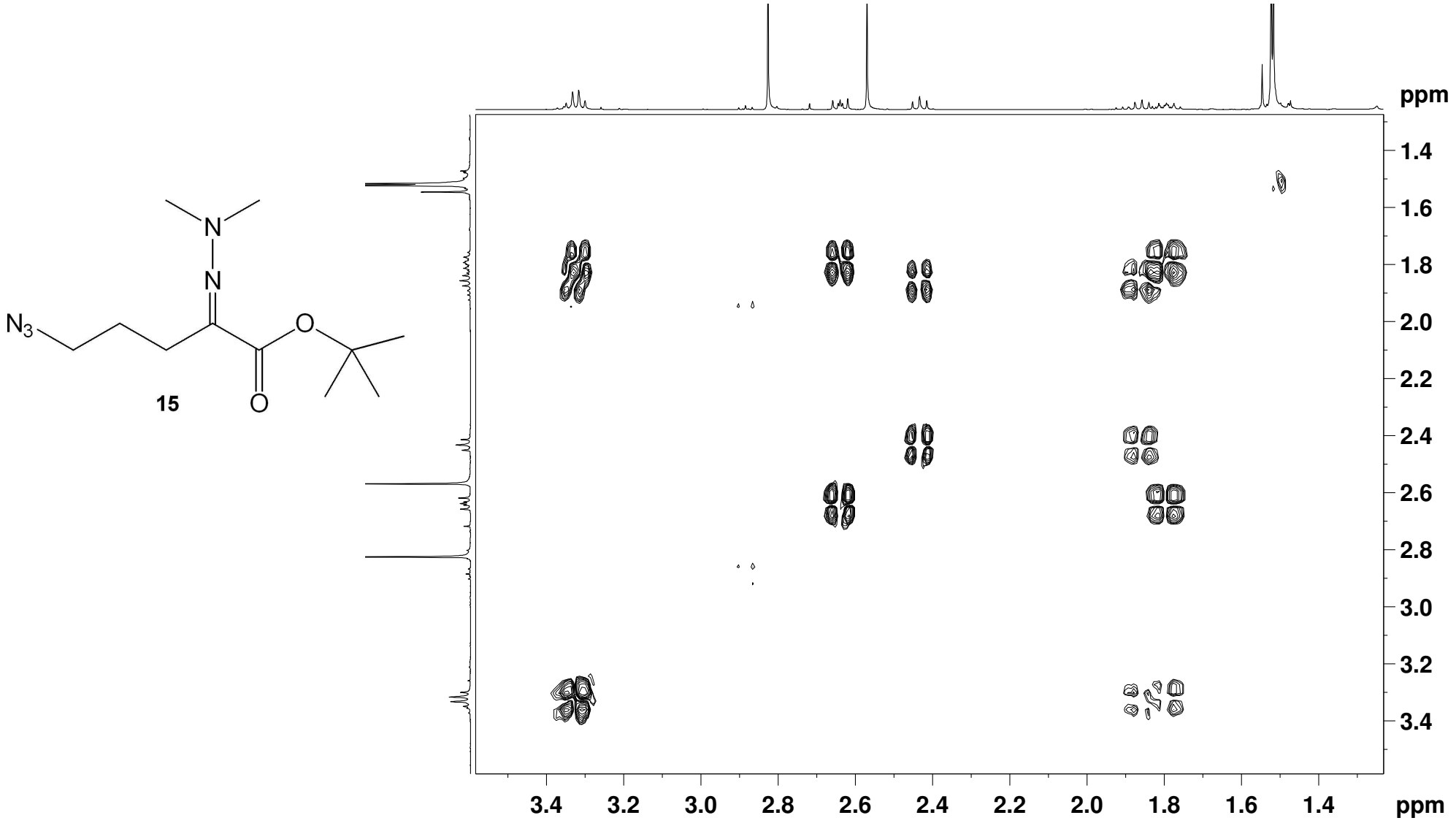
^{1}H-NMR: *tert*-Butyl-5-azido-2-(2,2-dimethylhydrazono)pentanoat (15, E/Z) ($CDCl_3$)



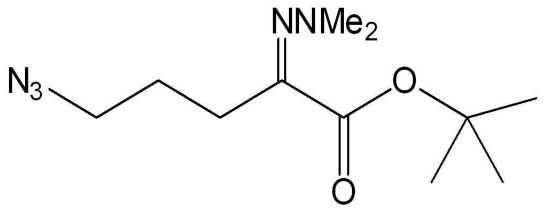
^{13}C-NMR: *tert*-Butyl-5-azido-2-(2,2-dimethylhydrazono)pentanoat (15, E/Z) ($CDCl_3$)

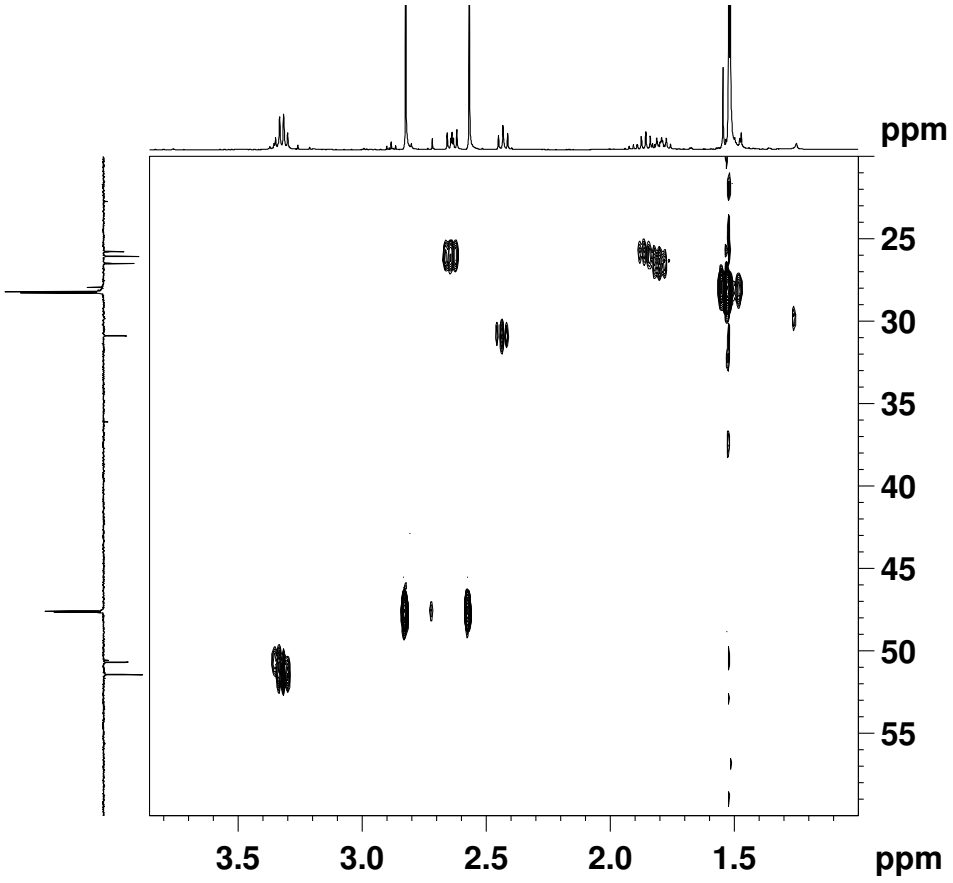


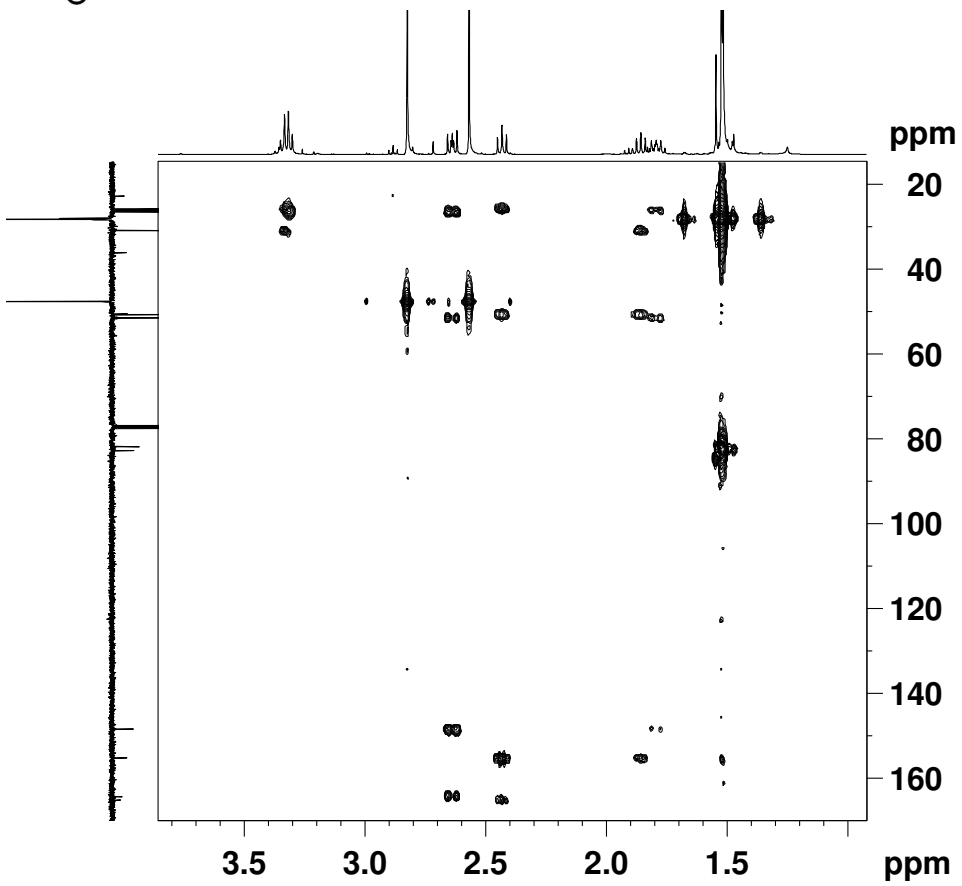
COSY: *tert*-Butyl-5-azido-2-(2,2-dimethylhydrazono)pentanoat (15, E/Z) ($CDCl_3$)



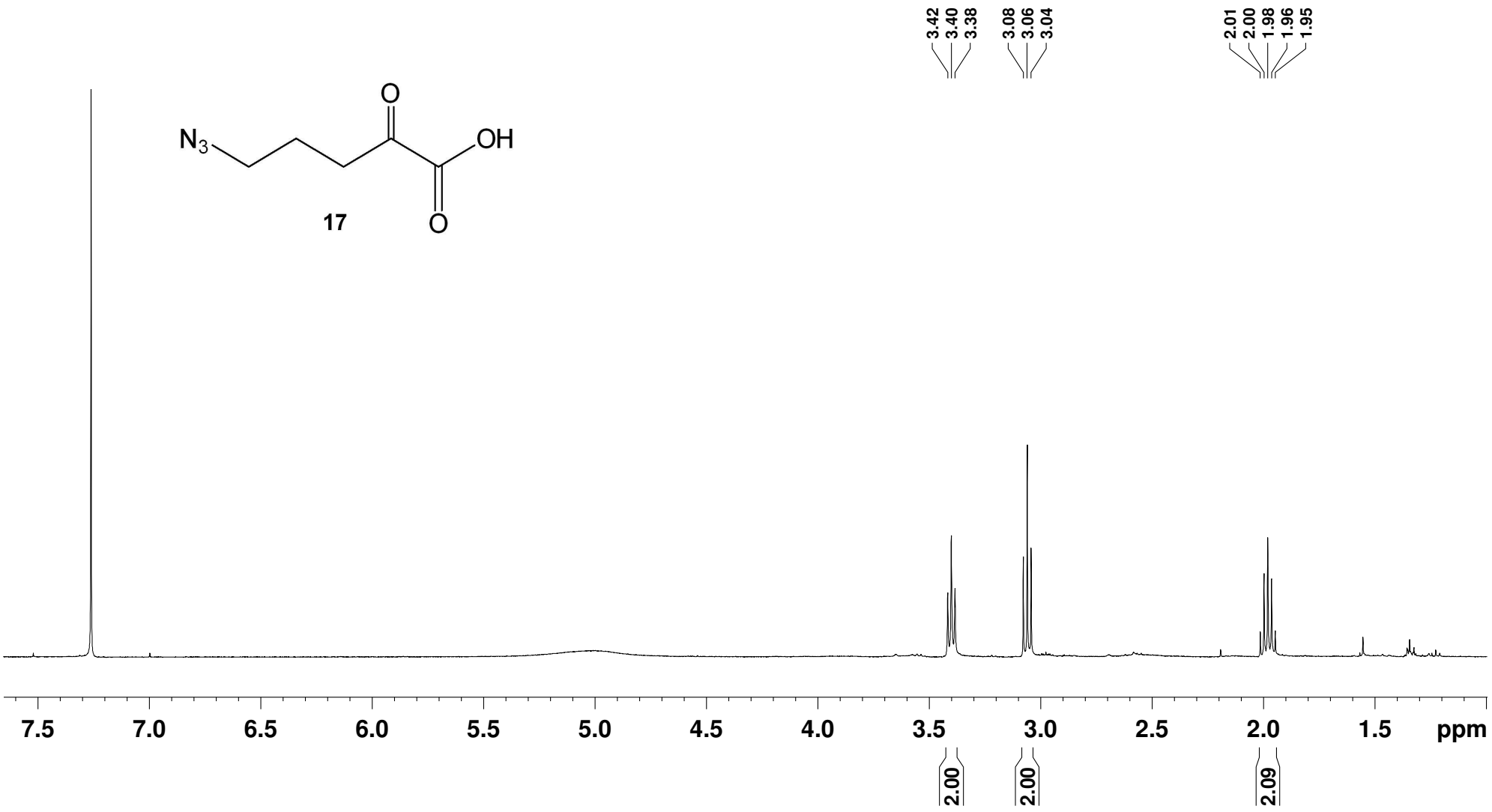
2D-NMR: *tert*-Butyl-5-azido-2-(2,2-dimethylhydrazono)pentanoat (15, E/Z) ($CDCl_3$)



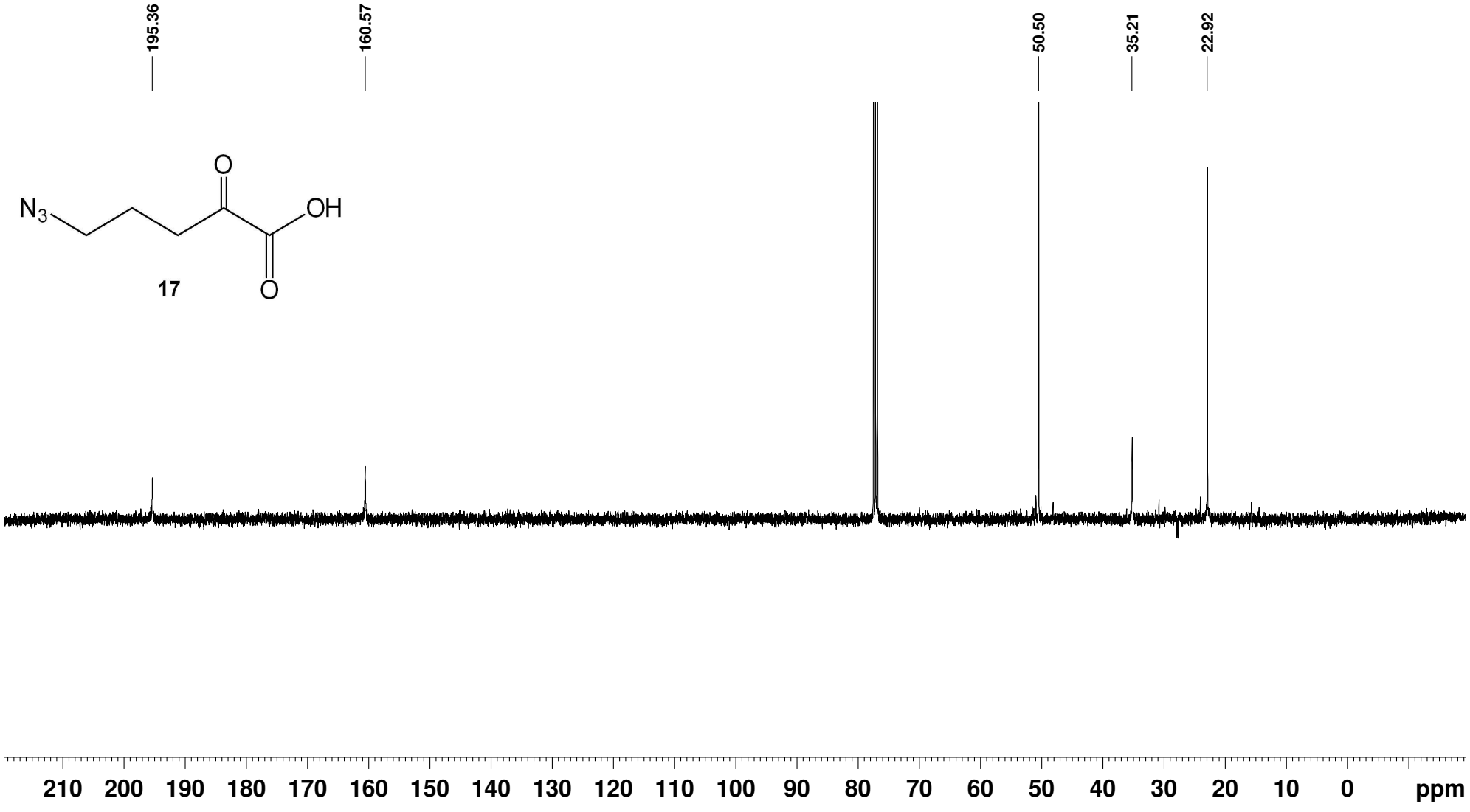




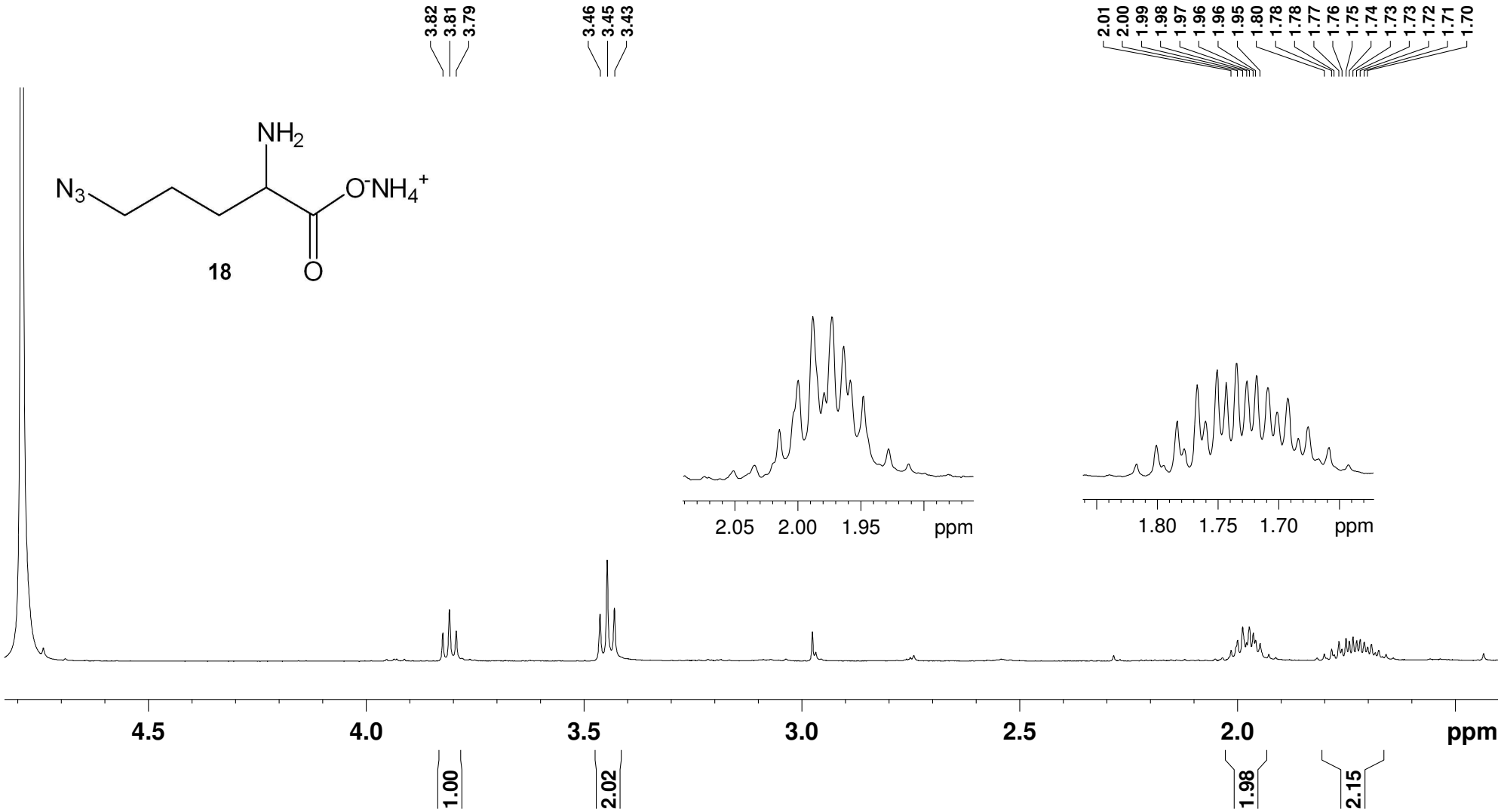
^{1}H-NMR: 5-Azido-2-oxopentansäure (17) ($CDCl_3$)



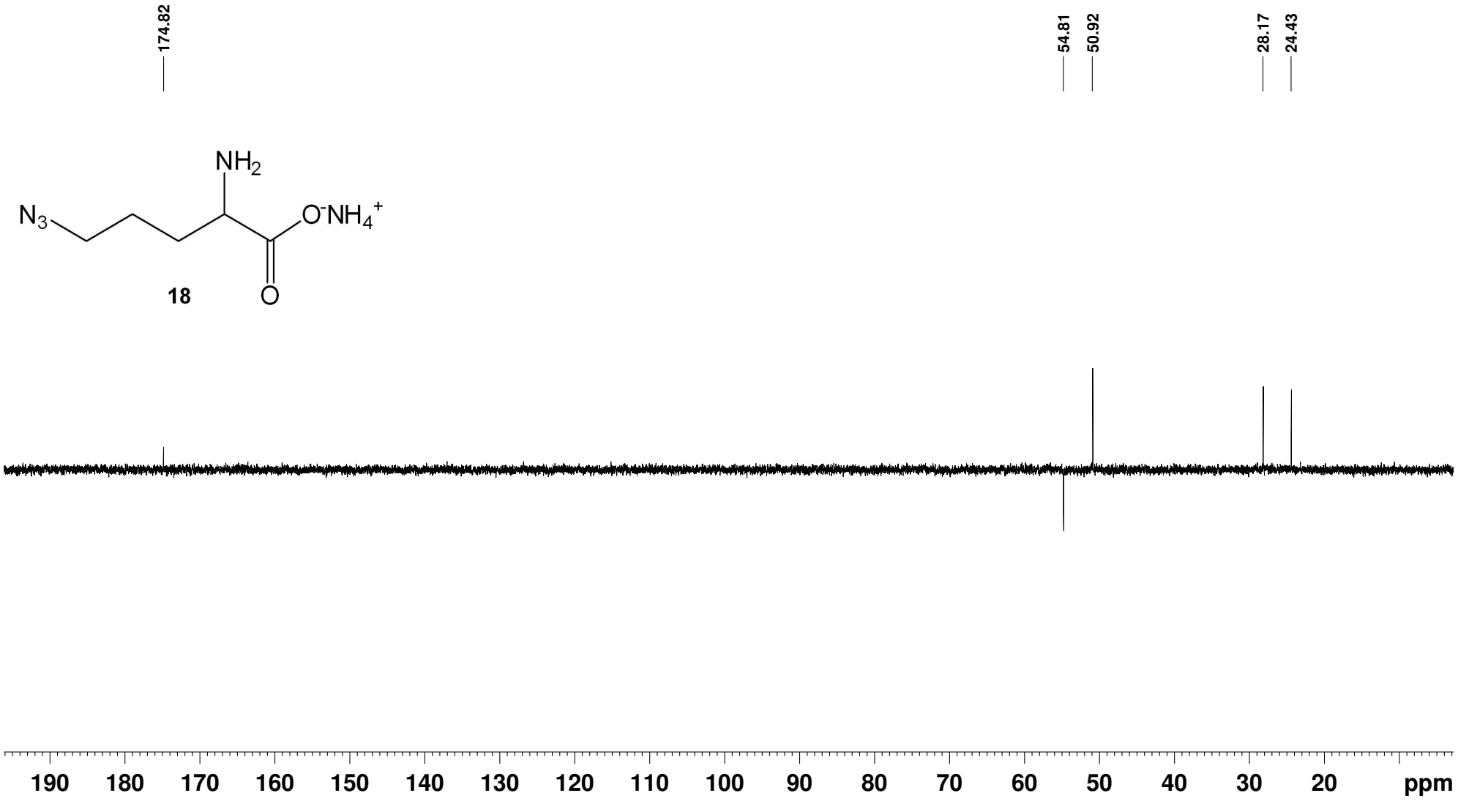
^{13}C-NMR: 5-Azido-2-oxopentansäure (17) ($CDCl_3$)



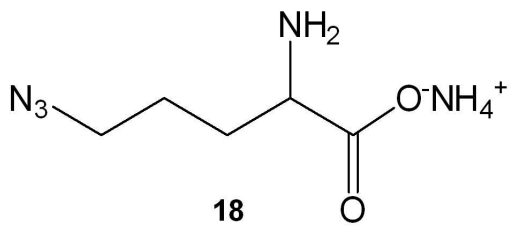
^{1}H-NMR: Ammonium-2-amino-5-azidopentanoat (18) (D_2O)



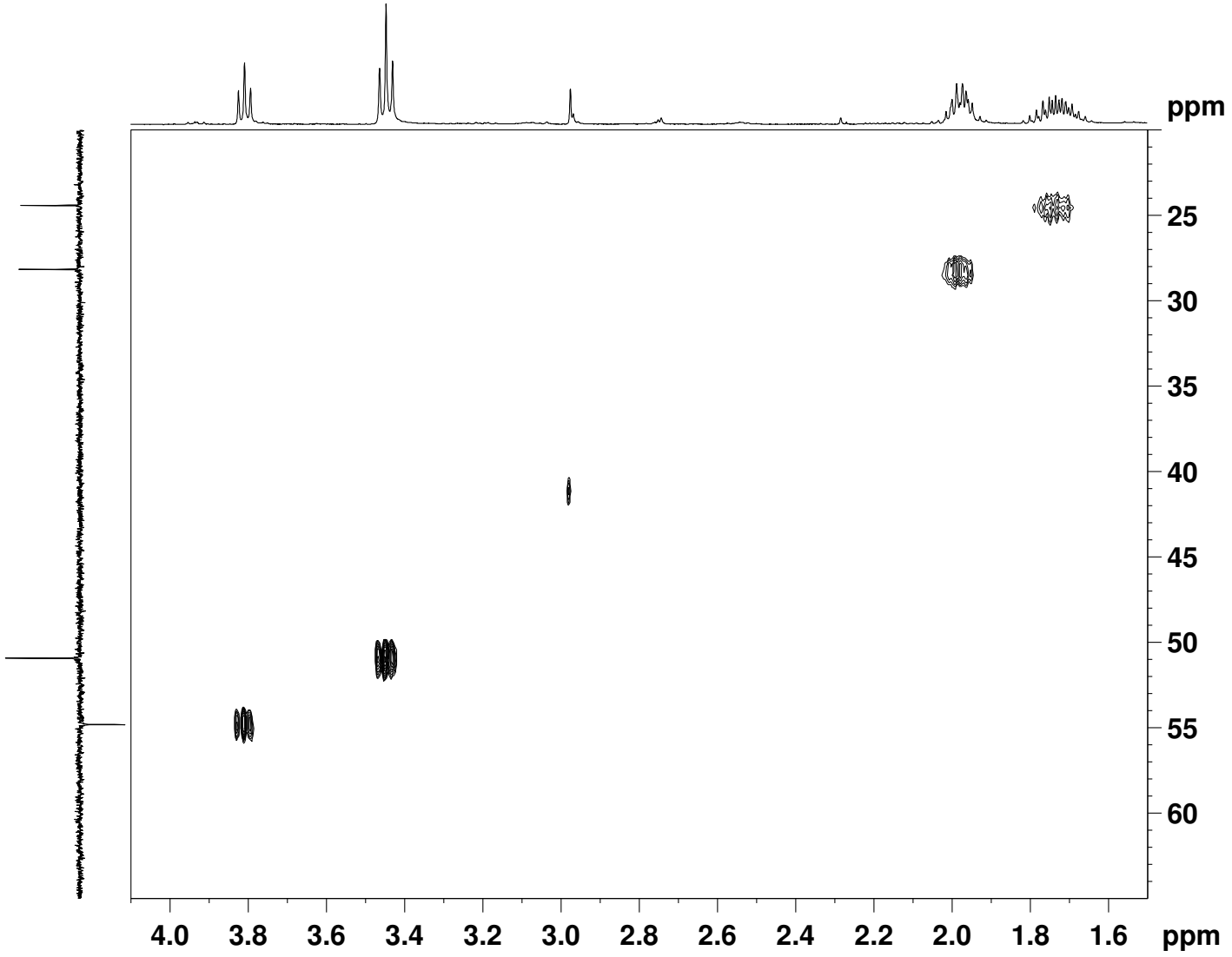
^{13}C-NMR: Ammonium-2-amino-5-azidopentanoat (18) (D_2O)



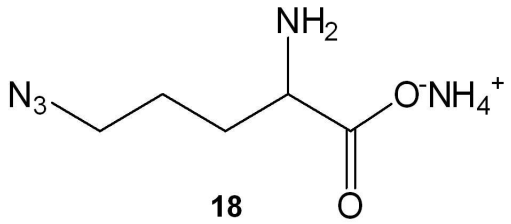
HSQC: Ammonium-2-amino-5-azidopentanoat (18) (D_2O)



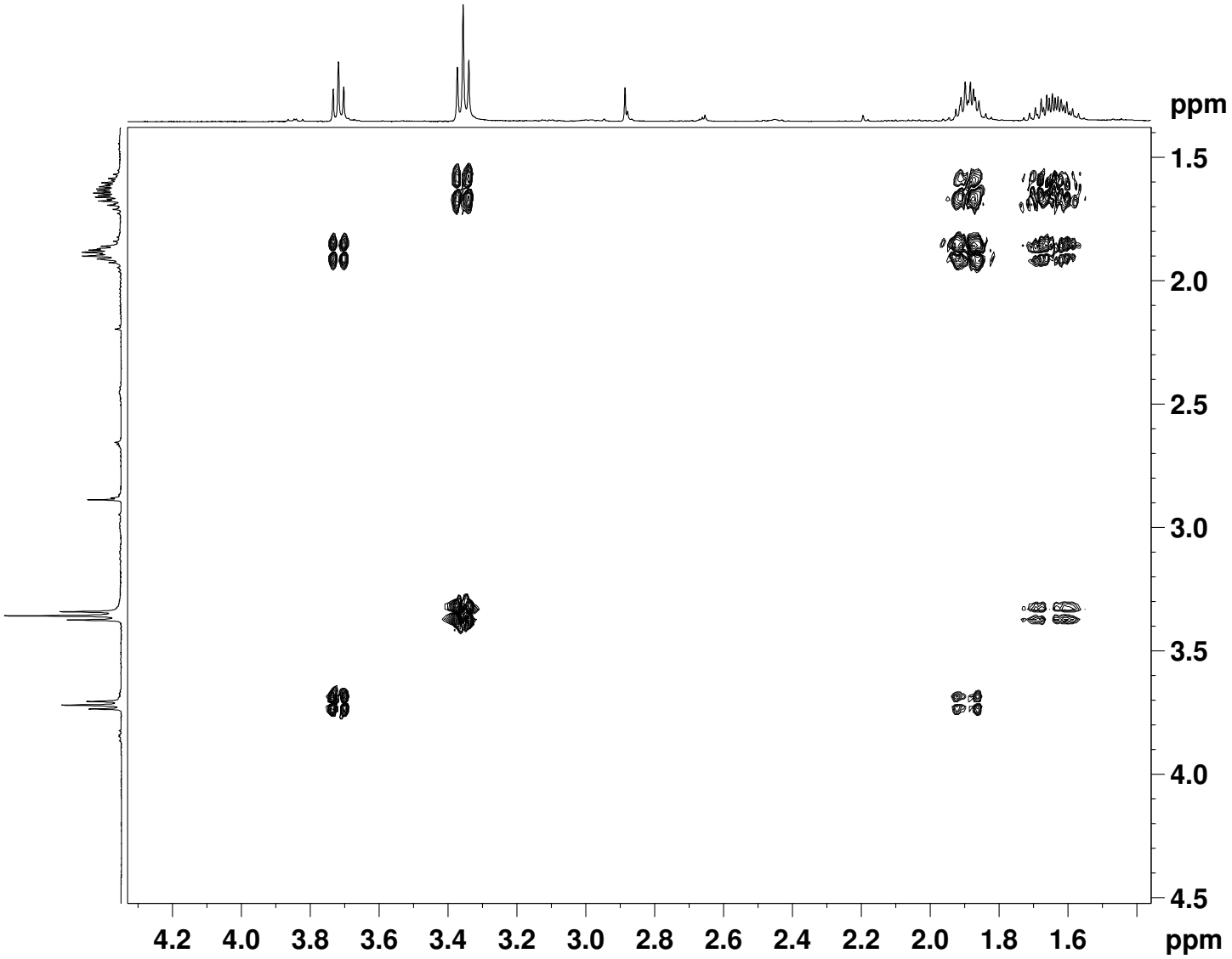
18



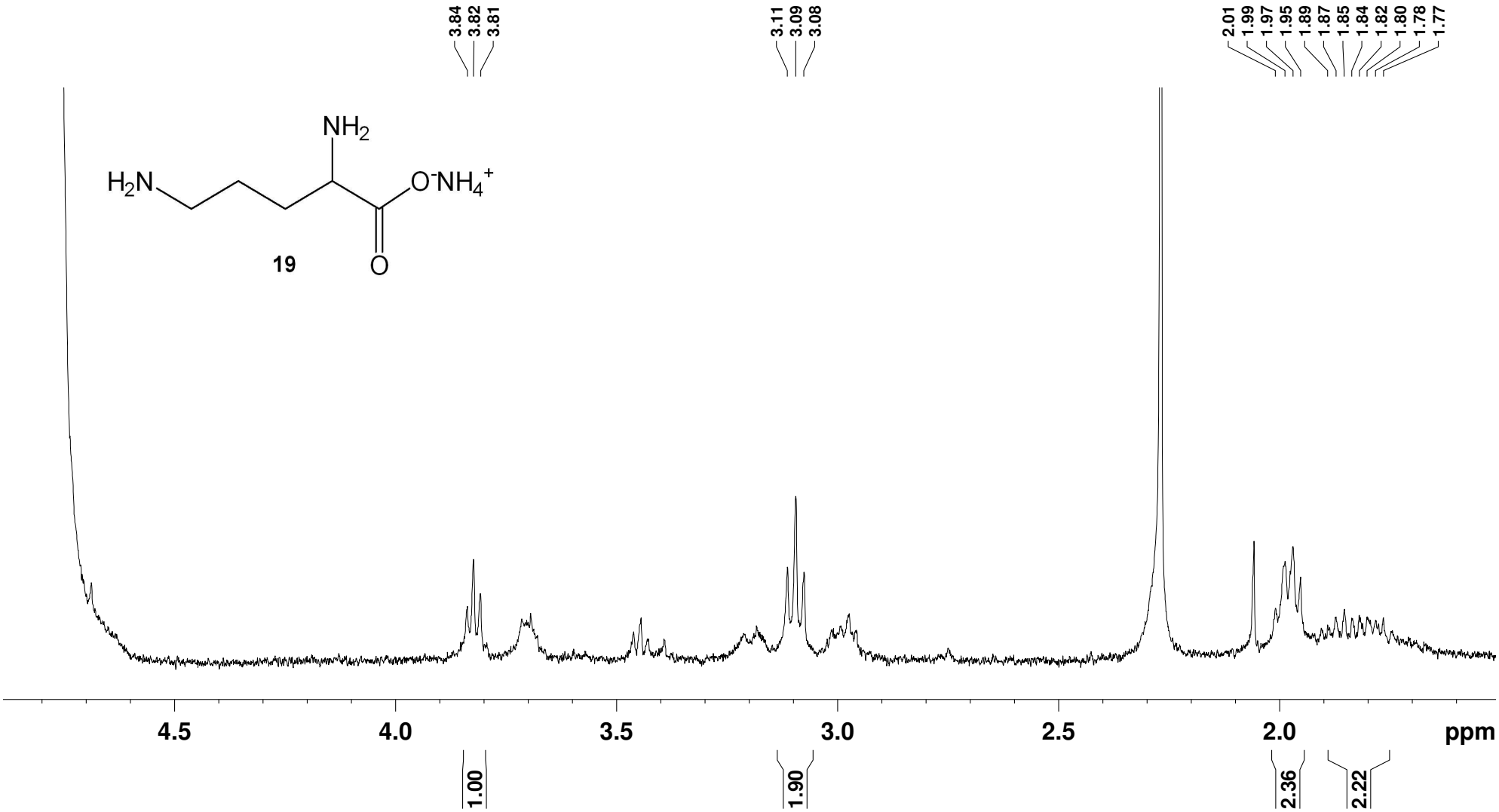
COSY: Ammonium-2-amino-5-azidopentanoat (18) (D_2O)



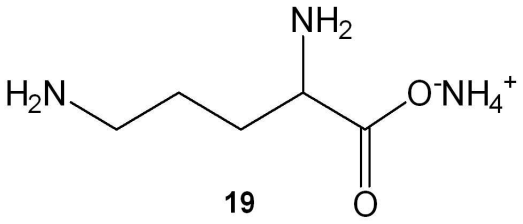
18



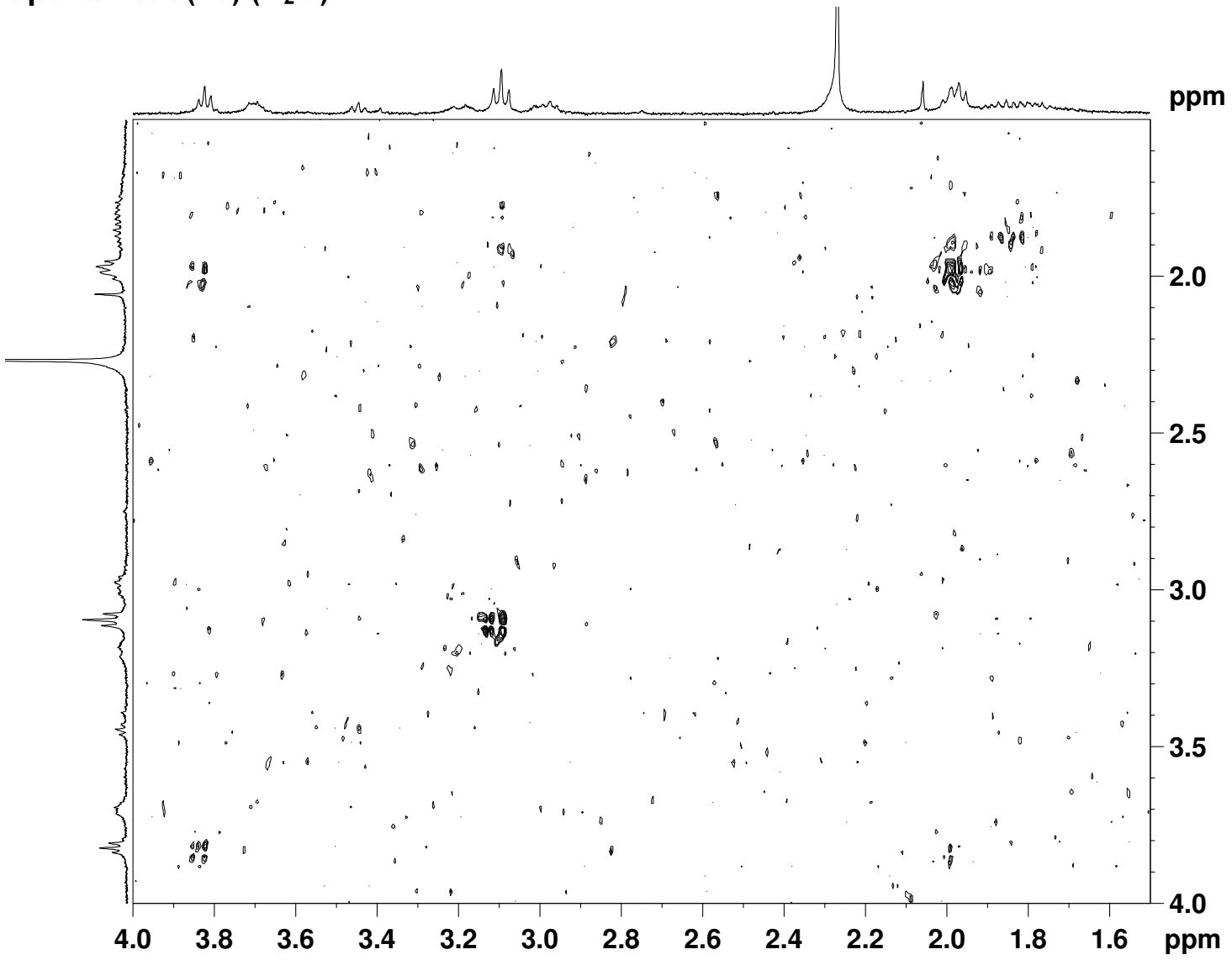
^{1}H-NMR: Ammonium-2,5-diaminopentanoat (19) (D_2O)



COSY: Ammonium-2,5-diaminopentanoat (19) (D_2O)



19



Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Svitlana Vogl
Geburtsdatum:	30.03.1981
Geburtsort:	Tscherkassy (Ukraine)
Nationalität:	Ukraine
Familienstand:	verheiratet

Ausbildung:

1987-1998	Allgemeinbildende Schule der Stadt Tscherkassy
1998-2003	Universität Tscherkassy: Bakkalaureat-Studium Chemie
10.2008-	Universität Wien, Institut für Chemie: Masterstudium
12.2010-	Beginn der Masterarbeit in der AG Schmid

Universitäres:

2011	Tutorentätigkeit in den „Chemische Übungen für Biologen“

Praktika:

05-07.2002	Chemiebetrieb in Tscherkassy: Analyselabor
02-04.2003	Gymnasium der Stadt Tscherkassy: Chemieunterricht