Synthese und erste Anwendungen pH-sensitiver Spinmarker für site-specific spin-labelling Experimente

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte

Dissertation
(D386)

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Thomas Schanding

Betreuer: Dr. John G. Wise

Kaiserslautern 1999

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 19. November 1999

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. H. Sitzmann

1. Berichterstatter: Dr. J. G. Wise

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. E. Trommer

Die vorliegende Arbeit entstand von November 1994 bis September 1996, von Januar 1997 bis Juli 1997 und von September bis November 1998 im Fachbereich Chemie Abteilung Biochemie an der Universität Kaiserslautern sowie während eines Forschungsaufenthaltes im Rahmen eines DAAD-Kurzstipendiums von Oktober bis Dezember 1996 im Labor für Stickstoffverbindungen am Institut für Organische Chemie der Sibirischen Abteilung der Russischen Akademie der Wissenschaften in Novosibirsk/Akademgorodok

Mein besonderer Dank gebührt Dr. John G. Wise für die Betreuung und den großen Freiraum, den er mir bei der Gestaltung dieser Arbeit gewährte. Ebenfalls danken möchte ich Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer und Priv. Doz. Dr. Pia D. Vogel für die ständige Diskussionsbereitschaft, wertvolle Anregungen und wohlwollende Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas. Prof. Dr. Leonid B. Volodarsky und dem DAAD danke ich für die Unterstützung bei der Verwirklichung des Forschungsaufenthaltes in Novosibirsk.
Herrn Maxim A. Voinov danke ich für tatkräftige Unterstützung in schwerer Zeit.

Des Geistes Auge
fängt erst dann an,
scharf zu sehen,
wenn das des Leibes
seine Schärfe zu
verlieren beginnt.

Platon

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Die F_oF_1-ATP Synthase	1
1.1.1.	Vorkommen, Aufgabe und Funktion	1
1.1.2.	Struktur und Funktion des F_1-Teils des Enzyms	3
1.1.3.	Struktur und Funktion des F_o-Teils des Enzyms	6
1.2.	ESR-Spektroskopie	14
1.2.1.	Theoretische Grundlagen	14
1.2.2.	Die Spin-Label Methode	16
1.2.3.	pH-sensitive SL-Verbindungen	18
1.2.3.1.	Eigenschaften pH-sensitiver SL-Verbindungen	18
1.2.3.2.	Methoden zur Darstellung einiger ausgewählter pH-sensitiver SL-Verbindungen	21
2.	Problemstellung	28
3.	Eigene Ergebnisse und Diskussion	31
3.1.	Synthesen	31
3.1.1.	Syntheseplanung	31
3.1.1.1.	Entwurf der Zielmoleküle	31
3.1.1.2.	Allgemeines Syntheseschema	34
3.1.2.	Durchführung der Synthesen	37
3.1.2.1.	Darstellung von **38a**	37
3.1.2.2.	Darstellung von **47a**	43
3.1.2.3.	Synthese der 4-N-R-Amino-3-imidazolin-1-oxyle	45
3.1.2.3.1.	Alternative Synthesemethode zur Herstellung der Ausgangsverbindung **22**	45
3.1.2.3.2.	Cycloaddition von **22** mit Isocyanaten	46
3.1.2.3.3.	Darstellung von **39a** und **39d**	47
3.1.2.3.4.	Versuche zur Synthese von **44a-d**	49
3.1.2.3.5.	Synthese des Isothiocyanates **77**	60
3.1.2.4.	Darstellung von 4-N,N-R,R‘-Amino-3-imidazolinen	63

3.1.2.4.1. Allgemeines 63
3.1.2.4.2. Umsetzung von **27** mit Isocyanaten und Isothiocyanaten und Spaltung der entstandenen Cycloaddukte zu den entsprechenden Amidinen 63
3.1.2.4.3. Alkylierung der Amidine **30b** und **82** mit Bromessigsäure-ethylester 67
3.1.2.4.4. Oxidation von **82** zum entsprechenden Radikal **85** 69
3.1.2.4.5. Versuch der Darstellung von **42a-d** 70
3.1.2.4.6. Versuch der Darstellung von **45a-d** und **46a-d** 74
3.2. pH-Titrationen mit Hilfe der ESR-Spektroskopie 78
3.3. Reaktion der Carbodiimide **38a**, **39a** und **47a** mit *E. coli* F_o 80
3.3.1. Prüfung der Bindungsspezifität mit Fluoreszenzquench Assays 80
3.3.1.1. Inhibierung der passiven Protonentranslokation 81
3.3.1.2. Inhibierung der aktiven Protonentranslokation 83
3.3.2. ESR-Spektren Carbodiimid-markierter F_o-Membranvesikel 87
4. Zusammenfassung und Ausblick 88
5. Experimenteller Teil 94
5.1. Analyse-, Reinigungsmethoden und Spektroskopie 94
5.2. Materialien 97
5.3. Synthesen 100
5.3.1. Synthese von **38a,d** 100
*4-Brommethylen-1-oxyl-2,2,3,5,5-pentamethylimidazolidin **(12)*** 100
*4-Dibrommethylen-1-oxyl-2,2,3,5,5-pentamethylimidazolidin **(12b)*** 101
*4-Azidomethyl-1-oxyl-2,2,3,5,5-pentamethylimidazolidin **(14)*** 102
*1-Oxyl-2,2,3,5,5-pentamethyl-4-triphenylphosphiniminomethyl-imidazolidin **(48)*** 103
*4-Isothiocyanatomethyl-1-oxyl-2,2,3,5,5-pentamethylimidazolidin **(15)*** 104
*4-Isocyanatomethyl-1-oxyl-2,2,3,5,5-pentamethylimidazolidin **(49)*** 105
*N-Cyclohexyl-N'-(1-oxyl-2,2,3,5,5-pentamethylimidazolidin-4-yl)-methylharnstoff **(38d)*** 106
*N-Cyclohexyl-N'-(1-oxyl-2,2,3,5,5-pentamethylimidazolidin-4-yl)-methylthioharnstoff **(50)*** 107

*N-Cyclohexyl-N'-(1-oxyl-2,2,3,5,5-pentamethylimidazolidin-4-yl)-methylcarbodiimid **(38a)*** 108
5.3.2. Synthese von **47a** 109
*N-Cyclohexyl-N'-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-3-yl)-methylthioharnstoff **(53)*** 109
*N-Cyclohexyl-N'-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-3-yl)-methylcarbodiimid **(47a)*** 110
5.3.3. Synthese der 4-N-R-Amino-3-imidazolin-1-oxyle 111
5.3.3.1. Verbesserte Synthesen der Ausgangsverbindungen **20** und **21** 111
2-N-Hydroxylamino-2-methylpropionaldehydoxim **(20)** 111
*1-Hydroxy-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazolin-3-oxid **(21)*** 112
5.3.3.2. Umsetzung von **22** mit Isocyanaten 113
3-(4-Chlormethylphenyl)-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-2-oxo-5-oxyl-4,4,6,6-tetramethylimidazo[1,5-b][1,2,4]oxadiazol **(57)** 113
3-(2-Bromethyl)-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-2-oxo-5-oxyl-4,4,6,6-tetramethylimidazo[1,5-b][1,2,4]oxadiazol **(58)** 114
5.3.3.3. Darstellung von **39a,d** 114
*N-Cyclohexyl-N'-(2-methyl-5-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazolin-4-yl)-phenylamino)-thioharnstoff **(60)*** 114
*N-Cyclohexyl-N'-(2-methyl-5-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazolin-4-yl)-phenylamino)-carbodiimid **(39a)*** 115
*N-Cyclohexyl-N'-(2-methyl-5-(2,3,3a,4,5,6-hexahydro-2-oxo-5-oxyl-4,4,6,6-tetramethylimidazo[1,5-b][1,2,4]oxadiazol-3-yl)-phenyl)harnstoff **(62)*** 116
*N-Cyclohexyl-N'-(2-methyl-5-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazolin-4-yl)-phenylamino)-harnstoff **(39d)*** 117
5.3.3.4. Versuch der Synthese von **44a-d** 118
*3-(2-Azidoethyl)-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-2-oxo-5-oxyl-4,4,6,6-tetramethylimidazo[1,5-b][1,2,4]oxadiazol **(67)*** 118
*Umsetzung von **58** mit Natriumazid unter phasentransfer-katalytischen Bedingungen in einem Benzol/Wasser Gemisch* 119
*3-(2-Cyanethyl)-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-2-oxo-5-oxyl-4,4,6,6-tetramethylimidazo[1,5-b][1,2,4]oxadiazol **(68)*** 120

*4-(2-Azidoethyl)amino-1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazolin **(63)*** 121
*Versuch der Darstellung von 4-(2-Isothiocyanatoethyl)amino-1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazolin **(64)*** 122
*3-(2-Isothiocyanatoethyl)-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-2-oxo-5-oxyl-4,4,6,6-tetramethylimidazo[1,5-b][1,2,4]oxadiazol **(71)*** 123
*Versuch der Darstellung von **44a-c** über das Triethylphosphinimin **65*** 124
1) Erzeugung des Phosphinimins **65** in THF-Lösung: 124
2) In situ Umsetzung der Lösungen von **65** mit den folgenden Reagenzien: 124
A) Cyclohexylisothiocyanat 124
B) Iodessigsäure 125
C) Maleinsäureanhydrid 125
D) Maleinsäure 126
5.3.3.5. Darstellung von **77** 126
*3-(4-Azidomethylphenyl)-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-2-oxo-5-oxyl-4,4,6,6-tetramethylimidazo[1,5-b][1,2,4]oxadiazol **(75)*** 126
*4-(4-Azidomethylphenyl)amino-1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazolin **(76)*** 127
*3-(4-Isothiocyanatomethylphenyl)-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-2-oxo-5-oxyl-4,4,6,6-tetramethylimidazo[1,5-b][1,2,4]oxadiazol **(77)*** 128
5.3.4. Synthese der 4-N,N-R,R'-Amino-3-imidazolin-1-oxyle 129
5.3.4.1. Aromatische Vertreter 129
*4-N-(2-Hydroxyethyl)-N-phenylamino-1,2,2,5,5-pentamethyl-3-imidazolin **(86)*** 129
*Versuch der Synthese von 4-N-(2-Azidoethyl)-N-phenylamino-1,2,2,5,5 pentamethyl-3-imidazolin **(88)*** 131
*2,3,3a,4,5,6-Hexahydro-3-(4-methoxyphenyl)-4,4,5,6,6-pentamethyl-2-thioxoimidazo[1,5-b][1,2,4]oxadiazol **(80)*** 132
*4-(4-Methoxyphenyl)amino-1,2,2,5,5-pentamethyl-3-imidazolin **(82)*** 133
4-Methoxyphenylamino-1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazolin

(85) 135
*4-N-Ethoxycarbonylmethyl-N-(4-methoxyphenyl)amino-1,2,2,5,5-pentamethyl-3-imidazolin **(83)*** 136
*4-N-(2-Hydroxyethyl)-N-(4-methoxyphenyl)amino-1,2,2,5,5-pentamethyl-3-imidazolin **(87)*** 137
*3-(4-Chlorphenyl)-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-2-oxo-4,4,5,6,6-pentamethylimidazo[1,5-b][1,2,4]oxadiazol **(79)*** 138
*4-(4-Chlorphenyl)amino-1,2,2,5,5-pentamethyl-3-imidazolin **(81)*** 139
5.3.4.2. Aliphatische Vertreter 140
*4-Methylamino-1,2,2,5,5-pentamethyl-3-imidazolin **(30b)*** 140
*4-N-Ethoxycarbonylmethyl-N-methylamino-1,2,2,5,5-pentamethyl-3-imidazolin **(84)*** 141
*3-(2-Bromethyl)-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-2-oxo-4,4,5,6,6-pentamethylimidazo[1,5-b][1,2,4]oxadiazol **(78)*** 142
*3-(2-Azidoethyl)-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-2-oxo-4,4,5,6,6-pentamethylimidazo[1,5-b][1,2,4]oxadiazol **(92)*** 143
*4-(2-Azidoethyl)amino-1,2,2,5,5-pentamethyl-3-imidazolin **(89)*** 144
*Versuch der Alkylierung von **89*** 145
5.4. ESR-Messungen 146
5.4.1. pH-Titrationen ausgewählter pH-sensitiver SL-Verbindungen 146
5.4.2. Messungen mit Carbodiimid-markierten F_o-Membranvesikeln 147
5.5. Fluoreszenzquench Assays 148
6. Literaturverzeichnis 151

Abkürzungen:

Ac_2O	Essigsäureanhydrid
ADP	Adenosindiphosphat
A.O.	Acridin Orange
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DPPA	Phosphorsäurediphenylesterazid
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoßionisation
ESR	Elektronenspinresonanz
F.I.	Fluoreszenzintensität
gem	geminal
IR	Infrarot
MCPBA	m-chloroperbenzoic acid
MS	Massenspektrometrie
MSA	Maleinsäureanhydrid
NBS	N-Bromsuccinimid
NCCD	N-Cyclohexyl-N‘-(1-oxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)-carbodiimid
NMR	nuclear magnetic resonance
P_i	Phosphat
PAB	p-Aminobenzamidinhydrochlorid
P. modestum	*Propionigenium modestum*
PSC	präparative Schichtchromatographie
RT	Raumtemperatur

SL	spin label
t	Zeit
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-
TES	Tris(hydroxymethyl)methylaminoethansulfonsäure
$TfAc_2O$	Trifluoressigsäureanhydrid
THF	Tetrahydrofuran
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan

1. Einleitung

Die Natur nutzt verschiedene Arten von molekularen Motoren. Neben linearen Motoren, wie z.B. gleitenden Filamenten, Kinesin, Dynein oder RNA-Polymerase existieren auch Rotationsmotoren. Der bakterielle Flagellenmotor ist ein solcher, ein sehr komplexes Gebilde, das die Größe eines Virus erreicht. Der kleinste bisher bekannte Rotationsmotor ist die F_oF_1 ATP-Synthase (Block, 1997).

1.1. Die F_oF_1-ATP Synthase

1.1.1. Vorkommen, Aufgabe und Funktion

F_oF_1 ATP-Synthasen findet man in der inneren Mitochondrienmembran, in der Cytoplasmamembran von Bakterien und in der Thylakoidmembran von Chloroplasten. Sie nutzen nach der chemiosmotischen Hypothese von Mitchell (Mitchell, 1961) die elektrochemische Energie eines Protonengradienten, der im mitochondrialen und bakteriellen Enzym (bei Bakterien, die keine Photosynthese betreiben) von der Atmungskette erzeugt wird, zur Synthese des universellen Energieträgers ATP. Auch die umgekehrte Reaktion, die Hydrolyse von ATP unter Aufbau eines Protonengradienten, ist möglich. Sie hat in Bakterien physiologische Bedeutung. Im Chloroplastenenzym wird Lichtenergie zur ATP-Synthese genutzt. Geht man davon aus, daß drei ATP pro Umdrehung hydrolysiert werden, so liegt der Wirkungsgrad dieses kleinsten Rotationsmotors bei nahezu 100 % (Block, 1997).
Die F_oF_1 ATP-Synthasen bestehen aus zwei Teilen, dem membranintegralen F_o-Teil und dem membranextrinsischen F_1-Teil. Der F_o-Teil ist für die Protonentranslokation verantwortlich, am F_1-Teil findet die ATP-Synthese statt. Der F_1-Teil läßt sich reversibel von der Membran trennen und ist dann per se nur noch in der Lage, ATP zu hydrolysieren.

Während man von den Vorgängen im F_1-Teil des Enzyms schon recht genaue Vorstellungen hat, sind die Kenntnisse über die Funktionsweise des F_o-Teils noch nicht so weit fortgeschritten.

Für ihre bahnbrechenden Arbeiten auf dem Gebiet der F_oF_1 ATP-Synthasen teilten sich Paul Boyer und John Walker eine Hälfte des Nobelpreises für Chemie im Jahre 1997. Die andere Hälfte ging an Jens Skou für seine Arbeiten an der Na^+ / K^+ Pumpe.

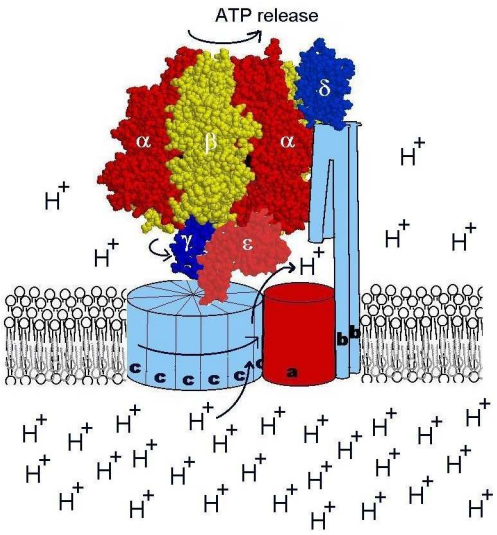


Abb. 1: Schematische Darstellung der F_oF_1-ATP Synthase (Wise, unveröffentlicht)

1.1.2. Struktur und Funktion des F_1-Teils des Enzyms

Der F_1-Teil des Enzyms besteht aus fünf verschiedenen Untereinheiten der Stöchiometrie $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$. α und β sind unter den Spezies hochkonserviert. Es konnten funktionsfähige Chimären mit aus unterschiedlichen Spezies stammenden Untereinheiten generiert werden (Lill et al., 1993). Die Struktur der α–, β– und eines Teils der γ– Untereinheit des mitochondrialen Enzyms sind seit der Röntgenkristallstruktur von Walker und Kollegen bis ins Detail bekannt (Abrahams et al., 1994). Die Struktur der ε–Untereinheit ist mittlerweile mit Hilfe der 2D NMR-Spektroskopie ermittelt worden (Wilkens et al., 1995). Quervernetzugsstudien ermittelten für ε eine Position am unteren Teil der γ-Untereinheit (Tang und Capaldi, 1996). Die δ– Untereinheit bindet an den oberen Teil des $\alpha_3\beta_3$-Hexamers (Lill et al., 1996; Ogilvie et al., 1997). Sie assoziiert mit dem oberen Teil des membranextrinsischen Abschnitts der b-Untereinheiten von F_o in Form eines $b_2\delta$-Komplexes (Dunn und Chandler, 1998).

F_1 besitzt sechs Nukleotidbindungsstellen, drei katalytische und drei nicht-katalytische. ATP-Synthese bzw. Hydrolyse findet in den drei katalytischen Bindungsstellen auf β statt (je eine pro β-Untereinheit). Sie kooperieren bei der Katalyse miteinander, was im Modell des „binding change“ Mechanismus von Boyer (Boyer, 1977), das später von Cross (Cross, 1981) erweitert wurde, zum Ausdruck kommt.

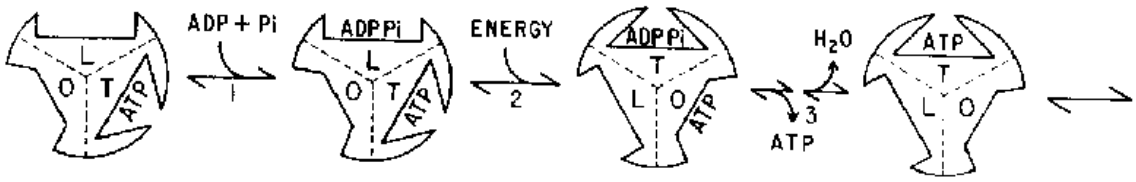


Abb. 2: „binding change“ Mechanismus von Boyer in der Erweiterung von Cross mit drei sequentiell arbeitenden katalytischen Bindungsstellen (Cross, 1981)

Die Bindungsstellen besitzen unterschiedliche Bindungsaffinitäten für Nukleotide (T: tight; L: loose; O: open). Durch Konformationsänderungen wechseln die drei Bindungsstellen sequentiell zwischen den drei Zuständen hin und her. Die Synthese von ATP aus ADP und P_i läuft in den katalytischen Bindungsstellen spontan ab (K_{eq} ~ 1). Das entstandene ATP bleibt danach aber sehr fest gebunden. Zu seiner Freisetzung ist eine Konformationsänderung des Enzyms notwendig, was gleichzeitig den Schritt der Katalyse darstellt, der die meiste freie Energie benötigt.
Das „binding change“ Modell postuliert, daß bei der Katalyse eine Bindungsstelle leer ist. Weber und Senior schlagen ein abgewandeltes Modell vor, in dem bei Katalyse unter V_{max} Bedingungen (beobachtet für ATP-Hydrolyse) im Zeitmittel alle Bindungsstellen mit Nukleotiden besetzt sind (Weber und Senior, 1997).

Man stellt sich die Vorgänge bei der ATP-Synthese folgendermaßen vor:
durch Protonenfluß durch die F_o-Einheit wird ein Drehmoment erzeugt, das ein ringförmiges Oligomer aus c-Untereinheiten in Bewegung versetzt. Diese Bewegung wird an der Grenzfläche zwischen F_o und F_1 auf die funktionelle Einheit aus γ und ε, die auch als Rotor bezeichnet wird, übertragen. Der Rotor vermittelt dann die zur ATP-Freisetzung benötigte Konformationsänderung in der β-Untereinheit. Die funktionelle Einheit aus $b_2\delta$ bildet einen zweiten Stiel, was durch elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt werden konnte (Wilkens und Capaldi, 1998). $b_2\delta$, auch als Stator bezeichnet, hält das Hexamer aus $\alpha_3\beta_3$ gegen die rotierende γ-Untereinheit fest. Im Falle der ATP-Hydrolyse läuft die Bewegung in der umgekehrten Richtung ab.
Die Rotation von γ konnte durch drei unterschiedliche Experimente nachgewiesen werden.

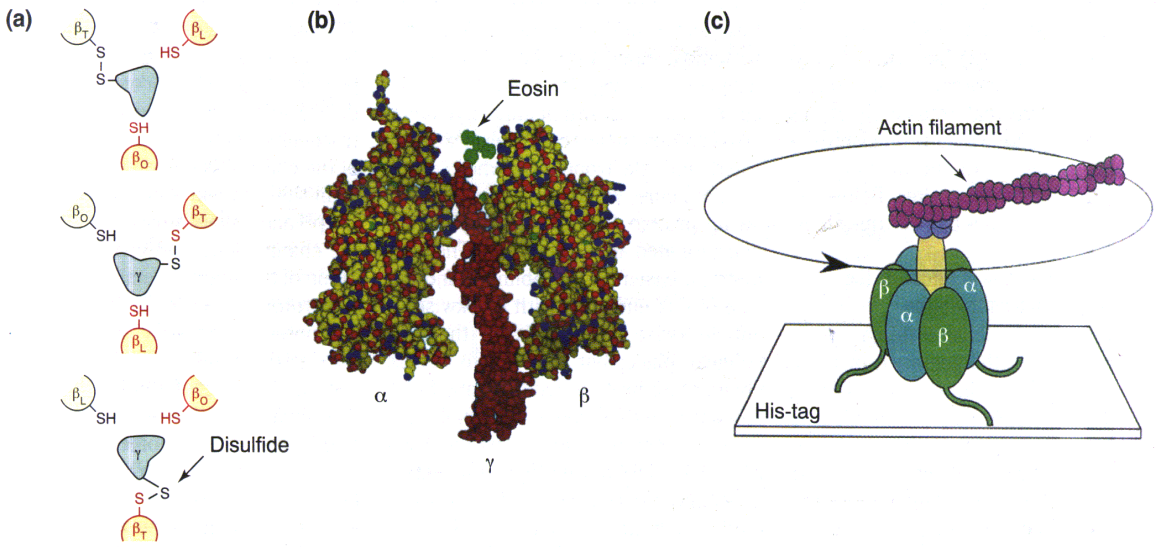


Abb. 3: Drei verschiedene Experimente zum Nachweis der Rotation der γ- Untereinheit in F_1 (aus Junge et al., 1997)

Im ersten Experiment (a) wurde zwischen *E. coli* β- und γ-Untereinheiten, die an geeigneter Stelle jeweils Cys-Mutationen enthielten, eine definierte Cys-Cys Quervernetzung erzeugt. Wurde diese Quervernetzung durch Reduktion geöffnet, so konnte nach Reoxidation nur diese Quervernetzung gefunden werden, wenn keine Katalyse stattgefunden hatte. Nach ATP-Hydrolyse und Reoxidation wurden Quervernetzungen der γ-Untereinheit mit allen drei β-Untereinheiten gefunden (Duncan et al., 1995).

Im zweiten Experiment (b) wurde Eosin an γ aus Chloroplasten F_1 gebunden und mittels PARAP (polarized absorption recovery after photobleaching) während ATP-Hydrolyse ein Rotationswinkel von $\gamma > 280°$ ermittelt (Sabbert et al., 1996).

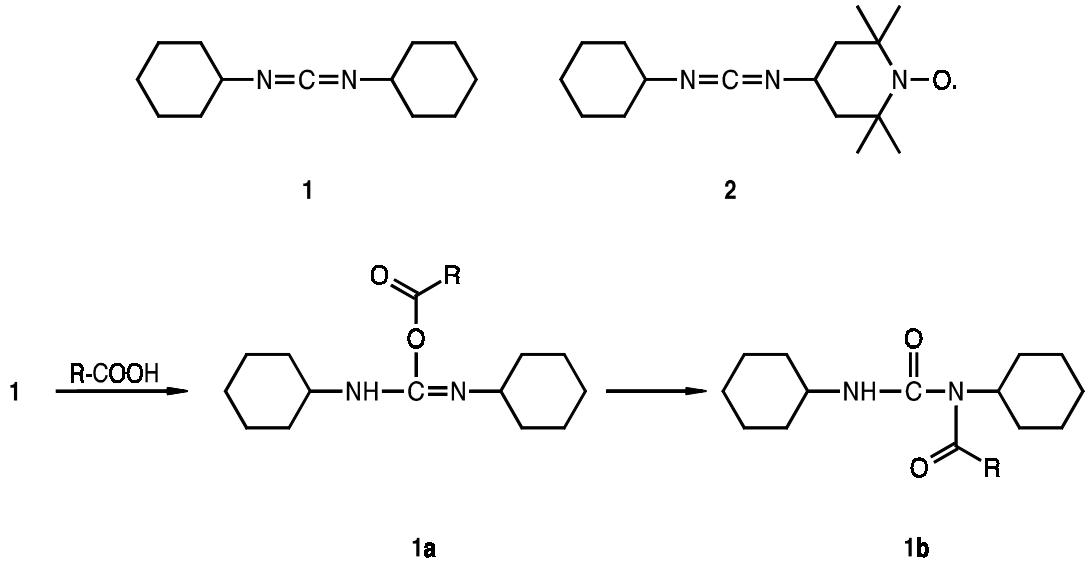
Im dritten Experiment (c) wurde an die γ-Untereinheit ein fluoreszeierendes Aktinfilament angeheftet. Das $\alpha_3\beta_3$-Hexamer aus einem thermophilen Bakterium wurde mittels His-Tags , die am N-terminalen Ende der β-Untereinheiten befestigt

waren, an einem Objektträger fixiert. Die Rotation von γ konnte während der ATP-Hydrolyse videographisch sichtbar gemacht werden (Noji et al., 1997).

1.1.3. Struktur und Funktion des F_o-Teils des Enzyms

Der F_o-Teil des *E.coli* Enzyms setzt sich aus drei verschiedenen Untereinheiten mit der Stöchiometrie ab_2c_{12} zusammen. Die genaue Anzahl der c-Untereinheiten war lange Zeit umstritten. Neueste Untersuchungen deuten auf zwölf als die korrekte Anzahl der c-Untereinheiten pro F_o hin. Durch Einführung einer flexiblen Schleife wurden funktionelle Di- (c-c) und Trimere (c-c-c) erzeugt. Doppelte Cys-Mutationen an geeigneten Positionen und Oxidation der Cysteine mit Cu-Phenanthrolin lieferten quervernetzte Oligomere, in denen bis zu sechs Dimere $(c\text{-}c)_6$ bzw. vier Trimere $(c\text{-}c\text{-}c)_4$ miteinander verknüpft waren (Jones und Fillingame, 1998). Dies spricht für 12 als korrekte Anzahl der c-Untereinheiten. Untersuchungen am Chloroplastenenzym zeigen an, daß pro synthetisiertem ATP vier Protonen durch die Membran gepumpt werden müssen. Für jedes synthetisierte ATP Molekül rotieren γ und ε um 120 ° . Bei einer kompletten Rotation werden also drei Moleküle ATP synthetisiert und somit zwölf Protonen über die Membran transportiert (van Walraven et al., 1996; Berry und Rumberg, 1996).

Auf die Funktion der b-Untereinheit ist in **1.1.3.** bereits eingegangen worden.
Den a- und c-Untereinheiten kommt Bedeutung bei der Protonentranslokation zu. Die c-Untereinheiten enthalten eine saure Aminosäure (Asp61 in *E. coli*; Glu 65 in *P. modestum*), die essentielle Bedeutung für die Protonen- bzw. Na^+-Ionen-translokation besitzt. Carbodiimide, wie z.B. DCCD **1** (Hassinen und Vuokila, 1993) oder das SL-Analogon NCCD **2** (Azzi et al., 1973; Girvin und Fillingame, 1994), in dem ein Cyclohexylring durch die TEMPO-Einheit ersetzt ist, können spezifisch an die freie Carboxylgruppe von Asp61 unter Ausbildung eines N-Acylharnstoffs **1b** binden (Hassinen und Vuokila, 1993).



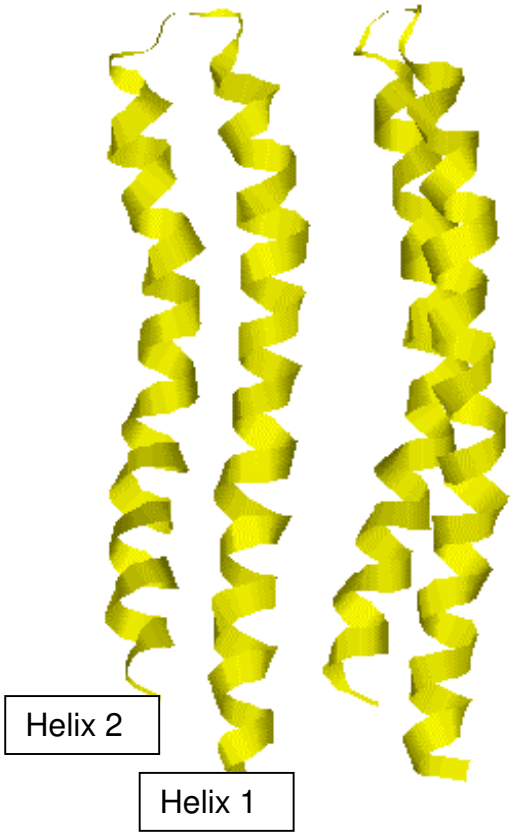
Die Bindung eines Moleküls DCCD pro F_o genügt bereits, um die Protonentranslokation zu unterbinden (Hermolin und Fillingame, 1989).

Die c-Untereinheit ist ein sehr hydrophobes Protein. Sie besteht in *E. coli* aus 79 Aminosäuren. Sie löst sich in einer ternären Mischung aus Chloroform/ Methanol/Wasser 4:4:1 (v:v:v) und kann aus dieser Lösungsmittelmischung unter vollem Erhalt der Funktionsfähigkeit rekonstituiert werden (Dmitriev et al., 1995). Die Struktur der c-Untereinheit aus *E. coli* ist in einer Mischung aus $CDCl_3$, CD_3OD und D_2O (4:4:1; v:v:v) mit Hilfe der 2D-NMR-Spektroskopie ermittelt worden (Girvin und Fillingame 1993; 1994; 1995; Girvin et al., 1998). Das Protein faltet zu einer Haarnadelstruktur aus zwei hydrophoben antiparallelen α-Helices, die die Membran duchziehen und einer polaren Schleife mit Pro 43 an der Spitze. In Quervernetzungsstudien mit einer Mutante, die in c in Position 44 ein Cystein enthält, wurden Quervernetzungen sowohl mit γ, als auch mit ε beobachtet. Dies deutet darauf hin, daß die Schleife mit dem Rotor von F_1, mit γ und ε, interagiert (Watts et al., 1995). Die polare Schleife ist an der Kopplung zwischen Protonentranslokation und ATP-Synthese beteiligt. In der R41K Mutante findet zwar eine Bindung von F_1 an F_o statt, aber Protonentransport und ATP-Synthese bleiben ungekoppelt (Fraga et al., 1994).

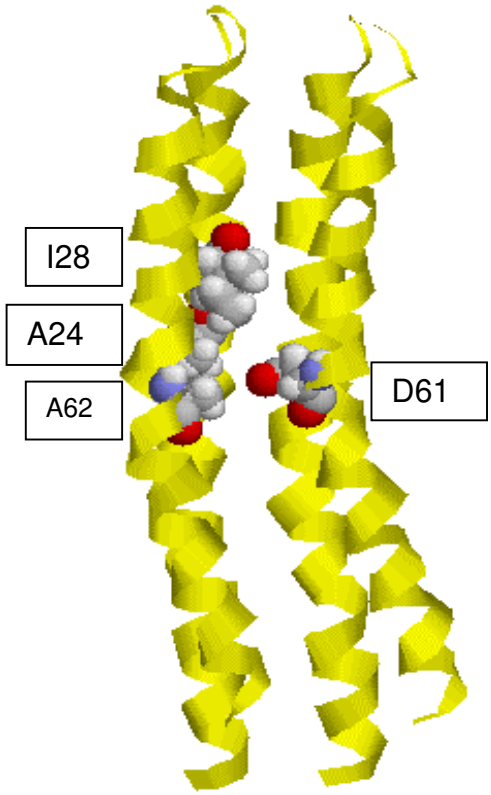
Die N- und C-terminalen Helices erstrecken sich von der Schleife aus in nahezu paralleler Art und Weise. Man findet van der Waals Kontakte zwischen Gly27 in Helix-1 und Gly58 in Helix-2. Helix-2 entwindet sich etwas zwischen Val60 und Pro64 und ändert ihre Richtung ab Pro64 um 30 ± 5 ° . Helix-1 ändert am N-terminalen Ende ebenfalls ihre Richtung. Die Helices kreuzen sich an ihren Enden und winden sich leicht umeinander (Girvin et al., 1998).

Von der Schleife gesehen bilden die beiden Helices ein ovales abgeflachtes Molekül. Ala24, Ile28 und Ala62 liegen auf der Asp61 entgegengesetzten Seite der abgeflachten Oberfläche (Girvin et al., 1998). Dieser Befund ist überraschend, erhält man doch funktionsfähige Enzyme bei der Übertragung von Asp auf Position 24 durch Doppelmutation (A24D/D61G und A24D/D61N). Asp61 und Ala24 sollten sich also räumlich sehr nahe kommen. Dies ist möglich, wenn sich die abgeflachte Vorderseite der einen c-Untereinheit an die Rückseite der nächsten anlehnt und so Asp61 der einen c-Untereinheit in nächste Nachbarschaft zu Ala24, Ile28 und Ala62 der anderen c-Untereinheit gelangt. So kommt Asp61 in der Mitte eines 4-Helix-Bündels zu liegen. Quervernetzungsstudien mit Cystein Doppelmutanten haben gezeigt, daß das c_{12} Oligomer einen Ring bildet, in dem sich die voluminösere Helix-2 außen und Helix-1 innen befindet (Jones et al., 1998).

A:



B:



C:

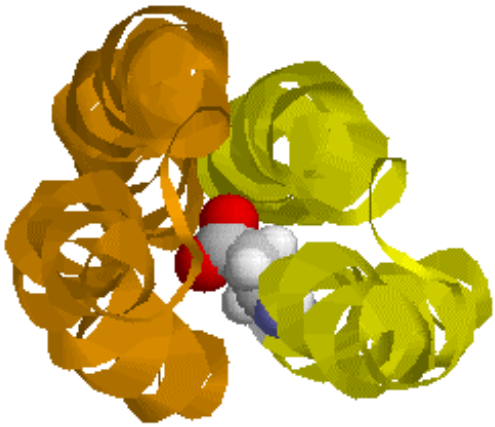


Abb. 4: A: links Draufsicht, rechts Seitenansicht einer c-Untereinheit;
B: „front to back packing“ zweier c-Untereinheiten und Darstellung der Seitenketten der AS Ala24, Ile 28, Asp61 und Ala62

C: Lage von Asp61 innerhalb eines 4-Helix Bündels; hervorgehoben ist nur Asp61 der rechten c-Untereinheit

Die atomaren Koordinaten aus der Literatur (Girvin et al., 1998) wurden mit dem Programm Rasmol bearbeitet.

Das essentielle Protonen transportierende Asp61 liegt in seiner protonierten Form in einer Höhlung, die durch das Fehlen von Seitenketten an Gly23 und Gly27 erzeugt wird. Dieser Stelle gegenüber auf der N-terminalen Helix befindet sich Ala24. Tauscht man die AS 61 und 24 jeweils gegeneinander aus, so bleibt die Funktion erhalten. Welche AS am Protonentransport beteiligt sind, haben Studien an verschiedenen Mutanten gezeigt.
Einbau der AS 64-67 der c-Untereinheit aus dem Na^+-pumpenden *P. modestum* in die *E. coli* c-Untereinheit (V60D61A62I63 $\rightarrow$ A60E61S62(G/A)63) resultierte in Li^+-Bindung (Zhang und Fillingame, 1995). In *P. modestum* wurde gezeigt, daß das Ser66 entsprechend der Position 62 in *E. coli* zur Li^+- oder Na^+- Bindung benötigt wird. Das Gln32 entsprechend der Position 28 in *E. coli* ist nötig für Na^+-Bindung (Kaim et al., 1997). Dies zeigt an, daß die Reste in Position 61, 62 und 28 in *E. coli* die Kationenbindungsstelle bilden.

Der pK_a-Wert der freien Carboxylgruppe von Asp61 wurde mittels 2D-NMR anhand der chemischen Verschiebung der H-Atome der β-CH_2-Gruppe bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Er liegt bei einem ungewöhnlich hohen Wert von pK = 7,1 im Wildtypenzym. Asp7 und Asp44 hingegen zeigten Werte im erwarteten Bereich (pK_a = 5,4 bzw. pK_a = 5,6. Eine D24D61 Mutante zeigte für beide Aspartatgruppen erhöhte pK_a-Werte (pK_a(Asp24) = 7,1; pK_a(Asp61) = 6,9) ebenso die Aspartatgruppe in der D24N61 Mutante (pK_a(Asp24) = 6,9). Diese Resultate zeigen an, daß die lokale Umgebung um Asp61 noch wesentlich hydrophober ist, als die Umgebung des organischen Solvens. Die Deprotonierung der β-Carboxylgruppe des Asp61 resultierte in einer globalen Konformationsänderung des Proteins, die in der polaren Schleife am Stärksten ausgeprägt war (Assadi-Porter und Fillingame 1995).

Auch die a-Untereinheit spielt eine Rolle für den Protonentransport durch die Membran. Man nimmt an, daß das Protein sich zu fünf Transmembranhelices faltet. Der N-Terminus befindet sich auf der periplasmatischen, der C-Terminus auf der cytoplasmatischen Membranseite. Arg210 ist essentiell für den sogenannten aktiven Protonentransport während der ATP Synthese aber nicht für den passiven, der bei F_1-befreiten Membranen stattfindet (Valiyaveetil und Fillingame, 1997). Arg210 liegt in der vierten Transmembranhelix in der Nähe von cAsp61 (Valiyaveetil und Fillingame, 1998). Studien an Cys-Mutanten haben gezeigt, daß Helix-4 zwischen je zwei der äußeren Helices (Helix-2) des Ringes aus c-Untereinheiten insertiert, was eine Öffnung der Kationenbindungsstelle zur Bindung oder Ablösung von Protonen bewirken könnte (Jiang und Fillingame, 1998).

Diese Beobachtungen unterstützen ein Modell, in dem Protonen durch einen Kanal in der a-Untereinheit zum Ring aus c-Untereinheiten gelangen. Durch Drehung des Rings werden die Protonen aus dem Periplasma über die COOH-Gruppen in cAsp61 durch einen zweiten seitlich versetzten Kanal durch a ins Cytoplasma weitergeleitet (Abb. 5, links) (Elston et al., 1998). An der „sauren“ Eintrittsstelle der Protonen wird die Asp61 Carboxylgruppe protoniert und kann so in die Membranregion eintreten. Dadurch tritt aus der Membran eine protonierte Carboxylgruppe in die Region zwischen den Kanälen und wird an der „basischen“ Austrittstelle deprotoniert. Die positive Ladung des Arg210 zieht die COO^- -Gruppe elektrostatisch an und bringt sie in die Nähe der Protonenautrittstelle, wo sie protoniert wird usw.

Dimroth und Kollegen haben aufgrund ihrer Beobachtungen an *P. modestum* ein anderes Modell aufgestellt. Sie bestimmten eine 2D-NMR-Struktur der c-Untereinheit in Dodecylsulfatmicellen. In diesem System fanden die Autoren eine Struktur sehr ähnlich der von Fillingame und Kollegen beschriebenen. Der Unterschied war, daß vier klar definierte α-helikale Bereiche zu beobachten waren, unterbrochen an der Kationenbindungsstelle und der polaren Schleife (Dimroth et al., 1998). Nach diesem Modell sind die COOH-Gruppen von Glu65 (Pendant zu Asp61 in *E. coli*) von der Cytoplasmaseite frei zugänglich. Die Lage der Kationenbindungsstelle wird in der Nähe der Grenzfläche von Cytoplasma und Membran postuliert. Die N- und C-terminalen Helices (24 bzw. 21 AS) sind in der Membran verankert. Die beiden

anderen Helices mit der polaren Schleife ragen aus der Membran heraus, sind aber daran assoziiert. Dimroths Modell der Protonentranslokation ist in Abbildung 5 rechts skizziert. Alle bis auf eine c-Untereinheit sind vom Cytoplasma her frei zugänglich und stehen im Gleichgewicht zwischen freiem (COO^-) und Na^+-gebundenem Zustand. Eine c-Untereinheit steht in Kontakt mit der a-Untereinheit. An cGlu65 befindet sich ein Na^+-Ion eingeschlossen, es steht nicht mit der cytoplasmatischen Seite im Gleichgewicht (Kaim et al, 1998). Dieses Na^+ kann nun durch einen Kanal in a ins Periplasma gelangen (bei ATP-getriebener Protonentranslokation) und ist gleichzeitig vor Rückdissoziation ins Cytoplasma geschützt. Arg227 der a-Untereinheit ist essentiell für die Translokation (Valiyaveetil und Fillingame 1997). Es wird angenommen, daß Arg227 eine COO^--Gruppe von Glu65 der c-Untereinheit elektrostatisch anzieht, wodurch der Ring aus c-Untereinheiten rotiert. Dann wird die negative Ladung der COO^--Gruppe durch Aufnahme eines Na^+-Ions aus dem vom Periplasma kommenden Kanal in a neutralisiert (im Falle der ATP Synthese), die nächste COO^--Gruppe angezogen usw. Die COONa- Gruppen gelangen auf die cytoplasmatische Seite und Na^+ dissoziiert ab (Kaim et al., 1998).

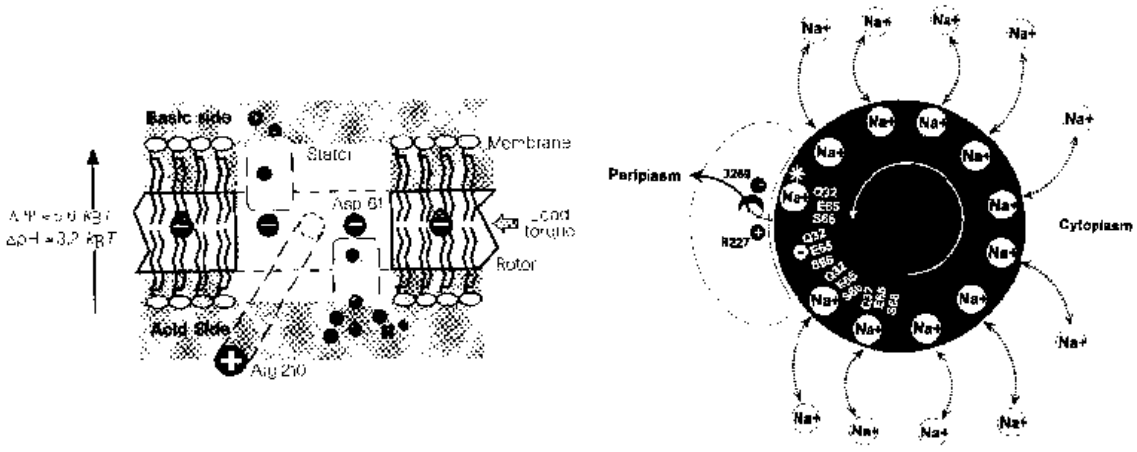


Abb. 5: Modelle zur Erzeugung eines Drehmomentes mit Hilfe des Protonen- bzw. Natriumionenflusses durch F_o
links: in *E. coli* F_o (Elston et al., 1998), rechts: in *P. modestum* F_o (Kaim et al., 1998)

Eine interessante Neuentwicklung von Nakamoto und Kollegen soll hier nicht unerwähnt bleiben. Sie generierten eine Mutante von *E. coli* F_oF_1, in der alle Cysteine gegen Alanine ausgetauscht sind. Die Mutante enthält die Flag Epitop Sequenz am N-terminalen Ende der β-Untereinheiten, was eine effektive Reinigung mittels Affinitätschromatographie ermöglicht. Die Stabilität und Funktionalität der Mutante ist vergleichbar der des Wildtypenzyms (Kuo et al., 1998).

1.2. ESR-Spektroskopie

1.2.1. Theoretische Grundlagen

Die ESR-Spektroskopie ist eine Form der Absorptionsspektroskpie, bei der Übergänge ungepaarter Elektronen, die in paramagnetischen Übergangsmetallionen oder in organischen Radikalen enthalten sind, in einem externen Magnetfeld beobachtet werden.
Der Gesamtdrehimpuls **J** des Elektrons setzt sich aus dem Bahndrehimpuls **L** und dem Eigendrehimpuls **S** zusammen. Für organische Radikale ist der Bahndrehimpuls vernachlässigbar. Die Spinquantenzahl m_s nimmt die Werte ± ½ an. In einem äußeren Magnetfeld spalten die beiden entarteten Spinzustände auf (Zeeman Effekt). Die Wechselwirkungsenergie des magnetischen Moments mit dem äußeren Magnetfeld beträgt

$$E = g_e \mu_B H_0 m_s \qquad (1)$$

(g_e: g-Faktor; μ_B: Bohr'sches Magneton; H_0: Feldstäke des angelegten Magnetfeldes)

Für ein System mit einem ungepaarten Elektron ergeben sich aufgrund $m_s = \pm ½$ zwei Energieniveaus mit dem Energieunterschied von

$$\Delta E = g_e \mu_B H_0 \qquad (2)$$

Strahlt man Energie in Form elektromagnetischer Wellen ein, so findet Absorption bei Erfüllung der Resonanzbedingung

$$H = h\nu_0 / g_e \mu_B \qquad (3)$$

statt.
Die Aufnahme der Spektren erfolgt meistens bei konstanter Mikrowellenfrequenz bei ~ 10 GHz (X-Band) unter Variation der Magnetfeldstärke. Aus meßtechnischen Gründen wird die erste Ableitung der Spektren aufgezeichnet.

Durch die Wechselwirkung des Elektronenspins **S** mit dem Kernspin **I** benachbarter Atome kommt es zu einer Hyperfeinaufspaltung in 2I+1 Energieniveaus. In den als Reportergruppen (Spin-Label, s. **1.2.2.**) verwendeten Nitroxylradikalen findet eine Wechselwirkung zwischen dem Elektronenspin und dem Kernspin des Stickstoffs statt (^{14}N: I = 1). Man beobachtet also im Spektrum 2I+1 = 3 äquidistante Linien.

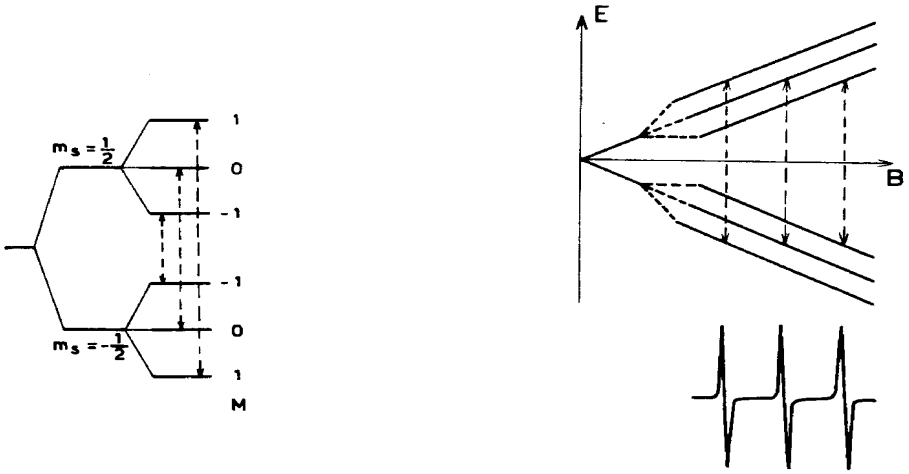
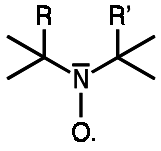


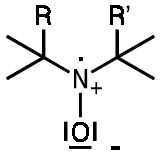
Abb. 6: links: Energieniveauschema eines Elektronenspins in einem statischen Magnetfeld wechselwirkend mit einem Kern mit I = 1; rechts: Abhängigkeit der Energieniveuas von der Feldstärke und das zugehörige simulierte Spektrum (nach Nordio, 1976)

Mit ^{15}N markierte Nitroxyle zeigen aufgrund des Kernspins von ½ für ^{15}N ein Zweilinienspektrum. Perdeuterierte ^{15}N markierte Nitroxyle liefern bis zu zehnmal höhere Signalintensitäten. Die Vorteile solcher Verbindungen sind in der Literatur beschrieben worden (Park, Trommer, 1989).
Die Hyperfeinkopplungskonstante a_N und der g-Wert sind von der Orientierung der Nitroxylgruppe zum äußeren Magnetfeld abhängig. Liegen die Moleküle frei beweglich in Lösung vor, so erhält man ein gemitteltes Spektrum über alle drei Raumkomponenten. Im Spektrum eines Einkristalls erhält man jeweils

unterschiedliche Spektren für verschiedene Orientierungen der N-O· -Gruppe zum äußeren Magnetfeld. Liegen die Nitroxylradikale in amorpher Form vor, so beobachtet man das sogenannte Pulverspektrum, in dem alle Orientierungen statistisch verteilt vorliegen.
Wird die Beweglichkeit der Radikale eingeschränkt, so werden die Spektren anisotrop. Dies ist z.B. bei zunehmender Viskosität von Lösungen oder bei der Bindung an Makromoleküle der Fall.
Hieraus resultieren wichtige biophysikalische Anwendungen wie die Beobachtung von Konformationsänderungen in Proteinen. Auch Studien über die Bindung SL-modifizierter Substrate an Proteine sind möglich, denn da immobilisierte Radikale fast keinen Beitrag zum Hochfeldsignal liefern, kann durch die Abnahme des Hochfeldsignals die Menge an gebundenem Radikal ermittelt werden.
Die Polarität der direkten Umgebung des Radikals beeinflußt die elektronische Struktur der N-O· – Gruppe. Je größer die Polarität der Umgebung, desto mehr wird die Struktur b stabilisiert. Dies äußert sich im Spektrum durch eine Zunahme von a_N.



a



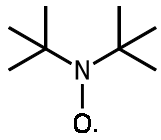
b

Besitzt das Radikal eine protonierbare Gruppe in der Nähe des N-O· – Fragments, so erhält man pH-abhängige Spektren. Auf solche pH-sensitive Radikale wird in **1.2.3.** näher eingegangen.

1.2.2. Die Spin Label Methode

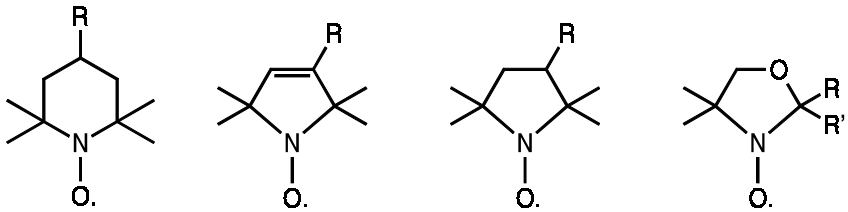
Biomoleküle sind sehr komplexe Verbindungen, deshalb ist ihre spektroskopische Analyse schwierig. Meist tragen sie keine spektroskopisch aktiven Gruppen und

müssen mit sogenannten Reportergruppen markiert werden. Solche Reportergruppen dürfen Informationen lediglich vermitteln, aber nicht selbst erzeugen.
In den sechziger Jahren führte Mc Connell die Verwendung von stabilen organischen Radikalen als ESR-Sonden (Spin-Label) (Ohnishi und Mc Connell, 1965) ein. Sie leiten sich formal alle vom Di-^{t}butylnitroxyl **3** ab.



3

Im allgemeinen verwendet man Piperidin- **4**, Pyrrolin- **5**, Pyrrolidin- **6**, und Oxazolidin- **7** Nitroxylradikale. Diese Moleküle werden über geeignete funktionelle Gruppen entweder direkt oder in Form eines modifizierten Substrates an das zu untersuchende Biomolekül gebunden.



4 **5** **6** **7**

Durch ortsspezifische Mutagenese ist der Austausch einer Aminosäure gegen Cystein möglich. Die entsprechenden Cys-Mutanten können durch Bindung SH-spezifischer Reagenzien, wie z.B. Iodacetamiden, Maleimiden oder Methanthiosulfonaten an die SH-Gruppe des Cysteins spezifisch an nahezu jeder beliebigen Stelle eines Biomoleküls eingeführt werden. Dieses „site specific spin

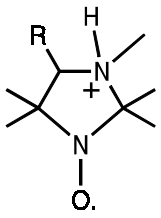
labelling“ genannte Verfahren ist von Hubbell und Kollegen zur Untersuchung des membranintegralen Teils eines Polypeptids von Bacteriorhodopsin genutzt worden (Altenbach et al., 1990). Es fand neulich auch in unserer Abteilung zu Untersuchungen an der b-Untereinheit von *E. coli* F_o Verwendung (Kersten et al., 1999).
Neben dieser allgemein anwendbaren Methode gibt es auch sehr spezielle Anwendungen von SL-Verbindungen, wie das Beispiel von **2** zeigt (Azzi et al., 1973). Für solche Fälle müssen SL-Verbindungen „maßgeschneidert“ hergestellt werden.

Ein Vorteil von SL-Verbindungen gegenüber Fluoreszenzproben ist, daß sie sich auch in nicht transparenten Medien einsetzen lassen.

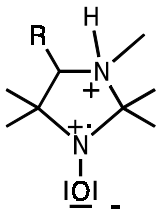
1.2.3, pH-sensitive SL-Verbindungen

1.2.3.1. Eigenschaften pH-sensitiver SL-Verbindungen

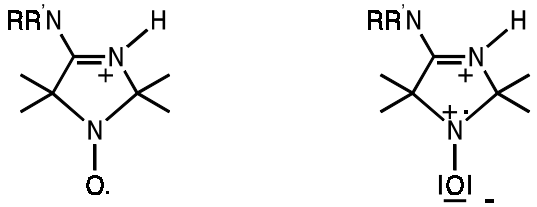
Als pH-sensitive SL-Verbindungen bezeichnet man Nitroxylradikale, die aufgrund protonierbarer Gruppen im Molekül ein pH-sensitives ESR-Spektrum zeigen. Am größten ist dieser Effekt bei Imidazolidin- oder Imidazolin-Nitroxylen, deren N-3-Atom protonierbar ist. Die protonierte und unprotonierte Form zeigen jeweils unterschiedliche ESR-Spektren. Die positive Ladung am N3-Atom in der protonierten Form beeinflußt die Nitroxylgruppe derart, daß die Resonanzstruktur **a** mit ungeladener Nitroxylgruppe bevorzugt wird.



a



b



a b

Im pH-sensitiven Bereich liegen die protonierte und unprotonierte Form nebeneinander vor, und man beobachtet eine Superposition ihrer ESR-Spektren. Ist der Austausch schnell für die ESR-Zeitskala (pK < 3; pK > 11), so beobachtet man lediglich einen Unterschied in a_N, ist er langsam, so sieht man neben dem Unterschied in a_N auch eine Aufspaltung des Hochfeldsignals (gilt für Messungen im X-Band; bei höheren Mikrowellenfrequenzen sind das Mittelfeld- und das Hochfeldsignal ebenfalls aufgespalten).

Trägt man a_N (gemessen zwischen Tieffeld- und Mittelfeldsignal) oder die Funktion $f = I_{R+}/(I_R+I_{R+})$ (I_R, I_{R+} = Intensität des Hochfeldsignals der unprotonierten bzw. der protonierten Form) gegen den pH-Wert auf, so erhält man eine klassische Titrationskurve. Bei $a_N = (a_N (R) + a_N (R^+))/2$ ($a_N (R)$; $a_N (R^+) = a_N$ der unprotonierten bzw. der vollständig protonierten Form) bzw. $f = 0{,}5$ liegt der pK_a-Wert der Verbindung (Khramtsov et al., 1985a).

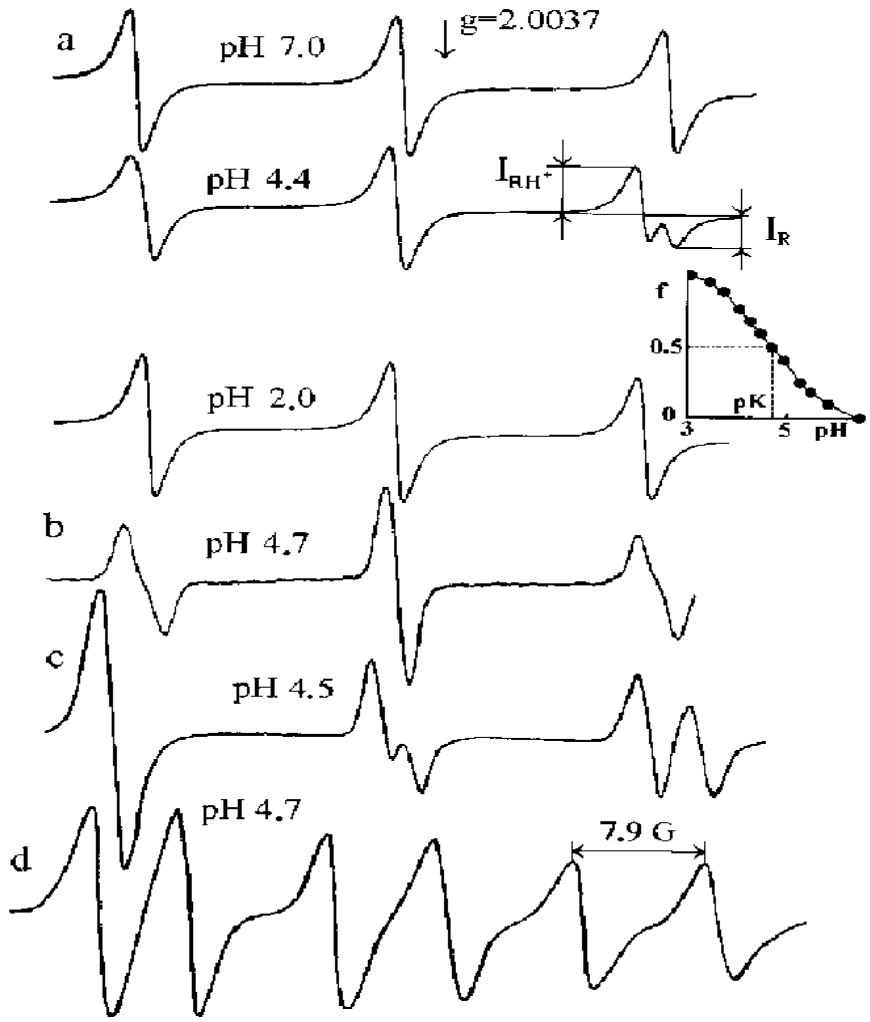
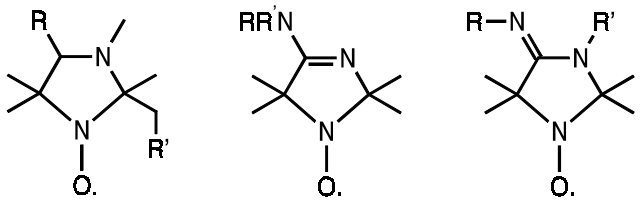


Abb. 7: ESR-Spektren des Imidazolins **8** (R = CH_3, R‘ = H) bei verschiedenen pH-Werten und Mikrowellenfrequenzen: a) 9,9 GHz; b) 1,1 GHz; c) 35,5 GHz; d) 140 GHz
Inset: pH-Abhängigkeit der Funktion $f = I_{R+}/(I_R+I_{R+})$ vom pH-Wert
(a, c, d aus Khramtsov und Weiner, 1988; b aus Mäder et al, 1996)

Am besten für Untersuchungen geeignet sind die Imidazolidin SL-Verbindungen **8** mit einer tertiären Aminogruppe als protonierbarer Einheit und besonders die 4-Amino-3-imidazoline **9** und 4-Iminoimidazolidine **10**, die sog. Amidin SL-Verbindungen mit ihrer stärker basischen protonierbaren Amidinfunktion. Viele der Amidin SL zeigen für Studien an biologischen Systemen im physiologisch interessanten Bereich von pH =

3,3 – 7,8 ein pH-sensitives ESR-Spektrum und sind damit den weniger basischen Imidazolidin-SL, die zur Anwendung erst im stärker sauren Bereich (pH = 2 – 5,5) geeignet sind, überlegen (Balakirev et al., 1992).



8 9 10

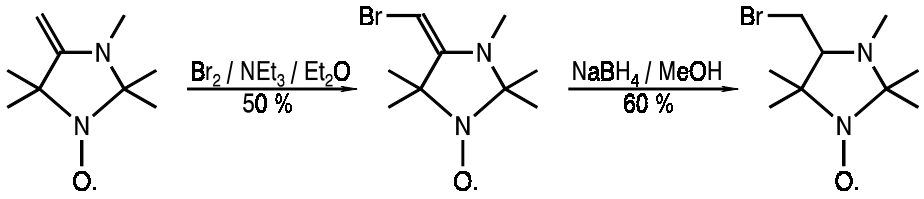
Verwendung fanden pH-sensitive SL-Verbindungen bisher zu Studien über den Protonentransport durch Phospholipidmembranen (Balakirev und Khramtsov, 1993), zur pH-Bestimmung in Phospholipidvesikeln (Keana et al., 1982), zur Untersuchung des Oberflächenpotentials, der Polarität von Phospholipidmembranen und von Proteinen (Khramtsov et al., 1992). Einen Überblick und weiterführende Literatur über weitere Anwendungen, wie z. B. pharmakologische Studien über den pH-Wert in Wasser in Öl Emulsionen, in vivo Experimente über den Einfluß des pH-Wertes auf den Abbau biologisch abbaubarer Biopolymere in Mäusen oder nichtinvasive in vivo Studien des pH-Wertes in Mäusedärmen gibt der Übersichtsartikel von Khramtsov und Volodarsky (Khramtsov und Volodarsky, 1998).

1.2.3.2. Methoden zur Darstellung einiger ausgewählter pH-sensitiver SL-Verbindungen

pH-sensitive SL-Verbindungen sind bisher in beachtlicher Anzahl synthetisiert worden. Ein Überblick ist unlängst in der Literatur erschienen (Khramtsov und Volodarsky, 1998). Die Hauptgruppe darunter bilden die Imidazolidin- und Amidin-SL, die auch für diese Arbeit relevant sind.

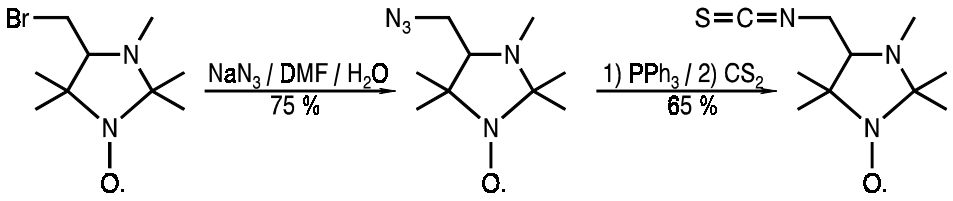
Funktionelle Gruppen zur spezifischen Bindung an z.B Makromoleküle können bei den Imidazolidin-Verbindungen **8** am C-4 Atom eingeführt werden (Volodarsky et al., 1979; Reznikov und Volodarsky, 1984; Reznikov et al. 1994; Schanding et al. 1996). Über das C-2 Atom können ebenfalls funktionelle Gruppen angebracht werden. Auch bifunktionelle Derivate (funktionelle Gruppen an C-2 und C-4) sind so zugänglich (Reznikov und Volodarsky, 1990). Die Einführung funktioneller Gruppen in die Amidin Verbindungen **9** und **10** ist bisher nur über die 4-Aminogruppe erprobt worden (Volodarsky et al., 1994).

Die Synthese der Imidazolidin SL-Verbindungen geht vom Enamin **11** aus, das in einer 7-stufigen Synthese aus 2-Methyl-2-buten erhalten werden kann (Lubenets et al., 1983; Volodarsky und Putsykin, 1967; Putsykin und Volodarsky, 1968; Volodarsky und Sevastyanova, 1971; Sevastyanova und Volodarsky, 1972, 1973; Volodarsky et al., 1979).
11 besitzt ein großes synthetisches Potential. Es reagiert mit einer Vielzahl von Elektrophilen. Die Bromierung des Enamins **11** führt zu **12**, das mit Natriumborhydrid zu **13** reduziert wird (Reznikov und Volodarsky, 1984).



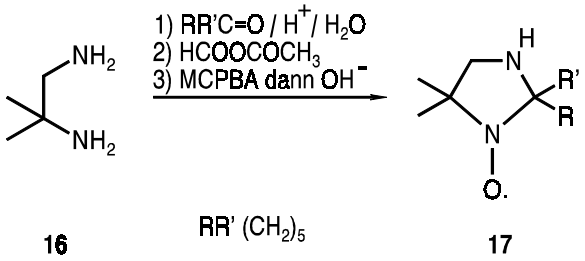
11 **12** **13**

Das Bromatom in **13** wird leicht nukleophil substituiert. Reznikov und Kollegen erhielten durch Substitution des Bromatoms in **13** durch Azid die Azidoverbindung **14**, die über das entsprechende Phosphinimin in das Isothiocyanat **15** umgewandelt werden kann (Reznikov et al. 1994).



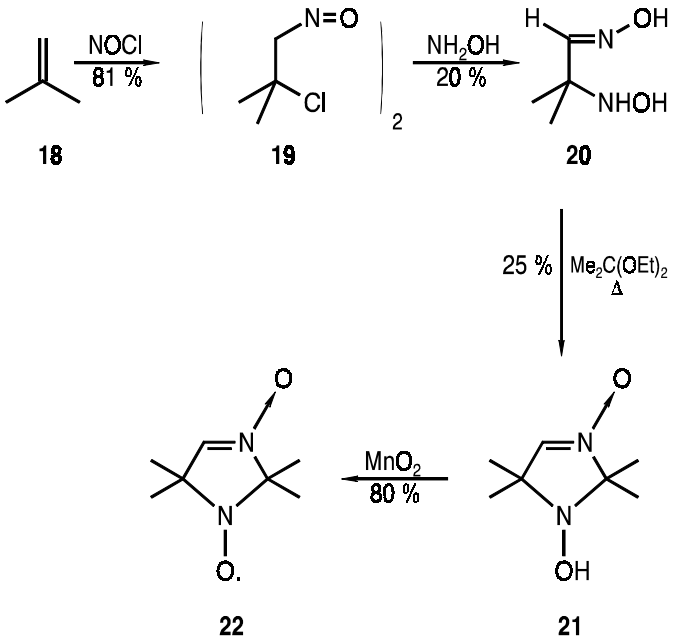
13 14 15

Lediglich erwähnt werden soll eine weitere Möglichkeit zur Darstellung pH-sensitiver Imidazolidine, die von Keana entwickelt wurde. Der Schlüsselschritt ist die Kondensation von Ketonen mit 1,2-Diamino-2-methylpropan **16**. Die Cyclisierungsprodukte werden durch weitere Reaktionen in die entsprechenden Nitroxyle **17** überführt (Keana et al., 1982).

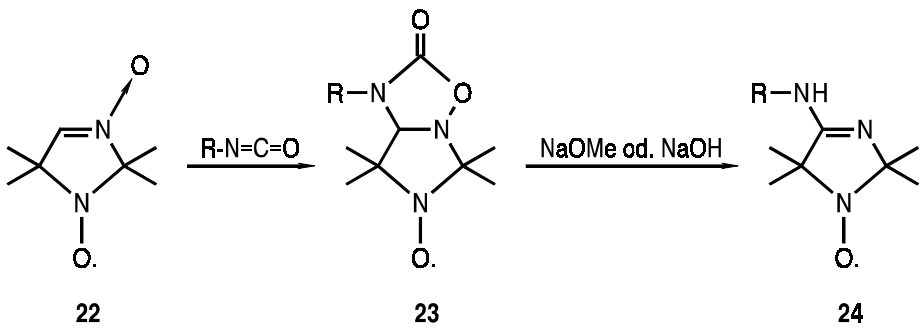


16 17

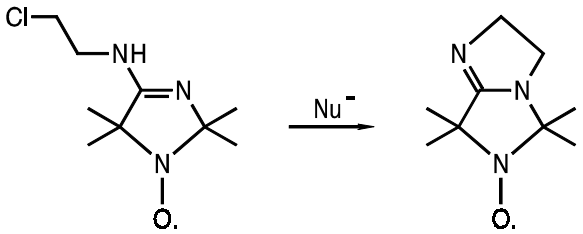
Die Synthese der Amidin SL-Verbindungen geht von Isobuten **18** aus, an das Nitrosylchlorid angelagert wird. Es bildet sich das dimere Nitrosochlorid **19** (Metzger und Meier, 1971), das mit Hydroxylamin umgesetzt wird (Putsykin und Volodarsky, 1968). Das entstandene α-Hydroxylaminooxim **20** wird mit Acetondiethylketal cyclisiert (Volodarsky und Kutikova, 1971) und das so erhaltene 1-N-Hydroxy-aldonitron **21** mit Mangandioxid zum Aldonitronradikal **22** oxidiert (Martin et al., 1988).



22 reagiert mit Isocyanaten zu Oxadiazolidinon Cycloaddukten **23**, die mit Methylat oder Hydroxid zu den entsprechenden Amidinen **24** gespalten werden. Auf diese Weise ist bereits eine große Anzahl pH-sensitiver Amidin SL-Verbindungen zugänglich gemacht worden (Volodarsky et al., 1985; Berezina et al., 1990, Balakirev et al., 1992; Berezina et al., 1993; Balakirev und Khramtsov, 1993).

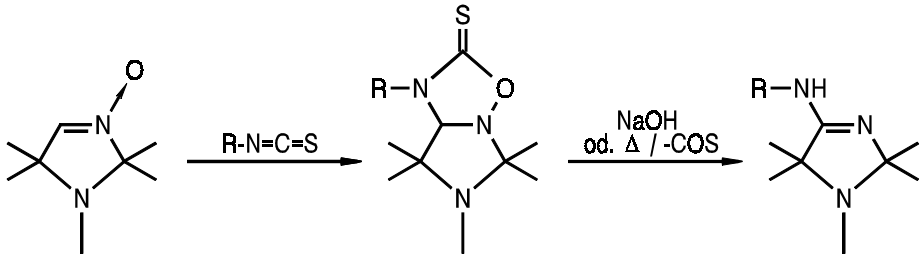


Trotz der leichten Acylierbarkeit der Amidin SL ist ihre Alkylierung, um Verbindungen mit noch höheren pK_a-Werten zu erhalten, bisher nicht gelungen (Berezina et al., 1993). Beim Versuch der nucleophilen Substitution des Chloratoms in **25** wurde lediglich **26** als das Produkt einer intramolekularen Cyclisierung erhalten. **26** besitzt einen sehr interessanten pK_a-Wert (pK_a = 7,2) im physiologischen Bereich, ist jedoch in Ermangelung einer modifizierbaren funktionellen Gruppe für weitere synthetische Operationen zur Darstellung spezifisch reagierender SL-Verbindungen unbrauchbar (Berezina et al., 1993).



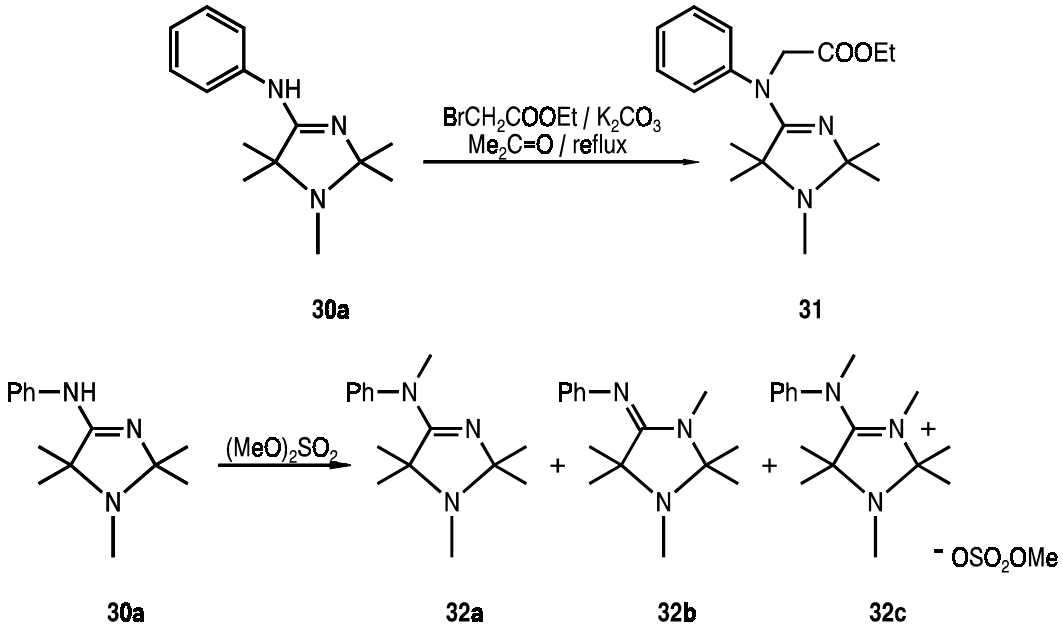
25 **26**

Die Alkylierung der Amidinfunktion gelingt, wenn statt der Radikale die entsprechenden 1-N-Methylderivate **29** eingesetzt werden. Diese lassen sich dann nach der Alkylierung zu den entsprechenden Radikalen oxidieren. Die Gewinnung von **29** erfolgt in Analogie zu den entsprechenden Radikalverbindungen durch Reaktion des 1-N-Methylaldonitrons **27** mit Isocyanaten, oder, was hier auch möglich ist, mit Isothiocyanaten (Voinov et al. 1992).
Die Synthese des Aldonitrons **27** selbst ist recht aufwendig. Es kann in einer achtstufigen Synthese aus 2-Methyl-2-buten erhalten werden (Lubenets et al., 1983; Murman, 1957; Martin und Volodarsky, 1979; Shchukin et al., 1984; Voinov, 1985; Grigor'ev et al., 1985).
Durch 1,3 dipolare Cycloaddition von **27** mit Isothiocyanaten und anschließende Spaltung der Cycloaddukte **28** sind verschiedene Amidine mit 1-N-Methylgruppe **29** erhalten worden (Voinov et al. 1992).



27 **28** **29**

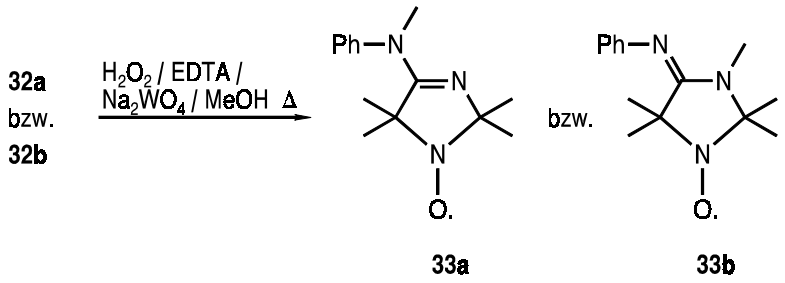
30a wurde sowohl von Dimethylsulfat (Voinov et al. 1992), als auch von Bromessigsäureethylester alkyliert (Voinov, unveröffentlichte Ergebnisse). Während Bromessigsäureethylester nur das exocyclische N-Atom der Amidingruppe unter Bildung von **31** alkylierte, reagierte Dimethylsulfat auch mit dem endocyclischen zu drei verschiedenen Produkten **32a**, **32b** und **32c**.



30a **32a** **32b** **32c**

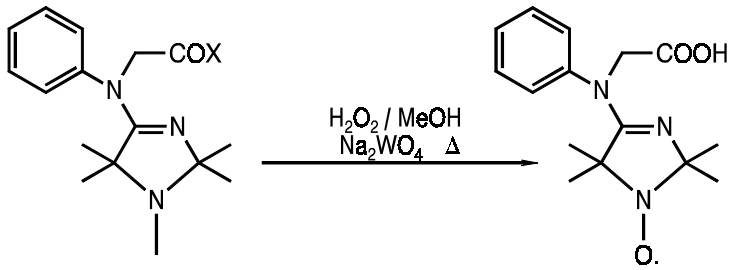
32a und **32b** wurden zu den entsprechenden Radikalen oxidiert. Um die Methylgruppe in 1-Position oxidativ zu entfernen, sind recht harte Reaktionsbedingungen erforderlich. Die entsprechenden Radikale wurden durch mehrstündiges Erhitzen in einer Mischung aus Methanol und 30 %-igem

Wasserstoffperoxid unter Einwirkung von Natriumwolframat erhalten. **33a** und **33b** zeigten gegenüber dem disubstituierten Phenylamidin **24** mit R = Ph (pK_a = 5,0) erhöhte pK_a-Werte (**33a**: pK_a = 6,1; **33b**: pK_a = 5,5) (Voinov et al. 1992).



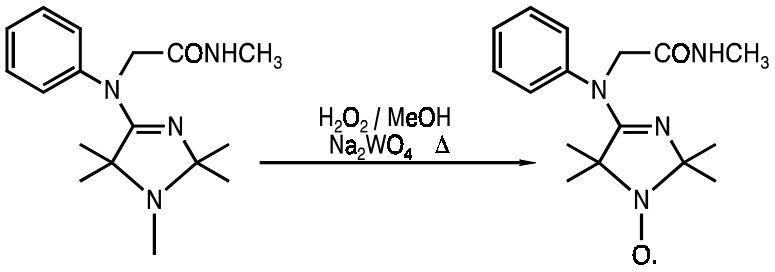
33a **33b**

Beim Versuch der Oxidation des Esters **31** konnte lediglich eine kleine Menge der Radikalcarbonsäure **34** isoliert werden. Dies deutet auf Hydrolyse und Folgereaktionen der Estergruppierung hin. Über die Natur dieser Folgereaktionen ist bisher nichts bekannt. Ähnlich verhält sich das entsprechende primäre Amid **35**. Das N-Methylamid **36**, erhältlich aus dem Ester **31** mit alkoholischer Methylaminlösung, ließ sich dagegen problemlos zum entsprechenden Radikal **37** oxidieren (Voinov, unveröffentlichte Ergebnisse).



31: X = OEt
35: X = NH_2

34

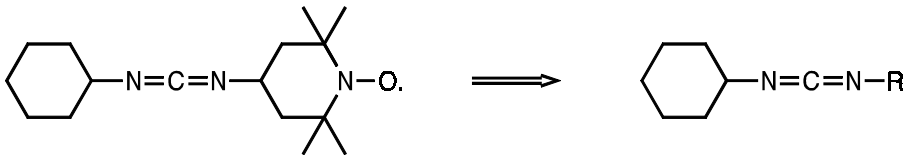


36 **37**

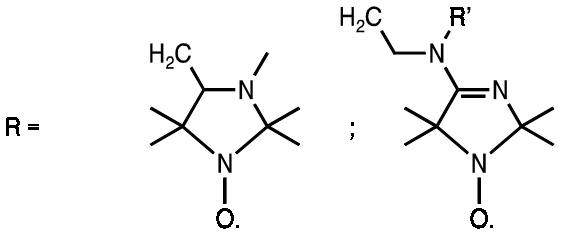
2. Problemstellung

Ziel dieser Arbeit war es, pH-sensitive SL-Verbindungen zur ortsspezifischen Markierung an Proteinen zu synthetisieren und erste Experimente zu ihrer Funktionstüchtigkeit durchzuführen.

Als Grundmodell sollte zum einen die Verbindung **2** dienen, indem der nicht pH-sensitive TEMPO-Rest durch eine geeignete pH-sensitive Einheit – typischerweise einen Imidazolidin- oder Amidinrest – ersetzt wird.

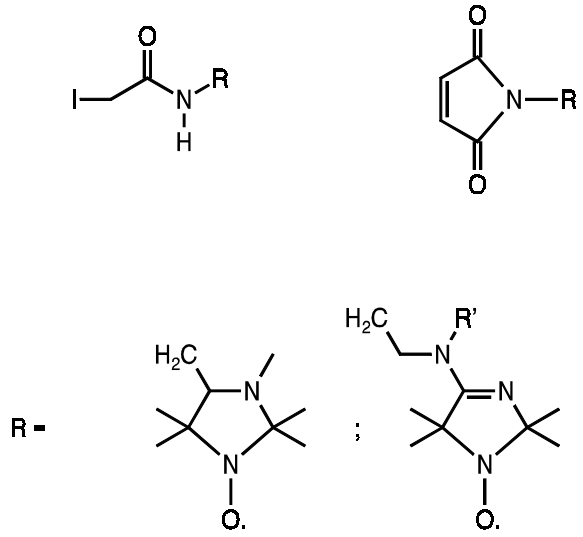


2

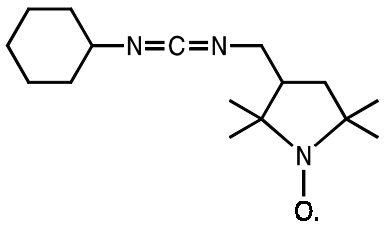


R' = H, Me, Ph

Es sollte zum andern auch die Möglichkeit ausgelotet werden, pH-sensitive SH-spezifische Spinmarker herzustellen.



Um einen Einfluß des pH-Wertes von einem Einfluß eventueller Konformationsänderungen im ESR-Spektrum zu unterscheiden, ist immer der Einsatz einer pH-unabhängigen Vergleichsprobe nötig. Eine solche sollte in dieser Arbeit ebenfalls synthetisiert und getestet werden.



SL-Verbindungen sind unempfindlich gegenüber der Transparenz des Mediums, was ein Vorteil gegenüber Fluoreszenzproben bedeutet. Die SL-Verbindungen könnten daher in der nativen Umgebung der markierten Proteine z.B. in Membranen zum Einsatz kommen. Geeignete pH-sensitive SL-Verbindungen könnten zur Überprüfung von Struktur und Funktion der c-Untereinheit des F_o-Teils von z.B *E. coli* F_oF_1 ATP-Synthasen dienen. Die Verfügbarkeit solcher spezifischer pH-sensitiver SL-

Verbindungen könnte allgemein die Durchführung weitergehender Experimente zur Aufklärung der Frage ermöglichen, wie die F_oF_1-ATP-Synthasen die protonenmotorische Kraft nutzen, um den universellen Energieträger ATP zu generieren.
Nicht zuletzt ist auch die Anwendung auf andere protonenpumpende und pH-abhängige Enzyme denkbar.

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthesen

3.1.1. Syntheseplanung

3.1.1.1. Entwurf der Zielmoleküle

Jede pH-sensitive SL-Verbindung zeigt in einem Bereich von ~ pK ± 1,2 pH-Einheiten ein pH-sensitives ESR-Spektrum (Balakirev et al., 1992). Größere Änderungen im Spektrum sind aber nur in einem Bereich von pK_a ± 1 pH-Einheiten beobachtbar. Es wäre ideal, auf einen Satz von Verbindungen mit einer pK_a-Differenz von ~ 0,5 – 1 zurückgreifen zu können, um die Durchführung von Messungen in einem größeren pH-Wert Intervall zu ermöglichen.
Die Substituenten in 4-Position der Imidazolidine bzw. an der 4-Aminogruppe der Amidine beeinflussen den pK_a-Wert der jeweiligen Verbindungen. Aliphatische Reste ergeben im allgemeinen höhere pK_a-Werte als aromatische.

Beim Entwurf der Zielmoleküle standen mehrere Überlegungen im Vordergrund.

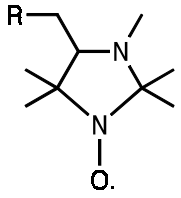
1) Sie sollten als funktionelle Gruppe zur Bindung an Proteine die Carbodiimid-Gruppe zur spezifischen Makierung von Asp61 der c-Untereinheit der *E.coli* F_0 bzw. die Iodacetamid- oder Maleimidgruppe zur ortsspezifischen Markierung von Cysteinen tragen. Da die Carbodiimide in Form von N-Acylharnstoffen an Asp61 binden, war es ratsam, zur Abschätzung des pK_a-Wertes nicht die Carbodiimide selbst, sondern Modellverbindungen einzusetzen. Zu diesem Zweck sollten die entsprechenden Harnstoffe dienen.
2) Die pH-sensitiven Radikale sollten einen geeigneten pK_a-Wert im biologisch relevanten Bereich von pK_a ~ 4 – 7 besitzen. Um diesen Bereich abzudecken ist die Darstellung mehrerer Moleküle nötig, um aus dem Set

dasjenige zur Wahl zu haben, das den Anforderungen des Proteins am besten gerecht wird.

3) Sie sollten auf möglichst einfachem Weg synthetisierbar sein.
4) Der Raumanspruch der Substituenten sollte möglichst gering sein, um nach der Markierung die Proteinstruktur möglichst wenig zu stören.

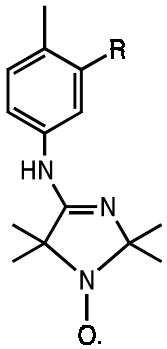
Nach Abwägung obiger Kriterien erschienen folgende Zielmoleküle als aussichtsreich:

geschätzter pK_a-Wert



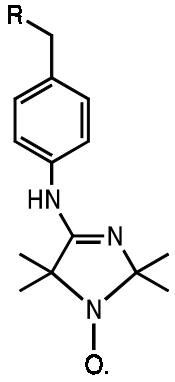
38

~ 4 – 4,5



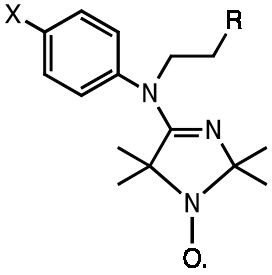
39

~ 4,5 – 5



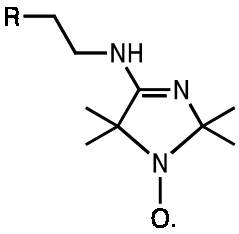
40

~ 5



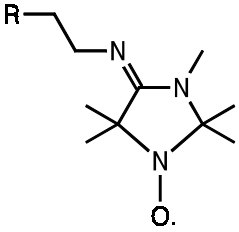
41 : X = Cl
42 : X = H
43 : X = OMe

41 : ~ 5 – 5,5 ; **42** : ~ 5,5 – 6 ;
43 : ~ 6 – 6,5



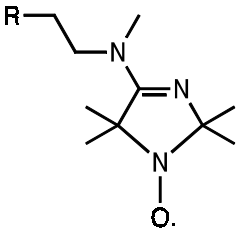
44

~ 5,5 – 6



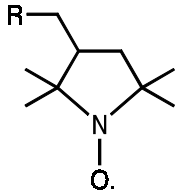
45

~ 6,5 – 7



46

~ 7 – 7,5

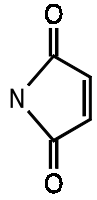


47

pH-unabhängige Vergleichsprobe

38a - 47a : R = N=C=N-C_6H_{11}

38b - 47b : R = NH-CO-CH_2I

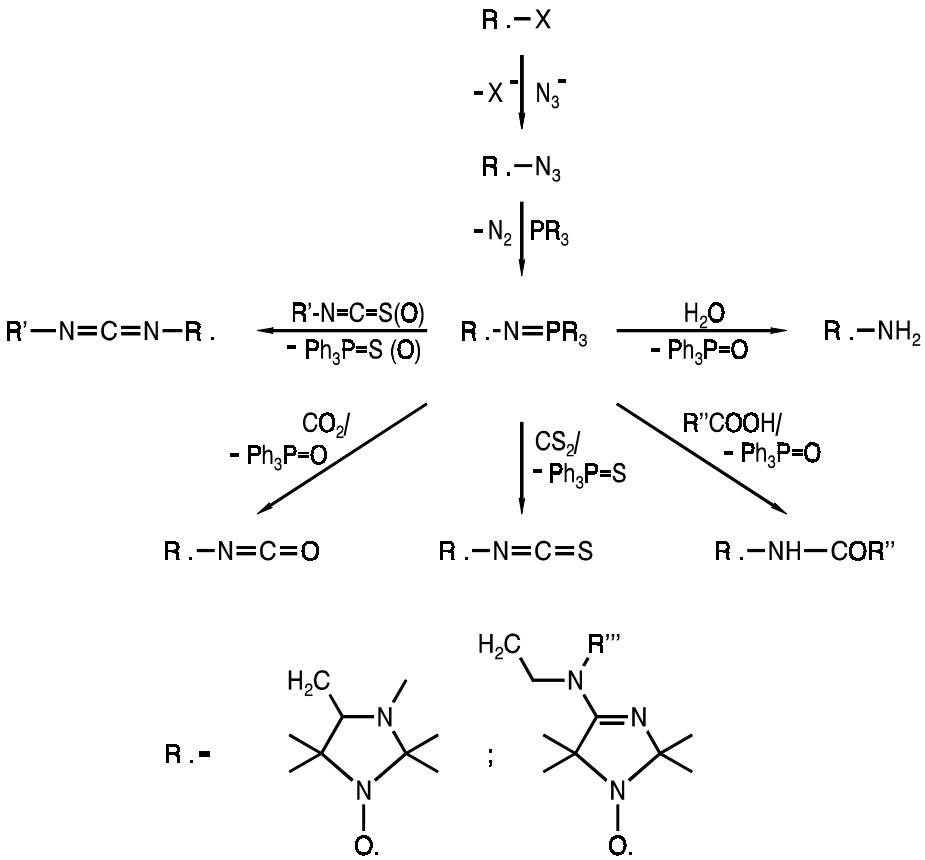
38c - 47c : R = 

38d - 47d : R = NH-CO-NH-C_6H_{11}

3.1.1.2. Generelles Syntheseschema

Der Aufbau der Carbodiimidgruppe setzt den Einsatz primärer Amine bzw. geeigneter Derivate primärer Amine, wie z.B. Isothiocyanate, Isocyanate oder Phosphinimine, voraus. Über die entsprechenden Thioharnstoffe und deren Desulfurierung mit gelbem Quecksilberoxid sind die Carbodiimide zugänglich. Dieses Verfahren ist auch für Nitroxylradikale mit Erfolg angewendet worden (Kumarev und Knorre, 1970; Azzi et al.,1973; Hankovszky et al., 1981; Schanding et al., 1996). Auch die Synthese der Maleimidgruppe bedingt den Einsatz primärer Amine. Die Iodacetamid-SL werden in aller Regel durch Acylierung primärer Amine erhalten. Amine werden im allgemeinen durch Reduktion von Amiden, Nitroverbindungen, Nitrilen u.ä. dargestellt. Die Empfindlichkeit der Nitroxylgruppe gegenüber stark reduzierenden oder stark sauren Reaktionsbedingungen verlangt aber den Einsatz möglichst milder Reaktionsbedingungen. Als Methode der Wahl steht die Umwandlung von Aziden in die entsprechenden Phosphinimine zur Verfügung. Diese können dann ohne extra isoliert zu werden direkt in Amine, Isothiocyanate, Isocyanate (Staudinger und Meyer 1919; Staudinger und Hauser, 1921) oder Amide (Garcia et al., 1984; Urpi und Vilarrama, 1986) überführt werden. Diese sehr

elegante und rationelle Methode ist bereits mit Erfolg zur Synthese von SL-Verbindungen genutzt worden (Hankovszky, et al., 1981; Reznikov et al., 1994; Schanding et al., 1996). Die Azide selbst sind aus Alkylhalogeniden oder –tosylaten durch nukleophile Substitution leicht darstellbar.



X = Hal oder OTs R = Et oder Ph R' = Cyclohexyl
R" = ICH_2, $ClCH_2$, oder HOOC-CH=CH R"'= H, Me, Ph

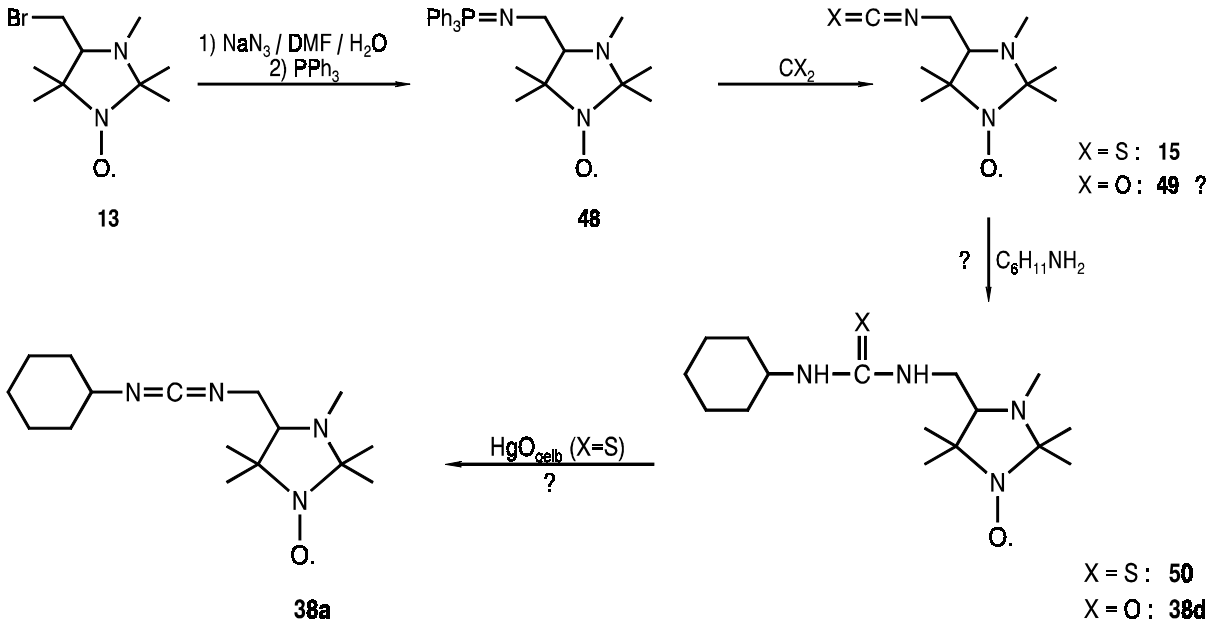
Zur Synthese von **38a** stand bereits ein geeignetes R.-X , sowie R.-N=C=S in den Verbindungen **13** und **15** zur Verfügung (Reznikov et al., 1994). Das gleiche galt für **47a** (Hankovszky et al., 1981). **47b** und **47c** sind käuflich erwerblich.
Auch **39b** ist schon in der Literatur beschrieben (Khramtsov und Volodarsky, 1998).
Um andere Amidinverbindungen in möglichst einfacher und effektiver Weise zu synthetisieren, war die Wahl des richtigen Isocyanates von entscheidender Bedeutung. Der Rest am Isocyanat sollte in möglichst einfacher Weise in die

gewünschten, zur spezifischen Bindung an Proteine geeigneten funktionellen Gruppen, wie Iodacetamid, Maleimid oder Carbodiimid umwandelbar sein.
Zur Gewinnung disubstituierter Amidine sind bifunktionelle Isocyanate, wie z. B. Diisocyanate, Halogenalkylisocyanate und Isocyanatocarbonsäurederivate nötig (Berezina et al., 1990, Balakirev et al., 1992, Berezina et al., 1993). Bei den trisubstituierten kann die zur Markierung benötigte funktionelle Gruppe auch durch Alkylierung der Amidinfuntion mit z.B. Bromessigsäureethylester aufgebaut werden (Voinov, unveröffentlichte Ergebnisse).

3.1.2. Durchführung der Synthesen

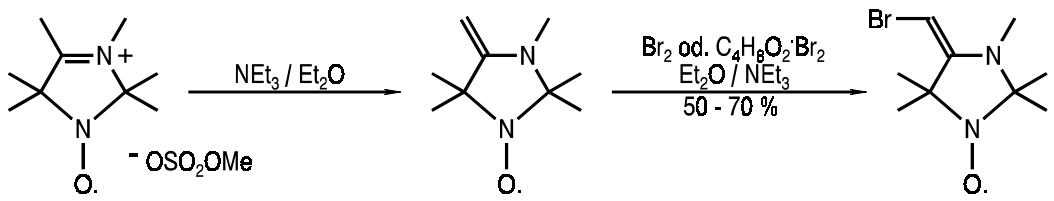
3.1.2.1. Darstellung von 38a

Die Chemie der Imidazolidin Nitroxyle ist durch die Arbeiten von Reznikov und Kollegen gut etabliert worden. Bei der Planung der Synthese von **38a** und **38d** konnte auf diese Arbeiten zurückgegriffen werden. Als Ausgangsverbindung zur Synthese von **38a** bot sich **15** an, das aus **14** über das entsprechende Phosphinimin **48** erhältlich ist (Reznikov et al., 1994). Aus **48** sollte aber auch das Isocyanat **49** darstellbar sein. Die Umsetzung von **15** bzw. **49** mit Cyclohexylamin ergäbe Thioharnstoff **50** bzw. Harnstoff **38d**. Die Desulfurierung des Thioharnstoffes **50** mit gelbem Quecksilberoxid sollte Carbodiimid **38a** zugänglich machen.

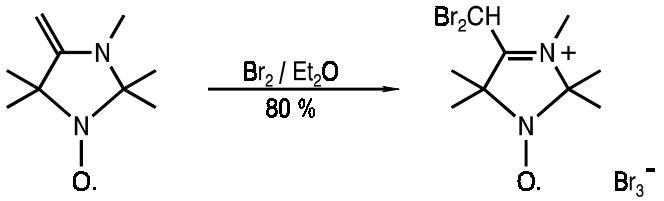


Da bei der Synthese von **12** nach Literaturvorschrift (Reznikov und Volodarsky, 1984) Probleme auftraten, sei hier noch einmal näher auf ihre Lösung eingegangen.

Durch Umsetzung von **11** mit einer Lösung von Brom oder Dioxan Dibromid in Ether erhielten Reznikov und Kollegen **12** als Hauptprodukt bei Anwesenheit einer Base. In Abwesenheit von Basen wurde ein dibromiertes Produkt **12a** erhalten.



51 11 12



11 12a

Die Synthese war unter den in der Literatur gegebenen Bedingungen nicht reproduzierbar. Nur selten entstand reines **12**, dessen Doppelbindung im IR-Spektrum durch die ν(C=C) Bande bei 1616 cm^{-1} charakterisiert wurde. Meist entstand **12** im Gemisch mit einer anderen Komponenten mit einer IR-Absorption bei 1592 cm^{-1}. Manchmal wurde ausschließlich diese Verbindung erhalten. Auch die Erniedrigung der Reaktionstemperatur und die Verlängerung der Zutropfdauer der Brom/Ether Lösung konnte die Entstehung dieser zweiten Komponente nicht zurückdrängen. Daraufhin wurde die unbekannte Verbindung isoliert, gereinigt und massenspektrometrisch untersucht. Sie zeigte das typische Isotopenmuster für eine Verbindung, die zwei Bromatome enthält.

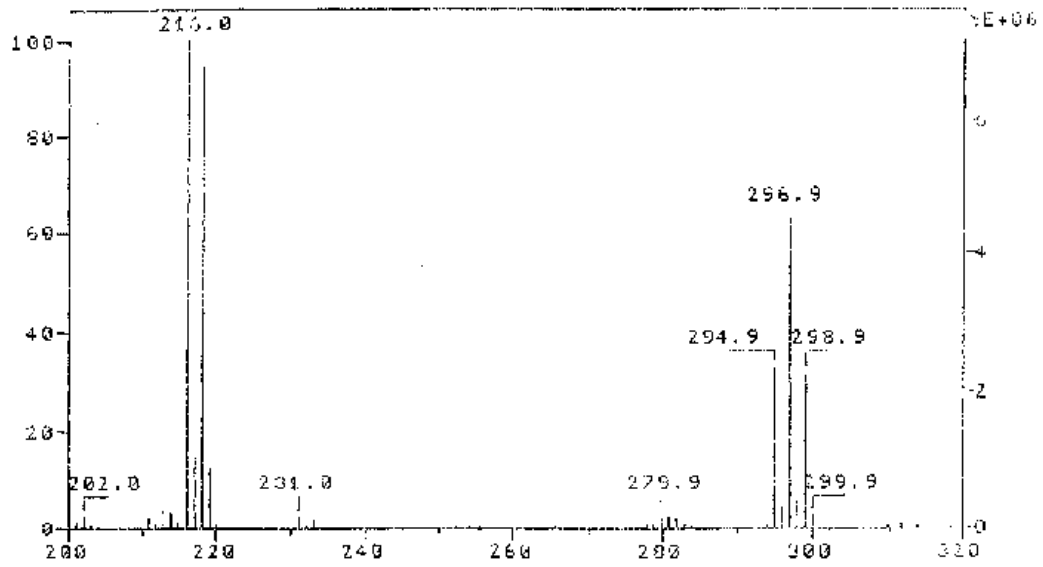
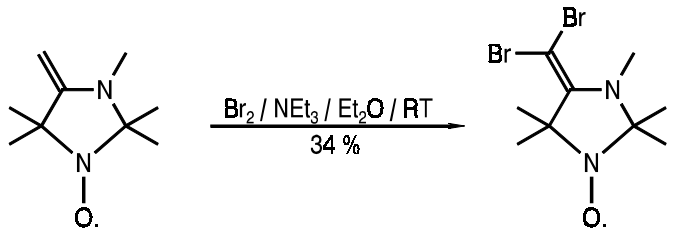


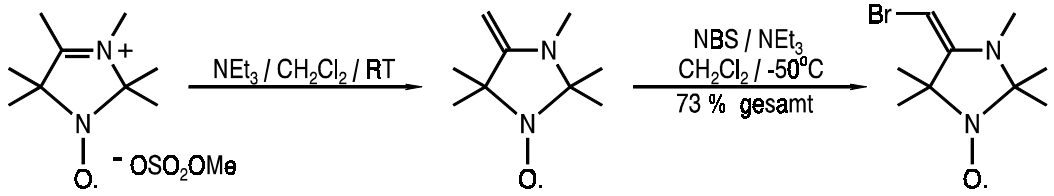
Abb. 1: Massenspektrum von **12b** (EI, 70 eV)

Man erkennt eine Gruppe Peaks, die dem Fragment M^+ - 30 zugeordnet werden kann (m/z = 295, 297, 299). Das entspricht einem Molekülion **12b**, aus dem NO abgespalten worden war. Das erhaltene Fragmentierungsmuster ist typisch für eine Verbindung, die zwei Atome mit je zwei in ungefähr gleicher Häufigkeit vorkommenden Isotopen enthält, so, wie das bei Brom der Fall ist (^{79}Br: 50,69 % natürliche Häufigkeit und ^{81}Br: 49,31 % natürliche Häufigkeit). Bei m/z = 216 und 218 liegt ein Fragment vor, das sowohl NO, als auch ein Bromatom verloren hat. Der Schluß liegt nahe, daß es sich bei der unbekannten Verbindung um das Dibromenamin **12b** handelte. Auch die Elementaranalyse untermauerte dies. Die gegenüber **12** um ~ 20 cm^{-1} erniedrigte Wellenzahl der IR-Absorption der Doppelbindung deutet auch in Richtung des Dibromenamins **12b** (unsubstituiertes Enamin **11**: ν(C=C): 1640 cm^{-1}, Monobromenamin **12**: ν(C=C): 1620 cm^{-1} (Volodarsky et al., 1979; Reznikov und Volodarsky, 1984)). Offensichtlich entstand trotz Anwesenheit von Triethylamin als Base eine nicht unerhebliche Menge **12b**.



11 12b

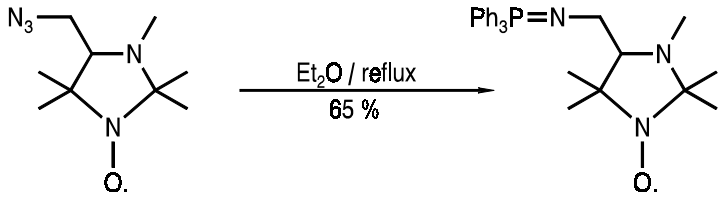
Um die Reaktion besser steuern zu können, wurde nach Alternativen gesucht. Die Monohalogenierung von Enaminen ist u.a. von Vilsmaier und Kollegen erprobt worden. Als mildes Halogenierungsmittel wurde N-Chlorsuccinimid bei tiefen Temperaturen eingesetzt (Tetzlaff et al., 1990).
Auf diese Weise wurde **12** durch Umsetzung von **11** mit N-Bromsuccinimid in Dichlormethan bei – 50° C in 73 %-iger Ausbeute erhalten (Schanding et al., 1996).



51 11 12

Die Reduktion zu **13** erfolgte wie in der Literatur angegeben (Reznikov und Volodarsky, 1984). **13** wurde mit Natriumazid in einem Aceton/Wasser Gemisch umgesetzt und **14** in Form eines gelben Feststoffs erhalten (Reznikov et al., 1994: Reaktion in DMF, als Öl isoliert). **14** reagierte mit Triphenylphosphan in Ether zu **48**.

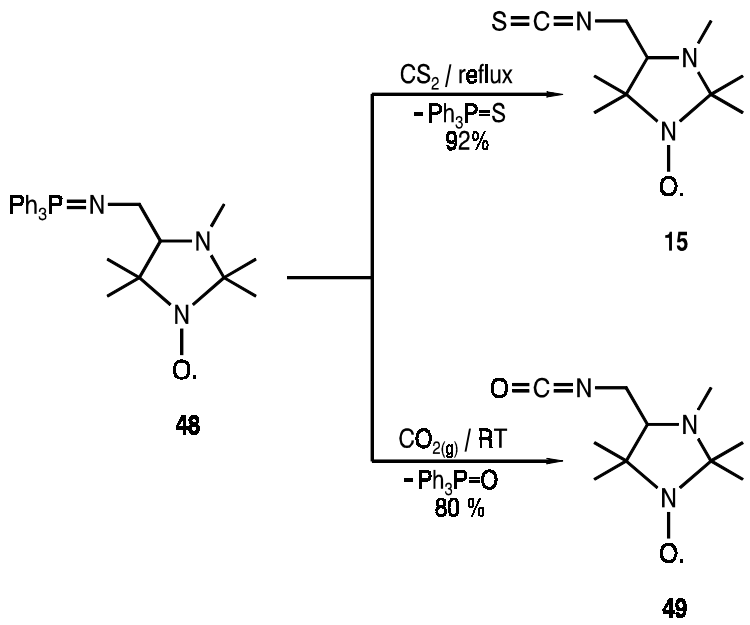
Es kann in situ durch Refluxieren in Schwefelkohlenstoff weiter zum Isothiocyanat **15** umgesetzt werden (Reznikov et al., 1994). Im Zuge dieser Arbeit wurde **48** gesondert isoliert und charakterisiert. **48** wurde als blaßgelber Feststoff in sehr reiner Form erhalten. Die Ausbeute betrug 65 % (Schanding et al., 1996).



14 **48**

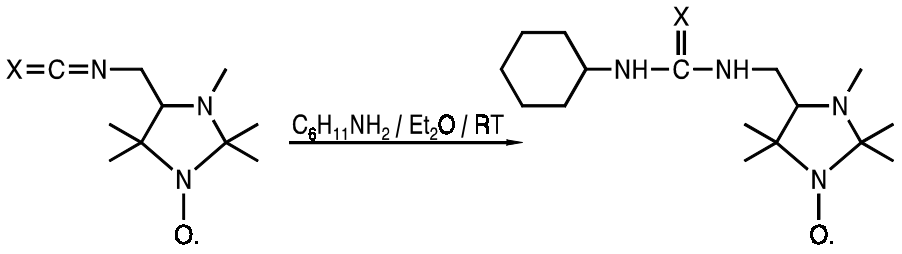
Die Reaktion der Phosphinimine mit Schwefelkohlenstoff oder Kohlendioxid bietet eine bequeme Möglichkeit der Synthese von Isothiocyanaten bzw. Isocyanaten (Staudinger und Meyer, 1919; Staudinger und Hauser, 1921). Die Darstellung des Isothiocyanates **15** ist auf diese Weise bereits gelungen (Reznikov et al., 1994). Die Synthese wurde ausgehend vom Phosphinimin **48** nachvollzogen und ergab **15** in 92 %-iger Ausbeute. **15** wurde als oranger Feststoff (Schmp.: 40-41 ° C; Reznikov et al., 1994: Öl) erhalten.

49 wurde durch Umsetzung von **48** mit Kohlendioxid erstmals dargestellt. Das Phosphinimin **48** wurde in einer Argonatmosphäre in trockenem Ether suspendiert und bis zur Beendigung der Reaktion trockenes Kohlendioxid eingeleitet. Das Isocyanat **49** wurde aufgrund seiner zu erwartenden hohen Reaktivität gleich weiter umgesetzt.



IR (ν(N=C=O): 2260 cm^{-1}) und Massenspektrum (m/z = 212 (M^+) 11 % relative Intensität) bestätigten die **49** zugeordnete Struktur (Schanding et al., 1996).

Die Umsetzung von **15** und **49** mit Cyclohexylamin in Ether bei Raumtemperatur ergab Thioharnstoff **50** und Harnstoff **38d** in 96 bzw. 74 %-iger Ausbeute in analysenreiner Form (Schanding et al., 1996).

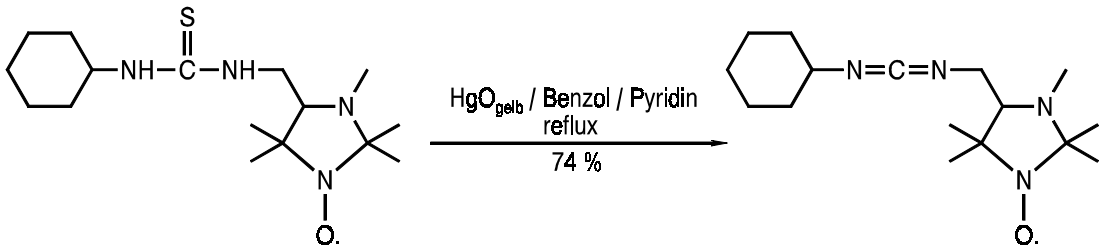


X = S : **15**
X = O : **49**

X = S : **50** : 96 %
X = O : **38d** : 74 %

Die Bestimmung des pK_a-Wertes mittels ESR-Spektroskopie ergab für **38d** einen Wert von $pK_a = 3,1 \pm 0,1$ (s.S. 146).

Durch Erhitzen des entsprechenden Thioharnstoffes mit gelbem Quecksilberoxid in trockenem Benzol/Pyridin Gemisch konnte **38a** in 74 %-iger Ausbeute gewonnen werden. **38a** lag bei Raumtemperatur als gelboranges Öl vor, das bei – 20 ° C zu gelborangen Kristallen erstarrte. Es konnte analysenrein erhalten werden.



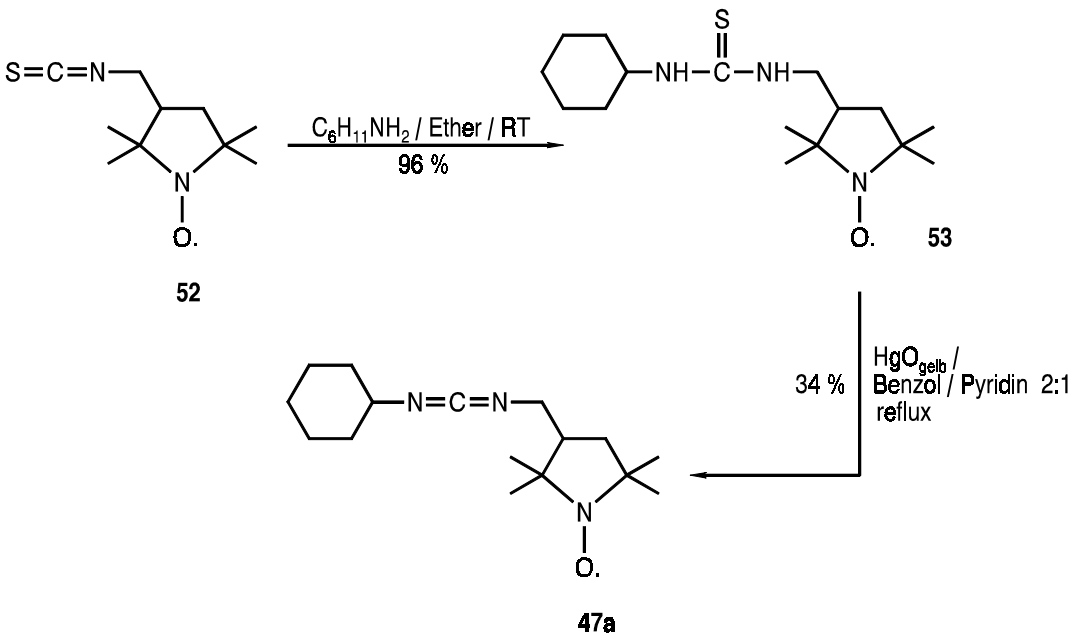
50 **38a**

Die Carbodiimidgruppe absorbierte im IR bei 2127 cm^{-1} . Im Massenspektrum war der Molekülpeak bei m/z = 293 mit 6,2 % relativer Intensität zu erkennen (Schanding et al., 1996).

3.1.2.2. Darstellung von 47a

47a könnte als eine geeignete pH- unabhängige Vergleichsprobe für ESR-Experimente mit pH-sensitiven SL-Carbodiimiden dienen (s. **3.1.1.1.**). Die Darstellung von **47a** erfolgte analog der Darstellung von **38a** ausgehend vom literaturbekannten Isothiocyanat **52**, das nach Literaturangaben synthetisiert worden war (Rozantsev, 1970; Gaffney, 1976; Chion et al., 1978; Hankovszky et al., 1981). Der Thioharnstoff **53** wurde in hervorragender Ausbeute (96%) und Reinheit erhalten. Carbodiimid **47a** konnte nur in geringer Ausbeute (34 %) gewonnen

werden. Es wurde jedoch für die biochemischen Experimente genügend Substanz erhalten, weshalb im Rahmen dieser Arbeit auf eine Ausbeuteoptimierung verzichtet wurde. **47a** wurde wie **38a** in Form eines gelborangen Öls gewonnen.



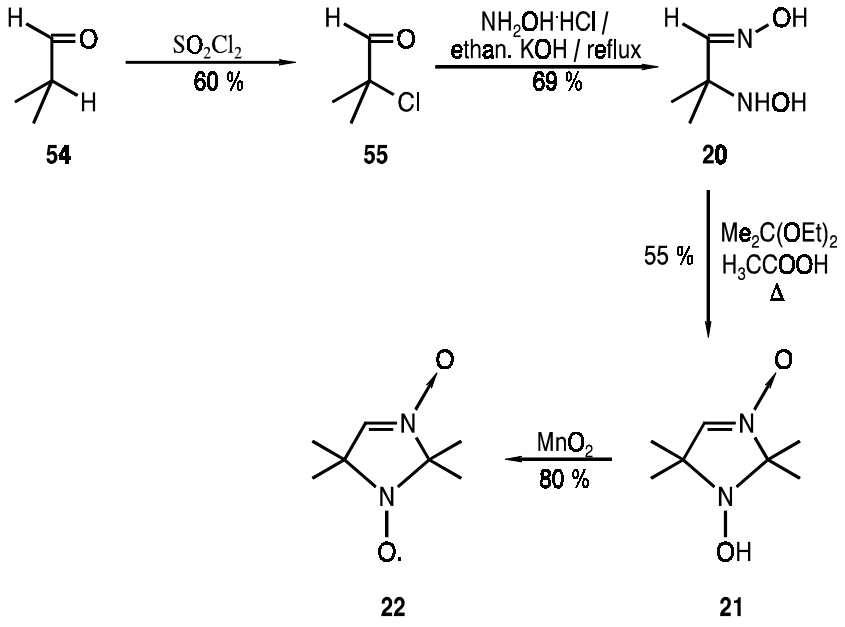
Die Absorption der N=C=N Gruppierung im IR erfolgte im erwarteten Bereich bei 2126 cm^{-1}.

53 wurde als Referenzsubstanz für **47a** bei verschiedenen pH-Werten (3,4,5,6 und 7) im ESR vermessen und zeigte in diesem pH-Bereich keinerlei Anzeichen einer pH-Sensitivität, was die Eignung von **47a** als pH-unabhängige Vergleichsprobe bestätigte (s.S. 145).

3.1.2.3. Synthese der 4-N-R-Amino-3-imidazolin-1-oxyle

3.1.2.3.1. Alternative Synthesemethode zur Darstellung der Ausgangsverbindung 22

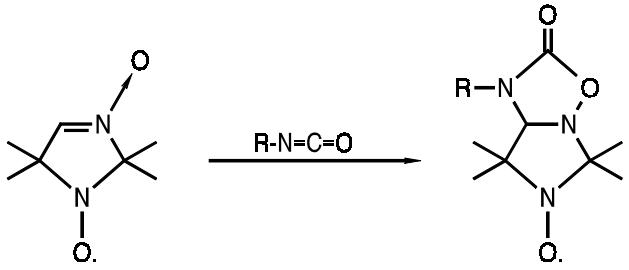
Die in der Literatur beschriebene Synthese von **22** ist in Kap. **1.2.3.2.** näher dargelegt worden. Die Darstellung des dimeren Nitrosochlorids **19** gelingt nur in vernünftiger Ausbeute, wenn man Nitrosylchlorid zur Addition an die Doppelbindung verwendet. Das von Volodarsky und Kollegen entwickelte Verfahren (Lubenets et al., 1983), bei dem das Nitrosylchlorid in situ aus Natriumnitrit und konzentrierter Salzsäure in Methanol bei – 20 ° C erzeugt wird, und das u. a. für die Darstellung des dimeren Nitrosochlorids von 2-Methyl-2-buten eingesetzt werden kann, ist für Isobuten leider nicht anwendbar (Volodarsky, persönliche Mitteilung). Nitrosylchlorid ist ein giftiges und aggressives Gas, das sehr teuer ist. Die Darstellung im Labor ist mit einem recht mühsamen Reinigungsverfahren verbunden. Außerdem ist die Ausbeute im darauffolgenden Schritt bei der Darstellung des α-Hydroxylaminooxims **20** gering (20-30 %) (Putsykin, Volodarsky, 1968). Aus diesen Gründen wurde nach einer Alternative zum Literaturverfahren gesucht. Sie wurde in der folgenden Reaktionssequenz gefunden:



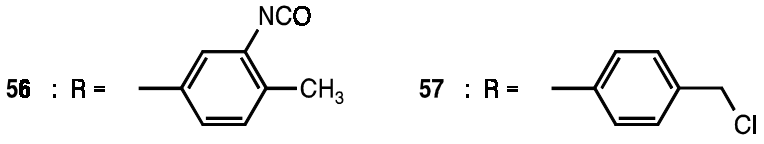
Die Chlorierung von Isobutyraldehyd **54** wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt (Stevens und Gillis, 1957). Der so gewonnene α-Chlorisobutyraldehyd **55** wurde mit überschüssigem Hydroxylamin durch fünfstündiges Refluxieren in wäßrig alkoholischer Lösung zum α-Hydroxylaminooxim **20** umgesetzt. **20** wurde in einer Ausbeute von 69 % erhalten. Die Kondensation mit Acetondiethylketal zu **21** verlief nur reproduzierbar und in passabler Ausbeute, wenn ein Äquivalent Eisessig zugesetzt wurde (Volodarsky und Kutikova, 1971: ohne Säurezugabe, Ausbeute 25%; führte beim Nachvollziehen oft zu Zersetzungsprodukten). **20** wurde in Acetondiethylketal zusammen mit einem Äquivalent Eisessig 15 min zum Sieden erhitzt. Nach der Aufbereitung wurde **21** als Rohprodukt in 55 %-iger Ausbeute erhalten und in dieser Form gleich weiter umgesetzt.
Das angewandte Verfahren ist im Vergleich zum Literaturverfahren wesentlich effektiver. Die Ausbeute konnte um mehr als das Doppelte gesteigert werden. Außerdem war der Arbeitsaufwand erheblich geringer.
Die Oxidation von **21** zum Radikal **22** erfolgte, wie in der Literatur beschrieben (Martin et al., 1988).

3.1.2.3.2. Cycloadditionen von 22 mit Isocyanaten

Über die Reaktion von **22** mit verschiedenen Isocyanaten ist in der Literatur ausführlich berichtet worden, ebenso über die Gewinnung pH-sensitiver Amidin SL-Verbindungen aus diesen Cycloaddukten (Volodarsky et al., 1985; Berezina et al., 1990; Balakirev et al., 1992; Berezina et al., 1993; Balakirev und Khramtsov, 1993). Eine gute Ausgangsposition zur Synthese von Iodacetamiden, Maleimiden oder Carbodiimiden boten u.a. **25** und **56**. **56** wurde nach Literaturvorschrift (Berezina et al.,1990) dargestellt.
Anstatt der Chloralkylverbindung **25** wurde die Bromalkylverbindung **58** erstmals synthetisiert, um nukleophile Substitutionen leichter durchführen zu können. Neu synthetisiert wurde auch **57**, das eine vielversprechende Ausgangssubstanz zur Synthese der Verbindungen **40a-d** darstellt.



22

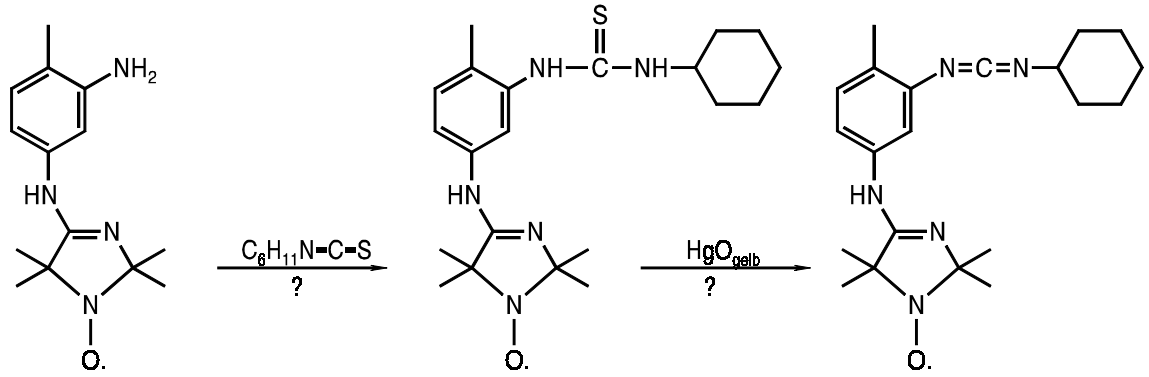


58 : R = $(CH_2)_2$-Br

Die Synthese von **56** verlief genau wie in der Literatur beschrieben (Bererzina et al., 1990). Bei der Synthese der noch unbekannten Verbindungen **57** und **58** wurde **57** in 70 %-iger, **58** in 46%-iger Ausbeute erhalten. Die beiden Verbindungen konnten in hoher Reinheit dargestellt und vollständig charakterisiert werden. Ihre IR-Spektren zeigten die typische Absorption der Carbonylgruppe des Oxadiazolidinonringes bei ν ~1750 cm^{-1}.

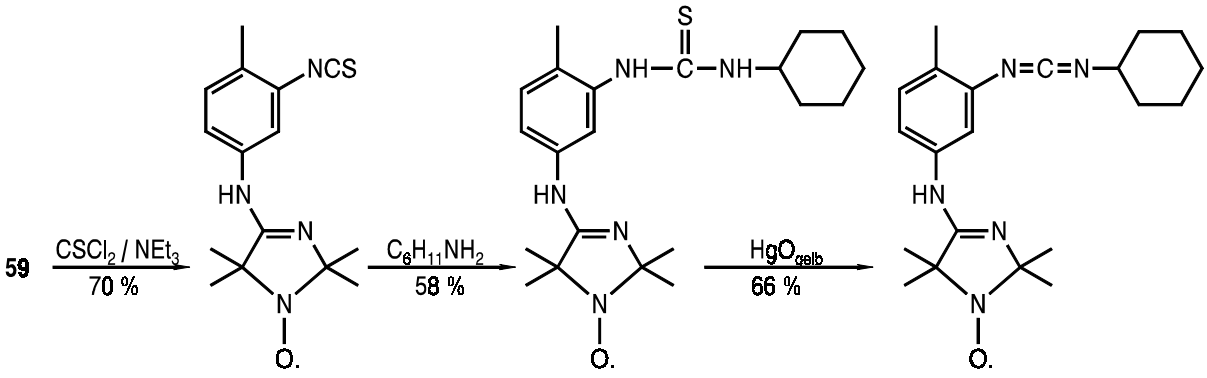
3.1.2.3.3. Darstellung von 39a und 39d

Bei der Planung der Synthese von **39a** bot sich das literaturbekannte Amin **59** als Ausgangsverbindung an (Berezina et al., 1990). **59** sollte dann mit Cyclohexylisothiocyanat in den Thioharnstoff **60** überführt werden. Dessen anschließende Desulfurierung mit gelbem Quecksilberoxid stellte einen einfachen Zugang zu **39a** dar.



59 **60** **39a**

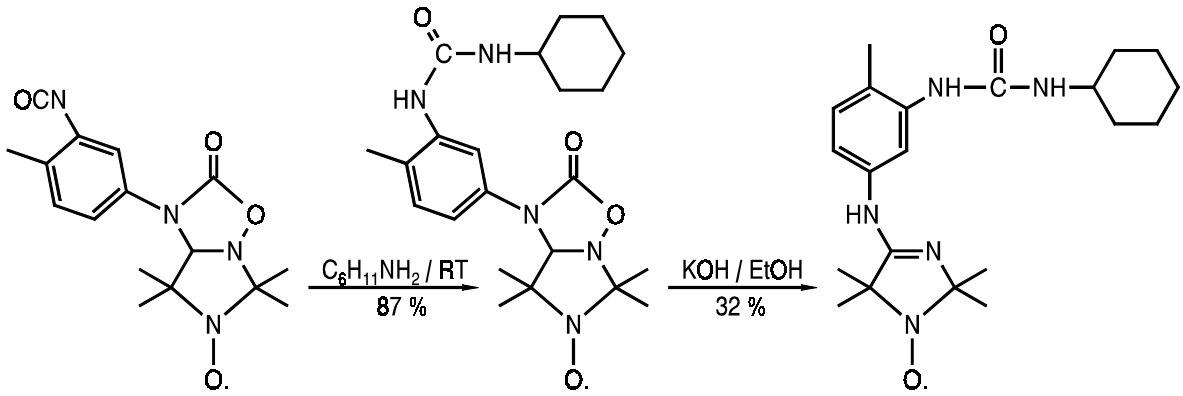
Das Amin **59** wurde nach Literaturvorschrift aus **56** hergestellt (Berezina et al., 1990). Überraschenderweise fand bei der Umsetzung von **59** mit Cyclohexylisothiocyanat unter den für eine solche Reaktion üblichen Bedingungen – 3 d Rühren bei Raumtemperatur, 3 h Refluxieren in Trichlormethan – keine Reaktion statt. Deshalb wurde **59** nach Literaturvorschrift mit Thiophosgen in das Isothiocyanat **61** umgewandelt (Reznikov et al., 1994), welches ohne Probleme mit Cyclohexylamin zu **60** reagierte. Es scheint, als ob die Isothiocyanatogruppe in **61** besser zugänglich ist, als die Aminogruppe in **59**. Der Thioharnstoff **60** wurde durch Desulfurierung mit gelbem Quecksilberoxid zum gewünschten Carbodiimid **39a** umgesetzt. Die Ausbeute betrug 66 %.



61 **60** **39a**

39a wurde in analysenreiner Form erhalten. Die IR-Absorption der Carbodiimid-gruppe erfolgte bei $\nu = 2118\ cm^{-1}$. Der Molekülpeak war im Massenspektrum bei m/z = 369 mit 3,4 % relativer Intensität zu erkennen.

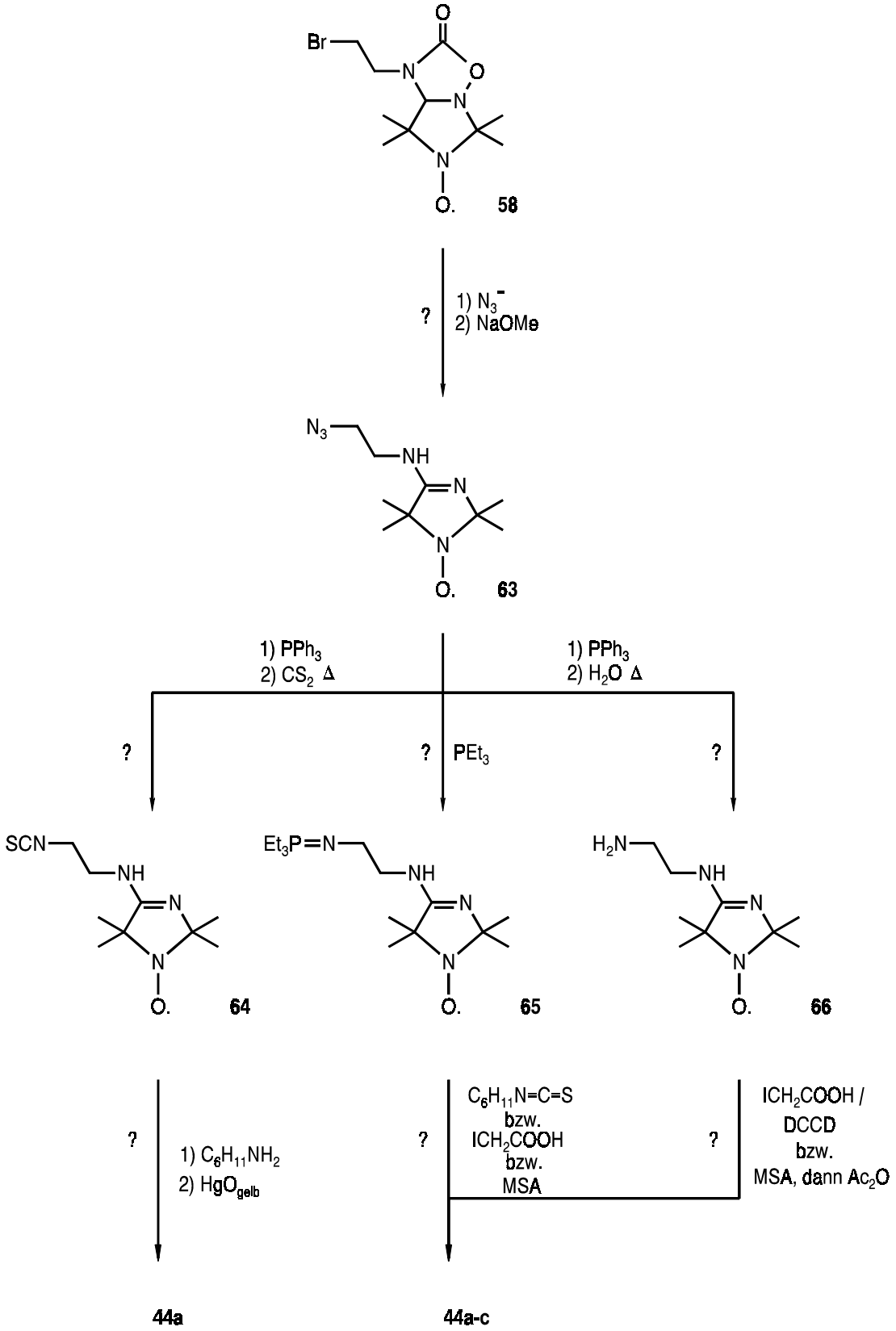
Der Harnstoff **39d** ließ sich auf einfache Weise gewinnen. **56** wurde mit Cyclohexylamin in **62** überführt, dessen Oxadiazolidinonring mit Kaliumhydroxid in Ethanol gespalten wurde. **39d** fiel in 32 %-iger Ausbeute in hoher Reinheit als hochschmelzendes blaßgelbes Pulver an. Eine pH-Titration mit Hilfe der ESR-Spektroskopie ergab für **39d** einen pK_a-Wert von 4,75 ± 0,25 (s.S. 146).



56 **62** **39d**

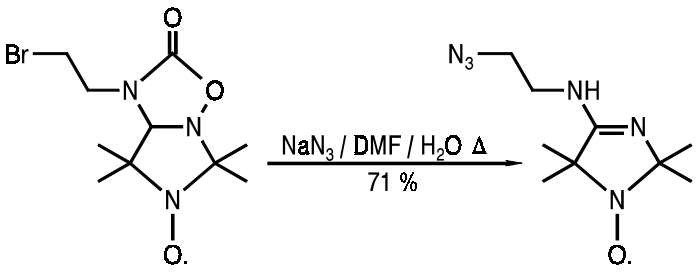
3.1.2.3.4. Versuch der Darstellung von 44a-d

Die pH-sensitiven Verbindungen **44a-c** mit aliphatischer Seitenkette am 4-N-Atom erscheinen aufgrund ihrer geringen Größe und des zu erwartenden hohen pK_a-Wertes sehr interessant für Untersuchungen an Enzymen. Bei der Syntheseplanung boten sich die im folgenden Schema angedeuteten Wege an:

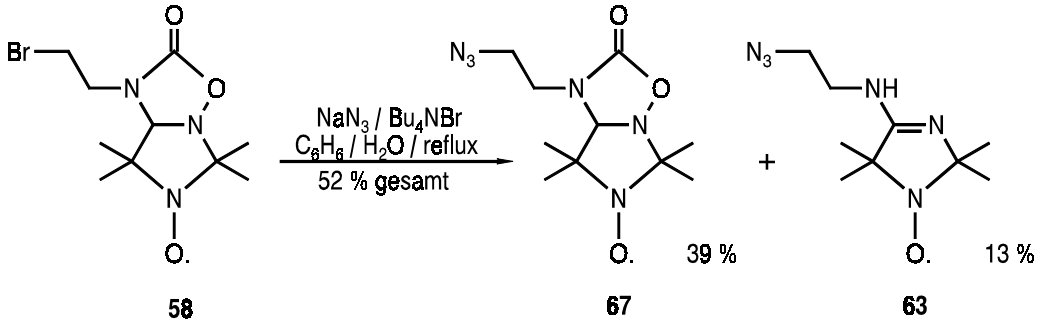

Br
O
N
O
N
N
O.
58
?
1) N_3^-
2) NaOMe
N_3
NH
N
N
O.
63
1) PPh_3
2) CS_2 Δ
1) PPh_3
2) H_2O Δ
?
?
PEt_3
?
SCN
NH
N
N
O.
64
$Et_3P{=}N$
NH
N
N
O.
65
H_2N
NH
N
N
O.
66
?
1) $C_6H_{11}NH_2$
2) HgO_{gelb}
?
$C_6H_{11}N{=}C{=}S$
bzw.
ICH_2COOH
bzw.
MSA
?
ICH_2COOH /
DCCD
bzw.
MSA, dann Ac_2O
44a
44a-c

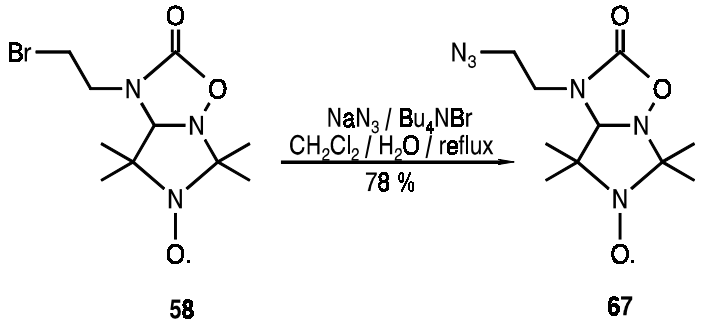
Das Bromatom in **58** sollte nukleophil gegen die Azidogruppe ausgetauscht werden. Die Spaltung des Oxadiazolidinonringes führte zu **63**, das dann über das entsprechende Triphenylphosphinimin in das Isothiocyanat **64** umgewandelt werden sollte. Umsetzung mit Cyclohexylamin und Desulfurierung des entstandenen Thioharnstoffes nach der bei der Synthese von **38a** und **47a** beschriebenen Methode ergäbe dann **44a**.
63 könnte aber auch über das entsprechende Triphenylphosphinimin in das Amin **66** überführt werden, das geeignet als Ausgangsverbindung zur Synthese der restlichen Verbindungen **44b-d** erschien.
Schließlich böte das reaktivere Triethylphosphinimin **65** eine interessante Ausgangsposition zur Synthese der gewünschten Substanzen **44a-d**.

58 wurde durch Erhitzen mit Natriumazid in DMF/Wasser auf 110 ° C in 71 %-iger Ausbeute in das Azid **63** überführt. Beim Refluxieren von **58** mit Natriumazid in einem Benzol/Wasser Gemisch unter phasentransferkatalytischen Bedingungen wurde **67** als Hauptprodukt (39 %), **63** als Nebenprodukt (13 %) isoliert. Wurde statt Benzol/Wasser Dichlormethan/Wasser verwendet, so entstand ausschließlich **67** in 78 %-iger Ausbeute.



58 63



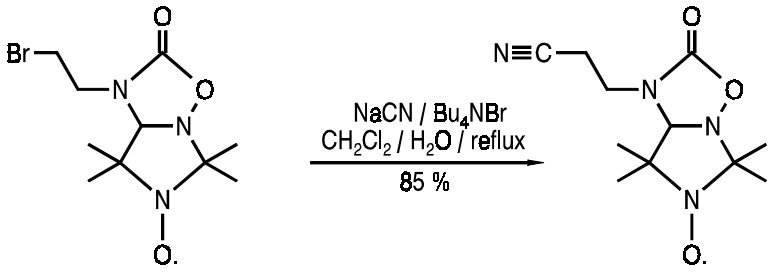


Die Ursache für dieses Reaktionsverhalten liegt wohl in folgendem Gleichgewicht begründet:

Da die Stickstoffwasserstoffsäure eine schwache Säure ist, löst sich Natriumazid in Wasser unter Bildung von undissoziierter Säure und OH^--Ionen. Diese könnten vor allem bei höherer Temperatur in der Lage sein, den Oxadiazolidinonring zu spalten. Durch die Flüchtigkeit der Stickstoffwasserstoffsäure würde das Gleichgewicht vor allem bei höheren Temperaturen ebenfalls in Richtung der Bildung von OH^--Ionen verschoben.

63 wurde in Form eines hellgelben, **67** in Form eines rosa orangen Feststoffes isoliert. Die IR- Daten der beiden Verbindungen finden sich in Tabelle 1.

Bei der Umsetzung von **58** mit Natriumcyanid in Dichlormethan/Wasser unter den zur Synthese von **67** erprobten phasentransferkatalytischen Bedingungen entstand ausschließlich und in hoher Ausbeute (85 %) das Nitril **68**. Es konnte analysenrein dargestellt und charakterisiert werden.



58 **68**

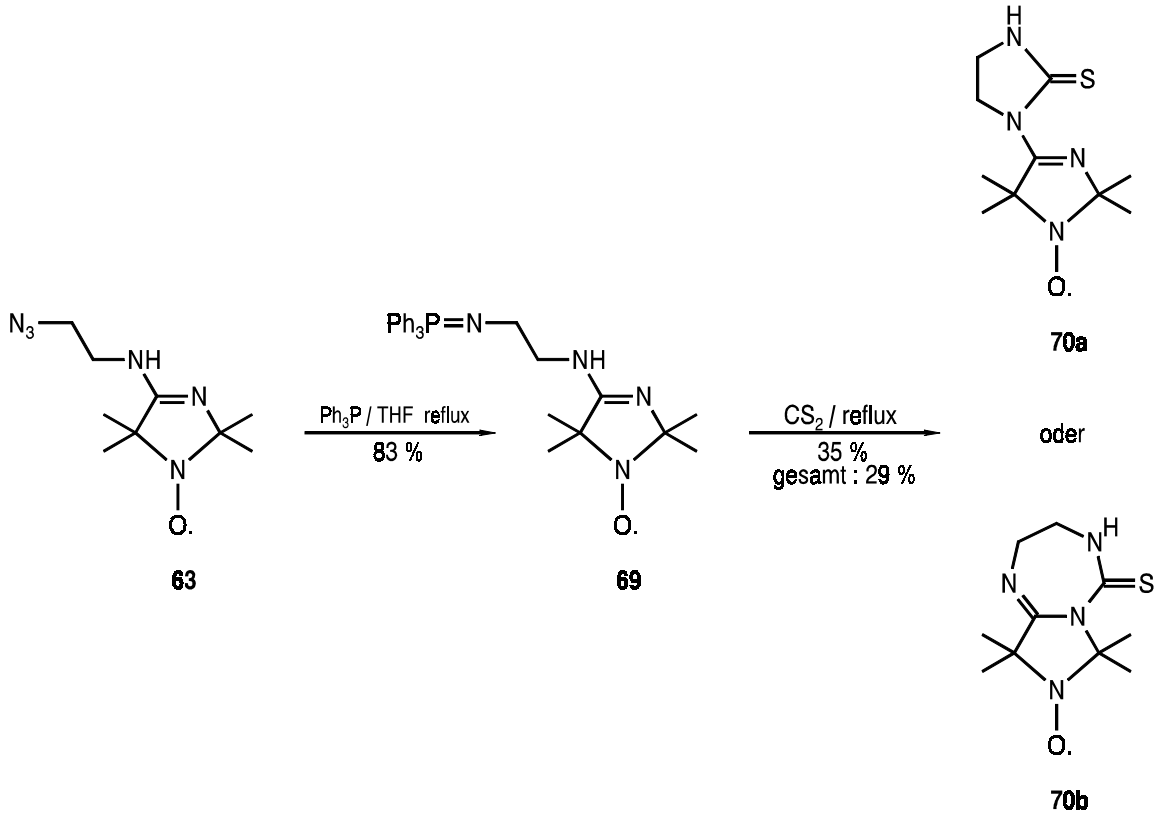
	IR: ν [cm^{-1}]
63	2105 (N_3); 3363, 1627, 1545 (HN-C=N)
67	2100 (N_3); 1757 (C=O)
68	2251 (CN); 1758 (C=O)

Tabelle 1: IR- Daten der Verbindungen **63**, **67** und **68**

Diese Beispiele zeigten deutlich, daß der Oxadiazolidinonring als Schutzgruppe für die Amidingruppe verwendet werden kann. Durch die Wahl der entsprechenden Reaktionsbedingungen war es möglich, die Einführung der gewünschten funktionellen Gruppen unter Erhalt der Schutzgruppe (**58** → **67**, **68**), oder gleichzeitiger Abspaltung (**58** → **63**) zu erreichen. Die Schutzgruppe entstand bei

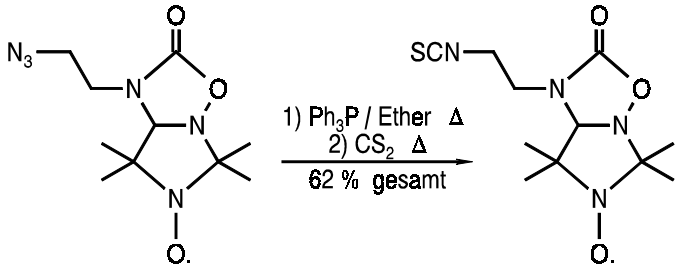
der Synthese der Ausgangsverbindung **58** selbst und mußte nicht in einem weiteren Reaktionsschritt eingeführt werden, was die Synthese insgesamt verkürzte. Besonders wichtig war die Darstellung der Schlüsselverbindung **63**, die nach Literaturdaten aus **25** nicht erhalten werden kann (Berezina et al., 1993). Das Beispiel des Nitrils **68** zeigte, daß mit dieser Schutzgruppentechnik auch andere Nukleophile unter Umgehung der intramolekularen Cyclisierung von **25** in die entsprechenden Amidine bzw. geschützten Amidine eingebaut werden können.

63 wurde mit Triphenylphosphan in THF, und das entstandene Phosphinimin **69** anschließend direkt mit Schwefelkohlenstoff umgesetzt. Es konnte ein zitronengelbes Pulver in 29 %-iger Ausbeute und hoher Reinheit erhalten werden, das im IR-Spektrum keinerlei Spuren einer Isothiocyanatbande aufwies. Am wahrscheinlichsten ist eine unmittelbar auf die Bildung des Isothiocyanates folgende intramolekulare Cyclisierung, die entweder zu einem Fünfring **70a** oder Siebenring **70b** führen sollte.



Aufgrund der niedrigen Wellenzahl der IR-Absorption der C=N Doppelbindung (ν(C=N) = 1581 cm^{-1}) ist anzunehmen, daß die Fünfringstruktur vorlag. Bei vergleichbaren trisubstituierten Amidinen absorbiert die C=N Doppelbindung im Bereich von 1600-1610 cm^{-1}, während für entsprechende Amidine mit exocyclischer Doppelbindung, wie z.B. **33b** (1650 cm^{-1}) oder **26** (1680 cm^{-1}), wesentlich höhere Werte beobachtet werden (Voinov et al., 1992; Berezina et al., 1993), was somit auch für **70b** zu erwarten gewesen wäre.

Bei der Umsetzung von **67** mit Triphenylphosphan in Ether und anschließender Reaktion mit Schwefelkohlenstoff wurde hingegen eine Verbindung gewonnen, deren IR-Spektrum eindeutig auf das Isothiocyanat **71** hinwies. Die charakteristischen IR-Banden waren bei 2201 und 2117 cm^{-1} (N=C=S) und 1754 cm^{-1} (C=O Oxadiazolidinon) zu erkennen. Dies ist ein weiteres Beispiel für die Schutzgruppenfunktion des Oxadiazolidinonrings.

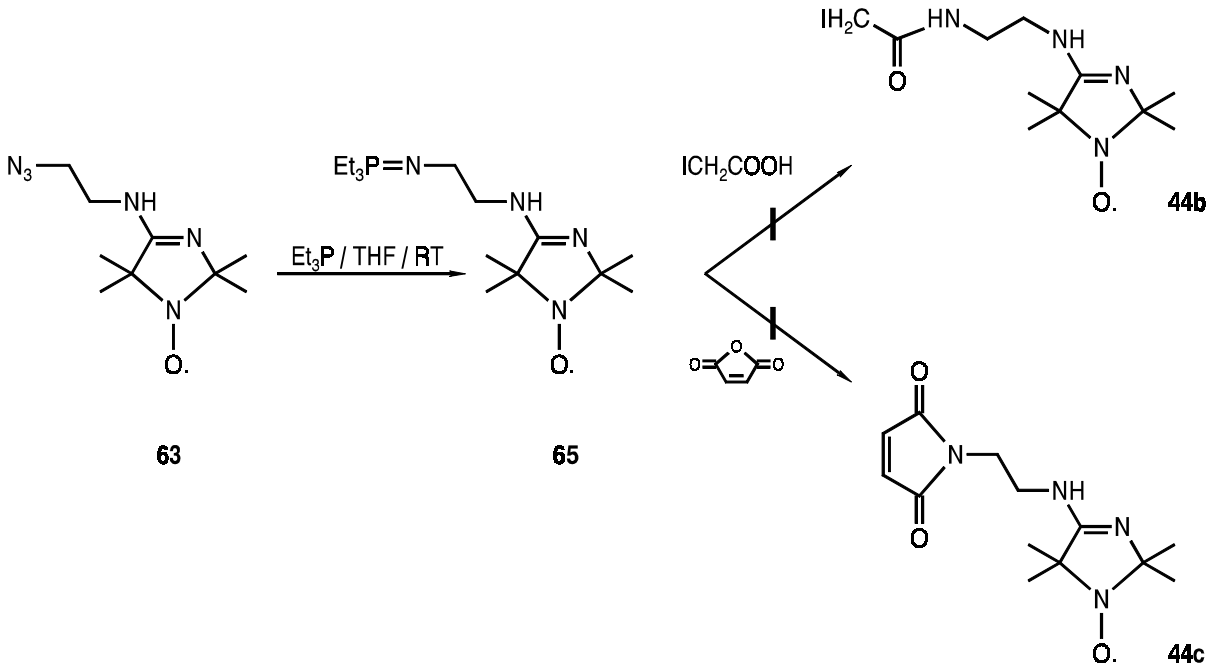


67 **71**

Der eleganteste Weg zur Synthese von **44a**, des entsprechenden Iodacetamids **44b** und des entsprechenden Maleimids **44c** führte über das Triethylphosphinimin **65**. Durch die erhöhte Reaktivität des Triethylphosphinimins gegenüber dem Triphenylphosphinimin sollten die Reaktionen schon unter sehr milden Bedingungen bei Raumtemperatur ablaufen (Staudinger und Meyer, 1919; Staudinger und Hauser, 1921; Garcia et al., 1984; Urpi und Vilarrama, 1986). Unter diesen milden Reaktions-

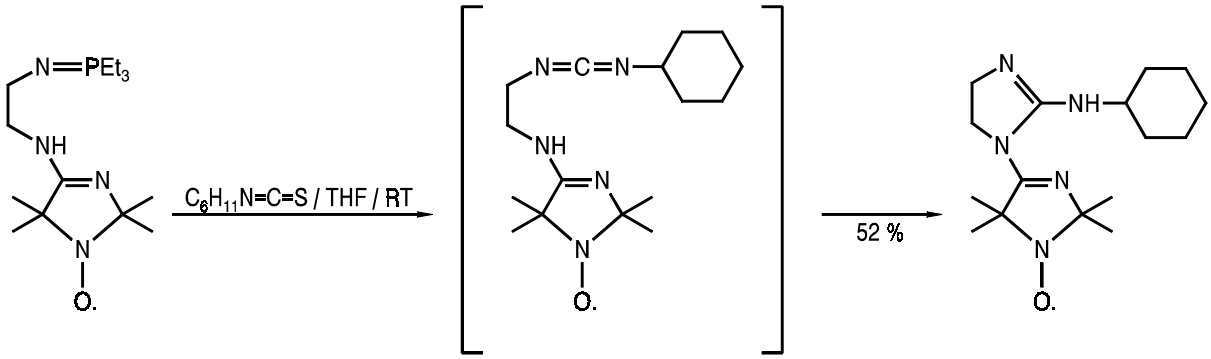
bedingungen bestünde die Chance, die zu erwartende intramolekulare Cyclisierung von **44a-c** zu vermeiden. Dieser Weg böte die Möglichkeit, sämtliche gewünschte Verbindungen in einer Ein-Topf-Reaktion aus **63** zu erhalten.

Zuerst wurde **63** unter Argon mit Triethylphosphan umgesetzt. Zu der entstandenen Lösung von **65** wurde eine Lösung des jeweiligen Reaktionspartners getropft und bei Raumtemperatur bis zur Beendigung der Reaktion weitergerührt.
Die Reaktion mit Iodessigsäure verlief unzufriedenstellend und nicht reproduzierbar. Bei der Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid fand sofort Zersetzung statt unter Bildung teeriger Rückstände.



Die Reaktion mit Cyclohexylisothiocyanat führte zu einem auswertbaren Ergebnis. Es wurde ein gelbes Pulver in 52 %-iger Ausbeute isoliert. Es handelte sich jedoch lediglich um ein Folgeprodukt des Carbodiimids **44a**. Auch hier war die

wahrscheinlichste Erklärung eine intramolekulare Cyclisierung (vgl.die Umsetzung von **69** mit CS_2). Die spektroskopischen Daten deuteten auf das Vorliegen von **72** hin.



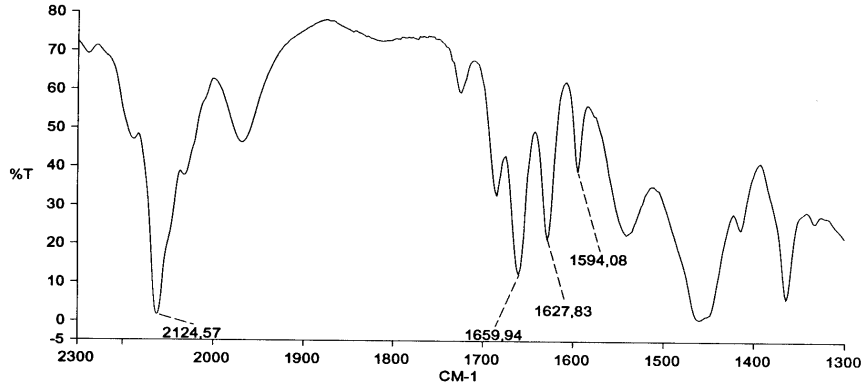
65 **44a** **72**

Im IR-Spektrum waren als charakteristische Absorptionen ν(C=N Guanidin): 1661 und ν(C=N Amidin): 1596 cm^{-1} zu erkennen. Die niedrige Wellenzahl der Absorption der Amidin C=N Doppelbindung deutete wie bei **70a** auf das Vorliegen der Fünfringverbindung hin.

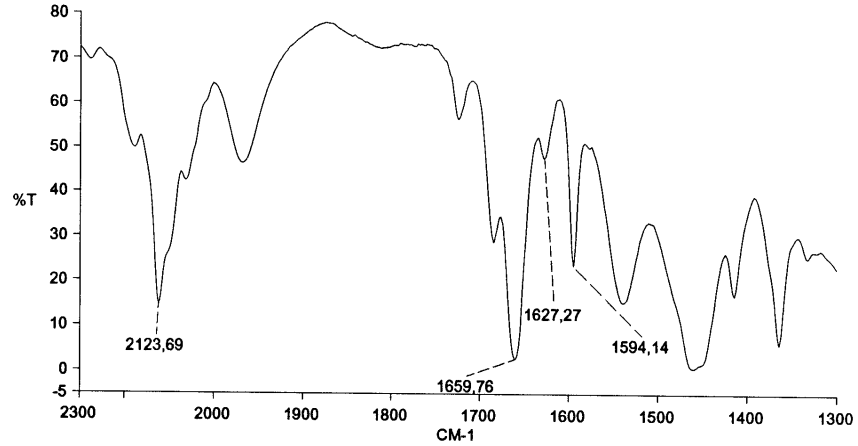
Eine der Reaktionslösung unmittelbar vor der Aufarbeitung entnommene Probe zeigte im IR-Spektrum neben den zu **72** gehörenden Banden auch Absorptionen (ν(N=C=N): 2124 cm^{-1}; ν(C=N Amidin): 1628 cm^{-1}), die auf das Vorliegen von **44a** hinwiesen. Daß es sich um nicht umgesetztes Cyclohexylisothiocyanat handelte, konnte ausgeschlossen werden. Cyclohexylisothiocyanat zeigte in THF-Lösung eine Absorption bei 2102 cm^{-1} für die N=C=S-Gruppe.

Um diese Sachverhalte genauer zu beleuchten, wurde die Reaktion wiederholt und regelmäßig eine Probe IR-spektroskopisch analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 2 dargestellt.

a)



b)



c)

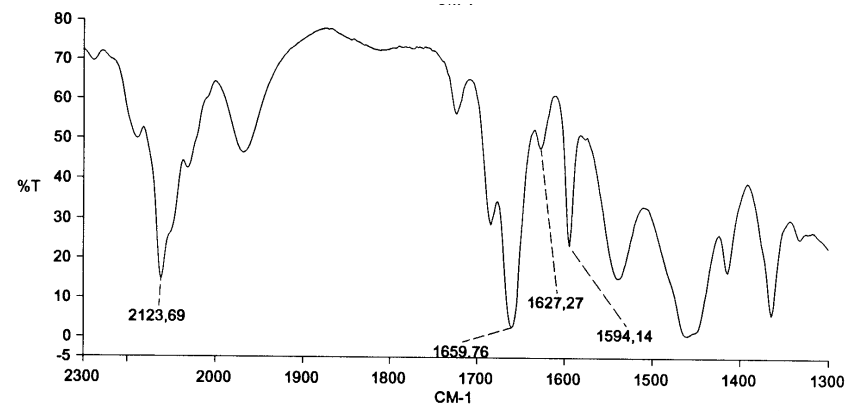
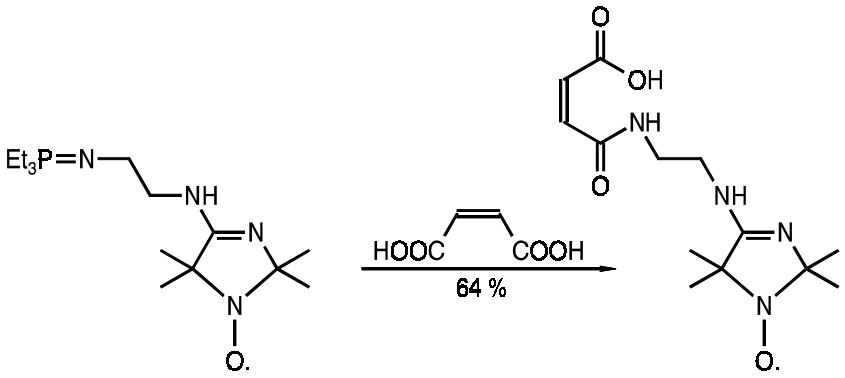


Abb. 2: IR Spektren der Reaktion von **65** mit Cyclohexylisothiocyanat in THF a) nach 10 min, b) nach 2 h, c) nach 6 h Reaktionszeit

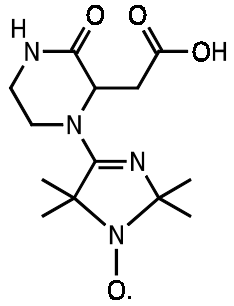
Schon gleich nach der Zugabe des Cyclohexylisothiocyanats lagen **44a** und **72** nebeneinander vor (a). Nach 2 h hatte die Konzentration an **44a** abgenommen (b), was durch die Abnahme der C=N Bande bei ν = 1627 cm^{-1} zu erkennen war. Gleichzeitig war eine Zunahme der C=N Bande von **72** bei ν = 1594 cm^{-1} zu verzeichnen. Nach 6 h bot sich das gleiche Bild (c). Auch die Carbodiimid Absorption hatte nach 2 h leicht abgenommen. Die Schulter bei ν ~ 2100 cm^{-1} rührte von nicht umgesetztem Cyclohexylisothiocyanat her.

Eine in situ bereitete Lösung von **65** wurde mit Maleinsäure umgesetzt. Es konnte ein Rohprodukt erhalten werden, dessen IR-spektroskopische Daten auf das Vorliegen von **73** hindeuteten.



65 **73**

Das rohe **73** wurde in Form einer zähen, klebrigen, gelben Masse erhalten und anhand der IR-Daten identifiziert. Im IR-Spektrum waren die Absorptionen der verschiedenen Carbonylgruppen (ν(COOH): 1731, ν(CONH): 1688 cm^{-1}) gut zuzuordnen. Eine Bande bei 1595 cm^{-1} könnte einerseits von NH-Deformations-schwingungen des Maleinsäureamids herrühren, genausogut aber auch von der C=N-Amidin Doppelbindung des Produktes einer intramolekularen Alkylierung **74**.



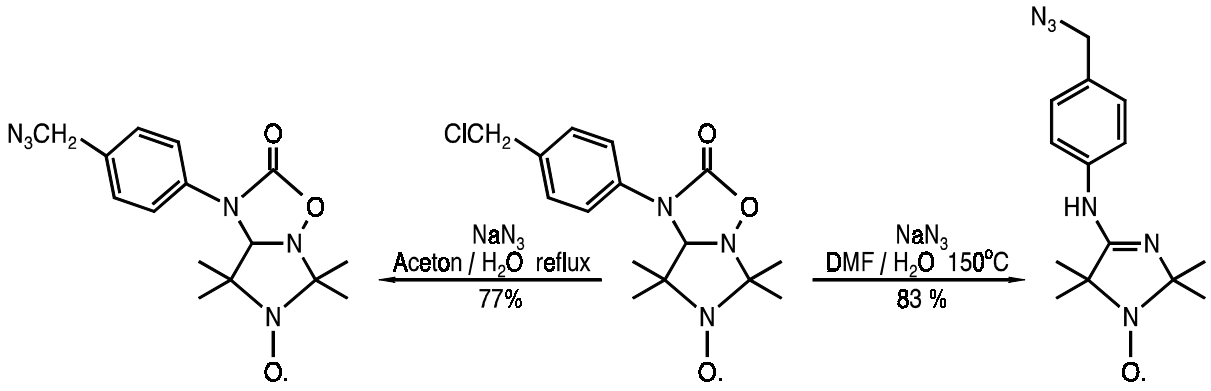
74

Andererseits wies die besagte Bande bei ν ~ 1623 cm^{-1} eine Schulter auf, die sehr gut mit der C=N Absorption eines disubstituierten Amidins oder der C=C Doppelbindung des Maleinsäuremonoamids in Einklang gebracht werden könnte. Den deutlichsten Hinweis auf das Vorliegen von **73** lieferten die beiden Absortionen bei ν = 876 und 864 cm^{-1}, die der out of plane Schwingung eines 1,2 disubstituierten cis-Alkens bei zusätzlicher Konjugation zuzuordnen waren (Hargreaves, Stevenson, 1965). Diese im IR-Spektrum von Maleinsäuremonoamid präsenten Absorptionen fehlen im Spektrum von Bernsteinsäuremonoamid (Wolfs, Desseyn, 1995) und wären somit auch im Spektrum von **74** nicht vorhanden.
Es ist zu erwarten, daß auch die Zielverbindung dieser Synthese, das Maleimid **44c**, nicht unter intramolekularer Cyclisierung reagieren wird. Eine Überprüfung dieser Vermutung war im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr möglich.
72 ist für die Markierung von Proteinen unbrauchbar. Abhilfe könnte hier die Verwendung entsprechender trisubstituierter Amidinverbindungen wie **45a** oder **46a** schaffen, die gegen eine intramolekulare Cyclisierung unempfindlich sein sollten.

3.1.2.3.5. Synthese des Isothiocyanates 77

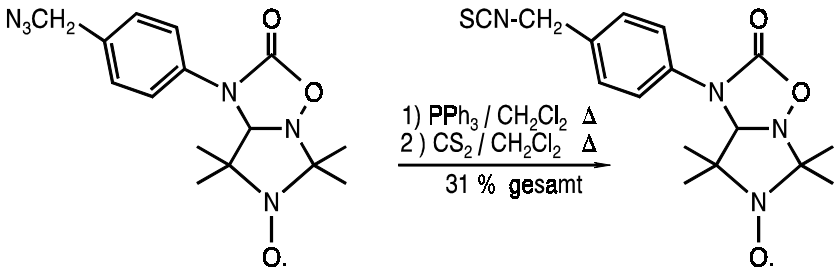
Bei der Umsetzung von **57** mit Nukleophilen wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, wie bei **58**. **57** wurde mit Natriumazid durch Refluxieren in einer Aceton/Wasser

Mischung umgesetzt. Der Oxadiazolidinonring blieb unter diesen Bedingungen erhalten. **75** wurde in 77 %-iger Ausbeute und guter Reinheit gewonnen.
Durch Erhitzen von **57** mit Natriumazid in DMF/Wasser auf 150° C konnte direkt **76** erhalten werden. Die Ausbeute betrug 83 %.



75 **57** **76**

Sowohl **75** als auch **76** konnten in analysenreiner Form dargestellt und charakterisiert werden.
75 wurde in einer Ein-Topf-Reaktion zuerst mit Triphenylphosphan, dann mit Schwefelkohlenstoff zum entsprechenden Isothiocyanat **77** umgesetzt. Die Gesamtausbeute der beiden Schritte betrug 31 %.



75 **77**

77 wurde in guter Reinheit isoliert. Es zeigte die für diese Verbindungsklasse typischen IR-Absorptionen.
In der folgenden Tabelle sind die IR-Daten von **75**, **76** und **77** zusammengestellt:

	IR: ν [cm^{-1}]
75	2097 (N_3); 1754 (C=O)
76	2094 (N_3); 3312, 1637, 1547 (HN-C=N)
77	2181, 2102 (N=C=S); 1753 (C=O)

Tabelle 2: IR – Daten der Verbindungen **75**, **76** und **77**

Mit den Verbindungen **76** und **77** konnte eine gute Ausgangsbasis zur Synthese der Verbindungen **40a-d** geschaffen werden. Eine weitere Bearbeitung dieses Reaktionsweges war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

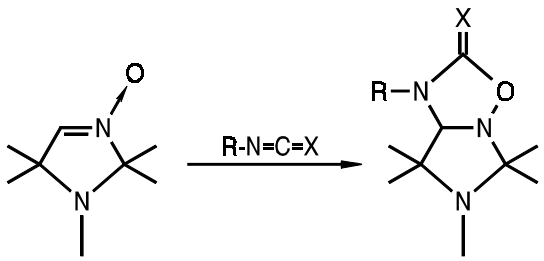
3.1.2.4. Darstellung von 4-N,N-R,R'-Amino-3-imidazolinen

3.1.2.4.1. Allgemeines

Alle in dieser Arbeit bisher behandelten Amidin SL-Verbindungen trugen zwei Substituenten an der Amidingruppe. Es sind bisher aber auch einige trisubstituierte Amidin SL-Verbindungen dargestellt worden (**26**, **33a**, **33b**). Allen gemeinsam ist, daß sie gegenüber vergleichbaren disubstituierten Verbindungen wesentlich höhere pK_a-Werte aufweisen (Voinov et al., 1992; Berezina et al., 1993). Ein guter Grund, um auch in dieser Arbeit zu versuchen, spezifische Spin-Marker dieses Typs darzustellen. Ein anderer Vorteil dieser Verbindungen gegenüber den disubstituierten liegt in der tertiären Struktur der Amidingruppe. Solche Amidine sollten der intramolekularen Acylierung, wie für **70a** und **72** beobachtet, nicht zugänglich sein.

3.1.2.4.2. Umsetzung von 27 mit Isocyanaten und Isothiocyanaten und Spaltung der entstandenen Cycloaddukte zu den entsprechenden Amidinen

Um auch bei den pK_a-Werten der trisubstituierten SL-Amidine eine große Variationsbreite zu erreichen, wurden verschiedene Grundkörper durch Reaktion von **27** mit einem Überschuß an entsprechendem Isocyanat oder Isothiocyanat bei Raumtemperatur in Di- oder Trichlormethan synthetisiert.
30a und **30b** wurden nach Literaturvorschrift (Voinov et al., 1992) erhalten. Auch die noch nicht beschriebenen Cycloaddukte **78**, **79** und **80** wurden in guter Ausbeute dargestellt und charakterisiert.



27

78 : R = $Br(CH_2)_2$ X = O 68 %
79 : R = 4-Cl-C_6H_4 X = O 98 %
80 : R = 4-MeO-C_6H_4 X = S 73 %

Die Oxadiazolidinone zeigten wie ihre radikalischen Analoga eine sehr starke IR-Absorption bei ν ~ 1750 cm^{-1}, die der Absorption der Carbonylgruppe zuzuordnen ist. Die Oxadiazolidinthione zeigen keine Bande in diesem Bereich (Voinov et al., 1992). Aufgrund der thermischen Labilität des Oxadiazolidinthionringes (Abspaltung von COS unter Bildung der entsprechenden Amidine) werden im IR-Spektrum immer auch die Banden der entsprechen Amidine beobachtet. Das wurde auch für **80** bestätigt.

Im Unterschied zu den vergleichbaren Radikalen findet man noch die N-CH_3 Bande bei ν ~ 2800 cm^{-1} .

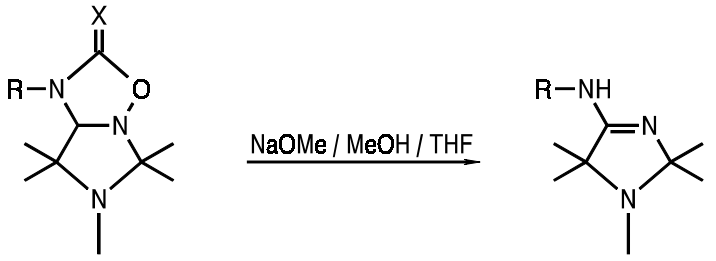
In den ^{1}H-NMR-Spektren beobachtet man im allgemeinen folgenden Signale:
alle vier geminalen CH_3-Gruppen liefern unterschiedliche Signale. Die N-CH_3 Protonen treten bei 2,2-2,3 ppm, das H-Atom an C-3a bei tieferem Feld bei 5-5,5 ppm in Resonanz. Die genauen Daten sind aus Tabelle 3 ersichtlich.

	IR: ν [cm^{-1}]	^{1}H-NMR (400 MHz) δ [ppm]
78	2818, 2796 (N-CH_3); 1752 (C=O)	5,01 (s, 1 H, CH); 4,09 –3,31 (4 m, je 1 H, CH_2-CH_2); 2,24 (N-CH_3); 1,39-1,07 (4 s, je 3 H, gem-CH_3)

79	2810, 2791 (N-CH_3); 1746 (C=O)	7,49 (m, 4 H, Aryl-H); 5,55 (s, 1 H, CH); 2,33 (s, 3 H, N-CH_3); 1,50-1,00 (4 s, je 3 H, gem-CH_3)
80	s. S. 131	7,25 (m, 4 H, Aryl-H, 5,45 (s, 1 H, CH); 3,82 (s, 3 H, OCH_3); 2,27 (s, 3 H, N-CH_3); 1,51-1,08 (4 s, je 3 H, gem-CH_3)

Tabelle 3: spektroskopische Daten von **78**, **79** und **80**

Die Amidine **81** und **82** ließen sich durch Spaltung des Oxadiazolidinthion- bzw. Oxadiazolidinonringes mit Natriummethylat in einer Mischung aus Methanol und THF gewinnen. Die Ausbeuten lagen bei ca. 90 %, und die Substanzen konnten analysenrein erhalten und vollständig charakterisiert werden.



79 : R = 4-Cl-C_6H_4 X = O
80 : R = 4-MeO-C_6H_4 X = S

81 : R = 4-Cl-C_6H_4 89 %
82 : R = 4-MeO-C_6H_4 87 %

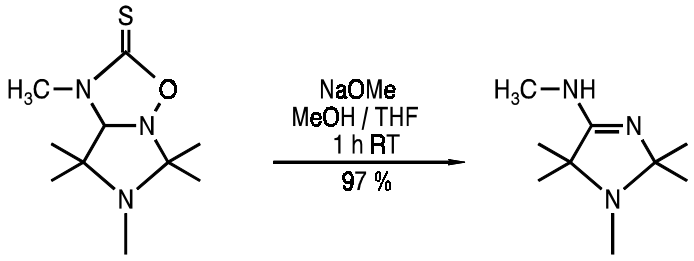
Die IR-Daten wiesen die für diesen Verbindungstyp charakteristischen Absorptionen auf (Tabelle 4). Im ^{1}H-NMR beobachtete Verbreiterungen verschiedener Signale waren durch die Amidintautomerie bedingt.

	IR: ν [cm^{-1}]	^{1}H-NMR (400 MHz) δ [ppm]
81	3392, 1639, 1539 (HN-C=N); 2841 (OCH_3); 2803 (N-CH_3)	7,18 (m, 4 H, Aryl-H); 5,60 und 4,91 (br, je 0,5 H, NH); 3,76 (s, 3 H, OCH_3); 2,33 (s, 3 H, N-CH_3); 1,28 (br, s, 12 H, gem-CH_3)
82	3418, 3316, 1644, 1534 (HN-C=N); 2805, 2785 (N-CH_3)	7,49 (m, 4 H, Aryl-H); 6,85 und 5,89 (br, je 0,5 H, NH); 2,37 (s, 3 H, N-CH_3); 1,32 (br, s, 12 H, gem-CH_3)

Tabelle 4 : spektroskopische Daten von **81** und **82**

Die Ausbeute bei der Synthese von **30b** aus dem Cycloaddukt **28b** konnte gesteigert werden, indem der Oxadiazolidinthion-Ring nicht thermisch, wie in der Literatur beschrieben (Voinov et al., 1992), sondern durch Einwirken von Natriummethylat in Methanol/THF Mischung vorgenommen wurde. Die Ausbeute betrug 96 % gegenüber 60 % beim thermischen Verfahren. Das so erhaltene Produkt konnte sofort für weitere Umsetzungen genutzt werden. Das auf thermische Art und Weise gewonnene Produkt war oft stark mit rotbraunen, kautschukartigen

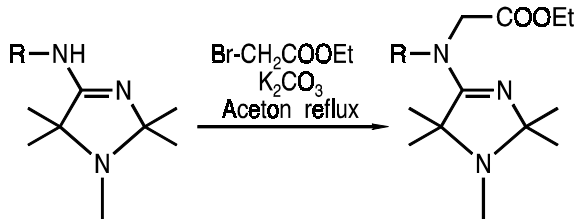
Zersetzungsprodukten verunreinigt und mußte teilweise unter Zeit- und Substanzverlust aufgereinigt werden.



28b **30b**

3.1.2.4.3. Alkylierung der disubstituierten Amidine 30b und 82 mit Bromessigsäureethylester

30a ist bereits erfolgreich mit Bromessigsäureethylester alkyliert worden (Voinov, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Alkylierung konnte unter den gleichen Bedingungen für **30b** und **82** nachvollzogen werden. Hierzu wurden **30b** und **82** in Aceton mit einem fünffachen Überschuß an Bromessigsäureethylester unter Einwirkung von Kaliumcarbonat als Base refluxiert. Die benötigte Reaktionszeit war für **82** mit ca. 9 h viel kürzer, als zur Darstellung von **31** (60-70 h Reaktionszeit). Offenbar erhöht die elektronenschiebende Methoxygruppe die Nukleophilie der Amidingruppe in **82**. Die Ausbeute betrug 80 %.
Bei der Darstellung von **30b** lief die Reaktion unter erheblicher Bildung brauner Zersetzungsprodukte ab. Die Reaktionsbedingungen wurden variiert. Ein Ausbeuteoptimum von ~26 % wurde bei einer Reaktionszeit von 5 h erreicht. Ob eine Ausbeutesteigerung durch weitere Variation der Reaktionsbedingungen möglich wäre, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.



30b	R = Me	**84**	R = Me	26 %
82	R = 4-MeO-C_6H_4	**83**	R = 4-MeO-C_6H_4	80 %

83 wurde als niedrig schmelzender, farbloser, kristalliner Feststoff in 80 %-iger Ausbeute isoliert. Das rohe **84** lag nach der Aufarbeitung mittels PSC in Form eines leicht bräunlichen Öls vor. Durch eine weitere PSC konnte ein Produkt erhalten werden, dessen spektroskopische Daten mit der Struktur von **84** gut in Einklang gebracht werden konnten.

83 und **84** zeigten sehr ähnliche IR-Absorptionen (Tabelle 5). Die Absorption der C=N Doppelbindung der Amidingruppe erfolgte bei beiden Vertretern bei ν ~ 1610 cm^{-1}. Dieser Wert ist in sehr guter Übereinstimmung mit dem für **32a** beobachteten (ν(C=N): 1605 cm^{-1}; Voinov et al., 1992), was für eine selektive Alkylierung der Amidingruppe am exocyclischen N-Atom spricht (zum Vgl.: **32b**: ν(C=N) = 1650 cm^{-1}).

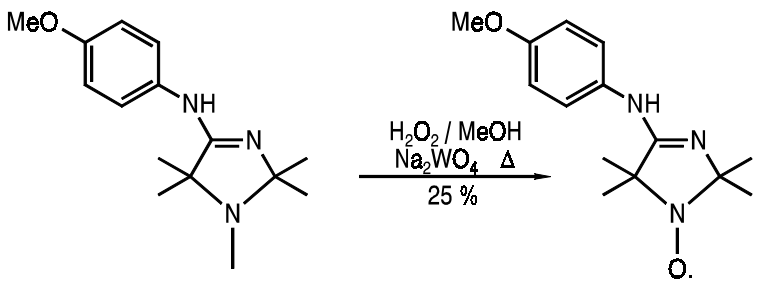
83 und **84** ergaben einfache ^{1}H-NMR-Spektren. Die Werte für die einzelnen Absorptionen sind in Tabelle 5 aufgelistet.

	IR: ν [cm^{-1}]	^{1}H-NMR (400 MHz) δ [ppm]
83	1750 (C=O); 1611 (C=N)	7,08 (m, 4 H, Aryl-H); 4,29 (s, 2 H, CH_2); 4,15 (q, 2 H, O-C*H*$_2$-CH_3); 3,80 (s, 3 H, O-CH_3); 2,19 (s, 3 H, N-CH_3); 1,26 (t, 3 H, O-CH_2-C*H*$_3$); 1,23 und 0,91 (s, 6 H, gem-CH_3)
84	2802 (N-CH_3); 1748 (C=O), 1612 (C=N)	4,16 (q, 2 H, O-C*H*$_2$-CH_3); 4,07 (s, 2 H, CH_2); 3,02 (s, 3 H, 4-N-CH_3); 2,25 (s, 3 H, 1-N-CH_3); 1,24 (t, 3 H, O-CH_2-C*H*$_3$); 1,28 und 1,20 (s, 6 H, gem-CH_3)

Tabelle 5: spektroskopische Daten von **83** und **84**

3.1.2.4.4. Oxidation von 82 zum entsprechenden Radikal 85

Das bisher noch nicht beschriebene Amidinradikal **85** wurde durch Oxidation von **82** mit Wasserstoffperoxid in Methanol unter Einwirkung von EDTA und Natriumwolframat bei erhöhter Temperatur (~50° C) als Rohprodukt erhalten. Die Ausbeute betrug 25 %.

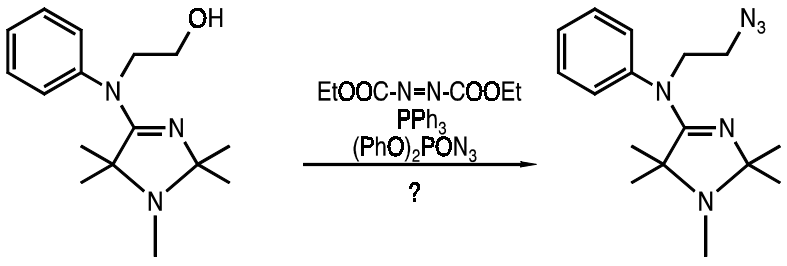


82 **85**

Als charakteristische IR-Absorptionen wurden ν(OMe) bei 2836 cm^{-1} und ν(NH-C=N) bei 3312; 1630 und 1553 cm^{-1} beobachtet.
Für **85** wurde mittels ESR ein pK_a-Wert von 4,8 ± 0,1 ermittelt (s.S. 146).

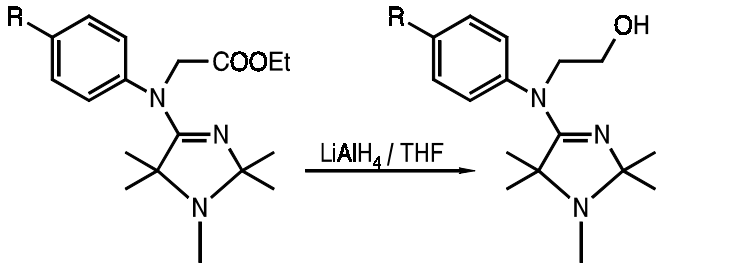
3.1.2.4.5. Versuch der Darstellung von 42a-d

Bei der Planung der Synthese der Zielmoleküle führte der eleganteste Weg wie schon bei den disubstituierten Verbindungen über die entsprechenden Alkylazide. Außerdem ist die Azidogruppe potentiell stabil gegenüber den Reaktionsbedingungen, die zur Oxidation der N-CH_3-Gruppe nötig sind. Die gewünschten Azide sollten nach folgendem Syntheseschema zugänglich sein:
R-COOEt $\rightarrow$ R-CH_2OH $\rightarrow$ R-CH_2-N_3.
Als Reduktionsmittel für die Estergruppe sollte Lithiumaluminiumhydrid dienen. Die Möglichkeit der direkten Überführung der Hydroxy- in die Azidogruppe mittels DPPA/ Triphenylphosphan/Azodicarbonsäurediethylester (DEADCAT Reaktion; vom Akronym für diethylazodicarboxylate) ist in der Literatur beschrieben (Lal et al., 1977). Die Anwendung dieses Verfahrens auf **86** sollte die Synthese von **88** ermöglichen.



86 **88**

Zunächst mußte der Alkohol **86** aus dem entsprechenden Ester **31** gewonnen werden. Die Reduktion von **31** wurde mit Lithiumaluminiumhydrid in THF bei Raumtemperatur erreicht. **86** wurde in 82 %-iger Ausbeute erhalten. Auf die gleiche Weise wurde aus **83** der Alkohol **87** dargestellt. Die Ausbeute betrug 85 %.



31 : R = H
83 : R = MeO

86 : R = H 82 %
87 : R = MeO 85 %

Beide Alkohole wurden als kristalline, farblose Feststoffe in analysenreiner Form erhalten und vollständig charakterisiert.
Die wichtigsten spektroskopischen Daten sind in Tabelle 6 dargestellt.

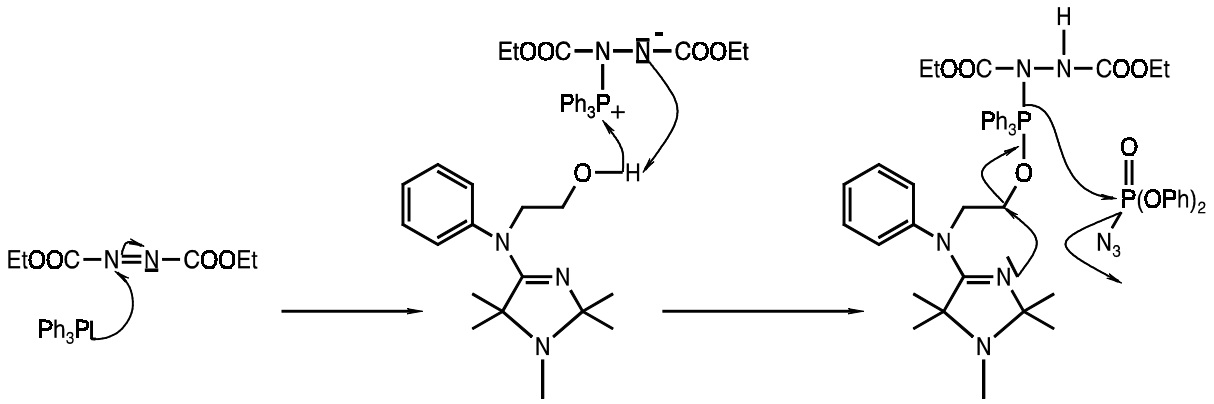
	IR: ν [cm^{-1}]	^{1}H-NMR (400 MHz) δ [ppm]
86	3206 (OH); 2806 (N-CH_3); 1605 (C=N)	7,46 – 7,31 (m, 5 H, Aryl-H); 3,80 (m, 4 H, CH_2-CH_2); 2,25 (s, 3 H, N-CH_3); 1,32 und 0,94 (s, 6 H, gem-CH_3)
87	3163 (OH); 2804, 2786 (N-CH_3); 1611 (C=N)	7,01 (m, 4 H, Aryl-H); 3,81 (s, 3 H, O-CH_3); 3,77 (s, 4 H, CH_2-CH_2); 2,19 (s, 3 H, N-CH_3); 1,27 und 0,89 (s, 6 H, gem-CH_3)

Tabelle 6: spektroskopische Daten von **86** und **87**

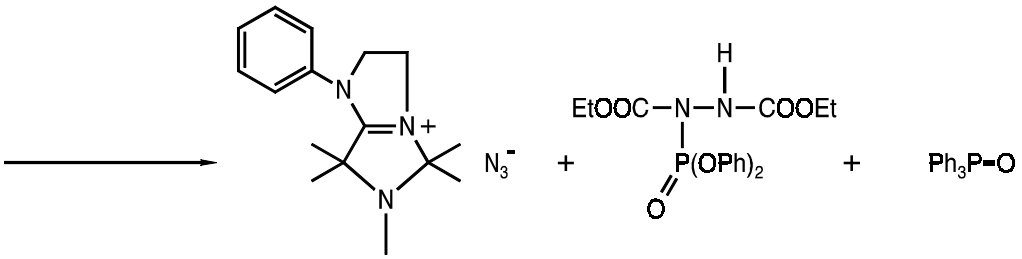
86 wurde mit dem System DPPA/Triphenylphosphan/Azodicarbonsäurediethylester umgesetzt. Es resultierte ein farbloses Öl in 74 %-iger Ausbeute. Die NMR-Daten könnten durchaus der Verbindung **88** zugeordnet werden. Die Absorption der C=N-Doppelbindung der Amidingruppe lag mit ν = 1634 cm^{-1} ungewöhnlich hoch. Ein vergleichbarer Wert wurde für Amidine dieser Art bisher nur für das Salz **32c** beobachtet (Voinov et al., 1992: ν(C=N = 1625 cm^{-1})). Die Azidogruppe absorbierte mit ν = 2023 cm^{-1} bei einem ungewöhnlich niedrigen Wert. Werte in diesem Bereich werden nur für ionische Azide beobachtet (ν ~ 2050 cm^{-1}, unabhängig vom Kation), für kovalente findet man höhere Werte (ν ~ 2100 cm^{-1}) (Treinin, 1971). Auch war nach zweimaliger PSC an neutralem Aluminiumoxid die Azidobande komplett verschwunden. Es war indes eine starke, breite Absorption im OH-Bereich zu beobachten. Offenbar hatte bei der PSC ein Ionentausch (OH^- gegen N_3^-)

stattgefunden. Als Quelle für die OH^- - Ionen kamen Wasserspuren im Eluens oder am Trennmaterial adsorbiertes Wasser in Frage.

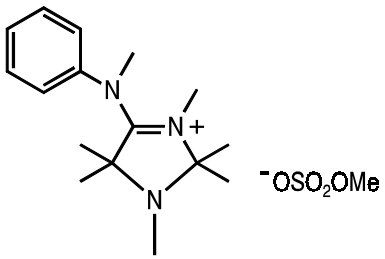
Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, daß eine intramolekulare Cyclisierung unter Bildung des quartären Amidiniumsalzes **88a** stattgefunden hatte.



86



88a

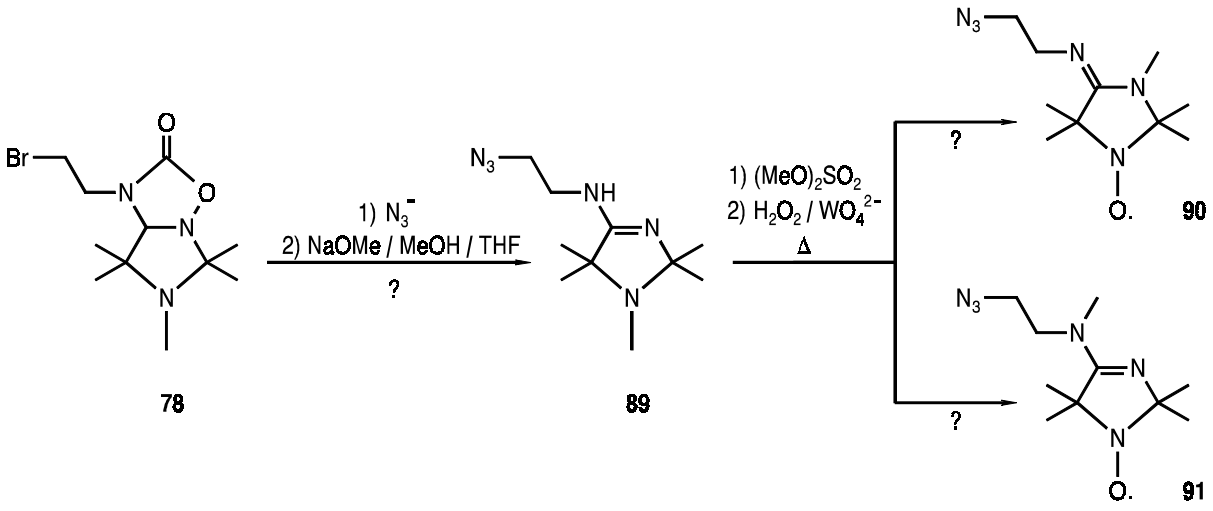


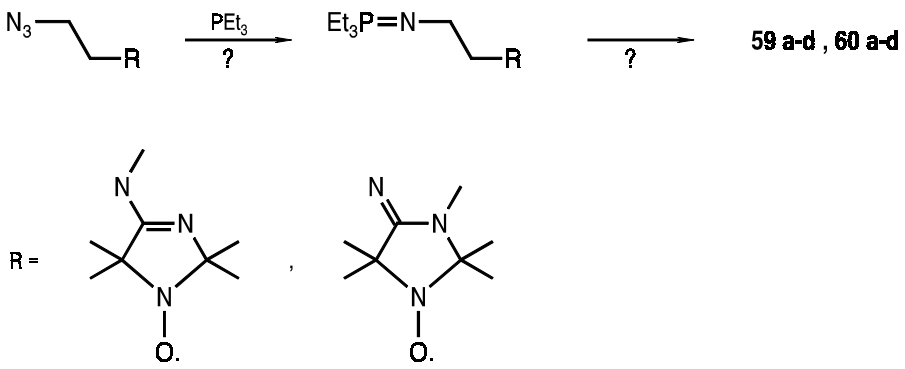
32c

Das entstandene quartäre Amidiniumsalz **88a** war für weitere Umsetzungen zu brauchbaren SL-Verbindungen nicht geeignet.

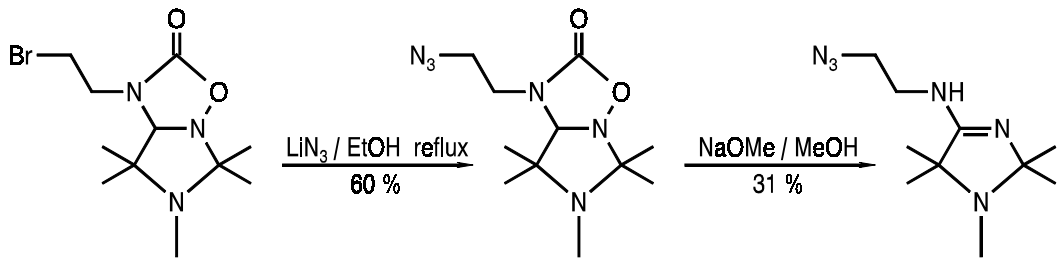
3.1.2.4.6. Versuch der Darstellung von 45a-d und 46a-d

Bisher ist nur eine einzige trisubstituierte aliphatische Amidin-SL-Verbindung **26** bekannt (Berezina et al., 1993). Zur Synthese spezifisch reagierender Spin-markierter Verbindungen ist sie jedoch unbrauchbar.
Am interessantesten wären Verbindungen mit monocyclischer Radikaleinheit, wobei die funktionelle Gruppe zur Bindung an das Protein an einer aliphatischen Seitenkette lokalisiert ist.
Erfolg verspräche hier eine Vorgehensweise in Analogie zur Synthese von **44a-d**, nur daß noch ein Alkylierungs- und ein Oxidationsschritt zusätzlich erforderlich wäre. Die Planung ist in dem folgenden Schema kurz skizziert:





Als Ausgangverbindung kam **78** in Frage, das wie weiter oben beschrieben erhältlich war (s. **3.1.2.4.2.**). Daraus wurde **92** durch Refluxieren mit Lithiumazid in wasserfreiem Ethanol in 60 %-iger Ausbeute erhalten. Die anschließende Spaltung des Oxadiazolidinonringes mit Natriummethylat in Methanol ergab **89**.



78 **92** **89**

92 bildete farblose Kristalle, **89** wurde als Rohprodukt in Form eines farblosen Öls erhalten. Die NMR- und IR-Spektren zeigten die erwarteten Signale bzw. Banden. Die spektroskopischen Daten sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

	IR: ν [cm^{-1}]	^{1}H-NMR (400 MHz) δ [ppm]
89	2806 (N-CH_3); 2102 (N_3); 3312, 1634, 1548 (HN-C=N)	3,50 (m, 4 H; CH_2-CH_2); 2,28 (s, 3 H, N-CH_3); 1,26 und 1,20 (2 s, je 6 H, gem-CH_3)
92	2789 (N-CH_3); 2097 (N_3); 1748 (C=O)	4,93 (s, 1 H, CH); 4,00 – 2,95 (m, 4 H, CH_2-CH_2); 2,30 (s, 3 H, N-CH_3); 1,43 – 1,10 (4 s, je 3 H, gem-CH_3) *

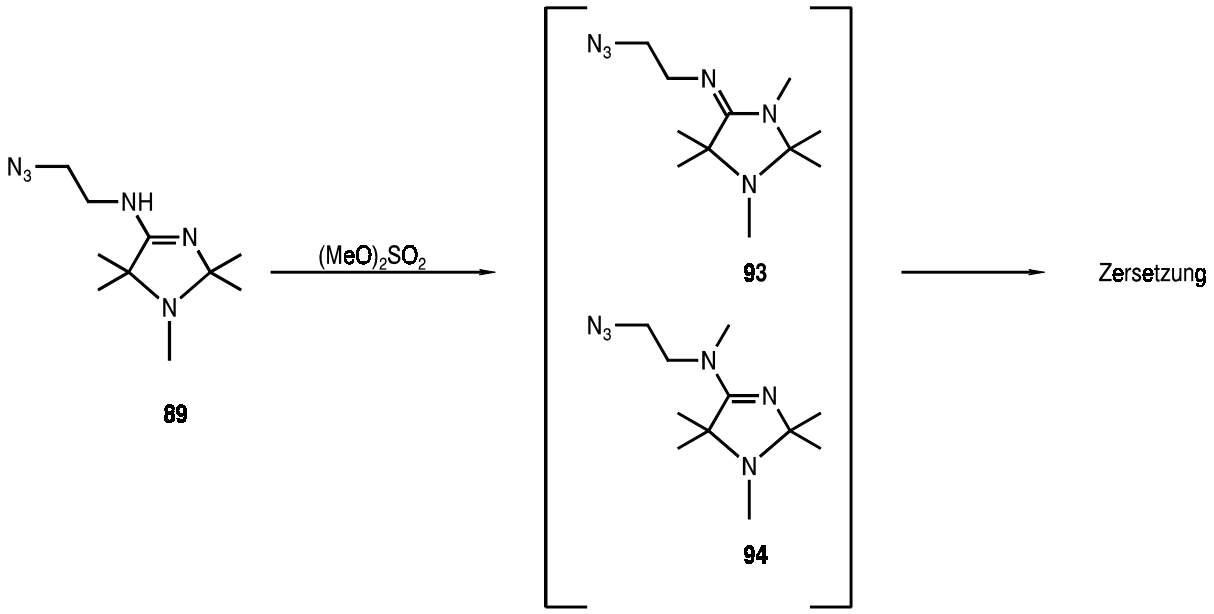
Tabelle 7: spektroskopische Daten von **89** und **92**

* 90 MHz

Die Alkylierung von **89** mit Dimethylsulfat in Aceton unter Einwirkung von Kaliumcarbonat ergab neben nicht umgesetzter Ausgangsverbindung nur ein bräunliches Öl mit $R_f = 0$, bei dem es sich höchstwahrscheinlich um ein Zersetzungsprodukt handelte

Es konnte kein Hinweis auf das Entstehen eines der monoalkylierten Produkte erhalten werden. Die Alkylierung der trisubstituierten Amidine **93** und **94** fand offensichtlich so schnell statt, daß sie nicht gefaßt werden konnten.

Somit ist dieser Weg nicht geeignet, um trisubstituierte Amidin SL-Verbindungen zu synthetisieren.


N3
NH
N
N
89
(MeO)2SO2
N3
N
N
N
93
N3
N
N
N
94
Zersetzung

3.2. pH-Titrationen mit Hilfe der ESR-Spektroskopie

Die pH-Titrationen mit Hilfe der ESR-Spektroskopie erfolgten in Anlehnung an eine Literaturmethode (Khramtsov et al., 1985b). Stammlösungen der zu messenden Verbindungen typischerweise in Acetonitril oder Methanol wurden so zu 10 mM Pufferlösungen gegeben, deren pH-Wert zuvor mittels eines pH-Meters genau eingestellt worden war, daß die Endkonzentration an Radikal 10^{-4} M war (s.S.146). In Abbildung 3 ist eine Auswahl von Spektren von **39d** bei verschiedenen pH-Werten dargestellt:

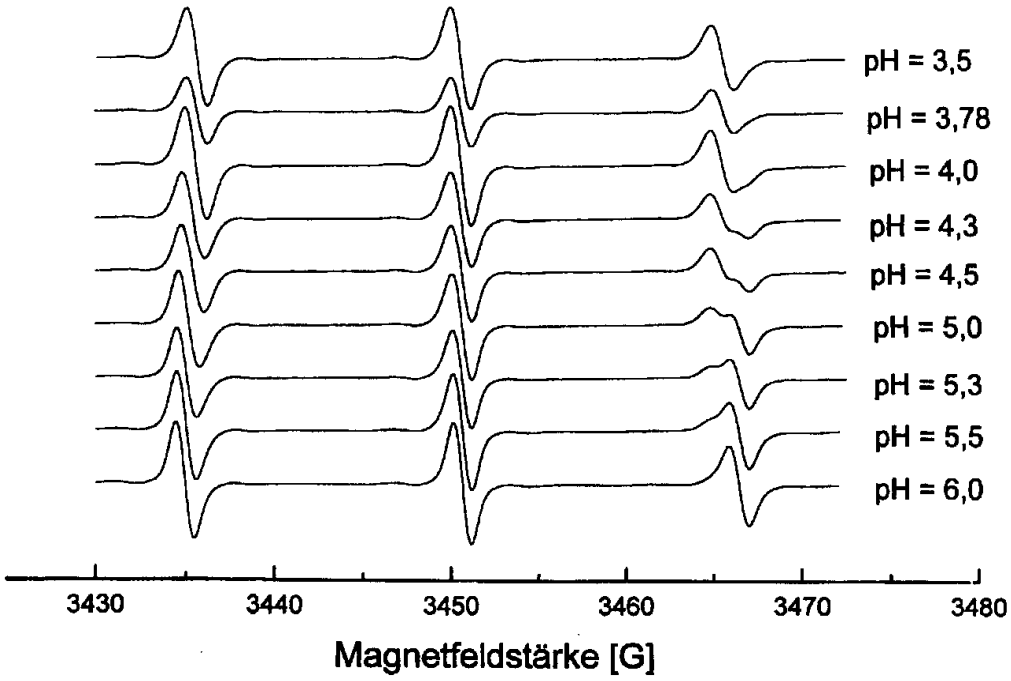


Abb. 2 : ESR-Spektren von **39d** bei verschiedenen pH-Werten
Spektrometereinstellungen: receiver gain: $8 \cdot 10^3$; conversion time und time constant: jeweils 40,96 ms; center field: 3451 G; sweep width: 78 G

Die hier angewandte Methode zur Abschätzung der pK_a-Werte ist auf S. 146 näher beschrieben. Für **38d** ergab sich ein pK_a-Wert von 3,1 ± 0,1. Für **39d** wurde ein pK_a-Wert von 4,75 ± 0,25 und für **85** pK_a = 4,8 ± 0,1 ermittelt.
Der pK_a-Wert von **38a** war für Studien an *E. coli* F_o zu niedrig. Für Asp7 und Asp44 wurden in dem zur NMR-Bestimmung der pK_a-Werte verwendeten Lösungsmittelgemisch aus $CDCl_3$/MeOD/D_2O, das in der Literatur als membranähnliche Umgebung erachtet wird, um ~ 1½ pH-Einheiten höhere pK_a-Werte gefunden (pK_a-Wert der β-COOH-Gruppe des Aspartats in wasserlöslichem Kurzpeptid Gly-Gly-Asp-Ala: pK_a = 4,0 in Wasser; pK_a = 5,4 in $CDCl_3$/MeOD/D_2O), für Asp61 sogar pK_a = 7,1 (Assadi-Porter und Fillingame, 1995). Dies ist verständlich, da in einer hydrophoben Umgebung die ungeladene (COOH) Form begünstigt ist, also leichter gebildet wird. Für die Amidin- bzw. Imidazolidinradikale ist genau das Umgekehrte zu erwarten. Die Bildung der protonierten Form sollte aufgrund der Bildung eines geladenen Teilchens in einer hydrophoben Umgebung erschwert sein, d.h. der pK_a-Wert sollte sogar noch niedriger liegen, als im wäßrigen Milieu.

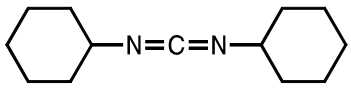
Der pK_a-Wert von **85** war trotz der elektronenschiebenden Methoxygruppe sogar noch niedriger, als der von **24a** (mit R = Ph: pK_a = 5,0 (Berezina et al, 1993)).
Eine wahrscheinliche Erklärung ist, daß die Methoxygruppe zwar die Nukleophilie, aber nicht die Basizität der Amidingruppe erhöht. Die Methoxyphenylgruppe (z.B.in **85**) besitzt also gegenüber der Phenylgruppe (z.B. in **24a** (R = Ph)) in Bezug auf den pK_a-Wert keinerlei Vorteile.

Erwartungsgemäß zeigte die als Vergleichsprobe für das Carbodiimid **47a** herangezogene Verbindung **53** im untersuchten Intervall von pH = 3 bis pH = 7 keine pH-Sensitivität im ESR-Spektrum. Die Pyrrolidin-SL Verbindungen eignen sich also als pH-unabhängige Vergleichsproben.

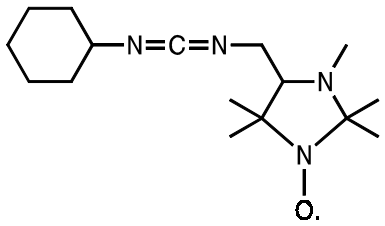
3.3. Reaktion der Carbodiimide 38a, 39a und 47a mit *E. coli* F_o

3.3.1. Prüfung der Bindungsspezifität mit Fluoreszenzquench Assays

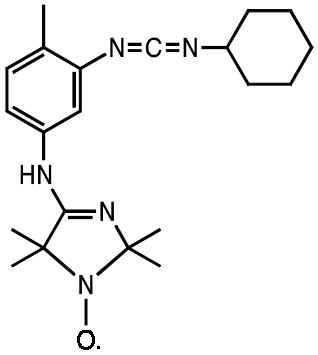
Zum Nachweis der spezifischen Bindung der Carbodiimide an Asp61 der c-Untereinheit von F_o stehen zwei biochemische Assays zur Verfügung.
Der erste nutzt die Inhibierung der passiven Protonentranslokation durch F_o in von F_1 befreiten *E. coli* Zellmembran Vesikeln. Da die Vesikel noch die Atmungskette enthalten, können die Enzyme der Atmungskette durch Oxidation von NADH Protonen ins Innere der Vesikel pumpen. Ist die passive Protonentranslokation durch F_o durch spezifische Bindung eines Carbodiimids an Asp61 der c-Untereinheit inhibiert, so baut sich ein Protonengradient auf, der indirekt mit dem Acridin-Orange Fluoreszenzquench Assay beobachtet werden kann (Perlin et al., 1984).
Im zweiten Test wird der Einfluß der Bindung eines Carbodiimids an c-Asp61 auf die aktive Protonentranslokation beobachtet. Die mit Carbodiimid gelabelten F_1-befreiten F_o-Membranvesikel werden mit *E. coli* F_1 rekonstituiert (Wise und Senior 1985). Ist das Carbodiimid spezifisch gebunden, so wird der durch ATP-Hydrolyse getriebene Protonentransport inhibiert. Somit kann kein Protonengradient aufgebaut werden, was sich im Acridin Orange Fluoreszenzquench Assay nachweisen läßt.
Neben 1 als Vergleichsprobe wurden folgende neu synthetisierte Verbindungen auf diese Weise untersucht:



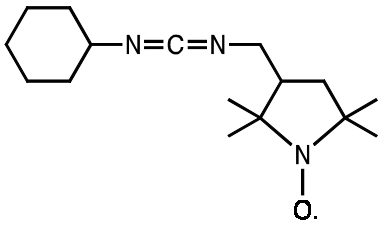
1



38a



39a



47a

3.3.1.1. Inhibierung der passiven Protonentranslokation

Die F_o enthaltenden Membranvesikel-Suspensionen wurden mit 200 µM Carbodiimid 45 min bei 30 ° C inkubiert. Nach Zugabe von Acridin-Orange Lösung stieg die Fluoreszenz stark an (1). Die Zugabe von NADH Lösung (2) führte zu einem geringfügigen Quench der Fluoreszenz. Die Atmungskette pumpte nun unter NADH Oxidation Protonen in das Innere der Vesikel. War die passive Protonentranslokation durch F_o genügend stark inhibiert, so kam es zur Ausbildung eines Protonengradienten, was sich in einer weiteren Abnahme der Fluoreszenz äußerte. Typischerweise wurde bei einer nicht mit Carbodiimid inkubierten Vergleichsprobe kein Protonengradient aufgebaut. Zugabe von KCN (3) legte durch Vergiftung der Cytochrom c Oxidase die Atmungskette lahm, stellte also die Pumpe ab. Der Protonengradient löste sich wieder auf. Um das vollständige Verschwinden des Protonengradienten zu überprüfen, wurde NH_4Cl (4) zugegeben, das als NH_3 die Membran passiert und im Innern der Vesikel den pH erhöht.

Genau wie **1** inhibierten auch **38a** und **47a** die passive Protonentranslokation. Bei **38a** war die Inhibierung im direkten Vergleich zu **1** um ~ 30 % geringer.

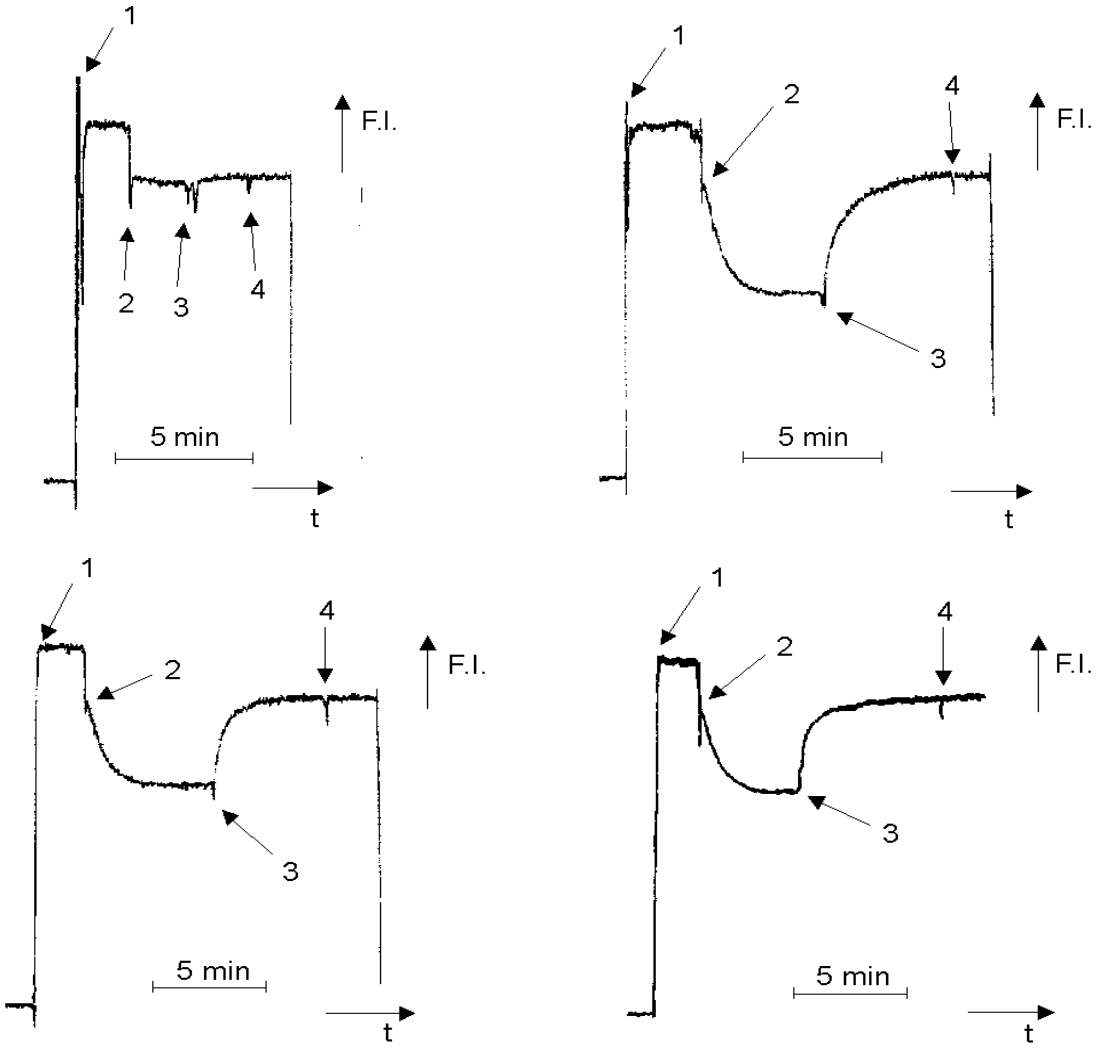


Abb. 4: oben links: Vergleichsprobe ohne Carbodiimid; oben rechts: 200 µM **1**; unten links: 200 µM **38a**; unten rechts: 200 µM **47a**
Zugabe von 1: Acridin Orange; 2: NADH; 3: KCN; 4: NH_4Cl.

39a verursachte keine Inhibierung. Eine mit **39a** inkubierte Probe zeigte das gleiche Verhalten wie eine Vergleichsprobe, die nicht mit Carbodiimid inkubiert worden war.

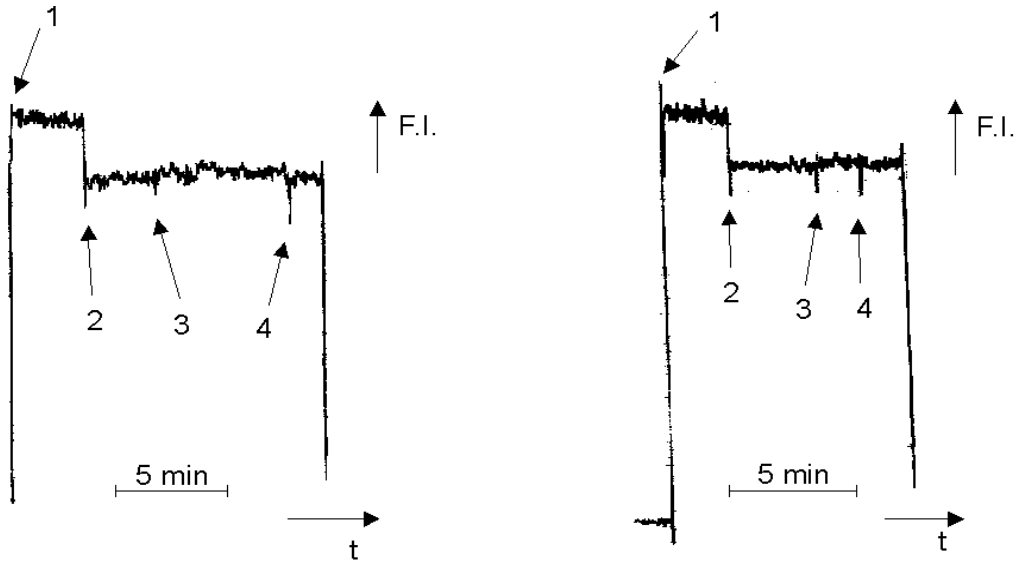


Abb. 5 : links: Vergleichsprobe ohne Carbodiimid; rechts: 200 µM **39a**
Zugabe von 1: Acridin Orange; 2: NADH; 3: KCN; 4: NH_4Cl.

3.3.1.2. Inhibierung der aktiven Protonentranslokation

Durch Bindung von F_1 an den mit Carbodiimid markierten F_o-Teil der Zellmembran Vesikel wurde der F_oF_1-Komplex rekonstituiert. Die Schritte 1-3 liefen analog zu dem Test in **3.3.1.1.** Da F_1 ebenfalls die passive Protonentranslokation inhibiert, zeigte hier auch die nicht mit Carbodiimid inkubierte Vergleichsprobe die Ausbildung eines Protonengradienten. Nach Zugabe von ATP (4) stieg die Fluoreszenz zunächst geringfügig an. Bei der Vergleichsprobe baute sich nun ein durch ATP-Hydrolyse getriebener Protonengradient auf, der durch Zugabe von NH_4Cl (5) zerstört werden konnte. Bei mit 200 µM **1** bzw. 200 µM **47a** behandelten Proben konnte durch die Inhibierung der aktiven Protonentranslokation kein Protonengradient aufgebaut werden. Mit 200 µM **38a** behandelte Proben waren im Vergleich zu mit 200 µM **1** behandelten Proben um ~ 45 % weniger inhibiert.

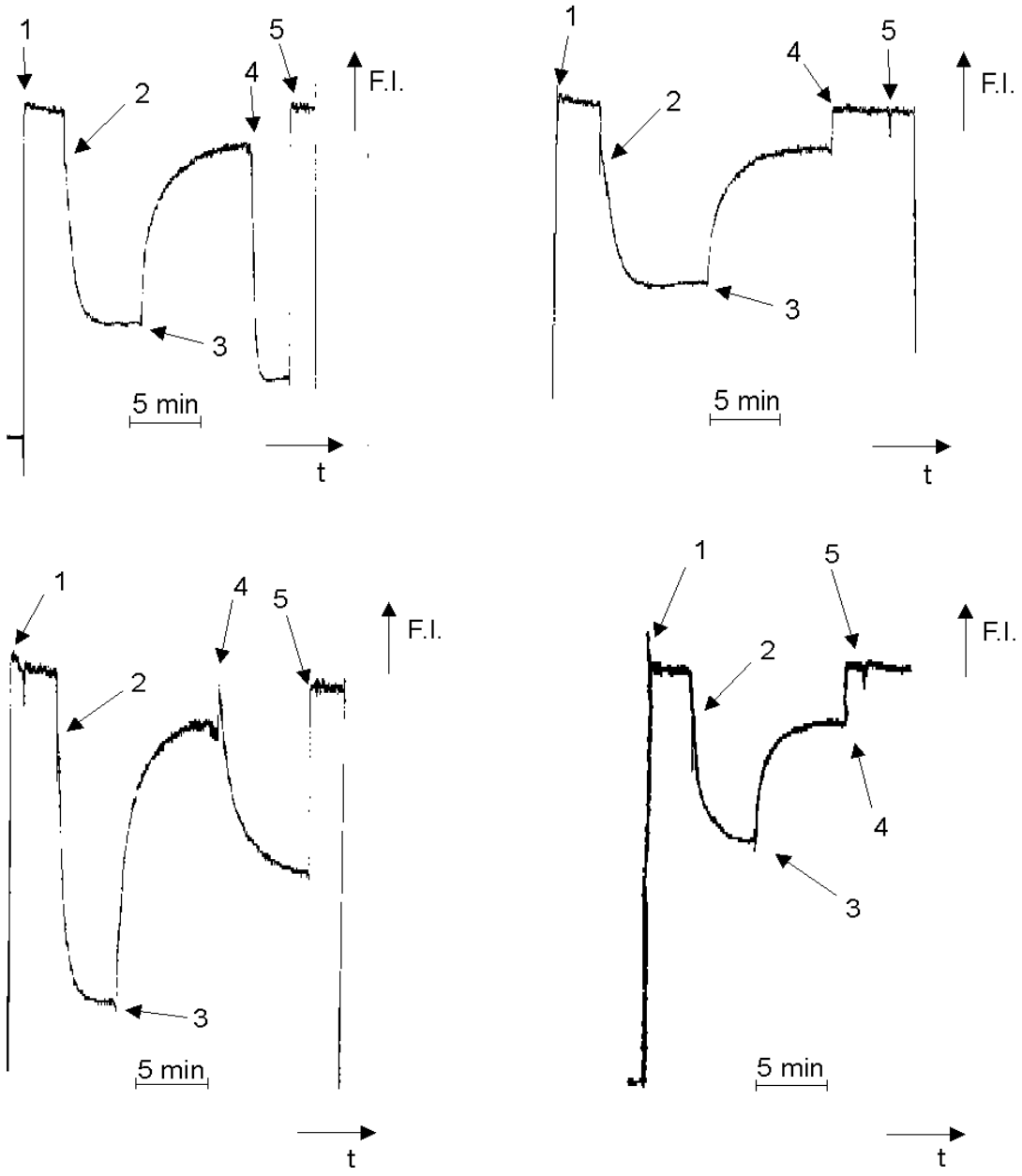


Abb. 6: oben links: Vergleichsprobe ohne Carbodiimid; oben rechts: 200 µM **1** + F_1 rekonstituiert; unten links: 200 µM **38a** + F_1 rekonstituiert; unten rechts: 200 µM **47a** + F_1 rekonstituiert
Zugabe von 1: Acridin Orange; 2: NADH; 3: KCN; 4: ATP; 5: NH_4Cl.

Bei Inkubation mit einer Mischung aus 200 µM **38a** und 100 µM **1** wurde die Protonentranslokation vollständig gehemmt. Das deutet darauf hin, daß die

Hemmung bei 200 µM **38a** unvollständig war und die noch freien Protonenkanäle durch das zusätzliche **1** blockiert wurden. Somit lag keine partielle Durchlässigkeit für Protonen, die durch das protonierbare N-3 Atom in **38a** vermittelt werden könnte, vor. In einem separaten Versuch wurde eine Konzentration von 300 µM als die Mindestkonzentration an **38a**, die zur vollständigen Blockierung nötig ist, ermittelt.

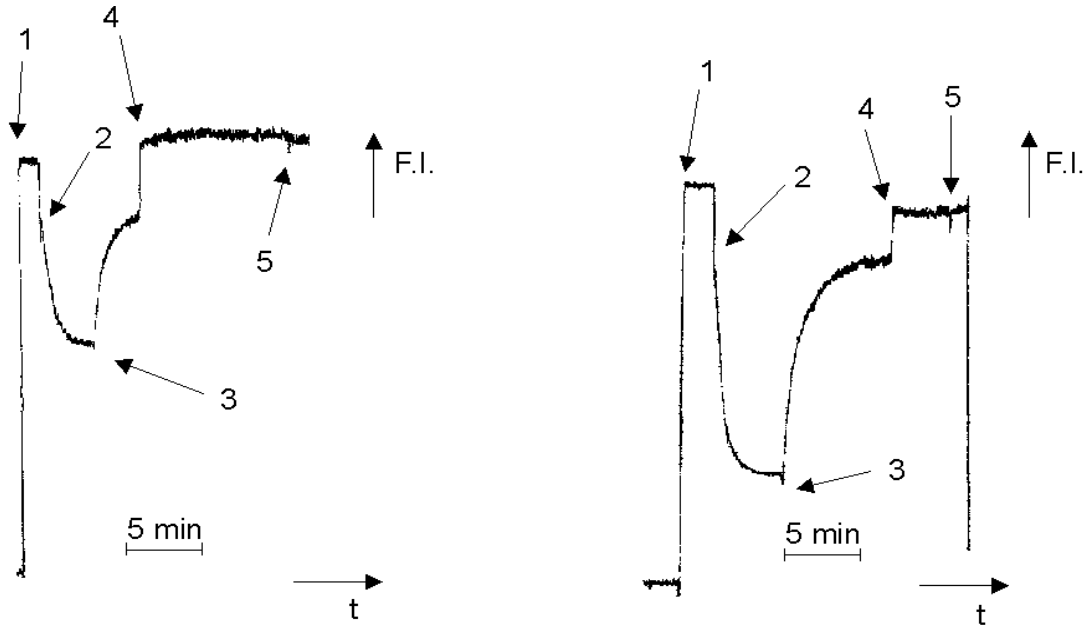


Abb. 7: links: 200 µM **38a** + 100µM **1** + F_1 rekonstituiert; rechts: 300 µM **38a** + F_1 rekonstituiert
Zugabe von 1: Acridin Orange; 2: NADH; 3: KCN; 4: ATP; 5: NH_4Cl.

Mit diesen Ergebnissen wurde gezeigt, daß sowohl **38a**, als auch **47a** genau wie DCCD **1** an cAsp61 von *E. coli* F_o band.
39a zeigte auch keine Inhibierung der aktiven Protonentranslokation. Die Probe zeigte ein der nicht mit Carbodiimid inkubierten Vergleichsprobe analoges Verhalten. Es ist anzunehmen, daß kein **39a** an Asp61 gebunden hatte. Höchstwahrscheinlich ist **39a** sterisch zu anspruchsvoll, um sich an die Bindungsstelle in der c-Untereinheit zu nähern.

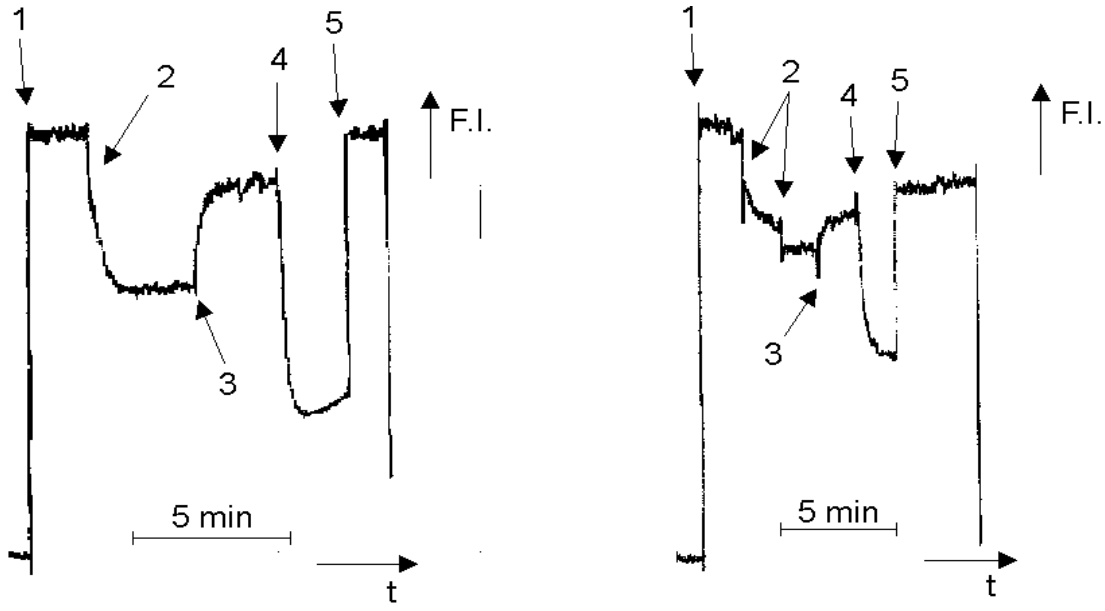


Abb. 8: links: Vergleichsprobe ohne Carbodiimid; rechts: 200 µM **39a** + F_1 rekonstituiert
Zugabe von 1: Acridin Orange; 2: NADH; 3: KCN; 4: ATP; 5: NH_4Cl.

3.3.2. ESR-Spektren Carbodiimid-markierter F_o-Membranvesikel

Auch durch ESR-Messungen konnte die Bindung der Carbodiimide **38a** und **47a** an F_o-Membranvesikel gezeigt werden. F_o-Membranvesikel wurden mit jeweils 500 µM **38a** bzw. **47a** inkubiert. Die ESR-Spektren so behandelter Proben zeigten eine starke Immobilisierung der Radikale. Der 2 A_{zz}-Wert wies für beide Verbindungen nahezu gleiche Werte auf. Für **38a** ergab sich ein 2 A_{zz}-Wert von 66 G, für **47a** betrug 2 A_{zz} 67 G.
Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 9 dargestellt:

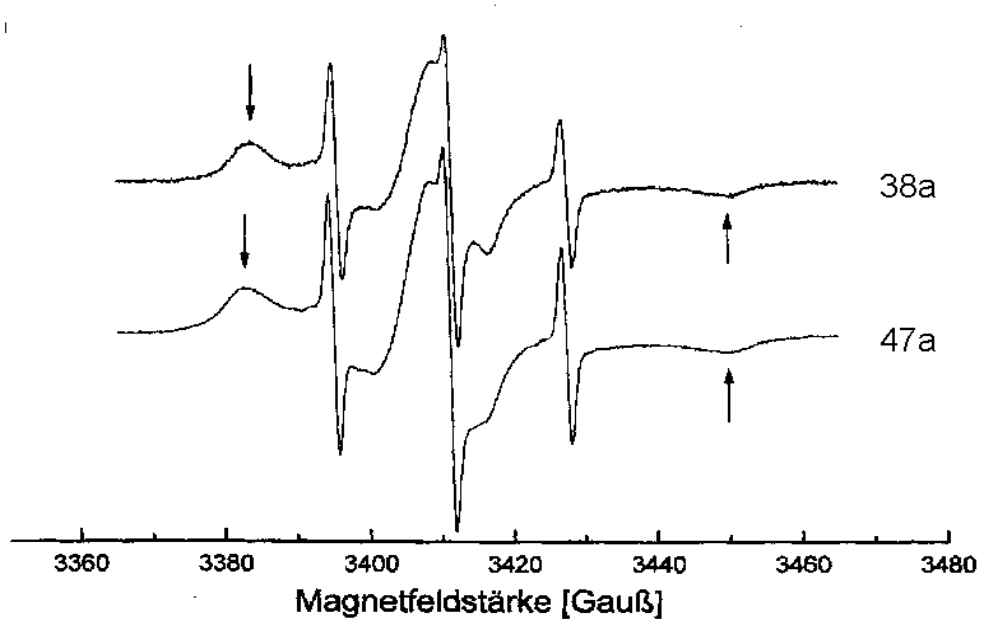
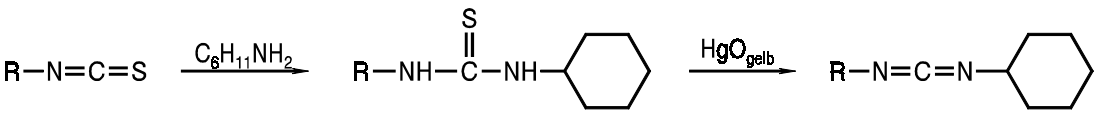


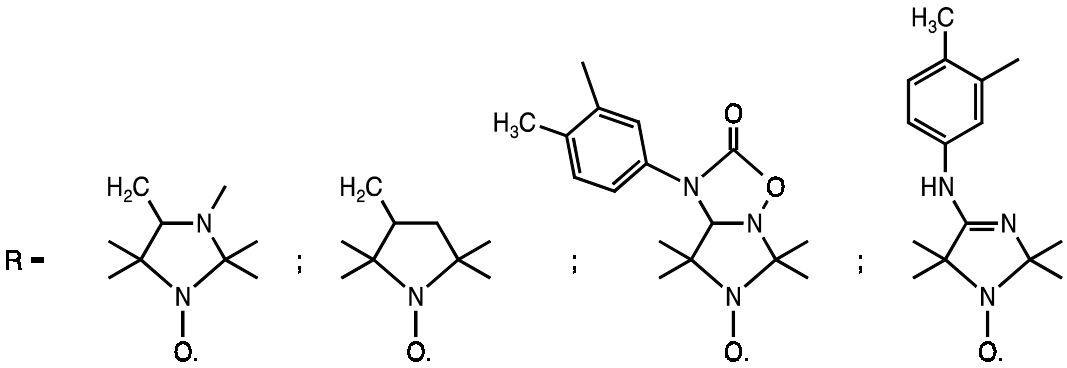
Abb. 9: ESR-Spektren von F_o Membranvesikeln nach Inkubation mit 500 µM **38a** bzw. 500 µM **47a**
Geräteeinstellungen **38a**: conversion time: 327,68 ms; time constant: 81,92 ms; center field: 3415 G; sweep width: 100 G; receiver gain: $3{,}2 \cdot 10^5$; 10 scans; **47a**: alle Einstellungen wie bei **52a** außer receiver gain: $5 \cdot 10^5$

4. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden pH-sensitive SL-Verbindungen aus der Imidazolidin- und der Amidinreihe zur ortsspezifischen Markierung von Proteinen synthetisiert. Erste Anwendungen zur Überprüfung der Funktionstauglichkeit wurden ebenfalls durchgeführt.

Als spezifische Marker für die β-Carboxylgruppe von Asp61 in der c-Untereinheit von *E. coli* F_o konnten die Carbodiimide **38a** und **39a** gewonnen werden. Als pH-unabhängige Vergleichsprobe für ESR-Untersuchungen wurde **47a** synthetisiert. Alle drei Verbindungen wurden aus den entsprechenden literaturbekannten Isothiocyanaten durch Addition von Cyclohexylamin und anschließende Desulfurierung mit gelbem Quecksilberoxid gewonnen. Zu Zwecken der pH-Titration mit Hilfe der ESR-Spektroskopie wurden die Harnstoffe **38d** und **39d** über die entsprechenden Isocyanate dargestellt.





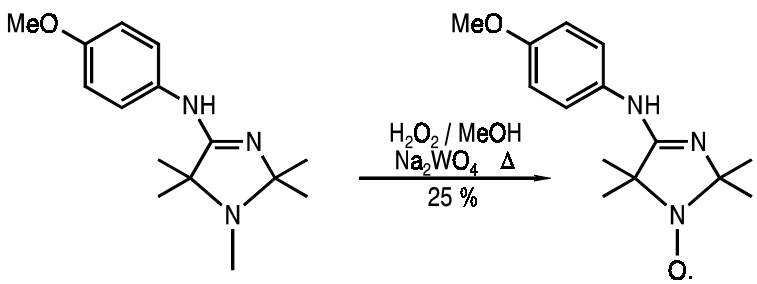
38a band an cAsp61 von *E. coli* F_o Membranvesikeln, was durch die Inhibierung sowohl der passiven, als auch der aktiven Protonentranslokation gezeigt wurde. Ein ESR-Spektrum von mit **38a** markierten *E. coli* F_o Membranvesikeln zeigte eine sehr starke Immobilisierung des Radikals (2 A_{zz} = 66 G). Harnstoff **38d** zeigte bei der pH-Titration im ESR einen sehr niedrigen pK_a-Wert von 3,1 ± 0,1 – zu niedrig für Studien an F_o. Der niedrige pK_a-Wert macht allenfalls den Einsatz von **38a** als pH-unabhängige Vergleichsprobe sinnvoll.

47a verhielt sich gegenüber *E. coli* F_o Membranvesikeln weitgehend analog zu **38a**. Es inhibierte sowohl die aktive, als auch die passive Protonentranslokation. Mit **47a** markierte *E. coli* F_o Membranvesikel ergaben ein ESR-Spektrum, das fast identisch mit dem von mit **38a** markierten Vesikeln war (2 A_{zz} = 67 G). Erwartungsgemäß zeigte der zur Überprüfung etwaiger pH-Sensitivität herangezogene Thioharnstoff **53** im Bereich von pH = 3-7 keine pH-Sensitivität des ESR-Spektrums, was die Eignung der Pyrrolidin SL-Verbindungen als pH-unabhängige Vergleichsproben unterstreicht.

Im Gegensatz zu **38a** und **47a** reagierte **39a** nicht mit Asp61 in *E. coli* F_o. In mit **39a** inkubierten F_o Membranvesikeln war weder die passive, noch die aktive Protonentranslokation gehemmt.

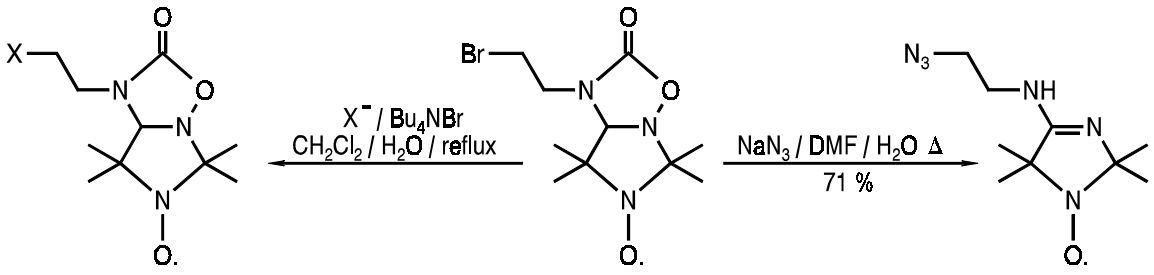
Für Harnstoff **39d** ergab sich bei der pH-Titration mittels ESR ein pK_a-Wert von 4,75 ± 0,25.

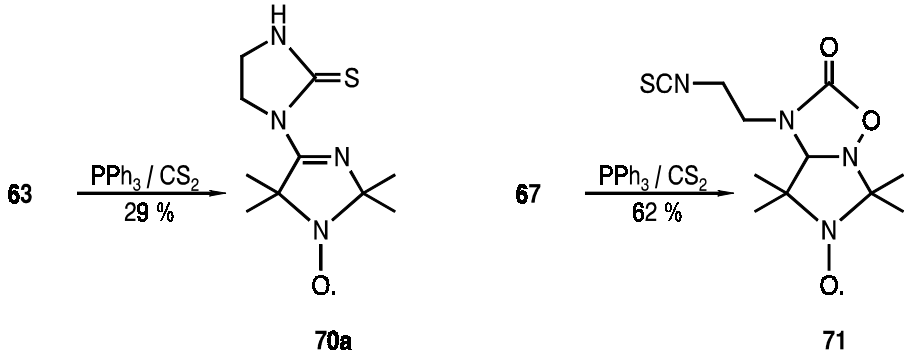
85 wurde synthetisiert, um den Einfluß des Methoxysubstituenten auf den pK_a-Wert zu studieren. Die Erwartung, daß durch die Donoreigenschaften der MeO-Gruppe der pK_a-Wert erhöht würde, bestätigte sich nicht. Der für **85** ermittelte pK_a-Wert von 4,8 ± 0,1 liegt im Bereich des entsprechenden Phenylamidins **24a** (pK_a = 5,0 (Berezina et al., 1993)).



82 **85**

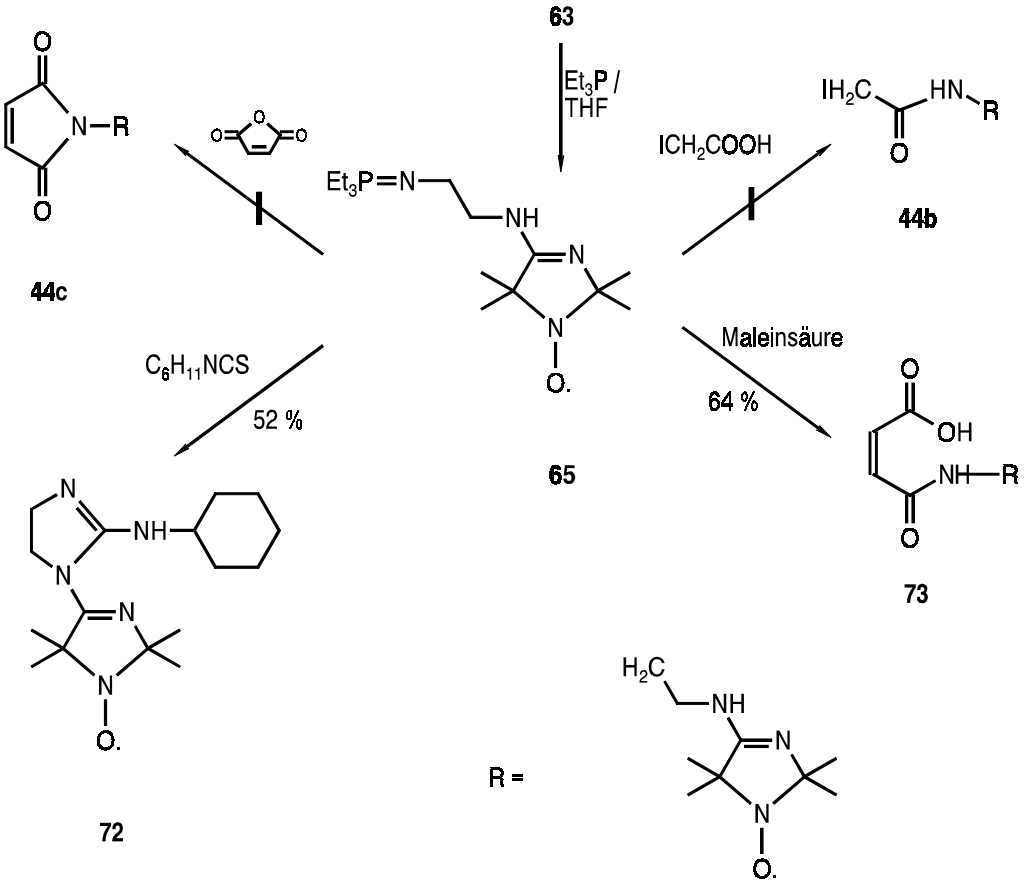
In der Reihe der aliphatischen Amidin-SL-Verbindungen wurde aus der Azidoverbindung **63** das Triethylphosphinimin **65** als vielseitige Zwischenstufe zur Synthese der gewünschten Verbindungen **44a-d** zugänglich gemacht. Die Synthese von **63** war möglich, indem statt **25**, das mit Nukleophilen unter intramolekularer Cyclisierung zu **26** reagiert, **58** als Ausgangsverbindung zur Einführung der Azidogruppe verwendet wurde. Durch Nutzung des Oxadiazolidinonringes als Schutzgruppe konnte das Bromatom in **58** nukleophil durch Azid bzw. Cyanid substituiert werden, ohne daß die Amidingruppe in die Reaktion einbezogen wurde. Während bei der Reaktion von **63** mit PPh_3/CS_2 statt des erwünschten Isothiocyanates **64** nur **70a** als das Produkt der intramolekularen Acylierung entstand, konnte bei Verwendung von **67** das Isothiocyanat **71** erhalten werden.





Um die Verbindungen **44a-c** zu erhalten, wurde **65** aus **63** mit Triethylphosphan in situ erzeugt und sofort mit den jeweiligen Reaktanden Cyclohexylisothiocyanat, Iodessigsäure, Maleinsäureanhydrid oder Maleinsäure weiter umgesetzt.

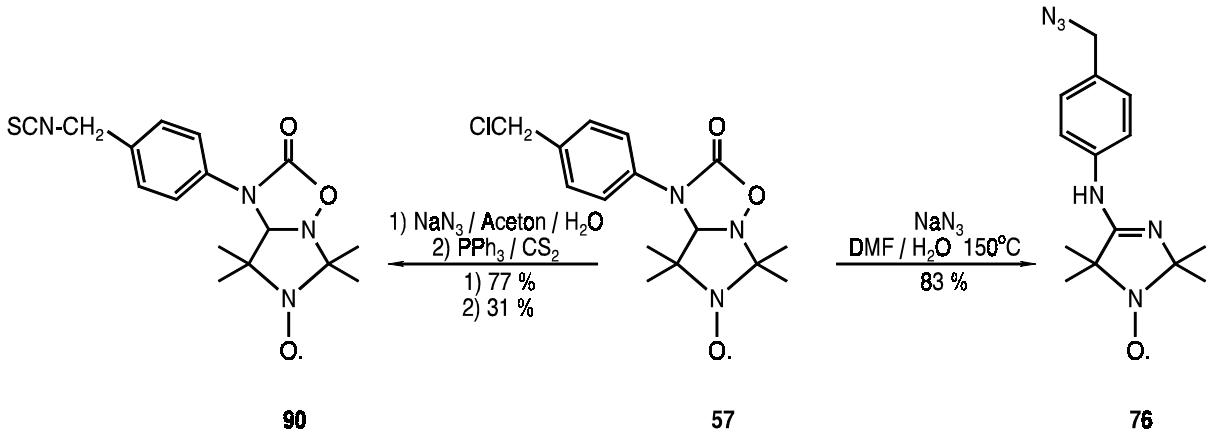
Beim Versuch Carbodiimid **44a** zu erhalten, konnte lediglich dessen Folgeprodukt **72** als Ergebnis einer intramolekularen Cyclisierung isoliert werden. Die Existenz von **44a** wurde durch Reaktionskontrolle mit Hilfe der IR-Spektroskopie nachgewiesen. Iodessigsäure und Maleinsäureanhydrid ergaben keine auswertbaren Resultate. Bei der Reaktion von **65** mit Maleinsäure wurde das Maleinsäuremonoamid **73** als Rohprodukt in guter Ausbeute gewonnen. Es konnte keinerlei Hinweis auf die Entstehung des Produktes einer intramolekularen Cyclisierung erhalten werden.



Die Umsetzung von **73** mit Ac_2O oder $TfAc_2O$ und anschließende Entfernung der Acylgruppe an der Amidinfunktion sollte Maleimid **44c** zugänglich machen können. **44c** wäre eine vielseitig einsetzbare SH-spezifische pH-sensitive SL-Verbindung. Sie besäße gegenüber der literaturbekannten SH-spezifischen Verbindung **39b** eine

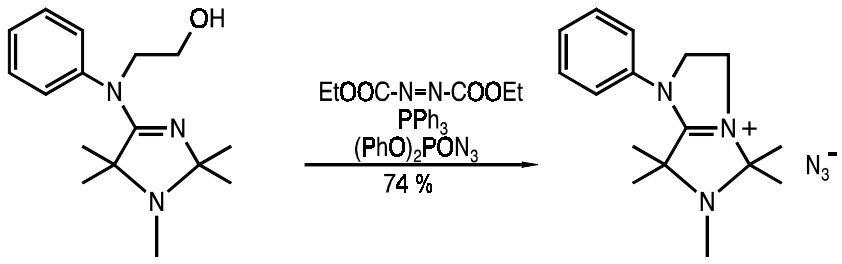
geringere Größe und höhere Flexibilität. Es ist zu erwarten, daß **44c** gegenüber **39b** einen höheren pK_a-Wert haben wird.

Die Halogenalkylverbindung **57** ließ sich analog **63** und **67** in die entsprechenden Azide **75** und **76** umwandeln. Aus **75** wurde mit PPh_3/CS_2 das Isothiocyanat **77** dargestellt.
Aus diesen Verbindungen könnten in der Zukunft auch die pH-sensitiven Marker **40a-c** sowie die Vergleichsprobe **40d** gewonnen werden.



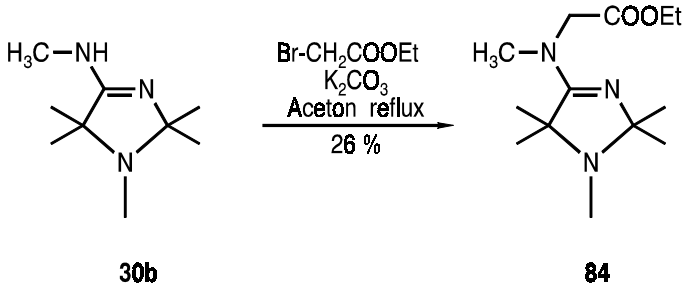
90 **57** **76**

Auf dem Weg zu trisubstituierten aromatischen Amidin SL-Verbindungen konnten wertvolle Erkenntnisse gewonnen werden. Beim Versuch, den Alkohol **86** in das gewünschte Azid **88** umzuwandeln, wurde lediglich **88a** als das Produkt einer intramolekularen Cyclisierung erhalten.

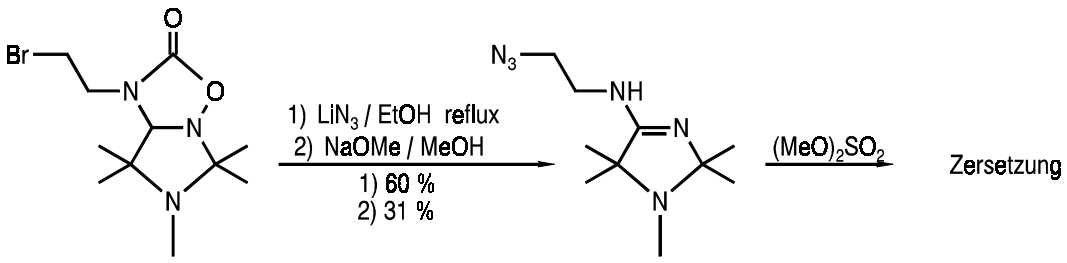


86 **88a**

In der Reihe der trisubstituierten aliphatischen Amidine konnte **84** als erstes aliphatisches trisubstituiertes 4-N,N-R,R'-Amino-3-imidazolin durch die Alkylierung von **30b** mit Bromessigsäureethylester als Ausgangsverbindung für die Synthese von **46a-d** gewonnen werden. Es wurde außerdem versucht, durch Alkylierung des Azidoethylamidins **89** mit Dimethylsulfat geeignete Ausgangsverbindungen zu Synthese von **45a-d** und **46a-d** zu erhalten. Es resultierten jedoch lediglich Zersetzungsprodukte.



30b **84**



78 **89**

Aus diesen Resultaten kann geschlossen werden, daß zur Darstellung trisubstituierter Amidin-SL der Weg über die entsprechenden Ester, Amide und Amine am aussichtsreichsten ist. Für zukünftige Versuche empfiehlt sich die folgende Vorgehensweise: R-COOEt → $R\text{-}CONH_2$ → $R\text{-}CH_2NH_2$ → → **42a-d**, **46a-d**.

5. Experimenteller Teil

5.1. Analyse-, Reinigungsmethoden und Spektroskopie

Elementaranalysen

Die C,H,N-Analysen wurden von Frau Alester, Frau Burger und Frau Schaible an einem Perkin-Elmer microanalyser 240 durchgeführt.

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden mit einem heizbaren Kupferblock ermittelt. Die angegebenen Werte sind nicht korrigiert.

Chromatographie

Zu DC-Untersuchungen dienten:

Kieselgel Fertigplatten Polygram Sil G/UV_{254} 8x4x0,025 cm und 20x20x0,025 cm von Macherey-Nagel,
DC Alufolien Aluminiumoxid 150 F_{254} neutral (Typ T) 20x20x0,02 cm von Merck
DC Fertigplatten RP-18 F_{254}s 20x5x0,025 cm von Merck

Zur PSC an Kieselgel kamen PSC-Fertigplatten Kieselegel 60 F_{254} 20x20x0,2 cm zum Einsatz. Die PSC an Aluminiumoxid wurde folgendermaßen durchgeführt:

Neutrales Aluminiumoxid ICN Alumina N-Super I von ICN Biomedicals wurde mit Fluoreszenzindikator F_{254} für die Dünnschichtchromatographie von Merck versetzt und gut durchmischt. Das so behandelte Adsorbens sollte unter der Fluoreszenzlampe eine deutliche Fluoreszenz zeigen. Das so zubereitete Aluminiumoxid wurde trocken auf einer Glasplatte ausgestrichen (Schichtdicke 2-3 mm), die Substanzlösung aufgetragen und die Platte in einer geschlossenen schräggestellten Kammer eluiert (die Platte muß ebenfalls schräg liegen, um ein Herabfallen des Adsorbens zu verhindern). Nach Elution und Trocknen der Platte wurden die einzelnen Fraktionen separiert und die Substanzen auf einer Glasfritte mit einem jeweils geeigneten Lösungsmittel ausgewaschen.

Zur Säulenchromatographie diente:

Kieselgel ICN SiliTech, Korngröße 0,063-0,2 mm
Aluminiumoxid ICN Alumina N-Super beide von ICN Biomedicals
Sephadex LH20 von Pharmacia

Die für Eluentengemische angegebenen Mischungsverhältnisse sind als Volumenverhältnisse (v:v) zu verstehen. Das gleiche gilt, wenn bei Reaktionen Lösungsmittelgemische zum Einsatz kamen.

NMR-Spektroskopie

Die ^{1}H-NMR- und ^{13}C-NMR-Spektren wurden Frau Ruzek und Herrn Dr. Georg an einem Bruker AMX 400 (400,13 MHz), an einem Varian EM 390 (90 MHz) und an einem Varian EM 360 (60 MHz) aufgenommen. Die Messung der Spektren erfolgte in deuterierten Lösungsmitteln. Die chemischen Verschiebungen sind in δ relativ zu TMS angegeben. Als interner Standard diente $CHCl_3$, δ_H=7,24 ppm, $CHDCl_2$ δ_H=5,32 ppm, $D_3CSOCHD_2$ δ_H=2,49 ppm.
Zur Beschreibung der Signale wurden die folgenden Abkürzungen verwendet:
s = Singulett; t = Triplett; q = Quartett; m = Multiplett; b = breit.

Infrarot-Spektroskopie

Die Infrarot-Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer 881 sowie Perkin-Elmer FT-IR 16 PC Spektrometer aufgenommen. Die Proben wurden als Kaliumbromid-Preßlinge, in Lösung oder als Film zwischen Kaliumbromid-Platten gemessen. Zur Angabe der Bandenintensitäten dienten folgende Abkürzungen:
vs = sehr stark, s = stark, m = mittel, w = schwach, vw = sehr schwach, br = breit.

ESR-Spektroskopie

Die ESR-Spektren wurden mit einem X-Band Spektrometer ESP 300 E der Firma Bruker aufgenommen. Die Messungen wurden entweder in einem Hohlraumresonator TE_{001} (ER 4118) in Quarzkapillaren der Firma Spintec (0,9 x 100 mm) oder in einem Hohlraumresonator TE_{102} in Flachküvetten der med. Glastechnik Werkstätten E. Harms, Berlin, durchgeführt.
Die Aufnahme der Spektren erfolgte im X-Band bei einer Mikrowellenfrequenz von 9,6 GHz. Die Modulationsfrequenz betrug 100 kHz, die Modulationsamplitude 1 G. Die angegebene Linienbreite des Hochfeldsignals ist die Breite bei maximaler Steigung der Absorptionskurve. HF/MF stellt das Verhältnis der Peakhöhe des Hochfeld- zu der des Mittelfeldsignales dar.

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden von Frau Dr. Schmitz und Herrn Dr. Mackewitz an einem Finnigan MAT 90 aufgenommen.

Fluoreszenzmessungen

Die Fluoreszenzmessungen erfolgten an einem Perkin-Elmer LS-5 Lumineszenz Spektrometer in Quarzküvetten. Die Messungen erfolgten bei einer

Anregungswellenlänge von 486 nm und bei einer Emissionswellenlänge von 533 nm.

Ultrazentrifugation

Zur Ultrazentrifugation kam eine Airfuge von Beckman zum Einsatz.

Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach der Methode von Lowry in der Modifikation von Peterson (Peterson, 1977).

5.2. Materialien

Folgende Ausgangsverbindngen wurden nach Literaturmethoden synthetisiert:

4-(3-Amino-4-methylphenylamino)-1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazolin **(59)** (Berezina et al., 1990)
4-Brommethyl-1-oxyl-2,2,3,5,5-pentamethylimidazolidin **(13)** (Reznikov und Volodarsky, 1984)
(55) (Stevens und Gillis, 1957)
2,2-Diethoxypropan (Acetondiethylketal) (Tschitschibabin und Jelgasin, 1914)
4-N-Ethoxycarbonylmethyl-N-phenylamino-1,2,2,5,5-pentamethyl-3-imidazolin **(31)** (Voinov, unveröffentlichte Ergebnisse)
2,3,3a,4,5,6-Hexahydro-3,4,4,5,6,6-hexamethyl-2-thioxoimidazo[1,5-b][1,2,4] oxadiazol **(28b)** (Voinov et al., 1992)

2,2,3,4,5,5-Hexamethyl-1-oxyl-3-imidazolinium-methylsulfat **(51)** (Volodarsky und Grigor'ev, 1988; Volodarsky et al., 1980)
3-Isothiocyanatomethyl-1-oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin **(52)** (Rozantsev, 1970; Gaffney, 1976; Chion et al., 1978; Hankovszky et al., 1981)
4-(3-Isothiocyanato-4-methylphenylamino)-1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazolin **(61)** (Reznikov et al., 1994)
Lithiumazid (Steudel und Schenk, 1975)
4-Methoxyphenylisothiocyanat (Hodgkins und Reeves, 1964)
1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazolin-3-oxid **(22)** (Martin, et al., 1988)
1,2,2,5,5-Pentamethyl-3-imidazolin-3-oxid **(27)** (Murman, 1957; Martin und Volodarsky, 1979; Shchukin et al., 1984; Voinov, 1985; Grigor'ev et al., 1985)
4-Phenylamino-1,2,2,5,5-pentamethyl-3-imidazolin **(30a)** (Voinov et al., 1992)

Folgende Chemikalien wurden käuflich erworben:
Azodicarbonsäurediethylester (keine Angabe zur Reinheit), 2-Bromethylisocyanat (90 %), 4-(Chlormethyl)-phenylisocyanat (97 %), Phosphorsäurediphenylesterazid (97 %), Triethylphosphan 1 M Lösung in THF von Aldrich;
4-Chlorphenylisocyanat (> 97 %), Isobutyraldehyd (~ 97 %), Methylisothiocyanat (> 98 %), Phenylisothiocyanat (> 99 %), Thiophosgen (~ 90 %), Tolylen-2,4-diisocyanat (> 98 %) von Fluka;
2-Methyl-2-buten (> 95 %) von Merck.

Alle übrigen Chemikalien waren entweder im Arbeitskreis oder in der Chemikalienausgabe der Universität Kaiserslautern vorhanden und entsprachen der Qualitätsstufe p.a., sofern nicht anders angegeben.
Das zur Säulenchromatographie benutzte Dichlormethan war technisch. Ethylacetat (techn. und p.a.) wurde vor Gebrauch durch Refluxieren über P_4O_{10} (bis zur Beendigung der Rückstandsbildung) und Abdestillieren aufbereitet.
DMF wurde stets frisch destilliert eingesetzt.
Als Schutzgas wurde, wenn nötig, Argon 4.8 der Messer Griesheim GmbH verwendet.

Lösungsmittel wurden bei Bedarf durch Refluxieren in einer Argonatmosphäre über den unten angegebenen Substanzen getrocknet und unter Argon aufbewahrt:

Di-, Trichlormethan über P_4O_{10}
Ether, Pentan, THF und Benzol über Na/Benzophenon
Pyridin über BaO
Triethylamin und Cyclohexylamin über KOH

Zur Entwicklung von Kohlendioxid wurde Trockeneis der Raumtemperatur ausgesetzt und das gasförmige Kohlendioxid über einen Trockenturm direkt in die Reaktionslösung eingeleitet. Der Trockenturm war mit Molsieb 4 Å beschickt, das zuvor am Ölpumpenvakuum mittels Bunsenbrenner ausgeheizt und getrocknet worden war. Nach dem Abkühlen war es mit Argon begast worden.

Die zu ESR-Messungen und Fluoreszenzquench Assays verwendeten *E.coli* F_1 befreiten F_o Membranvesikel und die zu Rekonstitution (Wise und Senior 1985) verwendete F_1 waren im Arbeitskreis vorhanden. Es handelte sich um unc^+ Wildtyp ATP Synthase aus dem *E.coli* K12 Stamm SWM1 (Rao et al., 1988).

5.3. Synthesen

5.3.1. Synthese von 38a,d

*4-Brommethylen-1-oxyl-2,2,3,5,5-pentamethylimidazolidin **(12)** (vgl. Reznikov und Volodarsky, 1984)*

Ansatz: 7 g (24,9 mmol) **51**
4,4 g (24,9 mmol) NBS
15 ml (11,0 g; 109 mmol) trockenes NEt_3
500 ml trockenes CH_2Cl_2

7 g (24,9 mmol) **51** wurde bei Raumtemperatur in 250 ml trockenem Dichlormethan suspendiert und 15 ml trockenes Triethylamin zugegeben, wobei sich eine gelbe Lösung von **11** bildete. Diese wurde mit einem Aceton/Trockeneisbad auf – 50 ° C gekühlt. Danach wurde innerhalb von 1 h eine Lösung von 4,4 g (24,9 mmol) N-Bromsuccinimid in 250 ml trockenem Dichlormethan zugetropft. Anschließend wurde noch 1 h weitergerührt, wobei zu der Kältemischung kein Trockeneis mehr hinzugefügt wurde, und sich die Lösung auf –10 ° C erwärmte. Das Lösungsmittel wurde am Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand bei 40 ° C fünfmal mit je 10 ml Hexan extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden über Nacht bei –20 ° C stehen gelassen. Die ausgefallenen leuchtend orangen Kristalle wurden abgesaugt und am Vakuum getrocknet. Zur Analyse wurde eine Probe bei Raumtemperatur in einem Minimum an Hexan gelöst und bei –20 ° C auskristallisiert.

Ausbeute: 4,5 g (18,1 mmol; 72,7 %) **12**

IR (KBr) : ν(=C-H): 3095 (s); ν(N-CH_3): 2820 (w); ν(C=C): 1616 (s) cm^{-1}.

Schmelzpunkt : 72–74 ° C (Zersetzung) (aus Hexan)

Elementaranalyse ($C_9H_{16}BrN_2O$, 248,13):
berechnet: C: 43,57 % H: 6,50 % N: 11,28 %
gefunden: C: 43,41 % H: 6,36 % N: 11,32 %

MS (EI): m/z = 247 und 249 (beide M^+; je 1%)

*4-Dibrommethylen-1-oxyl-2,2,3,5,5-pentamethylimidazolidin **(12b)***

Ansatz: 1 g (3,6 mmol) **51**
2 ml (14,4 mmol; 1,46 g) trockenes NEt_3
0,18 ml (3,6 mmol; 0,57 g) Br_2
40 ml trockener Ether

1 g (3,6 mmol) **51** wurde in 20 ml trockenem Ether suspendiert und unter Rühren mit 2 ml (14,4 mmol; 1,46 g) trockenem Triethylamin versetzt. Zur entstanden Lösung von **11** wurde nach 15 min eine Lösung von 0,18 ml (3,6 mmol; 0,57 g) Br_2 in 20 ml trockenem Ether innerhalb von 15 min zugetropft und anschließend noch 5 min weitergerührt. Ausgefallene Salze wurden abgesaugt und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde bei 40 ° C mit 10 ml Hexan extrahiert und bei –5 ° C zur Kristallisation gebracht.

Ausbeute: 0,4 g (1,22 mmol; 34,0 %) **12b**

IR (KBr) : ν(C=C): 1592 (s) cm^{-1}.

Elementaranalyse ($C_9H_{15}Br_2N_2O$, 327,02):
berechnet: C: 33,06 % H: 4,62 % N: 8,56 %
gefunden: C: 33,3 % H: 4,6 % N: 8,7 %

MS (EI): m/z (%) = 295 (32,4), 297 (63,0), 299 (31,0) (alle M^+-30(NO))

*4-Azidomethyl-1-oxyl-2,2,3,5,5-pentamethylimidazolidin **(14)** (vgl. Reznikov et al., 1994)*

Ansatz: 1 g (4 mmol) **13**
0,52 g (8 mmol) NaN_3
20 ml Aceton
2 ml H_2O

1 g (4 mmol) **13** wurde in einer Mischung aus 20 ml Aceton und 2 ml Wasser gelöst und 0,52 g (8 mmol) Natriumazid zugegeben. Die Lösung wurde 4 h refluxiert und anschließend das Aceton am Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit 10 ml Wasser versetzt und dreimal mit je 20 ml Ether extrahiert. Die vereinigten Etherextrakte wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, abfiltriert und der Ether am Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde an Kieselgel mit einer Ether/Hexan 1:1 Mischung chromatographiert. Es eluierte ausschließlich **14**, die Verunreinigungen blieben auf der Säule zurück.
Zur Analyse wurde eine Probe aus Hexan bei –20 ° C auskristallisiert.

Ausbeute: 0,55 g (2,6 mmol; 64,8 %) **14**

IR (CCl_4): ν(N-CH_3): 2803 (m); ν(N_3): 2101 (vs) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 34-36 ° C (aus Hexan)

Elementaranalyse ($C_9H_{18}N_5O$,212,24):
berechnet: C: 50,93 % H: 8,55 % N: 32,98%
gefunden: C: 51,06 % H: 8,34 % N: 33,31 %

ESR (c = 10^{-4} M in 10 mM Phosphatpuffer pH 7):
HF/MF = 0,90; a_N = 15,82 G; Linienbreite = 1,41 G

1-Oxyl-2,2,3,5,5-pentamethyl-4-triphenylphosphiniminomethylimidazolidin ***(48)***

Ansatz: 1,63 g (7,68 mmol) **14**
2,01 g (7,68 mmol) PPh_3
10 ml trockener Ether

1,63 g (7,68 mmol) **14** wurde in 10 ml trockenem Ether gelöst und 2,01 g (7,68 mmol) Triphenylphosphan zugegeben. Die Lösung wurde 1 h refluxiert. Der abgeschiedene Feststoff wurde abgesaugt, zerkleinert und viermal mit je 5 ml trockenem Ether gewaschen, bis nach DC-Kontrolle an Kieselgel mit Trichlormethan als Laufmittel kein Triphenylphosphan (R_f = 0,95) in der Waschlösung mehr nachzuweisen war. Der Feststoff wurde am Vakuum getrocknet und es wurde **48** als blaßgelbes Pulver in analysenreiner Form erhalten.

Ausbeute: 2,23 g (5,0 mmol; 65,1 %) **48**

IR (KBr): ν(C-H Aromat): 3038 (m); ν(N-CH_3): 2816, 2797 (m); ν(C=C-H Aromat): 1588 (m), 1482 (s) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 166-168 ° C

Elementaranalyse ($C_{27}H_{33}N_3OP$; 446,53):
berechnet: C: 72,62 % H: 7,45 % N: 9,41%
gefunden: C: 72,66 % H: 7,35 % N: 9,40 %

ESR (c = 10^{-4} M in 10 mM Phosphatpuffer pH 7):
HF/MF = 0,76; a_N = 15,74 G; Linienbreite = 1,52 G

*4-Isothiocyanatomethyl-1-oxyl-2,2,3,5,5-pentamethylimidazolidin **(15)** (vgl. Reznikov et al., 1994)*

Ansatz: 2,3 g (5,15 mmol) **48**
5 ml CS_2

2,3 g (5,15 mmol) **48** wurde mit 5 ml Schwefelkohlenstoff versetzt und 90 min refluxiert. Der Schwefelkohlenstoff wurde am Vakuum entfernt und der Rückstand mit 10 ml Ether extrahiert. Nach Entfernen des Ethers am Vakuum wurde der verbleibende Rückstand an Kieselgel mit Trichlormethan als Laufmittel chromatographiert. Als erste Fraktion eluierte Triphenylphosphinsulfid (R_f ~ 1). Die zweite Fraktion bestand aus **15** (R_f = 0,3). **15** wurde in Form eines orangen Öls erhalten, das bei – 20 ° C zu gelborangen Kristallen erstarrte.

Ausbeute: 1,04 g (4,56 mmol; 92 %) **15**

IR (KBr): ν(N-CH_3): 2807 (m); ν(N=C=S): 2170 (m), 2090 (m) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 40-41 ° C

Elementaranalyse: ($C_{10}H_{18}N_3OS$; 228,25):
berechnet: C: 52,62 % H: 7,95 % N: 18,40 %
gefunden: C: 52,73 % H: 7,75 % N: 18,31 %

ESR (c = 10^{-4} M in 10 mM Phosphatpuffer pH 7):
HF/MF = 0,90 ; a_N = 15,78 G; Linienbreite = 1,39 G

*4-Isocyanatomethyl-1-oxyl-2,2,3,5,5-pentamethylimidazolidin **(49)***

Ansatz: 0,45 g (1 mmol) **48**
trockenes $CO_{2(g)}$
10 ml trockener Ether

In einer Argonatmosphäre wurde 0,45 g (1 mmol) **48** in 10 ml trockenem Ether suspendiert. Anschließend wurde während 90 min ein Strom trockenen Kohlendioxids durch die Suspension geleitet (vom CO_2-Strom mitgerissener Ether wurde von Zeit zu Zeit ersetzt), wobei der Feststoff allmählich in Lösung ging. Nach dieser Zeit wurde der Ether am Vakuum entfernt und der Rückstand mit 5 ml trockenem Pentan digeriert. Die Lösung wurde vom nicht gelösten Triphenylphosphanoxid mit Hilfe einer Glasfritte getrennt und das Filtrat am Vakuum vom Pentan befreit. Das verbleibende Isocyanat **49** wurde für die folgende Reaktion ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Ausbeute : 0,17 g (0,80 mmol; 80 %) **49**

IR (CCl_4): ν(N-CH_3): 2801 (w); ν(N=C=O): 2260 (vs) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 53-55 ° C

Elementaranalyse ($C_{10}H_{18}N_3O_2$; 212,25):
berechnet: C: 56,59 % H: 8,54 % N: 19,79 %
gefunden: C: 56,34 % H: 8,71 % N: 18,60 %

MS (EI): m/z = 212 (M^+; 11 %)

N-Cyclohexyl-N'-(1-oxyl-2,2,3,5,5-pentamethylimidazolidin-4-yl)-methylharnstoff ***(38d)***

Ansatz: 28 mg (0,13 mmol) **49**
99 mg (1 mmol; 0,11 ml) Cyclohexylamin
1 ml trockener Ether

28 mg (0,13 mmol) **49** wurde in 1 ml trockenem Ether gelöst und unter Rühren 99 mg (1 mmol; 0,11 ml) Cyclohexylamin zugegeben. Es begann sofort ein blaßgelber Feststoff auszufallen. Es wurde noch über Nacht weitergerührt. Der Feststoff wurde abgesaugt, zweimal mit je 1 ml Pentan gewaschen und sorgfältig am Vakuum getrocknet. Die gewünschte Verbindung **38d** wurde als blaßgelbes Pulver erhalten, das in analysenreiner Form vorlag.

Ausbeute: 32 mg (0,10 mmol; 79,0 %) **38d**

IR (KBr): ν(N-H): 3338 (s); ν(N-CH_3): 2808 (m); ν(CONH): 1623, 1590 (vs) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 194-195 ° C (Zersetzung)

Elementaranalyse ($C_{16}H_{31}N_4O_2$; 311,42):
berechnet: C: 61,71 % H: 10,03 % N: 17,98 %
gefunden: C: 61,80 % H: 10,03 % N: 17,77 %

ESR (c = 10^{-4} M in 10 mM Phosphatpuffer pH 7):
HF/MF = 0,80; a_N = 15,82 G; Linienbreite = 1,47 G
pH 1: HF/MF = 0,81; a_N = 14,55 G; Δa_N = 1,27 G;
Linienbreite = 1,33 G
$pK_a = 3,1 \pm 0,1$

N-Cyclohexyl-N'-(1-oxyl-2,2,3,5,5-pentamethylimidazolidin-4-yl)-methylthioharnstoff ***(50)***

Ansatz: 228 mg (1 mmol) **15**
99 mg (1 mmol; 0,11 ml) Cyclohexylamin
2 ml trockener Ether

228 mg (1 mmol) **15** wurde in 1 ml trockenem Ether gelöst und 99 mg (1 mmol; 0,11 ml) Cyclohexylamin in 1 ml trockenem Ether zugegeben. Es wurde noch 18 h bei Raumtemperatur weitergerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abgesaugt, mit mehreren Portionen Pentan gewaschen und am Vakuum getrocknet. Das gewünschte Produkt fiel als blaßgelbes Pulver an, das in analysenreiner Form vorlag.

Ausbeute: 311 mg (0,95 mmol; 95 %) **50**

IR (KBr): ν(NH): 3295 (s); ν(N-CH_3): 2804 (m); ν(CSNH): 1540 (vs) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 111 ° C

Elementaranalyse ($C_{16}H_{31}N_4OS$; 327,42):
berechnet: C: 58,68 % H: 9,54 % N: 17,10 %
gefunden: C: 58,53 % H: 9,62 % N: 17,24 %

ESR (c = 10^{-4} M in 10 mM Phosphatpuffer pH 7):
HF/MF = 0,79; a_N = 15,82 G; Linienbreite = 1,48 G

N-Cyclohexyl-N'-(1-oxyl-2,2,3,5,5-pentamethylimidazolidin-4-yl)-methylcarbodiimid ***(38a)***

Ansatz: 164 mg (0,5 mmol) **50**
800 mg (3,7 mmol) HgO_{gelb}
10 ml trockenes Benzol/Pyridin 2:1

800 mg (3,7 mmol) gelbes Quecksilberoxid wurde zu 164 mg (0,5 mmol) **50** in 10 ml trockenem Benzol/Pyridin 2:1 gegeben und 1 h refluxiert. Nach dem Abkühlen wurde vom festen Rückstand abfiltriert und das Filtrat am Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das verbleibende Öl wurde an Kieselgel mit einer Mischung aus trockenem Trichlormethan/Acetonitril 9:1 chromatographiert, wobei die Verunreinigungen auf der Säule zurückblieben, und **38a** als einzige Fraktion eluierte. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Vakuum wurde das Carbodiimid **38a** als gelboranges Öl in analysenreiner Form gewonnen.

Ausbeute: 109 mg (0,37 mmol; 74,4 %) **38a**

IR (Film): ν(N-CH_3): 2802 (m); ν(N=C=N): 2127 (vs) cm^{-1}.

Elementaranalyse ($C_{16}H_{29}N_4O$; 293,41):
berechnet: C: 65,50 % H: 9,96 % N: 19,09 %
gefunden: C: 65,21 % H: 10,08 % N: 18,98 %

MS (EI): m/z = 293 (M^+; 6,2 %)

ESR (c = 10^{-4} M in 10 mM Phosphatpuffer pH 7):
HF/MF = 0,85; a_N = 15,82 G; Linienbreite = 1,43 G

5.3.2. Synthese von 47a

N-Cyclohexyl-N'-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-3-yl)-methylthioharnstoff ***(53)***

Ansatz: 1,1 g (5,16 mmol) **52**
0,76 g (7,73 mmol; 0,88 ml) Cyclohexylamin
15 ml trockener Ether

Zu einer Lösung von 1,1 g (5,16 mmol) **52** in 10 ml trockenem Ether wurde 0,76 g (7,73 mmol; 0,88 ml) Cyclohexylamin in 5 ml trockenem Ether gegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Schon nach einer Stunde hatte sich ein gelbes Öl abgeschieden. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde über Nacht weitergerührt und dann der Ether am Vakuum entfernt. Der resultierende Schaum wurde mit 50 ml Pentan digeriert, wobei er sich in ein ein gelbes Pulver umwandelte. Der Feststoff wurde abgesaugt und noch dreimal mit je 30 ml Pentan gewaschen. Danach wurde das Produkt am Ölpumpenvakuum sorgfältig getrocknet. Die so erhaltene Substanz erwies sich als analysenrein.

Ausbeute: 1,55 g (4,96 mmol; 96,2 %) **53**

IR (KBr): ν(NH): 3335 (vs); ν(CSNH): 1544 (vs) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 111-113 ° C

Elementaranalyse ($C_{16}H_{30}N_3OS$, 312,42):
berechnet: C: 61,51 % H: 9,68 % N: 13,44 %
gefunden: C: 61,32 % H: 9,60 % N: 13,39 %

ESR ($c = 10^{-4}$ M in 10 mM Phosphatpuffer pH 7):
HF/MF = 0,85; a_N = 16,16 G; Linienbreite = 1,46 G

N-Cyclohexyl-N'-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-3-yl)-methylcarbodiimid ***(47a)***

Ansatz: 1,5 g (4,8 mmol) **53**
8,32 g (38,4 mmol) HgO_{gelb}
100 ml trockenes Benzol/Pyridin 2:1

8,32 g (38,4 mmol) gelbes Quecksilberoxid wurde zu 1,5 g (4,8 mmol) **53** in 100 ml trockenem Benzol/Pyridin 2:1 gegeben und 90 min refluxiert. Nach dem Abkühlen wurde die Vollständigkeit der Reaktion DC-chromatographisch (Kieselgel; Trichlormethan/Acetonitril 9:1) überprüft. Es war neben nicht umgesetzter Ausgangsverbindung (R_f = 0,31) ein neues Produkt mit R_f = 0,68 entstanden. Der Versuch wurde abgebrochen und die Reaktionsmischung aufgearbeitet. Vom festen Rückstand wurde abfiltriert und das Filtrat am Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das verbleibende Öl wurde an Kieselgel mit einer Mischung aus trockenem Trichlormethan/Acetonitril 9:1 chromatographiert. Auf diese Weise wurde das Carbodiimid **47a** als gelbes Öl gewonnen und die nicht umgesetzte Ausgangsverbindung zurückerhalten.

Ausbeute: 0,12 g **47a** (0,43 mmol; 9 % bezogen auf eingesetzten Thioharnstoff **53**; 33,6 % bezogen auf umgesetzten Thioharnstoff **53**)
1,1 g (3,52 mmol; 73,4 %) nicht umgesetzter Thioharnstoff **53**

IR (Film): ν(N=C=N): 2126 (vs) cm^{-1}.

ESR (c = 10^{-4} M in 10 mM Phosphatpuffer pH 7):
HF/MF = 0,91; a_N = 16,11 G; Linienbreite = 1,37 G

5.3.3. Synthese der 4-N-R-Amino-3-imidazolin-1-oxyle

5.3.3.1. Verbesserte Synthesen der Ausgangsverbindungen 20 und 21

2-N-Hydroxylamino-2-methylpropionaldehydoxim **(20)**

Ansatz: 27,6 g (0,26 mol; 27,1 ml) **55**
69,5 g (1 mol) Hydroxylaminhydrochlorid
34,0 g (0,85 mol) Natriumhydroxid
400 ml techn. Ethanol
250 ml H_2O

69,5 g (1 mol) Hydroxylaminhydrochlorid und 34,0 g (0,85 mol) Natriumhydroxid wurden in jeweils 125 ml Wasser gelöst, die beiden Lösungen zusammengegeben und 400 ml techn. Ethanol hinzugefügt. Dann wurde unter Rühren 27,6 g (0,26 mol) **55** über einen Tropftrichter in dünnem Strahl zugegeben. Die Mischung erwärmte sich auf ca. 50 ° C. Anschließend wurde 5 h refluxiert. Der Alkohol wurde abdestilliert (nicht zu weit destillieren, da das Produkt mit Wasserdampf flüchtig ist!) und die wäßrige Phase nach dem Abkühlen zehnmal mit je 150 ml Ether extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der verbleibende Feststoff am Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 21,2 g (0,18 mol; 69 %) **20**

^{1}H-NMR (DMSO-d_6; 293 K; 400 MHz):
δ = 10,41 (s, 1 H, =N-O-*H*); 7,31 (s, 1 H , *H*-C=N-OH); 7,11 (s, 1 H, NH-O-*H*); 5,55 (s, 1 H, *H*-N-OH); 1,08 (s; 6 H, C*H*$_3$) ppm.

IR (KBr): ν(N-H, O-H): 3300-3100 (br) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 99-100 ° C (aus Ethanol)

Elementaranalyse ($C_4H_{10}N_2O_2$, 118,12):
berechnet: C: 40,67 % H: 8,53 % N: 23,70 %
gefunden: C: 40,66 % H: 8,63 % N: 23,59 %

1-Hydroxy-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazolin-3-oxid ***(21)*** *(vgl. Volodarsky und Kutikova, 1971)*

Ansatz: 19,5 g (0,16 mol) **20**
34,0 g (0,26 mol; 41ml) 2,2-Diethoxypropan
10 g (0,16 mol; 9,5 ml) Eisessig

19,5 g (0,16 mol) **20** wurde in 34,0 g (0,26 mol; 41ml) 2,2-Diethoxypropan suspendiert und unter kräftigem Rühren 10 g (0,16 mol; 9,5 ml) Eisessig zugetropft. Danach wurde die Mischung am Rückfluß erhitzt. Es enstand allmählich eine schwach gelbe Lösung. Nach 15 min wurde die Reaktion abgebrochen. Bei ca. 40 ° C Wasserbadtemperatur wurden die flüchtigen Bestandteile am Vakuum entfernt und der zurückbleibende Brei in 20 ml Ether aufgenommen. Die schmierigen Verunreinigungen gingen in Lösung. Der zurückbleibende weißliche Feststoff wurde abgesaugt und noch zweimal mit je 20 ml Ether gewaschen. Das nach dem Trocknen am Vakuum resultierende Produkt wurde direkt für weitere Umsetzungen verwendet.

Ausbeute: 14,4 g (0,09 mol; 55%) **21**

Schmelzpunkt: 151-152 ° C

^{1}H-NMR (D_2O; 293 K; 60 MHz):
δ= 7,28 (s,1 H, N=C-*H*); 1,48 (s, 6 H, gem C*H*$_3$); 1,35 (s, 6 H, gem C*H*$_3$) ppm.

5.3.3.2. Umsetzung von 22 mit Isocyanaten

Zu einem Äquivalent **22** in trockenem Di- oder Trichlormethan (1 ml pro mmol **22**) wurde die 1,5-fache Menge des jeweiligen Isocyanates gegeben und bei aromatischen Isocyanaten über Nacht, bei aliphatischen Isocyanaten zwei Tage bei Raumtemperatur belassen. Danach wurde das Lösungsmittel am Vakuum entfernt und der Rückstand mehrmals mit Hexan digeriert, um möglichst viel des überschüssigen Isocyanates zu entfernen. Die Hexanextrakte wurden verworfen und der Rückstand jeweils an Kieselgel mit Dichlormethan/Ethylacetat 9:1 (R_f **57** = 0,7; R_f **58** = 0,6) chromatographiert. Auf diese Weise konnten folgende Verbindungen erhalten werden:

3-(4-Chlormethylphenyl)-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-2-oxo-5-oxyl-4,4,6,6-tetramethylimidazo[1,5-b][1,2,4]oxadiazol (57)

Ausbeute: 70,4 %

IR (KBr): ν (C=O Oxadiazolidinon):1751 (vs); ν(C=C-H Aromat): 1610 (m), 1515 (s) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 163,5-164,5 ° C (Zersetzung) (aus Ethylacetat/Hexan 3:1)

Elementaranalyse ($C_{15}H_{19}ClN_3O_3$; 324,82):
berechnet: C: 55,47 % H: 5,90 % N: 12,93 %
gefunden: C: 55,33 % H: 5,88 % N: 12,80 %

ESR ($c = 10^{-4}$ M in Acetonitril):
HF/MF = 0,97; a_N = 14,75 G; Linienbreite = 2,93 G

3-(2-Bromethyl)-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-2-oxo-5-oxyl-4,4,6,6-tetramethyl-imidazo[1,5-b][1,2,4]oxadiazol **(58)**

Ausbeute: 46 %

IR (KBr): ν(C=O Oxadiazolidinon): 1744 (vs) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 111-112 ° C (aus Hexan/Ethylacetat 3:1)

Elementaranalyse ($C_{10}H_{17}BrN_3O_5$; 307,15):
berechnet: C: 39,10 % H: 5,58 % N: 13,67 %
gefunden: C: 38,99 % H: 5,50 % N: 13,40 %

ESR (c = 10^{-4} M in Acetonitril):
HF/MF = 0,97; a_N = 14,70 G; Linienbreite = 2,64 G

5.3.3.3. Darstellung von 39a,d

N-Cyclohexyl-N'-(2-methyl-5-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazolin-4-yl)-phenylamino)-thioharnstoff ***(60)***

Ansatz: 0,39 g (1,3 mmol) **61**
0,26 g (2,6 mmol; 0,30 ml) Cyclohexylamin
10 ml trockenes $CHCl_3$

0,39 g (1,3 mmol) **61** wurde in 10 ml trockenem Trichlormethan gelöst und unter Rühren 0,26 g (2,6 mmol; 0,30 ml) Cyclohexylamin zugegeben. Es wurde noch 15 h bei Raumtemperatur weitergerührt und dann das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Es blieb ein gelber Schaum zurück, der an Kieselgel mit Ethylacetat/Dichlormethan 2:1 chromatographisch aufgereinigt wurde. Es eluierte ausschließlich **60**, die Verunreinigungen blieben auf der Säule zurück.

Ausbeute: 0,30 g (0,75 mmol; 57,7 %) **60**

IR (KBr): ν(N-H): 3366 (vs), 3263 (s); ν(C=N): 1632 (vs); ν(C=C-H Aromat): 1600 (vs); ν(CSNH): 1526 (vs) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 180 ° C

Elementaranalyse ($C_{21}H_{32}N_5OS$; 402,58):
berechnet: C: 62,65 % H: 8,01 % N: 17,40 %
gefunden: C: 62,50 % H: 8,06 % N: 16,48 %

N-Cyclohexyl-N'-(2-methyl-5-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazolin-4-yl)-phenylamino)-carbodiimid ***(39a)***

Ansatz: 0,3 g (0,75 mmol) **60**
1,2 g (5,54 mmol) HgO_{gelb}
16,5 ml trockenes Benzol/Pyridin 2:1

Eine Lösung von 0,3 g (0,75 mmol) **60** in 16,5 ml trockenem Benzol/Pyridin 2:1 wurde mit 1,2 g (5,54 mmol) gelbem Quecksilberoxid versetzt und 1 h am Rückfluß erhitzt. Vom unlöslichen Rückstand wurde abfiltriert und das Filtrat am Vakuum von allen flüchtigen Bestandteilen befreit. Nach Chromatographie an Kieselgel mit einem Gemisch aus trockenem Trichlormethan/Acetonitril im Verhältnis 9:1 (R_f **39a** = 0,64) wurde **39a** als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0,18 g (0,5 mmol; 66 %) **39a**

IR (KBr): ν(NH): 3352 (s), 1548 (vs); ν(N=C=N): 2118 (vs); ν(C=N Amidin): 1635 (vs); ν(C=C-H Aromat): 1603 (vs), 1509 (m) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 177 ° C (Zersetzung) (aus Ethylacetat/Hexan 1:1)

Elementaranalyse ($C_{21}H_{30}N_5O$; 368,50):
berechnet: C: 68,45 % H: 8,21 % N: 19,00 %
gefunden: C: 68,12 % H: 8,20 % N: 18,86 %

MS (EI) : m/z = 369 (M^+; 3,4 %)

ESR (c = 10^{-4} M in 10 mM Phosphatpuffer pH 7):
HF/MF = 0,81; a_N = 15,77 G; Linienbreite = 0,98 G

N-Cyclohexyl-N'-(2-methyl-5-(2,3,3a,4,5,6-hexahydro-2-oxo-5-oxyl-4,4,6,6-tetramethylimidazo[1,5-b][1,2,4]oxadiazol-3-yl)-phenyl)harnstoff ***(62)***

Ansatz: 1,14 g (3,4 mmol) **56**
0,8 ml (6,8 mmol; 0,64 g) Cyclohexylamin
10 ml trockenes $CHCl_3$

1,14 g (3,4 mmol) **56** wurde im 10 ml trockenem Trichlormethan suspendiert und unter Umschwenken 0,8 ml (6,8 mmol; 0,64 g) Cyclohexylamin zugegeben. Es entstand fast augenblicklich eine klare, rote Lösung. Diese wurde noch 2 h bei Raumtemperatur belassen und dann das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Es verblieb ein öliger, zäher, roter Rückstand, der dreimal mit je 10 ml Pentan digeriert wurde, um möglichst viel des überschüssigen Cyclohexylamins auszuwaschen. Durch diese Vorgehensweise wurde eine Substanz pulvriger Konsistenz erhalten. Diese wurde abgesaugt und noch mit reichlich Pentan nachgewaschen. Die Substanz wurde an Kieselgel Flash-chromatographiert (Eluens: Trichlormethan/ Ethylacetat 3:1). Es eluierte ausschließlich **62**, die Verunreinigungen blieben auf der Säule zurück. Nach Abziehen des Lösungsmittels verblieb ein Schaum im Kolben zurück, der nach zweimaligem Digerieren mit je 10 ml Pentan zu einem rosa orangen Pulver zerfiel.

Ausbeute: 1,27 g (2,95 mmol; 86,8 %) **62**

IR (KBr): ν(N-H): 3393 (s), 1530 (vs); ν(C=O Oxadiazolidinon): 1761 (vs): ν(C=O Amid): 1702 (vs); ν(C=C-H Aromat): 1586 (m) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 172-173 ° C (aus Ethylacetat)

Elementaranalyse ($C_{22}H_{32}N_5O_4$; 430,50):
berechnet: C: 61,38 % H: 7,50 % N: 16,26 %
gefunden: C: 60,59 % H: 7,38 % N: 15,95 %

ESR (c = 10^{-4} M Acetonitril):
HF/MF = 0,95; a_N = 14,84 G; Linienbreite = 2,64 G

*N-Cyclohexyl-N'-(2-methyl-5-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazolin-4-yl)-phenylamino)-harnstoff **(39d)***

Ansatz: 0,6 g (1,4 mmol) **62**
0,4 g (7 mmol) KOH
5 ml techn. Ethanol

0,4 g (7 mmol) KOH wurde in 5 ml techn. Ethanol gelöst und 0,6 g (1,4 mmol) **62** zugegeben. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wurde der Alkohol abgezogen und der Rückstand mit 15 ml Wasser versetzt. Es wurde mit 5 M HCl auf pH = 7 gebracht und die wäßrige Phase zweimal mit je 20 ml Trichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet. Der nach Abfiltrieren und Abziehen des Lösungsmittels verbleibende Rückstand wurde an Kieselgel mit Dichlormethan/Ethylacetat 1:1 als Eluens chromatographiert. Es eluierte ausschließlich **39d**, die Verunreinigungen blieben auf der Säule zurück. **39d** fiel in Form einer zähen gelben Substanz an, die nach Anreiben mit Pentan zu einem gelben Pulver zerfiel.

Ausbeute: 0,17 g (0,45 mmol; 32,1 %) **39d**

IR (KBr): ν(N-H): 3387 (m), 3259 (s), 3199 (m), 1544 (vs); ν(C=O): 1663 (vs); ν(C=N): 1626 (vs); ν(C=C-H Aromat): 1605 (vs) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 226-226,5 ° C (aus Ethylacetat)

Elementaranalyse ($C_{21}H_{32}N_5O_2$; 386,49):
berechnet: C: 65,26 % H: 8,35 % N: 18,11 %
gefunden: C: 65,05 % H: 8,27 % N: 17,98 %

ESR (c = 10^{-4} M in 10 mM Phosphatpuffer pH 6):
HF/MF = 0,63; a_N = 15,69 G; Linienbreite = 1,14 G
pH 3: HF/MF = 0,68; a_N = 14,89 G; Δa_N = 0,8 G;
Linienbreite = 1,33 G
pK_a = 4,75 ± 0,25

5.3.3.4. Versuch der Synthese von 44a-d

*3-(2-Azidoethyl)-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-2-oxo-5-oxyl-4,4,6,6-tetramethylimidazo [1,5-b][1,2,4]oxadiazol **(67)***

Ansatz: 0,31 g (1 mmol) **58**
0,13 g (2 mmol) NaN_3
0,05 g (0,15 mmol) Tetrabutylammoniumbromid
5 ml CH_2Cl_2
3 ml H_2O

Zu einem Gemisch aus 5 ml Dichlormethan und 3 ml Wasser wurde 0,31 g (1 mmol) **58**, 0,13 g (2 mmol) Natriumazid und 0,05 g (0,15 mmol) Tetrabutylammonium-

bromid gegeben und unter kräftigem Rühren refluxiert. Der Reaktionsverlauf wurde DC-chromatographisch verfolgt (Kieselgel; Dichlormethan/Ethylacetat 9:1; **58**: R_f = 0,65; **67**: R_f = 0,60). Nach 4 h war die Ausgangsverbindung vollständig umgesetzt. Nach dem Abkühlen wurde die organische Phase abgetrennt, die wäßrige Phase noch zweimal mit je 5 ml Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Der nach Abfiltrieren und Abziehen des Lösungsmittels verbleibende Rückstand wurde an Kieselgel mit Dichlormethan/ Ethylacetat 5:1 chromatographiert.

Ausbeute: 0,21 g (0,78 mmol; 78 %) **67**

IR (KBr): $\nu(N_3)$: 2100 (s); ν(C=O Oxadiazolidinon): 1757 (vs) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 93,5-94,5 ° C (aus Hexan/Ethylacetat 5:1)

Elementaranalyse ($C_{10}H_{17}N_6O_5$; 269,25):
berechnet: C: 44,61 % H: 6,36 % N: 31,20 %
gefunden: C: 44,63 % H: 6,38 % N: 30,67 %

ESR ($c = 10^{-4}$ M Acetonitril):
HF/MF = 0,97; a_N = 14,75 G; Linienbreite = 2,54 G

*Umsetzung von **58** mit Natriumazid unter phasentransferkatalytischen Bedingungen in einem Benzol/Wasser Gemisch*

Ansatz: 0,5 g (1,63 mmol) **58**
0,21 g (3,25 mmol) NaN_3
0,052 g (0,16 mmol) Tetrabutylammoniumbromid
5 ml Benzol
1,5 ml H_2O

Die Durchführung des Versuchs erfolgte wie für die Umsetzung im Dichlormethan/Wasser System beschrieben. Die Aufarbeitung erfolgte durch Chromatographie an Kieselgel. **67** wurde als erste Fraktion mit Dichlormethan/ Ethylacetat eluiert. Danach wurde **63** als zweite Fraktion mit Ethylacetat eluiert. Die Produkte wurden anhand ihrer IR-Spektren identifiziert.

Ausbeute: 0,17 g (0,63 mmol; 39 %) **67**
0,04 g (0,18 mmol; 13 %) **63**

3-(2-Cyanethyl)-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-2-oxo-5-oxyl-4,4,6,6-tetramethylimidazo [1,5-b][1,2,4]oxadiazol *(68)*

Ansatz: 0,5 g (1,63 mmol) **58**
0,2 g (4,1 mmol) NaCN
0,05 g (0,15 mmol) Tetrabutylammoniumbromid
15 ml CH_2Cl_2
3 ml H_2O

Der Versuch wurde wie für **67** beschrieben durchgeführt. Die Reaktion war nach 15 h beendet. Das Produkt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Ethylacetat 5:1 als Eluens aufgereinigt. Es eluierte ausschließlich **68**, die Verunreinigungen blieben auf der Säule zurück.

Ausbeute: 0,35 g (1,38 mmol; 84,7 %) **68**

IR (KBr): ν(CN): 2251 (w); ν(C=O Oxadiazolidinon): 1758 (vs) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 161-162 ° C (aus Ethylacetat/Hexan 3:2)

Elementaranalyse ($C_{11}H_{17}N_4O_3$; 253,26):
berechnet: C: 52,17 % H: 6,77 % N: 22,11 %
gefunden: C: 52,42 % H: 6,60 % N: 21,94 %

ESR (c = 10^{-4} M Acetonitril):

HF/MF = 0,97; a_N = 14,70 G; Linienbreite = 2,73 G

*4-(2-Azidoethyl)amino-1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazolin **(63)***

Ansatz: 1 g (3,3 mmol) **58**
0,42 g (6,6 mmol) NaN_3
20 ml DMF/H_2O 10:1

1 g (3,3 mmol) **58** und 0,42 g (6,6 mmol) Natriumazid wurden in 20 ml DMF/H_2O 10:1 gegeben und 5 h im Ölbad erhitzt (Ölbadtemperatur ~110° C, kontrolliert durch Kontaktthermometer !). Nach dem Abkühlen wurden die flüchtigen Bestandteile am Vakuum entfernt und der Rückstand an Kieselgel mit Trichlormethan/Methanol 15:1 als Eluens chromatographiert. Als einzige Substanz eluierte **63**, während die Verunreinigungen auf der Säule zurückblieben. **63** wurde in Form eines gelben Feststoffes erhalten.

Ausbeute: 0,53 g (2,35 mmol; 71,3 %) **63**

IR (KBr): ν(N-H): 3363 (vs), 1545 (s); $\nu(N_3)$: 2105 (vs); ν(C=N): 1627 (vs) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 86,5-88 ° C (aus Hexan/Ethylacetat 5:1)

Elementaranalyse ($C_9H_{17}N_6O$; 225,24):
berechnet: C: 48,00 % H: 7,64 % N: 37,29 %
gefunden: C: 47,54 % H: 7,69 % N: 37,21 %

ESR (c = 10^{-4} M in 10 mM Phosphatpuffer pH 7):

HF/MF = 0,85; a_N = 15,77 G; Linienbreite = 0,98 G

*Versuch der Darstellung von 4-(2-Isothiocyanatoethyl)amino-1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazolin **(64)***

Ansatz: 0,25 g (1,1 mmol) **63**
0,44 g (1,7 mmol) PPh_3
3 ml trockenes THF

0,25 g (1,1 mmol) **63** wurde in 3 ml trockenem THF gelöst und 0,44 g (1,7 mmol) Triphenylphosphan zugegeben. Anschließend wurde 90 min am Rückfluß erhitzt. Nach dieser Zeit war keine Ausgangsverbindung mehr in der Reaktionslösung vorhanden (DC-Kontrolle an Kieselgel; Laufmittel: Acetonitril; **63**: R_f = 0,63; **69**: R_f ~ 0). Das THF wurde am Vakuum abgezogen, der klebrige Rückstand zweimal mit je 3 ml Hexan extrahiert und die flüchtigen Bestandteile am Vakuum entfernt. Es verblieb 0,42 g (0,92 mmol; 83,1 %) Rohprodukt in Form einer zähen, klebrigen Masse. Es wurde direkt weiter umgesetzt.

Ansatz: 0,42 g (0,92 mmol) **69**
3 ml CS_2

Zu den oben erhaltenen 0,42 g (0,92 mmol) **69** wurde 3 ml Schwefelkohlenstoff gegeben und refluxiert. Nach kurzer Zeit hatte sich ein schmieriger Feststoff gebildet, der durch Zugabe von Dichlormethan in Lösung gebracht wurde. Insgesamt wurde 2 h refluxiert. DC-Kontrolle (an Kieselgel; Laufmittel: Acetonitril; **69**: R_f ~ 0; **70a**: R_f = 0,74) zeigte das Verschwinden der Ausgangsverbindung zugunsten einer neuen Verbindung. Die flüchtigen Bestandteile wurden am Vakuum entfernt und der Rückstand mittels PSC an Kieselgel mit Dichlormethan/Acetonitril 3:2 als Eluens aufgereinigt. Das so erhaltene Produkt lag in Form eines zitronengelben feinpulvrigen Feststoffes vor.

Ausbeute: 77 mg (0,32 mmol; 34,8 %) **70a**

IR (KBr): ν(N-H): 3296 (s); ν(C=N): 1581 (vs) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 140-141 ° C (Zersetzung)

Elementaranalyse ($C_{10}H_{17}N_4OS$; 241,25):

berechnet: C: 49,79 % H: 7,10 % N: 23,21 %

gefunden: C: 49,84 % H: 7,04 % N: 23,01 %

ESR (c = 10^{-4} M in 10 mM Phosphatpuffer pH 7):

HF/MF = 0,89; a_N = 15,63 G; Linienbreite = 0,98 G

*3-(2-Isothiocyanatoethyl)-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-2-oxo-5-oxyl-4,4,6,6-tetramethylimidazo[1,5-b][1,2,4]oxadiazol **(71)***

Ansatz: 49,8 mg (0,19 mmol) **67**

72,8 mg (0,28 mmol) PPh_3

5 ml trockener Ether

3 ml CS_2

Zu 49,8 mg (0,19 mmol) **67** in 5 ml trockenem Ether wurde 72,8 mg (0,28 mmol) Triphenylphosphan gegeben und 90 min am Rückfluß erhitzt. DC-Kontrolle (Kieselgel; Dichlormethan/Ethylacetat 5:1) zeigte, daß nach dieser Zeit das Edukt (R_f = 0,54) vollständig umgesetzt und eine neue Komponente mit R_f = 0 entstanden war. Der Ether wurde am Vakuum entfernt, 3 ml Schwefelkohlenstoff zugefügt und 1 h refluxiert. Die Lösung enthielt nun eine Komponente mit R_f = 0,57. Der Schwefelkohlenstoff wurde abgezogen und der Rückstand an Kieselgel mit Dichlormethan/Ethylacetat 5:1 als Eluens chromatographiert. Es resultierte ein klebriger, rotoranger Feststoff.

Ausbeute: 33,7 mg (0,12 mmol; 62,2 %) **71**

IR (KBr): ν(N=C=S): 2201 (m), 2117 (s); ν(C=O Oxadiazolidinon): 1754 (vs) cm^{-1}.

*Versuch der Darstellung von **44a-c** über das Triethylphosphinimin **65***

1) Erzeugung des Phosphinimins **65** in THF-Lösung:

Ansatz: 0,33 g (1,33 mmol) **63**
1,36 ml (1,36 mmol) 1 M PEt_3-Lösung in THF
5 ml trockenes THF

In einer Argonatmosphäre wurde 0,33 g (1,33 mmol) **63** in 5 ml trockenem THF gelöst und unter Rühren bei Raumtemperatur 1,36 ml einer 1 M Lösung von Triethylphosphan in THF zugetropft. Es begann sofort eine lebhafte Gasentwicklung. Nach 40 min Rühren bei Raumtemperatur wurde noch 20 min auf 40 ° C erwärmt. Nach dem Abkühlen war die Lösung gebrauchsfertig.

2) In situ Umsetzung der Lösungen von **65** mit den folgenden Reagenzien:

A) Cyclohexylisothiocyanat

Zur Lösung von 0,14 g (0,44 mmol) **65** in THF wurde unter Rühren eine Lösung von 0,08 g (0,57 mmol; ~ 80 µl) Cyclohexylisothiocyanat in 2 ml trockenem THF getropft und dann noch über Nacht weitergerührt. Nach dieser Zeit wurde direkt aus der Reaktionslösung eine Probe entnommen und ein IR-Spektrum aufgenommen. Es war deutlich die Carbodiimidabsorption bei ν = 2124 cm^{-1} zu beobachten. Auf der DC (Aluminiumoxid; Acetonitril) war ein langgezogener Fleck zu erkennen (Rf = 0-0,43). Das THF wurde am Vakuum entfernt und der Rückstand an Aluminiumoxid mit Acetonitril als Laufmittel chromatographiert. Es resultierte ein blaßgelber Feststoff. Die spektroskopischen Daten deuten auf das Vorliegen von **72** hin.

Ausbeute: 0,07 g (0,23 mmol; 52,2 %) **72**

IR (KBr): ν(NH): 3256 (m), 1535 (vs); ν(C=N Guanidin): 1661 (vs); ν(C=N Amidin): 1596 (s) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 140-142 ° C (Hexan/Ethylacetat 4:1)

Elementaranalyse ($C_{16}H_{28}N_5O$; 306,40):

berechnet: C: 62,72 % H: 9,21 % N: 22,85 %

gefunden: C: 61,58 % H: 9,20 % N: 22,49 %

ESR (c = 10^{-4} M in 10 mM Phosphatpuffer pH 7):

HF/MF = 0,75; a_N = 15,54 G; Linienbreite = 1,03 G

B) Iodessigsäure

Zur Lösung von 0,25 g (0,79 mmol) **65** in THF wurde unter Rühren eine Lösung von 0,22 g (0,12 mmol) Iodessigsäure in 3 ml trockenem THF getropft und dann noch über Nacht weitergerührt. DC-Kontrolle (s. A)) zeigte eine langgezogene Spur mit mehreren kleinen Punkten. Dies deutete wenn nicht gar auf Zersetzung, so doch auf ein komplexes Reaktionsgemisch hin.
Der Versuch wurde daraufhin aufgegeben.

C) Maleinsäureanhydrid

Zur Lösung von 0,14 g (0,44 mmol) **65** in THF wurde unter Rühren eine Lösung von 0,054 g (0,55 mmol) Maleinsäureanhydrid in 2 ml trockenem THF getropft. Es hatte sich sofort eine rote Lösung gebildet, aus der sich nach kurzem Stehen ein braunschwarzer Teer abschied. DC-Kontrolle (s. A)) zeigte eine langgezogene Spur, es waren keine auswertbaren Markierungen zu erkennen.
Der Versuch wurde daraufhin abgebrochen.

D) Maleinsäure

Zur Lösung von 0,15 g (0,47 mmol) **65** in THF wurde unter Rühren eine Lösung von 0,09 g (0,77 mmol) Maleinsäure in 2 ml trockenem THF getropft und über Nacht weitergerührt. DC-Kontrolle (RP-18; Aceton/Wasser 2:1) zeigte neben geringen Verunreinigungen bei R_f = 0-0,2 und R_f = 1 eine einzige Verbindung mit R_f = 0,72. Die Reaktionslösung wurde am Vakuum vom THF befreit und an Sephadex LH20 mit Wasser als Eluens chromatographiert. Durch mehrmaliges Auflösen in Toluol, Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und anschließendes Trocknen am Ölpumpenvakuum wurde ein zäher, klebriger, gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0,09 g (0,30 mmol; 64 %) **73**

IR (KBr): ν(NH; OH): 3295 (s); ν(C=O Carbonsäure): 1731 (vs); ν(C=O Amid): 1688 (m); ν(NH def): 1596 (vs); ν(C=C cis 1,2 disubstituierte Doppelbindung mit zusätzlicher Konjugation): 876, 864 (m) cm^{-1}.

ESR ($c = 10^{-4}$ M in 10 mM Phosphatpuffer pH 7):
HF/MF = 0,85; a_N = 15,82 G; Linienbreite = 0,98 G

5.3.3.5. Darstellung von 77

*3-(4-Azidomethylphenyl)-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-2-oxo-5-oxyl-4,4,6,6-tetramethylimidazo[1,5-b][1,2,4]oxadiazol **(75)***

Ansatz: 1,14 g (3,44 mmol) **57**
0,56 g (8,6 mmol) NaN_3
25 ml Aceton
2,5 ml H_2O

1,14 g (3,44 mmol) **57** wurde in 25 ml Aceton gelöst und 0,56 g (8,6 mmol) Natriumazid in 2,5 ml H_2O zugegeben. Die Mischung wurde 4 h am Rückfluß erhitzt. Das Aceton wurde am Vakuum abgezogen und zum Rückstand 40 ml Wasser hinzugefügt. Die wäßrige Phase wurde mit 40 ml Trichlormethan extrahiert, die organische Phase mit 40 ml Wasser gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Der nach Abfiltrieren und Abziehen des Chloroforms verbleibende Rückstand wurde an Kieselgel mit Dichlormethan/Ethylacetat 9:1 als Laufmittel chromatographiert (R_f **75** = 0,7).

Ausbeute: 0,88 g (2,66 mmol; 77,2 %) **75**

IR (KBr): $\nu(N_3)$: 2097 (vs); ν(C=O Oxadiazolidinon); 1754 (vs); ν(C=C-H Aromat): 1614 (w), 1519 (vs) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 148-149 ° C (aus Hexan/Ethylacetat 3:1)

Elementaranalyse ($C_{15}H_{19}N_6O_3$; 331,32):
berechnet: C: 54,38 % H: 5,78 % N: 25,35 %
gefunden: C: 54,38 % H: 5,80 % N: 25,10 %

ESR ($c = 10^{-4}$ M in Acetonitril):
HF/MF = 0,97; a_N = 14,79 G; Linienbreite = 2,73 G

*4-(4-Azidomethylphenyl)amino-1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazolin **(76)***

Ansatz: 2,31 g (7,1 mmol) **57**
0,92 g (14,2 mmol) NaN_3
50 ml DMF/H_2O 10:1

2,31 g (7,1 mmol) **57** und 0,92 g (14,2 mmol) Natriumazid wurden in 50 ml DMF/H_2O 10:1 gegeben und 2 h im Ölbad (Ölbadtemperatur ca.150 ° C) erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die flüchtigen Bestandteile bei ca. 40° C (Wasserbadtemperatur)

am Vakuum entfernt und der Rückstand in 40 ml Wasser aufgenommen, wobei ein gelber Niederschlag entstand. Die wäßrige Phase wurde zweimal mit je 40 ml Trichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Abfiltrieren und Abziehen des Lösungsmittels verblieb ein gelber Feststoff, der säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Ethylacetat 3:1 gereinigt wurde. Als einzige Substanz eluierte **76**, während die Verunreinigungen auf der Säule zurückblieben.

Ausbeute: 1,7 g (5,92 mmol; 83,3 %) **76**

IR (KBr): ν(N-H): 3312 (vs), 1547 (vs); $\nu(N_3)$: 2094 (vs); ν(C=N): 1637 (vs); ν(C=C-H Aromat): 1603 (vs), 1515 (s) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 170,5-171,5 ° C (aus Ethylacetat/Hexan 3:1)

Elementaranalyse ($C_{14}H_{19}N_6O$; 287,31):
berechnet: C: 58,53 % H: 6,67 % N: 29,24 %
gefunden: C: 58,58 % H: 6,74 % N: 29,52 %

ESR ($c = 10^{-4}$ M in 10 mM Phosphatpuffer pH 7):
HF/MF = 0,80; a_N = 15,77 G; Linienbreite = 1,07 G

*3-(4-Isothiocyanatomethylphenyl)-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-2-oxo-5-oxyl-4,4,6,6-tetramethylimidazo[1,5-b][1,2,4]oxadiazol **(77)***

Ansatz: 0,5 g (1,51 mmol) **75**
0,59 g (2,26 mmol) PPh_3
5 ml trockenes CH_2Cl_2
5 ml CS_2

0,5 g (1,51 mmol) **75** und 0,59 g (2,26 mmol) Triphenylphosphan wurden in 5 ml trockenem Dichlormethan gelöst und solange refluxiert, bis nach DC-Kontrolle

(Kieselgel; Trichlormethan) keine Ausgangsverbindung mehr in der Reaktionslösung nachzuweisen war. Dann wurde 5 ml Schwefelkohlenstoff zugegeben und noch 90 min weiter refluxiert. Anschließend wurden die flüchtigen Bestandteile am Vakuum entfernt und der Rückstand an Kieselgel mit Trichlormethan als Laufmittel chromatographiert. Als erste Fraktion (R_f = 1) eluierte Triphenylphosphinsulfid, als zweite (R_f = 0,9) das gewünschte Produkt **77**.

Ausbeute: 0,16 g (0,46 mmol; 30,5 %) **77**

IR (KBr): ν(N=C=S): 2181 (s), 2102 (s); ν(C=O Oxadiazolidinon): 1753 (vs); ν(C=C-H Aromat): 1614 (w), 1519 (s) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 112-114 ° C (aus Hexan/Ethylacetat 3:1)

Elementaranalyse ($C_{16}H_{19}N_4O_3S$; 347,33):
berechnet: C: 55,33 % H: 5,51 % N: 16,12 %
gefunden: C: 55,35 % H: 5,59 % N: 15,74 %

ESR (c = 10^{-4} M in 10 mM Phosphatpuffer pH 7):
HF/MF = 0,96; a_N = 14,84 G; Linienbreite = 2,73 G

5.3.4. Darstellung von 4-N,N-R,R'-3-imidazolinen

5.3.4.1. Aromatische Vertreter

*4-N-(2-Hydroxyethyl)-N-phenylamino-1,2,2,5,5-pentamethyl-3-imidazolin **(86)***

Ansatz: 0,64 g (2 mmol) **31**
0,046 g (1,2 mmol) $LiAlH_4$
10 ml trockenes THF

In einer Argonatmosphäre wurde 0,046 g (1,2 mmol) Lithiumaluminiumhydrid in 5 ml trockenem Tetrahydrofuran gelöst und unter Rühren bei Raumtemperatur 0,64 g (2 mmol) **31** in 5 ml trockenem Tetrahydrofuran innerhalb von 20 min zugetropft. Anschließend wurde noch 3 h weitergerührt. Dann wurde 0,5 ml Ethylacetat zugegeben, 5 min weitergerührt und dann 0,5 ml Wasser zugegeben. Die flüchtigen Bestandteile wurden am Vakuum abgezogen und der Rückstand dreimal mit je 5 ml Dichlormethan extrahiert. Vom festen Rückstand wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde eingeengt und das resultierende Rohprodukt mittels PSC an Aluminiumoxid mit Trichlormethan/Ether 3:1 als Eluens aufgereinigt. Als einzige Substanz eluierte **86**, während die Verunreinigungen am Auftragungsort zurückblieben.

Ausbeute: 0,45 g (1,63 mmol; 81,7 %) **86**

^{1}H-NMR (CD_2Cl_2; 293 K; 400 MHz):

δ = 7,46 – 7,31 (m, 5 H, Phenyl-*H*); 3,80 (m, 4 H, AA'BB' System C*H*$_2$-C*H*$_2$); 2,25 (s, 3 H, N-C*H*$_3$); 1,32 (s, 6 H, gem C*H*$_3$); 0,94 (s, 6 H, gem C*H*$_3$) ppm.

IR (KBr): ν (OH): 3206 (m, br), ν(N-CH_3): 2806 (m); ν(*C*=N): 1605 (vs) ν(C=C-H Aromat): 1590 (vs), 1496 (s) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 97-98 ° C (aus Hexan)

Elementaranalyse ($C_{16}H_{25}N_3O$; 275,38):

berechnet: C: 69,79 % H: 9,15 % N: 15,25 %

gefunden: C: 69,63 % H: 9,22 % N: 15,44 %

*Versuch der Synthese von 4-N-(2-Azidoethyl)-N-phenylamino-1,2,2,5,5 pentamethyl-3-imidazolin **(88)***

Ansatz: 0,15 g (0,54 mmol) **86**
0,095 g (0,54 mmol; 0,086 ml) Azodicarbonsäurediethylester
0,15 g (0,54 mmol; 0,12 ml) Phosphorsäurediphenylesterazid
0,14 g (0,54 mmol) PPh_3
10 ml trockenes THF

In einer Argonatmosphäre wurden 0,095 g (0,54 mmol; 0,086 ml) Azodicarbonsäurediethylester und 0,14 g (0,54 mmol) Triphenylphosphan in 4 ml trockenem THF vorgelegt und unter Rühren 0,15 g (0,54 mmol) **86** in 3 ml trockenem THF zugetropft. Direkt in Anschluß wurde 0,15 g (0,54 mmol; 0,12 ml) Phosphorsäurediphenylesterazid in 3 ml trockenem THF zugetropft und noch 20 h bei Raumtemperatur weitergerührt, wobei sich die Lösung allmählich entfärbte. Nach dieser Zeit wurde das THF am Vakuum entfernt und der Rückstand mittels PSC an neutralem Aluminiumoxid mit Trichlormethan/Methanol 9:1 als Laufmittel aufgereinigt. Es eluierten zwei Fraktionen. Die zweite Fraktion enthielt das Folgeprodukt von **86**, dessen spektroskopische Daten am besten mit der Struktur des Salzes 1,2,3,5,6,7 Hexahydro-5,5,6,7,7,-pentamethyl-1,5H-imidazo[1,5a]imidazoliumazid **88a** in Einklang gebracht werden können.

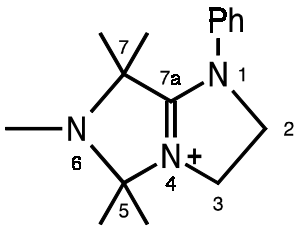
Ausbeute: 0,12 g (0,40 mmol; 74,0 %) **88a**

IR (Film): ν(OH): 3396 (vs, br); $\nu(N_3)$: 2023 (m); ν(C=N): 1634 (vs); ν(C=C-H Aromat): 1594 (s), 1493 (m) cm^{-1}.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$; 293 K; 400 MHz):
δ = 7,56 (m, 5 H, Phenyl-C*H*); 4,84 (m, 2 H, 3-CH_2); 4,29 (m, 2 H, 2-CH_2); 2,24 (s, 3 H, N-CH_3); 1,48 (s, 6 H, gem-CH_3); 1,19 (s, 6 H, gem-CH_3) ppm.

^{13}C-NMR ($CDCl_3$; 293 K; 100 MHz):

δ = 171,43 (s, C-7a); 134,01 (s, C-ipso); 130,03 (d, *J* = 162,2 Hz, C-para); 129,71 (d, *J* = 171,5 Hz, C-meta); 127,74 (d, *J* = 158,2 Hz, C-ortho); 79,26 (s, C-5); 60,43 (s, C-7); 60,15 (t, *J* = 151,3 Hz, C-3); 42,04 (t, *J* = 150,1 Hz, C-2); 26,02 (q, *J* = 134,8 Hz, H_3C-N-6); 23,67 (q, *J* = 128,0 Hz, $(H_3C)_2$C-5); 22,51 (q, *J* = 129,2 Hz, $(H_3C)_2$C-7) ppm.



2,3,3a,4,5,6-Hexahydro-3-(4-methoxyphenyl)-4,4,5,6,6-pentamethyl-2-thioxoimidazo[1,5-b][1,2,4]oxadiazol ***(80)***

Ansatz: 0,5 g (3,2 mmol) **27**
0,8 g (4,8 mmol; 0,64 ml) 4-Methoxyphenylisothiocyanat
5 ml trockenes CH_2Cl_2

0,5 g (3,2 mmol) **27** wurde in 5 ml trockenem Dichlormethan gelöst und 0,8 g (4,8 mmol; 0,64 ml) 4-Methoxyphenylisothiocyanat zugegeben. Nach kräftigem Schütteln wurde die Reaktionsmischung 3 d bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Vakuum abgezogen und das resultierende Öl zweimal mit je 20 ml Petrolether extrahiert. Der verbleibende Rückstand wurde an Kieselgel mit Dichlormethan/Ethylacetat 9:1 chromatographiert. **80** eluierte als zweite Fraktion (R_f = 0,84) nach dem restlichen 4-Methoxyphenyl-isothiocyanat (R_f ~ 1). **80** fiel in Form eines farblosen, zähen Öls an, das durch Animpfen mit kristallinem **80** schnell kristallisierte. Das kristalline **80** war durch

Umkristallisieren aus Hexan/Ethylacetat 4:1 und Anreiben der noch halbwarmen Lösung mit einem Glasstab gewonnen worden.

Ausbeute: 0,75 g (2,33 mmol; 73 %) **80**

^{1}H-NMR ($CDCl_3$; 293 K; 400 MHz):

δ = 7,25 (m, 4 H, Aryl-*H*); 5,45 (s, 1 H, C*H*); 3,82 (s, 3 H, O-C*H*$_3$); 2,27 (s, 3 H, N-C*H*$_3$); 1,51; 1,23; 1,082; 1,076 (4 s, je 3 H, gem-C*H*$_3$) ppm.

IR (KBr): Die gemessene Probe zeigte im wesentlichen die Banden der Amidinverbindung **82**. Es war keinerlei Absorption im Bereich der Carbonylabsorptionen der Oxadiazolidinone zu erkennen. Eine starke Absorption bei ν = 1288 cm^{-1}, die im Amidin **82** fehlt, rührt möglicherweise von der C=S-Bindung von restlichem Oxadiazolidinthion her.

Schmelzpunkt: 78-81 ° C (aus Hexan/Ethylacetat 4:1)

Elementaranalyse ($C_{16}H_{23}N_3O_2S$; 321,26):
berechnet: C: 59,80 % H: 7,21 % N: 13,07 %
gefunden: C: 59,52 % H: 7,13 % N: 12,92 %

*4-(4-Methoxyphenyl)amino-1,2,2,5,5-pentamethyl-3-imidazolin **(82)***

Ansatz: 0,7 g (2,2 mmol) **80**
4,4 ml (4,4 mmol) 1 M NaOMe in MeOH

0,7 g (2,2 mmol) **80** wurde mit 4,4 ml (4,4 mmol) 1 M Natriummethylat in Methanol übergossen und bei Raumtempetatur so lange gerührt, bis nach DC-Kontrolle (Kieselgel; Dichlormethan/Ethylacetat 5:1) kein Edukt mehr in der Reaktionslösung mehr vorhanden war (~4 h). Das Methanol wurde abgezogen und der Rückstand mit

2 %-iger Schwefelsäure auf pH = 1 gebracht. Es wurde zweimal mit je 10 ml Dichlormethan extrahiert, die organischen Phasen verworfen und die wäßrige Phase mit Kaliumcarbonat gesättigt. Die wäßrige Phase wurde dreimal mit je 10 ml Dichlormethan extrahiert und die vereinigten Extrakte über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abfiltrieren und Entfernen des Lösungsmittels am Vakuum verblieb ein weißer Feststoff.

Ausbeute: 0,5 g (1,91 mmol; 87%) **82**

^{1}H-NMR ($CDCl_3$; 293 K; 400 MHz):

δ = 7,18 (m, 4 H, Aryl-*H*, Tieffeld Teil stark verbreitert); 5,60; 4,91 (br, je 0,5 H, N-*H*); 3,76 (s, 3 H, O-C*H*$_3$); 2,33 (s, 3 H, N-C*H*$_3$); 1,28 (s, br, 12 H, gem C*H*$_3$) ppm.

IR (KBr): ν(N-H): 3392 (s), 1539 (vs); ν(O-CH_3): 2841 (w); ν(N-CH_3): 2803 (w); ν(C=N): 1639 (vs); ν(C=C-H Aromat): 1602 (w), 1508 (vs) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 136-137 ° C (aus Heptan)

Elementaranalyse ($C_{15}H_{23}N_3O$; 261,35):

berechnet: C: 68,94 % H: 8,84 % N: 16,07 %

gefunden: C: 68,76 % H: 8,87 % N: 16,18 %

*4-Methoxyphenylamino-1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazolin **(85)***

Ansatz: 0,2 g (0,77 mmol) **82**
0,05 g (0,15 mmol) Na_2WO_4
1,5 ml 30 %-iges H_2O_2
3 ml Methanol

Zu einer Mischung aus 3 ml Methanol und 1,5 ml 30 %-igem Wasserstoffperoxid wurde 0,2 g (0,77 mmol) **82** und 0,05 g (0,15 mmol) Natriumwolframat gegeben und 8 h bei 50 ° C gehalten. DC-Kontrolle (Aluminiumoxid, Ether/Hexan 1:1) zeigte, daß nach dieser Zeit die Ausgangsverbindung komplett umgesetzt war. Die Reaktionslösung wurde dreimal mit je 5 ml Dichlormethan und die organische Phase anschließend zweimal mit 3 %-iger Salzsäure extrahiert. Die sauren Extrakte wurden mit Kaliumcarbonat auf pH ~ 8 gebracht und dreimal mit je 5 ml Dichlormethan extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und über Kaliumcarbonat getrocknet. Der nach Abziehen des Lösungsmittels verbleibende Rückstand wurde mittels PSC an neutralem Aluminiumoxid mit Ether/Hexan 1:1 als Laufmittel aufgereinigt. Die zweite Fraktion wurde isoliert, evaporiert und der verbleibende Rückstand mit Pentan digeriert. Es verblieb ein gelbes Pulver.

Ausbeute: 0,05 g (0,19 mmol; 24,8 %) **85**

IR-(KBr): ν(NH): 3312 (s), 1553 (s); $\nu(OCH_3)$: 2836 (w); ν(C=N): 1630 (vs); ν(C=C-H Aromat): 1602 (s), 1515 (vs) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 200-202 ° C (aus Ethylacetat/Hexan 2:1)

Elementaranalyse ($C_{14}H_{20}N_3O_2$; 262,31):
berechnet: C: 64,11 % H: 7,69 % N: 16,01 %
gefunden: C: 60,38 % H: 7,19 % N: 14,64 %

ESR (c = 10^{-4} M in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,5):

HF/MF = 0,73; a_N = 15,69 G; Linienbreite = 1,07 G

pH 3,2: HF/MF = 0,79; a_N = 14,89 G; Δa_N = 0,8 G;

Linienbreite = 1,22 G

pK_a = 4,8 ± 0,1

*4-N-Ethoxycarbonylmethyl-N-(4-methoxyphenyl)amino-1,2,2,5,5-pentamethyl-3-imidazolin **(83)***

Ansatz: 0,6 g (2,3 mmol) **82**

1,92 g (11,5 mmol; 1,27 ml) Bromessigsäureethylester

1,6 g (11,5 mmol) K_2CO_3

10 ml Aceton/1 ml H_2O

0,6 g (2,3 mmol) **82** wurde in 10 ml Aceton/1 ml H_2O gelöst, 1,92 g (11,5 mmol; 1,27 ml) Bromessigsäureethylester und 1,6 g (11,5 mmol) Kaliumcarbonat zugegeben und die Mischung unter kräftigem Rühren am Rückfluß erhitzt. Nach ca. 8 ½ Stunden war die Reaktion beendet (DC-Kontrolle; Aluminiumoxid neutral; Ether/Hexan 1:1). Vom Kaliumcarbonat wurde abfiltriert und die flüchtigen Bestandteile am Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 5 ml 2 %-iger Schwefelsäure aufgenommen und die resultierende Mischung zweimal mit je 5 ml Dichlormethan extrahiert. Die organischen Extrakte wurden verworfen, die wäßrige Phase mit Kaliumcarbonat gesättigt und dreimal mit je 5 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abfiltrieren und Abziehen des Lösungsmittels verblieb ein schwach gelbes Öl, das nach Ankratzen kristallisierte.

Ausbeute: 0,64 g (1,84 mmol; 80,1 %) **82**

^{1}H-NMR ($CDCl_3$; 293 K; 400 MHz):

δ = 7,08 (m, 4 H, Aryl-*H*); 4,29 (s, 2 H, C*H*$_2$); 4,15 (q, $^3J_{H,H}$ = 7,17 Hz, 2 H, O-C*H*$_2$-CH_3); 3,80 (s, 3 H, O-C*H*$_3$); 2,19 (s, 3 H, N-

C*H*$_3$); 1,26 (t, $^3J_{H,H}$ = 7,17 Hz, 3 H, O-CH$_2$-C*H*$_3$); 1,23 (s, 6 H, gem C*H*$_3$); 0,91 (s, 6 H, gem C*H*$_3$) ppm.

IR (KBr): ν(OCH$_3$): 2846 (w); ν(N-CH$_3$): 2802 (w); ν(C=O Ester): 1750 (vs); ν(C=N): 1611 (vs); ν(C=C-H Aromat): 1580 (w) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 46-48 ° C (aus Hexan)

Elementaranalyse ($C_{19}H_{29}N_3O_3$; 347,44):
berechnet: C: 65,68 % H: 8,41 % N: 12,09 %
gefunden: C: 65,83 % H: 8,31 % N: 11,90 %

4-N-(2-Hydroxyethyl)-N-(4-methoxyphenyl)amino-1,2,2,5,5-pentamethyl-3-imidazolin ***(87)***

Ansatz: 0,35 g (1 mmol) **83**
0,021 g (0,55 mmol) $LiAlH_4$
10 ml trockenes THF

Die Durchführung erfolgte wie für **86** beschrieben. Das Produkt fiel als weißer Feststoff an.

Ausbeute: 0,26 g (0,85 mmol; 85 %) **87**

^{1}H-NMR ($CDCl_3$; 293 K; 400 MHz):
δ = 7,01 (m, 4 H, Aryl-*H*); 3,81 (s, 3 H, O-C*H*$_3$), 3,77 (s, 4 H, C*H*$_2$-C*H*$_2$); 2,19 (s, 3 H, N-C*H*$_3$); 1,27 (s, 6 H, gem C*H*$_3$); 0,89 (s, 6 H, gem C*H*$_3$) ppm.

IR (KBr): ν(OH): 3163 (s, br); ν(N-CH$_3$): 2804, 2786 (m); ν(C=N): 1611 (vs); ν(C=C-H Aromat): 1590, 1508 (vs) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 125,5-127 ° C (aus Hexan)

Elementaranalyse ($C_{17}H_{27}N_3O_2$; 305,40):
berechnet: C: 66,86 % H: 8,91 % N: 13,75 %
gefunden: C: 66,78 % H: 8,95 % N: 13,68 %

3-(4-Chlorphenyl)-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-2-oxo-4,4,5,6,6-pentamethylimidazo [1,5-b][1,2,4]oxadiazol ***(79)***

Ansatz: 1 g (6,4 mmol) **27**
1,5 g (9,6 mmol) 4-Chlorphenylisocyanat
10 ml trockenes Dichlormethan

1 g (6,4 mmol) **27** wurde in 10 ml trockenem Dichlormethan gelöst, 1,5 g (9,6 mmol) 4-Chlorphenylisocyanat zugegeben, kräftig geschüttelt und 20 h bei Raumtemperatur belassen. Danach wurde das Lösungsmittel am Vakuum abgezogen und der Rückstand an Kieselgel mit Dichlormethan/Ethylacetat 5:1 als Laufmittel chromatographiert. Als einzige Substanz eluierte **79**, während die Verunreinigungen auf der Säule zurückblieben

Ausbeute: 1,96 g (6,3 mmol; 98,4 %) **79**

^{1}H-NMR (CD_2Cl_2; 293 K; 400 MHz):
δ = 7,49 (m, 4 H, Aryl-*H*); 5,55 (s, 1 H, C-*H*); 2,33 (s, 3 H, N-C*H*$_3$); 1,50; 1,32; 1,25; 1,00 (4s, je 3 H, gem-C*H*$_3$) ppm.

IR (KBr): ν(N-CH_3): 2810, 2791 (m); ν(C=O Oxadiazolidinon): 1746 (vs)
ν(C=C-H Aromat): 1599 (s), 1497 (vs) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 135-136 ° C (aus Hexan/Ethylacetat 3:1)

Elementaranalyse ($C_{15}H_{20}ClN_3O_2$; 309,83):
berechnet: C: 58,15 % H: 6,51 % N: 13,56 %
gefunden: C: 58,20 % H: 6,43 % N: 13,41 %

4-(4-Chlorphenyl)amino-1,2,2,5,5-pentamethyl-3-imidazolin ***(81)***

Ansatz: 0,5 g (1,61 mmol) **79**
3,22 ml (6,44 mmol) 2 M NaOMe in MeOH
5 ml trockenes THF

0,5 g (1,61 mmol) **79** wurde in 3,22 ml (6,44 mmol) 2 M NaOMe in MeOH suspendiert und so lange trockenes THF zugegeben, bis alles gelöst war (hierzu waren 5 ml THF nötig). Nach kräftigem Umschütteln wurde die Lösung 3 d bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Aufarbeitung erfolgte wie für **82** beschrieben. **81** wurde als weißer Feststoff isoliert.

Ausbeute: 0,38 g (1,43 mmol; 88,8 %) **81**

^{1}H-NMR ($CDCl_3$; 293 K; 400 MHz):
δ = 7,49 (m, 4 H, Aryl-*H*), Tieffeld-Teil stark verbreitert); 6,87 und 5,89 (br, je 0,5H, N-*H*); 2,37 (s, 3H, N-C*H*$_3$); 1,32 (s, br, 12 H, gem C*H*$_3$) ppm.

IR (KBr): ν(N-H): 3418 (m), 3316 (m) 1534 (vs); ν(N-CH_3): 2805 (m); 2785 (m); ν(C=N): 1644 (vs); ν(C=C) Aromat: 1595, 1492 (vs) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 108-109,5 ° C (aus Hexan)

Elementaranalyse ($C_{14}H_{20}ClN_3$; 265,81):
berechnet: C: 63,26 % H: 7,58 % N: 15,80 %
gefunden: C: 63,29 % H: 7,44 % N: 15,48 %

5.3.4.2. Aliphatische Vertreter

*4-Methylamino-1,2,2,5,5-pentamethyl-3-imidazolin **(30b)** (vgl. Voinov et al., 1992)*

Ansatz: 2,8 g (12,2 mmol) **28b**
24,4 ml (24,4 mmol) 1 M NaOMe in MeOH
20 ml trockenes THF

Die Versuchsdurchführung erfolgte wie für **82** beschrieben. Nach 1 h war die Reaktion beendet. Nach der Aufarbeitung verblieb ein weißer Feststoff.

Ausbeute: 2,0 g (11,82 mmol; 96,9 %) **30b**

^{1}H-NMR ($CDCl_3$; 293 K; 60 MHz):
δ = 3,39 (br, 1 H ; N-*H*); 2,84 (s, 3H, 4-N-C*H*$_3$); 2,25 (s, 3 H, 1-N-C*H*$_3$); 1,29 (s, 6 H, gem C*H*$_3$); 1,15 (s, 6 H, gem C*H*$_3$) ppm.
Schmelzpunkt: 130-131 ° C (aus Heptan)

Elementaranalyse ($C_9H_{19}N_3$; 169,25):
berechnet: C: 63,87 % H: 11,32 % N: 23,82 %
gefunden: C: 61,03 % H: 11,41 % N: 23,83 %

*4-N-Ethoxycarbonylmethyl-N-methylamino-1,2,2,5,5-pentamethyl-3-imidazolin **(84)***

Ansatz: 0,41 g (2,4 mmol) **30b**
2,0 g (12 mmol; 1,33 ml) Bromessigsäureethylester
1,7 g (12 mmol) K_2CO_3
10 ml Aceton/0,5 ml H_2O

Die Durchführung und Aufarbeitung erfolgte wie bei der Darstellung von **83**. Die DC-Kontrollen wurden an neutralem Aluminiumoxid mit Acetonitril als Laufmittel durchgeführt und die Chromatogramme in einer Iodkammer entwickelt. Es bildeten sich schnell mehrere Fraktionen. Am weitesten lief eine stark braune Verunreinugung, danach kam direkt die erste Fraktion (R_f= 0,84). Es folgte eine breite langgezogene Spur mit mehreren Fronten, die möglicherweise noch Ausgangsverbindung enthielt, vermutlich aber hauptsächlich Zersetzungsprodukte beinhaltete. Die Reaktion wurde nach 5 h abgebrochen.
Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels PSC an neutralem Aluminiumoxid vorgereinigt. Acetonitril diente als Eluens. Als Produktfraktion wurde der Bereich zwischen R_f = 0,5 und R_f = 0,9 isoliert. Der Rest wurde verworfen. Es resultierte ein schwach braun gefärbtes Öl, das mittels PSC an neutralem Aluminiumoxid weiter aufgereinigt wurde, wobei diesmal Ether/Hexan 1:1 als Eluens diente. Die Hauptfraktion zwischen R_f ~ 0,7 und R_f ~ 0,3 wurde isoliert und analysiert.

Ausbeute: 0,16 g (0,63 mmol; 26,1 %) **83** (Ausbeute nach erster PSC bestimmt)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$; 293 K; 400 MHz):
δ = 4,16 (q, $^3J_{H,H}$ = 7,1 Hz, 2 H, O-C*H*$_2$-CH_3); 4,07 (s, 2 H, C*H*$_2$); 3,02 (s, 3 H, 4-N-C*H*$_3$); 2,25 (s, 3 H, 1-N-C*H*$_3$); 1,24 (t, $^3J_{H,H}$ = 7,1 Hz, 3 H, O-CH_2-C*H*$_3$); 1,28 (s, 6 H, gem C*H*$_3$); 1,20 (s, 6 H, gem C*H*$_3$) ppm.

IR (Film): ν(N-CH_3): 2802 (w); ν(C=O): 1748 (s), ν(C=N): 1612 (vs) cm^{-1}.

Elementaranalyse ($C_{13}H_{25}N_3O_2$; 255,34):

berechnet: C: 61,15 % H: 9,87 % N: 16,45 %

gefunden: C: 59,89 % H: 9,86 % N: 15,47 %

3-(2-Bromethyl)-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-2-oxo-4,4,5,6,6-pentamethylimidazo [1,5-b][1,2,4]oxadiazol ***(78)***

Ansatz: 0,63 g (4 mmol) **27**

0,9 g (6 mmol; 0,56 ml) 2-Bromethylisocyanat

5 ml trockenes CH_2Cl_2

0,63 g (4 mmol) **27** wurde in 5 ml trockenem Dichlormethan gelöst und 0,9 g (6 mmol; 0,56 ml) 2-Bromethylisocyanat zugegeben. Nach kräftigem Umschütteln wurde 3 d bei Raumtemperatur belassen. DC-Kontrolle (Kieselgel; Dichlormethan/ Ethylacetat 5:1; Entwickeln in Iodkammer !) zeigte die vollständige Umsetzung der Ausgangsverbindungen an. Die Reaktionslösung hatte eine tiefbraune bis schwarze Farbe angenommen. Die flüchtigen Bestandteile wurden am Vakuum abgezogen und das resultierende schwarze Öl zweimal mit je 5 ml Hexan extrahiert. Die Hexanfraktionen wurden verworfen und der verbleibende schwarze Rückstand der Chromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Ethylacetat 5:1 unterworfen. Als einzige Substanz eluierte **78**, während die Verunreinigungen auf der Säule zurückblieben

Ausbeute: 0,83 g (2,71 mmol; 67,8 %) **78**

^{1}H-NMR ($CDCl_3$; 293 K; 400 MHz):

δ = 5,01 (s, 1 H, C*H*); 4,09; 3,59; 3,50; 3,31 (4 m, je 1 H, CH_2-CH_2); 2,24 (s, 3 H, N-CH_3); 1,39; 1,18; 1,15; 1,07 ppm (4 s, je 3 H, gem-CH_3).

IR (KBr): ν(N-CH_3): 2818 (w), 2796 (w); ν(C=O Oxadiazolidinon): 1752 (vs) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 103-104 ° C (aus Hexan/Ethylacetat 5:1)

Elementaranalyse ($C_{11}H_{20}BrN_3O_2$; 306,18):
berechnet: C: 43,15 % H: 6,62 % N: 13,72 %
gefunden: C: 42,92 % H: 6,62 % N: 13,64 %

3-(2-Azidoethyl)-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-2-oxo-4,4,5,6,6-pentamethylimidazo [1,5-b][1,2,4]oxadiazol ***(92)***

Ansatz: 0,31 g (1 mmol) **78**
0,1 g (2 mmol) LiN_3
10 ml EtOH wasserfrei

0,31 g (1 mmol) **78** und 0,1 g (2 mmol) LiN_3 wurden in 10 ml wasserfreiem Ethanol gelöst und am Rückfluß erhitzt. Der Verlauf der Reaktion wurde mittels DC-Analyse verfolgt (Kieselgel; Dichlormethan/Ethylacetat 5:1; Entwickeln in Iodkammer). Nach 3 h hatte sich alle Ausgangsverbindung (R_f = 0,54) zu einer neuen Substanz (R_f = 0,35) umgesetzt. Das Ethanol wurde am Vakuum entfernt, der Rückstand mit 5 ml Wasser versetzt und dreimal mit je 5 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abfiltrieren und Abziehen des Lösungsmittels wurde der Rückstand an Kieselgel mit Dichlormethan/Ethylacetat 5:1 als Eluens chromatographiert. Es verblieb ein farbloses Öl, das bei – 20 ° C sehr langsam zu farblosen Kristallen erstarrte.

Ausbeute: 0,16 g (0,60 mmol; 60 %) **92**

^{1}H-NMR ($CDCl_3$; 293 K; 90 MHz):
δ = 4,93 (s, 1 H, C*H*); 4,0 – 2,95 (m, 4 H, CH_2-CH_2); 2,3 (s, 3 H, N-CH_3); 1,43; 1,21; 1,19; 1,1 (4 s, je 3 H, gem- CH_3) ppm.

IR (KBr): ν(N-CH_3): 2789 (s); ν(N_3): 2097 (vs); ν(C=O): 1748 (vs) cm^{-1}.

Schmelzpunkt: 60-61 ° C (aus Hexan/Ethylacetat 5:1)

Elementaranalyse ($C_{11}H_{20}N_6O_2$; 268,28):
berechnet: C: 49,25 % H: 7,51 % N: 31,31 %
gefunden: C: 49,81 % H: 7,45 % N: 28,44 %

*4-(2-Azidoethyl)amino-1,2,2,5,5-pentamethyl-3-imidazolin **(89)***

Ansatz: 1,8 g (6,71 mmol) **92**
20 ml (40 mmol) 2 M NaOMe in Methanol

1,8 g (6,71 mmol) **92** wurde in 20 ml (40 mmol) 2 M NaOMe in Methanol gelöst und unter Rühren 40 min bei 45 ° C gehalten. DC-Kontrolle (Kieselgel; Dichlormethan/ Ethylacetat 5:1) zeigte, daß nach dieser Zeit die Ausgangsverbindung komplett umgesetzt war. Die Reaktionsmischung wurde in 50 ml Wasser gegossen und fünfmal mit je 15 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten Dichlormethanextrakte wurden dreimal mit je 10 ml 3,5 %-iger Salzsäure extrahiert und die vereinigten Säurephasen mit Dichlormethan gewaschen. Die Säurephase wurde mit Kaliumcarbonat auf pH = 8-9 gebracht und dann achtmal mit je 10 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten Dichlormethanextrakte wurden über Kaliumcarbonat getrocknet. Nach dem Abfiltrieren und Abziehen des Lösungsmittels verblieb ein Öl, das an neutralem Aluminiumoxid mit Ethylacetat/ Dichlormethan 3:1 chromatographisch aufgereinigt wurde. Es resultierte ein farbloses Öl, das in dieser Form für die Analyse und die weiteren Reaktionen verwendet wurde.

Ausbeute; 0,46 g (2,05 mmol; 30,6 %) **89**

^{1}H-NMR ($CDCl_3$; 293 K; 400 MHz):
δ = 3,50 (m, 4 H; C*H*$_2$-C*H*$_2$); 2,28 (s, 3 H, N-C*H*$_3$); 1,26 (s, 6 H, gem-C*H*$_3$); 1,20 (s, 6 H, gem-C*H*$_3$) ppm.

IR (Film): ν(NH): 3312 (s), 1548 (s); ν(N-CH_3): 2806 (m); ν(N_3): 2102 (vs); ν(C=N): 1634 (vs) cm^{-1}.

Elementaranalyse ($C_{10}H_{20}N_6$; 224,27)

berechnet: C: 53,56 % H: 9,00 % N: 37,45 %

gefunden: C: 52,67 % H: 8,91 % N: 32,63 %

*Versuch der Alkylierung von **89***

Ansatz: 20 mg (0,09 mmol) **89**
14 mg (~ 10 µl ; 0,11 mmol) Dimethylsulfat
20 mg (0,15 mmol) K_2CO_3
2 ml Aceton

20 mg (0,09 mmol) **89** wurde in 2 ml Aceton gelöst, 20 mg (0,15 mmol) Kaliumcarbonat und 14 mg (~ 10 µl ; 0,11 mmol) Dimethylsulfat zugegeben. Die Mischung wurde am Rückfluß erhitzt, bis keine Ausgangsverbindung in der Reaktionslösung mehr nachzuweisen war (DC-kontrolliert, Al_2O_3; Ethylacetat/ Dichlormethan 1:1; Iodkammer). Es war eine neue Komponente mit R_f = 0 entstanden (**89**: R_f = 0-0,4). Das Lösungsmittel wurde abgezogen und der Rückstand mit Pentan digeriert, um restliches Dimethylsulfat zu entfernen. Das resultierende leicht bräunliche Öl wurde verwendet, um spektroskopische Untersuchungen durchzuführen.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$; 293 K; 60 MHz): keine auswertbaren Signale

IR (Film): ν(N_3): 2108 (s); ν(C=N): 1635 (m) cm^{-1} (wahrscheinlich Reste des Eduktes)

5.4. ESR-Messungen

5.4.1. pH-Titrationen ausgewählter pH-sensitiver SL-Verbindungen

Die pH-Titrationen der pH-sensitiven SL-Verbindungen **38d**, **39d**, und **85** erfolgten nach einer leicht modifizierten Literaturvorschrift (Khramtsov et al., 1985b).
Die Messungen wurden in 10 mM Phosphatpuffer Lösungen durchgeführt, deren pH-Wert mit einem pH-Meter (WTW Weilheim i. OB) mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH genau eingestellt worden war.
Eine Stammlösung der zu titrierenden Verbindungen in einem probaten Lösungsmittel (Acetonitril für **38d**, Methanol für **39d**, und **85**) wurde so zu den entsprechenden Pufferlösungen gegeben, daß die SL-Konzentration der jeweiligen Probe ~ 10^{-4} µM war. Direkt im Anschluß erfolgte die ESR-Messung mit folgenden Geräteeinstellungen:
conversion time: 40,96 ms (**38d**: 20,48 ms); time constant: 40,96 ms (**38d**: 5,12 ms); receiver gain: $8 \cdot 10^{-3}$ (**38d**: $2 \cdot 10^{-4}$)

Zur Abschätzung der pK_a-Werte wurde eine einfache Methode angewandt. Der pK_a-Wert wurde in der Mitte des Intervalls zwischen dem pH-Wert der Probe, deren Spektrum den kleinsten Wert mit $f > 0{,}5$ und dem pH-Wert der Probe, deren Spektrum den größten Wert für $f < 0{,}5$ ergab, lokalisiert. Als Abweichung wurde die Hälfte des jeweiligen Intervalls nach oben bzw. nach unten angegeben.

	pK_a	a_N [G]	a_N (H^+) [G]	Δa_N [G]
38d	3,1 ± 0,1	15,82	14,55	1,27
39d	4,75 ± 0,25	15,69	14,89	0,8
85	4,8 ± 0,1	15,69	14,89	0,8

Von **53** wurde bei pH-Werten von 3, 4, 5, 6 und 7 jeweils ein ESR-Spektrum gemessen. Die a_N-Werte blieben konstant und lagen bei allen gemessenen pH-Werten bei 16,11-16,16 G.

5.4.2. Messungen mit Carbodiimid-markierten F_o-Membranvesikeln

Puffersysteme:

Puffer A:	0,25 M Sucrose	ESR-Puffer:	50 mM Tris-HCl
	10 mM $TrisSO_4$		1 mM $MgSO_4$
	5 mM $MgSO_4$		pH = 7,5
	pH = 7,6		

Vorbereitung der Proben:

340 µl F_o-Membranvesikelsuspension (Gesamtproteinkonzentration = 14,6 mg/ml) wurde so in Puffer A umgepuffert, daß das Suspensionsvolumen noch 200 µl betrug. Die Suspension wurde in zwei Aliquote à 100µl aufgeteilt (Gesamtprotein-konzentration = 25 mg/ml). Die Aliquote wurden jeweils mit 500 µM **52a** bzw. **61a** 24 h bei 4 ° C inkubiert und anschließend dreimal in ESR-Puffer umgepuffert und gemessen.

5.5. Fluoreszenzquench Assays

Die Fluoreszenzquench Assays erfolgten in Anlehnung an eine Literaturmethode (Perlin et al., 1984). Zur Markierung von F_o mit Carbodiimiden wurden F_1 befreite F_o-haltige Membranvesikel verwendet. Die Gesamtproteinkonzentration in den Membranvesikel Suspensionen betrug 14,6 mg/ml. Da der Lagerungspuffer (TES5-PAB) DTT enthält, das Nitroxylgruppen reduzieren kann, mußten die Membranvesikel Suspensionen vor der Inkubation mit den Carbodiimiden in einen geeigneten Puffer (Puffer A) umgepuffert werden.

Puffersysteme:

Puffer A:	0,25 M Sucrose 10 mM $TrisSO_4$ 5 mM $MgSO_4$ pH = 7,6	Puffer B:	20 mM Tris-HCl 200 mM KCl 5 mM $MgSO_4$ pH = 7,5
Puffer C:	80 mM Tris-HCl 800 mM KCl 20 mM $MgSO_4$ pH = 7,5		

Vorbereitung der Proben für die Messung:

Umpuffern:

Vor der Inkubierung der F_o-Membranvesikel mit Carbodiimiden wurden die Vesikel in Puffer A umgepuffert. Hierzu wurde die gewünschte Menge (50µl/Messung) der Vesikel in TES5-PAB Puffer in einer Airfuge bei 110000 g

5 min zentrifugiert und danach mit 200 µl Puffer A resuspendiert. Nach einer weiteren Umpufferung in Puffer A waren die Membranvesikel bereit zur Inkubierung mit den jeweiligen Carbodiimiden.

Inkubierung mit Carbodiimiden:

50 µl der Membranvesikel in Puffer A wurde mit Puffer A auf 500 µl aufgefüllt, mit Stammlösungen der Carbodiimide in Acetonitril auf die gewünschte Carbodiimd Konzentration gebracht (typischerweise 200 – 300µM) und anschließend 45 min bei 30 ° C inkubiert. So behandelte Proben waren bereit zur Messung der passiven Protonentranslokation.

F_1 Rekonstitution

Zum Test der aktiven Protonentranslokation wurden die mit Carbodiimid vorinkubierten Membranvesikel mit 250 µl Puffer C, 180 µl Wasser und 70 µl F_1-Lösung (2,2 mg/ml) versetzt und 1 h bei 30 ° C inkubiert.

Vergleichsproben ohne Carbodiimid:

Die entsprechenden Vergleichsproben wurden mit Ausnahme der Inkubation mit Carbodiimid auf genau die gleiche Art behandelt.

Messung der passiven Protonentranslokation:

Allgemeines Pipettierschema:

1) 0,5 ml mit Carbodiimid inkubierte Membranvesikel Suspension
2) 1,125 ml H_2O
3) 0,375 ml Puffer C
4) 10 µl 1 mM Acridin Orange Lösung ($[A.O.]_{End}$ ~ 5 µM)
5) 4 µl 1 M NADH-Lösung ($[NADH]_{End}$ ~ 2 mM)
6) 5 µl 1 M KCN-Lösung ($[KCN]_{End}$ ~ 2,5 mM)
7) 12 µl 3,3 M NH_4Cl-Lösung ($[NH_4Cl]_{End}$ ~ 20 mM)

Messung der aktiven von der ATP Synthase getriebenen Protonentranslokation

Allgemeines Pipettierschema:

1) 1 ml der mit Carbodiimid inkubierten und F_1 rekonstituierten Membranveskel Suspension
2) 1 ml Puffer B
3) 10 µl 1 mM Acridin Orange Lösung ($[A.O.]_{End}$ ~ 5 µM)
4) 4 µl 1 M NADH-Lösung ($[NADH]_{End}$ ~ 2 mM)
5) 5 µl 1 M KCN-Lösung ($[KCN]_{End}$ ~ 2,5 mM)
6) 24 µl 83 mM ATP-Lösung ($[ATP]_{End}$ ~ 1 mM)
7) 12 µl 3,3 M NH_4Cl-Lösung ($[NH_4Cl]_{End}$ ~ 20 mM)

Nach jedem Pipettierschritt wurde die Mischung kurz mit einem Plastikspatel gut durchgerührt und dann der Verlauf der Fluoreszenzintensität gegen die Zeit aufgezeichnet. Die Diagramme sind in Kap. **3.3.1.** dargestellt.

6. Literaturverzeichnis

Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R., Walker, J.E. (1994) *Nature* **370**, 621-628

Altenbach, C., Marti, T., Khorana, G.H., Hubbell, W.L. (1990) *Science* **248**, 1088-1092

Assadi-Porter, F.M., Fillingame, R.H. (1995) *Biochemistry* **34**, 16186-16193

Azzi, A., Bragadin, M.A., Tamburro, A.M., Santato, M. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 5520-5526

Balakirev, M.Yu., Khramtsov, V.V. (1993) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 2157-2160

Balakirev, M.Yu., Khramtsov, V.V., Berezina, T.A, Martin, V.V., Volodarsky, L.B. (1992) *Synthesis* 1223-1225

Berezina, T.A, Martin, V.V., Volodarsky, L,B., Khramtsov, V.V., Weiner, L.M. (1990) *Bioorg. Khim.* **16**, 262-269

Berezina, T.A., Reznikov, V.A., Volodarsky, L.B. (1993) *Tetrahedron* **49**, 10693-10704

Berry, S. Rumberg, B. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1276**, 51-56

Block, S.M. (1997) *Nature* **386**, 217-219

Boyer, P.D. (1977) *Ann. Rev. Biochem.* **46**, 957-966

Chion, B., Lajzerowicz, J., Bordeaux, D., Collet, A., Jacques, J. (1978) *J. Phys. Chem.* **82**, 2682-2688

Cross, R.L. (1981) *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 681-714

Dimroth, P., Kaim, G., Matthey, U. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 87-92

Dmitriev, O.Y., Altendorf, K., Fillingame, R.H. (1995) *Eur. J. Biochem.* **233**. 478-483

Duncan, T.M., Bulygin, V.V., Zhou, Y., Hutcheon, M.L., Cross, R.L. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10964-10968

Elston, T., Wang, H., Oster, G. (1998) *Nature* **391**, 510-513

Fraga, D., Hermolin, J., Oldenburg, M., Miller, M.J., Fillingame, R.H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 7532-7537

Gaffney, B.J. (1976) in *Spin Labeling* (Berliner, L.J. ed.), 208-209, Academic Press, New York. San Francisco, London

Garcia, J., Urpi, F., Vilarrama, J. (1984) *Tetrahedron Lett.* **25**, 4841-4844

Girvin, M.E., Fillingame, R.H. (1993) *Biochemistry* **32**, 12167-12177

Girvin, M.E., Fillingame, R.H. (1994) *Biochemistry* **33**, 665-674

Girvin, M.E., Fillingame, R.H. (1995) *Biochemistry* **34**, 1635-1645

Girvin, M.E., Rastogi, V.K., Abildgaard, F., Markley, J.L., Fillingame, R.H. (1998) *Biochemistry* **37**, 8817-8824

Grigor'ev, I.A., Shchukin, G.I., Martin, V.V., Mamatyuk, V.I. (1985) *Khim. Geterosikl. Soedin.*, 252-259

Hankovszky, H.O., Hideg, K., Lex, L. (1981) *Synthesis*, 147-149

Hargreaves, M.K., Stevinson, E.A. (1965) *Spectrochim. Acta* **21**, 1681-1689

Hassinen, I.E., Vuokila, P.T. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1144**, 107-124

Hermolin, J., Fillingame, R.H. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 3896-3903

Hodgkins, J.E., Reeves, W.P. (1964) *J. Org. Chem.* **29**, 3098-3099

Jiang, W., Fillingame, R.H. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6607-6612

Jones, P.C., Fillingame, R.H. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 29701-29705

Jones, P.C., Jiang, W., Fillingame, R.H. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 17178-17185

Junge, W., Lill, H., Engelbrecht, S. (1997) *Trends Biochem. Sci.* **22**, 420-423

Kaim, G., Matthey, U., Dimroth, P. (1998) *EMBO J.* **17**, 688-695

Kaim, G., Wehrle, F., Gerike, U., Dimroth, P. (1997) *Biochemistry* **36**, 9185-9194

Keana, J.F.W., Acarregui, M.J., Boyle, S.L.M. (1982) *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 827-830

Kersten, M., Motz, C., McLachlin, D., Dunn, S.D., Wise, J.G., Vogel, P.D. (1999) Manuskript in Vorbereitung

Khramtsov, V.V., Marsh, D., Weiner, L., Reznikov, V.A. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1104**, 317-324

Khramtsov, V.V., Volodarsky, L.B. (1998) in *Biological Magnetic Resonance Vol. 14* (Berliner, L.J. ed.), 109-179, Plenum Press, New York

Khramtsov, V.V., Weiner, L. (1988) in *Imidazoline Nitroxides vol. II* (Volodarsky, L.B. ed.), 37-80, CRC Press Boca Raton, Florida

Khramtsov, V.V., Weiner, L., Emerenko, S.I., Belchenko, O.I., Schastnev, P.V., Grigor'ev, I.A., Reznikov, V.A. (1985a) *J. Magn. Res.* **61**, 397-408

Khramtsov, V.V., Weiner, L., Grigor'ev, I.A., Reznikov, V.A., Shchukin, G.I., Volodarsky, L.B., (1985b) *Zh. Khim. Fiz.* **4**, 637-643

Kumarev, V.P., Knorre, D.G. (1970) *Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R.* **193**, 103-105

Kuo, P.H., Ketchum, C.J., Nakamoto, R.K. (1998) *FEBS Lett.* **426**, 217-220

Lal, B., Pramanik, B.N., Manhas, M.S., Bose, A.K. (1977) Tetrahedron Lett., 1977-1980

Lill, H., Burkovski, A., Altendorf, K., Junge, W., Engelbrecht, S. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1144**, 278-284

Lill, H., Hensel, F., Junge, W., Engelbrecht, S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 32737-32742

Lubenets, E.G., Nikulina, L.D., Morosova, F.S., Volodarsky, L.B., Khmelnitsky, A.G., Kobrin, V.S. (1983) belgisches Patent 896093

Mäder, K., Gallez, B., Swartz, H.M. (1996) *Biomaterials* **17**, 457-463

Martin, V.V., Volodarsky, L.B. (1979) *Khim. Geterosikl. Soedin.*, 103-109

Martin, V.V., Volodarsky, L.B., Voinov, M.A., Berezina, T.A., Lelyuch, T.F. (1988) *Izv. Akad. Nauk S.S.S.R., Ser. Khim.* 1875-1882

Metzger, H., Meier, H. (1971) in *Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie X/1* (Müller, E., Stroh, R. eds.), 926-938, Georg Thieme Verlag Stuttgart

Mitchell, P. (1961) *Nature* **191**, 144-148

Mitsunobu, O., (1981) *Synthesis* 1-28

Murman, K. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 521-526

Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., Kinosita Jr., K. (1997) *Nature* **386**, 299-302

Nordio, P.L. (1976) in *Spin Labeling* (Berliner, L.J. ed.), 5-52, Academic Press, New York. San Francisco, London

Perlin, D.S., Latchney, L.R., Wise, J.G., Senior, A.E. (1984) *Biochemistry* **23**, 4998-5003

Ogilvie, I., Aggeler, R., Capaldi, R.A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 16652-16656

Ohnishi, S., Mc Connell, H.M. (1965) *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 2293-2307

Park, J.H., Trommer, W.E. (1989) in *Biological Magnetic Resonance* **8** (Berliner, L.J., Reuben, J. eds.), 547-595, Plenum Press, New York

Peterson, G.I. (1977) *Anal. Biochem.* **83**, 346-356

Putsykin, Yu.G., Volodarsky, L.B. (1968) *Izv. Sib. Otd. Akad. Nauk S.S.S.R. Ser. Khim. Nauk* 101-107

Rao, R., Al- Shawi, M.K., Senior, A.E. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 5569-5573

Reznikov, V.A., Volodarsky, L.B. (1984) *Izv. Sib. Otd. Akad. Nauk S.S.S.R., Ser. Khim. Nauk* 89-97

Reznikov, V.A., Volodarsky, L.B. (1990) *Khim. Geterosikl. Soedin.* 772-779

Reznikov, V.A., Berezina, T.A., Kirilyuk, I.A., Volodarsky, L.B. (1994) *Russ. Chem. Bull.* **43**, 424-427

Rozantsev, E. G. (1970) in *Free Nitroxyl Radicals* (Ulrich, H. ed.), 203-206, Plenum Press New York, London

Sabbert, D., Engelbrecht, S., Junge, W. (1996) *Nature* **381**, 623-625

Schanding, Th., Vogel, P.D., Trommer, W.E., Wise, J.G. (1996) *Tetrahedron* **52**, 5783-5792

Sevastyanova, T.K., Volodarsky, L.B. (1972) *Izv. Akad. Nauk S.S.S.R. Ser. Khim.* 2339-2341

Shchukin, G.I., Grigor'ev, I.A., Volodarsky, L.B. (1984) *Izv. Sib. Otd. Akad. Nauk S.S.S.R. Ser. Khim. Nauk* 81-92

Staudinger, H., Meyer, J. (1919) *Helv. Chim. Acta* **2**, 635-646

Staudinger, H., Hauser, E. (1921) *Helv. Chim. Acta* **4**, 861-886

Steudel, R., Schenk, P.W. (1975) in *Handbuch der präparativen Anorganischen Chemie* **1** (Brauer, G., ed.), 457, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

Stevens, C.L., Gillis, B.T. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3448-3451

Tang, C.L., Capaldi, R.A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 3018-3024

Tetzlaff, C., Vilsmaier, E., Schlag, W.-R. (1990) *Tetrahedron* **46**, 8117-8130

Treinin, A. in *The Chemistry of the Azido Group* (Patai, S. ed.), 1-55, Interscience Publishers, John Wiley & Sons, London, New York, Sydney, Toronto, 1971

Tschitschibabin, A.E., Jelgasin, S.A. (1914) *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **47**, 1843-1852

Urpi, F., Vilarrama, J. (1986) *Tetrahedron Lett.* **27**, 4623-4624

Valiyaveetil, F.I., Fillingame, R.H. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 32635-32641

Valiyaveetil, F.I., Fillingame, R.H. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 16241-16247

van Walraven, H.S., Strotmann, H., Schwartz, O., Rumberg, B. (1996) *FEBS Lett.* **379**, 309-313

Voinov, M.A., Diplomarbeit (1985), Institut für Organische Chemie der Sibirischen Abteilung der Akademie der Wissensschaften der UdSSR, Novosibirsk

Voinov, M.A., Martin, V.V., Volodarsky, L.B. (1992) *Izv. Akad. Nauk, Ser. Khim.*, 2642-2647

Volodarsky, L.B., Grigor'ev I.A. (Volodarsky, L.B. ed.) (1988) *Imidazoline Nitroxides vol. I*, CRC Press Boca Raton, Florida

Volodarsky, L.B., Grigor'ev, I.A., Sagdeev, R.Z. in *Biological Magnetic Resonance* **2** (Berliner, L.J., Reuben, J. eds.), 169-241, Plenum Press, New York

Volodarsky, L.B., Kutikova, G.A. (1971) *Izv. Akad. Nauk S.S.S.R. Ser. Khim.* 937-941

Volodarsky, L.B., Martin. V.V., Leluch, T.F. (1985) *Tetrahedron Lett.* **26**, 4801-4802

Volodarsky, L.B., Putsykin, Yu.G. (1967) *Zh. Org. Khim.* **3**, 1686-1694

Volodarsky, L.B., Reznikov, V.A., Kobrin, V.S. (1979) *Zh. Org. Khim.* **15**, 415-422

Volodarsky, L.B., Reznikov, V.A., Ovcharenko, V.I. (editors) (1994) CRC Press Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo

Volodarsky, L.B., Sevastyanova, T.K. (1971) *Zh. Org. Khim.* **8**, 1687-1692

Volodarsky, L.B., Sevastyanova, T.K. (1973) UdSSR Patent 309097

Watts, S.D., Zhang,Y., Fillingame, R.H., Capaldi, R.A. (1995) *FEBS Letters* **368**, 235-238

Weber, J., Senior, A.E. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1319**, 19-58

Wilkens, S., Capaldi, R.A. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 93-97

Wilkens, S., Dahlquist, F.W., McIntosh, L.P., Donaldson, L.W., Capaldi, R.A. (1995) *Nat. Struct. Biol.* **2**, 961-967

Wilkens, S., Dunn, S.D., Chandler, J., Dahlquist, F.W., Capaldi, R.A. (1997) *Nat. Struct. Biol.* **4**, 198-201

Wise, J.G. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 10403-10409

Wise, J.G., Senior, A.E. (1985) *Biochemistry* **24**, 6949-6954

Wolfs, I., Desseyn, H.O. (1995) *Spectrochim. Acta Part A* **51**, 1608-1615

Zhang, Y., Fillingame, R.H. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 87-93

Dank

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere

allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der Abteilung Biochemie und des Fachbereiches Chemie an der Universität Kaiserslautern, die mich auf meinem Weg begleitet haben, für die freundschaftliche und hilfsbereite Atmosphäre und das hervorragende Arbeitsklima, das stets vorherrschte

Prof. Dr. L. B. Volodarsky, Maxim A. Voinov, Dr. Alexej J. Tichonov, Dr. Igor A. Grigor'ev, Dr. Vladimir A. Reznikov, allen anderen Mitgliedern des Labors für Stickstoffverbindungen, sowie allen Mitgliedern des Instituts für Organische Chemie der Sibirischen Abteilung der Russischen Akademie der Wissenschaften in Novosibirsk Akademgorodok für die freundliche Aufnahme und Betreuung während meines Aufenthaltes von Okt. bis Dez. 1996

Maxim Voinov, der bereit war, während meiner Krankheit im Rahmen eines dreimonatigen Forschungsaufenthaltes durch experimentelle Arbeit im Labor zur Weiterentwicklung meiner Dissertation beizutragen, sowie allen, die diesen Aufenthalt ermöglicht haben

meinen ehemaligen Forschungspraktikanten Monika Kemény, Thomas Stengel und Michael Zeiger, sowie Jakov Poiline für ihre überaus engagierte Mitarbeit

Mike, Lopez, Gerhard und Andreas für die Aufzeichnung von ESR-, IR-, und NMR-Spektren, als ich das selbst nicht tun konnte; Christian und Gerhard für die Bereitstellung von Proteinchargen

Prof. Dr. Kalman Hideg für ausführliche Diskussionen zum Thema Nitroxylradikale

meinen Eltern, Daliah, Freunden, Verwandten, Bekannten und allen, die mir die Daumen gedrückt und ein paar aufmunternde Worte für mich übrig hatten

Dr. K. Hille, der mir durch seine chirugische Kunstfertigkeit das Augenlicht wieder zurückgab und damit die Fertigstellung dieser Arbeit erst ermöglichte, sowie Prof. Dr. K. Ruprecht, Dr. R. Weik, den Ärztinnen und Ärzten und den Bediensteten der Universitätsaugenklinik Homburg, die dabei mitgeholfen haben

Herrn Mudrack für seine kompetente Beratung und große Geduld bei der Anpassung von Sehhilfen.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Thomas Schanding
Geburtsdatum /-ort:	7. 6. 1969 in Blieskastel

Schulbesuch:

1975 – 1979:	Grundschule in Blieskastel-Altheim
1979 – 1988:	Herzog-Wolfgang-Gymnasium in Zweibrücken Abschluß: Abitur

Studium:

1988 – 1994:	Studium in der Fachrichtung Diplom-Chemie an der Universität Kaiserslautern
30. 9. 1994:	Beendigung des Studiums mit einer Diplomarbeit im Arbeitskreis von Dr. J. G. Wise im Fachbereich Chemie/Biochemie an der Universität Kaiserslautern
seit Nov. 1994:	Promotion an der Universität Kaiserslautern im Fachbereich Chemie/Biochemie im Arbeitskreis von Dr. J. G. Wise
Okt. bis Dez. 1996:	Forschungsaufenthalt im Rahmen eines DAAD Kurzstipendiums im Labor für Stickstoffverbindungen an der Sibirischen Abteilung der Russischen Akademie der Wissenschaften in Novosibirsk-Akademgorodok unter der Leitung von Prof. Dr. L. B. Volodarsky
26. 7. 1997:	Erblindung aufgrund eines Arbeitsunfalls an der Universität Kaiserslautern, nachfolgend mehrere Operationen
25. 2., 25. 6. 1998:	Vorbereitende Hornhauttransplantationen auf dem linken bzw. rechten Auge und teilweise Wiederherstellung der Sehfähigkeit
seit Sept. 1998:	Fortführung der Promotion unter Anfertigen der schriftlichen Arbeiten
15. 6. 1999:	Erneute Hornhauttransplantation am linken Auge und weitere geringfügige Verbesserung der Sehfähigkeit
19. 11. 1999:	Tag der wissenschaftlichen Aussprache