

# Synthese von neuartigen Sphingosin-Derivaten

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Alexandra Klose-Stier, geb. Stier

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. rer. nat. Christoph Arenz  
2. Prof. Dr. rer. nat. Rainer Mahrwald

Tag der mündlichen Prüfung: 22. März 2017



*Meiner kleinen und  
großen Familie*



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>v</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>ix</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xi</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Stand der Forschung</b> .....	<b>2</b>
2.1 Sphingolipide .....	2
2.1.1 Metabolismus der Sphingolipide .....	3
2.1.1.1 Sphingosinkinasen .....	6
2.1.1.2 Sphingosin-1-phosphat-Lyase.....	7
2.1.1.3 Sphingosin-1-phosphat-Phosphatasen .....	7
2.1.2 Sphingosin .....	8
2.1.3 Sphingosin-1-phosphat .....	8
2.1.3.1 Vorkommen .....	8
2.1.3.2 Primäre Funktionen von S1P .....	9
2.1.3.3 Wirkung über die S1P-Rezeptoren.....	9
2.2 Sphingosin-1-phosphat-Rezeptoren.....	10
2.3 Pathogenese und pharmakologisch relevante Vertreter der Sphingolipide .....	12
2.3.1 Krebs.....	12
2.3.2 Erkrankungen des Immunsystems .....	13
2.3.3 Parasitäre Infektionen .....	14
2.4 Wichtige bioaktive Sphingosin-Derivate .....	15
2.4.1 FTY720 (Fingolimod).....	16
2.4.2 <i>cis</i> -4-Methylsphingosin .....	17
2.5 Synthetischer Zugang zu Sphingosin .....	19
2.5.1 Zugang über Kohlenhydrate .....	20
2.5.2 Zugang über Oxirane .....	21
2.5.3 Zugang über asymmetrische Aldol-Reaktion .....	21
2.5.4 Zugang über Serin-Derivate .....	23
2.6 Beispiele zur biologischen Charakterisierung von Sphingolipiden .....	26
2.6.1 Fluoreszenz-Markierung.....	27
2.6.2 $[Ca^{2+}]_i$ -Desensibilisierungsassay .....	27
2.6.3 PRESTO-Tango-Reporter-Gen-Assay.....	28
<b>3 Zielsetzung</b> .....	<b>31</b>
<b>4 Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>33</b>
4.1 Synthese von <i>cis</i> -4-Methylsphingosin-Derivaten .....	33
4.1.1 Synthese über <i>Garner</i> -Aldehyd .....	33
4.1.2 Alternative Schutzgruppen-Strategien .....	40
4.1.2.1 Verwendung von Fmoc- und Silyl-Schutzgruppen.....	41

4.1.2.2 Verwendung von Azidoserinal.....	42
4.2 Synthese von 1-modifizierten Sphingosinen.....	43
4.3 Synthese von 3-modifizierten Sphingosinen.....	46
4.3.1 Synthese von 3-Chloro-3-desoxysphingosin <b>8</b> .....	46
4.3.2 Synthese von 3-Desoxy-3-methoxysphingosin <b>9</b> .....	50
4.3.3 Synthese von 3-Desoxy-3-fluorosphingosin <b>10</b> .....	51
4.4 Synthese von 1- und 3-modifizierten Sphingosinen.....	55
4.4.1 Synthese von 1-Methyl-3-chloro-3-desoxysphingosin <b>7</b> .....	55
4.4.2 Synthese von 1-Methyl-3-desoxy-3-methoxysphingosinen <b>11</b> und <b>12</b> .....	55
4.5 Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung von modifizierten Sphingosinen.....	56
4.5.1 Detektion der Calcium-Modulation.....	56
4.5.2 Detektion der Interaktion mit den S1P-Rezeptoren.....	58
4.6 Synthese und Charakterisierung von fluoreszenzmarkiertem Sphingosin-Derivat <b>13</b> ..	61
4.7 Synthese von 1-modifizierten Dihydrosphingosin-Derivaten.....	64
<b>5 Ausblick .....</b>	<b>65</b>
<b>6 Experimenteller Teil .....</b>	<b>69</b>
6.1 Methoden.....	69
6.1.1 Lösungsmittel und Reagenzien .....	69
6.1.2 Chromatographische Methoden .....	69
6.1.3 Verwendete Messgeräte.....	70
6.1.4 Aufnahme des Ceramids in <i>C. trachomatis</i> -infizierten HeLa229-Zellen .....	71
6.2 Synthesevorschriften.....	72
6.2.1 Synthese von <i>Garner</i> -Aldehyden.....	72
6.2.2 Synthese von ( <i>Z</i> )-2-Bromohexadec-2-en <b>31</b> .....	78
6.2.3 Synthese von 4-verzweigten Derivaten .....	81
6.2.4 Synthesevorschriften für alternative Darstellung 4-verzweigter Derivate .....	88
6.2.5 Synthese von 1-verzweigten Derivaten .....	92
6.2.6 Synthese von 3-Chloro-3-desoxysphingosin <b>8</b> .....	99
6.2.7 Synthese von 3-Desoxy-3-methoxysphingosin <b>9</b> .....	106
6.2.8 Synthese von 3-Desoxy-3-fluorosphingosin <b>10</b> .....	108
6.2.9 Synthese von 1-Methyl-3-desoxy-3-methoxy-Derivaten.....	111
6.2.10 Markierung mit NBD-Fluorophor.....	114
6.2.11 Synthese von Dihydrosphingosin-Derivaten .....	115
<b>7 Anhang.....</b>	<b>117</b>
<b>A Literatur .....</b>	<b>183</b>
<b>B Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>191</b>
<b>C Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>195</b>
<b>D Publikationsliste .....</b>	<b>197</b>
<b>E Danksagung .....</b>	<b>199</b>

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2012 bis Juli 2016 unter der Betreuung von Prof. Dr. Christoph Arenz am Institut für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin angefertigt.

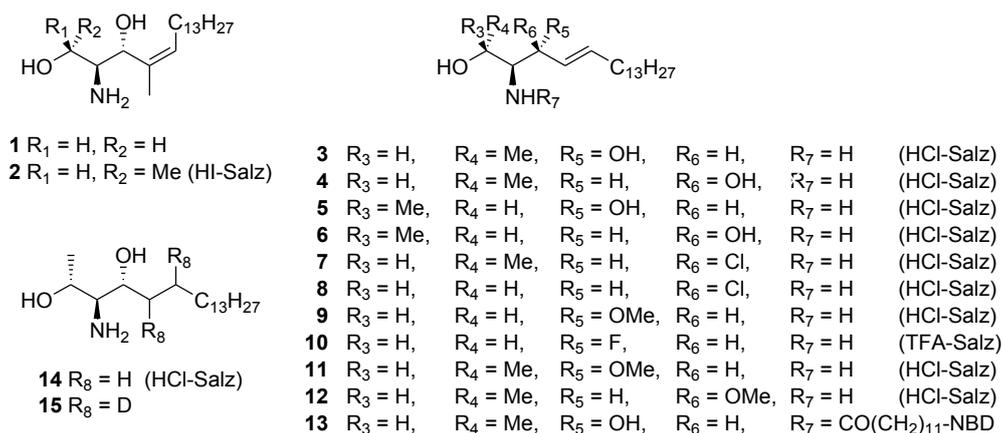


## Zusammenfassung

Sphingolipide sind essentielle Bestandteile der Plasmamembranen aller eukaryotischen Organismen. Zusätzlich fungieren sie als Signalmoleküle und sind an nahezu allen physiologischen Prozessen beteiligt. Hierbei spielt ein Metabolit, Sphingosin-1-phosphat (S1P), aufgrund seiner Interaktion mit den G-Protein-gekoppelten S1P-Rezeptoren eine zentrale Rolle. Diese Rezeptoren regulieren eine enorme Bandbreite an zellulären Antworten und Funktionen, von der Angiogenese, der Entwicklung einer normalen Immunantwort bis hin zur Apoptose. Die Beteiligung der S1P-Rezeptoren an einer Vielzahl an pathologischen und physiologischen Prozessen legt nahe, dass eine gezielte Adressierung der Rezeptoren von großer Bedeutung ist. Daher weisen bioaktive Lysophospholipide und ihre Analoga ein hohes Potenzial für die Entwicklung von lipidbasierten Wirkstoffen und Therapien auf. Das Musterbeispiel ist FTY720 (Fingolimod), ein Sphingosin-Derivat, welches dank seiner immunsuppressiven Wirkung zur Behandlung der Multiplen Sklerose seit 2010 zugelassen ist. Es zeigt ein verändertes Bindungsmuster zu den S1P-Rezeptoren und bindet an alle Rezeptorsubtypen, ausschließlich S1P2. Bei einem weiteren Sphingosin-Analogon, *cis*-4-Methylsphingosin, sind kürzlich ähnliche biochemische Eigenschaften nachgewiesen worden. Im Gegensatz zu FTY720 zeigt dieses jedoch eine verstärkte Aktivität am S1P2-Rezeptor.

Diese Arbeit beschreibt die Synthese von Sphingosin-Derivaten mit potenziell neuen biologischen Eigenschaften. Hierfür wurde die Leitstruktur des natürlichen *D-erythro*-Sphingosins an mehreren Positionen modifiziert, sodass 15 neuartige Sphingosin-Analoga synthetisiert werden konnten (**Abbildung 1**). Als Ausgangsverbindungen dienten die Aminosäuren L-Serin, L-Threonin und L-*allo*-Threonin. Der synthetische Zugang wurde in Abwandlung zweier gut etablierter Methoden erarbeitet. Zum einen wurden die Vorläufer des Sphingosins durch einen Angriff eines Kohlenstoff-Nukleophils am geschützten *Gamer*-Aldehyd dargestellt, zum anderen ermöglichte die Verwendung eines geschützten Weinrebamids den Zugang zu anderen Derivaten.

Darüber hinaus wurde eine Vorschrift in Anlehnung an eine in der Gruppe um C. Arenz entwickelte Methode für die Synthese von *cis*-4-Methylsphingosinen etabliert, die einen schnelleren und variablen Zugang zu den an Position 4 verzweigten Sphingosin-Derivaten erlaubt.



**Abbildung 1:** Neuartige Sphingosin-Derivate, die in dieser Arbeit synthetisiert wurden.

Mithilfe des  $[Ca^{2+}]_i$ -Desensibilisierungs- und des PRESTO-Tango-Reporteragen-Assays wurden die ersten Kenntnisse zur S1P-abhängigen Inhibition des  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs durch die Derivate sowie zur Wechselwirkung der Verbindungen mit Rezeptorsubtypen S1P1 und S1P2 gewonnen. Neben den reproduzierten Ergebnissen für das *cis*-4-Methylsphingosin **1** bezüglich der Calcium-Modulation (45 % Inhibition), konnte erstmalig eine zweifach stärkere Aktivierung des S1P2, im Vergleich zu S1P, durch intrazellulär phosphoryliertes **1** nachgewiesen werden. Zusätzlich wies *cis*-4-Methylsphingosinphosphat eine mit S1P vergleichbare Aktivierung des Rezeptors S1P1 auf, sodass es nun als nicht selektiver Agonist der S1P-Rezeptoren charakterisiert werden kann. Gleichzeitig gelang es ein weiteres Derivat, 3-Desoxy-3-methoxysphingosin **9**, als einen potenten Inhibitor des Calcium-Anstiegs (40 % Inhibition) zu identifizieren. Ferner schien der Austausch der allylischen Hydroxylfunktion gegen eine Methoxygruppe die Stabilität der Verbindung gegenüber der S1P-Lyase zu beeinflussen. Anhand der Studien an den Verbindungen **2**, **11** und **12**, bei denen eine zusätzliche Methylgruppe am C1 eingeführt wurde, konnte die Vermutung aufgestellt werden, dass 1-verzweigte Derivate durch Sphingosinkinasen schlecht bis gar nicht phosphoryliert werden können.

Mithilfe des NBD-markierten C12-Ceramids **13** wurde untersucht, ob solch eine Verzweigung an der Position 1 einen Effekt auf die Zellaufnahme und die Lokalisierung im Zusammenhang mit *Chlamydia trachomatis* infizierten Zellen besitzt. Schließlich wurden die Dihydrosphingosin-Derivate **14** und **15** als Standards zur Identifizierung und Quantifizierung neuartiger Sphingolipide in Hefe synthetisiert.

Diese neuartigen Sphingosin-Derivate könnten aufgrund ihrer unterschiedlichen Affinitäten gegenüber den in ihren Metabolismus involvierten Enzymen sowie den jeweiligen Rezeptoren einen wertvollen Beitrag für die Erforschung von Rezeptor-Subtypen und ihrer entsprechenden biologischen Antwort leisten.

## Abstract

Sphingolipids are essential constituents of plasma membranes in all eukaryotic organisms. They also participate as signalling molecules in almost all physiological processes. Here one metabolite, sphingosine-1-phosphate (S1P), occupies a key role due to its interaction with G-protein coupled S1P receptors. These receptors regulate a colossal range of cellular responses and functions, including angiogenesis, development of regular immune responses as well as apoptosis.

Selective addressing of S1P receptors plays an important role due to their involvement in a variety of pathogenic and physiological processes. Therefore, bioactive lysophospholipids and their analogues are highly useful for the development of lipid based drugs and therapies. A well-known sphingosine analogue, FTY720 (fingolimod), which is approved for treatment of multiple sclerosis since 2010, shows a modified binding pattern to S1P receptors. It binds to all receptor subtypes except of S1P2. Recently it was demonstrated that another sphingosine analogue, *cis*-4-methyl sphingosine, has biochemical properties similar to FTY720. In contrast to the latter, it shows a predominant activation of S1P2.

This work describes the synthesis of sphingosine analogues with potential biological activity. For this purpose, the natural lead structure of *D-erythro*-sphingosine was modified at various positions resulting in 15 novel sphingosine derivatives. The amino acids L-serine, L-threonine and L-*allo*-threonine served as starting materials. The synthetic approach was realized by adaptation of two well-established methods. In the first one, the sphingosine precursors were synthesized by an attack of a carbon nucleophile to a protected *Garner's* aldehyde. In the second method, the application of protected weinreb amide afforded a set of further analogues.

Moreover, by modification of an existing method for *cis*-4-methyl sphingosine synthesis developed in *C. Arenz'* group, an adapted method, that allowed faster and adaptable access to 4-branched sphingosines, was established.

A preliminary biological investigation on synthesized derivatives by calcium desensitization assay and PRESTO-Tango reporter gene assay revealed their ability to inhibit S1P-dependent  $[Ca^{2+}]_i$  increase as well as their interaction with S1P receptor subtypes S1P1 and S1P2. Apart from reproduced results to calcium modulation of *cis*-4-methyl sphingosine **1** (45 % inhibition), its twofold more potent activation of S1P2 receptor, compared to S1P, was shown for the first time. Additionally, the S1P1 receptor activation by *cis*-4-methyl sphingosine phosphate, which is comparable to S1P, was demonstrated. Hence, *cis*-4-methyl sphingosine can be characterized as a non-selective agonist of S1P receptors.

Furthermore, a second analogue, 3-deoxy-3-methoxy sphingosine **9**, was identified as a potent inhibitor of calcium increase (40 % inhibition). In addition, the replacement of the allylic hydroxy function by a methoxy group seemed to influence the stability of the derivatives against S1P lyase. In consequence of the introduction of an additional methyl group on carbon 1 it was assumed, based on studies of compound **2**, **11**, and **12**, that 1-branched compounds are not - or only moderately - phosphorylated by sphingosine kinases.

Using the NBD labeled C12-ceramide **13**, it was also investigated, whether this 1-branched compound has modified properties regarding cell uptake and localization in *Chlamydia trachomatis* infected cells. Finally, dihydrosphingosines **14** and **15** were synthesized as standards for identification and quantification of novel sphingolipids in yeast.

These novel sphingosine analogues could make a great contribution to research of receptor subtypes and corresponding biological responses due to their different affinity and specificity towards involved metabolic enzymes and certain receptors.

**Schlagwörter:** Sphingosin-1-phosphat (S1P), S1P-Rezeptoren, *cis*-4-Methylsphingosin, *Garner*-Aldehyd, Struktur-Wirkungsbeziehung, Sphingosin-Derivate

---

# 1 Einleitung

Sphingolipide sind ubiquitäre Komponenten der Zellmembran in allen eukaryotischen Organismen, sowie einigen Prokaryoten<sup>[1]</sup> und Viren<sup>[2]</sup>. Ihre Entdeckung geht zurück auf den deutschen Mediziner und Chemiker *J. L. W. Thudichum*, der 1884 während seinen Arbeiten am menschlichen Gehirn diese Stoffklasse durch fraktionierte Kristallisation isolierte.<sup>[3-4]</sup>

Zusammen mit Cholesterol und Glycerophospholipiden bilden die Sphingolipide die essentiellen strukturellen Bausteine der biologischen Membranen.<sup>[5]</sup> Diese regulieren die Membranfluidität und formen bestimmte hydrophobe Lipidmikrodomänen, die sogenannten *Lipid Rafts*.<sup>[6-7]</sup> Ein wichtiger Vertreter der Sphingolipide ist Sphingosin, welches zunächst nur als Intermediat des Sphingolipid-Metabolismus angesehen wurde.<sup>[8]</sup> Erst die Entdeckung seiner Fähigkeit die Proteinkinase C (PKC) zu inhibieren führte zur Annahme, dass Sphingolipide als Signalmoleküle fungieren können. Es stellte für die Wissenschaft eine Herausforderung dar die Vielfalt von zellulären Prozessen, die durch Sphingolipide reguliert werden, zu verstehen. Gleichzeitig boten viele Eingriffsmöglichkeiten in dem Sphingolipid-Stoffwechsel ein sehr breites Spektrum an therapeutischen Ansätzen. Inzwischen dienen die Sphingolipide als entwicklungspezifische Marker<sup>[9]</sup> und finden ihre Anwendung bei der Bestimmung der Blutgruppe nach dem AB0-System.<sup>[10]</sup> Zudem wurde bewiesen, dass Sphingolipide in die Pathogenese vieler Krankheiten, wie Krebs, Asthma, Diabetes Melitus und in Störungen des vaskulären und Immunsystems, involviert sind.<sup>[11]</sup>

---

## 2 Stand der Forschung

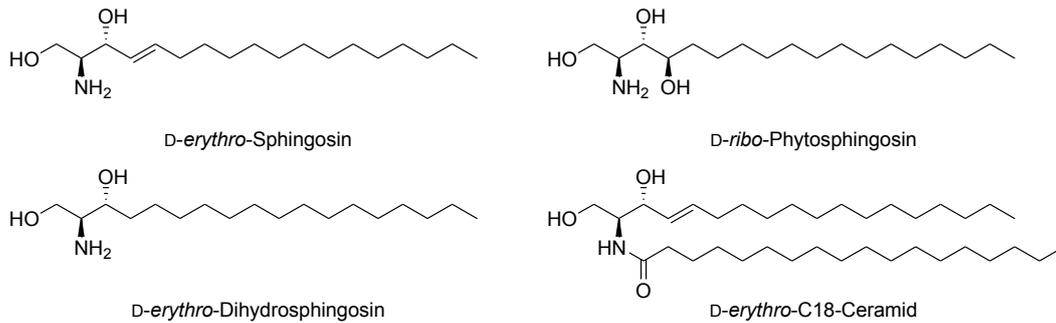
Ein ultimatives Ziel in der Biologie und Biochemie ist es, die Zusammenhänge zwischen der Struktur der Biomoleküle und ihrer Funktion in der natürlichen Umgebung zu verstehen.<sup>[12]</sup> Bei den Sphingolipiden ist das Erreichen dieses Ziels zusätzlich erschwert, da in ihrem Stoffwechsel die Metaboliten fortwährend ineinander umgewandelt werden.<sup>[6]</sup>

### 2.1 Sphingolipide

Sphingolipide sind sowohl in der zellulären Plasmamembran, als auch in den Membran-Doppelschichten der jeweiligen Zellkompartimente, wie unter anderem im Endoplasmatischen Retikulum (ER), Lysosom oder Golgi-Apparat, in hohen Konzentrationen zu finden.<sup>[13]</sup>

Bei den Säugetieren basiert der grundlegende Aufbau auf dem Aminodialkohol *D-erythro*-Sphingosin (2-Aminooctadecen-1,3-diol),<sup>[5]</sup> wobei das C<sub>18</sub>-Gerüst mit einer C4-C5-Doppelbindung am häufigsten auftritt.<sup>[14]</sup> Die exakte Struktur dieses Bausteins wurde erstmalig 1947 von *H. E. Carter et al.* identifiziert.<sup>[15]</sup> In Pilzen und Pflanzen kommen die langkettigen sphingoiden Basen *D-erythro*-Dihydrosphingosin und *D-ribo*-Phytosphingosin am häufigsten vor (**Abbildung 2-1**).<sup>[16]</sup> Aufgrund der Anwesenheit zweier Stereozentren im Molekül können vier Stereoisomere gebildet werden. Die *D-erythro*-Konfiguration ist die natürlich vorkommende, obgleich in Mikroben und Wirbellosen wie Algen und Schwämmen auch *L-threo*-Sphingosin gefunden wurde.<sup>[1]</sup>

Die komplexeren Sphingolipide leiten sich von diesem Grundgerüst ab. Durch eine *N*-Acylierung wird ein C<sub>16</sub>- bis C<sub>26</sub>-Fettsäurerest über eine Amidbindung an das Molekül geknüpft, sodass Ceramide (Cer) entstehen (**Abbildung 2-1**). Diese gelten als Grundkörper der Sphingolipide, da sie sowohl über eine Phosphoesterbindung oder eine glykosidische Bindung am C1 mit hydrophilen Kopfgruppen zu höheren Sphingolipid-Vertretern verstoffwechselt werden können, als auch durch ihre metabolische Degradation zu weiteren weniger komplexen Intermediaten abgebaut werden.<sup>[5]</sup>



**Abbildung 2-1:** Natürlich vorkommende Vertreter der Sphingolipide.

Je nach Kopfgruppe lassen sich die Sphingolipide in die Glycosphingolipide und die Phosphosphingolipide unterteilen. Die letzteren zeichnen sich durch eine Modifikation der primären Hydroxylgruppe durch ein Phosphorylcholin, ein Phosphat oder ein Phosphorylethanolamin aus. Wird diese Hydroxylgruppe mit Mono- oder Oligosacchariden verknüpft, so entstehen Glycosphingolipide. Sie können weiter je nach Anzahl und Art der Zuckerreste und anderen funktionellen Gruppen in neutrale Cerebroside, saure Sulfatide und sialinsäurehaltige Ganglioside unterteilt werden.<sup>[16-17]</sup> Sphingolipid-Moleküle haben einen amphiphilen Charakter, da sie sowohl eine hydrophile Kopfgruppe als auch eine hydrophobe Gerüstkette besitzen.<sup>[18]</sup>

Neben den membranbildenden Eigenschaften vermitteln die Sphingolipide ein breites Spektrum an physiologischen und pathologischen Prozessen und können über das Schicksal der Zelle entscheiden.<sup>[16]</sup> Die Glycosphingolipide (GSL) sind zentrale Bestandteile der Lipidmikrodomänen, die ebenfalls die Signaltransduktion durch die Membran, die Vermittlung der Wechselwirkung und die Erkennung zwischen Wirt und mikrobiellem Pathogen, z. B. Bakterien oder Viren,<sup>[19-21]</sup> zur Aufgabe haben.<sup>[22]</sup> Zusätzlich spielen sie eine wichtige Rolle bei den zelltypspezifischen Adhäsionsprozessen.<sup>[19-20]</sup>

Daher gehören die Sphingolipid-Metaboliten wie Ceramid (Cer), Sphingosin (Sph) und Sphingosin-1-phosphat (S1P) zur Klasse neuartiger potentiell bioaktiver Moleküle, die in Zellprozesse, wie Apoptose, Zellproliferation und –differenzierung, involviert sind.<sup>[23]</sup>

### 2.1.1 Metabolismus der Sphingolipide

Die Grundlagenforschung der vergangenen Jahrzehnte hat viele Erkenntnisse bezüglich der anabolischen und katabolischen Stoffwechselwege der Sphingolipide und der dazugehörigen Enzyme gewonnen. Die Komplexität des Metabolismus liegt in der fortwährenden Umwandlung der Intermediate. Aufgrund des strukturellen Aufbaus wird die physiologische Umgebung der Sphingolipide fast ausschließlich auf die biologischen Membranen beschränkt, wo sie von den membrangebundenen oder -assoziierten Enzymen umgewandelt werden.<sup>[24]</sup>

## 2.1 Sphingolipide

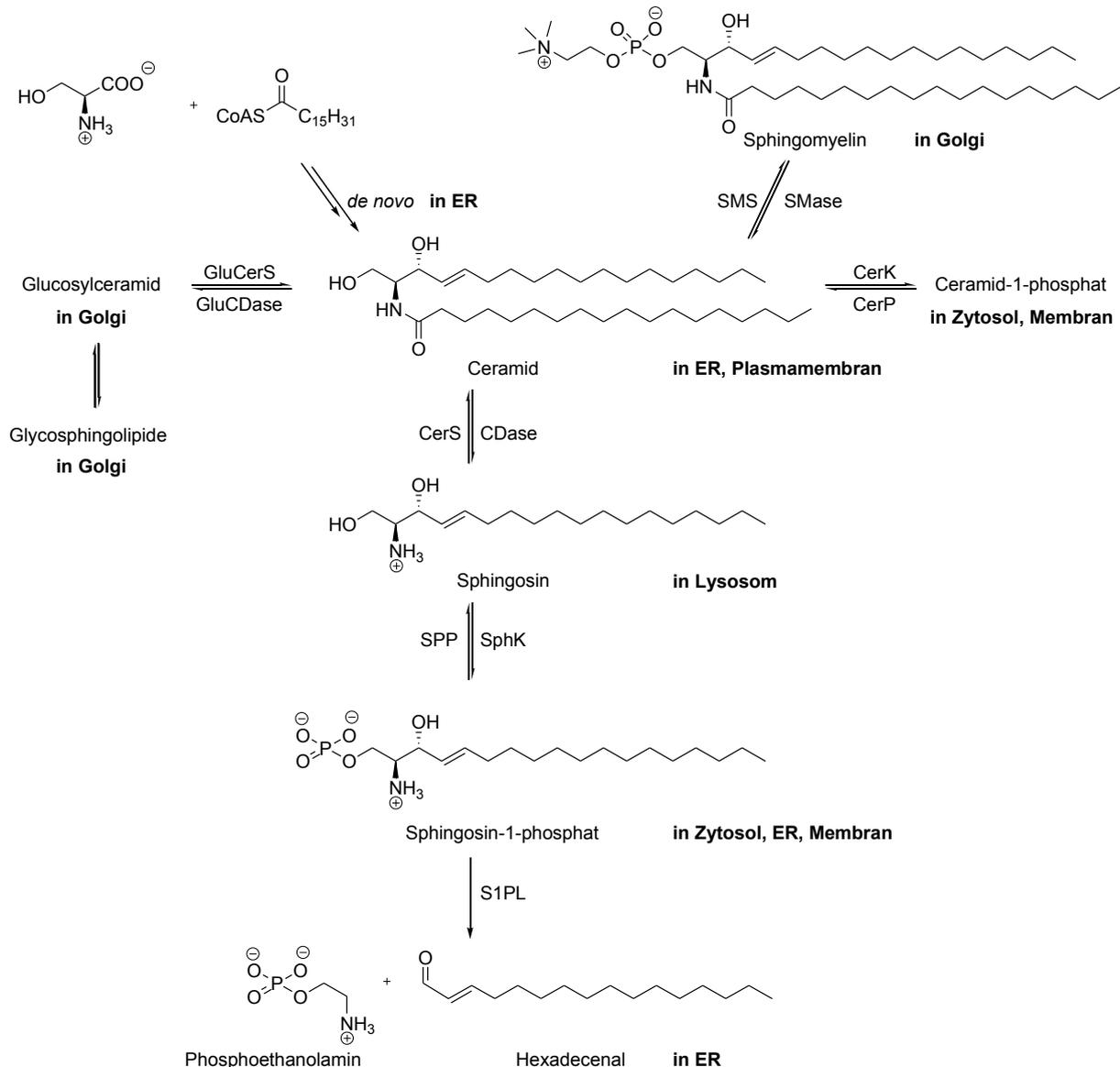
---

Ceramid nimmt im Sphingolipid-Metabolismus eine zentrale Rolle ein (**Schema 2-1**). Es kann sowohl über die *de novo* Biosynthese als auch über den endozytotischen Recyclingweg synthetisiert werden.<sup>[25]</sup> Die *de novo* Biosynthese findet vorwiegend auf der zytosolischen Seite des ERs statt.<sup>[24]</sup> Sie wird u.a. durch Stimuli wie Sauerstoffmangel oder Tumornekrosefaktor- $\alpha$  ausgelöst.<sup>[25]</sup> Im ersten Schritt kondensieren L-Serin und Coenzym A-aktivierte Fettsäure zum 3-Ketosphingamin.<sup>[11]</sup> Dieser geschwindigkeitsbestimmende Schritt wird durch das Enzym Serinpalmitoyltransferase (SPT) katalysiert.<sup>[26]</sup> Das entstandene 3-Ketosphingamin wird im Weiteren über die Intermediate Sphingamin und Dihydroceramid zum Ceramid umgewandelt.<sup>[22]</sup> Anschließend wird Cer entweder nicht vesikulär mithilfe des Ceramidtransportproteins CERT<sup>[11]</sup> oder vesikulär zum Golgi-Apparat befördert, wo es der Synthese komplexerer Sphingolipide dient.<sup>[16, 27]</sup> Im Lumen des Golgi-Apparats kann Ceramid bei Säugetieren zu Sphingomyelin mittels Sphingomyelinsynthase (SMS) metabolisiert werden.<sup>[16]</sup> Des Weiteren wird es zum Glycosylceramid auf der zytosolischen Seite der Membran<sup>[25]</sup> oder zum Ceramid-1-phosphat (C1P)<sup>[16]</sup> verstoffwechselt. Im Inneren des Golgi-Apparates werden aus Glycosylceramiden komplexere Glycosphingolipide synthetisiert. Anschließend findet der vesikuläre Transport von Sphingomyelin und GSL vom Golgi-Apparat zu der Plasmamembran statt.<sup>[24]</sup> Gleichzeitig kann im Golgi-Apparat die Hydrolyse von Sphingomyelin und z. B. Cerebrosiden zum Recycling des Cer beitragen.<sup>[6]</sup>

Der Katabolismus der Sphingolipide findet meist in sauren Zellkompartimenten wie Lysosomen und späten Endosomen statt.<sup>[28]</sup> Er ist allerdings auch auf beiden Seiten der Plasmamembran und auf anderen Zellmembranen zu finden. Die Aktivierung des Abbaus komplexer Sphingolipide erfolgt durch diverse Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Antigene und zellulärer Stress.<sup>[29]</sup> Ceramid kann durch die Hydrolyse von Plasmamembran-Sphingolipiden,<sup>[23]</sup> welche direkt auf der Zellmembran abgebaut werden, regeneriert werden. Zusätzlich können komplexe Sphingolipide in endozytotischen Vesikeln zum Lysosom transportiert werden, wo sie durch die zuständigen Enzyme Sphingomyelinasen (SMasen) und Glycosidasen degradiert werden.<sup>[24]</sup> Das in der Plasmamembran gebundene oder im Lysosom generierte Ceramid wird durch verschiedene Arten der Ceramidasen (CDasen) deacyliert,<sup>[27]</sup> wobei Sphingosin entsteht. Je nach pH-Optimum des Enzyms werden die Ceramidasen in saure CDase (pH = 4.5, vorwiegend im Lysosom), neutrale CDase (pH = 6.5-8.5, vorwiegend in Plasmamembran, Mitochondrium) und alkalische CDase (pH = 9.5-10, vorwiegend in Epidermis, ER, Golgi) eingeteilt.<sup>[30-31]</sup>

Das Sphingosin kann anschließend aufgrund seiner partiellen Löslichkeit im wässrigen Milieu das Lysosom verlassen und durch Sphingosinkinase 1 (SphK 1) im Zytosol phosphoryliert werden. Ferner kann es in der ER-Membran gebunden und dort durch Ceramidsynthase (CerS) zum Ceramid recycelt werden.<sup>[24]</sup> Die Gruppe um Y. Hannun schätzte 2008 die

Menge des gelösten Sphingosins auf 30 %, wobei die restlichen 70 % in der Membran bleiben. Sphingosin kann ebenso durch die membrangebundene Sphingosinkinase 2 (SphK 2) phosphoryliert werden.<sup>[32]</sup> Zusätzlich kann Sphingomyelin durch die Lysophospholipase D, Autotaxin, direkt zum S1P hydrolysiert werden.<sup>[16, 33]</sup>



**Schema 2-1:** Metabolismus der Sphingolipide mit entsprechenden Zellkompartimenten (**fett**), in denen die Umwandlung vorwiegend stattfindet; SMS, Sphingomyelinsynthase; SMase, Sphingomyelinase; GluCerS, Glucosylceramidsynthase; GluCDase, Glucosylceramidase; CerK, Ceramidkinase; CerP, Ceramidphosphatase; CerS, Ceramidsynthase; CDase, Ceramidase; SPP; Sphingosin-1-phosphat-Phosphatase; SphK, Sphingosinkinase; S1PL, Sphingosin-1-phosphat-Lyase, modifiziert nach <sup>[34]</sup>.

Das erhaltene Sphingosin-1-phosphat kann anschließend durch spezifische S1P-Phosphatasen und unspezifische Lipidphosphatphosphatasen im ER<sup>[11]</sup> wieder zum Sphingosin dephosphoryliert werden.<sup>[35]</sup> Zusätzlich kann S1P irreversibel aus dem Sphingolipid-Metabolismus durch das Enzym Sphingosin-1-phosphat-Lyase (S1PL) entfernt werden, indem es in Phosphoethanolamin und Hexadecenal gespalten wird.<sup>[6]</sup>

Infolge der unterschiedlichen biologischen Aktivitäten einzelner Intermediate kontrollieren die metabolischen Enzyme das kritische Gleichgewicht des zellulären Sphingolipid-Levels.<sup>[23]</sup> Am Beispiel des apoptose-auslösenden Ceramids und des proliferativen Sphingosin-1-phosphates, die ineinander umgewandelt werden können, wird deutlich, dass das dynamische Verhältnis zwischen beiden Metaboliten über das Schicksal der Zelle entscheiden kann.<sup>[36]</sup>

### 2.1.1.1 Sphingosinkinasen

Das menschliche Genom enthält etwa 600 Proteinkinasen, die auch in anderen Eukaryoten als zentraler Mechanismus der zellulären Kaskaden für die Signaltransduktion dienen und in alle biologischen Prozesse involviert sind.<sup>[37]</sup>

Die Sphingosinkinasen katalysieren die Phosphorylierung von Sphingosin, indem eine  $\gamma$ -Phosphatgruppe von ATP auf die primäre Hydroxylgruppe übertragen wird.<sup>[37-38]</sup> Es existieren zwei Säugetier-Isoformen der Kinasen, die SphK 1 und SphK 2.<sup>[39]</sup>

Obwohl beide Isoformen das gleiche Substrat (Sphingosin) zum selben Produkt (S1P) metabolisieren, unterscheiden sie sich in ihren katalytischen Eigenschaften, der intrazellulären Lokalisierung, der Gewebeexprimierung und der spezifischen Funktion (siehe **Tabelle 2-1**).<sup>[40]</sup> Die Sphingosinkinase 2 besitzt eine weniger ausgeprägte Substratspezifität, da sie nicht nur *D-erythro*-Sphingosin, sondern auch Dihydrosphingosin, Phytosphingosin sowie andere Derivate (siehe Abschnitt 2.4) umsetzen kann.<sup>[11, 41]</sup>

Die Lokalisierung der Kinasen entscheidet über ihre Funktion in den zellulären Prozessen.

**Tabelle 2-1:** Übersicht zu Eigenschaften und Funktionen der Sphingosinkinase-Isoformen bei Säugetieren.<sup>[11, 25, 40, 42-43]</sup>

	Sphingosinkinase 1	Sphingosinkinase 2
<b>Größe</b>	43 kDa	68 kDa
<b>Aufbau</b>	keine Transmembrandomäne, drei Ca/Calmodulin-Domänen	vier Transmembrandomänen, BH3-Domäne
<b>Gewebeverteilung</b>	Lunge, Milz, Hirn, Herz	Leber, Herz
<b>Lokalisierung</b>	Zytosol	ER, Plasmamembran
<b>Substratspezifität</b>	<i>D-erythro</i> -Sph	<i>D-erythro</i> -Sph, DihydroSph, PhytoSph
<b>Zellwachstum</b>	stimulierend	unterdrückend
<b>Funktion</b>	proliferativ	proapoptotisch

Die Enzyme werden durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert. Hierbei wird die Kinase 1 durch Phosphorylierung, zum Beispiel mittels Proteinkinase C, Proteinkinase D (PKD) oder ERK (engl. *extracellular-signal regulated kinase*), zur Plasmamembran translokalisiert.<sup>[40, 44-46]</sup> Das

dadurch synthetisierte proliferative Sphingosin-1-phosphat induziert anti-apoptotische mitogene Effekte, z. B. Zellskelettlagerung und Zellwachstum, unabhängig von Rezeptoren (siehe Abschnitt 2.2).<sup>[40]</sup> Daher kann die Überexpression von SphK 1 onkogen wirken, was bei diversen Krebsarten nachgewiesen wurde.<sup>[11, 42]</sup>

Im Gegensatz dazu besitzt SphK 2 aufgrund ihrer BCL2-homologen Domäne die Fähigkeit, durch die Freisetzung von Cytochrom C und die Aktivierung von Caspase-3, Rezeptor-unabhängig das Zellwachstum zu inhibieren und die Apoptose auszulösen.<sup>[11, 40]</sup>

### 2.1.1.2 Sphingosin-1-phosphat-Lyase

Die Sphingosin-1-phosphat-Lyase ist das wichtigste katabolische Enzym im Sphingolipid-Stoffwechsel und wurde erstmals 1968 durch die Gruppe um *W. Stoffel* beschrieben.<sup>[47]</sup> Das aktive Zentrum des ER-Enzyms sowie die Pyridoxal-5'-phosphat (PLP)-Bindungsseite zeigen zum Zytosol.<sup>[42, 48]</sup> Bei Säugetieren wird es, mit Ausnahme der Thrombozyten, ubiquitär exprimiert.<sup>[49]</sup>

S1PL gehört zu der Familie der PLP-abhängigen C-C-Lyasen, die eine reversible Spaltung von S1P zwischen den Kohlenstoffen 2 und 3 in einer Retro-Aldol-Reaktion katalysiert. Dabei entstehen ein langkettiger Aldehyd und Phosphoethanolamin.<sup>[14]</sup> Das Enzym besitzt ein pH-Optimum von 7.2-7.4 und eine sehr hohe Substratspezifität für *D-erythro*-sphingoide Basen.<sup>[50]</sup> Die Lyase stellt einen wichtigen Regulator des intrazellulären S1P-Levels dar und kann folglich in diverse Zellprozesse involviert sein. Des Weiteren wurde gezeigt, dass dieses Enzym für die Aufrechterhaltung des S1P-Gradienten zwischen Blut und Gewebe, welcher für den Lymphozytentransfer wichtig ist, zuständig ist.<sup>[51]</sup>

### 2.1.1.3 Sphingosin-1-phosphat-Phosphatasen

Der bioaktive Sphingolipid-Metabolit Sphingosin-1-phosphat kann auch durch die Hydrolyse des Phosphat-Rests wieder in den Stoffwechselkreislauf eingeschleust werden. Dies kann über drei unspezifische Lipidphosphatphosphatasen (LPP) oder zwei spezifische S1P-Phosphatasen (SPP) geschehen.<sup>[52]</sup> Zu ihren Aufgaben gehören die Regulation des Lysophospholipid-Levels und die Zersetzung von intrazellulären phospholipidischen Botenstoffen, was eine Signalterminierung zur Folge hat.<sup>[42]</sup>

Die beiden spezifischen SPP 1 und SPP 2 sind ebenfalls membrangebundene, vorwiegend im ER lokalisierte, Magnesium-abhängige Lipidphosphat-phosphohydrolasen.<sup>[25]</sup> Sie besitzen 70-prozentige strukturelle Ähnlichkeit und ein breites, teilweise überlappendes Gewebeverteilungsmuster.<sup>[14, 42]</sup> Die SPP 1-Isoform des Enzyms hat die Fähigkeit, den Transport von Cer aus dem ER zum Golgi-Apparat zu verringern,<sup>[53]</sup> indessen ist die SPP 2 bei Entzündungsprozessen hochreguliert.<sup>[54]</sup>

### 2.1.2 Sphingosin

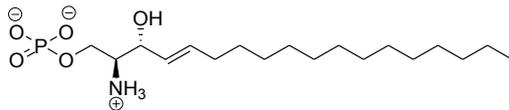
Sphingosin ist ein weiterer bioaktiver Sphingolipid-Vertreter, welcher nicht *de novo*, sondern ausschließlich aus anderen Metaboliten durch Ceramid-Hydrolyse und S1P-Dephosphorylierung synthetisiert werden kann. Bei Säugetieren kommt es in einer *D-erythro*-Konfiguration vor, wobei andere Stereomere geringere biologische Aktivität aufweisen.<sup>[55]</sup> Aufgrund des amphiphilen Charakters und der unter den Sphingolipiden einfachsten Struktur ist Sphingosin in der Lage schnell zwischen den Membranen zu diffundieren, wodurch seine Effekte in mehreren verschiedenen Zellkompartimenten nachzuweisen sind.<sup>[29]</sup>

1990 wurde erstmalig die biologische Aktivität dieses Sphingolipids beschrieben, als *T. K. Gosh* den potenten und reversiblen inhibitorischen Effekt des Sphingosins auf die Proteinkinase C gezeigt hat.<sup>[3]</sup> Heutzutage ist bekannt, dass Sphingosin in der Endozytose, der Calcium-Homöostase, dem Zellzyklus sowie bei der Organisation des Aktin-Zytoskeletts eine regulierende Rolle spielt<sup>[24]</sup> und Lipidphosphatphosphohydrolasen inhibieren kann.<sup>[29]</sup>

Abhängig vom Zelltyp kann Sphingosin sowohl proliferativ als auch proapoptotisch wirken.<sup>[56]</sup> Beispielsweise wurden in Maus-Neuroblastom-Zellen beim Zusatz von Sphingosin bei Konzentrationen von 1-2  $\mu\text{M}$  eine Inhibierung der Neurogenese und ein Rückzug von Neuriten in der Serum-freien Umgebung festgestellt.<sup>[57]</sup>

Durch die Phosphorylierung der primären Hydroxylgruppe wird Sphingosin in ein weitaus bedeutenderes Metabolit, Sphingosin-1-phosphat, umgewandelt.

### 2.1.3 Sphingosin-1-phosphat



**Abbildung 2-2:** Sphingosin-1-phosphat.

Ursprünglich wurde Sphingosin-1-phosphat als ein Intermediat des Sphingolipid-Stoffwechsels beschrieben. Erst Anfang der 1990er Jahre wurde erkannt, dass dieses Lysophospholipid als ein Lipidmediator in nahezu allen biologischen Prozessen auftritt.<sup>[58]</sup> Im Jahr 1991 wurde erstmalig gezeigt, dass S1P das Zellwachstum regulieren<sup>[59]</sup> und die Apoptose unterdrücken kann.<sup>[36]</sup> Seitdem stieg das Interesse der Wissenschaftler an der Aufklärung der Funktionen dieses Sphingolipids exponentiell an.

#### 2.1.3.1 Vorkommen

Die Konzentration von S1P im Organismus ist sehr unterschiedlich. Während die Körperflüssigkeiten die höchste Konzentration von 400 bis 1100 nM im Serum bzw. 200 bis 900 nM im Plasma aufweisen, ist die Menge des S1P im Gewebe mit 0.5 bis 75 pM sehr

gering.<sup>[25, 51, 60-61]</sup> Der Konzentrationsgradient wird durch unterschiedliche Aktionen von Sphingosinkinasen und S1P-Lyasen bestimmt.<sup>[42]</sup>

Die Hauptquellen des S1P im Blut sind die aktivierten Thrombozyten und die Erythrozyten, wobei in beiden Blutbestandteilen die Sphingosinkinasen exprimiert werden, ihnen jedoch die S1P-Lyase-Aktivität fehlt.<sup>[62-63]</sup> Neue Studien belegen zusätzlich, dass vaskuläre Endothelzellen<sup>[64]</sup>, Mastzellen<sup>[65]</sup> und Lymphozyten S1P speichern und sezernieren können.<sup>[66-67]</sup> Die Freisetzung wird durch Stimuli wie Adenosindiphosphat (ADP), Thrombin, Stress, Tumornekrosefaktor  $\alpha$  und Kollagen hervorgerufen.<sup>[14, 28]</sup>

Im Blut ist Sphingosin-1-phosphat an HDL (engl. *high density lipoprotein*, Lipoprotein hoher Dichte) und Serumalbumin gebunden,<sup>[68]</sup> wodurch es vor dem Abbau geschützt ist und gleichzeitig seine Bioverfügbarkeit gesenkt wird.<sup>[8]</sup> Trotzdem bleibt der Metabolit aktiv und kann leicht dissoziieren.<sup>[25]</sup>

### 2.1.3.2 Primäre Funktionen von S1P

Nach der Phosphorylierung von Sphingosin kann das entstandene Sphingosin-1-phosphat als intrazelluläres Signalmolekül eine Auswahl an zellulären Antworten auf direktem Wege induzieren.<sup>[38]</sup>

Es kann direkt die Histonacetylasen HDAC1 und 2 inhibieren,<sup>[3, 69]</sup> indem es die Abspaltung eines Acyl-Restes vom Lysin-Rest im Histon-Schwanz verhindert. Somit ist S1P mit der epigenetischen Regulation der Genexpression verbunden.<sup>[69]</sup> S1P kann den intrazellulären Calciumion-Vorrat mobilisieren,<sup>[3]</sup> die Zellproliferation stimulieren und die Apoptose unterdrücken.<sup>[70-71]</sup> In neuronalen Zellen kommt es durch S1P zum Zurückziehen von Neuriten, die Invasivität der Tumorzellen wird gehemmt.<sup>[38]</sup>

Ferner kann Sphingosin-1-phosphat durch die Adenosintriphosphat (ATP)-bindende Familie von ABC-Transportproteinen oder durch das ATP-unabhängige Transportprotein Spinster 2 (Spns2) aus der Zelle transportiert werden.<sup>[72-74]</sup>

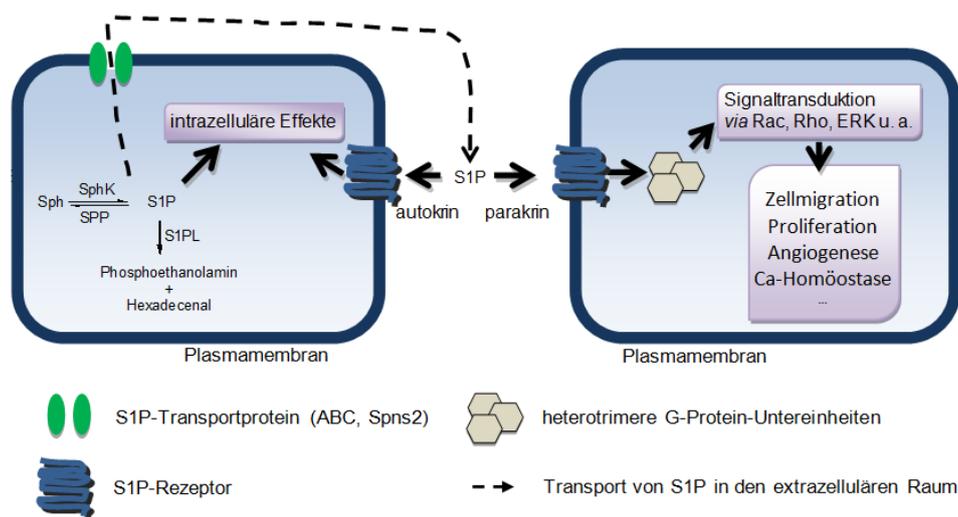
### 2.1.3.3 Wirkung über die S1P-Rezeptoren

Das ausgeschleuste Sphingosin-1-phosphat besitzt eine hohe Affinität zu den fünf spezifischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren S1P1 bis 5, die auf der Oberfläche der Zelle zu finden sind.<sup>[75]</sup> Die S1P-abhängige Stimulation dieser Rezeptoren wurde 1998 von *T. Hla et al.* erstmalig nachgewiesen.<sup>[76]</sup>

Hierbei agiert endogenes S1P als extrazellulärer Mediator, indem es an die Rezeptoren agonistisch bindet und somit ihre zeitabhängige Internalisierung hervorruft.<sup>[42]</sup> Die Interaktion zwischen dem Liganden und den Rezeptoren kann sowohl autokriner als auch parakriner Natur sein.<sup>[28, 75]</sup> Durch die Wechselwirkung mit den Rezeptoren werden die Rezeptor-

## 2.2 Sphingosin-1-phosphat-Rezeptoren

gebundenen heterotrimeren G-Proteine (Guanin-Nukleotide-bindende Proteine) und folglich Kinase-Kaskaden stimuliert. Dies resultiert unter anderem in der Aktivierung der GTPasen (Guanosintriphosphatasen) Rho und Rac, der Mobilisierung des Calciumflusses und in der ERK-Aktivierung.<sup>[29]</sup> Demzufolge werden die zellulären Prozesse wie das Zellwachstum, die Proliferation, die Prävention der Apoptose und das Reorganisieren des Zytoskeletts induziert (**Abbildung 2-3**).<sup>[29, 38]</sup>



**Abbildung 2-3:** Schematische Darstellung der zellulären Umwandlung des S1P und seiner direkten und rezeptorvermittelten Wirkungsweise (modifiziert nach <sup>[25]</sup>). In der Zelle phosphoryliertes S1P wird zum einen durch S1P-Lyase enzymatisch abgebaut, zum anderen durch Transportproteine (ABC, Spns2) aus der Zelle ausgeschleust. Das in der Zelle verbliebene S1P löst intrazelluläre Effekte aus. Das extrazelluläre S1P induziert durch autokrine und parakrine Interaktion mit den S1P-Rezeptoren über eine Aktivierung der G-Proteine mit anschließender Signaltransduktion weitere zelluläre Prozesse.

Aufgrund seiner mitogenen Wirkung beeinflusst S1P die Angiogenese, die Neurogenese, die Regulation des Immunsystems, die Wundheilung und die kardiovaskuläre Reifung.<sup>[28, 58, 77-78]</sup> Der Konzentrationsgradient erlaubt dem Plasma-S1P als chemischer Lockstoff für Lymphozyten im lymphatischen Gewebe zu agieren.<sup>[42, 79]</sup>

Die proliferativen Eigenschaften, einschließlich der Fähigkeit die Zellinvasion zu kontrollieren, machen diesen Lipidmediator zum Hauptprotagonisten bei dem Auftreten zahlreicher Krankheiten. Dazu gehören die Erkrankungen des vaskulären Systems<sup>[80]</sup> und des zentralen Nervensystems (ZNS), Krebsprogression<sup>[8]</sup>, Allergien<sup>[81]</sup>, Arteriosklerose<sup>[25]</sup> und Fertilitätsstörungen.<sup>[33, 82]</sup>

## 2.2 Sphingosin-1-phosphat-Rezeptoren

Die S1P-Rezeptoren (GPCR, engl. *G-protein-coupled receptors*) sind an der Zelloberfläche exprimierte Proteine mit sieben Transmembranhelices, die an heterotrimere G-Protein-

Untereinheiten  $G_{i/o}$ ,  $G_q$ ,  $G_{12/13}$  gekoppelt sind.<sup>[83-84]</sup> Es wird zwischen den fünf Subtypen S1P1 bis 5 unterschieden. Während S1P1 nur an  $G_{i/o}$  gekoppelt ist, leiten S1P2 und S1P3 die Signale über alle Untereinheiten weiter. S1P4 und S1P5 aktivieren nur  $G_{i/o}$  und  $G_{12/13}$ . Das Gewebeverteilungsmuster der Rezeptoren unterscheidet sich in der Lokalisierung. S1P1 ist ubiquitär vorhanden, genau wie S1P2 und S1P3, die nahezu in allen Organen exprimiert sind. Die Subtypen 4 und 5 haben hingegen ein beschränktes Expressionsmuster (**Tabelle 2-2**).<sup>[82]</sup>

Die Rezeptoren werden vor allem durch den hochaffinen Liganden Sphingosin-1-phosphat stimuliert, obwohl Sphingolipide wie Dihydrosphingosin, Phytosphingosin und einige Sphingolipid-Analoga (siehe Abschnitt 2.4) ebenfalls eine gewisse Affinität aufweisen. Die Signalübertragung erfolgt durch die Aktivierung oder die Inhibition bestimmter zellulärer Faktoren. Dazu gehören die kleinen GTPasen Rho, Rac und Ras; die Phospholipase C, die Proteinkinase C, die Adenylatzyklase und ERK.<sup>[85-86]</sup> Durch die Stimulation von S1P2, S1P3 und S1P4 wird über einen PLC-abhängigen Weg der Calcium-Vorrat mobilisiert. Subtyp 1 spielt indessen eine große Rolle bei der Regulierung der Lymphozyten-Rezirkulation und vermittelt den Austritt der weißen Blutkörperchen aus dem lymphatischen Gewebe.<sup>[87-88]</sup>

Die zellspezifische Expression der Rezeptoren in Kombination mit ihrer differentiellen G-Protein-Kopplung resultiert in der Vielfalt zellulärer Prozesse an denen GPCR beteiligt sind. Hierbei können die einzelnen Subtypen überlappende oder gegensätzliche physiologische Effekte hervorrufen.<sup>[42]</sup> Neben der Neurogenese, der Entwicklung normaler Immunantwort und Calcium-Homöostase, regulieren GPCR die vaskuläre Kontraktilität sowie die Entzündungsreaktionen und die Innenohrfunktion.<sup>[29, 33, 82, 86]</sup>

**Tabelle 2-2:** Zusammenfassung zu G-Protein-gekoppelten Oberflächenrezeptoren S1P1-5.<sup>[25, 33, 42, 86]</sup>

Rezeptor	G-Protein	Expressionsmuster	Ausgewählte physiologische Effekte
<b>S1P1</b>	$G_{i/o}$	ubiquitär	Proliferation, Zellmigration, Lymphozytentransfer, Angiogenese, Neurogenese, Zell-Zell-Kontakt
<b>S1P2</b>	$G_{i/o}$ , $G_q$ , $G_{12/13}$	weit verbreitet, vaskuläre Glattmuskelzellen	Inhibition der Proliferation und Migration, Hören, neuronale Reizung
<b>S1P3</b>	$G_{i/o}$ , $G_q$ , $G_{12/13}$	weit verbreitet, Herz, Lunge, Milz, Niere	Hören, pulmonale Epithelbarriere, Senkung der Herzfrequenz
<b>S1P4</b>	$G_{i/o}$ , $G_{12/13}$	Immunzellen, Leukozyten	Inhibition der Proliferation und Zytokin-Sekretion in T-Zellen
<b>S1P5</b>	$G_{i/o}$ , $G_{12/13}$	ZNS, Haut, Oligodendrozyten	Zellmigration, Inhibition der Proliferation

### 2.3 Pathogenese und pharmakologisch relevante Vertreter der Sphingolipide

Angeborene und erworbene degenerative Störungen des Sphingolipid-Metabolismus basieren häufig auf der Einschränkung oder Erhöhung der Aktivität involvierter Enzyme. Sie werden mit Krankheiten wie Sphingolipidosen, Krebs, Diabetes, Alzheimer und der Beeinträchtigung des Immunsystems in Zusammenhang gebracht.<sup>[2, 5, 50, 89]</sup>

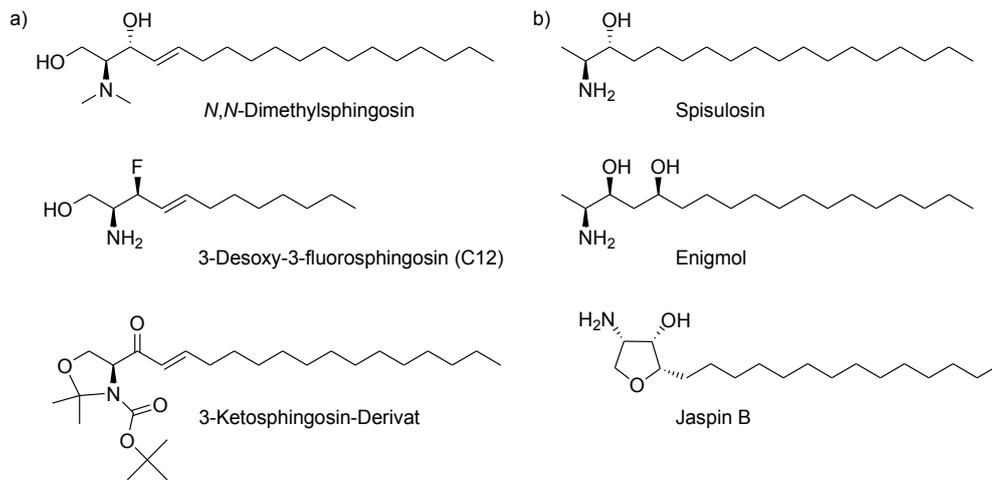
#### 2.3.1 Krebs

Ein verändertes Level der aktiven Sphingolipide sowie der im Stoffwechsel involvierten Enzyme sind in der Krebspathogenese und der -progression von großer Bedeutung.<sup>[90]</sup> Dabei scheint die Balance zwischen dem proapoptotischen Ceramid und dem proliferativen Sphingosin-1-phosphat die entscheidende Rolle zu spielen. Das Gleichgewicht wird durch die Enzyme Sphingosinkinase, S1P-Lyase und Ceramidsynthase beeinflusst.<sup>[91]</sup>

Bei vielen Krebsarten (Brust, Lunge, Gehirn, u.a.) wird eine erhöhte Expression der Sphingosinkinase 1 beobachtet.<sup>[25]</sup> Die onkogene Wirkung des Enzyms beschränkt sich nicht nur auf die Überproduktion des Zellwachstum-fördernden S1P, sie verleiht dem Tumor zusätzlich eine Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapie.<sup>[8, 92]</sup> Somit repräsentiert SphK 1 ein interessantes Target für die Erforschung von Wirkstoffen, die gegen Krebs eingesetzt werden können. Durch den Einsatz selektiver Inhibitoren könnte eine Unterdrückung der krankhaften Proliferation erreicht werden. Beispielsweise stellt das Sphingosin-Derivat *N,N*-Dimethylsphingosin (DMS) einen potenten kompetitiven Inhibitor der Sphingosinkinasen in diversen Zelltypen dar (**Abbildung 2-4, a**).<sup>[93]</sup> Ein Isopropyliden- und *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-geschütztes Ketosphingosin wurde von *A. J. Melendez et al.* 2008 als ein spezifischer Inhibitor der SphK 1, welcher zudem eine geringere Toxizität als DMS aufwies, beschrieben.<sup>[23]</sup> Darüber hinaus konnte 3-Desoxy-3-fluorosphingosin als ein Inhibitor der Sphingosinkinase und PKC identifiziert werden.<sup>[38, 94]</sup>

Neben den Anti-Krebs-Therapeutika Tamoxifen und 5-Fluorouracil, die entsprechend auf hormoneller Ebene bzw. regulatorisch auf die DNA- und RNA-Synthese wirken, zeigen einige Sphingolipid-Derivate eine potenzielle tumorsuppressorische Wirksamkeit (**Abbildung 2-4, b**).<sup>[95]</sup> Diese geht mit einer erhöhten zellulären Ceramid-Konzentration einher und resultiert im Unterdrücken des Zellwachstums und dem Verstärken der Apoptose. Beispielsweise zeigen die 1-desoxy-Sphingosin-Analoga Spisulosin und biokompatibles Enigmol Zellwachstum-unterdrückende Eigenschaften in mehreren Arten von Krebszellen. Aufgrund ihrer Leitstruktur können sie nicht 1-phosphoryliert und somit nicht bis zum proliferativen S1P metabolisiert werden.<sup>[96-97]</sup> Ein weiteres aus einem Schwamm isoliertes Analogon, Jaspin B, weist untermikromolare Toxizität gegenüber Krebszellen durch die

Inhibition der Sphingomyelinsynthese auf, da dies wiederum zu einem Anstieg des Ceramid-Levels führt.<sup>[98]</sup>



**Abbildung 2-4:** a) Inhibitoren der Sphingosinkinase; b) Sphingolipid-Derivate mit tumor-suppressorischer Wirkung.

### 2.3.2 Erkrankungen des Immunsystems

Durch die Regulierung der Funktion von Mastzellen, inklusive ihrer Degranulierung und Chemotaxis, spielt S1P eine große Rolle bei der Asthma-Erkrankung<sup>[86]</sup> und den allergischen Reaktionen des respiratorischen Systems.<sup>[81]</sup>

Die bei der Immunantwort rekrutierten B- und T-Zellen besitzen hochexprimierte S1P-Rezeptoren der Subtypen 1, 4 und 5, die durch zytosolisches S1P adressiert werden. Somit kommt es zur Aktivierung der Immunzellen. Zudem kann die in den Lymphorganen präsente Sphingosinkinase das Sphingosin phosphorylieren und es so für die Aktivierung der Lymphozyten zusätzlich bereitstellen.<sup>[28, 87]</sup>

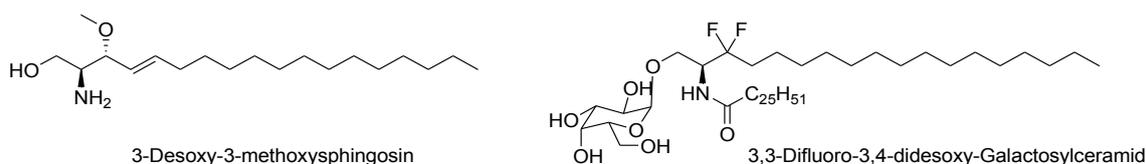
Bei Entzündungsprozessen werden zu viele Leukozyten rekrutiert, wobei daraus Störungen wie rheumatoide Arthritis, Sepsis und Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen resultieren.<sup>[19]</sup> Ist das zentrale Nervensystem betroffen werden Myelinscheiben und Axone zerstört, sodass irreversible Nervenschäden auftreten.<sup>[99]</sup> An dieser neurodegenerativen Störung, besser bekannt als Multiple Sklerose (MS), leiden über 2.5 Millionen Menschen weltweit. Die Symptomatik, die Sehstörungen, motorische Schwäche, Auftreten von Schmerzen und Depressionen beinhaltet, wird durch T-Zellen vermittelt, die die Blut-Hirn-Schranke passieren und im ZNS progressieren.<sup>[99-100]</sup>

Die meisten Medikamente zur Behandlung der Multiplen Sklerose basieren auf der Modulation der Anzahl der weißen Blutkörperchen und ihrer Funktionalität. Wirkstoffe wie Azathioprin und Mitoxandron stören die DNA- und RNA-Synthese, wodurch die Vermehrung und das Wachstum von B- und T-Zellen verhindert werden.<sup>[101-102]</sup> Indessen sorgt der

Wirkstoff Dimethylfumarat durch die Beeinflussung der entzündungsfördernden Transkriptionsfaktoren Tumornekrosefaktor und Interleukin-8 für das Umprogrammieren der Immunzellen.<sup>[103]</sup> Häufig werden hierbei Nebenwirkungen wie Lymphopenie und Leukopenie und daraus resultierende infektiöse Erkrankungen hervorgerufen.<sup>[104-105]</sup>

Zur Einschätzung des Bedarfs und des Erfolgs einer Therapie bei MS-Patienten wird in der klinischen Diagnostik das Sphingosin-Analogon 3-Desoxy-3-methoxysphingosin (**Abbildung 2-5**) eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die Menge des Derivates in menschlichem Serum bei Patienten mit akuten Schüben, im Vergleich zu stabilen Patienten, relativ oder absolut reduziert ist.<sup>[106]</sup> Interessanterweise besitzt 3-Desoxy-3-methoxysphingosin weitere pharmakologische Eigenschaften. Da es indirekt die Schilddrüsentoxizität in männlichen Ratten, vermittelt durch Erhöhung der metabolischen Leberaktivität, induziert, kann es als Biomarker für die Induktion der Enzyme in der Leber genutzt werden.<sup>[107]</sup> Zusätzlich könnte 3-Desoxy-3-methoxysphingosin zur Behandlung von bestimmten Asthma-Erkrankungen verwendet werden, da es den Degranulationsprozess in RBL-Zelllinien (engl. *rat basophilic leukaemia*) inhibiert.<sup>[108]</sup>

Neben dem pharmakologischen Aspekt können Sphingolipid-Derivate zur Gewinnung wichtiger Einblicke in die Modulation der gestörten biologischen Systeme und folglich zur Entwicklung von neuen Therapeutika beitragen. So konnte ein 3,3-Difluoro-Derivat eines potenten Modulators des Immunsystems  $\alpha$ -Galactosylceramid KRN7000 aufzeigen (**Abbildung 2-5**) wie die Aktivierung der invarianten natürlichen Killer-T-Zellen, die für die Immunantwort zuständig sind, über einen Komplex mit semi-invarianten T-Zellrezeptoren mit dem CD1d-Gen und dem Galactosylceramid vonstattengeht.<sup>[109]</sup>



**Abbildung 2-5:** Sphingolipid-Analoga mit regulatorischer Wirkung auf das Immunsystem.

### 2.3.3 Parasitäre Infektionen

Sphingolipide dienen nicht nur der Signaltransduktion in Zellen, sondern können auch von pathogenen Bakterienstämmen, z.B. dem *Chlamydia trachomatis* genutzt werden, um Krankheiten hervorzurufen. Dieser intrazelluläre menschliche Parasit ist der Auslöser für Unfruchtbarkeit und Erkrankungen, wie Trachom oder ektopische Schwangerschaft<sup>[110]</sup> und die Hauptursache für Blindheit in der Dritten Welt.<sup>[111]</sup> Bisher konnte kein spezifischer Wirkstoff entwickelt werden, sodass die Behandlung mit einem Breitband-Antibiotikum erfolgt, welches unerwünschte Nebenwirkungen wie Resistenz und Magen-Darm-Störungen

verursachen kann.<sup>[110, 112]</sup> Der Parasit betritt in Form eines infektiösen Elementarkörpers (EB) in einem spezifischen bakteriell-modifizierten Phagosom,<sup>[113]</sup> der Inklusion, vermutlich über eine rezeptorvermittelte Endozytose die Wirtszellen, um dort mithilfe des Wirt-Sphingomyelins zu wachsen und sich zu reproduzieren.<sup>[111]</sup> Mithilfe der Nitrobenzoxadiazol (NBD)-markierten Ceramiden konnten vesikel- und nicht-vesikel-vermittelte Wege aufgeklärt werden, mit denen sich die Bakterien das zum Wachstum und zur Reifung benötigte Sphingomyelin des Wirts zu eigen machen.<sup>[114]</sup> Im Jahr 1996 schlug die Gruppe um *M. A. Skidmore* ein Modell für die Aufnahme der Wirt-Sphingolipide durch den Bakterienstamm vor, basierend auf ihren Studien des NBD-markierten C6-Sphingomyelins, welches endogen aus NBD-C6-Ceramid generiert wurde.<sup>[115]</sup> Laut diesem Modell unterbricht *C. trachomatis* den exozytischen Weg der Wirt-Sphingolipide, die vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert werden, um sie abzufangen. Kürzlich wurde von *D. Heuer et al.* gezeigt, dass ein NBD-markiertes C16-Ceramid (*1-OMe*) mit einer Methoxygruppe anstelle der primären Hydroxyfunktion in die infizierten Zellen aufgenommen werden kann, wobei es zur Verringerung der Anzahl bakterieller Inklusionen kommt. Es inhibierte die Reproduktion von Bakterien ohne einen signifikanten Effekt auf die Wirtszelle, obwohl es nicht in die Inklusion transportiert wurde. Dieser anti-chlamydiale Effekt schien durch die Inhibition des Sphingomyelinaufbaus ausgelöst worden zu sein ( $IC_{50} = 4.65 \mu\text{mol}$ ).<sup>[110]</sup> Es konnte bisher nicht ermittelt werden, auf welchem Weg *1-OMe* diese Wirkung ausübt. Die Vermutung lag nahe, dass das CERT-Transportprotein verstärkt angesprochen wurde.

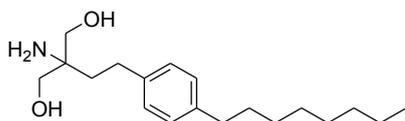
Da *Chlamydia trachomatis* eines der wenigen Bakterien ist, die Sphingomyelin zum Wachstum benötigen, stellt es ein Target für die Entwicklung spezifischer potenzieller anti-chlamydialer Therapien dar. Hierfür wurden in den letzten Jahren mehrere Studien mit Fluorophor-markierten Sphingolipiden veröffentlicht.<sup>[110, 116]</sup>

## 2.4 Wichtige bioaktive Sphingosin-Derivate

Wie im letzten Abschnitt gezeigt wurde, finden synthetisch hergestellte, nicht in der Natur vorkommende Sphingolipid-Analoga eine vielversprechende Anwendung bei der Aufklärung diverser Erkrankungen und Störungen. Zusätzlich können solche Verbindungen bei der Erforschung biologischer Zusammenhänge im Metabolismus und der Signaltransduktion der Sphingolipide, die durch ihre Zellspezifität und schnelle gegenseitige Umwandlung erschwert ist, ihren Einsatz finden. Deshalb werden strukturell verwandte, allerdings metabolisch stabile Substanzen, die die biologische Wirkung der natürlichen Signalmoleküle nachahmen, bei derartigen Untersuchungen verwendet. Das Interesse für diese Analoga stieg Anfang der 1990er Jahre drastisch an, als ein neuartiges Sphingolipid-Derivat FTY720 seine effiziente

immunosuppressorische Wirkung in Autoimmunitäts- und Organtransplantationsmodellen gezeigt hat.<sup>[117]</sup>

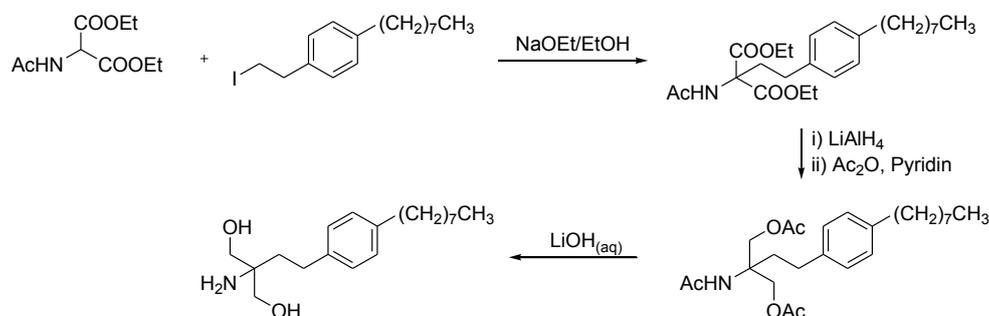
### 2.4.1 FTY720 (Fingolimod)



**Abbildung 2-6:** Struktur von FTY720.

FTY720 (**Abbildung 2-6**), auch bekannt unter dem Namen Fingolimod, wurde erstmalig 1992 im Rahmen einer umfassenden Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung (SAR) durch die strukturelle Modifikation des natürlich im Pilz vorkommenden Sphingolipid-Derivates Myriocin synthetisiert.<sup>[118-119]</sup> Im Gegensatz zu Myriocin, welches ein kompetitiver Inhibitor der SPT ist<sup>[120]</sup>, besitzt FTY720 diese Eigenschaft nicht, sondern adressiert über seinen Metaboliten FTY720-Phosphat die S1P-Rezeptoren mit einem vom S1P abweichenden Bindungsmuster.<sup>[16, 29]</sup>

Die erste veröffentlichte Synthese im Jahr 1995 von *T. Fujita et al.* zeigte einen schnellen synthetischen Zugang zu Fingolimod in vier Reaktionsschritten ausgehend von Diethylacetamidomalونات, welches unter basischen Bedingungen mit dem entsprechenden Alkyljodid eine nukleophile Substitution einging.<sup>[121]</sup> Nach der Reduktion der Carbonsäureester, gefolgt von Einführung und Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppen, konnte die Endsubstanz erhalten werden (**Schema 2-2**).



**Schema 2-2:** Erste Synthese von FTY720 (2-Amino-2(2-[4-octylphenyl]ethyl)-1,3-propandiol) nach<sup>[121]</sup>.

In den darauffolgenden Jahren wurde die Darstellung dieses Derivates bezüglich der Ausbeuten noch verbessert oder über andere Methoden, z. B. der Sharpless-Epoxidierung oder der Sonogashira-Kreuzkupplung erreicht.<sup>[122-124]</sup>

Im biologischen System wird FTY720 in die Zellen aufgenommen und aufgrund der niedrigeren Substratspezifität der Sphingosinkinase 2 vorwiegend durch dieses Enzym zum (S)-enantiomeren FTY720-Phosphat phosphoryliert.<sup>[28, 41]</sup> Das entstandene Phosphat wird analog zum S1P aus der Zelle durch das Transportprotein Spns2 transportiert, wo es an die

S1P-Rezeptoren auf eine funktionelle agonistische Weise binden kann.<sup>[125]</sup> Die Bindungsaktivität bewegt sich im niedrigen nanomolaren Bereich, wobei Subtyp S1P1 (0.3 nM) am stärksten und S1P2 (> 10 000 nM) nicht angesprochen werden.<sup>[88, 126]</sup> Der beobachtete immunsuppressive Effekt basiert auf der langanhaltenden Internalisierung des S1P1-Rezeptors in Lymphozyten, die durch eine anschließende funktionelle antagonistische Wirkung von Fingolimod-Phosphat zustande kommt. Die Depletion des S1P1-Rezeptors hat zur Folge, dass die Lymphozyten gegenüber dem S1P-Gradienten zwischen Blut und lymphatisches Gewebe desensibilisiert werden und dadurch ihre Freisetzung aus dem Thymus und den sekundären Lymphorganen verhindert wird.<sup>[82, 87, 127]</sup> Des Weiteren führt die agonistische Stimulierung von S1P1 in lymphatischen Endothelzellen (EC) zur Ausbildung einer EC-Barriere, die zusätzlich das Austreten der Lymphozyten verhindert.<sup>[128-130]</sup> Die Effekte werden verstärkt durch die erhöhte Halbwertszeit des FTY720-Phosphates im Vergleich zu S1P. Diese resultiert daraus, dass das Analogon nicht nur kein Substrat der S1P-Lyase ist, sondern dieses abbauende Enzym inhibiert, sodass die Rezeptoren erst nach zwei bis acht Tagen wieder exprimiert werden.<sup>[100, 119]</sup>

Aufgrund dieser immunregulatorischen Wirkungsweise wird Fingolimod seit 2010 zur Behandlung der rezidivierend-remittierenden MS eingesetzt.<sup>[100, 131-132]</sup> Im Gegensatz zu vielen Wirkstoffen (siehe Abschnitt 2.3.2) werden die Proliferation und Funktionalität der T-Zellen bei der Therapie nicht beeinträchtigt. Ferner werden die B-Zellen und die B-Gedächtniszellen nicht adressiert, sodass die Anzahl der Lymphozyten nicht signifikant beeinflusst wird.<sup>[25, 29, 42, 119, 133]</sup> Die effektive Modulation des Immunsystems durch FTY720 erlaubt es, sich diesen Wirkstoff bei weiteren Erkrankungen, in denen das Immunsystem involviert ist, zu Nutze zu machen. So wurden bereits Studien veröffentlicht, in denen dieses Sphingolipid-Derivat zur Behandlung von Arteriosklerose<sup>[86]</sup>, Diabetes Typ 1<sup>[134-135]</sup> und bei Lungenentzündung<sup>[136]</sup> eingesetzt wird.

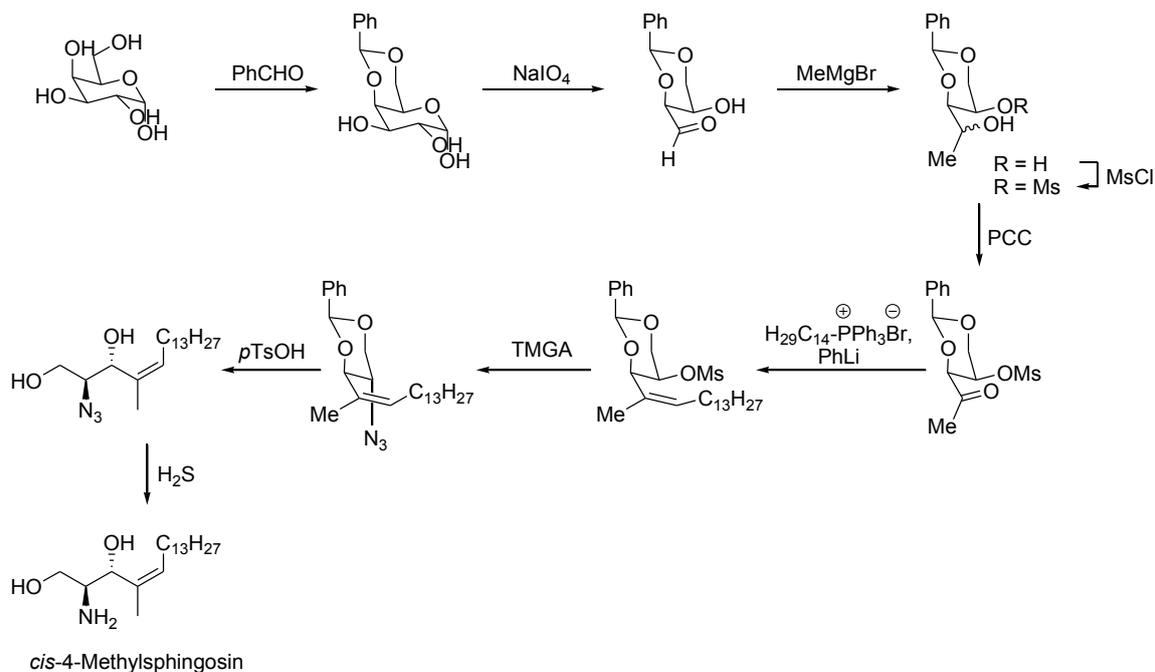
Da Fingolimod mit vier der fünf Rezeptoren wechselwirkt, entstehen z. B. durch die agonistische Stimulation des S1P3-Rezeptors im vaskulären System Nebenwirkungen wie Bradykardie und Hypertonie.<sup>[42, 137]</sup> Aus pharmakologischer Sicht, wäre es von Vorteil, S1P-Rezeptor-Agonisten mit ähnlicher immunsuppressiver Wirkung wie FTY720 zu finden, die jedoch durch eine veränderte Rezeptorselektivität weniger Nebenwirkungen hervorrufen könnten.

### 2.4.2 *cis*-4-Methylsphingosin (Cimes)

Im Jahr 1993 veröffentlichte die Gruppe um *R. R. Schmidt* eine Studie zum metabolischen Abbau von Sphingolipid-Derivaten, in der sie eine neunstufige Synthese eines 4-verzweigten Sphingosin-Derivates beschrieben.<sup>[138]</sup> Die Besonderheit der Verbindung war, neben der Verzweigung, die *cis*-Konfiguration des lipophilen Kettenrests. Die Synthese ging vom

## 2.4 Wichtige bioaktive Sphingosin-Derivate

Zucker D-Galaktose aus, welcher nach einer fünfstufigen Modifikation in einer Wittig-Reaktion mit der lipophilen Seitenkette versehen wurde. Folglich wurde eine Substitution mit einem Azid (TMGA, Tetramethylguanidiniumazid) und abschließender Reduktion dieses Azids mit Schwefelwasserstoff (**Schema 2-3**) durchgeführt. Die Gesamtausbeute über neun Stufen betrug 3 %, sodass die Synthese nicht nur sehr aufwendig, sondern auch nicht effektiv war.



**Schema 2-3:** Synthetischer Zugang zu *cis*-4-Methylsphingosin (Cimes) nach R. R. Schmidt et al..<sup>[138]</sup>

Die biologischen Untersuchungen zeigten, dass *cis*-4-Methylsphingosin, auch Cimes genannt, schnell in die Zellen aufgenommen und durch Sphingosinkinasen phosphoryliert wird.<sup>[139-140]</sup> Des Weiteren wurde eine Akkumulation des Derivates in der Zelle beobachtet, die darauf zurückgeführt wurde, dass Cimes ähnlich wie FTY720 kein Substrat der S1P-Lyase ist.<sup>[139]</sup> Es wurde vermutet, dass durch den „Knick“ in der hydrophoben Kette, hervorgerufen durch die *cis*-Konfiguration der Doppelbindung, ein sterischer Effekt induziert wird, sodass die Verbindung nicht in die katalytische Tasche der S1P-Lyase passt.<sup>[27]</sup> Die strukturellen Modifikationen des Moleküls scheinen auch die Metabolisierung von Cimes zu komplexeren Sphingolipiden zu verhindern.<sup>[139]</sup>

Im Jahr 2011 zeigten die Gruppen um D. Meyer zu Heringdorf und G. van Echten-Deckert, dass Cimes-Phosphat die S1P-Rezeptoren adressiert, wobei die Bindungsselektivität verschieden zu S1P und FTY720-Phosphat war. In diesem Fall wurden die Rezeptorsubtypen S1P2 und S1P3 stark, S1P1 hingegen nur schwach angesprochen.<sup>[141]</sup>

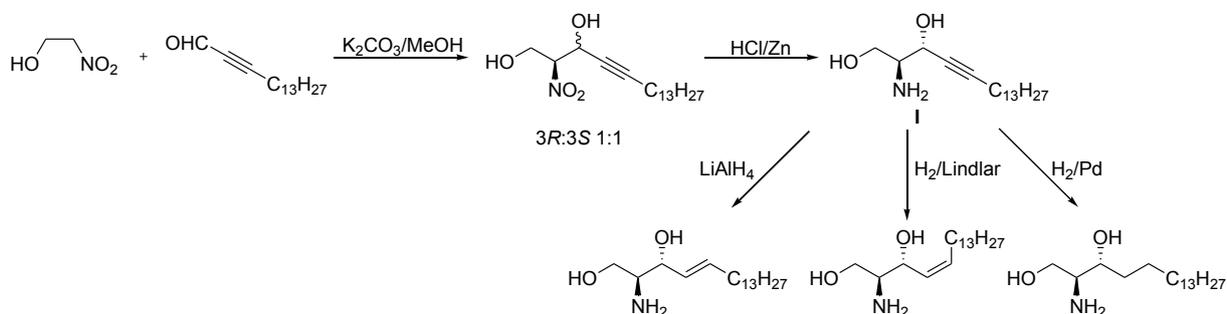
Die durch fehlende S1PL-Degradation erhöhte Halbwertszeit und verstärkte Akkumulation von Cimes-Phosphat führt folglich zur anhaltenden Aktivierung von S1P-basierten

Signaltransduktionswegen. Infolgedessen bewirkt die Präinkubation der Zellen mit Cimes bei sub-mikromolaren Konzentrationen eine spezifische Desensibilisierung der S1P-, jedoch nicht der LPA-induzierten Calcium-Freisetzung. Diese Calcium-Modulation wird durch die S1P2 und S1P3 vermittelt.<sup>[141]</sup> Interessanterweise verhindert *cis*-4-Methylsphingosin die *de novo* Sphingolipid-Biosynthese, indem es die SPT-Aktivität inhibiert.<sup>[139]</sup> In primär kultivierten Neuronen führt es zur erheblichen Änderung der Zellmorphologie und zur zellspezifischen Apoptose, gleichermaßen wie in Neuroblastom-Zellen.<sup>[139-140]</sup> In Fibroblasten stimuliert *cis*-4-Methylsphingosin jedoch das Zellwachstum.<sup>[140]</sup> Diese Eigenschaften machen dieses Analogon zu einem interessanten Target für pharmakologische Forschungen. Allerdings wurde diese Verbindung noch nicht *in vivo* getestet, was höchstwahrscheinlich in der aufwendigen Synthese begründet ist.

## 2.5 Synthetischer Zugang zu Sphingosin

Die interessanten physiologischen Eigenschaften der Sphingolipide führten dazu, dass die Anzahl der Publikationen, die sich mit der Synthese dieser Stoffklasse beschäftigt haben, auffällig hoch war. Es war notwendig, stereoselektive synthetische Methoden zur Darstellung von homogenen Sphingolipiden zu entwickeln, da die natürlichen Quellen eher nicht homogenes Material lieferten, welches für die biologischen Untersuchungen nicht geeignet war. Die Herausforderung der Totalsynthese lag in der Einführung mehrerer aufeinanderfolgender Stereozentren in das Molekül.

Die erste publizierte Synthese aus dem Jahr 1954 stammte von *D. Shapiro* und *H. Segal* und zeigte die Darstellung des racemischen Sphingosins mit dem Verhältnis *erythro:threo* von 3:2.<sup>[142]</sup> Drei Jahre später gelang *C.A. Grob* und *F. Gradient* eine simultane Synthese von Sphingosin, Dihydrosphingosin und *cis*-Sphingosin ausgehend von Aminoalkohol **I**, welcher durch Kondensation von Nitroethanol mit Hexadecinal erzeugt wurde (**Schema 2-4**).<sup>[143]</sup>



**Schema 2-4:** Synthese von Sphingosin und Derivaten nach *C.A. Grob* und *F. Gradient*.<sup>[143]</sup>

Mit der Zeit wurden vier Synthesestrategien, die von *R. M. Devant*, *P. M.* und *A. M. P. Koskinen* sowie *D. Liu et al.* ausführlich erläutert wurden, zur Darstellung von Sphingosin bevorzugt angewendet.<sup>[13, 29, 144]</sup>

### 2.5.1 Zugang über Kohlenhydrate

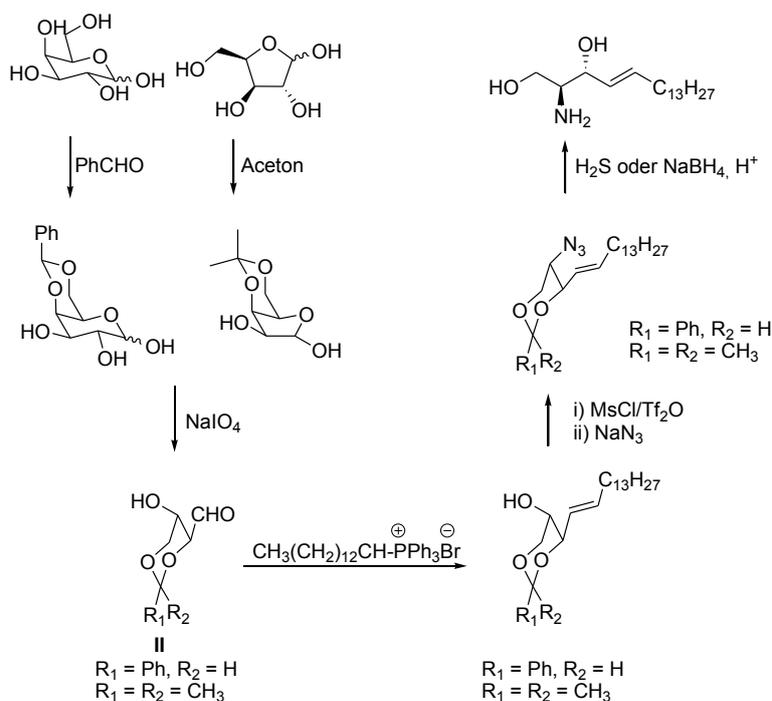
Die erste Strategie geht von natürlichen Zuckern als Quelle der Chiralität am C2 und C3 aus. Das hat den Vorteil, dass eine ganze Reihe von Ausgangsmaterialien mit bekannter absoluter Konfiguration für die Synthese zur Verfügung steht. Die Methode beinhaltet im Allgemeinen eine Überführung des Zuckers in einen Aldehyd, welcher anschließend in einer Wittig-Reaktion zum Sphingosin-Gerüst aufgebaut wird.

Im Jahr 1970 konnten *E. J. Reist* und *P. H. Christie* erstmalig *D-erythro*-Sphingosin in nicht racemischer Form synthetisieren. Hierfür verwendeten sie einen Aldehyd des geschützten Aminozuckers und Tetradecyltriphenylphosphonium-Ylid.<sup>[145]</sup>

Ende der 1980er Jahre nutzten *R. R. Schmidt* und *P. Zimmermann* 2,4-Benzyliden- oder Acetal-geschützte *D*-Threose **II**, die sowohl aus *D*-Galaktose als auch aus *D*-Xylose gewonnen werden konnte, als Startmaterial (**Schema 2-5**).

Nach der Spaltung des Zuckers mit Natriumperiodat, wurde der Aldehyd einer Wittig-Olefinierung unterzogen. Folgend wurde eine Substitution der in eine Fluchtgruppe überführten Hydroxylfunktion durchgeführt.

Abschließend wurden die Schutzgruppen abgespalten und das Azid reduziert.<sup>[146-147]</sup>



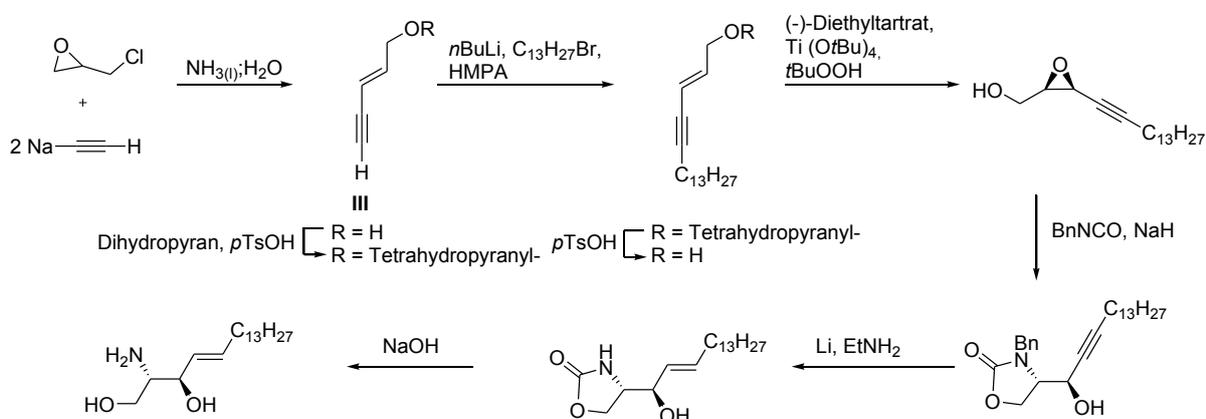
**Schema 2-5:** Synthese von *D-erythro*-Sphingosin nach *R.R. Schmidt* und *P. Zimmermann*.<sup>[146-147]</sup>

Der Nachteil dieser Strategie liegt in der aufwendigen und sehr langen Synthese sowie eher geringen Ausbeuten im Vergleich zu anderen Methoden.

### 2.5.2 Zugang über Oxirane

Die zweite Strategie beruht auf der Erzeugung von Oxiranen mittels asymmetrischer Sharpless-Epoxidierung, wobei die Chiralität durch die Liganden des Metallkatalysators kontrolliert wird.<sup>[13]</sup>

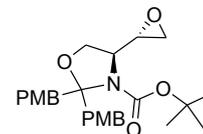
Ein geeignetes Beispiel wurde von *A. Vasella et al.* im Jahr 1986 publiziert (**Schema 2-6**).<sup>[148]</sup> Ausgehend von Epichlorhydrin wurde ein Eninol **III** erzeugt, welches asymmetrisch epoxidiert und daraufhin regioselektiv intramolekular mit Benzylisocyanat geöffnet wurde. Die anschließende Reduktion der Dreifachbindung und Hydrolyse des Oxazolidinon-Rings komplettierten die Synthese. Die Methode funktioniert zwar gut in einem kleinen Maßstab, jedoch stellt das Wiedergewinnen des teuren Titan-Katalysators ein präparatives Problem dar, sodass diese Methode selten Anwendung findet.



**Schema 2-6:** Sphingosin-Synthese über Oxiran-Intermediat nach *Vasella et al.*<sup>[148]</sup>

17 Jahre später gelang *Somfai et al.* erstmalig die Synthese aller acht Regio- und Stereoisomere des Sphingosins mithilfe der regioselektiven Öffnung von Vinylepoxiden und Vinylaziridinen, die durch Shi-Epoxidierung erzeugt wurden.<sup>[18]</sup>

Kürzlich stellten *A. Temperini et al.* eine Synthese für Dihydrosphingosin vor, in der ein von Serin-abgeleitetes Derivat in ein Oxiran (**Abbildung 2-7**) überführt wurde. Dieses wurde anschließend mit Tetradecyl-magnesiumbromid selektiv geöffnet, um die gewünschte Stereochemie am C3 zu erzeugen. Hierbei wurde zur Oxiran-Darstellung keine Epoxidierung, sondern die Reaktion mit Schwefel-Yliden angewendet.<sup>[149]</sup>



**Abbildung 2-7:** Struktur von Oxiran nach <sup>[149]</sup>.

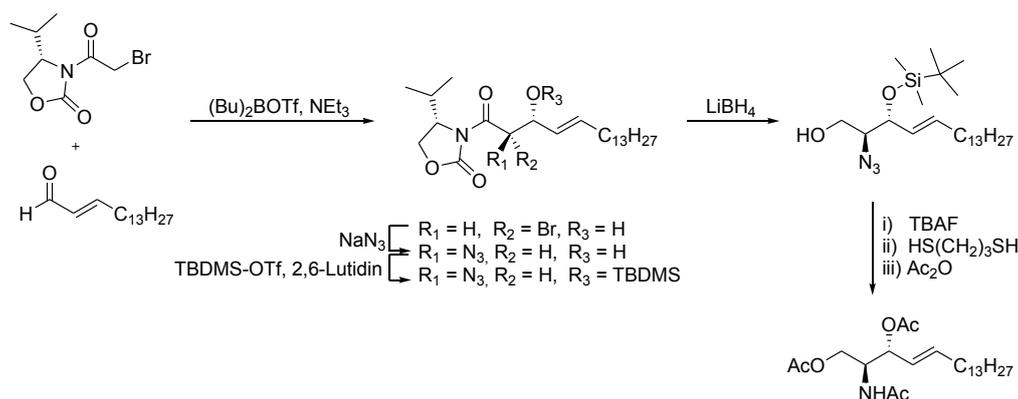
### 2.5.3 Zugang über asymmetrische Aldol-Reaktion

Bei der dritten Herangehensweise werden in einer Aldol-Reaktion chirale Auxiliare zur kontrollierten Erzeugung von Stereozentren im Sphingosin-Gerüst verwendet und somit eine

## 2.5 Synthetischer Zugang zu Sphingosin

sehr hohe enantiomere Reinheit der Zielverbindung erzielt. Jedoch fand diese Strategie eher selten Anwendung, weil diese Hilfsmoleküle erst synthetisiert werden mussten.

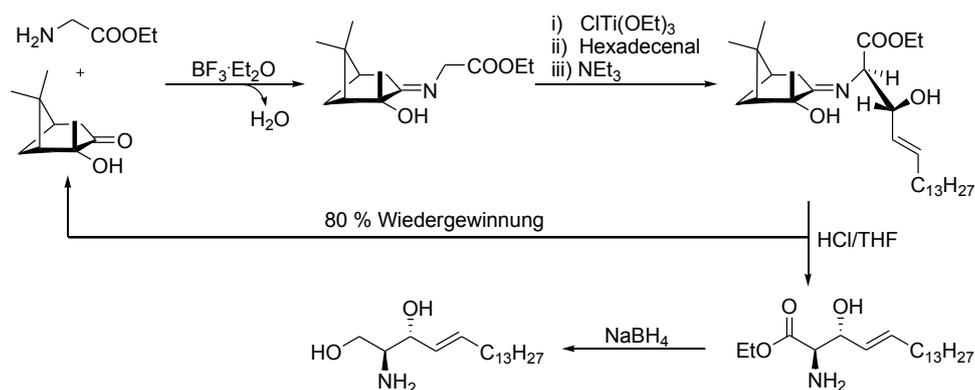
*T. Kumazawa et al.* zeigten 1988 eine effektive und kurze Synthese des acetylierten Sphingosins ausgehend von *N*-Acyloxazolidinon, welches gleichzeitig als ein Teil des Sphingosin-Gerüsts fungierte und die Stereokontrolle induzierte (**Schema 2-7**).<sup>[150]</sup> Der Aufbau der lipophilen Kette erfolgte über die Aldol-Reaktion mit Hexadecenal. Nach dem Entfernen des Oxazolidinon-Rests konnte acetyliertes Sphingosin in wenigen einfachen Schritten in exzellenter enantiomerer Reinheit und hoher Gesamtausbeute von 47 % erhalten werden.



**Schema 2-7:** Aldol-Reaktion als Schlüsselschritt bei der Synthese des Sphingosins nach *T. Kumazawa et al.*<sup>[150]</sup>

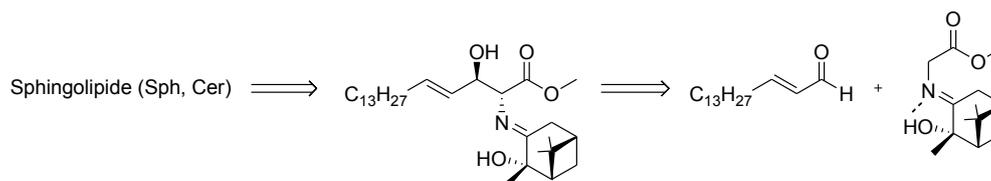
Einige Jahre später stellten *U. Tiller et al.* eine Synthese vor, in der ein lithierter Bislactimether von Cyclo-(L-Val-Gly) mit (*2E*)-Hexadecenal eine asymmetrische Aldol-Reaktion einging.<sup>[151]</sup> Allerdings führten die gewählten Reaktionsbedingungen zur Bildung einer 1:1-Diastereomeren-Mischung, die jedoch chromatographisch getrennt werden konnte. Die Tatsache, dass das chirale Auxiliar ein Teil des Zielmoleküls darstellte und somit nicht wiedergewonnen werden konnte, trug dazu bei, dass diese Methode aus atom-ökonomischer Sicht nicht effektiv war.<sup>[13]</sup>

Die erste Synthese über eine metallvermittelte Aldol-Reaktion, die zusätzlich den Vorteil hatte, dass das Auxiliar wiedergewonnen werden konnte, wurde von *J. L. Koessler et al.* 1994 gezeigt (**Schema 2-8**).<sup>[152]</sup> Hierbei wurde durch die Umsetzung von Hydroxy-pinanon mit Glycinester ein Iminoglycinat erzeugt, welches im nächsten Schritt mithilfe von Triethoxytitanchlorid und Triethylamin in ein Titanenolat überführt wurde. Nach der Reaktion des Enolats mit dem Aldehyd, konnte das chirale Auxiliar zur Wiedergewinnung unter sauren Bedingungen abgespalten und der erhaltene Ethylester reduziert werden. Unter Berücksichtigung der notwendigen Synthese der Ausgangsverbindungen, dem Aldehyden und des Auxiliars, betrug die Gesamtausbeute lediglich etwa 20 %.



**Schema 2-8:** Metallvermittelte Aldol-Reaktion zur Darstellung von Sphingosin nach *J. L. Koessler et al.* <sup>[152]</sup>

Obwohl die Verwendung von chiralen Auxiliaren mit einem hohen synthetischen Aufwand verbunden ist, werden bis heute Publikationen veröffentlicht, die sich diese Methode zu Nutze machen. So erschien 2016 ein Patent in dem Sphingolipid-Derivate mithilfe einer Aldolisierung des Auxiliars (+)-2-Hydroxy-3-pinanon-iminoglycinat und Hexadecenal mit hohen Ausbeuten und guter enantiomeren Reinheit synthetisiert wurden (**Schema 2-9**).<sup>[153-154]</sup>



**Schema 2-9:** Sphingosin-Synthese über Iminoglycinat nach <sup>[153-154]</sup>.

### 2.5.4 Zugang über Serin-Derivate

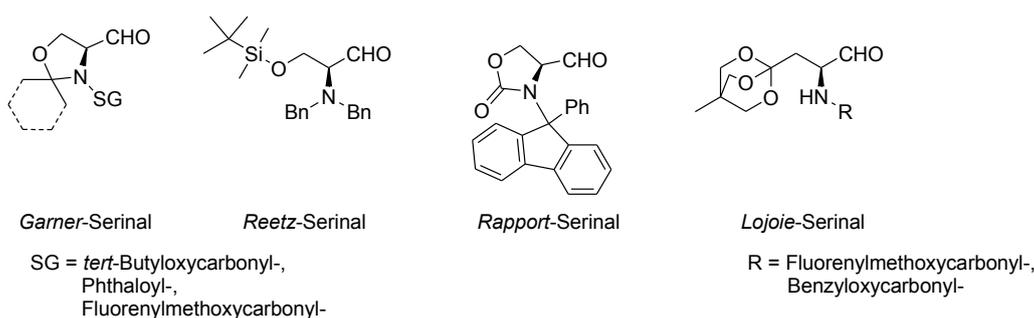
Die am häufigsten angewendete Strategie zur Sphingolipid-Darstellung basiert auf der Verwendung von Derivaten, die von der Aminosäure L-Serin abgeleitet sind. Da diese Aminosäure sowohl die (S)-Konfiguration des C2-Stereozentrums als auch die primäre Hydroxyfunktion am C1 mit sich bringt, ist es nicht verwunderlich, dass diese Methode für die Synthese natürlicher Sphingolipid-Derivate, inklusive des Sphingosins, eine solch große Bedeutung in der synthetischen Praxis einnimmt.

Hierbei steht die selektive Addition einer nukleophilen organometallischen Verbindung an ein geschütztes Serinal im Mittelpunkt.<sup>[29]</sup> Die Idee stammt von *H. Newmann*, der 1973 eine kurze Sphingosin-Synthese vorstellte, die von einem Phthaloyl- und Acetyl-geschützten Serinal und *trans*-Vinylalan ausging. Allerdings zeichnete sich diese Synthese durch mangelnde Stereoselektivität und niedrige Ausbeuten aus.<sup>[78]</sup>

In den darauffolgenden Jahrzehnten wurden die Synthesechemiker vorwiegend durch ein enantiomerenreines geschütztes Serinal, welches von *P. Garner et al.* Ende der 1980er Jahren entwickelt wurde, inspiriert. Obwohl Carbamat-geschützte Aminoaldehyde häufig zur

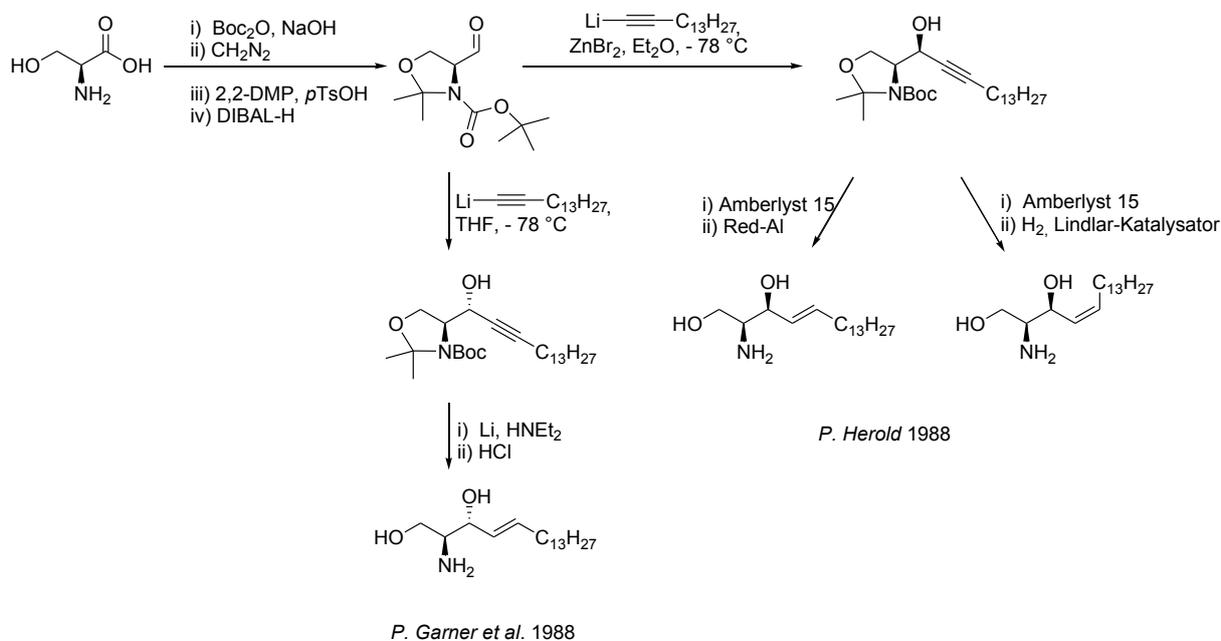
## 2.5 Synthetischer Zugang zu Sphingosin

Racemisierung neigen,<sup>[30]</sup> konnte *P. Garner* durch eine zusätzliche Schutzgruppe (SG), wie die Isopropyliden- oder Cyclohexyl-SG, die Konfiguration stabilisieren.<sup>[155-157]</sup> Dies führte zu einem regelrechten Aufschwung der synthetischen Anwendung von Serinalen (**Abbildung 2-8**).<sup>[158]</sup> Diese wurden unter anderem zur Darstellung von nicht natürlichen Aminosäuren mit konformativen Einschränkungen und Fluorosubstituenten; heterocyclischen Verbindungen wie Piperidin-Derivaten und Iminozucker sowie medizinisch relevanten Ceramiden genutzt. Diese Verbindungen spielen eine wichtige Rolle in Struktur-Wirkungsbeziehungsstudien und bei der Entwicklung neuartiger therapeutischer Wirkstoffe.<sup>[158]</sup>



**Abbildung 2-8:** Verschiedene Arten der synthetischen Aminoaldehyde, benannt nach dem Entwickler (modifiziert nach <sup>[158]</sup>).

Gleichzeitig konnten die Arbeiten von *P. Garner et al.*, *P. Herold* (**Schema 2-10**) und *H.-E. Radunz et al.* zeigen, dass mit dieser Methode eine kurze und stereoselektive Synthese von Sphingosin und seinen *cis*- und *threo*-Isomeren möglich war.<sup>[157, 159-161]</sup>

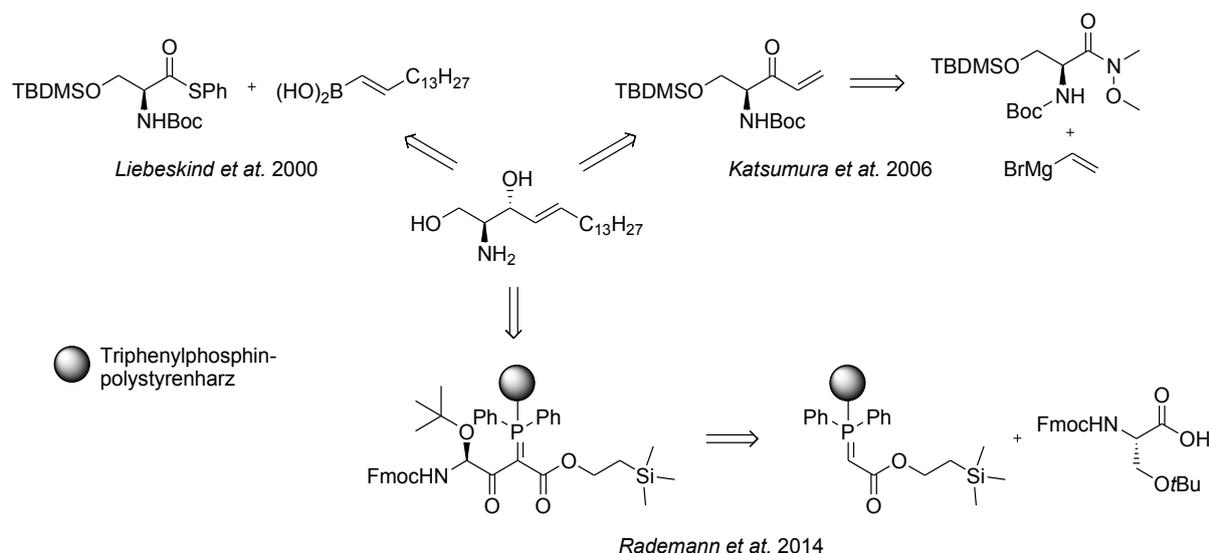


**Schema 2-10:** Synthese von Sphingosin-Isomeren über *Garner*-Aldehyd nach *Garner et al.* und *P. Herold* (modifiziert nach <sup>[157, 160-161]</sup>).

Hierbei konnte durch die Verwendung von Reaktionsadditiven die gewünschte Diastereodivergenz erreicht werden. So resultierte die C-C-Bindungsknüpfung des Serinals mit dem organometallischen Rest durch den Zusatz von  $\text{ZnBr}_2$  in einer Bevorzugung der *threo*-Konfiguration.<sup>[159]</sup> Einige Jahre später konnten *T. Murakami et al.* eine diastereodivergente Synthese des *erythro*- und *threo*-Sphingosins vorstellen, in der durch die Wahl der Additive zum Organyl 1-Alkenylzirconocenchlorid (für *erythro*:  $\text{ZnBr}_2$ ; für *threo*:  $\text{ZnEt}_2$ ) die Stereokontrolle in hohem Maße beeinflusst werden konnte.<sup>[162]</sup>

Neben den Serinalen konnten sich in den letzten Jahrzehnten auch andere Serin-Derivate, die keine Aldehyd-Funktion in der Molekülstruktur besaßen, durchsetzen. Dazu gehören vor allem die Weinrebamide und die Thiophenylester. So konnten *L. S. Liebeskind et al.* im Jahr 2000 eine Synthese des *D-erythro*-Sphingosins vorstellen, die über eine Palladium-katalysierte, Kupfer-vermittelte Kreuzkupplung des Thiophenylesters mit *E*-1-Pentadecenylboronsäure verlief. Sie lieferte hohe Ausbeuten von 71 % über sechs Stufen sowie eine ausgezeichnete enantio- und diastereomere Reinheit von  $ee > 99\%$ ,  $de$  bis zu 99 % (**Schema 2-11**).<sup>[163]</sup>

Einige Jahre später zeigten *S. Katsumura et al.*, dass sich mithilfe des geschützten Serin-Weinrebamids und der Verlängerung des Sphingosin-Rückgrates über eine Kreuzmetathese eine ausgesprochen hohe Anzahl an Sphingolipid-Derivaten synthetisieren lässt (**Schema 2-11**).<sup>[164]</sup> Ferner konnten mit dieser Methode Funktionalisierungen, wie Farbstoffmarkierung, durchgeführt werden, was unter anderem von *P. Nussbaumer et al.* am Beispiel des Bordipyromethen (BODIPY)-markierten Sphingosins vorgestellt wurde.<sup>[165]</sup>



**Schema 2-11:** Strategien zur Darstellung von Sphingosin mittels Serin-Derivaten (TBDMS, *tert*-Butyldimethylsilyl-; Boc, *tert*-Butyloxycarbonyl-; Fmoc, Fluorenylmethoxycarbonyl-).

Im Jahr 2002 zeigten *P.G. Schultz et al.*, dass die Synthese von Sphingosin-Derivaten auch an der festen Phase erfolgen kann.<sup>[166]</sup> Sie erstellten eine Ceramid-Bibliothek aus 528

Verbindungen, indem sie 16 Leitstrukturen, unter anderem alle Isomere des Sphingosins sowie aromatische und aliphatische Amine, in Lösung mit an fester Phase gebundenen Reagenzien acyliert haben. Hierbei wurde eine hohe Varietät an aktivierten Estern, die am Nitrophenol-Polystyrenharz gebunden wurden, als Acyl-Donoren eingesetzt. Kürzlich wurde die Idee der Sphingosin-Synthese an der festen Phase von *J. Rademann et al.* aufgegriffen. Mithilfe des polymeren Phosphoranylidenacetats wurden hierbei Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)- und *tert*-Butyl-geschütztes Serin acyliert (**Schema 2-11**).<sup>[167]</sup>

Die hier vorgestellten Strategien wurden nicht nur für die Synthese von natürlich vorkommenden Sphingolipiden genutzt, sondern ließen sich ebenso gut zur Darstellung synthetischer Analoga, die häufig im Anschluss auf ihre biologische Aktivität getestet wurden, anwenden. Eine kürzlich vorgestellte, gänzlich andere Strategie ging von Phytosphingosin aus, welches in ein Aziridin überführt wurde. Durch eine nukleophile Ringöffnung des *N*-aktivierten Aziridins mithilfe von vielzähligen Nukleophilen, wie Thiolen,  $\beta$ -Glycosylthiolen, Phosphaten und Aminen, konnte eine große Bibliothek an Sphingolipiden aufgebaut werden.<sup>[168]</sup>

Im Jahr 2012 entwickelte die Gruppe um *C. Arenz* eine effiziente Methode 4-verzweigte und konformativ bzw. konformativ stabilisierte Derivate zu synthetisieren. Ausgehend vom *Garner*-Aldehyd wurde das Molekürückgrat über eine C-C-Bindungsknüpfung mit einem *in situ* hergestellten Lithiumorganyl in einem einzigen Syntheseschritt aufgebaut. Dies resultierte in einer enormen Zeitersparnis bei der Synthese des Sphingosin-Analogons Cimes, im Vergleich zur Originalsynthese von 1993 (siehe Abschnitt 2.4.2), und einer verbesserten Verfügbarkeit des Derivates.<sup>[169]</sup> Nach den biologischen Studien stellte sich jedoch heraus, dass die biologische Aktivität dieser Substanz, im Vergleich zum Original, um etwa 50 % reduziert war. Die Vermutung lag nahe, dass es während der Synthese zur Racemisierung und/oder Isomerisierung gekommen war.

Folglich verliert die Synthese von Sphingolipiden und ihren Derivaten heutzutage nicht an Aktualität, da weiterhin der Bedarf an homogenen Substanzen für biologische Untersuchungen besteht. Während die anfänglichen Synthesemethoden zumeist signifikante Schwächen, wie mangelnde Stereokontrolle, lange Routen und geringe Ausbeuten, aufwiesen, entstand in den letzten Jahrzehnten ein Pool an enantio- und diastereoselektiven Wegen, Sphingolipide effizient darzustellen.

## 2.6 Beispiele zur biologischen Charakterisierung von Sphingolipiden

Wissenschaftler bedienen sich vielseitiger Methoden, um die Aufklärung der Stoffwechselwege zu gewährleisten oder eine Substanz und ihre Funktion zu

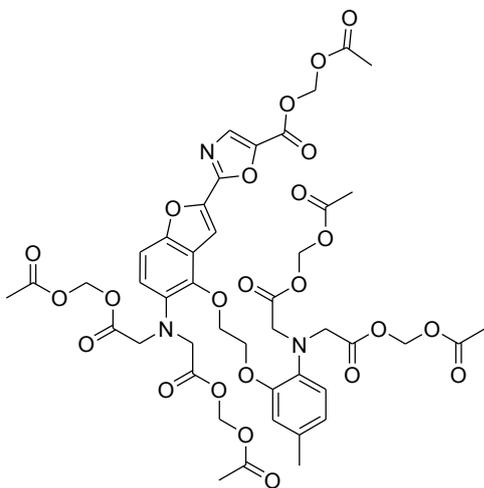
charakterisieren. Zu den Arbeitstechniken gehören unter anderem die radioaktive Markierung des Substrats oder die massenspektrometrischen und fluoreszenzspektroskopischen Analysen.

### 2.6.1 Fluoreszenz-Markierung

Durch die Markierung des Moleküls mit einem oder mehreren Fluorophoren können die Substrate und ihre Metaboliten mithilfe der fluoreszenzspektroskopischen Methoden sichtbar gemacht werden. Somit können kinetische und sogar Echtzeit-Messungen in lebenden Zellen vorgenommen werden. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit und Spezifität sowie des guten Signal-Rausch-Verhältnisses findet die Fluoreszenzspektroskopie breite Anwendung in der Molekularbiologie.<sup>[170]</sup> Als Fluorophore werden häufig NBD, BODIPY oder Cumarin verwendet.<sup>[22, 171]</sup>

### 2.6.2 $[Ca^{2+}]_i$ -Desensibilisierungsassay

Solche Fluoreszenzfarbstoffe können neben ihrer bildgebenden Funktion auch der Detektion von zellulären Vorgängen dienen. Beispielsweise ist Fura-2-Acetoxy-methylester (Fura-2-AM) ein membrangängiger Fluoreszenzfarbstoff, welcher in seiner acetoxy-methylfreien aktivierten Form Chelatkomplexe mit freien Calciumionen bilden kann. Deshalb wird es zur Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration angewendet, wobei die Emissionsrate eine direkte Proportionalität zur Calcium-Konzentration aufweist.<sup>[172]</sup>



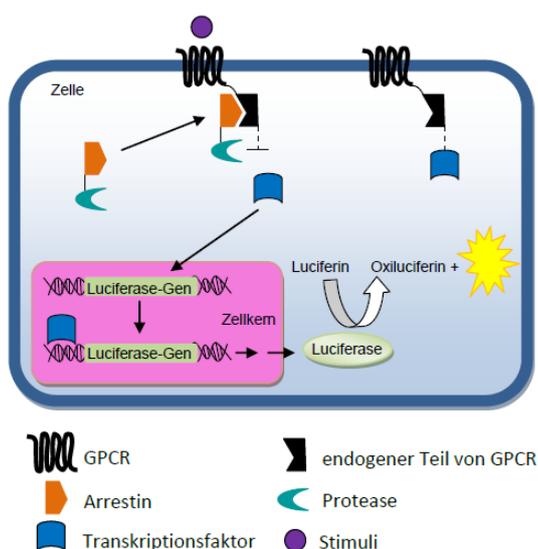
**Abbildung 2-9:** Struktur von Fura-2-AM.

Die Calcium-Homöostase ist ein universelles Signal auf extrazelluläre Stimuli, wie z. B. Stress oder Botenstoffe.<sup>[11, 173]</sup> Sie ist in eine Vielzahl von zellulären Prozessen verwickelt, angefangen bei der embryonalen Entwicklung, Zellproliferation und -apoptose, Muskelkontraktion bis hin zur Neurotransmittersekretierung.<sup>[174-176]</sup> Hierbei wird der transiente Anstieg des zytosolischen Calciums von vielzähligen Proteinen wie PKC und Calmodulin-Kinase 2 erfasst und in andere spezifische Reaktionen transduziert.<sup>[173, 175]</sup> Die im Rahmen

dieser Arbeit synthetisierten Sphingosin-Derivate wurden mithilfe dieser Technik in Bezug auf die S1P- und LPA-induzierte Calcium-Konzentrationserhöhung untersucht. Da sowohl S1P als auch Cimes-1-phosphat Veränderungen der Konzentration der intrazellulären Calcium-Ionen induzieren, könnte der Desensibilisierungsassay einen indirekten Hinweis auf die biologische Aktivität der Sphingosin-Derivate und ihre Eignung als Enzymsubstrat geben.

### 2.6.3 PRESTO-Tango-Reportergen-Assay

Am Beispiel von FTY720 und Cimes wurde gezeigt, dass Sphingosin-Analoga die S1P-Rezeptoren mit verschiedenen Bindungsmustern adressieren können. Die Internalisierung der Rezeptoren konnte bereits mithilfe einer Modifizierung des jeweiligen Rezeptorsubtyps mit Grün Fluoreszierendem Protein (GFP) und ihrer fluoreszenzspektroskopischen Analyse bildlich dargestellt werden.<sup>[141]</sup> Kürzlich wurde eine Methode von *B. L Roth et al.* entwickelt, die es erlaubte, ein Screening von GPCR-omen *via* G-Protein-unabhängigem  $\beta$ -Arrestin-Rekrutierungsassay durchzuführen. Da nahezu alle GPCR eine  $\beta$ -Arrestin-Translokation induzieren können, erwies sich dieses universelle System für eine schnelle, effiziente und parallele Identifizierung der GPCR-ome als sehr vorteilhaft. Der PRESTO-Tango-Assay (*Parallel Receptorome Expression and Screening via Transcriptional Output* mit transkriptionaler Aktivierung und darauffolgender Arrestin-Translokation) ist eine Weiterentwicklung des Tango-Assays von *K. J. Lee et al.* aus dem Jahr 2008<sup>[177]</sup> und kann wie folgt erläutert werden (**Abbildung 2-10**). Durch Stimulation des GPCR-Rezeptors wird  $\beta$ -Arrestin, welches eine endogene Protease trägt, zum aktivierten Rezeptor rekrutiert. Die Protease spaltet daraufhin den mit dem C-Terminus des Rezeptors fusionierten Transkriptionsfaktor ab, welcher direkt in den Zellkern wandert. Dort reguliert er die Transkription des Reportergens, welches das Luciferase-Gen enthält, sodass das Enzym Luciferase gebildet wird. Das Protein katalysiert seinerseits die Umwandlung des hinzugegebenen Substrats Luciferin zum Oxiluciferin, die mit der Emission von fluoreszierendem Licht einhergeht.



**Abbildung 2-10:** Prinzip des Tango-Assays zur Bestimmung des Ausmaßes der Wechselwirkung zwischen einem bestimmten Rezeptor und dem Stimulus. Durch Stimuli-vermittelte Rekrutierung des  $\beta$ -Arrestins wird der Transkriptionsfaktor freigesetzt. Dieser wandert in den Zellkern und induziert die Transkription des Luciferase-Gens. Wird nun der Zelle Luciferin zugegeben, wird es durch das gebildete Enzym Luciferase zu Oxiluciferin unter Lichtemission gespalten (modifiziert nach <sup>[177-178]</sup>)

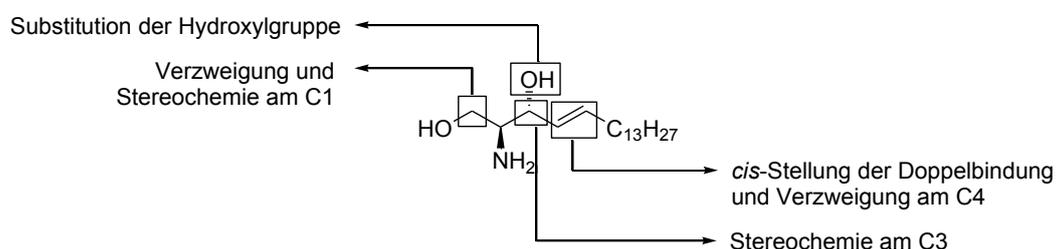
Die gemessene Fluoreszenz korreliert hierbei mit der Rezeptor-Modulation durch den Stimulus. Bei dieser Methode liefert die Aktivierung des Reportergens ein quantifizierbares Maß für den Grad der Wechselwirkung zwischen dem Rezeptor und dem  $\beta$ -Arrestin.<sup>[83]</sup> Daher wurde der PRESTO-Tango-Assay im Rahmen dieser Arbeit zur Quantifizierung der Wechselwirkung des bekannten Sphingosin-Analogons Cimes und neuartiger Derivate genutzt.



### 3 Zielsetzung

Spätestens seit der Entwicklung des Medikaments Fingolimod (FTY720), welches eine Sphingosin-verwandte Struktur besitzt, besteht ein starkes Interesse an neuartigen Sphingosin-Analoga. Ein weiteres Sphingosin-Derivat, *cis*-4-Methylsphingosin (Cimes), besitzt einzigartige Eigenschaften, die durch selektiv adressierte S1P-Rezeptoren vermittelt und aufgrund der erhöhten biologischen Halbwertszeit potenziert werden. Obwohl diese Verbindung seit 1993 bekannt ist, wurden bisher keine *in vivo*-Studien durchgeführt. Der Grund hierfür ist die sehr aufwendige und lange Synthese, die in reduzierter Verfügbarkeit der Substanz resultiert.

Diese Arbeit hat die Synthese neuartiger Sphingosin-Analoga ausgehend von den Aminosäuren L-Threonin, L-*allo*-Threonin und L-Serin zum Ziel. Zum einen liegt der Fokus auf der Einführung einer zusätzlichen Methylgruppe am C1. Diese Modifikation könnte durch den erhöhten sterischen Anspruch des Moleküls vermutlich zu einer erhöhten biologischen Halbwertszeit und veränderter Selektivität des Moleküls gegenüber den relevanten Proteinen führen. Demnach könnten die 1-verzweigten Derivate noch phosphoryliert werden, jedoch höhere Stabilität gegenüber den abbauenden Phosphatasen aufweisen. Zum anderen sollten durch den Austausch der allylischen Hydroxylgruppe gegen Halogenide bzw. Alkoxy-Reste weitere Variationen der Leitstruktur erzeugt werden. In der **Abbildung 2-1** sind die Positionen im Molekül dargestellt, die einer Modifizierung unterzogen werden sollten.



**Abbildung 2-1:** Übersicht der Modifizierung der Leitstruktur *D-erythro*-Sphingosin.

Die Studien von *M. Pipeler et al.* haben gezeigt, dass die Stereochemie der Aminofunktion für die biologische Aktivität eine große Rolle spielt.<sup>[109]</sup> Daher sollte die (2*S*)-Konfiguration nicht verändert werden.

---

Des Weiteren sollte die in der Gruppe um C. Arenz entwickelte Methode für die Synthese des *cis*-4-Methylsphingosins validiert werden. Anschließend sollte ein 1-verzweigtes Cimes-Analogon mithilfe dieser Methode dargestellt werden.

Da jedes Derivat oder sein Enantiomer ein bestimmtes Bindungsprofil zum Rezeptor besitzen könnte sind sie für biologische Untersuchungen von Interesse. Die synthetisierten Sphingosin-Analoga sollten daher in Kooperation mit dem Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie zur Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen den S1P-Rezeptoren und den Substanzen beitragen. Folglich sollte die Evaluierung der Substanzen in Bezug auf ihre Fähigkeit, die intrazelluläre Calciumionen-Konzentration zu modulieren, sowie auf ihre Wechselwirkung mit bestimmten S1P-Rezeptoren erfolgen. Hierfür sollten der  $[Ca^{2+}]_i$ -Desensibilisierungsassay und der PRESTO-Tango-Assay genutzt werden.

Ergänzend sollte ein Derivat mit einem Fluorophor versehen und in einem weiteren biologischen Zusammenhang untersucht werden. In einer Kooperation mit dem Robert-Koch-Institut sollte gezeigt werden, ob die Verzweigung am C1 einen Einfluss auf biologische Eigenschaften der Verbindung in *Chlamydia trachomatis* infizierten Zellen hat. Die Substanz sollte bezüglich der Zellaufnahme, der Lokalisierung und der anti-chlamydialen Wirkung untersucht werden.

Schließlich sollten in Kooperation mit dem Stony Brook Cancer Center Dihydrosphingosin-Standards ausgehend von L-Threonin zur Identifizierung und Quantifizierung neuartiger Sphingolipide in Hefe synthetisiert werden.

---

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden strukturelle Modifizierungen am natürlich vorkommenden Sphingolipid *D-erythro*-Sphingosin vorgenommen. Hierbei wurden die gewünschten Strukturen mithilfe der hierfür entwickelten Synthesemethoden ausgehend von den Aminosäuren L-Threonin, L-*allo*-Threonin und L-Serin aufgebaut. Die ersten Vertreter der neuartigen Sphingosin-Derivate wurden biologisch untersucht.

### 4.1 Synthese von *cis*-4-Methylsphingosin-Derivaten

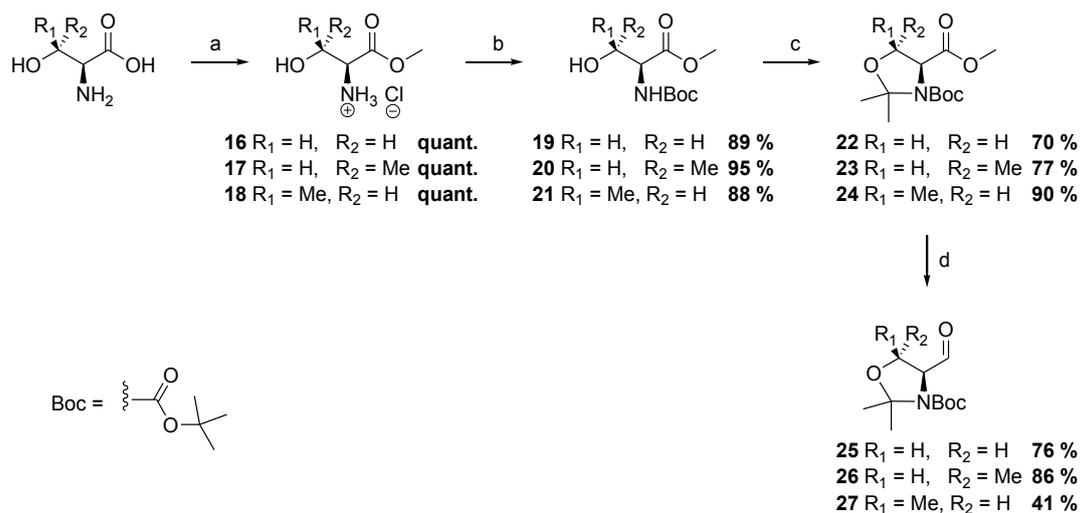
#### 4.1.1 Synthese über *Garner*-Aldehyd

Die Synthese des *cis*-4-Methylsphingosins und seines Derivates erfolgte mittels einer stereoselektiven Addition eines nukleophilen metallorganischen Reagenzes an ein geschütztes Serinal. Diese Strategie wurde von *D. Proksch* und *C. Arenz* im Jahr 2012 entwickelt (siehe Abschnitt 2.5.4).<sup>[169]</sup> Allerdings wies die hierbei erhaltene Substanz, im Vergleich zur Charge einer anderen Gruppe, eine reduzierte biologische Aktivität auf. Daher sollte diese Methode in Bezug auf die Tendenz zur Racemisierung und/oder Isomerisierung validiert werden.

Das synthetische Konzept zur Darstellung der Aminoaldehyde wurde analog zu Arbeiten von *A. M. P. Koskinen* und *L. A. Otsomaa* sowie von *P. Garner et al.* gewählt.<sup>[19, 157, 179]</sup> Hierfür wurden die natürlichen Aminosäuren L-Serin, L-Threonin und L-*allo*-Threonin in die entsprechenden *Garner*-Aldehyde überführt (**Schema 4-1**). Dies erfolgte mittels einer säurekatalysierten Veresterung der Carbonsäure nach *Fischer*, wobei sowohl Thionylchlorid als auch Acetylchlorid als Reagenzien eingesetzt wurden. Daraufhin wurde die Aminofunktion mit der Boc-Schutzgruppe in Gegenwart von Triethylamin geschützt. Die anschließende Lewisäure-katalysierte Einführung des Oxazolidin-Rings bot sich aufgrund ähnlicher Acidität des Carbamats und der freien Hydroxylgruppe an. Die Boc- und die Isopropyliden-Schutzgruppen wurden ausgewählt, weil von *Garner et al.* berichtet wurde, dass Serinale, die sonst zur Racemisierung neigen, bei der Verwendung dieser Schutzgruppen konfiguratив stabil blieben.<sup>[155, 179]</sup> Zudem konnte somit eine simultane Abspaltung beider Gruppen aufgrund ihrer Säurelabilität ermöglicht werden. Die Gesamtausbeuten für die ersten drei Syntheseschritte lagen bei 62-79 % .

## 4.1 Synthese von *cis*-4-Methylsphingosin-Derivaten

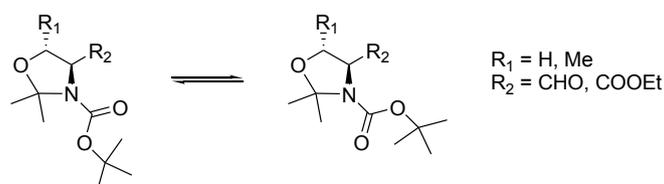
Die entstandenen Ester wurden im nächsten Schritt durch die Behandlung mit Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL-H) zu den entsprechenden Serinalen **25-27** reduziert. Die säulenchromatographische Trennung der entsprechenden Aldehyde von den nicht umgesetzten Estern erwies sich aufgrund der geringen Differenz der Retentionsfaktoren als anspruchsvoll. Der Aldehyd **27** konnte deshalb nur durch den entsprechenden Ester verunreinigt isoliert werden. Somit wurden die *Garner*-Aldehyde mit einer Ausbeute von 32-67 % über vier Stufen erhalten.



**Schema 4-1:** Synthese von *Garner*-Aldehyd-Derivaten **25-27** nach <sup>[19, 180-181]</sup>.

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a SOCl<sub>2</sub>, MeOH, 0 °C, dann RT (für **16**); AcCl, MeOH, 0 °C → 50 °C (für **17-18**) | b Boc<sub>2</sub>O, NEt<sub>3</sub>, MeCN, RT (für **19**); Boc<sub>2</sub>O, NEt<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 0 °C → RT (für **20-21**) | c 2,2-Dimethoxypropan, BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT | d DIBAL-H, Toluol, - 80 °C.

In <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C APT NMR-Spektren (NMR, kernmagnetische Resonanzspektroskopie) wiesen sowohl die geschützten Ester **22-24** als auch die dazugehörigen Aldehyde eine partielle Verdopplung oder Aufspaltung der Signale auf. 1987 wurde dieses Phänomen von *P. Garner et al.* beschrieben, wobei sie ein dynamisches Gleichgewicht zwischen den verschiedenen konformativ stabilen Rotameren eines Oxazolidin-Derivates nachwiesen, da sich die doppelten Signale bei einer empirisch ermittelten Temperatur zu einem Satz vereinten (**Abbildung 4-1**).<sup>[179]</sup>

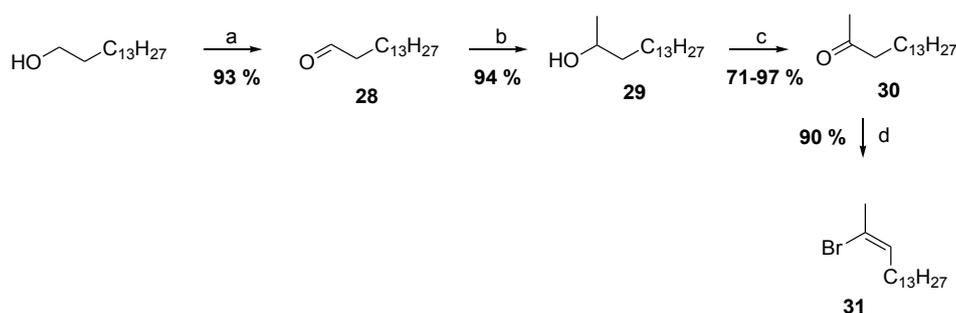


**Abbildung 4-1:** Gleichgewicht zwischen den konformativ stabilen Rotameren eines Oxazolidin-Derivates als Ursache der Verdopplung der Signale im NMR-Spektrum (links: stabiler in der Lösung, rechts: stabiler in der Gasphase).<sup>[158, 179]</sup>

Nichtsdestotrotz wurden zur Sicherstellung der Abwesenheit einer Racemisierung, die ebenfalls zur Verdopplung der Signale führen könnte, beispielhaft beim Ester **23** die Schutzgruppen unter sauren Bedingungen abgespalten.<sup>[182]</sup> Das NMR-Spektrum zeigte daraufhin keine doppelten Signalsätze. Somit wurde angenommen, dass keine Racemisierung stattgefunden hat, sondern die Verdopplung der Signale ausschließlich durch die Rotamerenbildung der Oxazolidin-Derivate erzeugt wurde.

Zur Verlängerung des Sphingosin-Rückgrates sollte ein Vinylbromid-Derivat mit einer *cis*-Doppelbindung synthetisiert werden. Zudem sollte die entwickelte Methode die Möglichkeit der Variation des lipophilen Restes, welcher an den Aldehyden gekuppelt werden sollte, mit sich bringen. Hierfür wurde eine effiziente und einfache Synthese entwickelt. Es war nun möglich, Reste mit verschiedenen funktionellen Gruppen und Längen einfach einzuführen.

Im ersten Schritt wurde 1-Pentadecanol zum 1-Pentadecanal **28** in einer aeroben chemoselektiven Oxidation nach *S. S. Stahl* und *J. Hoover* umgesetzt (**Schema 4-2**).<sup>[183]</sup> Hierfür wurde ein katalytisches System bestehend aus Cu<sup>I</sup>-Salz und TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy) verwendet, welches ausschließlich primäre Alkohole umsetzt. Diese Reaktionsbedingungen wurden aufgrund ihrer Kompatibilität mit vielen funktionellen Gruppen, dem breiten Anwendungsspektrum, der Unkompliziertheit der Synthese sowie hoher Ausbeuten, die sie lieferten, ausgewählt. Nach der Oxidation wurde der Aldehyd **28** mit einer guten Ausbeute von 93 % erhalten. Im Anschluss wurde in einer Grignard-Reaktion eine Methylgruppe eingeführt, wobei ebenfalls ein sehr guter Umsatz von 94 % erzielt wurde.<sup>[184]</sup>



**Schema 4-2:** Synthese von *Z*-2-Bromohexadec-2-en **31**.

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a [Cu(MeCN)<sub>4</sub>]OTf, Bipyridin, TEMPO, *N*-Methylimidazol, O<sub>2</sub>, MeCN, RT | b MeMgBr, Et<sub>2</sub>O, 0 °C → RT | c IBX, EtOAc, Rückfluss → RT oder Oxon, KBr, H<sub>2</sub>O/THF, RT | d AcBr, MsOH, 0 °C → RT.

Für die anschließende Oxidation des sekundären Alkohols **29** zum Keton **30** wurden zwei verschiedene Reaktionsbedingungen verwendet. Im ersten Ansatz übernahm das hypervalente Iod-Reagenz 1-Hydroxy-1,2-benziodoxol-3(<sup>1</sup>*H*)-on-1-oxid (Trivialname: 2-Iodoxybenzoesäure (IBX)) die Rolle des Oxidationsmittels.<sup>[185]</sup> Diese Methode besaß einige

Vorteile gegenüber anderen Oxidationsreaktionen. Zum einen ist das Reagenz sauerstoff- und hydrolyseunempfindlich. Zum anderen ist IBX ein heterogenes Oxidant und in den meisten Lösungsmitteln nur bei hohen Temperaturen und in sehr geringem Maße löslich, sodass das nicht umgesetzte Reagenz und die entstandenen Nebenprodukte mittels einfacher Filtration sehr leicht abgetrennt werden können.<sup>[186]</sup> Trotz der exzellenten Ausbeute von 97 % war die Reaktionsdauer von mehreren Tagen zu lang, sodass die Oxidation mit einem anderen Oxidationsmittel durchgeführt wurde. Diesmal wurde Kaliumperoxomonosulfat, auch bekannt als Oxon, zuzüglich einer katalytischen Menge an KBr zum Oxidieren der sekundären Hydroxylgruppe verwendet.<sup>[187]</sup> Mechanistisch erfolgte diese Reaktion über eine oxidative Umpolung vom Bromidion Br<sup>-</sup> zum Bromoniumion Br<sup>+</sup> durch den Oxidanten Oxon, gefolgt von der Bildung des Hypobromit-Derivates. Dieses zerfiel in das Keton und ein Bromidion.<sup>[187]</sup> Durch eine viel kürzere Reaktionszeit von vier Stunden konnte 2-Hexadecanon **30** schneller, jedoch mit geringerer Ausbeute dargestellt werden.

Im nächsten Schritt wurde das Keton regioselektiv zum *Z*-2-Bromohexadec-2-en **31** in Anlehnung an die Vorschrift von *C. Rolando et al.* umgesetzt.<sup>[188]</sup> Bei dieser Verbindung musste darauf geachtet werden, dass sie lösungsmittelfrei und bei maximal + 4 °C gelagert wurde, da es sonst mit der Zeit zur Isomerisierung der Doppelbindung kam.

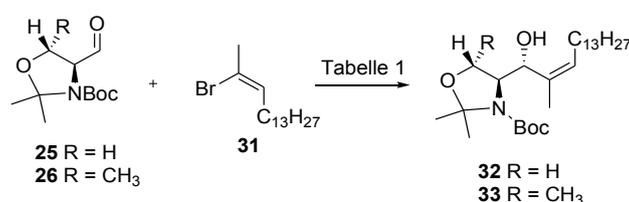
Die darauffolgende C-C-Bindungsknüpfung zwischen dem Aldehyden und dem Vinylbromid-Derivat **31** stellte eine Herausforderung dar und verlangte einiger Optimierung. Hierfür wurden verschiedene Reaktionsbedingungen, wie Temperatur und Menge der eingesetzten Reagenzien, an den Aldehyden **25** und **26** getestet (**Tabelle 4-1**).

Die Verbindung **31** sollte zunächst in einem Halogen-Metall-Austausch mit *tert*-Butyllithium (*t*BuLi) in ein Lithiumalkenyl überführt werden. Dieses sollte anschließend *in situ* mit dem entsprechenden *Garner*-Aldehyd eine C-C-Bindungsknüpfung eingehen. In Anlehnung an die Untersuchung der Stereoselektivität der C-C-Bindungsknüpfung, die von *A. J. Melendez et al.* am Beispiel der Reaktion von *Garner*-Aldehyd mit einem Lithiumalkenyl gezeigt wurde, musste die Reaktionstemperatur für eine bevorzugte Bildung des gewünschten (*R*)-Derivats zwischen - 50 °C und - 78 °C liegen. Sie zeigten außerdem, dass eine erhöhte Menge des Butyllithiums die Entstehung des (*S*)-Derivats begünstigte.<sup>[23]</sup> Deshalb wurde **31** in Tetrahydrofuran (THF) gelöst und zunächst nach der Originalvorschrift von *D. Proksch* mit nur 1.06 Äquivalenten *tert*-Butyllithium bei - 78 °C langsam versetzt (**Tabelle 4-1**, #1-2).<sup>[169]</sup> Nach der Zugabe des Deaggregationsadditivs *N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin (TMEDA) wurde die Lösung zum Aldehyd tropfenweise hinzugegeben. Nach 30 min Reaktionszeit wurde die Reaktion durch die Zugabe von Wasser gestoppt und die Produkte analysiert.

Aufgrund von einer sehr geringen Ausbeute wurde die Menge an *t*BuLi auf 2.0 Äquivalente erhöht (siehe #3). In diesem Fall betrug die Ausbeute 15 %. Eine weitere Erhöhung der

Menge des Reagenzes führte nicht zur Verbesserung des Umsatzes. In den darauffolgenden Versuchen 5 und 6 wurde festgestellt, dass eine schnellere Zugabe von *t*BuLi zum Vinylbromid-Derivat **31** sowie das schnelle Überführen des gebildeten Organyls zum Aldehyd eine Steigerung der Ausbeute bewirkte.

**Tabelle 4-1:** Synthese der geschützten Vorläufer von *cis*-4-Methylsphingosin-Derivaten mit der Übersicht der ausgewählten Reaktionsbedingungen für C-C-Bindungsknüpfung für **32** (<sup>a</sup>) und **33** (<sup>b</sup>).



#	Äq. <i>t</i> BuLi (T/°C)	<i>t</i> BuLi-Zugabe in min	Rühren vor TMEDA-Zugabe (T/°C)	Rühren nach TMEDA-Zugabe in min (T/°C)	Zugabe von Aldehyd (T/°C)	Reaktionszeit in min	Ausbeute in %
1	1.06 (- 78)	33	3 min (- 78)	3 min (- 78)	23 min (- 78)	30	1 <sup>a</sup>
2	1.06 (- 78)	35	10 min (- 78)	30 min (- 20)	43 min (- 45)	80	4 <sup>a</sup>
3	2.00 (- 80)	55	8 min (- 80)	30 min (RT)	70 min (- 30)	120	15 <sup>a</sup>
4	2.20 (- 80)	90	5 min (- 80)	30 min (RT)	60 min (- 30)	90	1 <sup>a</sup>
5	1.45 (- 84)	12	5 min (- 84)	5 min (- 84)	5 min (- 84)	13	14 <sup>a</sup>
6	1.45 (- 84)	11	10 min (- 84)	10 min (- 84)	4 min (- 84)	20	17 <sup>a</sup>
7	1.45 (- 120)	14	35 min (→ - 84)	10 min (- 84)	4 min (- 84)	60	22 <sup>a</sup>
8	2.00 (- 125)	13	60 min (→ RT)	20 min (→ -122)	4 min (- 80)	180	-
9	1.95 (- 80)	17	36 min (- 70)	20 min (- 75)*	4 min (- 80)	75	17 <sup>a</sup>
10	1.95 (- 80)	17	35 min (- 70)	20 min (- 75)*	4 min (- 80)	60	32 <sup>b</sup>

\* Zugabe weiterer 0.77 Äq. *t*BuLi.

Es wurde weiterhin versucht, den Umsatz der C-C-Bindungsknüpfung zu verbessern. Eine Studie von *Seebach et al.* von 1976 zeigte, dass die Bildung eines Lithiumorganyls Reaktionstemperaturen unterhalb von - 110 °C verlangte.<sup>[189]</sup> Die bereits gebildeten metallorganischen Verbindungen sollten deren Annahme nach sogar bei Raumtemperatur stabil sein. Deshalb wurde die Zugabe von *t*BuLi bei - 120 °C durchgeführt und die Lösung anschließend auf - 84 °C erwärmt (siehe #7). Diese Methode erforderte die Verwendung eines anderen Lösungsmittels, da THF bei diesen Temperaturen gefriert. Die Wahl fiel auf das verwandte Lösungsmittel Methyltetrahydrofuran (Me-THF), welches einen Schmelzpunkt von - 136 °C besitzt und somit geeignet war. Zudem wurde von *D. F. Aycock* berichtet, dass Methyltetrahydrofuran Lithiumorganyle besser stabilisieren kann als THF und, im Gegensatz zu THF, nicht mit Wasser mischbar ist.<sup>[190]</sup> Mit dieser Methode wurde die beste Ausbeute von

#### 4.1 Synthese von *cis*-4-Methylsphingosin-Derivaten

22 % für die C-C-Bindungsknüpfung des *Garner*-Aldehyds **25** mit dem Vinylbromid-Derivat erreicht. Wurde die Lithiumorganyl-Lösung jedoch nach der *t*BuLi-Zugabe bis zur Raumtemperatur erwärmt und die Reaktion anschließend bei -120 °C gerührt (siehe #8), konnte kein Umsatz festgestellt werden.

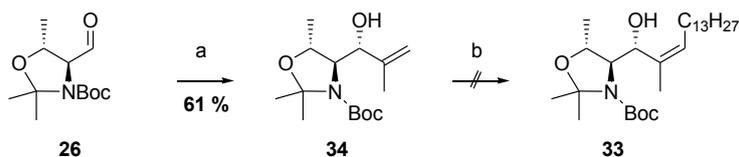
Bei dem L-Threonin-Derivat hingegen wurde die beste Ausbeute von 32 % erreicht, wenn die Temperatur während der gesamten Reaktionszeit zwischen -80 °C und -70 °C konstant gehalten wurde (siehe #10).

Während dieses Reaktionsschrittes wurde, erwartungsgemäß, vorrangig das gewünschte (*R*)-Diastereomer gebildet. Dennoch konnten auch kleine Mengen des (*S*)-Diastereomers isoliert werden. Da sich die chromatographische Trennung von (*R*)-**32** und (*S*)-**32** als schwierig erwies konnte der Vorläufer von *cis*-4-Methylsphingosin **1** mit einer Reinheit von lediglich *dr* ((*R*):(*S*)) = 87:13 erhalten werden. Die schlechte Trennbarkeit der Diastereomere führte auch zur Verringerung der Ausbeute, da die vollständige Trennung auch nach wiederholter Säulenchromatographie nicht erreicht werden konnte. Zudem konnte im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum ein Signal bei 5.45 ppm beobachtet werden, welches dem *E*-Isomer zuzuordnen war. Da die Messung der NMR-Spektren über Nacht verlief, wurde davon ausgegangen, dass der Vorläufer **32** ähnlich wie das Vinylbromid-Derivat **31** in Lösung und bei Raumtemperatur partiell isomerisieren kann.

Der von L-Threonin abgeleitete Vorläufer **33** lag aufgrund der besseren Trennbarkeit des ebenfalls gebildeten Nebenprodukts (*S*)-**33** diastereomerenrein vor.

Somit konnte gezeigt werden, dass bei der C-C-Bindungsknüpfung zwar beide Diastereomere gebildet wurden, diese jedoch in hohem Maße bzw. vollständig getrennt werden konnten. Eine Racemisierung am C2 wurde nicht beobachtet.

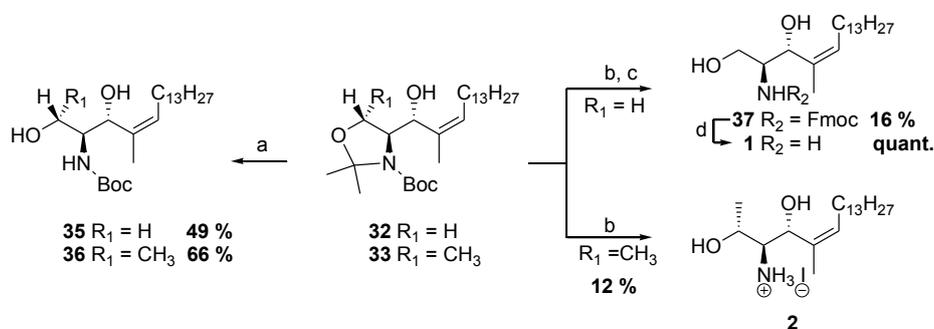
Zusätzlich wurde eine alternative Methode zur Darstellung des geschützten Cimes-Vorläufers, die ebenso eine C-C-Bindungsknüpfung enthielt, getestet. In diesem Fall wurde im ersten Syntheseschritt die Doppelbindung mittels einer Grignard-Reaktion mit *Isopropenylmagnesiumbromid* in das Sphingosin-Gerüst eingeführt (**Schema 4-3**). Anschließend sollte der aliphatische Rest über eine Kreuzmetathese eingefügt werden.<sup>[191]</sup>



**Schema 4-3:** Alternative Darstellung von *cis*-4-Methylsphingosin-Derivat **33** mittels Kreuzmetathese. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a *Isopropenyl-MgBr*, THF, -78 °C | b 1-Pentadecen, Grubbs/Hoveyda-Grubbs Katalysator zweiter Generation, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Rückfluss.

Obwohl die Bildung von trisubstituierten Olefinen in einer Kreuzmetathese bereits von *R. H. Grubbs et al.* beschrieben wurde,<sup>[192]</sup> konnte nach mehreren Versuchen kein Produkt isoliert werden, sodass dieser Syntheseweg nicht weiter verfolgt wurde.

Im letzten Schritt sollte die Abspaltung der Schutzgruppen analog zu der von *D. Proksch* entwickelten Methode erfolgen.<sup>[169]</sup> Hierbei wurde als Abspaltungsreagenz Trifluoressigsäure (TFA) angegeben. Das Entfernen der Boc-Schutzgruppe und der Isopropyliden-Gruppe unter diesen Bedingungen war jedoch nicht möglich. Der Gebrauch von TFA mit Reaktionszeiten über zehn Minuten resultierte in der Zersetzung des Moleküls zu dem Aldehyden und einem Alkan. Dies geschah vermutlich über die Protonierung der Doppelbindung, gefolgt von der Ausbildung der Carbonylgruppe und Spaltung der Bindung zwischen den Kohlenstoffatomen 3 und 4. Diese Art der Spaltung wurde von *D. Whittaker et al.* für  $\beta$ -Hydroxyalkene über eine Lewisäure-begünstigte Retro-Prins-Reaktion im Jahr 1999 beschrieben.<sup>[193]</sup>



**Schema 4-4:** Verschiedene Reaktionsbedingungen für die Spaltung der Schutzgruppen zur Darstellung von *cis*-4-Methylsphingosin **1** und seines Derivates **2**.

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a TFA,  $CH_2Cl_2$ ,  $0\text{ }^\circ C$  | b i TMS-I,  $CH_2Cl_2$ ,  $0\text{ }^\circ C$ , ii MeOH | c Fmoc-Cl,  $NaHCO_3$ , THF/ $H_2O$ ,  $0\text{ }^\circ C \rightarrow RT$  | d  $NEt_2H$ , MeOH, RT.

Wurde die Reaktionsmischung nur zwei bis drei Minuten gerührt, ließen sich nur die Boc-geschützten Derivate **35** und **36** isolieren (**Schema 4-4**, a). Anhand der NMR-Spektren dieser Verbindungen konnte gezeigt werden, dass bei diesen Reaktionsbedingungen keine vollständige Racemisierung und/oder Isomerisierung geschieht. Dies bedeutete, dass der Abfall der biologischen Aktivität vom zuvor synthetisierten Cimes höchstwahrscheinlich nicht auf der mangelnden Stereochemie beruhte. Bei näherer Betrachtung des  $^1H$ -NMR-Spektrums der zuvor synthetisierten Verbindung wurde festgestellt, dass ein Signal, welches zuvor dem Lösungsmittel zugeordnet wurde, auch dem *tert*-Butylrest der Boc-Schutzgruppe zugeordnet werden könnte. Die Tatsache, dass die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe innerhalb einer HPLC/UPLC-MS-Messung, wo üblicherweise angesäuerte Laufmittel verwendet werden, beobachtet wurde, erschwerte die Validierung der Molekülstruktur zusätzlich. Somit liegt die Vermutung nahe, dass bei der getesteten Substanz die Boc-SG nicht abgespalten wurde, was in der geringeren biologischen Aktivität resultierte.

Nichtsdestotrotz wurde weiterhin versucht, die beiden Schutzgruppen simultan zu entfernen. Dies wurde durch die Behandlung der geschützten Vorläufer mit 1.2 Äquivalenten Trimethylsilyliodid (TMS-I) erreicht (**Schema 4-4**, b).<sup>[194]</sup> Durch die Umesterung des *tert*-Butylcarbamats zum hydrolyseempfindlichen Trimethylsilylcarbammat konnte nach der Zugabe von Methanol die freie Carbaminsäure generiert werden, die unter spontaner CO<sub>2</sub>-Freisetzung zerfiel.<sup>[195]</sup> Die Spaltung beider Gruppen erfolgte so schnell, dass die vollständige Zersetzung des Vorläufers nicht stattfinden konnte. Die Zielverbindungen **1** und **2** konnten somit erfolgreich synthetisiert werden.

Das vom L-Threonin abgeleitete Cimes-Derivat **2** wurde direkt nach der säulenchromatographischen Aufreinigung als ein Hydroiodid-Salz mit einer Ausbeute von 12 % erhalten. Im Falle von *cis*-4-Methylsphingosin **1** war es notwendig direkt nach der Behandlung mit Trimethylsilyliodid die Aminofunktion mit der Fmoc-Schutzgruppe zu derivatisieren.<sup>[196]</sup> Nach diesem Schritt konnte das ungewünschte (*S*)-Derivat säulenchromatographisch abgetrennt werden. Anschließend wurde die Fmoc-SG mit der leicht flüchtigen Aminbase Diethylamin quantitativ entfernt.

Mit dieser Abspaltungsmethode konnten die Zielverbindungen erfolgreich synthetisiert werden. Allerdings lagen die Ausbeuten für den letzten Schritt unter 20 %. Der Grund für solch geringe Ausbeuten war die Bildung mehrerer Nebenprodukte. In beachtlichen Mengen bildete sich vor allem ein 3-Desoxy-3-iodo-Cimes-Derivat, bei dem die allylische Hydroxylgruppe durch ein Iod ersetzt wurde. Bei dem Einsatz von 3.6 anstatt von 1.2 Äquivalenten Trimethylsilyliodid wurde diese Verbindung sogar als Hauptprodukt gebildet.

Schließlich konnten beide Cimes-Derivate **1** und **2** mit einer Gesamtausbeute von jeweils 4 % über drei bzw. zwei Stufen erhalten werden. Die Aldehyde **25** und **26** sowie das Keton **30** sind kommerziell erhältlich und müssen folglich nicht zwingend synthetisiert werden. Somit wurde die Ausbeute der Originalsynthese nach *Schmidt et al.*<sup>[138]</sup> in unter vier anstatt neun Schritten erreicht und die Synthesedauer auf zwei bis drei Tage reduziert.

Diese Methode eröffnete die Möglichkeit der Darstellung von 4-substituierten Sphingosin-Derivaten in kürzester Zeit, wobei auch der synthetische Zugang zu den Analoga, die sich von Zucker-Derivaten nicht ableiten lassen, gewährleistet wurde.

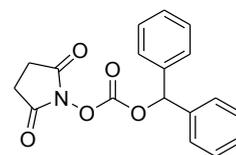
### 4.1.2 Alternative Schutzgruppen-Strategien

Im Abschnitt 4.1 wurde gezeigt, dass die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe nicht effizient durchgeführt werden konnte, da es während der Reaktion zur Zersetzung des Substrates oder zur Bildung vieler Nebenprodukte kam.

Daher lag die Überlegung nahe, die Schutzgruppe für die Aminofunktion zu ersetzen. In erster Annäherung wurde versucht, Schutzgruppen mit einer stärker ausgeprägten

Säurelabilität, wie die Trityl- und die Benzhydryloxycarbonyl (Bhoc)-Schutzgruppen, zu verwenden.<sup>[197-198]</sup> Die Trityl-Derivate waren zu säurelabil, sodass die Vorläufer nicht aufgereinigt werden konnten.

Für die Einführung der Bhoc-SG wurde zuerst ein Bhoc-Succinimid-Aktivester aus Benzhydrol und *N,N*-Disuccinimidylcarbonat synthetisiert (**Abbildung 4-2**).<sup>[198]</sup> Dennoch konnte die Aminofunktion mit diesem Reagenz nicht geschützt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine zu geringe



**Abbildung 4-2:** Struktur von Bhoc-Aktivester.

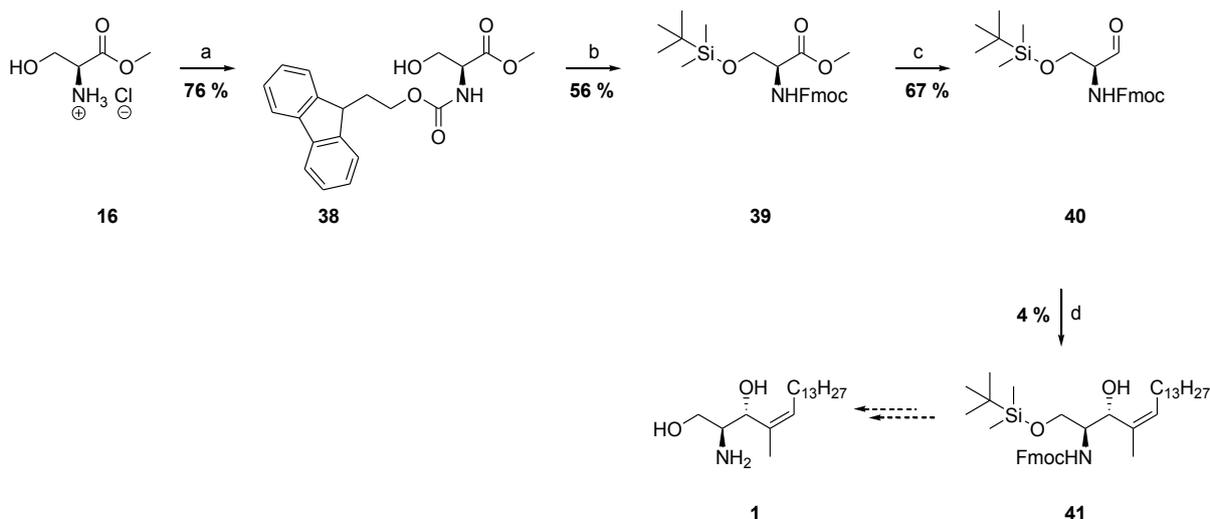
Reaktivität des Aktivesters oder sterische Hinderung beim Angriff des Amins an der Aktivesterfunktion. Diese beiden Probleme könnten durch die Verwendung eines Chloroformiat-Derivates, welches aus Benzhydrol und Thiophosgen generiert werden könnte, vermieden werden.

Da beide Ansätze nicht zum Erfolg führten wurden alternativ zwei weitere Schutzgruppen-Strategien entwickelt.

#### 4.1.2.1 Verwendung von Fmoc- und Silyl-Schutzgruppen

Bei der ersten Strategie wurde auf säurelabile Schutzgruppen gänzlich verzichtet und eine basenlabile Fmoc-SG und die *tert*-Butyldimethylsilyl (TBDMS)-SG, die selektiv mit einer Fluorid-Quelle abgespalten werden kann, eingeführt (**Schema 4-5**).

Dafür wurde der Ester **16** nacheinander mit der Fmoc- und der Silyl-Schutzgruppe unter Standardbedingungen geschützt und anschließend mit DIBAL-H zum Aldehyden reduziert.<sup>[19, 164, 196]</sup> Die Ausbeuten dieser drei Schritte waren zufriedenstellend.



**Schema 4-5:** Alternative Schutzgruppen-Strategie zur Darstellung von *cis*-4-Methylsphingosin **1**.

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a Fmoc-OSu, NaHCO<sub>3</sub>, 1,4-Dioxan/H<sub>2</sub>O, 0 °C → RT | b TBDMS-Cl, Imidazol, DMF, RT | c DIBAL-H, Toluol, - 80 °C | d **31**, *t*BuLi, TMEDA, Me-THF, - 120 °C → - 84 °C.

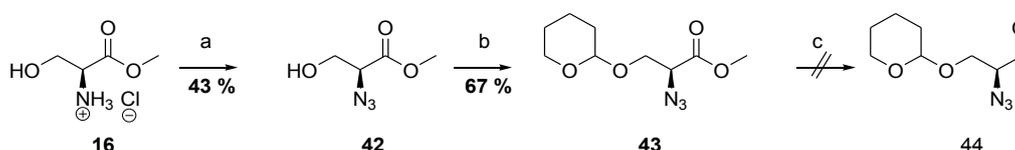
Die darauffolgende C-C-Bindungsknüpfung des Aldehyden **40** mit Z-2-Bromohexadec-2-en **31** lieferte jedoch nur 4 % Ausbeute. Außerdem zeigte das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum, dass die Substanz verunreinigt war.

Zusätzlich konnte nach der Säulenchromatographie eine Verbindung, bei der die Fmoc-SG abgespalten wurde und die C-C-Bindungsknüpfung nicht stattgefunden hat, isoliert werden. Dies lässt vermuten, dass die basischen Bedingungen in diesem Reaktionsschritt zur Abspaltung der Amin-Schutzgruppe führten. Somit erwies sich die Fmoc-Schutzgruppe als ungeeignet.

##### 4.1.2.2 Verwendung von Azidoserinal

In der Originalsynthese von *R. R. Schmidt et al.* wurde die Aminogruppe zuerst in Form eines Azids eingeführt (siehe Abschnitt 2.4.2), welches im letzten Schritt reduziert wurde.<sup>[138]</sup> Demzufolge erübrigte sich die Notwendigkeit der Verwendung einer Schutzgruppe.

Angesichts dieser Tatsache wurde die Synthese eines Azid-modifizierten Serinals angestrebt. Zu diesem Zweck wurde die Aminogruppe des L-Serinesters **16** mittels eines Kupfer-katalysierten Diazotransfers mit dem Diazodonor Imidazolsulfonylazid in einen Azidoserinester **42** unter der Retention des Stereozentrums überführt (**Schema 4-6**).<sup>[199]</sup>



**Schema 4-6:** Darstellung des Azid-modifizierten Serinals **44**.

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a Imidazolsulfonylazid-hydrochlorid, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O, MeOH, RT | b Dihydropyran, *p*TsOH·H<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT | c DIBAL-H, THF, - 80 °C.

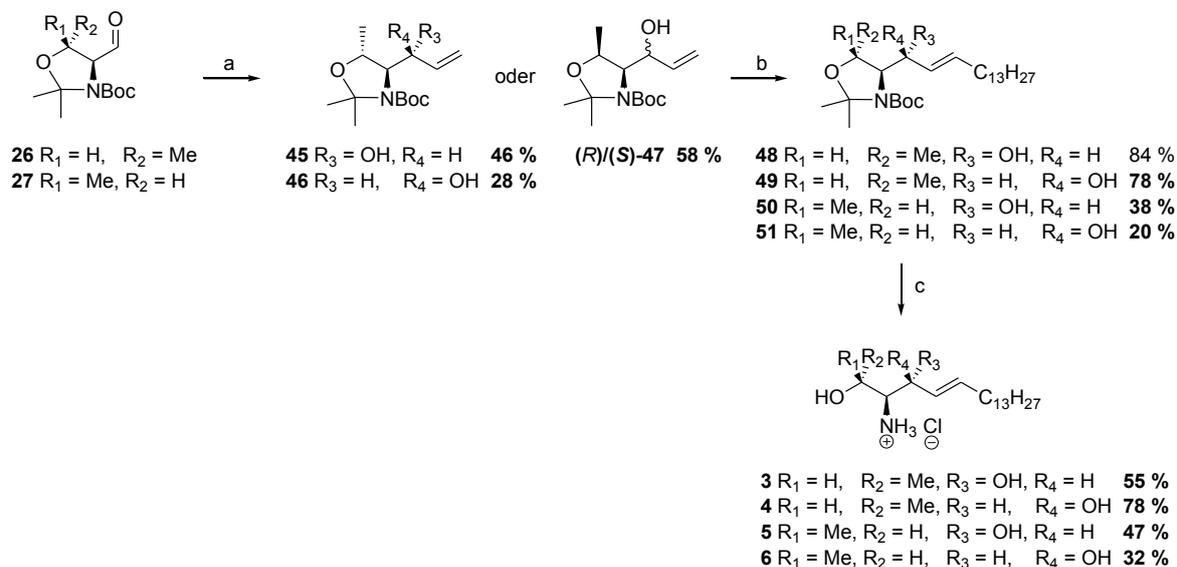
Anschließend wurde die primäre Hydroxylgruppe mit der säurelabilen Tetrahydropyranyl-SG nach der Synthesevorschrift von *T. Tatsushi et al.* geschützt.<sup>[200]</sup> Im nächsten Schritt sollte der Ester reduziert werden. Die bereits verwendeten Reaktionsbedingungen (DIBAL-H) waren nicht geeignet, da das Substrat sich nicht in Toluol löste. Daher wurde ein stärker polares Lösungsmittel, Tetrahydrofuran, verwendet. Ferner bestand die Gefahr der Reduktion des Azids. Jedoch fand kein Umsatz und keine Azidreduktion statt, sodass der Ester zurückgewonnen wurde. So konnte auch diese Strategie nicht weiter verfolgt werden.

Trotz aller Bemühungen konnte keine weitere Schutzgruppen-Strategie entwickelt werden, die die nicht optimal laufende Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen im Abschnitt 4.1 verbessern hätte können. Dennoch konnte eine ausreichende Menge der *cis*-4-Methylsphingosin-Derivate **1** und **2** für die biologischen Studien mit der zuvor beschriebenen Methode hergestellt werden.

## 4.2 Synthese von 1-modifizierten Sphingosinen

Da bereits eine kleine strukturelle Modifizierung des natürlichen Substrats gravierende funktionelle Auswirkungen haben könnte, wurde zunächst lediglich eine Methylgruppe mit unterschiedlicher Stereochemie an der Position 1 in die Leitstruktur eingebaut. Dieser Ansatz beruhte auf der Annahme, dass 1-verzweigte Derivate durch Sphingosinkinasen noch phosphoryliert werden könnten. Hingegen könnten diese Verbindungen gegenüber den S1P-Phosphatasen eine höhere metabolische Stabilität aufweisen. Dies würde in einer Akkumulation des aktiven Phosphats in der Zelle resultieren, was wiederum zur erhöhten biologischen Aktivität führen könnte.

Zu diesem Zweck wurden die zuvor synthetisierten *Garner*-Aldehyde **26** und **27**, die diese Methylgruppe in unterschiedlicher Konfiguration enthalten, verwendet. Im ersten Syntheseschritt wurde die Doppelbindung in einer Grignard-Reaktion durch die Behandlung mit Vinylmagnesiumbromid nach der Synthesevorschrift von *I. Ojima* und *E. S. Vidal* eingeführt (**Schema 4-7**).<sup>[201]</sup> Hierbei bildeten sich je zwei Diastereomere für jedes Aldehyd, wobei die Allylalkohole **45** und **46** säulenchromatographisch getrennt werden konnten, die L-*allo*-Threonin-Derivate jedoch nicht.

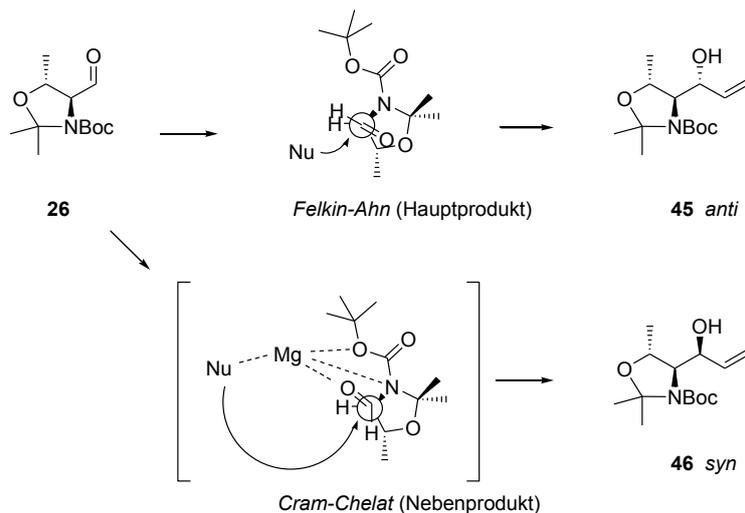


**Schema 4-7:** Darstellung von 1-modifizierten Sphingosinen **3-6** ausgehend von *Garner*-Aldehyden. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a VinylMgBr, THF, -80 °C → 0 °C | b 1-Pentadecen, Grubbs Katalysator zweiter Generation, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Rückfluss | c 4 M HCl, 1,4-Dioxan, 0 °C → RT.

Die Entstehung dieser Diastereomeren-Gemische kann anhand der *Felkin-Ahn*- und *Cram-Chelat*-Modelle erläutert werden. Bei der nukleophilen Addition einer organometallischen Verbindung an ein chirales Aldehyd werden ein kinetisches *anti*- und ein thermodynamisch stabileres *syn*-Produkt erzeugt, die den Allylalkoholen **45** und **46** entsprechen. In den meisten Fällen wird der nukleophile Angriff durch sterische Effekte gesteuert. Dabei orientiert

## 4.2 Synthese von 1-modifizierten Sphingosinen

sich die Carbonylgruppe in einer *gauche*-Position zum größten Substituenten, hier das Carbamat, sodass die Nukleophil-Annäherung über die am wenigsten gehinderte Trajektorie von der Seite des kleinsten Substituenten erfolgt (**Abbildung 4-3, Felkin-Ah**). Bildet sich jedoch ein chelat-kontrollierter Übergangszustand aus, indem Magnesium mit den beiden Sauerstoffatomen und dem Stickstoffatom ein Chelat bildet (**Abbildung 4-3, Cram-Chelat**), so wird das *Cram-Chelat*-Model angewendet.<sup>[23]</sup> In diesem Fall wird die Carbonylgruppe in einer anderen *gauche*-Position zum Carbamat positioniert und das Nukleophil greift wieder von der Seite des kleinsten Substituenten an.<sup>[23, 158]</sup>



**Abbildung 4-3:** *Felkin-Ah-Model* und *Cram-Chelat-Model* des nukleophilen Angriffs am Aldehyd **26** (modifiziert nach <sup>[158]</sup>).

Da bei der Grignard-Reaktion keine zusätzlichen chelatisierenden Additive verwendet wurden, bildete sich (*R*)-Allylalkohol **45** bevorzugt, wobei das Verhältnis (*R*) zu (*S*) 1.5 zu 1 betrug. Theoretisch wäre es auch möglich, den (*S*)-Allylalkohol durch den Zusatz von Übergangsmetallsalzen wie SnBr<sub>2</sub> oder SnCl<sub>4</sub> als Hauptprodukt zu erhalten.<sup>[38, 202]</sup>

Darüber hinaus sollte sichergestellt werden, dass aufgrund der starken Basizität des Metallorganyls keine Racemisierung des Stereozentrums an Position 2 stattgefunden hatte, da das acide Proton in der Nähe des Carbamats durch starke Basen leicht abzuspalten ist. Der Erhalt der Stereochemie wurde verifiziert, indem beispielhaft ein Allylalkohol entschützt<sup>[182]</sup> und die NMR-Spektren auf eine Verdopplung oder Aufspaltung der Signale untersucht wurden. Da keine Aufteilung der Signalsätze auftrat, wurde davon ausgegangen, dass keine Racemisierung stattfand.

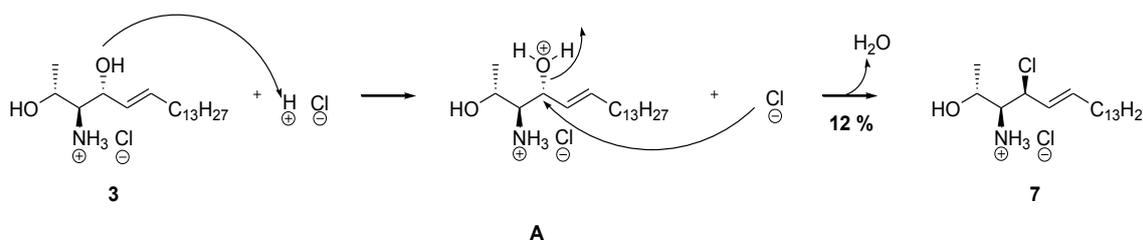
Im nächsten Syntheseschritt wurde das Sphingosin-Gerüst über eine Kreuzmetathese verlängert.<sup>[191]</sup> Zu diesem Zweck wurden beide Allylalkohole **45** und **46** sowie die Diastereomerenmischung (*R*)/(*S*)-**47** jeweils mit 1-Pentadecen und einer katalytischen Menge des Grubbs Katalysators zweiter Generation versetzt. Nachdem die Reaktionsgemische über mehrere Tage erwärmt wurden, konnten die geschützten Vorläufer

der 1-modifizierten Sphingosine in guten Ausbeuten isoliert werden. Zusätzlich konnten die *L-allo*-Threonin-Derivate **50** und **51** säulenchromatographisch zum größten Teil voneinander getrennt werden.

Zuletzt wurden beide Schutzgruppen durch die Behandlung mit 4 M HCl in Dioxan simultan abgespalten<sup>[182]</sup> und es konnten die vier 1-Methylsphingosin-Derivate **3-6** in Form von Hydrochloriden mit einer Gesamtausbeute von 4-21 % ausgehend vom Aldehyd isoliert werden.

Diese Synthesestrategie ermöglichte eine schnelle Darstellung von Sphingosin-Derivaten, wobei sowohl *anti*- als auch *syn*-Aminoalkohole generiert werden konnten. Zudem erlaubte die Anwendung der Kreuzmetathese die Einführung verschiedenster Reste mit diversen funktionellen Gruppen in das Sphingosin-Gerüst.

Unerwarteterweise wurden im letzten Syntheseschritt neben den gewünschten Zielverbindungen **3**, **5** und **6** kleine Mengen (10-16 %) an Nebenprodukten identifiziert. Bei diesen Verbindungen wurde die allylische Hydroxylgruppe durch ein Chloratom ausgetauscht. Die Entstehung solcher 3-Chloro-3-desoxysphingosin-Derivate könnte mechanistisch folgendermaßen abgelaufen sein (**Schema 4-8**). Da die allylische Hydroxylgruppe reaktiver als die sekundäre OH-Funktion ist, könnte sie durch die Säure protoniert worden sein, sodass Wasser als Abgangsgruppe generiert wurde (Intermediat **A**). In einer darauffolgenden nukleophilen Substitution könnte Chlorid unter Abspaltung von Wasser angegriffen haben. In diesem Fall wäre das Stereozentrum an Position 3 invertiert.



**Schema 4-8:** Vermuteter Mechanismus zur Chlorierung des Sphingosin-Derivates **3**.

Alternativ könnte die Reaktion über eine monomolekulare nukleophile Substitution abgelaufen sein. Dies hätte zur Folge, dass nach dem Abspalten von Wasser das gebildete Carbeniumion von beiden Seiten gleichermaßen durch das Nukleophil hätte angegriffen werden können, sodass das C3-Stereozentrum vollständig racemisieren würde. Da jedoch das <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C APT NMR-Spektrum von **7** eindeutig eine Verbindung mit sehr geringen Mengen an Verunreinigung zeigte, würde es eher auf eine bimolekular abgelaufene Reaktion hinweisen.

### 4.3 Synthese von 3-modifizierten Sphingosinen

Im Abschnitt 2.3 wurde gezeigt, dass die Modifikation am C3 des Sphingosins weitreichende Auswirkungen auf die biologischen Eigenschaften mit sich bringt. Daher sollten diverse 3-modifizierte Sphingosin-Derivate dargestellt werden, indem die Hydroxylgruppe gegen ein Chloratom, ein Fluoratom und einen Methoxy-Rest ausgetauscht wird.

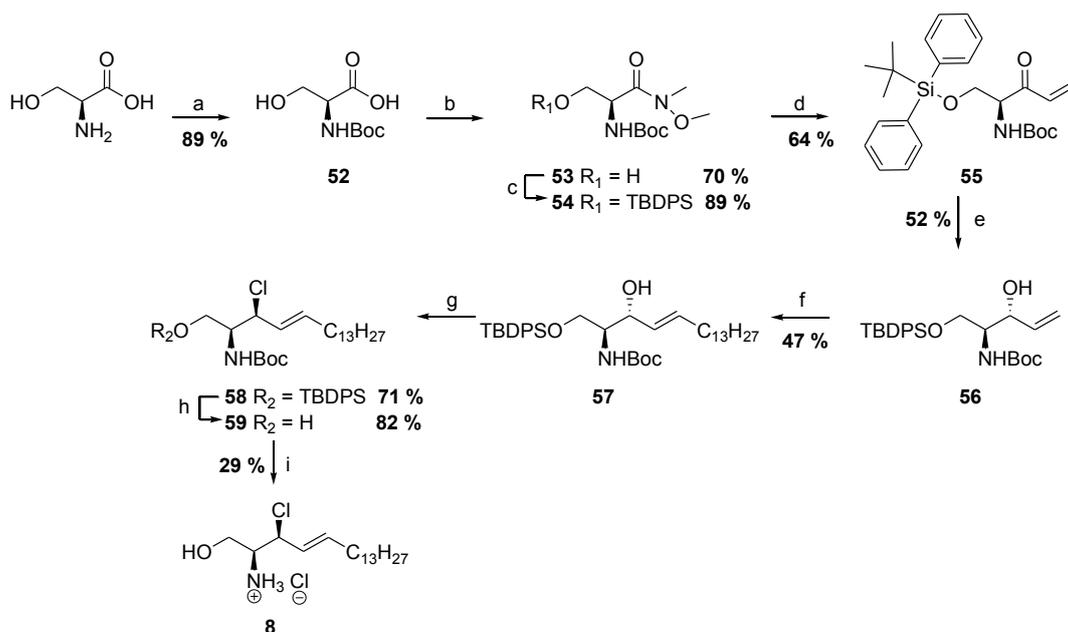
#### 4.3.1 Synthese von 3-Chloro-3-desoxysphingosin **8**

Da bereits ein chloriertes 1-Methylsphingosin-Derivat **7** dargestellt werden konnte, lag die Überlegung nahe, nur eine Position des natürlichen Sphingosins zu verändern, indem die allylische Hydroxylgruppe des Sphingosins durch Chlorid ersetzt werden würde. Dementsprechend könnte dieses Derivat nicht durch S1P-Lyase gespalten werden und/oder veränderte Rezeptorselektivität aufweisen.

Infolge des nicht vollständig geklärten Bildungsmechanismus von **7** sollte eine Synthese entwickelt werden, bei der eine eindeutige sterische Information des Moleküls explizit erzeugt werden kann. Die Methode aus dem Abschnitt 4.2 war für die Darstellung von 3-Chloro-3-desoxysphingosin nicht geeignet, weil die säulenchromatographische Trennung der nach der Grignard-Reaktion gebildeten Allylalkohole nicht effizient wäre. Daher wurde zur Darstellung der Allylalkohole eine alternative stereoselektive Reduktion eines Ketons nach *S. Katsumura et al.* anvisiert.<sup>[164]</sup>

Zunächst wurde L-Serin mit der Boc-Schutzgruppe geschützt und die Carboxylfunktion in ein Weinrebamid **53** überführt (**Schema 4-9**).<sup>[203-204]</sup> Nachdem die primäre Hydroxylgruppe mit der *tert*-Butyldiphenylsilyl (TBDPS)-Schutzgruppe geschützt wurde, konnte die Doppelbindung über eine Grignard-Reaktion mit Vinylmagnesiumbromid eingeführt werden. Anschließend wurde das Keton **55** durch die Behandlung mit Lithium-tri-*tert*-butoxyaluminiumhydrid selektiv zum (*R*)-Allylalkohol **56** reduziert.<sup>[164]</sup> Die Ausbeute für diese Reaktion betrug 52 %, jedoch konnten 28 % des nicht umgesetzten Ketons reisoliert werden.

Da der (*R*)-Allylalkohol mit dieser Methode erfolgreich dargestellt werden konnte, sollte nun das (*S*)-Derivat hergestellt werden. Hierfür wurde das Reduktionsmittel L-Selektrid verwendet, welches das Keton **55** selektiv zum *syn*-Produkt reduzieren sollte. *L. Liebeskind et al.* zeigten bereits für das Boc- und TBDMS-geschützte Ketosphingosin-Derivat eine erfolgreiche *syn*-Reduktion mittels L-Selektrid.<sup>[97]</sup> Trotz der Variation der Reaktionsbedingungen kam es bei diesem Schritt ausschließlich zur Zersetzung des Ausgangstoffes oder zur Reduktion der Doppelbindung. Somit konnte das (*S*)-Derivat im Rahmen dieser Arbeit nicht synthetisiert werden.

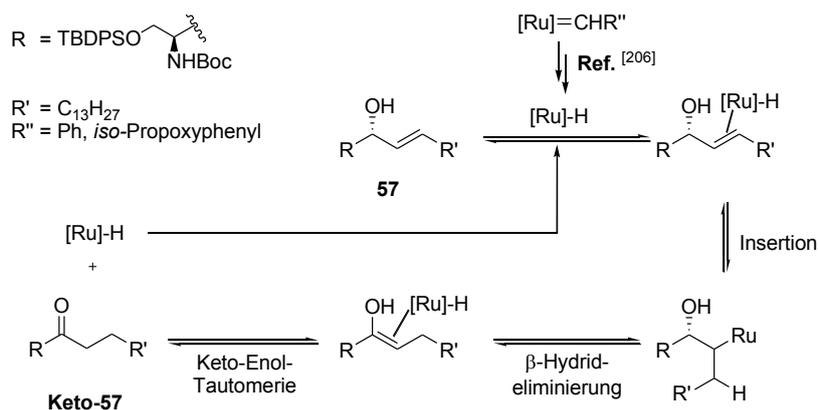


**Schema 4-9:** Darstellung von 3-Chloro-3-desoxysphingosin **8** über Weinrebamid.

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a  $\text{Boc}_2\text{O}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ , RT | b  $\text{NHMeOMe}\cdot\text{HCl}$ , *N*-Methylmorpholin,  $\text{EDC}\cdot\text{HCl}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-15\text{ }^\circ\text{C}$  | c  $\text{TBDPS}\text{-Cl}$ , Imidazol,  $\text{DMF}$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C}$   $\rightarrow$  RT | d  $\text{VinylMgBr}$ ,  $\text{THF}$ ,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  | e  $\text{LiAlH}(\text{O}t\text{Bu})_3$ ,  $\text{THF}/\text{EtOH}$ ,  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  | f 1-Pentadecen, Grubbs Katalysator zweiter Generation,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Rückfluss | g  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{PPh}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $40\text{ }^\circ\text{C}$   $\rightarrow$  RT | h TBAF,  $\text{THF}$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C}$   $\rightarrow$  RT | i 4 M  $\text{HCl}$ , 1,4-Dioxan,  $0\text{ }^\circ\text{C}$   $\rightarrow$  RT.

Anschließend wurde das Sphingosin-Rückgrat über eine Kreuzmetathese verlängert. Es wurde festgestellt, dass die Reaktionszeit von mehreren Tagen, die für 1-methylierte Sphingosine erforderlich war, für dieses Intermediat nicht geeignet war. Mit fortschreitender Dauer der Reaktion wurde die Bildung eines Nebenprodukts beobachtet, sodass die Reaktionszeit auf vier Stunden limitiert werden musste. Dieses Nebenprodukt konnte isoliert und als 3-Keto-Derivat Keto-**57** des geschützten Sphingosins **57** identifiziert werden. Die mögliche Ursache für die Keton-Bildung ist die sogenannte unkontrollierte Redoxisomerisierung. Diese basiert auf der Reaktion des nach der eigentlichen Kreuzmetathese gebildeten Allylalkohols **57** mit dem *in situ* entstandenen Rutheniumhydrid (**Schema 4-10**).<sup>[205-206]</sup> Solche Rutheniumhydride entstehen durch einen thermisch induzierten bimolekularen Zerfall von Ruthenium-NHC-methylidenen.<sup>[205-206]</sup> Da bei den verwendeten Katalysatoren zweiter Generation das Ruthenium-Zentrum in die C-H-Bindung des Mesityl-Liganden insertieren kann, fördert ein Einsatz dieser Übergangsmetall-Katalysatoren die Isomerisierung der Allylalkohole durch eine vermehrte Bildung der Ru-Hydride.<sup>[207]</sup> Nach der Limitierung der Reaktionszeit auf vier Stunden sowie durch das Stoppen der Reaktion durch die Zugabe von Kalium-2-*iso*-cyanoacetat<sup>[208]</sup> konnten 47 % des gewünschten Sphingosin-Derivates erhalten werden.

### 4.3 Synthese von 3-modifizierten Sphingosinen



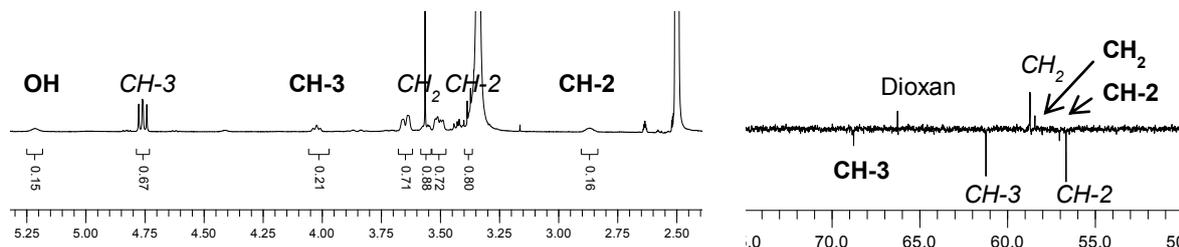
**Schema 4-10:** Vereinfachter Mechanismus der Redoxisomerisierung des Allylkohols nach *J.-E. Bäckvall et al.* (modifiziert nach <sup>[209-210]</sup>). Nach der Insertion des Ruthenium-Hydrids in die Doppelbindung des Allylkohols wird das  $\beta$ -Hydrid eliminiert. Durch die anschließende Keto-Enol-Tautomerie wird das Nebenprodukt Keto-57 gebildet.

Im nächsten Schritt wurde die allylische Hydroxylgruppe in ein Chlorid überführt. Dies wurde in einer Appel-Reaktion durch die Behandlung des Alkohols mit Triphenylphosphin und Tetrachlorkohlenstoff mit einer guten Ausbeute von 71 % erzielt.<sup>[211]</sup> Da diese Reaktion nach einem bimolekularen Mechanismus verlief, wurde die Stereochemie am Kohlenstoff 3 invertiert. Nachdem die Silyl-Schutzgruppe durch den Einsatz von Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) abgespalten wurde,<sup>[212]</sup> konnte im letzten Schritt die Boc-Schutzgruppe unter sauren Bedingungen entfernt werden.<sup>[182]</sup>

Im ersten Versuch wurde das Rohprodukt nach vollständiger Abspaltung der Schutzgruppen säulenchromatographisch aufgereinigt, wobei ein Lösungsmittelgemisch aus Dichlormethan und Methanol im Verhältnis 9:1 verwendet wurde. Die isolierte Hauptfraktion wurde anschließend mittels NMR analysiert. Die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C APT NMR-Spektren zeigten, dass das Produkt durch eine zweite Verbindung, die ebenfalls ein Sphingosin-Gerüst enthielt, verunreinigt war. Nach der anschließenden dünnenschichtchromatographischen Analyse der Lösung wurde die Präsenz einer weiteren Verbindung ebenfalls nachgewiesen. Dies deutete darauf hin, dass das 3-Chloro-3-desoxysphingosin **8** mit dem Lösungsmittel eine Reaktion einging. Die massenspektrometrische Analyse der methanolischen Lösung zeigte zusätzlich zum Produkt-Signal ( $m/z = 318$ ) einen weiteren Peak mit  $m/z = 314$ . Infolgedessen wurde vermutet, dass es sich um ein 3-Desoxy-3-methoxysphingosin handelt, welches aufgrund der Substitution des Chlors durch die Methoxygruppe des Methanols gebildet wurde. Angesichts der Tatsache, dass dieser Austausch erst während der sauren Abspaltung der Schutzgruppe auftrat, wurde vermutet, dass die Umwandlung säurekatalysiert ablaufen muss.

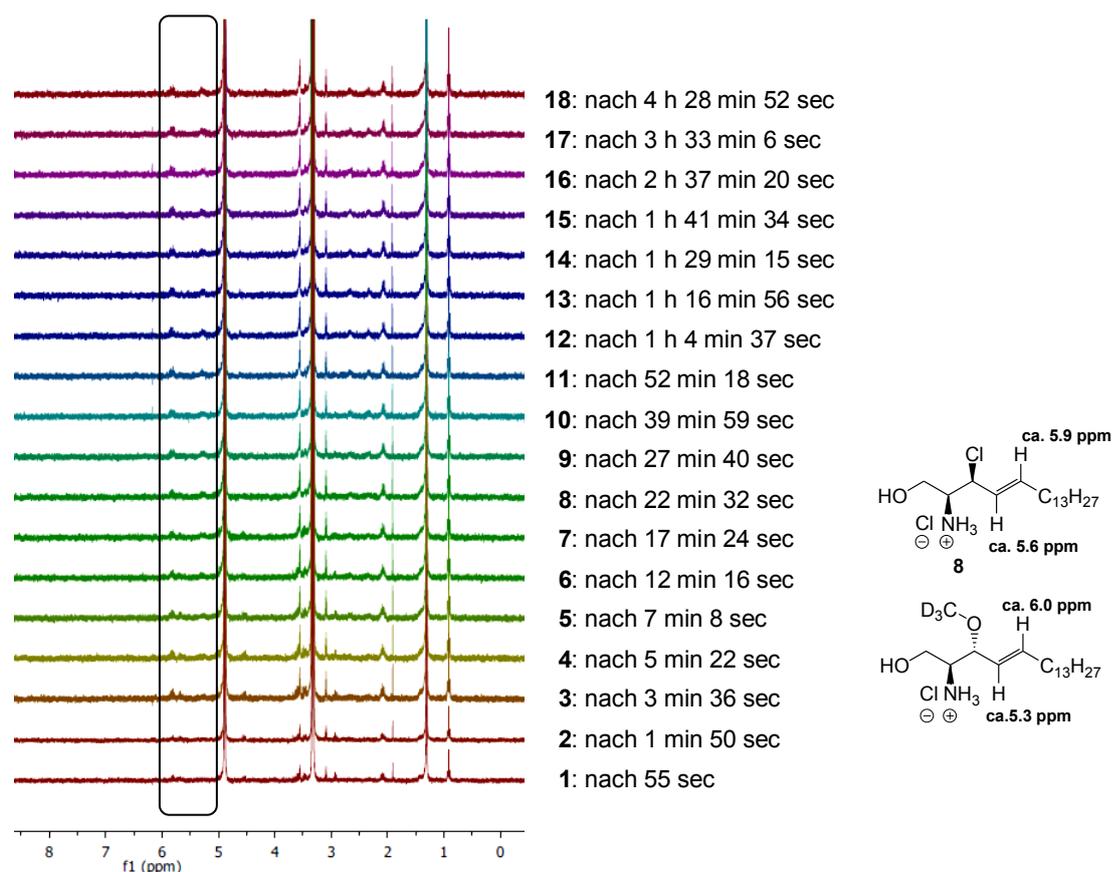
Deshalb wurde bei dem zweiten Ansatz auf die säulenchromatographische Aufreinigung verzichtet und die Zielverbindung durch Fällen im kalten Diethylether isoliert. Da Sphingosine in geringem Maße in Ether löslich sind, war die Ausbeute, verglichen mit den 1-methylierten Derivaten **3-6**, geringer. Die Struktur der Endverbindung wurde mittels einer NMR-Messung in deuteriertem Dimethylsulfoxid (DMSO) analysiert und bestätigt. Allerdings wurde

beobachtet, dass sogar durch Spuren von Wasser im Lösungsmittel die Endverbindung **8** über Nacht partiell zum Sphingosin umgewandelt wurde (**Abbildung 4-4**).



**Abbildung 4-4:** Ausschnitt aus den  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  APT-NMR-Spektren von 3-Chloro-3-desoxysphingosin **8** mit der Bezeichnung der Gerüstprotonen (kursiv für **8**, fett für Sphingosin). Die Verbindung reagierte mit den Spuren von Wasser aus dem NMR-Lösungsmittel.

Der oben beschriebene nukleophile Austausch des Chlors stellte für die weitere Charakterisierung der Verbindung ein Risiko dar, weil z. B. für die biologischen Studien auch wässrige Medien verwendet werden. Folglich wurde die Geschwindigkeit dieser Substitution in einer zeitabhängigen NMR-Studie erforscht (**Abbildung 4-5**). Zu diesem Zweck wurde eine 8.5 nM Lösung aus **8** in deuteriertem Methanol hergestellt und sofort vermessen.



**Abbildung 4-5:** Zeitabhängige  $^1\text{H}$ -NMR-Messung des Austausches von Chlor durch eine  $\text{d}_3$ -Methoxygruppe in einer 8.5 nM Lösung des 3-Chloro-3-desoxysphingosins **8** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

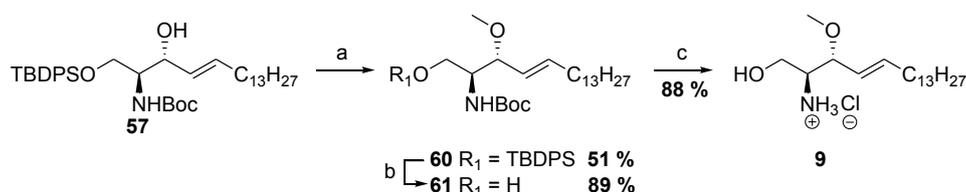
#### 4.3 Synthese von 3-modifizierten Sphingosinen

Zu Beginn der Messung wurden die Spektren alle 55 sec aufgenommen. Im weiteren Verlauf wurden die Intervalle zwischen den Messungen verlängert. Die Auswertung erfolgte anhand der Signalveränderung im Bereich zwischen 5 ppm und 6 ppm. Das Signal bei etwa 5.3 ppm, welches dem Proton an der Position 4 im  $d_3$ -Methoxy-Derivat entspricht, erschien bereits nach wenigen Minuten (siehe Spektrum Nr. 4). Der zweite Peak bei etwa 6 ppm, der zu dem Proton am C5 gehört, gewann erst an Intensität und stagnierte anschließend. Dies spricht ebenfalls für eine Umwandlung der Ausgangsverbindung. Die vollständige Substitution des Chlors wurde bei etwa 27 min vermutet. Dafür wurde das Signal bei etwa 5.9 ppm analysiert. Es steht dem H-5 des Chloro-Derivates gleich und verschwindet vollständig im NMR-Spektrum Nr. 9. Daraus folgte, dass der Austausch des Chlors sehr rasch ablief und nukleophile Lösungsmittel vermieden werden mussten. Daher wurde die Probe für die biologischen Studien in DMSO gelöst.

##### 4.3.2 Synthese von 3-Desoxy-3-methoxysphingosin 9

Im Abschnitt 2.3.2 wurde die pharmakologische Relevanz von 3-Desoxy-3-methoxysphingosin **9**, unter anderem bei der Behandlung und Bewertung immunologischer Erkrankungen, ausgiebig beschrieben. Deshalb sollte dieses Derivat synthetisiert werden, um zeigen zu können, ob es über die S1P-Rezeptoren agiert, welche Selektivität es gegenüber den Rezeptoren aufweist und ob in Zellen eine  $Ca^{2+}$ -Modulation ausgelöst wird. Des Weiteren wurde vermutet, dass bei dieser Verbindung eine Stabilität gegenüber dem enzymatischen Abbau durch S1P-Lyase bestehen könnte.

Die Darstellung erfolgte über eine klassische Williamson-Ethersynthese, wobei das zuvor synthetisierte geschützte Sphingosin **57** verwendet wurde (**Schema 4-11**). Hierfür wurde der Alkohol durch die Behandlung mit Natriumhydrid deprotoniert und dann mit Methyljodid umgesetzt. Die Abspaltung der Schutzgruppen konnte nach der gleichen Vorschrift unter sauren Bedingungen durchgeführt werden.<sup>[182, 212]</sup> Nach der säulenchromatographischen Aufreinigung wurde 3-Desoxy-3-methoxysphingosin **9** als ein Hydrochlorid-Salz erhalten. Die Ausbeuten waren zufriedenstellend.



**Schema 4-11:** Darstellung von 3-Desoxy-3-methoxysphingosin **9** über Williamson-Ethersynthese. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a NaH, MeI, THF, 0 °C → RT | b TBAF, THF, 0 °C → RT | c 4 M HCl, 1,4-Dioxan, 0 °C → RT.

### 4.3.3 Synthese von 3-Desoxy-3-fluorosphingosin **10**

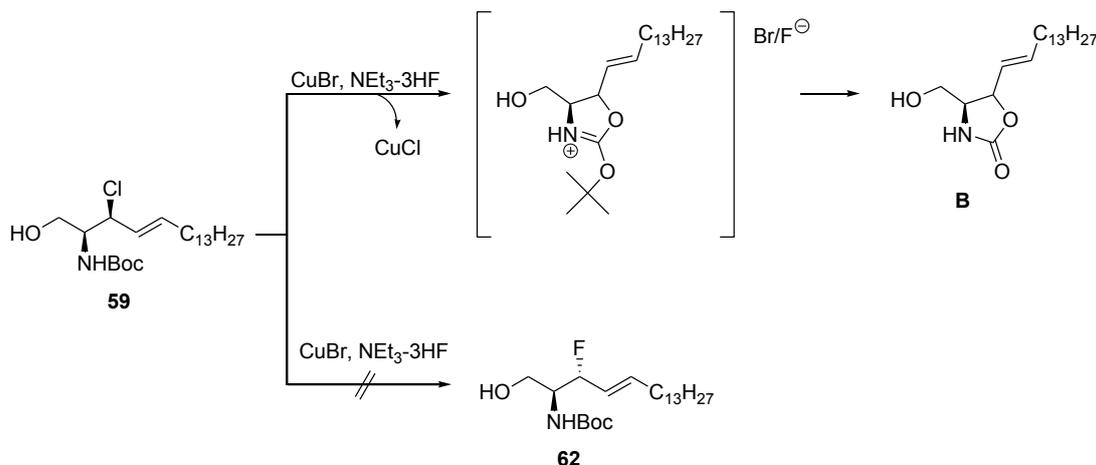
*P. Herdewijn et al.* und *S. M. Dubek et al.* konnten zeigen, dass Fluoro-Derivate von Sphingosin und FTY720 biologisch aktiv sind.<sup>[38, 136]</sup> In ihren Studien konnte 3-Desoxy-3-fluorosphingosin als ein Sphingosinkinase-Inhibitor und fluoriertes FTY720 als eine bei Lungenentzündung potente Gefäßbarriere-steigernde Verbindung identifiziert werden. Aufgrund der Größe und der hohen Elektronegativität hat Fluor einen signifikanten Einfluss auf chemische, biologische und physikalische Eigenschaften von organischen Molekülen.<sup>[213]</sup> Deshalb findet die Methode der Substitution mit einem oder mehreren Fluoratomen ihre Anwendung im pharmakologischen Bereich. Hierbei wird bei den Wirkstoffen die metabolische Stabilität aufgrund der Vermeidung unerwünschter oxidativer Abbauege, die selektive Reaktivität und die bindende Wirkung aufgrund zusätzlicher polarer Wechselwirkungen beeinflusst.<sup>[109, 214]</sup> Darüber hinaus werden fluoridierte Sphingolipide als Radiotracer zur molekularen Bildgebung mittels Positronenemissionstomographie genutzt.<sup>[215-216]</sup>

Mit dem Austausch der Hydroxylfunktion durch das Fluorid sollte bei der Verbindung eine metabolische Stabilität gegenüber der S1P-Lyase anvisiert werden. Daher sollte zunächst im Rahmen dieser Arbeit eine Synthese für 3-Desoxy-3-fluorosphingosin **10** entwickelt werden.

Die Einführung des Fluorids in einer allylischen Position war mit großem Aufwand verbunden. In erster Annäherung wurde die Finkelstein-Reaktion als Schlüsselschritt der Synthese ausgewählt, vor allem weil das Boc-geschützte 3-Chloro-3-desoxysphingosin **59** synthetisch zugänglich war (**Schema 4-12**, unten). Basierend auf seiner höheren Nukleophilie in aprotischen Lösungsmitteln sollte das Fluorid das weniger nukleophile Chlorid verdrängen. Im ersten Versuch wurde **59** nach der Vorschrift von *G. Liu et al.* mit einem Überschuss an Triethylamin-trihydrofluorid als Fluorid-Quelle und einer katalytischen Menge an Kupferbromid bei 35 °C umgesetzt.<sup>[217]</sup> Nach dem Aufarbeiten wurde ein Hauptprodukt isoliert, welches nach der Analyse jedoch nicht als das Fluoro-Derivat, sondern als ein zyklisches Carbamat **B** identifiziert wurde (**Schema 4-12**, oben). Die Ursache für die Entstehung dieses Produktes war höchstwahrscheinlich das Zusetzen des Kupfersalzes, welches durch seine Affinität zum Chlorid die Position 3 des Derivates aktiviert hatte, sodass die benachbarte Boc-Gruppe intramolekular in einer S<sub>N</sub>2-Reaktion zyklisierte. Durch die begünstigte Freisetzung des *tert*-Butyl-Carbokations, welches als Isobuten dem Reaktionsgleichgewicht entzogen wurde, wurde die Bildung des zyklischen Intermediates bevorzugt.<sup>[109]</sup> Diese Entstehung des Oxazolidinium-Salzes wurde von *M. Pipeler et al.* anhand einer Reaktion eines Boc-geschützten Aminoalkohols mit dem Fluorierungsmittel Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST) gezeigt, wobei ebenfalls ein Oxazolidinon als Hauptprodukt erhalten wurde.<sup>[109]</sup> Außerdem sind Kupfersalze in der Lage, *tert*-Butyl-Reste

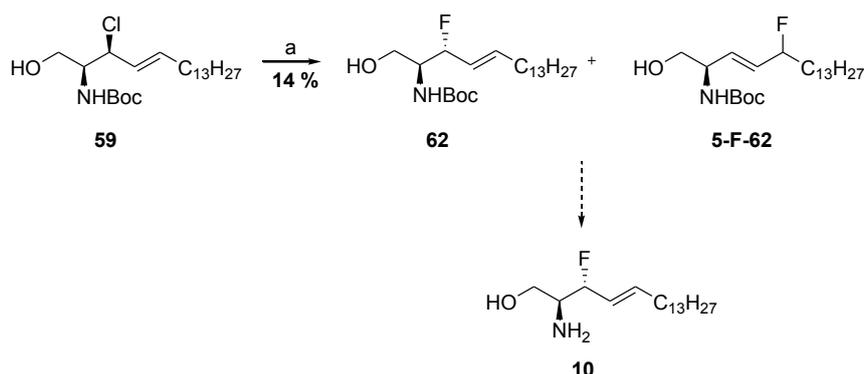
### 4.3 Synthese von 3-modifizierten Sphingosinen

oder eine Boc-SG abzuspalten, wie von *R. L. Webster et al.* 2014 am Beispiel vieler Amide und Carbamate berichtet wurde.<sup>[218]</sup>



**Schema 4-12:** Reaktion von **59** mit dem Fluorierungsmittel  $\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$  resultierte in der Bildung von zyklischem Carbamat **B**.

Da im ersten Versuch kein Fluoro-Derivat erhalten wurde, wurden die Reaktionsbedingungen variiert. Diesmal fand Cäsiumfluorid den Einsatz als Fluorierungsmittel (**Schema 4-13**).<sup>[217]</sup> Zwar konnte das gewünschte Produkt **62** erhalten werden, jedoch mit nur 14 % Ausbeute und in einer sehr geringen Menge. Zudem fand eine Umlagerung der Doppelbindung und des Fluorids statt. Wahrscheinlich wurde sie durch die Abstraktion des Chlorids durch Cäsium verursacht, gefolgt von der Stabilisierung des entstandenen Carbokations über das  $\pi$ -System der Doppelbindung, sodass ein **5-F**-Regioisomer entstand. Infolgedessen wurde versucht durch die Anpassung der Reaktionsbedingungen die Umlagerung zu minimieren.

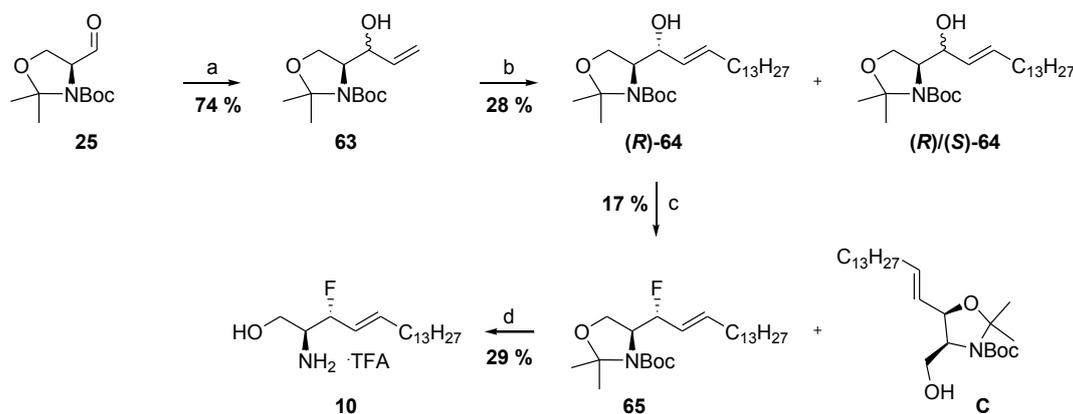


**Schema 4-13:** Synthese von 3-Desoxy-3-fluorosphingosin **10** über *Finkelstein*-Austausch nach *G.Liu et al.*<sup>[217]</sup>

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a  $\text{CsF}$ , DMF, RT  $\rightarrow$  50 °C.

Laut *K. Tomioka et al.* sollte die Fluorierung mit Kaliumfluorid und 18-Krone-6 mit 97 % zu Gunsten des nicht umgelagerten Regioisomers erfolgen.<sup>[219-220]</sup> Die Reaktionsbedingungen wurden auf das Chloro-Derivat angewendet, dennoch konnte kein Produkt erhalten werden.

Daraufhin wurde eine alternative Methode der Darstellung von 3-Desoxy-3-fluorsphingosin **10** entwickelt, die eine Desoxyfluorierung benötigte. Um dies zu ermöglichen, musste zuerst ein neues geschütztes Sphingosin dargestellt werden, weil das Silyl-geschützte Derivat **57** nicht stabil gegenüber den Fluorierungsmitteln ist. Daher fiel die Entscheidung auf die Methode, die für die 1-methylierten Sphingosine zum Erfolg führte. Hierfür wurde *Garner*-Aldehyd **25** in einer Grignard-Reaktion mit Vinylmagnesiumbromid umgesetzt, sodass eine Diastereomerenmischung **63** im Verhältnis 2.5:1 (*R*:*S*) erhalten wurde (**Schema 4-14**).<sup>[201]</sup> Nach darauffolgender Kreuzmetathese, die einen Umsatz von 64 % vorwies, konnten lediglich 28 % des reinen (*R*)-Allylalkohols **64** isoliert werden.<sup>[191]</sup>

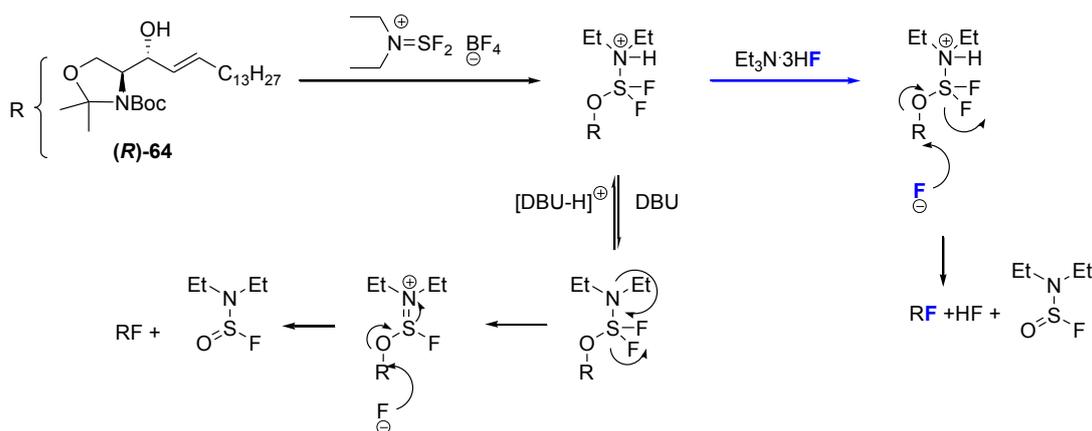


**Schema 4-14:** Alternative Methode zur Darstellung von 3-Desoxy-3-fluorsphingosin **10** über *Garner*-Aldehyd.

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a VinylMgBr, THF, - 80 °C  $\rightarrow$  0 °C | b 1-Pentadecen, Hoveyda-Grubbs Katalysator zweiter Generation, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Rückfluss | c XTal-Fluor-E®, DBU, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, - 80 °C  $\rightarrow$  RT | d TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C.

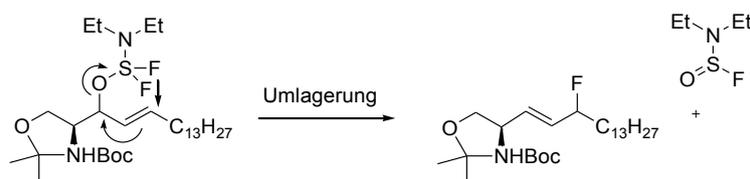
Im nächsten Schritt wurde die Einführung des Fluors mittels des Reagenzes XTal-Fluor-E® (Diethylaminodifluorsulfonium-tetrafluoroborat), welches eine nicht explosive, weniger feuchtigkeitsempfindliche und kristalline Alternative zu DAST darstellte, angestrebt.<sup>[214]</sup> Bei der Desoxyfluorierung gab es zwei Möglichkeiten, wie das Fluorid eingeführt werden konnte.<sup>[221]</sup> Zum einen kann eine externe Fluorid-Quelle, z. B. Triethylamin-trihydrofluorid, verwendet werden (**Schema 4-15**, blau). Zum anderen kann die Zugabe einer starken Base, z.B. 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU), durch die Deprotonierung der Diethylaminogruppe zum Freisetzen des Fluorids aus dem Molekül führen (**Schema 4-15**, schwarz). Dieses Fluorid greift daraufhin das gebildete Iminiumion an, sodass das gewünschte fluoridierte Produkt generiert wird.

### 4.3 Synthese von 3-modifizierten Spingosinen



**Schema 4-15:** Mechanismus der Desoxyfluorierung von **(R)-64** mit XTal-Fluor-E® (modifiziert nach <sup>[221]</sup>).

Die zweite Variante der Desoxyfluorierung schien geeigneter für das säurelabile Oxazolidin **(R)-64** zu sein, daher wurde die Reaktion unter Verwendung von DBU durchgeführt. Es war darauf zu achten, dass die Reaktion unter Luft- und Wasserausschluss ausgeführt wird. Das fluoridierte Produkt **65** konnte mit einer Ausbeute von 17 % erhalten werden. Allerdings konnte auch hier die Umlagerung der Doppelbindung und des Fluorids beobachtet werden. Diese läuft nach dem im **Schema 4-16** beschriebenen Mechanismus ab.<sup>[222]</sup> Somit wurde die Verbindung **65** als ein Regioisomeren-Gemisch **3-F** zu **5-F** im Verhältnis 2.3:1 erhalten. Diese Umlagerung kann, laut *T. Ritter et al.*, durch die Zugabe stöchiometrischer Mengen von Metallen wie Ruthenium oder Eisen verhindert werden, weil diese durch das  $\pi$ -System des Moleküls komplexiert werden.<sup>[214]</sup>



**Schema 4-16:** Mechanismus der Umlagerung bei der Desoxyfluorierung (modifiziert nach <sup>[222]</sup>).

Als Hauptprodukt der Desoxyfluorierung mit 55 % Ausbeute wurde jedoch ein anderes umgelagertes Derivat **C** erhalten (**Schema 4-14**). Unter den verwendeten Bedingungen kam es zur Wanderung der Isopropyliden-Gruppe zwischen der primären und der allylischen Hydroxylgruppe.

Zuletzt wurden die säurelabilen Schutzgruppen durch die Behandlung mit TFA abgespalten<sup>[163]</sup> und es konnte 3-Desoxy-3-fluorospingosin **10** isoliert werden. Trotz niedriger Ausbeuten konnte diese Synthese aus zeitlichen Gründen nicht optimiert werden. Da es sich bei der Endsubstanz um ein Regioisomeren-Gemisch handelte, wurde auf die biologische Untersuchung dieser verzichtet.

#### 4.4 Synthese von 1- und 3-modifizierten Sphingosinen

Analog zu 3-Desoxy-3-methoxysphingosin **8** und 3-Chloro-3-desoxysphingosin **9** sollten die jeweiligen 1-verzweigten Derivate dieser Zielverbindungen synthetisiert werden.

##### 4.4.1 Synthese von 1-Methyl-3-chloro-3-desoxysphingosin **7**

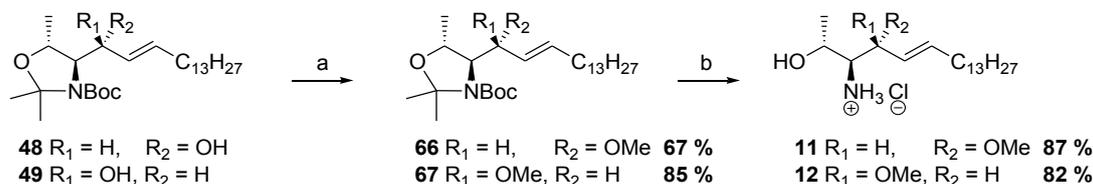
Der Versuch, die Zielverbindung **7** als Hauptprodukt einer bestimmten Synthese und nicht als Nebenprodukt bei der Abspaltung der Schutzgruppen zu erhalten, scheiterte trotz vielseitiger Ansätze. Als Substrat wurde das vollständig geschützte 1-methylierte Sphingosin-Derivat **48** verwendet, wobei die allylische Hydroxylgruppe in ein Chlorid überführt werden sollte.

Im ersten Versuch wurde das Reagenz Bis(triphenylphosphin)palladium(II)-dichlorid benutzt, welches laut *G. C. Fu et al.* in der Lage ist Allylalkohole in Chloride zu überführen.<sup>[223]</sup> Jedoch wurde bei dieser Reaktion kein Umsatz festgestellt, sodass der Alkohol reisoliert wurde.

Die darauffolgenden Reaktionsansätze mit dem Reagenz 2,4,6-Trichloro[1,3,5]triazin (Cyanurchlorid)<sup>[224]</sup> beziehungsweise mit Tetrachlorkohlenstoff/Triphenylphosphin<sup>[211]</sup> resultierten in der Bildung des umgelagerten 2,3-Oxazolidin-Derivates. Daher ist es im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen, die Verbindung **7** explizit zu synthetisieren.

##### 4.4.2 Synthese von 1-Methyl-3-desoxy-3-methoxysphingosinen **11** und **12**

Um eine mögliche gleichzeitige Stabilität der Derivate gegenüber den Phosphatasen und der S1P-Lyase zu erzielen, sollten 1-verzweigte und 3-methoxylierte Derivate mit unterschiedlicher Stereochemie am C3 dargestellt werden.



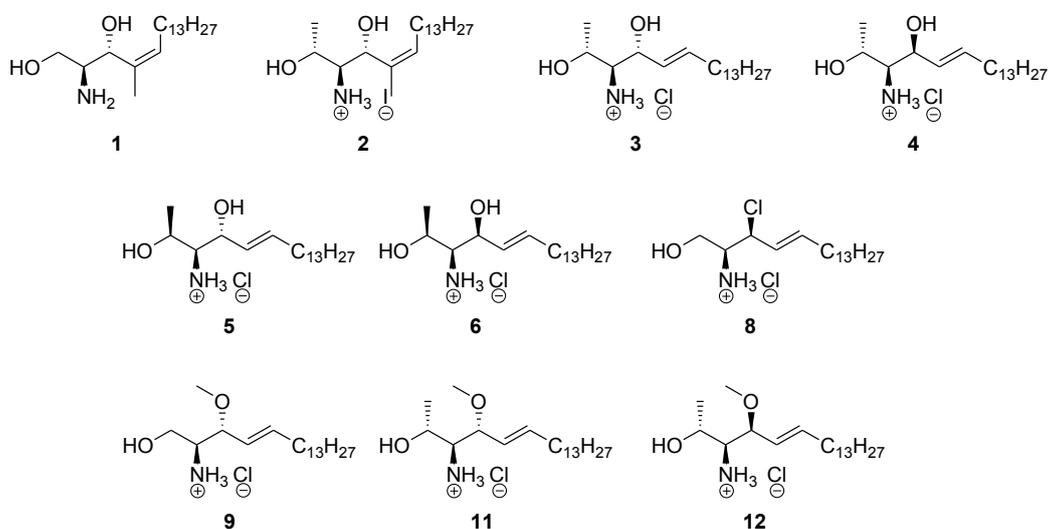
**Schema 4-17:** Darstellung von 1- und 3-modifizierten Sphingosinen **11** und **12**.

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a NaH, MeI, THF, 0 °C → RT | b 4 M HCl, 1,4-Dioxan, 0 °C → RT.

Diese 1,3-modifizierten Sphingosine konnten über eine Williamson-Ethersynthese erfolgreich generiert werden (**Schema 4-17**). Die im Vorfeld synthetisierten Oxazolidine **48** und **49** wurden nach der Vorschrift von *T. Braxmeier et al.* umgesetzt und die Schutzgruppen schließlich unter sauren Bedingungen abgespalten.<sup>[108, 182]</sup> Die Ausbeuten beliefen sich auf 58-70 % über zwei Stufen.

#### 4.5 Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung von modifizierten Sphingosinen

Es sollte die Rolle von verschiedenen strukturellen Merkmalen in der Wechselwirkung zwischen dem Substrat und dem Rezeptor getestet werden. Hierfür wurde eine Reihe von Verbindungen, basierend auf der Struktur des natürlichen Sphingosins, synthetisiert (**Abbildung 4-6**). Diese sollten anschließend auf ihren Effekt auf die Calcium-Modulation sowie auf die Selektivität gegenüber dem S1P-Rezeptor untersucht werden. In Kooperation mit der Gruppe um *D. Meyer zu Heringdorf* des Instituts für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie (Frankfurt am Main, Deutschland) wurden alle Assays zur Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung von *Anh-Tuan Sebastian Martin* durchgeführt.



**Abbildung 4-6:** Ausgewählte Endverbindungen für die Studie zur Struktur-Wirkungsbeziehung.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die ersten Derivate untersucht werden. Weitere Studien folgen.

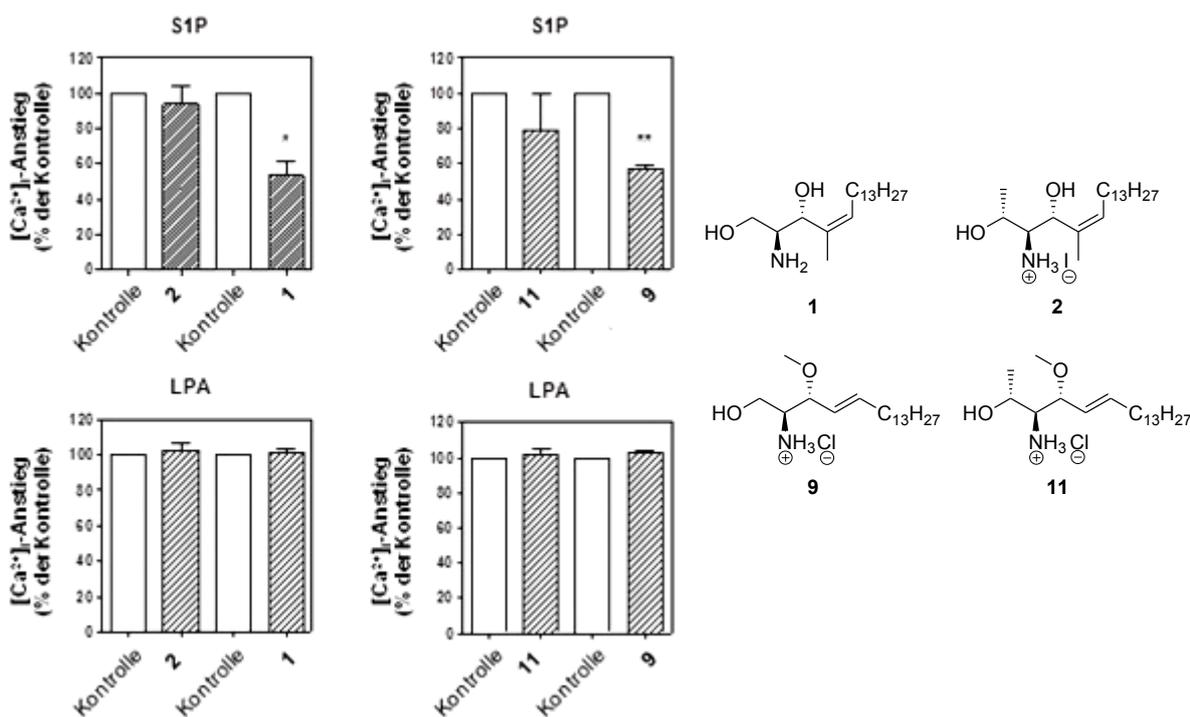
##### 4.5.1 Detektion der Calcium-Modulation

Der Einfluss der Sphingosin-Derivate auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) wurde mithilfe des Desensibilisierungsassays des S1P- oder LPA-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs gemessen und mittels Fluoreszenzspektroskopie detektiert. Zur Bildgebung wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM verwendet. Die Anregung wurde zwischen 340 nm und 380 nm verändert, während die Emission bei 510 nm aufgenommen wurde. ( $[Ca^{2+}]_i$ ) wurde nach der Bestimmung der maximalen und der minimalen Fluoreszenz nach *R. Y. Tsien et al.* bestimmt.<sup>[172]</sup>

Die intrazelluläre Calcium-Freisetzung aus dem ER oder sarkoplasmatischem Retikulum (SR) wird durch Messenger, wie S1P und LPA, über Rezeptoren oder direkt durch den Phospholipase C/Inositoltriphosphat-Weg kontrolliert.<sup>[3, 175, 225]</sup> Die Gruppe um *D. Meyer zu*

Heringdorf zeigte vorab, dass die Vorbehandlung der Zellen mit *cis*-4-Methylsphingosin **1** den S1P-abhängigen  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg inhibiert, jedoch keinen Einfluss auf die LPA-abhängige Calcium-Modulation ausübt.<sup>[141]</sup> Der Effekt stand in Abhängigkeit von Sphingosinkinasen, vorrangig SphK 2, wobei vorgeschlagen wurde, dass Cimes phosphoryliert wird. Dieses Phosphat sollte als Agonist von S1P-Rezeptoren agieren und sie desensibilisieren, ähnlich dem FTY720.

In der **Abbildung 4-7** ist der S1P- und LPA induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in HEK-293-Zellen gezeigt, nachdem die Zellen mit dem jeweiligen Sphingosin-Derivat vorbehandelt wurden.



**Abbildung 4-7:** Quantifizierung des S1P- und LPA-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs.  $[Ca^{2+}]_i$  wurde gemessen mittels Fluoreszenzspektroskopie mit Fura-2-AM. HEK-293-Zellen wurden für 16 h mit Trägersubstanz und mit je 1  $\mu$ M des Derivates behandelt. Nach dem Waschen und Beladen mit Fura-2 wurde  $[Ca^{2+}]_i$  in einer kontinuierlich gerührten Zellsuspension überwacht. Anschließend wurden jeweils 1  $\mu$ M S1P oder 1  $\mu$ M LPA hinzugegeben. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

Für das Derivat *cis*-4-Methylsphingosin **1** konnte eine Inhibition des S1P-abhängigen Calcium-Anstiegs um 45 % beobachtet werden. Somit konnten die Ergebnisse, die für die Cimes-Probe von R. R. Schmidt et al. erhalten wurden, reproduziert werden. Dies bestätigte, dass die neue kurze Methode sich für die Synthese von 4-verzweigten Sphingosin-Derivaten gut eignete. Das 1- und 4-methylierte Analogon **2** zeigte keine signifikante Veränderung der Calcium-Konzentration. Hingegen wiesen die 3-Desoxy-3-methoxyderivate des Sphingosins inhibitorische Eigenschaften auf, wobei die Verbindung **9** ähnlich der Verbindung **1** etwa 40 % Inhibition induzierte. Die 1-verzweigte Verbindung **11** zeigte ein Maximum der Inhibition von 20 %.

Anhand der Derivate **2** und **11** lässt sich ein Muster im Bezug auf die inhibitorischen Eigenschaften erkennen. Während die Verbindungen **1** und **9** mit primären Hydroxylgruppen die Calcium-Konzentration stärker modulierten, zeigten ihre 1-verzweigten Pendants weniger ausgeprägte bzw. keine Anlagen zur Inhibition. Es könnte hierbei einen Zusammenhang mit der Aktivität der Sphingosinkinasen, die die sekundären Hydroxylgruppen schlechter zu phosphorylieren vermögen, geben. Da üblicherweise das Phosphat über die Rezeptoren agiert, wird die Rezeptor-vermittelte Calcium-Modulation bei seiner Abwesenheit nicht induziert. Eine Inhibition der Sphingosinkinasen durch die 1-verzweigten Derivate ist ebenfalls nicht auszuschließen und sollte daher in weiteren Studien untersucht werden.

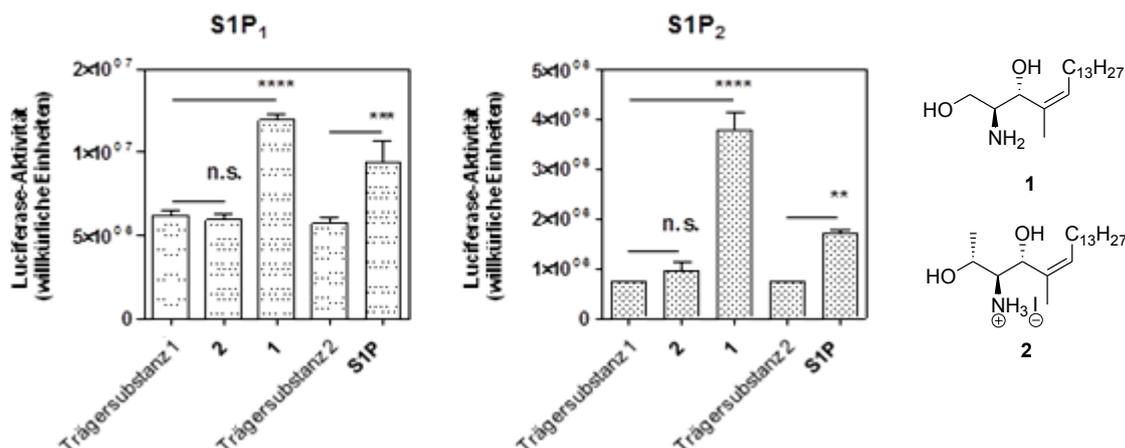
Für alle vier Verbindungen wurde keine Desensibilisierung des LPA-abhängigen  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs beobachtet. Dieses Resultat bestärkte die Annahme, dass die Derivate, die in diesem Kontext eine biologische Aktivität zeigen, über die S1P- und nicht über die LPA-Rezeptoren wirken.

#### **4.5.2 Detektion der Interaktion mit den S1P-Rezeptoren**

Für zwei Derivate, **1** und **9**, wurde eindeutig die Fähigkeit nachgewiesen,  $[Ca^{2+}]_i$  zu modulieren. Da in HEK-293-Zellen die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration mit den Rezeptorsubtypen S1P2 und S1P3 verbunden ist,<sup>[226]</sup> sollte die angenommene agonistische Aktivität der Derivate mithilfe des PRESTO-Tango-Reporter-Gen-Assays getestet werden. Die prädominante Internalisierung von S1P2 und S1P3 sowie die schwache Internalisierung an S1P1 durch *cis*-4-Methylsphingosin **1** ist von *D. Meyer zu Heringdorf et al.* bereits im Jahr 2011 beschrieben worden.<sup>[141]</sup>

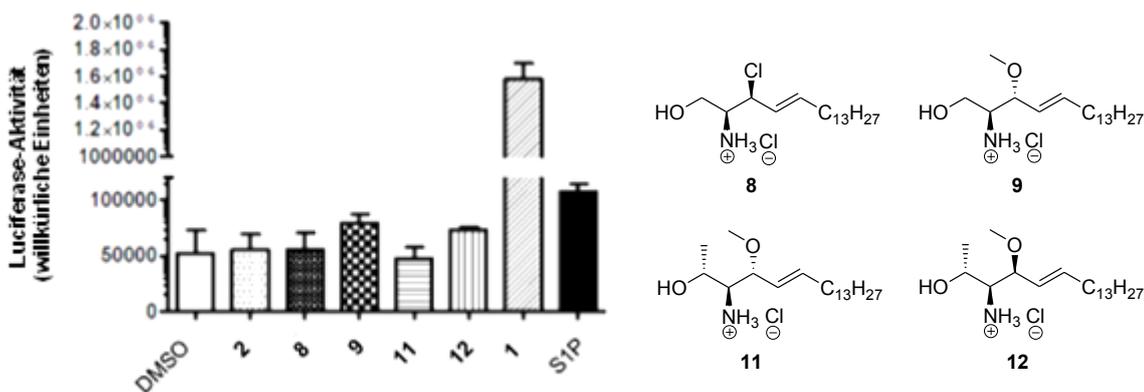
Für sechs Sphingosin-Derivate wurde die Aktivierung des S1P2-Rezeptors untersucht. Die Cimes-Derivate **1** und **2** wurden zusätzlich am S1P1 getestet. In den **Abbildungen 4-8** und **4-9** sind die Ergebnisse vorgestellt. Der PRESTO-Tango-Assay zeigte, dass *cis*-4-Methylsphingosin **1**, wie erwartet, ein starker Aktivator des S1P2 ist. Diesmal konnte erstmalig bestimmt werden, dass diese Verbindung eine drei- bis vierfache Aktivierung des Rezeptor-Subtyps hervorruft. Zum Vergleich, natürliches Substrat S1P induziert eine zweifache Aktivierung. Diese Resultate bestätigten die bisherige Hypothese, dass *cis*-4-Methylsphingosin **1** phosphoryliert wird und anschließend auf agonistische Weise an den S1P-Rezeptoren agiert. Zusätzlich konnte sein inhibitorischer Effekt auf den S1P-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg durch den funktionalen Antagonismus am S1P2 erklärt werden. Interessanterweise wurde festgestellt, dass eine mit S1P vergleichbare Aktivierung des Rezeptor-Subtyps S1P1 (zweifach im Vergleich zu Trägersubstanzen) ebenfalls vorlag. Daraus folgt, dass *cis*-4-Methylsphingosin **1**, als Prodrug des *cis*-4-Methylsphingosin-1-phosphates, als ein nicht selektiver Agonist der S1P-Rezeptoren charakterisiert werden

kann. Solch eine Aktivierung wurde bei dem Internalisierungsassay von *D. Meyer* zu *Heringdorf et al.* nicht beobachtet.<sup>[141]</sup>



**Abbildung 4-8:** Aktivierung des S1P-Rezeptors, gemessen mit dem PRESTO-Tango-System. HTLA-Zellstamm wurde transfiziert entweder mit S1P1- oder S1P2-Presto-Tango-Konstrukt und für 16 h mit Trägersubstanz 1 (0.1 % DMSO), 1 µM des Derivates in Trägersubstanz 1, Trägersubstanz 2 (0.01 mg/mL BSA) oder 1 µM S1P in Trägersubstanz 2 stimuliert. Luciferase-Reporter-Aktivität ist ausgedrückt in willkürlichen Einheiten der Lumineszenz. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler von repräsentativen Experimenten mit n=3. \*\*\*\*, p<0.0001; \*\*\*, p<0.001; \*\*, p<0.01; n.s., nicht signifikant in einfacher Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von *Bonferroni*-Mehrfachvergleichstest.

Das 1-methylierte Cimes-Derivat **2** zeigte hingegen keine Aktivierung der Rezeptoren S1P1 und S1P2. Dies könnte ebenfalls ein Hinweis darauf sein, dass Verbindung **2** nicht phosphoryliert wurde und somit keine Interaktion mit dem Rezeptor stattgefunden hat.



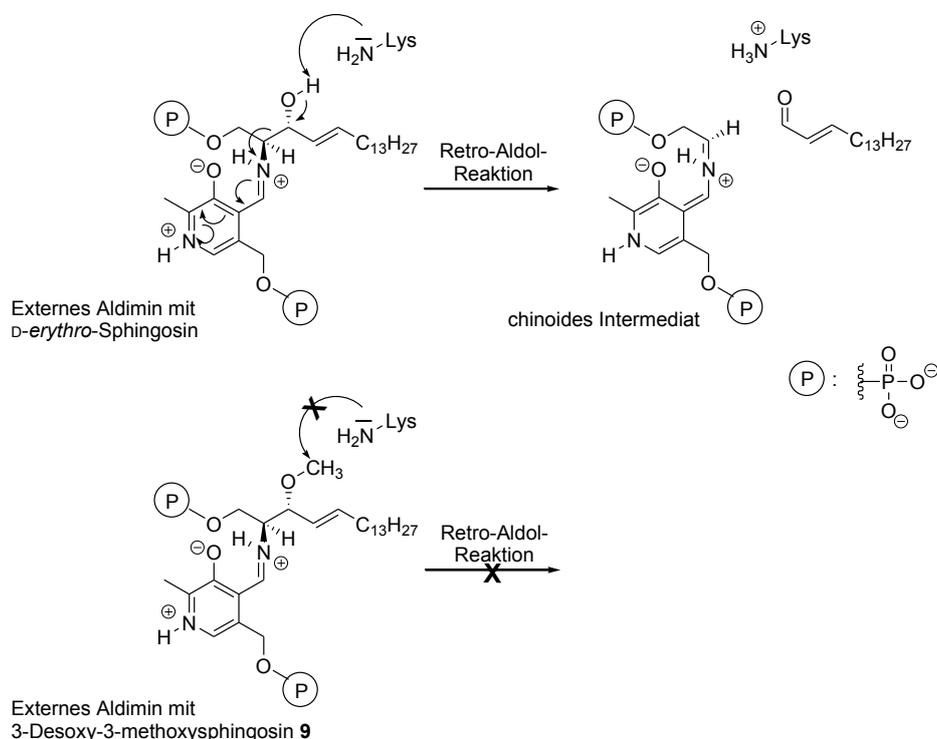
**Abbildung 4-9:** Aktivierung des S1P2-Rezeptors, gemessen mit dem PRESTO-Tango-System. HTLA-Zellstamm wurde transfiziert mit S1P2-Presto-Tango-Konstrukt und für 16 h mit Trägersubstanz 1 (0.1 % DMSO), 1 µM des Derivates in Trägersubstanz 1, 1 µM S1P (in 0.01 mg/mL BSA) stimuliert. Luciferase-Reporter-Aktivität ist ausgedrückt in willkürlichen Einheiten der Lumineszenz. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler von repräsentativen Experimenten mit n=3. Die Werte für Verbindung **1** und **2** sind zum Vergleich nochmals aufgeführt.

Im Falle der methoxylierten Derivate **9**, **11** und **12** sowie des 3-Chloro-3-desoxysphingosins **8** konnte keine agonistische Wirkung mit dem S1P2-Rezeptor festgestellt werden. Obwohl die Verbindungen **8** und **9** aufgrund ihrer primären 1-Hydroxylfunktion theoretisch hätten phosphoryliert werden sollen, lag die Aktivierung des Rezeptors unterhalb der

#### 4.5 Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung von modifizierten Sphingosinen

S1P-induzierten Aktivierung (**Abbildung 4-9**). Es wird vermutet, dass die 1-verzweigten Derivate, analog zu Verbindung **2**, nicht phosphoryliert werden.

Dennoch zeigte Verbindung **9** im verwendeten Desensibilisierungssassay die Fähigkeit, den S1P-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg zu inhibieren. Daher sollte für dieses Derivat die Interaktion mit dem Rezeptorsubtypen S1P3 untersucht werden. Die verstärkte Fähigkeit dieser Verbindung, den  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg zu inhibieren, könnte die Folge des funktionalen Antagonismus sein. Ähnlich zu *cis*-4-Methylsphingosin, wäre es möglich, dass die langanhaltende Internalisierung eines Rezeptorsubtyps aufgrund einer nicht stattfindenden Spaltung des Rezeptorliganden durch S1P-Lyase vorliegt. Theoretisch könnte diese Tatsache anhand des externen Aldimin-Intermediates, im postulierten Mechanismus des Enzyms nach *M. G. Grütter et al.* erklärt werden (**Abbildung 4-10**).<sup>[227]</sup>



**Abbildung 4-10:** Ausschnitt aus dem postulierten Mechanismus für die PLP-abhängige S1P-Lyase nach *M. G. Grütter et al.*<sup>[227]</sup> Durch die Modifizierung der C3-Position kann das externe Aldimin des 3-Desoxy-3-methoxysphingosins **9** durch S1P-Lyase nicht gespalten werden.

Nach der Bildung des externen Aldimins zwischen dem natürlichen *D*-erythro-Sphingosin und dem Kofaktor PLP wird das Intermediat in einer Retro-Aldol-Reaktion in Gegenwart einer Base gespalten. Es entstehen dabei das Hexadecenal und ein chinoides Intermediat, welches in dem enzymatischen Kreislauf weiter umgewandelt wird. Da bei dem 3-Methoxy-Derivat jedoch kein Proton, das unter den Bedingungen abstrahiert werden könnte, an der Position 3 vorhanden ist, könnte die Spaltung des Moleküls verhindert werden. Dies könnte in einer Akkumulation des Derivates und infolgedessen in der

dauerhaften Desensibilisierung des Rezeptors resultieren.

Ferner zeigte das 3-Chloro-3-desoxysphingosin **8** keine Wechselwirkung mit dem S1P2-Rezeptor. Diese Tatsache könnte andeuten, dass für die Interaktion mit dem S1P2-Rezeptor eine ionische Wechselwirkung der Hydroxylgruppe mit dem Rezeptor an Position 3 erforderlich ist. In diesem Fall ist Chlor aufgrund seiner niedrigeren Elektronegativität nicht fähig, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Zur Überprüfung dieser Hypothese könnte das Fluoro-Derivat **10** beitragen. Ähnlich wie das Chloro-Analogon **8**, sollte dieses gegen den Abbau durch die S1P-Lyase stabil sein. Gleichzeitig ist Fluor, im Gegensatz zu Chlor, in der Lage, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Dementsprechend könnte es zur Wechselwirkung mit dem S1P2-Rezeptor kommen.

Anhand der ersten SAR-Untersuchungen von den vorgestellten Sphingosin-Derivaten konnten erste Erkenntnisse bezüglich der Interaktion mit bestimmten S1P-Rezeptoren gewonnen werden. Es zeigte sich, dass die sekundäre Hydroxylfunktion an der Position 1 vermutlich dazu beiträgt, dass Derivate, im Vergleich zu nicht verzweigten Verbindungen, langsamer oder gar nicht phosphoryliert werden können. Des Weiteren gab es einen Hinweis darauf, dass die Hydroxylgruppe am C3 für die Interaktion mit dem S1P2-Rezeptor von Bedeutung ist.

#### **4.6 Synthese und Charakterisierung von fluoreszenzmarkiertem Sphingosin-Derivat 13**

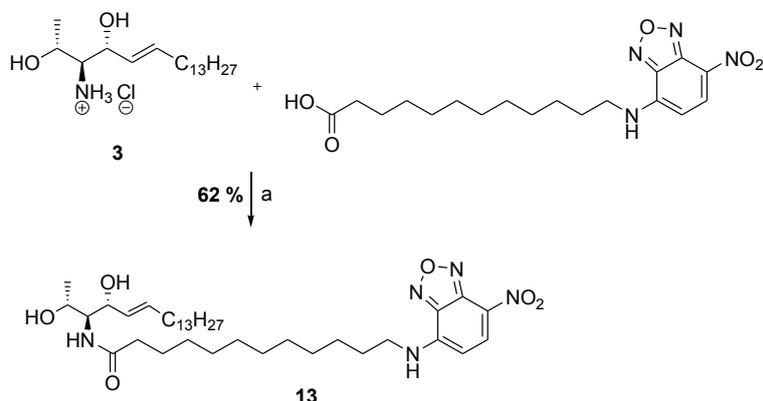
Neben ihren strukturellen Eigenschaften bezüglich der Calcium-Modulation und der Rezeptorwechselwirkung konnte eines der neuartigen Sphingosin-Derivate in einem weiteren biologischen Zusammenhang untersucht werden.

Wie bereits im Abschnitt 2.3.3 beschrieben wurde, konnte die Substitution der primären 1-Hydroxylfunktion mit einer Methoxygruppe in einem NBD-markiertem Ceramid *1-OMe* hervorrufen, dass die Verbindung durch den Bakterienstamm nicht metabolisiert wurde.<sup>[110]</sup> Des Weiteren wies das Ceramid eine anti-chlamydiale Eigenschaft auf. Ein verbessertes Verständnis des Zusammenspiels zwischen dem Parasiten und der Wirtszelle kann dazu führen, dass neue therapeutische Ansätze entwickelt und weitere Erkenntnisse in der Biologie des Parasitismus gewonnen werden.<sup>[111]</sup>

In einer Kooperation mit dem Robert-Koch-Institut sollte beispielhaft getestet werden, ob die Verlagerung der Methylgruppe auf die Position C1 des Sphingolipids einen Einfluss mit sich bringt. Die Verbindung sollte bezüglich der Zellaufnahme, der Lokalisierung und der anti-chlamydialen Wirkung überprüft werden.

Hierfür wurde das 1-methylierte Derivat **3** mit einem vorab NBD-markierten Fettsäurerest verknüpft, sodass das NBD-C12-Ceramid **13** mit einer guten Ausbeute von 62 % erhalten

wurde (**Schema 4-18**).<sup>[170]</sup> Die Länge der Fettsäure wurde so gewählt, dass sie mit dem zusätzlichen Fluorophor etwa der Länge eines C16-Fettsäure-Rests entspricht.



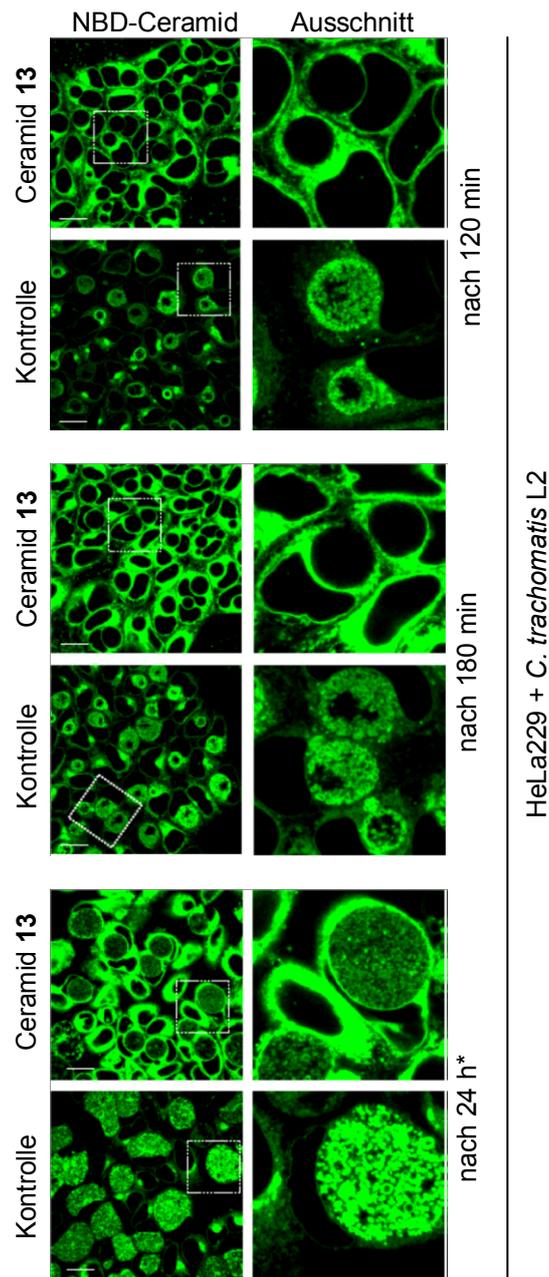
**Schema 4-18:** Darstellung von NBD-markiertem Sphingosin-Derivat **13**.

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a EDC·HCl, HOBT·HCl, DIPEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT.

Anschließend wurden mit *C. trachomatis* L2 infizierte HeLa229-Zellen mit dem Ceramid **13** inkubiert und die Lokalisierung des Sphingolipids mithilfe der konfokalen Laser-Scanning-Spektroskopie über einen Zeitraum von 24 h anhand der Fluoreszenz beobachtet (**Abbildung 4-11**). Die Messung wurde durch die Mitarbeiterin des Robert-Koch-Instituts (Berlin, Deutschland) *Sophia Edelmann* aus der Gruppe von *D. Heuer* durchgeführt.

Es wurde festgestellt, dass das 1-methylierte Ceramid **13** langsam in die Zellen aufgenommen wurde. Im Gegensatz zum Kontroll-Ceramid, zeigte es aber eine weniger distinkte Akkumulation im Golgi-Apparat. Zusätzlich gelangte es nicht in die Inklusion der Bakterien. Zwar konnte nach 24 h Inkubationszeit ein leichter Intensitätsanstieg der Fluoreszenz innerhalb der Inklusion festgestellt werden, dennoch war dies kein sicheres Anzeichen einer spezifischen Ceramid-Aufnahme. Da solch eine lange Inkubationszeit eher unüblich für eine Lipid-Aufnahmeuntersuchung ist, ist es nicht auszuschließen, dass das Ceramid durch den unspezifischen Transport oder durch die Diffusion aufgrund der membranartigen Struktur aufgenommen wurde.

Mithilfe dieser Methode wurde gezeigt, dass das vom L-Threonin-abgeleitete NBD-markierte C12-Ceramid **13** nicht in die bakterielle Inklusion auf spezifischem Wege aufgenommen wurde. Zudem wurde festgestellt, dass, im Gegensatz zu 1-OMe, das Molekül nicht im Golgi-Apparat akkumuliert wird. Dies liegt möglicherweise an der weniger aciden und sterisch anspruchsvolleren sekundären Hydroxylgruppe an Position 1. Die anti-chlamydiale Wirkung der Verbindung konnte bisher nicht getestet werden.



**Abbildung 4-11:** Aufnahme und Lokalisation des fluoreszierenden NBD-C12-Ceramids **13**. HeLa229-Zellen wurden mit *C. trachomatis* L2, MOI 1 infiziert. Nach 24 h *post infectionem* wurden 10  $\mu$ M des Ceramids **13** den infizierten Zellen zugesetzt, die Fluoreszenz wurde mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie nach 120 min, nach 180 min und nach 24 h der Inkubation beobachtet. Kontrolle = NBD-markiertes C16-Ceramid. Maßstabbalken: 20  $\mu$ m. Abbildungen zeigen repräsentative Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente. \*Anregung mit 1/3 der zuvor verwendeten Laserenergie.

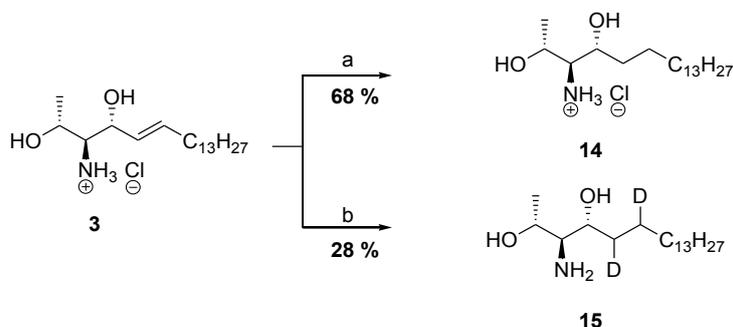
In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, ob die Länge des Fettsäure-Rests oder die Markierung des Moleküls über die Sphingosin-Base einen Einfluss auf die Lokalisierung und die Aufnahme des Ceramids hat. Die fluoreszenz-basierte Methode bietet hierbei die Möglichkeit, diese Eigenschaften schnell und effizient zu analysieren.

#### 4.7 Synthese von 1-modifizierten Dihydrospingosin-Derivaten

Zu Beginn des 21. Jahrhunderts wurden mehrere Studien zur vielversprechenden onkologischen Aktivität von Backhefe veröffentlicht, die auf der Modulation des Immunsystems und der intrazellulären Calcium-Konzentration sowie dem apoptotischen Effekt auf die Krebszellen *in vivo* basieren.<sup>[228-229]</sup> Erstaunlicherweise waren die Krebszellen (Brustkrebs, Ehrlich-Karzinom) bestrebt, die Hefe verstärkt zu phagozytieren.<sup>[95, 229]</sup> Dies führte anschließend zur Tumor-Degeneration und zur Apoptose der Krebszellen ohne nennenswerte Nebeneffekte für den lebenden Organismus.<sup>[95]</sup> Der Mechanismus solcher Selektivität konnte jedoch nicht aufgeklärt werden.

In Zusammenarbeit mit der Gruppe um Y. Hannun sollten Dihydrospingosin-Standards dargestellt werden, die zur Identifizierung und Quantifizierung neuartiger Sphingolipide in Hefe benutzt werden sollten. Die vorangegangenen Untersuchungen ergaben, dass einige der Sphingolipide auf der Aminosäure L-Threonin basieren. Daher sollte diese Annahme durch einen Vergleich der isolierten Sphingolipide mit den Standards evaluiert werden.

Für die Synthese der Dihydrospingosin-Standards basierend auf L-Threonin wurde das 1-methylierte Sphingosin-Derivat **3** jeweils mit Wasserstoff bzw. Deuterium in einer Palladium auf Kohle katalysierten Reaktion umgesetzt (**Schema 4-19**).<sup>[202]</sup> Im Falle der Deuterierung wurde zur Deprotonierung des Salzes vor der Reaktion zusätzlich eine Extraktion mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Diethylether durchgeführt, um jegliche Anwesenheit der Protonen zu vermeiden.



**Schema 4-19:** Darstellung von 1-modifizierten Dihydrospingosin-Derivaten **14** und **15**.

Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a  $\text{H}_2, \text{Pd/C, MeOH}$  | b i  $\text{NaHCO}_3, \text{Et}_2\text{O}$ , ii  $\text{D}_2, \text{Pd/C, MeOD}$ .

Die Reduktion der Doppelbindung war bei beiden Ansätzen erfolgreich, sodass die Dihydrospingosin-Derivate **14** und **15** mit guten Ausbeuten erhalten wurden. Die Reinheit der deuterierten Zielverbindung im Bezug auf die Wasserstoff-Addition wurde anhand der Massenspektrometrie sowie der NMR-Spektroskopie nachgewiesen. Erwartungsgemäß fehlten im  $^1\text{H}$ -Spektrum der deuterierten Verbindung **15**, verglichen mit dem Dihydrospingosin-Derivat **14**, die Signale zweier Protonen, beziehungsweise wiesen die C-D-Signale im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum eine Triplett-Aufspaltung aufgrund des nuklearen Spins von Deuterium  $I = 1$  auf. Der Vergleich dieser Standards mit den isolierten Sphingolipiden folgt.

---

## 5 Ausblick

Viele Fragen zu der Fähigkeit von bioaktiven Sphingolipiden, Signaltransduktion über vielseitige Mechanismen auszuüben und dadurch spezifische zelluläre Antworten hervorzurufen, sind in den letzten drei Jahrzehnten geklärt worden. Dennoch bleiben unzählige Fragestellungen offen. Synthetisch generierte Sphingosin-Analoga können hierbei zur Bestimmung von individuellen Funktionen des Rezeptors und der Wechselwirkung mit den metabolischen Enzymen beitragen oder sie können sogar als experimentelle Wirkstoffe genutzt werden.

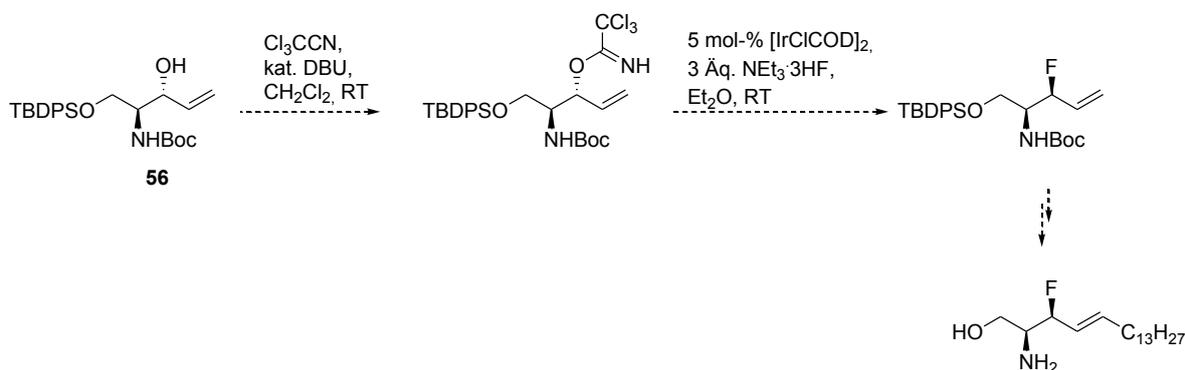
Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine robuste und reproduzierbare Methode zur Synthese von Cimes etabliert werden. Weiterer Optimierungsbedarf besteht bei der Abspaltung der Boc-Gruppe. Dabei steht die Säurelabilität der *cis*-Doppelbindung einer effizienten Abspaltung dieser Schutzgruppe entgegen.

Gelöst werden könnte dieses Problem beispielsweise durch eine alternative Abspaltungsmethode. Durch die Behandlung mit Cäsiumcarbonat und Imidazol bei 70 °C könnte die Abspaltung der Schutzgruppe unter basischen Bedingungen erzielt werden. <sup>[230]</sup> Allerdings könnte hierbei die Gefahr der Racemisierung und/oder Isomerisierung nicht vollständig ausgeschlossen werden. Darüber hinaus könnte eine besser geeignete Schutzgruppe die Gesamtausbeute dieser Methode erheblich verbessern. Durch den Einsatz von Bhoc-Chloroformiat als Reagenz könnte eine schnellere Schutzgruppenabspaltung an der Aminofunktion im letzten Schritt aufgrund der stärkeren Säurelabilität der eingeführten Schutzgruppe erreicht werden.

Die Erzeugung von L-Threonin abgeleiteten (3*R*)- und (3*S*)-Allylalkoholen konnte simultan mithilfe einer Grignard-Reaktion erreicht werden. Bei der Steigerung der Ausbeuten in diesem Schritt für ein einzelnes Diastereomer sowie falls nur ein Diastereomer benötigt wird, können Reaktionsadditive Abhilfe schaffen. Durch den Zusatz von chelatbildenden Übergangsmetallsalzen könnte beispielsweise das (3*S*)-Derivat bevorzugt generiert werden. Denkbar ist, dass dieser Ansatz ebenfalls bei der gescheiterten Synthese des Silyl- und Boc-geschützten (3*S*)-Allylalkohols (siehe Abschnitt 3.3.1) zum Erfolg führen könnte. In diesem Fall könnte die missglückte *syn*-Reduktion des Ketons umgangen werden, indem ein

L-Serin-*Garner*-Aldehyd direkt mit Vinylmagnesiumbromid umgesetzt wird. An einem anderen Beispiel wurde gezeigt, dass in diesem Fall die anschließende Trennung der Diastereomeren schwierig ist. Sie ist jedoch, z. B. durch eine Senkung der Polarität oder eine Erhöhung der Stereozentrenanzahl mittels einer Derivatisierung, realisierbar. Dazu wurden in diesem Zusammenhang die ersten Versuche in der Gruppe um C. Arenz bereits unternommen. Alternativ besteht die Möglichkeit das Vinylketon **55** mit einem nicht stereoselektiven Reduktionsmittel zu reduzieren und die entstandenen Diastereomere nach der genannten Methode zu trennen.

Mit den bislang genutzten Strategien konnte bei dem Austausch der allylischen Hydroxylgruppe durch ein Fluorid nur ein 3,5-Regioisomeren-Gemisch erhalten werden. Folglich sollte eine andere Möglichkeit gefunden werden Fluorid einzuführen. Ein großes Potential bietet die Anwendung von Trichloracetimidaten, die in Gegenwart eines kommerziell erhältlichen Iridium-Katalysators regioselektiv in allylische Fluoride überführt werden können (**Schema 5-1**).<sup>[231]</sup> Zudem kann vom bereits etablierten Derivat ausgegangen werden, da diese Reaktionsbedingungen die vorhandene Silyl-Schutzgruppe tolerieren sollten. Für das (3*R*)-Fluoro-Derivat sollte zunächst der entsprechende (S)-Allylalkohol generiert werden.



**Schema 5-1:** Anvisierte Synthese von 3-Desoxy-3-fluorosphingosin nach H. M. Nguyen *et al.*<sup>[231]</sup>

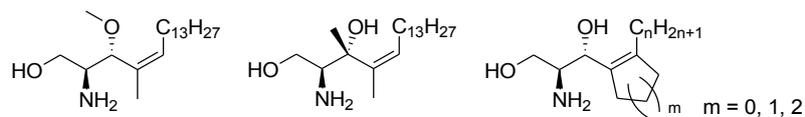
Die synthetisierten Sphingosin-Analoga erwiesen sich in den ersten biologischen *in vitro* Studien als sehr nützlich. Es zeigte sich, dass die 1-verzweigten Derivate **2** und **11** von Sphingosinkinase wahrscheinlich eher schlecht bis gar nicht phosphoryliert werden. Es wäre interessant zu bestimmen, ob diese Derivate keine Substrate der Kinasen sind oder ob sie diese Enzyme inhibieren. Ein weiterer zu klärender Aspekt ist, ob die veränderte Stereochemie an der Position 1 einen Effekt auf die Phosphorylierung hätte. Was den Austausch der allylischen Hydroxylgruppe gegen die Methoxygruppe betrifft, so konnte anhand der Verbindung **9** gezeigt werden, dass eine Inhibition des S1P-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs stattfindet. Andererseits musste festgestellt werden, dass dieser Effekt nicht über den S1P2-Rezeptor erfolgt. Daher sind weitere Untersuchungen, vor allem am

---

S1P3-Rezeptortyp, notwendig. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die 3-Methoxygruppe im enzymatischen Abbau mittels der S1P-Lyase eine Rolle spielt.

In diesem Zusammenhang wäre es in weiteren Studien interessant zu untersuchen, inwieweit sich der Austausch der 3-Hydroxylfunktion durch die Methoxygruppe in *cis*-4-Methylsphingosin auf die metabolische Stabilität gegenüber den abbauenden Enzymen auswirkt. Zusätzlich könnte eine Modifikation am Rückgrat des Moleküls vorgenommen werden, indem eine zweite Methylgruppe direkt am C3 eingeführt wird (**Abbildung 5-1**).

In den Studien von S.-K. Chung *et al.* wurde beschrieben, dass bei dem S1P1-Rezeptor die hydrophobe Wechselwirkung zwischen dem Sphingolipid-Gerüst und dem Rezeptor von großer Bedeutung ist. Es zeigte sich, dass die hydrophobe Tasche des Rezeptors schmal und lang ist, sodass Phosphosphingolipide mit kürzeren oder cyclischen Resten weniger Affinität zeigten.<sup>[77]</sup> In Anlehnung an diese Studie, wäre denkbar, dass *cis*-4-Methylsphingosin-Derivate mit cyclischen Resten nicht nur eine höhere Akkumulation in der Zelle aufweisen, sondern auch eine selektivere Bindungsaffinität z. B. zum S1P1-Rezeptor besitzen könnten. Die ersten Arbeiten hierfür wurden in der Gruppe von C. Arenz bereits durchgeführt (**Abbildung 5-1**).



**Abbildung 5-1:** Anvisierte *cis*-4-Methylsphingosin-Derivate, die für die SAR-Studien erforderlich sind.

Um die spezifische Adressierung der S1P-Rezeptoren und die in den Sphingolipid-Metabolismus involvierten Enzyme auf diesem Wege vollständig verstehen zu können, bedarf es gewiss weiterer Sphingolipid-basierter Analoga. Die Analyse der neuartigen Verbindungen soll in Bezug auf ihre Phosphorylierung mittels Sphingosinkinasen, ihre Spaltung mittels der S1P-Lyase oder den Phosphatasen und ihre Bindung an die S1P-Rezeptoren erfolgen. Erst nach dem Vergleich jedes einzelnen Aspekts ist die Bewertung der biologischen Aktivität möglich.

Schließlich könnten die neuen Sphingosin-Derivate in den *in vitro* Studien ihre biologische Wirksamkeit, z. B. bei den pathophysiologischen Stoffwechselwegen, in die die Sphingolipide involviert sind, demonstrieren.



---

## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Methoden

#### 6.1.1 Lösungsmittel und Reagenzien

Kommerziell erworbene Chemikalien der Firmen *Sigma-Aldrich/Fluka* (Taufkirchen, Deutschland), *Acros* (Geel, Belgien), *Iris Biotech GmbH* (Marktrechwitz, Deutschland), *TCI* (Tokyo, Japan), *Alfa Aesar* (Karlsruhe, Deutschland), *J.T.Baker* (Center Valley, USA), *ABCR* (Karlsruhe, Deutschland) und *Merck* (Darmstadt, Deutschland) wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die NBD-markierte Fettsäure wurde durch M. Sc. Essa M. Saied synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Lösungsmittel für die Säulenchromatographie und zur Extraktion waren von technischer Qualität, wurden mittels Destillation gereinigt und gegebenenfalls nach Standardverfahren getrocknet. Die wasserfreien Lösungsmittel wurden aus einem *solvent purification system SPS 800* von *MBraun* (Garching, Deutschland) entnommen und in ausgeheizten Glasgefäßen über ein 4 Å Molekularsieb gelagert. Alle Reaktionen mit feuchtigkeits- oder sauerstoffempfindlichen Substanzen wurden in ausgeheizten Glasgeräten unter einer Argon-Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Alle lichtempfindlichen Reaktionen wurden unter Lichtausschluss durchgeführt. Das Millipore-Wasser wurde der *Astacus Life Science* Wasserreinigungsanlage von *membraPure* (Hennigsdorf, Deutschland) entnommen.

#### 6.1.2 Chromatographische Methoden

**Dünnschichtchromatographie:** Für dünnschichtchromatographische Analysen wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumplatten der Firma *Merck* (Typ 60-F<sub>254</sub>, Schichtdicke 0.2 mm, Darmstadt, Deutschland) sowie der Firma *VWR* (Darmstadt, Deutschland) (Typ RP<sub>18</sub>-F<sub>254S</sub>) verwendet. Angegeben sind R<sub>F</sub>-Werte (Laufhöhe relativ zur Laufmittelfront). Zur Detektion UV-aktiver Substanzen wurde die Wellenlänge  $\lambda = 254$  nm verwendet. Die nicht UV-aktiven Verbindungen wurden durch das Anfärben mit Anfärbereagenzien und durch das anschließende Erhitzen mittels Heizluftpistole sichtbar gemacht. Es wurden folgende Anfärbereagenzien verwendet: Ninhydrin-Lösung (1.0 g Ninhydrin, 125.0 mL absoluter EtOH); Seebach-Lösung (25.0 g Molybdophosphorsäure, 10.0 g Cer<sup>IV</sup>-sulfat-tetrahydrat

60.0 mL konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 905.0 mL destilliertes Wasser) und Vanillin-Lösung (3.0 g Vanillin, 100.0 mL absoluter EtOH, 0.5 mL konzentrierte  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).

**Säulenchromatographie:** Säulenchromatographische Trennungen wurden bei erhöhtem Druck (Flash-Chromatographie) an stationären Phasen wie Kieselgel 60 M der Firma *Macherey-Nagel* (Dürren, Deutschland) (Korngröße 0.04-0.063 mm) und vorgepackten RP18 Chromabond®-Säulen durchgeführt. Für die mobile Phase wurden destillierte organische Lösungsmittel und verschiedene Lösungsmittelgemische verwendet.

### 6.1.3 Verwendete Messgeräte

**Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR):** Die Spektren wurden in der Serviceabteilung von den Mitarbeitern Dipl.-Ing. Angela Thiesies und Katharina Pfaff aufgenommen. Die  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -,  $^{13}\text{C}$  APT-, CHCOSY- und  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren wurden mit den Spektrometern der Typen *Bruker* (Karlsruhe, Deutschland) *AV 300*, *AVANCE II 400*, *AVANCE III 500* und *AVANCE 600* aufgenommen. Die Kohlenstoff-Spektren wurden protonenbreitbandentkoppelt gemessen. Die chemischen Verschiebungen sind in Einheiten der  $\delta$ -Skala (ppm = parts per million) angegeben und auf das Restprotonensignal des verwendeten deuterierten Lösungsmittels ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{SO}(\text{CD}_3)_2$ ) normiert. Zur Kennzeichnung der Multiplizität der Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), br s (breites Signal), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett); p (Pentett); dd (Dublett von Dublett); ddd (Dublett von Dublett von Dublett); td (Triplet von Dublett); dt (Dublett von Triplet); dq (Dublett von Quartett); tt (Triplet von Triplet); tq (Triplet von Quartett); qd (Quartett von Dublett), dtd (Dublett von Triplet von Dublett), tdd (Triplet von Dublett von Dublett), qdd (Quartett von Dublett von Dublett) und m (Multiplet). Die Kopplungskonstanten  $J$  sind in Hertz (Hz) angegeben.

**Massenspektrometrie:** Die hochaufgelösten Massenspektren wurden in der Serviceabteilung von Angelika Woyda auf dem Massenspektrometer *LTQ FT Ultra* von *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, USA) aufgenommen. Zur Ionenerzeugung wurde Elektrospray-Ionisation (ESI) bei positiver bzw. negativer Spannung verwendet.

Zur Messung mittels Elektronenstoß-Ionisation (EI) wurde das *Massenspektrometer MSI Concept 1H* von *AMD Intectra* (Harpstedt, Deutschland) verwendet. Die Ionisationsenergie betrug 70 eV. Das Molekülion  $[\text{M}]$  wurde bei der ESI in Form der Quasi-Molekülionen  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $[\text{M}+\text{K}]^+$ ,  $[\text{M}+\text{Ca}]^+$ ,  $[\text{M}+\text{Li}]^+$ ,  $[\text{M}-\text{H}]^-$  und  $[\text{M}-\text{Cl}]^-$  detektiert und angegeben.

**Drehwert-Messung:** Die Drehwerte wurden am *DIP-370 DIGITAL POLARIMETER* von *JASCO* (Gross-Umstadt, Deutschland) bei der Wellenlänge von  $\lambda = 589 \text{ nm}$  und Raumtemperatur gemessen. Für die Konzentration gilt:  $c = 1.0 = 10 \text{ mg/ml}$ .

**Zentrifuge:** Die Abtrennung der Feststoffe aus Suspensionen erfolgte mittels der *Megafuge 1.0R* von *Heraeus* (Newport Pagnell, England).

#### 6.1.4 Aufnahme des Ceramids in *C. trachomatis*-infizierten HeLa229-Zellen

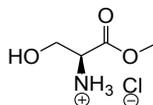
Die Anwendung des Assays zuzüglich der Vorbereitung der Zellen, der Infektion und der anschließenden Messung der Fluoreszenz wurde von Sophia Edelman aus der Gruppe um D. Heuer am Robert-Koch-Institut (Berlin, Deutschland) in Anlehnung an Ref.<sup>[110]</sup> durchgeführt.

**Zellkultur:** HeLa229 Gebärmutterhalskrebszellen (ATCC: CCL-2.1) wurden im RPMI 1640-Zellkulturmedium (*Gibco, Thermo Fisher Scientific*, Waltham, USA) ergänzt mit 10 % (v/v) durch Hitze inaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS, *Biochrom GmbH*, Berlin, Deutschland), 1 mM Natriumpyruvat (*Invitrogen, Thermo Fisher Scientific*, Waltham, USA) und 5 mM L-Glutamin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> (v/v) gezüchtet. *Chlamydia trachomatis lymphogranuloma venereum* des Biovar-Stammes L2/434/Bu (ATCC: VR-902B) wurden vermehrt.

**Infektion:** HeLa229-Zellen wurden im 8-Well- $\mu$ -Mikroskopie-Objektträger (*ibidi*, Planegg/Martinsried, Deutschland) verteilt und bis 80-90 % Konfluenz gezüchtet. Die Infektion wurde im Dulbecco-modifizierten Eagle-Medium (DMEM, *Gibco, Thermo Fisher Scientific*, Waltham, USA) mit Glucose (4.5 g/L) ergänzt mit 5 % (v/v) durch Hitze inaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS, *Biochrom GmbH*, Berlin, Deutschland), 1 mM Natriumpyruvat und 5 mM L-Glutamin (Infektionsmedium) durchgeführt. Die Stammlösung chlamydialer Elementarkörper wurde mit dem Infektionsmedium so verdünnt, dass die entsprechende Infektionsmultiplizität MOI = 1 betrug. Die Zellen wurden mit dem Infektionsmedium gewaschen, gleichmäßig mit Inokulum (150  $\mu$ L/Well) versetzt und bei 35 °C, 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach zwei Stunden Inkubation wurden die Zellen nochmals mit dem Infektionsmedium gewaschen und mit 300  $\mu$ L des frischen Infektionsmediums bei 35 °C inkubiert.

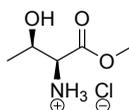
**Fluoreszenzmessung:** Nach 24 h der Infektion wurden die Zellen fixiert und mit dem Infektionsmedium, welches 10  $\mu$ M des fluoreszenz-markierten Ceramids enthielt, versetzt. Die Aufnahmen und die Verteilung der NBD-Fluoreszenz wurden nach 120 min, 180 min und 24 h mittels des konfokalen LSM 780 Laser-Scanning-Mikroskops (*Carl Zeiss*, Oberkochen, Deutschland; Anregung  $\lambda$  = 458 nm, Emission  $\lambda$  = 482-696 nm) gemessen. Die Messung wurde in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

## 6.2 Synthesevorschriften

6.2.1 Synthese von *Garner*-Aldehyden**(S)-Methyl-2-amino-3-hydroxypropanoat-hydrochlorid (16):**

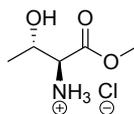
L-Serin (3.0 g, 28.55 mmol, 1 Äq.) wurde in MeOH (30.0 mL) suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Zu der Suspension wurde Thionylchlorid (2.1 mL, 28.55 mmol, 1 Äq.) langsam hinzuge tropft, die Reaktion eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und über Nacht stehen gelassen. Nach dem Entfernen der flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck wurde **16** (4.4 g, 28.55 mmol, **quantitativ**) als weißer Feststoff erhalten.

$R_f$  (EtOAc:MeOH 1:1) = 0.54.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 500.1 MHz)  $\delta$  [ppm] = 3.82 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.93 (ddd,  $J_1 = 15.2$  Hz,  $J_2 = 11.8$  Hz,  $J_3 = 4.0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -1); 4.10 (dd,  $J_1 = 4.5$  Hz,  $J_2 = 3.5$  Hz, 1H,  $\text{CH}$ -2).  $^{13}\text{C APT NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 125.8 MHz)  $\delta$  [ppm] = 53.6 ( $\text{OCH}_3$ ); 56.0 ( $\text{CH}$ -2); 60.6 ( $\text{CH}_2$ -1); 169.3 ( $\text{COO}$ ). **MS ESI** [ $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3$ ] cal.  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 120.0$ , gef. 120.1.

**(2S,3R)-Methyl-2-amino-3-hydroxybutanoat-hydrochlorid (17):**

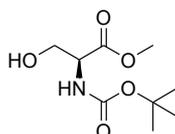
Acetylchlorid (2.4 mL, 33.56 mmol, 2 Äq.) wurde tropfenweise zum eiskalten MeOH (10.6 mL) hinzugegeben. Nach der anschließenden Zugabe von L-Threonin (2.0 g, 16.78 mmol, 1 Äq.) wurde die Reaktion bei 50 °C für 5.5 h und daraufhin bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Zuletzt wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck eingengt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (2.85 g, 16.80 mmol, **quantitativ**) erhalten und ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt.

$R_f$  (EtOAc:MeOH 1:1) = 0.43.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300.1 MHz)  $\delta$  [ppm] = 1.03 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ -1); 3.51 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H,  $\text{CH}$ -2); 3.54 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.94 (dq,  $J_1 = 6.4$  Hz,  $J_2 = 6.4$  Hz,  $J_3 = 6.4$  Hz,  $J_4 = 4.6$  Hz, 1H,  $\text{CH}$ -1).  $^{13}\text{C APT NMR}$  ( $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$ ; 75.5 MHz)  $\delta$  [ppm] = 19.2 ( $\text{CH}_3$ -1); 58.2 ( $\text{OCH}_3$ ); 53.6 ( $\text{CH}$ -2); 64.7 ( $\text{CH}$ -1); 167.7 ( $\text{COO}$ ).

**(2S,3S)-Methyl-2-amino-3-hydroxybutanoat-hydrochlorid (18):**

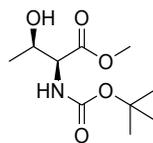
L-*allo*-Threonin (307 mg, 2.58 mmol, 1 Äq.) wurde nach der gleichen Vorschrift wie bei **17** umgesetzt. Das Produkt **18** wurde (437 mg, 2.58 mmol, **quantitativ**) als ein weißer Schaum erhalten und ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt.

$R_f$  (MeOH:EtOAc 1:1) = 0.43.

**tert-Butyl-(S)-1-(methoxycarbonyl)-2-hydroxyethylcarbammat (19):**

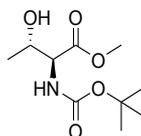
Zu einer Lösung aus **16** (4.46 g, 28.67 mmol, 1 Äq.) in MeCN (81.0 mL) wurden Di-*tert*-butyl-dicarbonat (6.26 g, 28.67 mmol, 1 Äq.) und NEt<sub>3</sub> (11.7 mL, 84.86 mmol, 2.96 Äq.) bei Raumtemperatur hinzugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht gerührt und die Lösung anschließend mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200.0 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde mit 1 M HCl (122.0 mL) und gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (82.0 mL) gewaschen, über Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan:EtOAc 1:1) gereinigt. Es wurde **19** (5.60 g, 25.54 mmol, **89 %**) als leicht gelbliches Öl erhalten.

$R_f$  (EtOAc:Cyclohexan 1:1) = 0.44. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>; 300.1 MHz) δ [ppm] = 1.44 (s, 3H, Boc-CH<sub>3</sub>); 2.59 (bs, 1H, OH); 3.77 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.91 (dq,  $J_1 = 3.7$  Hz,  $J_2 = 11.2$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-1); 4.31-4.42 (m, 1H, CH-2); 5.44-5.58 (bs, 1H, NH). <sup>13</sup>C APT NMR (CDCl<sub>3</sub>; 75.5 MHz) δ [ppm] = 28.4 (Boc-CH<sub>3</sub>); 52.7 (OCH<sub>3</sub>); 55.8 (CH-2); 63.6 (CH<sub>2</sub>-1); 80.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 155.9 (Boc-COO); 171.4 (COOMe). Im NMR sind die Signale des Lösungsmittels EtOAc zu erkennen.  $[\alpha]_D^{30} = +13.9$  (c 1.5, CHCl<sub>3</sub>) {Ref. <sup>[232]</sup>  $[\alpha]^{25} +13.3$  (c 1.5)}. HRMS ESI [C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub>] cal. [M+H]<sup>+</sup>  $m/z = 220.1179$ , gef. 220.1181; cal. [M+H]<sup>-</sup>  $m/z = 218.1034$ , gef. 218.1033.

**tert-Butyl-(1S,2R)-1-(methoxycarbonyl)-2-hydroxypropylcarbamate (20):**

Die Verbindung **17** (2.85 g, 16.8 mmol, 1.05 Äq.) wurde in trockenem MeOH (0.18 mL) gelöst, anschließend wurde trockenes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10.4 mL) hinzugegeben. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und es wurden Triethylamin (2.75 mL, 20.05 mmol, 1.25 Äq.) sowie Di-*tert*-butyl-dicarbonat (3.5 g, 16.04 mmol, 1 Äq.) hinzugegeben. Daraufhin wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde dann durch die Zugabe von 1 M Zitronensäure-Lösung (3x3.5 mL) gestoppt und die organische Phase mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Nach der chromatographischen Aufreinigung (Kieselgel, MeOH:EtOAc 1:9) wurde das Produkt **20** (3.72 g, 15.9 mmol, **95 %**) als gelbliches Öl erhalten.

$R_f$  (EtOAc:MeOH 1:1) = 0.91. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>; 500.1 MHz) δ [ppm] = 1.18 (d,  $J$  = 4.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-1); 1.39 (s, 9H, Boc-CH<sub>3</sub>); 2.98 (br s, 1H, OH); 3.70-3.71 (m, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4.18 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, CH-2); 4.24 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 1H, CH-1); 5.47 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H, NH). <sup>13</sup>C APT NMR (CDCl<sub>3</sub>; 125.8 MHz) δ [ppm] = 19.4 (CH<sub>3</sub>-1); 27.8 (Boc-CH<sub>3</sub>); 52.0 (OCH<sub>3</sub>); 58.4 (CH-2); 67.5 (CH-1); 155.8 (Boc-COO); 171.7 (COOCH<sub>3</sub>).  $[\alpha]_D^{26} = -7.3^\circ$  (c 0.75, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) {Ref.<sup>[233]</sup>  $[\alpha]^{21} = -8.77^\circ$ , c 0.75}. HRMS ESI [C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>] cal. [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  = 234.1336, gef. 234.1336; cal. [M+Na]<sup>+</sup>  $m/z$  = 256.1155, gef. 256.1157.

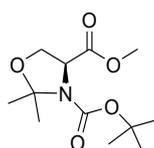
**tert-Butyl-(1S,2S)-1-(methoxycarbonyl)-2-hydroxypropylcarbamate (21):**

Der Ester **18** (437 mg, 2.58 mmol, 1 Äq.) wurde nach der gleichen Vorschrift wie bei **20** umgesetzt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, MeOH: EtOAc 1:9) gereinigt. Es wurde **21** (528 mg, 2.26 mmol, **88 %**) als farbloses Öl erhalten.

$R_f$  (MeOH:EtOAc 1:1) = 0.86. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD; 500.1 Hz) δ [ppm] = 1.48 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-1); 1.69 (s, 9H, Boc-CH<sub>3</sub>); 4.01 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4.27 (td,  $J_1$  = 10.9 Hz,  $J_2$  = 5.4 Hz, 1H, CH-1); 4.44 (d,  $J$  = 4.0 Hz, 1H, CH-2). <sup>13</sup>C APT NMR (CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD; 125.8 Hz) δ [ppm] = 19.5 (CH<sub>3</sub>-1); 28.6 (Boc-CH<sub>3</sub>); 52.5 (OCH<sub>3</sub>); 60.1 (CH-1); 68.6 (CH-2);

80.7 ( $C(CH_3)_3$ ); 156.90 (Boc-CO); 172.2 ( $COOCH_3$ ). Im NMR sind die Signale des Lösungsmittels EtOAc zu erkennen. **HRMS ESI** [ $C_{10}H_{19}NO_5$ ] cal.  $[M+H]^+$   $m/z$  = 234.1336, gef. 234.1338; cal.  $[M+Na]^+$   $m/z$  = 256.1155, gef. 256.1156.

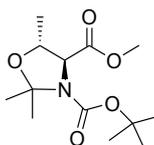
**(S)-3-tert-Butyl-4-methyl-2,2-dimethyloxazolidin-3,4-dicarboxylat (22):**



Die Verbindung **19** (1.90 g, 8.66 mmol, 1 Äq.) wurde in trockenem  $CH_2Cl_2$  (7.3 mL) gelöst, anschließend wurden 2,2-Dimethoxypropan (2.12 mL, 17.33 mmol, 2 Äq.) sowie Bortrifluorid-dietherat (52  $\mu$ L, 0.04 mmol, 5 mol-%) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 20 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit gesättigter NaCl-Lösung (6.5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde 1.5 h über  $Na_2SO_4$  getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan/EtOAc 1:1) gereinigt und das Produkt **22** (1.58 g, 6.09 mmol, **70 %**) als ein gelbliches Öl erhalten.

$R_f$  (EtOAc:Cyclohexan 1:1) = 0.44.  $^1H$  NMR ( $CD_3OD$ ; 300.1 MHz)  $\delta$  [ppm] = 1.38 (s, 6H, Boc- $CH_3$ ); 1.46-1.47 (m, 6H, Boc- $CH_3$  und Oxazolidin- $CH_3$ ); 1.58 (s, 3H, Oxazolidin- $CH_3$ ); 3.71-3.72 (m, 3H,  $OCH_3$ ); 3.97 (ddd,  $J_1$  = 9.2 Hz,  $J_2$  = 6.2 Hz,  $J_3$  = 2.7 Hz, 1H,  $CH_{2a-1}$ ); 4.16 (dd,  $J_1$  = 9.3 Hz,  $J_2$  = 7.0 Hz, 1H,  $CH_{2b-1}$ ); 4.41 (dt,  $J_1$  = 6.7 Hz,  $J_2$  = 2.7 Hz, 1H, CH-2).  $^{13}C$  APT NMR ( $CD_3OD$ ; 75.5 MHz)  $\delta$  [ppm] = 24.5/25.4/26.5 (Oxazolidin- $CH_3$ ); 28.6/28.7 (Boc- $CH_3$ ); 52.9 ( $OCH_3$ ); 60.6 (CH-2); 67.1/67.3 ( $CH_2-1$ ); 81.7 ( $C(CH_3)_3$ ).  $[\alpha]^{30}_D$  = -46.1° (c 1.14,  $CHCl_3$ ) {Ref.<sup>[234]</sup>  $[\alpha]^{25}$  -51.4°, c 1.12}. **HRMS ESI** [ $C_{12}H_{21}NO_5$ ] cal.  $[M+H]^+$   $m/z$  = 260.1492, gef. 260.1493; cal.  $[M+Na]^+$   $m/z$  = 282.1312, gef. 282.1311.

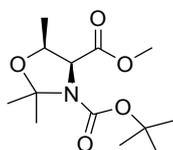
**(4S,5R)-3-tert-Butyl-4-methyl-2,2,5-trimethyloxazolidin-3,4-dicarboxylat (23):**



Der Ester **20** (3.26 g, 13.98 mmol, 1 Äq.) wurde nach der gleichen Vorschrift wie bei **22** umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan/EtOAc 1:1) gereinigt. Das Produkt **23** (2.95 g, 10.79 mmol, **77 %**) wurde als ein gelbes Öl erhalten.

$R_f$  (Cyclohexan/EtOAc 1:1) = 0.89.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300.1 MHz)  $\delta$  [ppm] = 1.37-1.38 (m, 9H, Boc- $\text{CH}_3$  und  $\text{CH}_3$ -1); 1.55-1.57 (m, 3H, Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 1.61-1.63 (m, 3H, Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 3.75 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.89 (d,  $J = 7.9$  Hz, 0.6H,  $\text{CH}$ -2)/3.97 (d,  $J = 7.7$  Hz, 0.3H,  $\text{CH}$ -2); 4.13 (qd,  $J_1 = 12.2$  Hz,  $J_2 = 6.2$  Hz,  $J_3 = 6.2$  Hz,  $J_4 = 6.1$  Hz, 1H,  $\text{CH}$ -1).  $^{13}\text{C APT NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 75.5 MHz)  $\delta$  [ppm] = 18.2 ( $\text{CH}_3$ -1); 23.4/24.2/25.9 (Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 27.1/27.6/27.7 (Boc- $\text{CH}_3$ ); 51.6 ( $\text{OCH}_3$ ); 65.4/65.6 ( $\text{CH}$ -2); 72.9/73.2 ( $\text{CH}$ -1).  $[\alpha]_D^{28} = -52.5^\circ$  (c 1.00, EtOH) {Ref.<sup>[19]</sup>  $[\alpha] = -52^\circ$ , c 1.00}. **HRMS ESI** [ $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ ] cal.  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 274.1649$ , gef. 274.1651; cal.  $[\text{M}+\text{Na}]^+ m/z = 256.1468$ , gef. 256.1468.

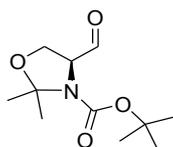
**(4S,5S)-3-tert-Butyl-4-methyl-2,2,5-trimethyloxazolidin-3,4-dicarboxylat (24):**



Der Ester **21** (514 mg, 2.21 mmol, 1 Äq.) wurde nach der gleichen Vorschrift wie bei **22** umgesetzt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan: EtOAc 4:1  $\rightarrow$  1:1) gereinigt. Es wurde **24** (542 mg, 1.98 mmol, **90 %**) als gelbliches Öl erhalten.

$R_f$  (Cyclohexan:EtOAc 1:1) = 0.85.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 500.1 Hz)  $\delta$  [ppm] = 1.16 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ -1); 1.38 (s, 6H, 2xBoc- $\text{CH}_3$ ); 1.46-1.49 (m, 6H, Oxazolidin- $\text{CH}_3$  und Boc- $\text{CH}_3$ ); 1.64 (s, 3H, Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 3.71-3.72 (m, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 4.32 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1H,  $\text{CH}$ -2)/4.33 (d,  $J = 6.3$  Hz, 1H,  $\text{CH}$ -2); 4.44 (tq,  $J_1 = 11.9$  Hz,  $J_2 = 5.8$  Hz, 1H,  $\text{CH}$ -1).  $^{13}\text{C APT NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 125.8 Hz)  $\delta$  [ppm] = 15.9 ( $\text{CH}_3$ -1); 24.5/25.3 (Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 25.9/25.1 (Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 28.6/28.7 (Boc- $\text{CH}_3$ ); 52.4 ( $\text{OCH}_3$ ); 64.7/64.9 ( $\text{CH}$ -2); 72.6/72.9 ( $\text{CH}$ -1); 81.6/82.4 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 95.2/95.2 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ); 152.9/153.8 (Boc-CO); 172.3 (COOMe). **HRMS ESI** [ $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{O}_5\text{N}$ ] cal.  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 274.1649$ , gef. 274.1651; cal.  $[\text{M}+\text{Na}]^+ m/z = 296.1468$ , gef. 296.1470.

**(S)-tert-Butyl-4-formyl-2,2-dimethyloxazolidin-3-carboxylat (25):**

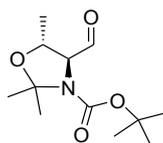


Zu einer Lösung aus **22** (2.90 g, 11.18 mmol, 1 Äq.) in trockenem Toluol (20.0 mL) wurde bei  $-78^\circ\text{C}$  langsam Diisobutylaluminiumhydrid (15.8 mL, 19.01 mmol, 1.2 M in Toluol,

1.7 Äq.) hinzugegeben, sodass die Temperatur -76 °C nicht überstieg. Nach 2.5 h Rühren bei -80 °C wurde die Reaktion durch die Zugabe von -78 °C kaltem Methanol (4.5 mL) gestoppt, sodass die Temperatur -62 °C nicht überstieg. Zu der resultierenden weißen Emulsion wurde eiskalte 1 M HCl (67.8 mL) hinzugegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan/EtOAc 20:1 → 4:1) gereinigt. Es wurde **25** (1.95 g, 8.51 mmol, **76 %**) als farbloses Öl erhalten.

**R<sub>f</sub>** (EtOAc:Cyclohexan 1:2.5) = 0.59. **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 500.1 MHz) δ [ppm] = 1.38 (s, 5H, Boc-CH<sub>3</sub>); 1.46 (s, 6H, Boc-CH<sub>3</sub> und Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 1.51 (s, 2H, Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 1.60 (s, 2H, Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 3.99-3.98 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-1); 4.14 (dd, *J*<sub>1</sub> = 6.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.7 Hz, 0.6H, CH-2)/4.29 (dd, *J*<sub>1</sub> = 4.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.6 Hz, 0.4H, CH-2); 9.50 (d, *J* = 2.5 Hz, 0.5H, CHO)/9.56 (d, *J* = 1.3 Hz, 0.4H, CHO). **<sup>13</sup>C APT NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 125.8 MHz) δ [ppm] = 23.8/25.8/26.7 (Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 28.4 (Boc-CH<sub>3</sub>); 63.5/63.9 (CH-2); 64.7 (CH<sub>2</sub>-1); 81.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 199.5 (CHO). Im NMR ist das Signal von Wasser aus dem Lösungsmittel zu erkennen. **[α]<sup>30</sup><sub>D</sub>** = -109.2 °(c 1.34, CHCl<sub>3</sub>) {Ref.<sup>[179]</sup> [α] -91.7 °, c 1.34}. **HRMS ESI** [C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>] cal. [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 230.1387, gef. 230.1388; cal. [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* = 252.1206, gef. 252.1206.

**(S)-tert-Butyl-4-formyl-2,2-dimethyloxazolidin-3-carboxylat (26):**

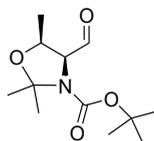


Der Ester **23** (2.80 g, 10.24 mmol, 1 Äq.) wurde nach der gleichen Vorschrift wie bei **25** umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan/EtOAc 20:1 → 4:1) gereinigt. Es wurde **26** (2.15 g, 8.84 mmol, **86 %**) als farbloses Öl erhalten.

**R<sub>f</sub>** (EtOAc:Cyclohexan 1:2.5) = 0.65. **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 300.1 MHz) δ [ppm] = 1.35 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-1); 1.41-1.49 (m, 9H, Boc-CH<sub>3</sub>); 1.56-1.64 (m, 6H, 2xOxazolidin-CH<sub>3</sub>); 3.69 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.3 Hz, 0.5H, CH-2)/3.79 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 3.6 Hz, 0.4H, CH-2); 4.05 (qd, *J*<sub>1</sub> = 8.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.0 Hz, *J*<sub>3</sub> = 6.0 Hz, *J*<sub>4</sub> = 6.0 Hz, 1H, CH-1); 9.37 (d, *J* = 4.3 Hz, 0.5H, CHO)/9.44 (d, *J* = 3.8 Hz, 0.3H, CHO). **<sup>13</sup>C APT NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 75.5 MHz) δ [ppm] = 17.4 (CH<sub>3</sub>-1); 24.8 (Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 25.9 (Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 27.9/28.0 (Boc-CH<sub>3</sub>); 69.8 (CH-2); 70.8 (CH-1); 197.3 (CHO). **[α]<sup>30</sup><sub>D</sub>** = -60.2°(c 1.25, CHCl<sub>3</sub>) {Ref.<sup>[179]</sup> [α] -65.8°,

c 1.66}. **HRMS ESI** [ $C_{12}H_{12}NO_4$ ] cal.  $[M+H]^+ m/z = 244.1543$ , gef. 244.1544; cal.  $[M+Na]^+ m/z = 266.1363$ , gef. 266.1364.

**(4S,5S)-tert-Butyl-4-formyl-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylat (27):**

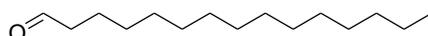


Der Ester **24** (495 mg, 1.81 mmol, 1 Äq.) wurde nach der gleichen Vorschrift wie bei **25** umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan/EtOAc 20:1 → 4:1) gereinigt. Es wurde **27** (251 mg, 1.03 mmol, **57 %**, verunreinigt durch 16 % Ester) als farblose ölige Flüssigkeit erhalten.

$R_f$  (Cyclohexan:EtOAc 2.5:1) = 0.58.  **$^1H$  NMR** ( $CD_3OD$ ; 500.1 Hz)  $\delta$  [ppm] = 1.29 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H,  $CH_3-1$ ); 1.39 (s, 6H, 2xBoc- $CH_3$ ); 1.48-1.49 (m, 3H, Boc- $CH_3$ ); 1.52-1.57 (m, 3H, Oxazolidin- $CH_3$ ); 1.68-1.73 (m, 3H, Oxazolidin- $CH_3$ ); 4.04 (dd,  $J_1 = 6.8$  Hz,  $J_2 = 3.8$  Hz, 0.6H,  $CH-2$ )/4.20 (dd,  $J_1 = 6.6$  Hz,  $J_2 = 3.2$  Hz, 0.4H,  $CH-2$ ); 4.40 (dt,  $J_1 = 12.6$  Hz,  $J_2 = 6.3$  Hz, 1H,  $CH-1$ ); 9.53 (d,  $J = 3.6$  Hz, 0.5H,  $CHO$ )/9.58 (d,  $J = 3.0$  Hz, 0.3H,  $CHO$ ).  **$^{13}C$  APT NMR** ( $CD_3OD$ , 125.8 Hz)  $\delta$  [ppm] = 15.2/15.5 ( $CH_3-1$ ); 23.8/24.7 (Oxazolidin- $CH_3$ ); 26.7/27.5 (Oxazolidin- $CH_3$ ); 28.2/28.3 (Boc- $CH_3$ ); 67.9/67.9 ( $CH-2$ ); 71.9/72.3 ( $CH-1$ ); 80.8 (Boc-C); 94.4 ( $C(CH_3)_3$ ); 151.4 (Boc-CO); 200.5/200.7 ( $CHO$ ). **HRMS ESI** [ $C_{12}H_{21}O_4N$ ] cal.  $[M+H]^+ m/z = 244.1543$ , gef. 244.1545; cal.  $[M+Na]^+ m/z = 266.1363$ , gef. 266.1365.

## 6.2.2 Synthese von (Z)-2-Bromohexadec-2-en 31

### 1-Pentadecanal (28):

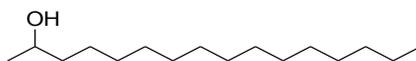


1-Pentadecanol (500 mg, 2.19 mmol, 1 Äq.) wurde in einem 50 mL Kolben mit Acetonitril (2.20 mL) versetzt. Zu der Suspension wurden Tetrakisacetonitril-kupfer<sup>I</sup>-triflat (41 mg, 0.11 mmol, 5 mol-%), Bipyridin (17 mg, 0.11 mmol, 5 mol-%), 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl (17 mg, 0.11 mmol, 5 mol-%) und *N*-Methylimidazol (17 mL, 0.22 mmol, 10 mol-%), jeweils gelöst in Acetonitril (2.20 mL), hinzugefügt. Die dunkelbraune Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur 22.5 h unter Luftzufuhr gerührt, bis die Farbe sich zu hellblau änderte. Die Reaktionssuspension wurde über Kieselgel mit Acetonitril und anschließend mit  $CH_2Cl_2$  filtriert. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingedunstet.

und säulenchromatographisch (Kieselgel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Et<sub>2</sub>O 95:5) gereinigt. Das Produkt **28** (459 mg, 2.03 mmol, **93 %**) wurde als ein weißer Feststoff erhalten.

**R<sub>f</sub>** (100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 0.74. **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 500.1 MHz): δ [ppm] = 0.87 (t, *J*<sub>1</sub> = 6.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.20-1.32 (m, 22H, 11xCH<sub>2</sub>); 1.58-1.64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2.40 (dt, *J*<sub>1</sub> = 7.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.4 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>); 9.75 (t, *J*<sub>1</sub> = 1.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.9 Hz, 1H, CHO). **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 125.8 MHz): δ [ppm] = 13.7 (CH<sub>3</sub>); 21.6 (CH<sub>2</sub>); 22.2 (CH<sub>2</sub>); 28.7 (CH<sub>2</sub>); 28.9 (CH<sub>2</sub>); 29.1 (CH<sub>2</sub>); 29.2 (CH<sub>2</sub>); 31.5 (CH<sub>2</sub>); 43.5 (CH<sub>2</sub>); 202.5 (CHO). **HRMS EI** [C<sub>15</sub>H<sub>30</sub><sup>16</sup>O] cal. [M] *m/z* = 226.2297, gef. 226.22969.

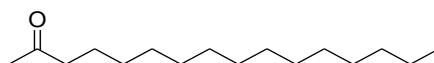
### 2-Hexadecanol (**29**):



Zu einer Lösung aus **28** (356 mg, 1.57 mmol, 1 Äq.) in Diethylether (6.0 mL) wurde bei 0 °C Methylmagnesiumbromid (0.63 mL, 1.88 mmol, 1.2 Äq.) hinzuge tropft. Die Mischung wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion anschließend durch die Zugabe von gesättigter NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (8.0 mL) gestoppt. Die Emulsion wurde in Diethylether (30.0 mL) aufgenommen und die organische Phase abgetrennt, mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan:EtOAc 4:1) gereinigt. Als Produkt **29** (340 mg, 1.48 mmol, **94 %**) wurde ein weißer Feststoff erhalten.

**R<sub>f</sub>** (Cyclohexan/EtOAc 4:1) = 0.52. **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 500.1 MHz): δ [ppm] = 0.88 (t, *J*<sub>1</sub> = 6.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.18 (d, *J* = 6.2 Hz; 3H, CH<sub>3</sub>CHOH); 1.22-1.33 (m, 24H, 12xCH<sub>2</sub>); 1.37-1.47 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.76-3.84 (m, 1H, CHOH). **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 125.8 MHz): δ [ppm] = 14.1 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 22.7 (CH<sub>3</sub>); 23.5 (CH<sub>2</sub>); 25.8 (CH<sub>2</sub>); 29.4 (CH<sub>2</sub>); 29.6 (CH<sub>2</sub>); 31.9 (CH<sub>2</sub>); 39.4 (CH); 68.2 (CHOH). **HRMS ESI** [C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>O] cal. [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* = 265.2500, gef. 265.2502.

### 2-Hexadecanon (**30**):



a) Zu einer Lösung aus **29** (402 mg, 1.65 mmol, 1 Äq.) in EtOAc (16.6 mL) wurde 2-Iodoxybenzoesäure (510 mg, 1.82 mmol, 1.1 Äq.) hinzugegeben. Die Suspension wurde für 11 h unter Rückfluss erhitzt und für weitere 91 h bei Raumtemperatur gerührt. Aufgrund

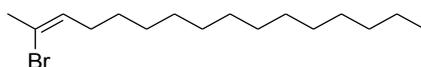
des unvollständigen Umsatzes wurde 2-Iodoxybenzoesäure (232 mg, 0.83 mmol, 0.5 Äq.) erneut hinzugegeben. Die Reaktion wurde anschließend für sieben Stunden unter Rückfluss erhitzt und für weitere 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan:EtOAc 6:1 → 4:1) gereinigt. Das Produkt **30** (383 mg, 1.59 mmol, **97 %**) wurde als gelblicher Feststoff erhalten.

$R_f$  (EtOAc:Cyclohexan 1:4) = 0.65.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500.1 MHz)  $\delta$  [ppm] = 0.85 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1.18-1.32 (m, 22H,  $11 \times \text{CH}_2$ ); 1.52-1.60 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2.12 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ) 2.39 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 125.8 MHz)  $\delta$  [ppm] = 13.9 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 22.4 ( $\text{CH}_2$ ); 23.6 ( $\text{CH}_3$ ); 28.9 ( $\text{CH}_2$ ); 29.1 ( $\text{CH}_2$ ); 29.2 ( $\text{CH}_2$ ); 29.3 ( $\text{CH}_2$ ); 29.4 ( $\text{CH}_2$ ); 29.6 ( $\text{CH}_2$ ); 31.7 ( $\text{CH}_2$ ); 43.8 ( $\text{CH}_2\text{CO}$ ); 209.2 (CO). **HRMS EI** [ $\text{C}_{16}\text{H}_{32}^{16}\text{O}$ ] cal. [M]  $m/z = 240.2453$ , gef. 240.24531.

b) Die Verbindung **29** (1.11 g, 4.58 mmol, 1 Äq.) wurde in einem Gemisch aus destilliertem Wasser und THF (9.2 mL, v/v, 1:9) gelöst. Anschließend wurden KBr (54.5 mg, 0.46 mmol, 0.1 Äq.) und Oxon (1.41 g, 4.58 mmol, 1 Äq.) hinzugegeben und die gelb-orangene Mischung bei 40 °C für vier Stunden gerührt. Daraufhin wurde die Reaktion durch die Zugabe von gesättigter  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung gestoppt und mit EtOAc verdünnt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan: EtOAc 6:1) gereinigt. Das Produkt **30** (781 mg, 3.25 mmol, **71 %**) wurde als gelblicher kristalliner Feststoff erhalten.

$R_f$  (Cyclohexan:EtOAc 4:1) = 0.70.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500.1 MHz)  $\delta$  [ppm] = 0.87 (t,  $J_1 = 7.0$  Hz,  $J_2 = 7.0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1.25-1.27 (m, 22H,  $11 \times \text{CH}_2$ ); 1.54-1.57 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2.13 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ) 2.41 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 125.8 MHz)  $\delta$  [ppm] = 14.0 ( $\text{CH}_3$ ); 22.6 ( $\text{CH}_2$ ); 23.8 ( $\text{CH}_2$ ); 29.1 ( $\text{CH}_2$ ); 29.3 ( $\text{CH}_2$ ); 29.3 ( $\text{CH}_2$ ); 29.4 ( $\text{CH}_2$ ); 29.5 ( $\text{CH}_2$ ); 29.6 ( $\text{CH}_2$ ); 29.8 ( $\text{CH}_3$ ); 31.8 ( $\text{CH}_2$ ); 43.8 ( $\text{CH}_2\text{CO}$ ); 209.4 (CO). **HRMS ESI** [ $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}$ ] cal.  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 241.2526$ , gef. 241.2533; cal.  $[\text{M}+\text{Na}]^+ m/z = 263.2345$ , gef. 263.2353.

### (Z)-2-Bromohexadec-2-en (**31**):



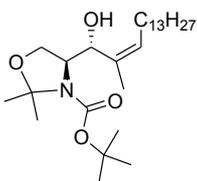
Zu einer Lösung aus **30** (439 mg, 1.84 mmol, 1 Äq.) in Methansulfonsäure (6.5 mL) wurde bei 0 °C Acetylbromid (0.7 mL, 9.39 mmol, 5 Äq.) tropfenweise hinzugegeben. Nachdem die

Mischung fünf Stunden bei 0 °C und 15 h bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde die Reaktion durch die Zugabe eiskalter 10 %-iger NaOH-Lösung (109.0 mL) gestoppt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen daraufhin mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, 100 % Cyclohexan) gereinigt. Es wurde **31** (494 mg, 1.63 mmol, **90 %**) als farbloses Öl erhalten.

$R_f$  (EtOAc:Cyclohexan 1:4) = 0.94. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 500.1 MHz)  $\delta$  [ppm] = 0.88 (t,  $J_1 = 7.0$  Hz,  $J_2 = 7.0$  Hz, 3H; CH<sub>3</sub>); 1.26-1.36 (m, 20 H, 10xCH<sub>2</sub>); 1.37-1.39 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2.11 (ddd,  $J_1 = 14.6$  Hz,  $J_2 = 7.1$  Hz,  $J_3 = 1.2$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>); 2.26 (d,  $J = 1.3$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 5.62 (dt,  $J_1 = 6.9$  Hz,  $J_2 = 6.9$  Hz,  $J_3 = 1.3$  Hz, 1H, CH). <sup>13</sup>C APT NMR (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 125.8 MHz)  $\delta$  [ppm] = 14.4 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 23.2 (CH<sub>2</sub>); 28.9 (CH<sub>2</sub>); 29.0 (CH<sub>3</sub>); 29.7 (CH<sub>2</sub>); 29.9 (CH<sub>2</sub>); 29.2 (CH<sub>2</sub>); 29.9 (CH<sub>2</sub>); 30.1 (CH<sub>2</sub>); 30.2 (CH<sub>2</sub>); 32.0 (CH<sub>2</sub>); 32.5 (CH<sub>2</sub>); 122.5 (CBr); 129.8 (CH). Im NMR-Spektrum ist eine Verunreinigung durch ein *trans*-Produkt, welches während der Messung entsteht, zu sehen. HRMS ESI [C<sub>16</sub>H<sub>31</sub><sup>79</sup>Br] cal. [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  = 303.1687, gef. 303.1690; [C<sub>16</sub>H<sub>31</sub><sup>81</sup>Br] cal. [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  = 305.1667, gef. 305.1670.

### 6.2.3 Synthese von 4-verzweigten Derivaten

#### (S)-*tert*-Butyl-4-((R,Z)-1-hydroxy-2-methylhexadec-2-enyl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-carboxylat (**32**):

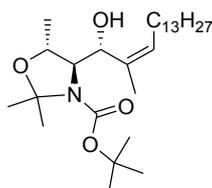


Eine Lösung aus **31** (66 mg, 0.218 mmol, 1 Äq.) in trockenem Methyltetrahydrofuran (5.0 mL) wurde in einem Kühlbad aus Methylcyclohexan und flüssigem N<sub>2</sub> auf -120 °C gekühlt und es wurde *tert*-Butyllithium (185  $\mu$ L, 0.316 mmol, 1.45 Äq., 1.7 M in Pentan) über 14 min tropfenweise hinzugegeben. Anschließend wurde die gelbe Reaktionsmischung über 32 min langsam auf -84 °C erwärmt. Daraufhin wurde zu der Reaktionslösung *N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin (0.2 mL) hinzugegeben. Die Mischung wurde weitere 10 min bei -84 °C gerührt und anschließend zu einer Lösung aus **25** (50 mg, 0.218 mmol, 1 Äq.) in Methyltetrahydrofuran (5.0 mL) bei -84 °C mittels einer wärmeisolierten Spritze über 4.5 min hinzugegeben. Die Reaktion wurde eine weitere Stunde bei derselben Temperatur gerührt und durch die Zugabe von eiskaltem destilliertem Wasser (8.0 mL) gestoppt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden daraufhin mit gesättigter

NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan: EtOAc 9:1 → 4:1) gereinigt. Es wurde **32** (22 mg, 0.048 mmol, **22 %**, **dr** = 87:13 (C3)) als farbloses Öl erhalten.

**R<sub>f</sub>** (Cyclohexan:EtOAc 5.5:1.5) = 0.51. **<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 500.1 Hz) δ [ppm] = 0.87 (t, *J*<sub>1</sub> = 6.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.9 Hz, 3H, Kette-CH<sub>3</sub>); 1.24-1.42 (m, 22H, 11xKette-CH<sub>2</sub>); 1.42-1.44 (m, 9H, Boc-CH<sub>3</sub>); 1.52-1.61 (m, 6H, Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 1.72 (br s, 3H, CH<sub>3</sub>-4); 2.01-2.08 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 3.86-3.96 (m, 2H, CH<sub>2a</sub>-1 und CH-2); 4.17 (dd, *J*<sub>1</sub> = 28.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.8 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub>-1); 4.47 (dd, *J*<sub>1</sub> = 16.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.6 Hz, 1H, CH-3); 5.21 (dd, *J*<sub>1</sub> = 18.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.3 Hz, 1H, CH-5). Im NMR-Spektrum ist eine Verunreinigung durch S-Alkohol (4.01 (d, *J* = 8.4 Hz, 0.5H, CH<sub>2a</sub>-1); 5.34 (t, *J*<sub>1</sub> = 5.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.8 Hz, 0.2H, CH-5)) und (**E**)-**32** (5.45 (0.1H)) zu erkennen. **<sup>13</sup>C APT NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 125.8 Hz) δ [ppm] = 14.5 (Kette-CH<sub>3</sub>); 18.9/20.1 (CH<sub>3</sub>-4); 23.8 (Kette-CH<sub>2</sub>); 24.9/27.4/27.9/28.2 (Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 28.7/28.8/28.9 (Boc-CH<sub>3</sub>); 29.3 (Kette-CH<sub>2</sub>-6); 30.5 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.6 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.7 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.8 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.8 (Kette-CH<sub>2</sub>); 33.1 (Kette-CH<sub>2</sub>-7); 60.2/60.7/60.8/61.0 (CH-2); 65.2/65.5/65.8 (CH<sub>2</sub>-1); 69.9 (CH-3); 81.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 129.9/130.1 (CH-5); 154.4/154.5 (C=O). Im NMR-Spektrum ist eine Verunreinigungen durch S-Alkohol (64.8 (CH<sub>2</sub>-1); 76.6 (CH-2); 77.4 (CH-3), 127.7/128.4 (CH-5)) zu erkennen. **[α]<sup>20</sup><sub>D</sub>** = -42.8 °(c 0.69, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). **HRMS ESI** [C<sub>27</sub>H<sub>51</sub>O<sub>4</sub>N] cal. [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 454.3891, gef. 454.3890; cal. [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* = 476.3710, gef. 476.3709.

**(4*R*,5*R*)-tert-Butyl-4-((*R*,*Z*)-1-hydroxy-2-methylhexadec-2-enyl)-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylat (**33**):**

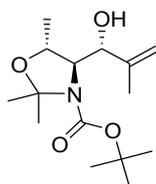


Die Lösung aus **31** (66 mg, 0.22 mmol, 1 Äq.) in trockenem Methyltetrahydrofuran (5.0 mL) wurde in einem Kühlbad aus Methylcyclohexan und flüssigem N<sub>2</sub> auf -75 °C gekühlt und es wurde *tert*-Butyllithium (0.25 mL, 0.43 mmol, 1.95 Äq., 1.7 M in Pentan) über 17 min tropfenweise hinzugegeben. Anschließend wurde die gelbe Reaktionsmischung über 35 min bei -70 °C gerührt. Daraufhin wurden zu der Reaktionslösung *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (0.2 mL) und weiteres *tert*-Butyllithium (0.1 mL, 0.17 mmol, 0.77 Äq., 1.7 M in Pentan) hinzugegeben. Die Mischung wurde weitere 20 min bei -70 °C gerührt und anschließend zu einer Lösung aus **26** (54 mg, 0.22 mmol, 1 Äq.) in Methyltetrahydrofuran (5.0 mL) bei -84 °C mittels einer wärmeisolierten Spritze über vier Minuten hinzugetropft. Die Reaktion wurde eine weitere Stunde bei derselben Temperatur gerührt und durch die

Zugabe von eiskaltem destilliertem Wasser (10.0 mL) gestoppt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden daraufhin mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan: EtOAc 20:1 → 15:1) gereinigt. Es wurde **33** (33 mg, 0.07 mmol, **32 %**, *dr* = 100:0 (C3)) als farbloses Öl erhalten.

*R<sub>f</sub>* (Cyclohexan:EtOAc 5.5:1.5) = 0.76. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD; 500.1 Hz) δ [ppm] = 0.87 (t, *J*<sub>1</sub> = 7.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.0 Hz, 3H, Kette-CH<sub>3</sub>); 1.24 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-1); 1.26 (m, 22H, 10x Kette-CH<sub>2</sub>); 1.48 (s, 12H, Boc-CH<sub>3</sub> und Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 1.59 (s, 3H, Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 1.71-1.72 (m, 3H, CH<sub>3</sub>-4); 1.94-2.14 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 3.88 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 8.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.5 Hz, CH-2); 4.04 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 6.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.6 Hz, CH-1); 4.65 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, CH-3); 5.34 (t, *J*<sub>1</sub> = 7.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.0 Hz, 1H, CH-5). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD; 125.8 Hz) δ [ppm] = 14.5 (Kette-CH<sub>3</sub>); 18.6 (CH<sub>3</sub>-4); 22.6 (CH<sub>3</sub>-1); 23.8 (Kette-CH<sub>2</sub>); 27.5 (Kette-CH<sub>2</sub>-6); 28.5 (Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 28.7 (Boc-CH<sub>3</sub>); 30.5 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.5 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.7 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.8 (Kette-CH<sub>2</sub>); 31.0 (Kette-CH<sub>2</sub>); 33.1 (Kette-CH<sub>2</sub>-7); 68.4 (CH-2); 74.3 (CH<sub>2</sub>-3); 74.5 (CH-1); 95.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 132.0 (CH-5). [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -46.6 °(c 1.00, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). HRMS ESI [C<sub>28</sub>H<sub>53</sub>NO<sub>4</sub>] cal. [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 468.4048, gef. 468.4045; cal. [2M+Na]<sup>+</sup> *m/z* = 957.7842, gef. 975.7824.

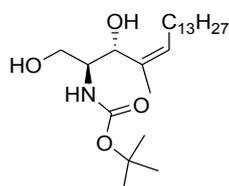
**(4*R*,5*R*)-tert-Butyl-4-((*R*)-1-hydroxy-2-methylallyl)-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylat (**34**):**



Zu einer Lösung aus **4** (200 mg, 0.82 mmol, 1 Äq.) in trockenem THF (7.5 mL) wurde bei -78 °C Isopropenylmagnesiumbromid (4.10 mL, 2.01 mmol, 0.5 M in THF, 2.5 Äq.) hinzugegeben. Nach zwei Stunden Rühren bei -78 °C wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1 M HCl (9.3 mL) gestoppt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit EtOAc (3.1 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan/EtOAc 8:1) gereinigt. Es wurde **34** (143 mg, 0.50 mmol, **61 %**) als farbloses Öl erhalten.

$R_f$  (Cyclohexan/EtOAc 4:1) = 0.53.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500.1 MHz):  $\delta$  [ppm] = 1.17 (d,  $J = 5.9$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ -1)/1.18 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ -1) 1.39-1.42 (m, 9H, Boc- $\text{CH}_3$ ); 1.50-1.53 (m, 6H, Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 1.67 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -4); 3.62 (br s, 0.8H,  $\text{CH}$ -2)/3.75-3.77 (m, 0.2H,  $\text{CH}$ -2); 3.92-3.93 (m, 0.3H,  $\text{CH}$ -1)/4.06 (br s, 1H,  $\text{CH}$ -1); 4.39 (br s, 1H,  $\text{CH}$ -3); 4.85-4.86 (m, 1H,  $\text{CH}_{2a}$ ); 4.96 (br s, 1H,  $\text{CH}_{2b}$ ).  $^{13}\text{C APT-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 125.8 MHz):  $\delta = 16.9$  ( $\text{CH}_3$ -4); 21.4 ( $\text{CH}_3$ -1); 25.9 (Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 28.2/28.2 (Boc- $\text{CH}_3$ ); 65.9 ( $\text{CH}$ -2); 70.6 ( $\text{CH}$ -1); 72.5/73.3 ( $\text{CH}$ -3); 114.4 ( $\text{CH}_2$ ); 144.7 ( $\text{CCH}_2$ ). **HRMS ESI** [ $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}_4$ ] cal.  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 286.2012$ , gef. 286.2013; cal.  $[\text{M}+\text{Na}]^+ m/z = 308.1832$ , gef. 308.1832.

**tert-Butyl-(Z,2S,3R)-1,3-dihydroxy-4-methyloctadec-4-en-2-ylcarbamat (35):**

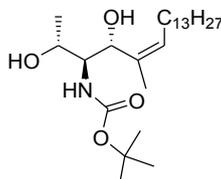


Die Verbindung **32** (39 mg, 0.09 mmol, 1 Äq.) wurde in trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3.2 mL) gelöst und es wurde Trifluoressigsäure (0.32 mL, 4.13 mmol, 47 Äq.) tropfenweise bei  $0^\circ\text{C}$  langsam hinzugegeben. Nach 2.5 min Rühren wurde die Reaktion durch die schnelle Zugabe von eiskalter 10 %-iger NaOH-Lösung (15.8 mL) gestoppt. Die entstandene Suspension wurde mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  verdünnt und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan: EtOAc 1:1, dann 4:1  $\rightarrow$  1:1) gereinigt. Es wurde **35** (18.3 mg, 0.04 mmol, **49 %**, **dr** = 90:10 (C3)) als weißer Feststoff erhalten.

$R_f$  (Cyclohexan:EtOAc 1:1) = 0.49.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ; 500.1 Hz)  $\delta$  [ppm] = 0.88 (t,  $J_1 = 6.9$  Hz,  $J_2 = 6.9$  Hz, 3H, Kette- $\text{CH}_3$ ); 1.26-1.36 (m, 22H, 11xKette- $\text{CH}_2$ ); 1.42 (s, 9H, Boc- $\text{CH}_3$ ); 1.74 (br s, 3 H,  $\text{CH}_3$ -4); 1.96-2.11 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -6); 2.49 (br s, 1H, OH); 2.86 (br s, 1H, OH); 3.57 (tt,  $J_1 = 7.9$  Hz,  $J_2 = 3.8$  Hz, 1H,  $\text{CH}$ -2); 3.82 (dd,  $J_1 = 67.5$  Hz,  $J_2 = 10.7$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ -1); 4.64 (dd,  $J_1 = 7.1$  Hz,  $J_2 = 2.1$  Hz, 1H,  $\text{CH}$ -3); 4.89 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H, NH); 5.35 (t,  $J_1 = 7.3$  Hz,  $J_2 = 7.3$  Hz, 1H,  $\text{CH}$ -5). Im NMR-Spektrum ist eine Verunreinigung durch S-Alkohol (3.63 (br s, 0.3H,  $\text{CH}$ -2); 3.81-3.83 (m, 0.2H,  $\text{CH}_2$ -1); 4.13 (br s, 0.1H, CH); 5.51 (t,  $J_1 = 8.1$  Hz,  $J_2 = 8.1$  Hz, 0.1H,  $\text{CH}$ -5)) zu erkennen.  $^{13}\text{C APT NMR}$  ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ; 125.8 Hz)  $\delta$  [ppm] = 14.3 (Kette- $\text{CH}_3$ ); 18.4 ( $\text{CH}_3$ -4); 23.1 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 27.9 (Kette- $\text{CH}_2$ -6); 28.5 (Boc- $\text{CH}_3$ ); 29.8 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 30.0 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 30.1 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 30.1 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 30.4 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 32.3 (Kette- $\text{CH}_2$ -7); 54.7 ( $\text{CH}$ -2); 63.8 ( $\text{CH}_2$ -1); 70.7 ( $\text{CH}$ -3); 130.7 ( $\text{CH}$ -5); 134.3 (C-4). Im NMR-Spektrum ist eine Verunreinigung durch S-Alkohol (128.1 ( $\text{CH}$ -5)) zu erkennen. **HRMS ESI**

[C<sub>24</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>4</sub>] cal. [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 414.3578, gef. 414.3582; cal. [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* = 436.3397, gef. 436.3399; cal. [M-H]<sup>-</sup> *m/z* = 412.3432, gef. 412.3443.

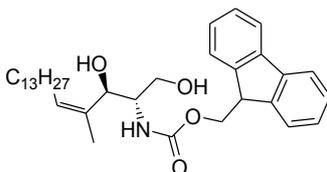
**tert-Butyl-(Z,2R,3S,4R)-2,4-dihydroxy-5-methylnonadec-5-en-3-ylcarbamat (36):**



Die Verbindung **33** (41.5 mg, 0.09 mmol, 1 Äq.) wurde nach der gleichen Vorschrift wie bei **35** umgesetzt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan: EtOAc 3:1 → 1:1) gereinigt. Es wurde **36** (25 mg, 0.06 mmol, **66 %**) als farbloser kristalliner Feststoff erhalten.

**R<sub>f</sub>** (Cyclohexan:EtOAc 1:1) = 0.77. **<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 500.1 Hz) δ [ppm] = 0.88 (t, *J*<sub>1</sub> = 7.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.0 Hz, 3H, Kette-CH<sub>3</sub>); 1.10 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-1); 1.26-1.37 (m, 22H, 11xKette-CH<sub>2</sub>); 1.43 (s, 9H, Boc-CH<sub>3</sub>); 1.68 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-4); 2.07 (tdd, *J*<sub>1</sub> = 21.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 13.8 Hz, *J*<sub>3</sub> = 6.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 3.47 (dd, *J*<sub>1</sub> = 7.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.2 Hz, 1H, CH-2); 3.76 (dq, *J*<sub>1</sub> = 6.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.2 Hz, 1H, CH-1); 4.59 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, CH-3); 5.27 (t, *J*<sub>1</sub> = 7.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.0 Hz, 1H, CH-5). **<sup>13</sup>C APT NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 125.8 Hz) δ [ppm] = 14.4 (Kette-CH<sub>3</sub>); 18.6 (CH<sub>3</sub>-4); 21.0 (CH<sub>3</sub>-1); 23.7 (Kette-CH<sub>2</sub>); 28.5 (Kette-CH<sub>2</sub>-6); 28.7 (Boc-CH<sub>3</sub>); 30.4 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.5 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.7 (Kette-CH<sub>2</sub>); 31.0 (Kette-CH<sub>2</sub>); 33.0 (Kette-CH<sub>2</sub>-7); 59.6 (CH-2); 68.3 (CH-1); 70.9 (CH-3); 80.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 130.7 (CH-5); 135.9 (C-4); 158.9 (Boc-COO). **HRMS ESI** [C<sub>25</sub>H<sub>49</sub>NO<sub>4</sub>] cal. [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 428.3734, gef. 428.3738; cal. [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* = 450.3554, gef. 450.3554.

**(9H-Fluoren-9-yl)-methyl-(Z,2S,3R)-1,3-dihydroxy-4-methyloctadec-4-en-2-ylcarbamate (37):**

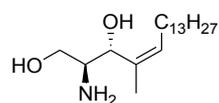


Die Verbindung **32** (21 mg, 0.05 mmol, 1 Äq.) wurde in trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.5 mL) gelöst und es wurde Trimethylsilyliodid (8 µL, 0.06 mmol, 1.2 Äq.) bei Raumtemperatur hinzugegeben. Nach fünf Minuten Rühren wurde die Reaktion durch die Zugabe von MeOH (10 µL, 0.25 mmol, 5 Äq.) gestoppt und alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem

Druck und anschließend am Feinvakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde daraufhin in einem THF-H<sub>2</sub>O-Gemisch (3.0 mL, 2:1, v:v) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach der Zugabe von NaHCO<sub>3</sub> (31 mg, 0.37 mmol, 8 Äq.) und 9-Fluorenylmethylchloroformat (119.5 mg, 0.5 mmol, 10 Äq.) wurde die Reaktion für 4.5 h gerührt und langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurde die Mischung mit EtOAc verdünnt und die organische Phase mit wenig gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde einmal mit EtOAc rückextrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan: EtOAc 2:1) gereinigt. Es wurde **37** (4 mg, 8 µmol, **16 %**) als weißer Feststoff erhalten.

**R<sub>f</sub>** (Cyclohexan:EtOAc 1:2) = 0.47. **<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 500.1 Hz) δ [ppm] = 0.87 (t, *J*<sub>1</sub> = 7.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.0 Hz, 3H, Kette-CH<sub>3</sub>); 1.24-1.32 (m, 22H, 11xKette-CH<sub>2</sub>); 1.73 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-4); 1.94-2.08 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 2.23 (br s, 1H, OH); 2.44 (br s, 1H, OH); 3.65 (br s, 1H, CH-2); 3.84 (dd, *J*<sub>1</sub> = 77.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 8.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-1); 4.21 (t, *J*<sub>1</sub> = 6.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.7 Hz, 1H, Fmoc-CH); 4.39 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 17.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 10.3 Hz, *J*<sub>3</sub> = 7.1 Hz, 1H, Fmoc-CH<sub>2a</sub>); 4.42-4.43 (m, 1H, Fmoc-CH<sub>2b</sub>); 4.68 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, CH-3); 5.14-5.15 (m, 1H, NH); 5.36 (t, *J*<sub>1</sub> = 6.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.9 Hz, 1H, CH-5); 7.30-7.42 (m, 4H, Ar-H); 7.59 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H); 7.78 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar-H). **<sup>13</sup>C APT NMR** (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 125.8 Hz) δ [ppm] = 14.4 (Kette-CH<sub>3</sub>); 18.4 (CH<sub>3</sub>-4); 23.2 (Kette-CH<sub>2</sub>); 28.0 (Kette-CH<sub>2</sub>-6); 29.9 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.1 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.2 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.1 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.5 (Kette-CH<sub>2</sub>); 32.4 (Kette-CH<sub>2</sub>-7); 47.8 (Fmoc-CH); 54.9 (CH-2); 63.5 (CH<sub>2</sub>-1); 67.0 (Fmoc-CH<sub>2</sub>); 70.9 (CH-3); 120.4 (Ar-CH); 125.5 (Ar-CH); 127.5 (Ar-CH); 128.1 (Ar-CH); 130.9 (CH-5), 134.2 (Ar-C); 141.8 (Ar-C); 144.5 (Ar-C), 144.5 (Ar-C). **HRMS ESI** [C<sub>34</sub>H<sub>49</sub>NO<sub>4</sub>] cal. [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* = 558.3554, gef. 558.3576; cal. [M+Cl]<sup>-</sup> *m/z* = 570.3356, gef. 570.3373.

**(Z,2S,3R)-2-Amino-4-methyloctadec-4-en-1,3-diol (1):**

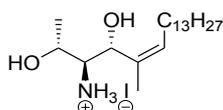


Die Verbindung **37** (4 mg, 8 µmol, 1 Äq.) wurde mit HNEt<sub>2</sub>-Lösung (0.3 mL, 25 % in MeOH) versetzt und für 80 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen der flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck wurde der Rückstand säulenchromatographisch (Kieselgel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 9:1) gereinigt. Es wurde **1** (2.4 mg, 8 µmol, **quantitativ**, Spuren von Kieselgel) als weißer Feststoff erhalten.

**R<sub>f</sub>** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 9:1) = 0.05. **<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 500.1 Hz) δ [ppm] = 0.86 (t, *J*<sub>1</sub> = 7.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.0 Hz, 3H, Kette-CH<sub>3</sub>); 1.25-1.28 (m, 22H, 11xKette-CH<sub>2</sub>); 1.68 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-4);

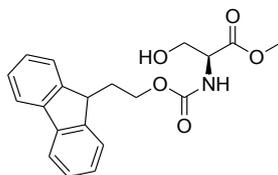
1.99-2.13 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 2.87 (br s, 1H, CH-2); 3.16 (dd,  $J_1 = 53.2$  Hz,  $J_2 = 9.9$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-1); 4.46 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, CH-3); 5.40 (t,  $J_1 = 7.0$  Hz,  $J_2 = 7.0$  Hz, 1H, CH-5). **<sup>13</sup>C APT NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 125.8 Hz)  $\delta$  [ppm] = 14.5 (Kette-CH<sub>3</sub>); 18.3 (CH<sub>3</sub>-4); 23.8 (Kette-CH<sub>2</sub>); 28.6 (Kette-CH<sub>2</sub>-6); 30.5 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.6 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.8 (Kette-CH<sub>2</sub>); 31.2 (Kette-CH<sub>2</sub>); 33.1 (Kette-CH<sub>2</sub>); 56.0\* (CH-2); 63.0\* (CH<sub>2</sub>-1); 70.3\* (CH-3); 132.0 (CH-5). (\*bestimmt aus CHCOSY). **HRMS ESI** [C<sub>19</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>2</sub>] cal. [M+H]<sup>+</sup>  $m/z = 314.3054$ , gef. 314.3054.

**(Z,2R,3S,4R)-3-Amino-5-methylnonadec-5-en-2,4-diol-hydroiodid (2):**



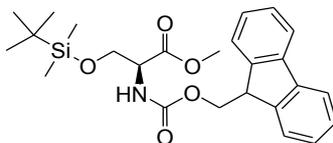
Die Verbindung **33** (19 mg, 0.04 mmol, 1 Äq.) wurde in trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.5 mL) gelöst und es wurde Trimethylsilyliodid (7  $\mu$ L, 0.05 mmol, 1.2 Äq.) bei Raumtemperatur hinzuge tropft. Nach dem Rühren für fünf Minuten, wurde die Reaktion durch die Zugabe von MeOH (8  $\mu$ L, 0.19 mmol, 5 Äq.) gestoppt und alle flüchtigen Rückstände unter vermindertem Druck und anschließend am Feinvakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 95:5  $\rightarrow$  9:1; dann RP18-Chromabond®-Säule, MeCN:Millipore 50:50  $\rightarrow$  90:1) gereinigt. Nach dem Gefriertrocknen wurde **2** (2 mg, 4.6  $\mu$ mol, **12** %) als weißer Feststoff erhalten.

$R_f$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 9:1) = 0.08. **<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 500.1 Hz)  $\delta$  [ppm] = 0.87 (t,  $J_1 = 7.0$  Hz,  $J_2 = 7.0$  Hz, 3H, Kette-CH<sub>3</sub>); 1.23 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-1); 1.26-1.33 (m, 20H, 10xKette-CH<sub>2</sub>); 1.33-1.37 (m, 2H, Kette-CH<sub>2</sub>); 1.67 (br s, 3H, CH<sub>3</sub>-4); 2.11 (qdd,  $J_1 = 34.7$  Hz,  $J_2 = 14.5$  Hz,  $J_3 = 7.2$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 2.96 (dd,  $J_1 = 9.6$  Hz,  $J_2 = 1.7$  Hz, 1H, CH-2); 3.76 (dq,  $J_1 = 6.5$  Hz,  $J_2 = 2.1$  Hz, 1H, CH-1); 4.47 (d,  $J = 9.7$  Hz, 1H, CH-3); 5.43 (t,  $J_1 = 7.1$  Hz,  $J_2 = 7.1$  Hz, 1H, CH-5). **<sup>13</sup>C APT NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 125.8 Hz)  $\delta$  [ppm] = 14.6 (Kette-CH<sub>3</sub>); 17.9 (CH<sub>3</sub>-4); 21.6 (CH<sub>3</sub>-1); 23.9 (Kette-CH<sub>2</sub>); 28.8 (Kette-CH<sub>2</sub>-6); 30.7 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.9 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.9 (Kette-CH<sub>2</sub>); 31.0 (Kette-CH<sub>2</sub>); 31.2 (Kette-CH<sub>2</sub>); 33.3 (Kette-CH<sub>2</sub>); 60.6 (CH-2); 64.0 (CH-1); 68.4 (CH-3); 133.3 (CH-5).  $[\alpha]^{20}_D = +16.6^\circ$  (c 0.15, MeOH). **HRMS ESI** [C<sub>20</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>2</sub>] cal. [M+H]<sup>+</sup>  $m/z = 328.3210$ , gef. 328.3210.

**6.2.4 Synthesevorschriften für alternative Darstellung 4-verzweigter Derivate****(9H-Fluoren-9-yl)methyl-(S)-1-(methoxycarbonyl)-2-hydroxyethylcarbammat (38):**

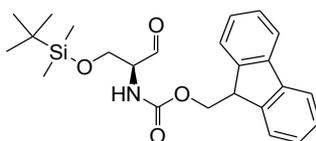
Zu einer Lösung aus **16** (1.0 g, 8.3 mmol, 1.0 Äq.) in Dioxan (5.5 mL) und destilliertem Wasser (2.8 mL) wurde  $\text{NaHCO}_3$  (170 mg, 20.7 mmol, 2.5 Äq.) bei 0 °C hinzugegeben und die Reaktion 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-succinimid (3.1 g, 9.1 mmol, 1.1 Äq.) in Dioxan (11.2 mL) tropfenweise hinzugegeben und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene Suspension wurde mit destilliertem Wasser (25.0 mL) verdünnt und die wässrige Phase dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit destilliertem Wasser, dreimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan:EtOAc 2:1) gereinigt. Es wurde **38** (2.7 g, 6.3 mmol, **76 %**) als ein gelbes Öl erhalten.

$R_f$  (Cyclohexan:EtOAc 2:1) = 0.14.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500.1 MHz):  $\delta$  [ppm] = 3.80 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.93-4.01 (m, 2H,  $2\times\text{CH}_2-1$ ); 4.24 (t,  $J_1 = 6.9$  Hz,  $J_2 = 6.9$  Hz, 1H, Fmoc-CH); 4.43-4.45 (m, 3H, CH-2 und Fmoc- $\text{CH}_2$ ); 5.70 (d,  $J = 6.9$  Hz, 1H, NH); 7.32 (t,  $J_1 = 7.5$  Hz,  $J_2 = 7.5$  Hz, 2H,  $2\times\text{Ar-CH}$ ); 7.40 (t,  $J_1 = 7.3$  Hz,  $J_2 = 7.3$  Hz, 2H, Ar-CH); 7.61 (d,  $J = 4.1$  Hz, 2H, Ar-CH); 7.78 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H, Ar-CH). Im NMR-Spektrum ist das Signal von Wasser aus dem Lösungsmittel zu erkennen.  $^{13}\text{C-APT-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 125.7 MHz):  $\delta$  [ppm] = 47.1 (Fmoc-CH); 52.8 ( $\text{OCH}_3$ ); 55.9 (CH-2); 63.3 ( $\text{CH}_2-1$ ); 67.2 (Fmoc- $\text{CH}_2$ ); 120.0 (Ar-CH-5); 125.0 (Ar-CH-2); 127.0 (Ar-CH-3); 127.7 (Ar-CH-4); 141.3 (Ar-C-6); 143.6 (Ar-C-1); 170.8 (COO). **MS ESI** [ $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ ] cal.  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 342.1$ , gef. 342.2.

**(9H-Fluoren-9-yl)-methyl-(S)-1-(methoxycarbonyl)-2-tert-butyldiphenylsilyloxyethyl-carbamat (39):**

Zu einer Lösung aus **38** (500 mg, 1.4 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DMF (2.2 mL) wurden Imidazol (0.4 g, 5.7 mmol, 4.0 Äq.) und *tert*-Butyl(chloro)dimethylsilan (0.4 g, 2.8 mmol, 2.0 Äq.) hinzugegeben. Nach dreitägigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch die langsame Zugabe gesättigter NaCl-Lösung (20.0 mL) gestoppt und die wässrige Phase dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan:EtOAc 2:1) gereinigt. Es wurde **39** (358 mg, 0.79 mmol, **56 %**) als ein gelber Feststoff erhalten.

**R<sub>f</sub>** (Cyclohexan:EtOAc 2:1) = 0.54. **<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 500.1 MHz): δ [ppm] = 0.04 (d, *J* = 7.6 Hz, 6H, 2xCH<sub>3</sub>-Si); 0.89 (s, 9H, *t*Bu-Si); 3.77 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.86 (dd, *J*<sub>1</sub> = 3.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 10.1 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub>-1); 4.09 (dd, *J*<sub>1</sub> = 2.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 10.1 Hz, 1H, CH<sub>2b</sub>-1); 4.26 (t, *J*<sub>1</sub> = 7.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.3 Hz, 1H, Fmoc-CH); 4.34-4.46 (m, 3H, CH-2 und Fmoc-CH<sub>2</sub>); 5.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, NH); 7.31 (m, 2H, Ar-CH); 7.41 (t, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.6 Hz, 2H, Ar-CH); 7.60-7.67 (m, Ar-CH); 7.77 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-CH). Im NMR-Spektrum sind die Signale von Wasser und Imidazol zu erkennen. **<sup>13</sup>C-APT-NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 125.7 MHz): δ [ppm] = 25.7 (*t*BuSi); 47.1 (Fmoc-CH); 55.9 (OCH<sub>3</sub>); 63.6 (CH<sub>2</sub>-1); 67.2 (Fmoc-CH<sub>2</sub>); 119.9 (Ar-CH); 125.1 (Ar-CH); 127.1 (Ar-CH); 127.7 (Ar-CH). Die Signale von (CH<sub>3</sub>-Si), (*t*BuSi-C), (Ar-C), (COO) sind im Spektrum nicht zu beobachten, weil die Probe zu verdünnt vorlag. **MS ESI** [C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>5</sub>Si] cal. [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 456.2, gef. 456.2.

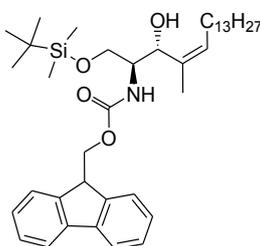
**(9H-Fluoren-9-yl)-methyl-(S)-1-formyl-2-tert-butyldiphenylsilyloxyethylcarbamat (40):**

Die Verbindung **39** (100 mg, 0.22 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Toluol (1.2 mL) gelöst und auf -80 °C gekühlt. Anschließend wurde Diisobutylaluminiumhydrid (0.3 mL, 0.37 mmol, 1.2 M in Toluol, 1.7 Äq.) über zwei Stunden bei -80 °C tropfenweise hinzugegeben und die Reaktion weitere drei Stunden gerührt. Daraufhin wurde die Reaktion durch die langsame Zugabe von gesättigter Natrium-Kalium-Tartrat-Lösung (1.2 mL) gestoppt. Die wässrige Phase wurde

dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan:EtOAc 9:1 → 2:1) gereinigt. Es wurde **40** (100 mg, 0.23 mmol, **quantitativ**, verunreinigt durch 33 % Lösungsmittel) als ein hell-gelbes Öl erhalten.

$R_f$  (Cyclohexan:EtOAc 2:1) = 0.53. **MS ESI** [C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>4</sub>Si] cal. [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  = 426.2, gef. 426.1.

**(9H-Fluoren-9-yl)-methyl-(Z,2S,3R)-1,3-dihydroxy-4-methyloctadec-4-en-2-ylcarbamat (41):**

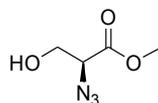


Eine Lösung aus **31** (43 mg, 0.14 mmol, 1 Äq.) in trockenem Methyltetrahydrofuran (3.3 mL) wurde in einem Kühlbad aus Methylcyclohexan und flüssigem N<sub>2</sub> auf - 120 °C gekühlt und es wurde *tert*-Butyllithium (0.17 mL, 0.28 mmol, 2.0 Äq., 1.7 M in Pentan) über 13 min tropfenweise hinzugegeben. Anschließend wurde die gelbe Reaktionsmischung über 35 min langsam auf - 84 °C erwärmt. Daraufhin wurde *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (0.17 mL) zur Reaktionslösung hinzugegeben. Die Mischung wurde weitere zehn Minuten bei - 84 °C gerührt und anschließend zu einer Lösung aus **40** (60.0 mg, 0.14 mmol, 1 Äq.) in Methyltetrahydrofuran (3.3 mL) bei - 84 °C mittels einer wärmeisolierten Spritze über 3.5 min hinzugegropft. Nach einer Stunde Rühren bei - 84 °C wurde die Reaktion durch die Zugabe von eiskaltem destilliertem Wasser (6.8 mL) gestoppt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden daraufhin mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan: EtOAc 9:1 → 4:1) gereinigt. Es wurde **41** (4 mg, 6 µmol, **4 %**, verunreinigt) als farbloses Öl erhalten.

$R_f$  (Cyclohexan:EtOAc 5.5:1.5) = 0.45. **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 500.1 MHz) δ [ppm] = 0.02-0.10 (m, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 0.89-0.91 (m, 12H, Kette-CH<sub>3</sub> und Si<sup>t</sup>Bu); 1.25(br s, 22H, 11xKette-CH<sub>2</sub>); 1.56 (br s, 3H, CH<sub>3</sub>-4); 2.01-2.20 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 3.74-3.77 (m, 1H, CH-2); 3.86-3.88 (m, 1H, CH<sub>2a</sub>-1); 4.22-4.26 (m, 2H, Fmoc-CH und CH<sub>2b</sub>-1); 4.39-4.41 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 4.48-4.49 (m, 1H, CH-3); 5.34-5.58 (m, 1H, CH-5); 7.32 (ddd,  $J_1 = 8.6$  Hz,  $J_2 = 7.6$  Hz,  $J_3 = 1.5$  Hz, 2H,

Ar-CH); 7.49-7.42 (m, Ar-CH); 7.59-7.60 (m, Ar-CH); 7.77-7.78 (m, 2H, Ar-CH). **MS ESI** [C<sub>40</sub>H<sub>63</sub>NO<sub>4</sub>Si] cal. [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 650.4, gef. 650.3; cal. [M+K]<sup>+</sup> *m/z* = 688.4, gef. 688.7.

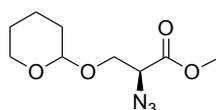
**(S)-Methyl-2-azido-3-hydroxypropanoat (42):**



Die Verbindung **16** (250 mg, 1.61 mmol, 1 Äq.) wurde in MeOH (8.0 mL) gelöst und es wurden fein gemörstertes K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (555 mg, 4.02 Äq., 2.5 Äq.), CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O (4 mg, 0.012 mmol, 0.01 Äq.) und Imidazol-sulfonylazid-hydrochlorid (404 mg, 1.93 mmol, 1.2 Äq.) hinzugegeben. Die bläuliche Suspension wurde über 20 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend eingengt. Der Rückstand wurde mit destilliertem Wasser (24.1 mL) verdünnt und mit konzentrierter HCl auf pH 2 angesäuert. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige Phase anschließend dreimal mit EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan:EtOAc 3:2 → 1:1) gereinigt. Das Produkt **42** (101 mg, 0.69 mmol, **43** %) wurde als ein farbloses Öl erhalten.

**R<sub>f</sub>** (EtOAc:MeOH 1:1) = 0.92. **MS ESI** [C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>] cal. [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 146.0, found 146.5.

**(S)-Methyl-2-azido-3-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)propanoat (43):**

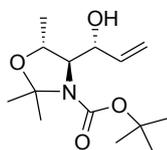


Zu einer Lösung aus **42** (57 mg, 0.39 mmol, 1 Äq.) in trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.6 mL) wurde Dihydropyran (50 µL, 0.54 mmol, 1.4 Äq.) und anschließend eine Spatelspitze *para*-Toluensulfonsäure-monohydrat hinzugegeben. Die Reaktionslösung färbte sich schlagartig schwarz. Daraufhin wurde die Mischung 24 h bei Raumtemperatur gerührt und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (5.0 mL) sowie EtOAc verdünnt. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde anschließend dreimal mit EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan:EtOAc 3:2) gereinigt. Es wurde ein gelber Feststoff **43** (60 mg, 0.26 mmol, **67** %) erhalten.

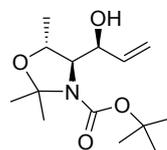
$R_f$  (Cyclohexan:EtOAc 3:2) = 0.44.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 500.1 Hz) = 1.43-1.49 (m, 4H,  $2\times\text{CH}_2$ -Pyran); 1.54-1.59 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -Pyran); 1.75 (ddd,  $J_1 = 12.7$  Hz,  $J_2 = 6.6$  Hz,  $J_3 = 3.7$  Hz, 1H,  $\text{CH}_{2a}$ -Pyran); 1.82-1.86 (m, 1H,  $\text{CH}_{2b}$ -Pyran); 3.45-3.43 (m, 2H,  $\text{CH}_{2a}$ -1 und  $\text{CH}$ -2); 3.76 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.88-3.92 (m, 1H,  $\text{CH}_{b2}$ -1); 4.50 (dd,  $J_1 = 9.7$  Hz,  $J_2 = 2.3$  Hz, 1H,  $\text{CH}$ -Pyran).  $^{13}\text{C APT NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 125.8 Hz) = 23.8 ( $\text{CH}_2$ -Pyran); 26.1 ( $\text{CH}_2$ -Pyran); 32.4 ( $\text{CH}_2$ -Pyran); 56.9 ( $\text{OCH}_3$ ); 67.7 ( $\text{CH}_2$ -1); 83.7 ( $\text{CH}$ -Pyran). Im NMR-Spektrum sind die Signale von EtOAc zu erkennen.

### 6.2.5 Synthese von 1-verzweigten Derivaten

**(4*R*,5*R*)-tert-Butyl-4-((*R*)-1-hydroxyallyl)-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylat(45)/  
(4*R*,5*R*)-tert-Butyl-4-((*S*)-1-hydroxyallyl)-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylat (46):**



45



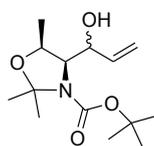
46

Zu einer Lösung aus **26** (500 mg, 2.06 mmol, 1 Äq.) in trockenem THF (9.7 mL) wurde bei  $-80$  °C Vinylmagnesiumbromid (4.1 mL, 4.12 mmol, 1 M in THF, 2 Äq.) langsam hinzugegeben. Nach 15 min Rühren bei  $-80$  °C wurde die Reaktionsmischung auf  $0$  °C erwärmt und weitere 1.5 h gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf  $-20$  °C gekühlt, die Reaktion durch die Zugabe von gesättigter  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung (9.0 mL) gestoppt und auf Raumtemperatur erwärmt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter  $\text{NaCl}$ -Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und unter vermindertem Druck eingedunstet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan/EtOAc 100:1  $\rightarrow$  10:1) gereinigt. Die entstandenen Diastereomere **45** (257 mg, 0.95 mmol, **46** %) und **46** (156 mg, 0.58 mmol, **28** %) wurden als leicht gelbliches Öl erhalten.

**Für 45:**  $R_f$  (EtOAc:Cyclohexan 1:4) = 0.43.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500.1 MHz)  $\delta$  [ppm] = 1.30 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ -1); 1.35 (s, 3H, Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 1.41 (s, 9H, Boc- $\text{CH}_3$ ); 1.49 (s, 3H, Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 3.62 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H,  $\text{CH}$ -2); 3.77 (br s, 1H,  $\text{CH}$ -1); 3.96 (br s, 1H,  $\text{CH}$ -3); 5.18 (td,  $J_1 = 10.4$  Hz,  $J_2 = 1.4$  Hz, 1H,  $\text{CH}_a$ -5); 5.25 (br d,  $J_1 = 17.1$  Hz, 1H,  $\text{CH}_b$ -5); 5.52 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, OH); 5.75 (ddd,  $J_1 = 16.9$  Hz,  $J_2 = 10.4$  Hz,  $J_3 = 6.2$  Hz, 1H,  $\text{CH}$ -4).  $^{13}\text{C APT NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125.8 Hz)  $\delta$  [ppm] = 18.7 ( $\text{CH}_3$ -1); 25.7 (Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 28.1 (Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 28.3 (Boc- $\text{CH}_3$ ); 69.8 ( $\text{CH}$ -1); 72.1 ( $\text{CH}$ -2); 72.5 ( $\text{CH}$ -3); 99.0 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ); 117.1 ( $\text{CH}_2$ -5); 135.9 ( $\text{CH}$ -4). **HRMS ESI** [ $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NO}_4$ ] cal.  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 272.1856$ , gef. 272.1854; cal.  $[\text{M}+\text{Na}]^+ m/z = 294.1676$ , gef. 294.1673.

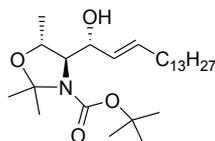
**Für 46:**  $R_f$  (EtOAc:Cyclohexan 1:4) = 0.32.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500.1 MHz)  $\delta$  [ppm] = 1.26 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ -1); 1.42/1.43 (s, 12H, Oxazolidin- $\text{CH}_3$  und Boc- $\text{CH}_3$ ); 1.54/1.56 (s, 3H, Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 3.63 (dd,  $J_1 = 7.5$  Hz,  $J_2 = 4.8$  Hz, 1H,  $\text{CH}$ -2); 3.98 (br s, 1H,  $\text{CH}$ -1); 4.25 (br s, 1H,  $\text{CH}$ -3); 5.18 (d,  $J = 10.4$  Hz, 1H,  $\text{CH}_a$ -5); 5.27-5.29 (m, 1H,  $\text{CH}_b$ -5); 5.73-5.79 (m, 1H,  $\text{CH}$ -4).  $^{13}\text{C APT NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 125.8 MHz)  $\delta$  [ppm] = 17.6/19.2 ( $\text{CH}_3$ -1); 28.3 (Boc- $\text{CH}_3$ ); 29.9 (Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 50.9 ( $\text{CH}$ -1); 68.1 ( $\text{CH}$ -2); 72.9 ( $\text{CH}$ -3); 79.2 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 99.4 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ); 116.7 ( $\text{CH}_2$ -5); 134.9 ( $\text{CH}$ -4); 156.3 (Boc-COO). **HRMS ESI** [ $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NO}_4$ ] cal.  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z = 272.1856$ , gef. 272.1854; cal.  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z = 294.1676$ , gef. 294.1673.

**(4*R*,5*S*)-tert-Butyl-4-((*R*)/(*S*)-1-hydroxyallyl)-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylat  
(*R*)/(*S*)-47):**



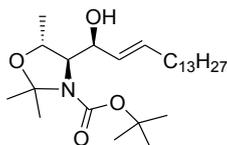
Die Verbindung **27** (234 mg, 0.94 mmol, 1 Äq.) wurde nach der gleichen Vorschrift wie bei **45/46** umgesetzt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan: EtOAc 100:1  $\rightarrow$  10:1) gereinigt. Es wurde **47** (147 mg, 0.54 mmol, **58** %) als farbloses Öl erhalten.

$R_f$  (Cyclohexan:EtOAc 4:1) = 0.51.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500.1 Hz)  $\delta$  [ppm] = 1.33 (d,  $J = 6.4$  Hz, 0.8H,  $\text{S-CH}_3$ -1), 1.35 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H,  $\text{R-CH}_3$ -1); 1.42-1.43 (m, 3H,  $\text{R-Oxazolidin-CH}_3$ ); 1.47-1.49 (m, 9H, Boc- $\text{CH}_3$ ); 1.54 (s, 3H,  $\text{R-Oxazolidin-CH}_3$ ); 1.59 (s, 0.5H,  $\text{R-Oxazolidin-CH}_3$ ); 1.61 (s, 0.7H,  $\text{R-Oxazolidin-CH}_3$ ); 3.54 (p,  $J_1 = 6.4$  Hz, 0.1H,  $\text{S-CH}$ -1); 3.67 (ddd,  $J_1 = 10.1$  Hz,  $J_2 = 6.9$  Hz,  $J_3 = 4.4$  Hz, 0.1H,  $\text{S-CH}$ -2); 4.15 (dd,  $J_1 = 6.7$  Hz,  $J_2 = 1.5$  Hz, 0.5H,  $\text{R-CH}$ -3); 4.26 (br s, 1H,  $\text{R-CH}$ -1); 4.33-4.36 (m, 1H,  $\text{R-CH}$ -2); 4.50-4.52 (m, 0.1H,  $\text{S-CH}$ -3); 5.20 (tdd,  $J_1 = 13.1$  Hz,  $J_2 = 11.4$  Hz,  $J_3 = 5.7$  Hz, 1H,  $\text{CH}_{2a}$ -4); 5.32-5.42 (m, 1H,  $\text{CH}_{2b}$ -4); 5.74-5.80 (m, 0.1H,  $\text{S-CH}$ -5); 5.85-5.99 (m, 1H,  $\text{R-CH}$ -5).  $^{13}\text{C APT NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125.8 Hz)  $\delta$  [ppm] = 15.2 ( $\text{CH}_3$ -1); 24.3 (Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 26.3 (Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 28.3 (Boc- $\text{CH}_3$ ); 56.8 ( $\text{S-CH}$ ); 65.7 ( $\text{R-CH}$ -3); 69.9 ( $\text{S-CH}$ ); 70.0 ( $\text{S-CH}$ ); 71.3 ( $\text{R-CH}$ -1); 72.3 ( $\text{R-CH}$ -2); 114.9 ( $\text{R-CH}_2$ -5); 116.4 ( $\text{S-CH}_2$ -5); 133.6 ( $\text{S-CH}$ -4); 138.3 ( $\text{R-CH}$ -4). **HRMS ESI** [ $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{N}$ ] cal.  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z = 272.1856$ , gef. 272.1858; cal.  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z = 294.1676$ , gef. 294.1677.

**(4*R*,5*R*)-tert-Butyl-4-((*R*,*E*)-1-hydroxyhexadec-2-enyl)-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylat (48):**

Die Verbindung **45** (255 mg, 0.94 mmol, 1 Äq.) wurde in trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7.0 mL) gelöst und es wurden 1-Pentadecen (1.3 mL, 4.67 mmol, 5 Äq.) sowie eine Spatelspitze vom Grubbs Katalysator zweiter Generation hinzugegeben. Anschließend wurde die Reaktionsmischung zwei Tage unter Rückfluss erhitzt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach der säulenchromatographischen Aufreinigung (Kieselgel, Cyclohexan:EtOAc 10:1) wurde das Produkt **48** (357 mg, 0.79 mmol, **84 %**) als leicht grünliches Öl erhalten.

**R<sub>f</sub>** (EtOAc:Cyclohexan 3:11) = 0.63. **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 500.1 Hz) δ [ppm] = 0.88 (t, *J*<sub>1</sub> = 6.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.9 Hz, 3H, Kette-CH<sub>3</sub>); 1.25 (br s, 22H, Kette-CH<sub>2</sub>); 1.35 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-1); 1.39 (s, 3H, Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 1.49 (s, 9H, Boc-CH<sub>3</sub>); 1.57-1.59 (m, 3H, Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 2.04 (dd, *J*<sub>1</sub> = 14.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 3.66 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, CH-1); 3.78 (dd, *J*<sub>1</sub> = 7.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.8 Hz, 1H, CH-3); 3.94 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.4 Hz, 1H, CH-2); 5.39 (dd, *J*<sub>1</sub> = 15.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.2 Hz, 1H, CH-4); 5.59 (br d, *J*<sub>1</sub> = 9.4 Hz, 1H, OH); 5.75 (td, *J*<sub>1</sub> = 13.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.6 Hz, 1H, CH-5). **<sup>13</sup>C APT NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 125.8 Hz) δ [ppm] = 14.1 (Kette-CH<sub>3</sub>); 18.6 (CH<sub>3</sub>-1); 22.7 (Kette-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 28.1 (Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 28.4 (Boc-CH<sub>3</sub>); 29.1 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.3 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.3 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.5 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.6 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.6 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.7 (Kette-CH<sub>2</sub>); 31.9 (CH<sub>2</sub>-7); 32.4 (CH<sub>2</sub>-6); 69.9 (CH-1); 72.2 (CH-3); 72.4 (CH-3); 106.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 127.4 (CH-4); 135.9 (CH-5). **[α]<sup>20</sup><sub>D</sub>** = -15.8 °(c 1.69, MeOH). **HRMS ESI** [C<sub>27</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>4</sub>] cal. [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 454.3891, gef. 454.3883; cal. [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* = 476.3710, gef. 476.3704.

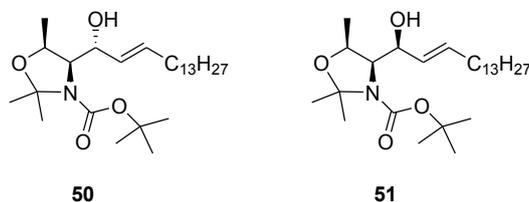
**(4*R*,5*R*)-tert-Butyl-4-((*S*,*E*)-1-hydroxyhexadec-2-enyl)-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylat (49):**

Die Verbindung **46** (156 mg, 0.58 mmol, 1 Äq.) wurde nach der gleichen Vorschrift wie bei **48** umgesetzt. Nach der säulenchromatographischen Aufreinigung (Kieselgel,

Cyclohexan:EtOAc 10:1) wurde das Produkt **49** (203 mg, 0.45 mmol, **78 %**) als farbloses Öl erhalten.

**R<sub>f</sub>** (EtOAc:Cyclohexan 3:11) = 0.56. **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 500.1 Hz) δ [ppm] = 0.88 (t,  $J_1 = 7.0$  Hz,  $J_2 = 7.0$  Hz, 3H, Kette-CH<sub>3</sub>); 1.25 (br s, 20H, Kette-CH<sub>2</sub>); 1.31 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-1); 1.34-1.39 (m, 2H, Kette-CH<sub>2</sub>); 1.47 (s, 3H, Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 1.49 (s, 9H, Boc-CH<sub>3</sub>); 1.58-1.60 (m, 3H, Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 2.00-2.07 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 3.67 (dd,  $J_1 = 7.6$  Hz,  $J_2 = 4.9$  Hz, 1H, CH); 4.02 (br s, 1H, CH); 4.20-4.28 (m, 1H, CH); 4.62-4.65 (br s, 1H, OH); 5.41 (dd,  $J_1 = 15.3$  Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz, 1H, CH-4); 5.72 (td,  $J_1 = 15.2$  Hz,  $J_2 = 6.8$  Hz, 1H, CH-5). **<sup>13</sup>C APT NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 125.75 Hz) δ [ppm] = 14.1 (Kette-CH<sub>3</sub>); 19.2 (CH<sub>3</sub>-1); 22.7 (Kette-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 27.1 (Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 28.4 (Boc-CH<sub>3</sub>); 28.9 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.2 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.3 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.5 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.6 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.7 (Kette-CH<sub>2</sub>); 31.9 (Kette-CH<sub>2</sub>-7); 32.3 (CH<sub>2</sub>-6); 63.7 (CH); 68.5 (CH); 71.2 (CH); 129.0 (CH-4); 135.1 (CH-5). **[α]<sup>20</sup><sub>D</sub>** = -57.3 °(c 1.62, MeOH). **HRMS ESI** [C<sub>27</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>4</sub>] cal. [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 454.3891, gef. 454.3888; cal. [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* = 476.3710, gef. 476.3708.

**(4*R*,5*S*)-tert-Butyl-4-((*R,E*)-1-hydroxyhexadec-2-enyl)-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylat (50)/(4*R*,5*S*)-tert-Butyl-4-((*S,E*)-1-hydroxyhexadec-2-enyl)-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylat (51):**



Die Verbindung **47** (145 mg, 0.53 mmol, 1 Äq.) wurde nach der gleichen Vorschrift wie bei **48** umgesetzt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan:EtOAc 10:1) gereinigt.

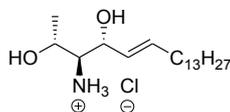
Der Umsatz betrug 80 %, wobei **50** (91 mg, 0.19 mmol, **38 %**) als grünliches Öl und **51** (48 mg, 0.10 mmol, **20 %**) als gelbliches Öl erhalten wurden. Die Mischfraktion aus beiden Diastereomeren betrug die restlichen 22 %.

**Für 50:** **R<sub>f</sub>** (Cyclohexan:EtOAc 5.5:1.5) = 0.50. **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 500.1 Hz) δ [ppm] = 0.81 (t,  $J_1 = 7.0$  Hz,  $J_2 = 7.0$  Hz, 3H, Kette-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1.18 (s, 20H, 10xKette-CH<sub>2</sub>); 1.22-1.23 (m, 2H, Kette-CH<sub>2</sub>); 1.29-1.32 (m, 3H, CH<sub>3</sub>-1); 1.41 (s, 9H, Boc-CH<sub>3</sub>); 1.48 (s, 3H, Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 1.53 (s, 3H, Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 1.97 (q,  $J = 6.5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 3.78-3.87 (br s, 1H, CH); 4.10-4.11 (br s, 1H, CH); 4.15-4.17 (br s, 1H, CH); 5.46 (dd,  $J_1 = 14.4$  Hz,  $J_2 = 6.6$  Hz, 1H, CH-4); 5.66 (dd,  $J_1 = 14.2$  Hz,  $J_2 = 6.4$  Hz, 1H, CH-5). **<sup>13</sup>C APT NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 125.8 Hz) δ [ppm] = 14.1 (Kette-CH<sub>3</sub>); 19.7 (CH<sub>3</sub>-1); 22.7 (Kette-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 24.9 (Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 28.4 (Boc-CH<sub>3</sub>);

29.0 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.3 (Kette-CH<sub>2</sub>); 28.3 (Kette-CH<sub>2</sub>); 28.5 (Kette-CH<sub>2</sub>); 28.6 (Kette-CH<sub>2</sub>); 28.6 (Kette-CH<sub>2</sub>); 31.9 (Kette-CH<sub>2</sub>-7); 32.4 (Kette-CH<sub>2</sub>-6); 63.2 (CH); 70.0 (CH); 71.9 (CH); 131.0 (CH-4); 133.7 (CH-5). **HRMS ESI** [C<sub>27</sub>H<sub>51</sub>O<sub>4</sub>N] cal. [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 454.3891, gef. 454.3895; cal. [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* = 476.3710, gef. 476.3710.

**Für 51:** R<sub>f</sub> (Cyclohexan:EtOAc 5.5:1.5) = 0.29. **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 500.1 Hz) δ [ppm] = 0.88 (t, J<sub>1</sub> = 7.0 Hz, J<sub>2</sub> = 7.0 Hz, 3H, Kette-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1.25-1.31 (m, 20H, 10xKette-CH<sub>2</sub>); 1.34 (d, J = 6.5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-1); 1.36-1.39 (m, 2H, Kette-CH<sub>2</sub>); 1.48 (s, 12H, Oxazolidin-CH<sub>3</sub> und Boc-CH<sub>3</sub>); 1.53/1.54 (s, 3H, Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 2.04 (q, J<sub>1</sub> = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 4.11 (dd, J<sub>1</sub> = 6.5 Hz, J<sub>2</sub> = 1.5 Hz, 1H, CH); 4.29 (d, J<sub>1</sub> = 4.7 Hz, 1H, CH); 4.33 (p, J<sub>1</sub> = 6.6 Hz, 1H, CH); 5.46 (dd, J<sub>1</sub> = 15.4 Hz, J<sub>2</sub> = 4.9 Hz, 1H, CH-4); 5.72 (dtd, J<sub>1</sub> = 7.6 Hz, J<sub>2</sub> = 6.78 Hz, J<sub>3</sub> = 0.9 Hz, 1H, CH-5). **<sup>13</sup>C APT NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 125.8 Hz) δ [ppm] = 14.1 (Kette-CH<sub>3</sub>); 15.1 (CH<sub>3</sub>-1); 22.7 (Kette-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 24.4 (Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 26.3 (Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 28.3 (Boc-CH<sub>3</sub>); 29.3 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.4 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.5 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.6 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.7 (Kette-CH<sub>2</sub>); 31.9 (Kette-CH<sub>2</sub>-7); 32.5 (Kette-CH<sub>2</sub>-6); 65.7 (CH-3); 71.4 (CH-1); 71.9 (CH-2); 81.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 92.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 129.7 (CH-5); 131.6 (CH-4). **HRMS ESI** [C<sub>27</sub>H<sub>51</sub>O<sub>4</sub>N] cal. [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 454.3891, gef. 454.3892; cal. [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* = 476.3710, gef. 476.3707.

**(E,2R,3S,4R)-3-Aminononadec-5-en-2,4-diol-hydrochlorid (3):**



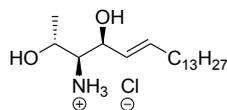
Zur Verbindung **48** (100 mg, 0.22 mmol, 1 Äq.) wurde Salzsäure (4.0 mL, 16.0 mmol, 73 Äq., 4 M in Dioxan) bei 0 °C tropfenweise hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 10 min bei 0 °C und anschließend zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 9:1) gereinigt. Das Produkt **3** (43 mg, 0.12 mmol, **55 %**, **dr** = 93:7 (C3)) wurde als ein weißer Feststoff erhalten. Als Nebenprodukt wurde 1-Methyl-3-chloro-3-desoxysphingosin **7** (9 mg, 0.03 mmol, **12 %**) als weißes Pulver isoliert.

**Für 3:** R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 9:1) = 0.22. **<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 599.9 Hz) δ [ppm] = 0.86 (t, J<sub>1</sub> = 7.0 Hz, J<sub>2</sub> = 7.0 Hz, 3H, Kette-CH<sub>3</sub>); 1.21 (d, J = 6.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-1); 1.25-1.28 (br s, 20H, 10xKette-CH<sub>2</sub>); 1.36-1.40 (m, 2H, Kette-CH<sub>2</sub>); 2.07 (dd, J<sub>1</sub> = 14.5 Hz, J<sub>2</sub> = 7.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 2.94 (dd, J<sub>1</sub> = 6.0 Hz, J<sub>2</sub> = 4.8 Hz, 1H, CH-2); 3.30 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>); 3.76 (qd, J<sub>1</sub> = 13.3 Hz, J<sub>2</sub> = 6.7 Hz, 1H, CH-1); 4.24 (dd, J<sub>1</sub> = 5.7 Hz, J<sub>2</sub> = 4.7 Hz, 1H, CH-3); 5.44 (dd, J<sub>1</sub> = 15.3 Hz, J<sub>2</sub> = 7.3 Hz, 1H, CH-4); 5.83 (dd, J<sub>1</sub> = 14.6 Hz, J<sub>2</sub> = 6.8 Hz, 1H, CH-5). **<sup>13</sup>C APT NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 125.8 Hz) δ [ppm] = 14.5 (CH<sub>3</sub>); 20.9 (CH<sub>3</sub>-1); 23.8 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.2 (Kette-

CH<sub>2</sub>); 30.4 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.5 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.7 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.8 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.8 (Kette-CH<sub>2</sub>); 33.1 (CH<sub>2</sub>-7); 33.5 (CH<sub>2</sub>-6); 62.7 (CH-2); 65.6 (CH-1); 70.9 (CH-3); 127.4 (CH-4); 137.4 (CH-5).  $[\alpha]^{20}_D = -1.8^\circ$  (c 1.09, MeOH). **HRMS ESI** [C<sub>19</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>2</sub>] cal. [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 314.3054, gef. 314.3054.

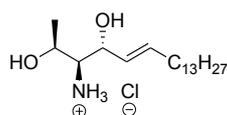
**Für 7:** *R<sub>f</sub>* (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 9:1) = 0.29. **<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 500.1 Hz) δ [ppm] = 0.85 (t, *J*<sub>1</sub> = 7.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.0 Hz, 3H, Kette-CH<sub>3</sub>); 1.16 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-1); 1.24 (br s, 20H, 10xKette-CH<sub>2</sub>); 1.37-1.41 (m, 2H, Kette-CH<sub>2</sub>); 1.77 (dt, *J*<sub>1</sub> = 8.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 3.41 (dt, *J*<sub>1</sub> = 8.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.0 Hz, 1H, CH-2); 3.66 (dq, *J*<sub>1</sub> = 14.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.3 Hz, 1H, CH-1); 4.44 (dd, *J*<sub>1</sub> = 14.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.9 Hz, 1H, CH-3); 5.41 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 15.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 8.7 Hz, *J*<sub>3</sub> = 4.3 Hz, 1H, CH-4); 5.97 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 15.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 8.0 Hz, *J*<sub>3</sub> = 2.2 Hz, 1H, CH-5). **<sup>13</sup>C APT NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 125.8 Hz) δ [ppm] = 14.5 (Kette-CH<sub>3</sub>); 20.6 (CH<sub>3</sub>-1); 23.8 (Kette-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 27.4/27.6 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.1 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.2 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.5 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.7 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.7 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.8 (Kette-CH<sub>2</sub>); 33.1 (Kette-CH<sub>2</sub>-7); 33.5 (CH<sub>2</sub>-6); 60.5 (CH-2); 62.3/62.5 (CH-1); 68.6/68.7 (CH-3); 127.1 (CH-4); 139.6/139.8 (CH-5). **HRMS ESI** [C<sub>19</sub>H<sub>38</sub>ClNO] cal. [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 332.2, gef. 332,3.

**(E,2R,3S,4S)-3-Aminononadec-5-en-2,4-diol-hydrochlorid (4):**



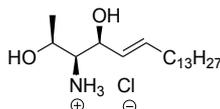
Die Verbindung **49** (200 mg, 0.44 mmol, 1 Äq.) wurde nach der gleichen Vorschrift wie bei **3** umgesetzt. Das Produkt **4** (120 mg, 0.34 mmol, **78 %**, **dr** = 99:1 (C3)) wurde als weißer Feststoff erhalten.

*R<sub>f</sub>* (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 9:1) = 0.19. **<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 500.1 Hz) δ [ppm] = 0.83 (t, *J*<sub>1</sub> = 6.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.9 Hz, 3H, Kette-CH<sub>3</sub>); 1.20-1.31 (br s, 23H, 10xKette-CH<sub>2</sub> und CH<sub>3</sub>-1); 1.33-1.37 (m, 2H, Kette-CH<sub>2</sub>); 2.04 (dd, *J*<sub>1</sub> = 14.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 2.73 (dd, *J*<sub>1</sub> = 5.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.1 Hz, 1H, CH-2); 3.28 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>); 3.87 (td, *J*<sub>1</sub> = 11.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.7 Hz, 1H, CH-1); 4.14 (dd, *J*<sub>1</sub> = 7.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.1 Hz, 1H, CH-3); 5.41 (dd, *J*<sub>1</sub> = 15.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.1 Hz, 1H, CH-4); 5.83 (td, *J*<sub>1</sub> = 14.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.8 Hz, 1H, CH-5). **<sup>13</sup>C APT NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 125.8 Hz) δ [ppm] = 14.5 (Kette-CH<sub>3</sub>); 20.9 (CH<sub>3</sub>-1); 23.8 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.2 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.4 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.5 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.6 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.8 (Kette-CH<sub>2</sub>); 33.1 (CH<sub>2</sub>-7); 33.4 (CH<sub>2</sub>-6); 62.7 (CH-2); 65.0 (CH-1); 71.1 (CH-3); 129.9 (CH-4); 136.8 (CH-5).  $[\alpha]^{20}_D = -6.8^\circ$  (c 1.09, MeOH). **HRMS ESI** [C<sub>19</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>2</sub>] cal. [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 314.3054, gef. 314.3056; cal. [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* = 336.2873, gef. 336.2877.

**(E,2S,3S,4R)-3-Aminononadec-5-en-2,4-diol-hydrochlorid (5):**

Die Verbindung **50** (91 mg, 0.19 mmol, 1 Äq.) wurde nach der gleichen Vorschrift wie bei **3** umgesetzt. Es wurde **5** (31 mg, 0.09 mmol, **47 %**, **dr** = 100:0 (C3)) als weißer Feststoff erhalten.

**R<sub>f</sub>** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 9:1) = 0.13. **<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 500.1 Hz) δ [ppm] = 0.85 (t, *J*<sub>1</sub> = 6.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.7 Hz, 3H, Kette-CH<sub>3</sub>); 1.12 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-1); 1.24 (br s, 20H, 10xKette-CH<sub>2</sub>); 1.35-1.37 (m, 2H, Kette-CH<sub>2</sub>); 2.04 (td, *J*<sub>1</sub> = 9.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 2.91 (td, *J*<sub>1</sub> = 10.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 3.2 Hz, 1H, CH-2); 3.86 (dd, *J*<sub>1</sub> = 5.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.3 Hz, 1H, CH-1); 4.05 (dd, *J*<sub>1</sub> = 12.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.3 Hz, 1H, CH-3); 5.42 (dd, *J*<sub>1</sub> = 15.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.4 Hz, 1H, CH-4); 5.96 (td, *J*<sub>1</sub> = 14.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.8 Hz, 1H, CH-5). **<sup>13</sup>C APT NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 125.8 Hz) δ [ppm] = 14.5 (Kette-CH<sub>3</sub>); 17.8 (CH<sub>3</sub>-1); 23.8 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.2 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.4 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.5 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.7 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.8 (Kette-CH<sub>2</sub>); 33.1 (Kette-CH<sub>2</sub>-7); 33.4 (Kette-CH<sub>2</sub>-6); 62.1 (CH-2); 66.4 (CH-1); 71.7 (CH-3); 130.3 (CH-4); 136.4 (CH-5). **[α]<sup>20</sup><sub>D</sub>** = -1.0° (c 0.80, MeOH). **HRMS ESI** [C<sub>19</sub>H<sub>39</sub>O<sub>2</sub>N] cal. [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 314.3054, gef. 314.3055; cal. [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* = 336.2873, gef. 336.2876.

**(E,2S,3S,4S)-3-Aminononadec-5-en-2,4-diol-hydrochlorid (6):**

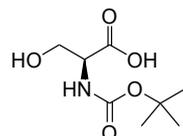
Die Verbindung **51** (91 mg, 0.19 mmol, 1 Äq.) wurde nach der gleichen Vorschrift wie bei **3** umgesetzt. Es wurde **6** (22 mg, 0.06 mmol, **32 %**, **dr** = 100:0 (C3)) als weißer Feststoff erhalten.

**R<sub>f</sub>** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 9:1) = 0.14. **<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 500.1 Hz) δ [ppm] = 0.86 (t, *J*<sub>1</sub> = 6.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.9 Hz, 3H, Kette-CH<sub>3</sub>); 1.17 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-1); 1.25 (br s, 20H, 10xKette-CH<sub>2</sub>); 1.28-1.29 (m, 2H, Kette-CH<sub>2</sub>); 2.06 (q, *J*<sub>1</sub> = 7.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 2.77 (t, *J*<sub>1</sub> = 5.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.2 Hz, 1H, CH-2); 3.83 (td, *J*<sub>1</sub> = 11.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.9 Hz, 1H, CH-1); 4.11 (t, *J*<sub>1</sub> = 6.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.2 Hz, 1H, CH-3); 5.47 (dd, *J*<sub>1</sub> = 15.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.3 Hz, 1H, CH-4); 5.96 (td, *J*<sub>1</sub> = 14.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.8 Hz, 1H, CH-5). **<sup>13</sup>C APT NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 125.8 Hz) δ [ppm] = 14.5 (Kette-CH<sub>3</sub>); 18.8 (CH<sub>3</sub>-1); 23.8 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.4 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.4 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.5 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.7 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.8 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.8 (Kette-CH<sub>2</sub>); 33.1 (Kette-CH<sub>2</sub>-7); 33.5 (Kette-CH<sub>2</sub>-6); 61.8

(CH-2); 68.2 (CH-1); 73.8 (CH-3); 129.9 (CH-4); 135.9 (CH-5).  $[\alpha]^{20}_D = -2.7^\circ$  (c 0.79, MeOH). **HRMS ESI**  $[C_{19}H_{39}O_2N]$  cal.  $[M+H]^+$   $m/z = 314.3054$ , gef. 314.3053.

### 6.2.6 Synthese von 3-Chloro-3-desoxysphingosin 8

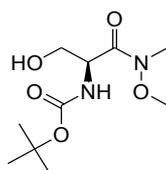
#### L-Boc-Serin (52):



Zu einer Lösung aus L-Serin (2.0 g, 19.03 mmol, 1 Äq.) und  $\text{NaHCO}_3$  (2.39 g, 27.78 mmol, 1.46 Äq.) in destilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  (41.0 mL) und MeOH (41.0 mL) wurde Di-*tert*-butyl-dicarbonat (6.1 g, 28.55 mmol, 1.5 Äq.) hinzugegeben. Die Mischung wurde 64 h bei Raumtemperatur gerührt und daraufhin auf die Hälfte des Volumens unter vermindertem Druck eingengt. Der Rückstand wurde durch die Zugabe von 1 %-iger HCl-Lösung auf pH 2 angesäuert und dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden daraufhin mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan: EtOAc 1:4  $\rightarrow$  1:9) gereinigt. Es wurde **52** (3.49 g, 16.98 mmol, **89 %**) als farbloses viskoses Öl erhalten.

$R_f$  (EtOAc:MeOH 1:1) = 0.55.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300.1 MHz)  $\delta$  [ppm] = 1.42 (br s, 9H, Boc- $\text{CH}_3$ ); 3.72-3.85 (m, 1H,  $\text{CH}_{2a-1}$ ); 3.05-4.01 (m, 1H,  $\text{CH}_{2b-1}$ ); 4.16-4.34 (m, 1H, CH-2); 5.77 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H, NH); 7.59 (br s, 1H, COOH).  $^{13}\text{C APT NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 75.5 MHz)  $\delta$  [ppm] = 28.1 (Boc- $\text{CH}_3$ ); 55.1/56.5 (CH); 60.2/62.7 ( $\text{CH}_2$ ); 80.4 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 155.9 (Boc-CO); 173.7 (COOH). Im NMR-Spektrum sind die Signale von EtOAc zu erkennen.  $[\alpha]^{32}_D = +3.9^\circ$  (c 3.00, MeOH) {Ref.<sup>[235]</sup>  $[\alpha]^{25} + 13.2^\circ$ , c 3.00}. **HRMS ES**  $[C_8H_{15}NO_5]$  cal.  $[M+H]^+$   $m/z = 206.1023$ , gef. 206.1023; cal.  $[M-H]^-$   $m/z = 204.0877$ , gef. 204.0876.

#### *tert*-Butyl-(S)-1-(*N*-methoxy-*N*-methylcarbamoyl)-2-hydroxyethylcarbammat (53):

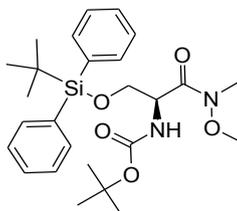


Verbindung **52** (3.48 g, 16.96 mmol, 1 Äq.) wurde in trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (70.0 mL) gelöst und es wurden *N,O*-Dimethylhydroxylamin-hydrochlorid (1.69 g, 17.41 mmol, 1.03 Äq.) und *N*-Methylmorpholin (1.92 mL, 17.41 mmol, 1.03 Äq.) bei  $-15^\circ\text{C}$  hinzugegeben. Anschließend

wurde *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-hydrochlorid (3.34 g, 17.41 mmol, 1.03 Äq.) portionsweise über 30 min addiert. Die Mischung wurde bei -15 °C für zwei Stunden gerührt und die Reaktion durch die Zugabe von eiskalter 1 M HCl-Lösung gestoppt. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige Phase dreimal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Daraufhin wurde die wässrige Phase nochmals dreimal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan:EtOAc 1:4 → 1:9) gereinigt. Es wurde **53** (2.94 g, 11.83 mmol, **70 %**) als weißer Feststoff erhalten.

$R_f$  (EtOAc:MeOH 1:1) = 0.62. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>; 500.1 MHz) δ [ppm] = 1.39 (s, 9H, Boc-CH<sub>3</sub>); 3.17 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>); 3.74 (s, 3H, NOCH<sub>3</sub>), 3.77 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-1); 4.75 (br s, 1H, CH-2); 5.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, NH). <sup>13</sup>C APT NMR (CDCl<sub>3</sub>; 125.8 MHz) δ [ppm] = 27.9 (Boc-CH<sub>3</sub>); 31.7 (NCH<sub>3</sub>); 51.1 (CH-2); 61.1 (NOCH<sub>3</sub>); 62.9 (CH<sub>2</sub>-1); 79.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 156.4 (Boc-CO); 170.6 (COONMeOMe).  $[\alpha]_D^{20} = -14.7^\circ$  (c 0.99, MeOH) {Ref.<sup>[179]</sup>  $[\alpha] = -14.8^\circ$ , c 1.38}. HRMS ESI [C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>] cal. [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 249.1445, gef. 249.1446; cal. [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* = 271.1264, gef. 271.1264.

***tert*-Butyl-(*S*)-1-(*N*-methoxy-*N*-methylcarbamoyl)-2-*tert*-butyldiphenylsilyloxyethyl-carbamat (**54**):**

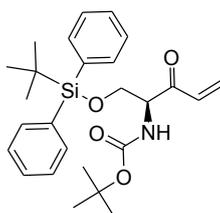


Die Verbindung **53** (3.16 g, 12.70 mmol, 1 Äq.) wurde in trockenem DMF (25.2 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Daraufhin wurden Imidazol (1.03 g, 15.24 mmol, 1.2 Äq.) und *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (3.6 mL, 13.3 mmol, 1.05 Äq.) der Lösung hinzugegeben. Nach 20 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch die Zugabe von Eis gestoppt. Die wässrige Phase wurde viermal mit Et<sub>2</sub>O extrahiert und die vereinigten organischen Phasen erst mit destilliertem Wasser, dann mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan: EtOAc 1:9) gereinigt. Es wurde **54** (5.49 g, 11.27 mmol, **89 %**) als farbloses viskoses Öl erhalten.

$R_f$  (EtOAc:Cyclohexan 9:1) = 0.77. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>; 500.1 MHz) δ [ppm] = 1.03-1.07 (m, 9H, Si*t*Bu); 1.44 (s, 9H, Boc-CH<sub>3</sub>); 3.19 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>); 3.66 (s, 3H, NOCH<sub>3</sub>), 3.86 (d, *J* = 4.7 Hz,

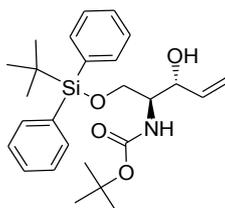
2H,  $CH_2$ -1); 4.83 (br s, 1H,  $CH$ -2); 5.42 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H,  $NH$ ); 7.36-7.42 (m, 6H,  $Ar$ - $H$ ); 7.62-7.77 (m, 4H,  $Ar$ - $H$ ).  $^{13}C$  APT NMR ( $CDCl_3$ ; 125.8 MHz)  $\delta$  [ppm] = 25.9 ( $Si$ tBu); 27.7 ( $Boc$ - $CH_3$ ); 51.7 ( $CH$ -2); 60.7 ( $NOCH_3$ ); 63.3 ( $CH_2$ -1); 78.8 ( $C(CH_3)_3$ ); 126.9 ( $Ar$ - $CH$ ); 129.0 ( $Ar$ - $CH$ ); 132.4 ( $Ar$ - $C$ ); 134.9 ( $Ar$ - $CH$ ); 156.6 ( $Boc$ - $CO$ ). Im NMR-Spektrum sind die Signale von EtOAc zu erkennen.  $[\alpha]^{20}_D = +18.5$  (c 1.00,  $CHCl_3$ ). HRMS ESI [ $C_{26}H_{38}N_2O_5Si$ ] cal.  $[M+H]^+$   $m/z = 487.2623$ , gef. 487.2649; cal.  $[2M+Na]^+$   $m/z = 995.4992$ , gef. 995.5045.

**tert-Butyl-(S)-1-tert-butyldiphenylsilyloxy-3-oxopent-4-en-2-ylcarbammat (55):**



Die Lösung aus **54** (7.37 g, 15.15 mmol, 1 Äq.) in trockenem THF (100.0 mL) wurde auf  $-20$  °C gekühlt und Vinylmagnesiumbromid (35.0 mL, 35.0 mmol, 1 M in THF, 2.3 Äq.) über 1.5 h hinzugetropft. Anschließend wurde die Mischung für zehn Minuten bei  $-20$  °C und dann für weitere 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch die langsame Zugabe von eiskalter 1 M HCl-Lösung gestoppt. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige Phase dreimal mit EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $Na_2SO_4$  getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan: EtOAc 9:1  $\rightarrow$  3:1) gereinigt. Es wurde **55** (3.54 g, 9.67 mmol, **64** %) als gelbliches Öl, welches im Kühlschrank zu einem weißen kristallinen Feststoff auskristallisierte, erhalten. Es konnten **28** % des Ausgangsstoffs zurückgewonnen werden.

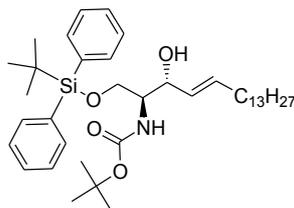
$R_f$  (Cyclohexan:EtOAc 5.5:1.5) = 0.66.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ; 500.1 MHz)  $\delta$  [ppm] = 1.01 (s, 9H,  $Si$ tBu); 1.45 (s, 9H,  $Boc$ - $CH_3$ ); 3.97 (ddd,  $J_1 = 34.2$  Hz,  $J_2 = 10.5$  Hz,  $J_3 = 3.8$  Hz, 2H,  $CH_2$ -1); 4.67 (td,  $J_1 = 7.6$  Hz,  $J_2 = 3.7$  Hz, 1H,  $CH$ -2); 5.60 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H,  $NH$ ); 5.82 (d,  $J = 10.6$  Hz, 1H,  $CH_{2a}$ -5); 6.32-6.35 (m, 1H,  $CH_{2b}$ -5); 6.51 (dd,  $J_1 = 17.5$  Hz,  $J_2 = 10.6$  Hz, 1H,  $CH$ -4); 7.35-7.44 (m, 6H,  $Ar$ - $H$ ); 7.62-7.77 (m, 4H,  $Ar$ - $H$ ).  $^{13}C$  APT NMR ( $CDCl_3$ ; 125.8 MHz)  $\delta$  [ppm] = 26.7 ( $Si$ tBu); 28.3 ( $Boc$ - $CH_3$ ); 59.4 ( $CH$ -2); 64.1 ( $CH_2$ -1); 79.7 ( $C(CH_3)_3$ ); 127.7 ( $Ar$ - $CH$ ); 129.6 ( $CH_2$ -5); 129.8 ( $Ar$ - $CH$ ); 132.7 ( $Ar$ - $C$ ); 132.8 ( $Ar$ - $C$ ); 133.1 ( $CH$ -4); 135.5 ( $Ar$ - $CH$ ); 135.6 ( $Ar$ - $CH$ ); 155.3 ( $Boc$ - $CO$ ); 196.6 ( $COO$ ). Im NMR-Spektrum sind die Signale von EtOAc zu erkennen.  $[\alpha]^{20}_D = +53.5$  (c 1.00,  $CHCl_3$ ). HRMS ESI [ $C_{26}H_{35}NO_4Si$ ] cal.  $[M+H]^+$   $m/z = 454.2408$ , gef. 454.2412; cal.  $[M+Na]^+$   $m/z = 476.2228$ , gef. 476.2230.

**tert-Butyl-(2S,3R)-3-hydroxy-1-tert-butylidiphenylsilyloxypent-4-en-2-ylcarbamat (56):**

Die Verbindung **55** (500 mg, 1.10 mmol, 1 Äq.) wurde in trockenem THF (0.5 mL) gelöst und mit EtOH (1.7 mL) versetzt. Die resultierende Lösung wurde auf  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt und es wurde Lithium-tri-*tert*-butoxyaluminumhydrid (617 mg, 2.42 mmol, 2.2 Äq.), gelöst in trockenem THF (2.6 mL), über 1.5 h hinzugegossen. Nach einer Stunde Rühren bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurde die Reaktion durch die Zugabe von eiskalter 1 M HCl-Lösung (5.9 mL) gestoppt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan: EtOAc 100:0  $\rightarrow$  9:1) gereinigt. Es wurde **56** (262 mg, 0.58 mmol, **52 %**) als farbloses Öl erhalten.

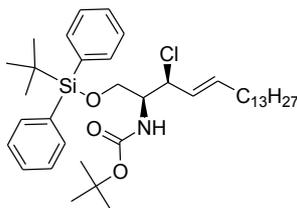
$R_f$  (Cyclohexan:EtOAc 15:5) = 0.45.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 500.1 MHz)  $\delta$  [ppm] = 1.01 (s, 9H, *Sit*Bu); 1.41 (s, 9H, Boc- $\text{CH}_3$ ); 3.65-3.68 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ); 3.74 (dq,  $J_1 = 10.2\text{ Hz}$ ,  $J_2 = 5.4\text{ Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_2$ -1); 4.11 (tt,  $J_1 = 6.5\text{ Hz}$ ,  $J_2 = 1.2\text{ Hz}$ , 1H,  $\text{CH}_3$ ); 5.07-5.09 (m, 1H,  $\text{CH}_{2a}$ -5); 5.20-5.24 (m, 1H,  $\text{CH}_{2b}$ -5); 5.82 (ddd,  $J_1 = 16.9\text{ Hz}$ ,  $J_2 = 10.5\text{ Hz}$ ,  $J_3 = 6.2\text{ Hz}$ , 1H,  $\text{CH}_4$ ); 7.36-7.41 (m, 6H, Ar-H); 7.64-7.67 (m, 4H, Ar-H).  $^{13}\text{C APT NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 125.8 MHz)  $\delta$  [ppm] = 20.1 (*tert*C-Si); 27.4 (*Sit*Bu); 28.9 (Boc- $\text{CH}_3$ ); 58.1 ( $\text{CH}_2$ ); 64.3 ( $\text{CH}_2$ -1); 73.7 ( $\text{CH}_3$ ); 80.2 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 116.6 ( $\text{CH}_2$ -5); 128.9 (Ar-CH); 130.9 (Ar-CH); 136.8 (Ar-CH); 139.6 ( $\text{CH}_4$ ). **HRMS ESI** [ $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{NO}_4\text{Si}$ ] cal.  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 456.2565$ , gef. 456.2565; cal.  $[\text{M}-\text{H}]^- m/z = 454.2419$ , gef. 454.2418.

**tert-Butyl-(E,2S,3R)-3-hydroxy-1-tert-butylidiphenylsilyloxyoctadec-4-en-2-ylcarbamat (57):**



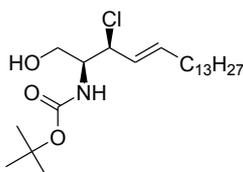
Zu einer Lösung aus **56** (542 mg, 1.19 mmol, 1 Äq.) in trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8.9 mL) wurden 1-Pentadecen (1.46 mL, 5.35 mmol, 4.5 Äq.) und Grubbs Katalysator zweiter Generation (30 mg, 0.04 mmol, 0.03 Äq.) hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde daraufhin vier Stunden unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von Kalium-2-*iso*-cyanoacetat (19 mg, 0.16 mmol, 0.13 Äq.), gelöst in MeOH (1.0 mL), gestoppt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan:EtOAc 20:1  $\rightarrow$  15:1) gereinigt. Es wurde **57** (355.5 mg, 0.56 mmol, 47 %) als farbloses Öl erhalten.

$R_f$  (Cyclohexan:EtOAc 15:5) = 0.68.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500.1 MHz)  $\delta$  [ppm] = 0.88 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H, Kette- $\text{CH}_3$ ); 1.07 (s, 9H, Si $t$ Bu); 1.26-1.28 (m, 20H, 10xKette- $\text{CH}_2$ ); 1.34-1.37 (m, 2H, Kette- $\text{CH}_2$ ); 1.45 (s, 9H, Boc- $\text{CH}_3$ ); 2.03 (dd,  $J_1$  = 14.2 Hz,  $J_2$  = 7.1 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -6); 3.65-3.66 (m, 1H,  $\text{CH}$ -2); 3.74-3.76 (m, 1H,  $\text{CH}_{2a}$ -1); 3.90 (dd,  $J_1$  = 10.5 Hz,  $J_2$  = 3.6 Hz, 2H,  $\text{CH}_{2b}$ -1); 4.24 (t,  $J_1$  = 4.9 Hz, 1H,  $\text{CH}$ -3); 5.21 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, NH); 5.48 (tdd,  $J_1$  = 15.3 Hz,  $J_2$  = 5.9 Hz,  $J_3$  = 1.2 Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ -5); 5.75-5.81 (m, 1H,  $\text{CH}$ -4); 7.37-7.45 (m, 6H, Ar- $H$ ); 7.63-7.66 (m, 4H, Ar- $H$ ).  $^{13}\text{C APT NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 125.8 MHz)  $\delta$  [ppm] = 14.1 (Kette- $\text{CH}_3$ ); 19.1 (*tert*C-Si); 22.7 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 26.8 (Si $t$ Bu); 28.4 (Boc- $\text{CH}_3$ ); 29.2 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.3 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.4 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.5 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.7 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 31.9 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 32.3 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 54.9 ( $\text{CH}$ -2); 64.1 ( $\text{CH}_2$ -1); 74.4 ( $\text{CH}$ -3); 79.5 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 127.8 (Ar- $\text{CH}$ ); 129.1 ( $\text{CH}$ -4); 129.7 (Ar- $\text{CH}$ ); 132.6 (Ar-C); 133.4 ( $\text{CH}_2$ -5); 135.5 (Ar- $\text{CH}$ ). **HRMS ESI** [ $\text{C}_{39}\text{H}_{63}\text{NO}_4\text{Si}$ ] cal. [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$   $m/z$  = 638.4599, gef. 638.4597; cal. [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$   $m/z$  = 660.4419, gef. 660.4418.

**tert-Butyl-(E,2S,3S)-3-chloro-1-tert-butylidiphenylsilyloxyoctadec-4-en-2-ylcarbamat (58):**

Zu einer Lösung aus **57** (551 mg, 0.81 mmol, 1 Äq.) in trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3.0 mL) wurden  $\text{CCl}_4$  (4.7 ml, 48.18 mmol, 60 Äq.) und  $\text{PPh}_3$  (635 mg, 2.42 mmol, 3 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 16 h auf 40 °C erwärmt und für 33 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan:EtOAc 20:1) gereinigt. Es wurde **58** (377 mg, 0.57 mmol, 71 %) als gelbliches Öl erhalten.

$R_f$  (Cyclohexan:EtOAc 15:5) = 0.89.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500.1 MHz)  $\delta$  [ppm] = 0.88 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3H, Kette- $\text{CH}_3$ ); 1.06/1.07 (s, 9H, Si $t$ Bu); 1.26-1.28 (m, 20H, 10xKette- $\text{CH}_2$ ); 1.36-1.39 (m, 2H, Kette- $\text{CH}_2$ ); 1.42/1.43 (s, 9H, Boc- $\text{CH}_3$ ); 2.03 (q,  $J$  = 6.9 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -6); 3.65 (dd,  $J_1$  = 10.0 Hz,  $J_2$  = 7.4 Hz, 1H,  $\text{CH}_{2a}$ -1); 3.73 (dd,  $J_1$  = 10.0 Hz,  $J_2$  = 4.8 Hz, 1H,  $\text{CH}_{2b}$ -1); 4.01-4.05 (m, 1H,  $\text{CH}$ -2); 4.76 (d,  $J$  = 9.8 Hz, 1H, NH); 4.85 (dd,  $J_1$  = 8.5 Hz,  $J_2$  = 3.5 Hz, 1H,  $\text{CH}$ -3); 5.60 (dd,  $J_1$  = 15.1 Hz,  $J_2$  = 8.7 Hz, 1H,  $\text{CH}$ -5); 5.81 (td,  $J_1$  = 13.7 Hz,  $J_2$  = 6.6 Hz, 1H,  $\text{CH}$ -4); 7.37-7.44 (m, 6H, Ar- $H$ ); 7.64-7.66 (m, 4H, Ar- $H$ ).  $^{13}\text{C APT NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 125.8 MHz)  $\delta$  [ppm] = 14.1 (Kette- $\text{CH}_3$ ); 19.2 (*tert*C-Si); 22.7 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 26.8 (Si $t$ Bu); 28.3 (Boc- $\text{CH}_3$ ); 28.8 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.3 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.4 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.5 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.6 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.7 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 31.9 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 32.1 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 55.7 ( $\text{CH}$ -2); 63.1 ( $\text{CH}_2$ -1); 63.4 ( $\text{CH}$ -3); 127.3 ( $\text{CH}$ -4); 127.8 (Ar- $\text{CH}$ ); 129.8 (Ar- $\text{CH}$ ); 135.5 ( $\text{CH}$ -5); 135.6 (Ar- $\text{CH}$ ). **HRMS ESI** [ $\text{C}_{39}\text{H}_{62}\text{ClNO}_4\text{Si}$ ] cal.  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  = 656.4, gef. 656.2; cal.  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  = 658.4, gef. 678.5.

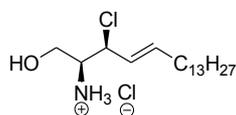
**tert-Butyl-(E,2S,3S)-3-chloro-1-hydroxyoctadec-4-en-2-ylcarbamat (59):**

Die Lösung aus **58** (38 mg, 0.06 mmol, 1 Äq.) in trockenem THF (0.6 mL) wurde auf 0 °C gekühlt und mit Tetrabutylammoniumfluorid (0.12 mL, 0.12 mmol, 1 M in THF, 2 Äq.) versetzt. Nachdem die Mischung für fünf Minuten bei 0 °C und anschließend für 3.5 h bei

Raumtemperatur gerührt wurde, wurde die Reaktion durch die Zugabe von gesättigter  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung (1.0 mL) gestoppt. Die Mischung wurde mit EtOAc und etwas destilliertem Wasser verdünnt und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan: EtOAc 6:1) gereinigt. Es wurde **59** (20 mg, 0.05 mmol, **82 %**) als farbloses Öl erhalten.

$R_f$  (Cyclohexan:EtOAc 15:5) = 0.39. **HRMS ESI** [ $\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{ClNO}_3$ ] cal.  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  = 418.3082, gef. 418.3082; cal.  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z$  = 440.2902, gef. 440.2900.

**(E,2S,3S)-2-Amino-3-chlorooctadec-4-en-1-ol-hydrochlorid (8):**



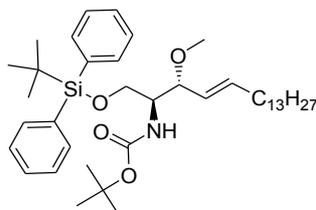
Zu der Verbindung **59** (40.5 mg, 0.06 mmol, 1 Äq.) wurde Salzsäure (1.13 mL, 4.50 mmol, 73 Äq., 4 M in Dioxan) bei 0 °C hinzugegeben. Anschließend wurde die Reaktion zehn Minuten bei 0 °C und dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde in einen Falcon tube® überführt, mit eiskaltem  $\text{Et}_2\text{O}$  überschichtet und für eine Stunde bei -40 °C gekühlt. Daraufhin wurde der Falcon tube® bei 4000 rpm und 25 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Die Mutterlauge wurde bis auf 0.5 mL entfernt und der Feststoff mit etwas Dioxan und eiskaltem  $\text{Et}_2\text{O}$  versetzt. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt und die Mutterlauge über Nacht bei -40 °C gekühlt. Die zweite Fällung erfolgte nach der oben genannten Prozedur. Der resultierende Feststoff wurde über Nacht unter vermindertem Druck getrocknet. Es wurde **8** (6 mg, 17.6  $\mu\text{mol}$ , **29 %**) als weißer Feststoff erhalten.

$R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 9:1) = 0.11.  **$^1\text{H NMR}$**  ( $\text{SO}(\text{CD}_3)_2$ ; 500.1 MHz)  $\delta$  [ppm] = 0.85 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3H, Kette- $\text{CH}_3$ ); 1.24 (br s, 20H, 10xKette- $\text{CH}_2$ ); 1.34-1.36 (m, 2H, Kette- $\text{CH}_2$ ); 1.99-2.05 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -6); 3.37 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ); 3.51 (dd,  $J_1$  = 10.8 Hz,  $J_2$  = 5.0 Hz, 1H,  $\text{CH}_{2a}$ -1); 3.56 (m, 1H, OH); 3.65 (dd,  $J_1$  = 11.9 Hz,  $J_2$  = 2.6 Hz, 1H,  $\text{CH}_{2b}$ -1); 4.76 (dd,  $J_1$  = 9.1 Hz,  $J_2$  = 8.0 Hz, 1H,  $\text{CH}$ -3); 4.85 (dd,  $J_1$  = 8.5 Hz,  $J_2$  = 3.5 Hz, 1H,  $\text{CH}$ -3); 5.64 (td,  $J_1$  = 14.8 Hz,  $J_2$  = 6.8 Hz, 1H,  $\text{CH}$ -4); 5.90 (td,  $J_1$  = 14.8 Hz,  $J_2$  = 6.8 Hz, 1H,  $\text{CH}$ -5), 8.26 (br s,  $\text{NH}_2$ ).  **$^{13}\text{C APT NMR}$**  ( $\text{SO}(\text{CD}_3)_2$ ; 125.8 MHz)  $\delta$  [ppm] = 13.9 (Kette- $\text{CH}_3$ ); 22.0 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 27.9 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 28.4 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 28.6 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 28.7 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 28.9 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 31.2 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 31.3 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 56.7 ( $\text{CH}$ -2); 58.7 ( $\text{CH}_2$ -1); 61.2 ( $\text{CH}$ -3); 125.9 ( $\text{CH}$ -4); 137.1 ( $\text{CH}$ -5). Im NMR-Spektrum sind die Signale des hydrolysierten Derivates ( $^1\text{H}$ : 2.87 ppm, 4.02 ppm, 5.21 ppm, 5.44 ppm, 7.80 ppm/66.3 ppm, 68.8 ppm, 129.3 ppm, 133.5 ppm) zu erkennen. **HRMS ESI**

$[C_{18}H_{36}ClNO]$  cal.  $[M+H]^+$   $m/z = 318.2558$ , gef. 318.2553; cal.  $[M+Na]^+$   $m/z = 340.2378$ , gef. 340.2374.

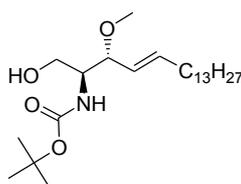
### 6.2.7 Synthese von 3-Desoxy-3-methoxysphingosin 9

#### **tert-Butyl-(E,2S,3R)-1-tert-butylidiphenylsilyloxy-3-methoxyoctadec-4-en-2-ylcarbamat (60):**



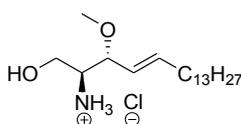
Zu einer eisgekühlten Lösung aus **57** (259 mg, 0.41 mmol, 1 Äq.) in trockenem THF (1.6 mL) wurde NaH (19 mg, 0.45 mmol, 1.1 Äq., 60 % in Mineralöl) hinzugegeben und die Reaktion bei 0 °C für eine Stunde gerührt. Anschließend wurde MeI (51 µL, 0.81 mmol, 2 Äq.) tropfenweise hinzugegeben und die Reaktionsmischung für weitere zehn Minuten bei 0 °C sowie über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von eiskalter  $NH_4OH$ -Lösung (1.3 mL, 25 %) gestoppt. Die Mischung wurde mit EtOAc und etwas destilliertem Wasser versetzt und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde einmal mit EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $Na_2SO_4$  getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan: EtOAc 20:1) gereinigt. Es wurde **60** (135.5 mg, 0.21 mmol, **51 %**) als gelbes Öl erhalten.

$R_f$  (Cyclohexan:EtOAc 15:5) = 0.85.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ; 400.1 MHz)  $\delta$  [ppm] = 0.88 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, Kette- $CH_3$ ); 1.06 (s, 9H, Si*t*Bu); 1.26 (br s, 20H, 10xKette- $CH_2$ ); 1.32-1.38 (m, 2H, Kette- $CH_2$ ); 1.43 (s, 9H, Boc- $CH_3$ ); 2.02-2.03 (m, 2H,  $CH_2$ -6); 3.21 (br s, 3H,  $OCH_3$ ); 3.64-3.72 (m, 3H,  $CH_2$ -1 und  $CH$ -2); 3.91 (dd,  $J_1 = 8.2$  Hz,  $J_2 = 0.7$  Hz, 1H,  $CH$ -3); 4.79 (d,  $J_1 = 8.9$  Hz, 1H,  $NH$ ); 5.27 (dd,  $J_1 = 15.3$  Hz,  $J_2 = 8.3$  Hz, 1H,  $CH$ -4); 5.66 (td,  $J_1 = 13.4$  Hz,  $J_2 = 6.4$  Hz, 1H,  $CH$ -5); 7.38-7.42 (m, 6H, Ar- $H$ ); 7.64-7.68 (m, 4H, Ar- $H$ ).  $^{13}C$  APT NMR ( $CDCl_3$ ; 100.6 MHz)  $\delta$  [ppm] = 14.1 (Kette- $CH_3$ ); 19.3 (*tert*C-Si); 22.7 (Kette- $CH_2$ ); 26.9 (Si*t*Bu); 28.4 (Boc- $CH_3$ ); 29.2 (Kette- $CH_2$ ); 29.4 (Kette- $CH_2$ ); 29.5 (Kette- $CH_2$ ); 29.6 (Kette- $CH_2$ ); 29.9 (Kette- $CH_2$ ); 31.9 (Kette- $CH_2$ ); 32.3 (Kette- $CH_2$ ); 56.2 ( $OCH_3$ ); 60.3 ( $CH$ -2); 62.6 ( $CH_2$ -1); 81.7 ( $CH$ -3); 127.1 ( $CH$ -4); 127.7 (Ar- $CH$ ); 129.7 (Ar- $CH$ ); 135.6 (Ar- $CH$ ); 136.6 ( $CH$ -5). Im NMR-Spektrum sind die Signale von Wasser und EtOAc zu erkennen. HRMS ESI  $[C_{40}H_{65}NO_4Si]$  cal.  $[M+H]^+$   $m/z = 652.4756$ , gef. 652.4750; cal.  $[M+Na]^+$   $m/z = 674.4571$ , gef. 674.4571.

**tert-Butyl-(E,2S,3R)-1-hydroxy-3-methoxyoctadec-4-en-2-ylcarbamat (61):**

Die Verbindung **60** (135.5 mg, 0.21 mmol, 1 Äq.) wurde nach der Vorschrift **6.2.47** umgesetzt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan:EtOAc 3:1) gereinigt. Es wurde **61** (76.5 mg, 0.18 mmol, **89 %**) als weißer Feststoff erhalten.

$R_f$  (Cyclohexan:EtOAc 15:5) = 0.25.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 400.1 MHz)  $\delta$  [ppm] = 0.88 (d,  $J = 67.0$  Hz, 3H, Kette- $\text{CH}_3$ ); 1.26-1.29 (m, 20H, 10xKette- $\text{CH}_2$ ); 1.36-1.39 (m, 2H, Kette- $\text{CH}_2$ ); 1.45 (s, 9H, Boc- $\text{CH}_3$ ); 2.06 (td,  $J_1 = 7.9$  Hz,  $J_2 = 4.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -6); 3.27 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.58-3.59 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ -2); 3.77 (ddd,  $J_1 = 14.9$  Hz,  $J_2 = 11.3$  Hz,  $J_3 = 3.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -1); 3.82 (dd,  $J_1 = 6.7$  Hz,  $J_2 = 2.5$  Hz, 1H,  $\text{CH}$ -3); 5.32-5.37 (m, 1H,  $\text{CH}$ -4); 5.75 (td,  $J_1 = 14.2$  Hz,  $J_2 = 6.8$  Hz, 1H,  $\text{CH}$ -5).  $^{13}\text{C APT NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 100.6 MHz)  $\delta$  [ppm] = 14.1 (Kette- $\text{CH}_3$ ); 22.7 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 28.4 (Boc- $\text{CH}_3$ ); 29.1 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.1 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.4 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.6 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.7 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 31.9 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 32.3 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 54.8 ( $\text{OCH}_3$ ); 56.7 ( $\text{CH}$ -2); 62.6 ( $\text{CH}_2$ -1); 84.8 ( $\text{CH}$ -3); 126.2 ( $\text{CH}$ -4); 136.9 ( $\text{CH}$ -5). Im Spektrum ist das Signal von Wasser aus dem Lösungsmittel zu erkennen. **HRMS ESI** [ $\text{C}_{24}\text{H}_{47}\text{NO}_4$ ] cal.  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 414.3578$ , gef. 414.3576; cal.  $[\text{M}+\text{Na}]^+ m/z = 436.3397$ , gef. 436.3397.

**(E,2S,3R)-2-Amino-3-methoxyoctadec-4-en-1-ol-hydrochlorid (9):**

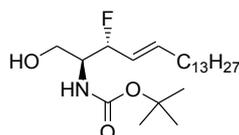
Die Verbindung **61** (75 mg, 0.18 mmol, 1 Äq.) wurde nach der gleichen Vorschrift wie bei **3** umgesetzt. Es wurde **9** (56 mg, 0.16 mmol, **88 %**) als weißes Wachs erhalten.

$R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 9:1) = 0.18.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500.1 Hz)  $\delta$  [ppm] = 0.85 (t,  $J_1 = 7.0$  Hz,  $J_2 = 7.0$  Hz, 3H, Kette- $\text{CH}_3$ ); 1.23-1.26 (m, 20H, 10xKette- $\text{CH}_2$ ); 1.36-1.40 (m, 2H, Kette- $\text{CH}_2$ ); 2.08 (dt,  $J_1 = 7.8$  Hz,  $J_2 = 1.0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ -6); 2.97 (br s, 1H,  $\text{CH}$ -2); 3.22 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.49 (dd,  $J_1 = 11.0$  Hz,  $J_2 = 7.7$  Hz, 1H,  $\text{CH}_{2a}$ -1); 3.61-3.67 (m, 1H,  $\text{CH}_{2b}$ -1 und  $\text{CH}$ -3); 5.27 (dd,  $J_1 = 15.4$  Hz,  $J_2 = 8.5$  Hz, 1H,  $\text{CH}$ -4); 5.96 (td,  $J_1 = 15.0$  Hz,  $J_2 = 6.8$  Hz, 1H,  $\text{CH}$ -5).  $^{13}\text{C APT NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125.8 Hz)  $\delta$  [ppm] = 14.5 (Kette- $\text{CH}_3$ ); 23.8 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 30.3 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 30.3 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 30.5 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 30.6 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 30.8 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 33.1 (Kette- $\text{CH}_2$ -7); 33.4 (Kette- $\text{CH}_2$ -6); 56.6 ( $\text{OCH}_3$ ); 57.5 ( $\text{CH}$ -2); 61.9 ( $\text{CH}_2$ -1); 83.1 ( $\text{CH}$ -3); 126.9

(CH-4); 139.6 (CH-5).  $[\alpha]_D^{20} = -17.3$  (c 1.06, MeOH). **HRMS ESI**  $[C_{19}H_{39}NO_2]$  cal.  $[M+H]^+$   $m/z = 314.3054$ , gef. 314.3053; cal.  $[M+Na]^+$   $m/z = 336.2873$ , gef. 336.2875

### 6.2.8 Synthese von 3-Desoxy-3-fluorosphingosin 10

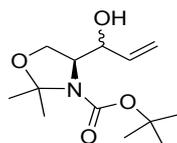
**tert-Butyl-(E,2S,3R)-3-fluoro-1-hydroxyoctadec-4-en-2-ylcarbammat (62):**



In einem Schlenkcolben wurde **59** (37.5 mg, 0.089 mmol, 1 Äq.) in trockenem DMF (0.5 mL) vorgelegt und mit CsF (77.2 mg, 0.54 mmol, 6 Äq.) versetzt. Die Suspension wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur und drei Tage bei 50 °C gerührt. Nach dem Entfernen der flüchtigen Bestandteile wurde der Rückstand säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan:EtOAc 15:5) gereinigt. Es wurde **62** (5 mg, 0.01 mmol, **14 %** zusammen mit **5-F**-Regioisomer) als weißer Feststoff erhalten.

$R_f$  (Cyclohexan:EtOAc 15:5) = 0.28.  $^{13}C$  **APT NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 125.8 Hz)  $\delta$  [ppm] = 14.4 (Kette-CH<sub>3</sub>); 22.9 (Kette-CH<sub>2</sub>); 28.6 (Boc-CH<sub>3</sub>); 29.6 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.7 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.8 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.9 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.9 (Kette-CH<sub>2</sub>); 32.2/32.5 (Kette-CH<sub>2</sub>); 54.6 (CH-2); 66.6 (CH<sub>2</sub>-1); 92.1/93.4 (CH-3); 122.7 (**F-5-CH-4**); 124.7/124.8 (CH-4); 137.9/137.9 (CH-5); 139.4 (**F-5-CH-3**).  $^{19}F$  **NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 470.6 MHz)  $\delta$  [ppm] = -187.2 (F, allylisch).

**(S)-tert-Butyl-4-((R)/(S)-1-hydroxyallyl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-carboxylat (63):**

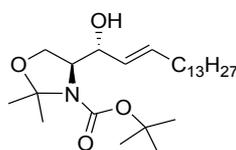


Die Verbindung **25** (1.18 g, 5.15 mmol, 1 Äq.) wurde nach der gleichen Vorschrift wie bei **45/46** umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan/EtOAc 100:0 → 10:1) gereinigt. Es wurde **63** (976 mg, 3.79 mmol, **74 %**) im Verhältnis 2.5:1 (*R*:*S*) als leicht gelbliches Öl erhalten.

$R_f$  (EtOAc:Cyclohexan 1:4) = 0.29.  $^1H$  **NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 500.1 MHz)  $\delta$  [ppm] = 1.41-1.47 (m, 18H, *R*-Boc-CH<sub>3</sub> und *R*-Oxazolidin-CH<sub>3</sub> und *S*-Boc-CH<sub>3</sub> und *S*-Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 1.34 (s, 3H, *R*-Oxazolidin-CH<sub>3</sub>); 3.79 (t,  $J_1 = 5.6$  Hz,  $J_2 = 5.6$  Hz, 0.5H, *S*-CH-2); 3.87-4.02 (m, 4H, *R/S*-CH<sub>2</sub>-1 und *R*-CH-2); 4.15 (m, 0.5H, *R*-CH-3); 4.22 (m, 0.5H, *R*-CH-3); 4.42 (t,  $J_1 = 5.5$  Hz,  $J_2 = 5.5$  Hz, 0.4H, *S*-CH-3); 5.11 (t,  $J_1 = 9.5$  Hz,  $J_2 = 9.5$  Hz, 1H, *R*-CH<sub>2a</sub>-5); 5.17 (d,

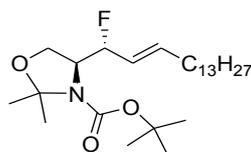
$J_1 = 10.4$  Hz, 0.4H, **S**- $CH_{2b-5}$ ); 5.52-5.56 (m, 1.5H, **R**- $CH_{2b-5}$  und **S**- $CH_{2b-5}$ ); 5.83-5.89 (m, 1.4H, **R/S**- $CH_4$ ).  $^{13}C$  APT NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125.8 Hz)  $\delta$  [ppm] = 23.5 (**R**-Oxazolidin- $CH_3$ ); 24.9 (**S**-Oxazolidin- $CH_3$ ); 26.9 (**R**-Oxazolidin- $CH_3$ ); 27.4 (**S**-Oxazolidin- $CH_3$ ); 28.7 (**R/S**-Boc- $CH_3$ ); 62.5 (**S**-CH-2); 62.8 (**R**-CH-2); 65.1/65.6 (**R/S**- $CH_2-1$ ); 73.1/73.2 (**S**-CH-3); 74.0/74.2 (**R**-CH-3); 116.2/116.3 (**R**- $CH_2-5$ ); 117.7/117.9 (**S**- $CH_2-5$ ); 139.6 (**R**-CH-4); 140.1 (**S**-CH-4). **HRMS ESI** [C<sub>13</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>] cal. [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  = 258.1700, gef. 258.1705; cal. [M+Na]<sup>+</sup>  $m/z$  = 280.1519, gef. 280.1526.

**(S)-tert-Butyl-4-((R,E)-1-hydroxyhexadec-2-enyl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-carboxylat (64):**



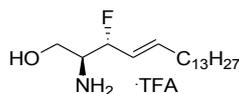
Die Verbindung **63** (955 mg, 3.68 mmol, 1 Äq.) wurde in trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (45.0 mL) gelöst und es wurden 1-Pentadecen (5.0 mL, 18.40 mmol, 5 Äq.) sowie Hoveyda-Grubbs Katalysator zweiter Generation (69 mg, 0.11 mmol, 0.03 Äq.) hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde 4.5 d bei 40 °C gerührt und die Reaktion anschließend durch die Zugabe von Kalium-2-*iso*-cyanoacetat (58.9 mg, 0.49 mmol, 0.13 Äq.), gelöst in MeOH (2.0 mL), gestoppt. Nach der säulenchromatographischen Aufreinigung (Kieselgel, Cyclohexan:EtOAc 10:1) wurde das Produkt **64** (446 mg, 1.01 mmol, **28** %) als grünliches Öl erhalten. Der Umsatz betrug 64 %. Das (**S**)-Diastereomer und die Mischfraktion betragen die restlichen 36 %.

**R<sub>f</sub>** (EtOAc:Cyclohexan 3:11) = 0.70.  $^1H$  NMR (CDCl<sub>3</sub>; 500.1 Hz)  $\delta$  [ppm] = 0.88 (t,  $J_1 = 6.9$  Hz,  $J_2 = 6.9$  Hz, 3H, Kette- $CH_3$ ); 1.25 (br s, 22H, Kette- $CH_2$ ); 1.35 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H,  $CH_3-1$ ); 1.39 (s, 3H, Oxazolidin- $CH_3$ ); 1.49 (s, 9H, Boc- $CH_3$ ); 1.57/1.59 (s, 3H, Oxazolidin- $CH_3$ ); 2.04 (dd,  $J_1 = 14.2$  Hz,  $J_2 = 7.2$  Hz, 2H,  $CH_2-6$ ); 3.66 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H,  $CH-1$ ); 3.78 (dd,  $J_1 = 7.2$  Hz,  $J_2 = 5.8$  Hz, 1H,  $CH-3$ ); 3.94 (dd,  $J_1 = 8.6$  Hz,  $J_2 = 7.4$  Hz, 1H,  $CH-2$ ); 5.39 (dd,  $J_1 = 15.4$  Hz,  $J_2 = 7.2$  Hz, 1H,  $CH-4$ ); 5.59 (br d,  $J_1 = 9.4$  Hz, 1H, OH); 5.75 (td,  $J_1 = 13.8$  Hz,  $J_2 = 6.6$  Hz, 1H,  $CH-5$ ).  $^{13}C$  APT NMR (CDCl<sub>3</sub>; 125.8 Hz)  $\delta$  [ppm] = 14.1 (Kette- $CH_3$ ); 18.6 ( $CH_3-1$ ); 22.7 (Kette- $CH_2CH_3$ ); 28.1 (Oxazolidin- $CH_3$ ); 28.4 (Boc- $CH_3$ ); 29.1 (Kette- $CH_2$ ); 29.3 (Kette- $CH_2$ ); 29.3 (Kette- $CH_2$ ); 29.5 (Kette- $CH_2$ ); 29.6 (Kette- $CH_2$ ); 29.6 (Kette- $CH_2$ ); 29.7 (Kette- $CH_2$ ); 31.9 ( $CH_2-7$ ); 32.4 ( $CH_2-6$ ); 69.9 ( $CH-1$ ); 72.2 ( $CH-2$ ); 72.4 ( $CH-3$ ); 106.7 (C( $CH_3$ )<sub>2</sub>); 127.4 ( $CH-4$ ); 135.9 ( $CH-5$ ). **HRMS ESI** [C<sub>26</sub>H<sub>49</sub>NO<sub>4</sub>] cal. [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  = 440.3734, gef. 440.3749; cal. [M+Na]<sup>+</sup>  $m/z$  = 462.3554, gef. 462.3570.

**(S)-tert-Butyl-4-((R,E)-1-fluorohexadec-2-enyl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-carboxylat (65):**

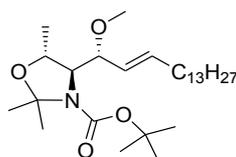
Der Alkohol **64** (100 mg, 0.23 mmol, 1 Äq.) wurde in trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3.9 mL) gelöst und es wurden Diazabicycloundecen (346 mg, 2.27 mmol, 10 Äq.) und XTal-Fluor-E® (634 mg, 2.27 mmol, 10 Äq.) bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde anschließend eine Stunde bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  und dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Stoppen der Reaktion durch die Zugabe von 5 %-iger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (3.5 mL) wurde die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde daraufhin dreimal mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan:EtOAc 9:1  $\rightarrow$  4:1) gereinigt. Es wurde **65** (17 mg, 0.04 mmol, **17 %**, Regioisomer-Verhältnis **F-3:F-5** 2.3:1) als gelbes Öl erhalten.

$R_f$  (EtOAc:Cyclohexan 3:11) = 0.70.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ; 500.1 Hz)  $\delta$  [ppm] = 0.88 (t,  $J_1 = 6.9\text{ Hz}$ ,  $J_2 = 6.9\text{ Hz}$ , 3H, Kette- $\text{CH}_3$ ); 1.26-1.31 (m, 47H, **F-3/F-5**-Kette- $\text{CH}_2$ ); 1.41-1.55 (m, 27H, **F-3/F-5**-Boc- $\text{CH}_3$  und Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 2.04-2.18 (m, 2H, **F-3**- $\text{CH}_2$ -6); 2.39 (t,  $J_1 = 7.5\text{ Hz}$ ,  $J_2 = 7.5\text{ Hz}$ , 1.3H, **F-5**- $\text{CH}_2$ -6); 3.68-3.74 (m, 1H, **F-3**- $\text{CH}_{2a}$ -1); 3.89-3.92 (m, 0.75H, **F-5**- $\text{CH}_{2a}$ -1); 3.99-4.04 (m, 1.7H, **F-3**- $\text{CH}_{2b}$ -1 und **F-5**- $\text{CH}_{2b}$ -1); 4.24-4.28 (m, 1H, **F-3**- $\text{CH}$ -2); 4.39 (br s, 3H, **F-5**- $\text{CH}$ -2); 4.81 (dd,  $J_1 = 12.7\text{ Hz}$ ,  $J_2 = 6.2\text{ Hz}$ , 0.2H, **F-5**- $\text{CH}$ -5); 4.90-4.98 (m, 0.4H, **F-3**- $\text{CH}$ -3); 5.44-5.72 (m, 2.6H, **F-3/F-5**- $\text{CH}$ -4 und **F-3**- $\text{CH}$ -5); 5.97-6.04 (m, 0.6H, **F-5**- $\text{CH}$ -3).  $^{13}\text{C APT NMR}$  ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ; 125.8 Hz)  $\delta$  [ppm] = 14.3 (Kette- $\text{CH}_3$ ); 23.1 (Kette- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 24.3 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 25.1 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 26.5 (Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 27.2 (Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 28.2 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 28.2/28.5 (Boc- $\text{CH}_3$ ); 29.6 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.7 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.8 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.9 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.9 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 30.1 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 32.7 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 33.0 ( $\text{CH}_2$ -7); 35.7/35.9 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 44.3 (**F-5**- $\text{CH}_2$ -6); 58.9/59.6 ( $\text{CH}$ -2); 63.8/64.3 ( $\text{CH}_2$ -1); 68.8 (**F-5**- $\text{CH}$ -1); 92.9 (**F-3**- $\text{CH}$ -3); 94.2/94.3 (**F-5**- $\text{CH}$ -5); 125.6/125.8 (**F-3**- $\text{CH}$ -4); 127.9/129.7 (**F-5**- $\text{CH}$ -4); 129.7 (**F-3**- $\text{CH}$ -5); 133.2 (**F-5**- $\text{CH}$ -3).  $^{19}\text{F NMR}$  ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ; 470.6 MHz)  $\delta$  [ppm] = -173.7/-174.0/-176.3/-176.4/-178.2/-178.3 (**F-3**); 185.6/185.5 (**F-5**). **MS ESI** [ $\text{C}_{26}\text{H}_{48}\text{FNO}_3$ ] cal.  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z = 464.35$ , gef. 464.4.

**(E,2S,3R)-2-Amino-3-fluorooctadec-4-en-1-ol (TFA-Salz) (10):**

In einem Schlenk Kolben wurde **65** (15 mg, 0.035 mmol, 1 Äq.) in trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.35 mL) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Trifluoressigsäure (0.35 mL) hinzugegeben und die Reaktion für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen der flüchtigen Bestandteile wurde der Rückstand dreimal mit MeOH (je 2.0 mL) versetzt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O 65:25:2) gereinigt. Es wurde **10** (4 mg, 0.01 mmol, **29 %**, enthält **F-5**-Regioisomer) als weißer Feststoff erhalten.

$R_f$  (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O 65:25:3) = 0.56. <sup>13</sup>C APT NMR (CD<sub>3</sub>OD; 125.8 Hz)  $\delta$  [ppm] = 14.9 (Kette-CH<sub>3</sub>); 24.3 (Kette-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 29.4 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.8 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.9 (Kette-CH<sub>2</sub>); 31.0 (Kette-CH<sub>2</sub>); 31.1 (Kette-CH<sub>2</sub>); 31.2 (Kette-CH<sub>2</sub>); 31.3 (Kette-CH<sub>2</sub>); 33.6 (Kette-CH<sub>2</sub>); 34.2 (Kette-CH<sub>2</sub>); 36.9/37.0 (**5-F-CH<sub>2</sub>-Kette-6**); 56.9 (CH-2); 64.4/64.5 (CH<sub>2</sub>-1); 124.9/127.5/128.9/130.8 (CH-4); 136.6/139.6 (CH-5). <sup>19</sup>F NMR (CD<sub>3</sub>OD; 470.6 MHz)  $\delta$  [ppm] = -77.2/-80.4 (TFA-CF<sub>3</sub>); -179.4/-179.4/-179.6/-179.9 (F, allylisch). HRMS ESI [C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>FNO] cal. [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  = 302.2859, gef. 302.2856.

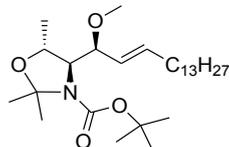
**6.2.9 Synthese von 1-Methyl-3-desoxy-3-methoxy-Derivaten****(4S,5R)-tert-Butyl-4-((R,E)-1-methoxyhexadec-2-enyl)-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylat (66):**

In einem Schlenk-Kolben wurde **48** (351 mg, 0.77 mmol, 1 Äq.) in trockenem THF (3.1 mL) gelöst und es wurde NaH (80 mg, 1.55 mmol, 2 Äq., 60 % auf Mineralöl) bei 0 °C hinzugegeben. Nach 15 min Rühren bei 0 °C wurde MeI (0.1 mL, 1.70 mmol, 2.2 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion wurde weitere zehn Minuten bei 0 °C gerührt. Folgend wurde das Eisbad entfernt und die Lösung drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von destilliertem Wasser (6.2 mL) und gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (6.2 mL) wurde die organische Phase abgetrennt. Daraufhin wurde die wässrige Phase dreimal mit Et<sub>2</sub>O extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und unter vermindertem Druck eingedunstet. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel,

Cyclohexan: EtOAc 20:1) gereinigt. Es wurde **66** (240 mg, 0.52 mmol, **67** %) als farbloses Öl erhalten.

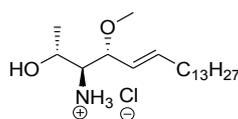
$R_f$  (Cyclohexan:EtOAc 11:3) = 0.72.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500.1 MHz)  $\delta$  [ppm] = 0.86 (t,  $J_1 = 6.9$  Hz,  $J_2 = 6.9$  Hz, 3H, Kette- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 1.23-1.27 (s, 23H, 10xKette- $\text{CH}_2$  und  $\text{CH}_3$ -1); 1.34-1.35 (m, 2H, Kette- $\text{CH}_2$ ); 1.43/1.46 (s, 12H, Boc- $\text{CH}_3$  und Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 1.54-1.61 (m, 4H, Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 2.03-2.06 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -6); 3.25/3.26 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.78-3.87 (br s, 1H, CH); 3.86 (dd,  $J_1 = 7.2$  Hz,  $J_2 = 2.7$  Hz, 0.5H, CH-3); 4.16-4.17 (br s, 0.5H, CH-3); 4.27-4.29 (m, 1H, CH-2); 5.24 (dd,  $J_1 = 15.5$  Hz,  $J_2 = 7.7$  Hz, 1H, CH-4); 5.65-5.68 (m, 1H, CH-5).  $^{13}\text{C APT NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 125.8 Hz)  $\delta$  [ppm] = 14.4 (Kette- $\text{CH}_3$ ); 20.2 ( $\text{CH}_3$ -1); 22.9 (Kette- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 26.6 (Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 28.6/28.7 (Boc- $\text{CH}_3$ ); 29.4 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.6 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.7 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.9 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 32.2 (Kette- $\text{CH}_2$ -7); 32.6 (Kette- $\text{CH}_2$ -6); 57.4/57.7 ( $\text{OCH}_3$ ); 65.8 (CH); 67.5 (CH); 86.1 (CH-3); 126.6/127.7 (CH-4); 136.8 (CH-5).  $[\alpha]_D^{20} = -26.9$  °(c 0.96, MeOH). **HRMS ESI** [ $\text{C}_{28}\text{H}_{53}\text{O}_4\text{N}$ ] cal.  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z = 468.4047$ , gef. 468.4047; cal.  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z = 490.3867$ , gef. 490.3865.

**(4*S*,5*R*)-tert-Butyl-4-((*S,E*)-1-methoxyhexadec-2-enyl)-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylat (**67**):**



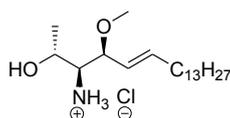
Die Verbindung **49** (231 mg, 0.51 mmol, 1 Äq.) wurde nach der gleichen Vorschrift wie bei **66** umgesetzt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Cyclohexan: EtOAc 20:1) gereinigt. Es wurde **67** (202 mg, 0.43 mmol, **85** %) als farbloses Öl erhalten.

$R_f$  (Cyclohexan:EtOAc 11:3) = 0.86.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500.1 MHz)  $\delta$  [ppm] = 0.88 (t,  $J_1 = 6.9$  Hz,  $J_2 = 6.9$  Hz, 3H, Kette- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 1.25-1.29 (s, 20H, 10xKette- $\text{CH}_2$ ); 1.35 (d,  $J = 15.5$  Hz, 1H,  $\text{CH}_3$ -1); 1.38-1.38 (m, 3H, Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 1.44/1.47 (s, 9H, Boc- $\text{CH}_3$ ); 1.56 (br s, 3H, Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 2.04-2.09 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -6); 3.25/3.27/3.27 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.71-3.82 (m, 1H, CH); 4.07-4.08 (m, 0.5H, CH); 4.22 (br s, 1H, CH); 4.36 (br s, 0.5H, CH); 5.33 (dd,  $J_1 = 15.4$  Hz,  $J_2 = 8.4$  Hz, 1H, CH-4); 5.67 (td,  $J_1 = 15.0$  Hz,  $J_2 = 6.7$  Hz, 1H, CH-5).  $^{13}\text{C APT NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 125.8 Hz)  $\delta$  [ppm] = 14.4 (Kette- $\text{CH}_3$ ); 20.1 ( $\text{CH}_3$ -1); 22.9 (Kette- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 26.7 (Oxazolidin- $\text{CH}_3$ ); 28.6/28.7 (Boc- $\text{CH}_3$ ); 29.3 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.5 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.6 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.7 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.8 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 29.9 (Kette- $\text{CH}_2$ ); 32.2 (Kette- $\text{CH}_2$ -7); 32.5/32.7 (Kette- $\text{CH}_2$ -6); 56.9 ( $\text{OCH}_3$ ); 65.5 (CH); 70.3 (CH); 85.7 (CH-3); 125.8 (CH-4); 136.6 (CH-5).  $[\alpha]_D^{20} = -56.2$  °(c 0.96, MeOH). **HRMS ESI** [ $\text{C}_{28}\text{H}_{53}\text{O}_4\text{N}$ ] cal.  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z = 468.4047$ , gef. 468.4047; cal.  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $m/z = 490.3867$ , gef. 490.3864.

**(E,2R,3S,4R)-3-Amino-4-methoxynonadec-5-en-2-ol-hydrochlorid (11):**

Die Verbindung **66** (142 mg, 0.30 mmol, 1 Äq.) wurde nach der gleichen Vorschrift wie bei **3** umgesetzt. Es wurde **11** (95.5 mg, 0.26 mmol, **87 %**) als weißer Feststoff erhalten.

$R_f$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 9:1) = 0.20. **<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 500.1 Hz)  $\delta$  [ppm] = 0.85 (t,  $J_1 = 7.0$  Hz,  $J_2 = 7.0$  Hz, 3H, Kette-CH<sub>3</sub>); 1.16 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-1); 1.24-1.27 (m, 20H, 10xKette-CH<sub>2</sub>); 1.37-1.41 (m, 2H, Kette-CH<sub>2</sub>); 2.09 (dt,  $J_1 = 7.8$  Hz,  $J_2 = 1.0$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 2.79 (br s, 1H, CH-2); 3.23 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.29 (s, 1H, OH); 3.65 (dd,  $J_1 = 7.9$  Hz,  $J_2 = 5.3$  Hz, 1H, CH-3); 3.72-3.74 (m, 1H, CH-1); 5.30 (dd,  $J_1 = 15.4$  Hz,  $J_2 = 8.8$  Hz, 1H, CH-4); 5.79 (td,  $J_1 = 15.2$  Hz,  $J_2 = 6.8$  Hz, 1H, CH-5). **<sup>13</sup>C APT NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 125.8 Hz)  $\delta$  [ppm] = 14.7 (Kette-CH<sub>3</sub>); 20.9 (CH<sub>3</sub>-1); 23.9 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.4 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.5 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.7 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.8 (Kette-CH<sub>2</sub>); 31.0 (Kette-CH<sub>2</sub>); 33.3 (Kette-CH<sub>2</sub>-7); 33.7 (Kette-CH<sub>2</sub>-6); 56.6 (OCH<sub>3</sub>); 62.4 (CH-2); 66.7 (CH-1); 82.8 (CH-3); 126.2 (CH-4); 140.4 (CH-5).  $[\alpha]^{20}_D = -10.1$  °(c 1.04, MeOH). **HRMS ESI** [C<sub>20</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>2</sub>] cal. [M+H]<sup>+</sup>  $m/z = 328.3210$ , gef. 328.3210; cal. [M+Na]<sup>+</sup>  $m/z = 350.3030$ , gef. 350.3030.

**(E,2R,3S,4S)-3-Amino-4-methoxynonadec-5-en-2-ol-hydrochlorid (12):**

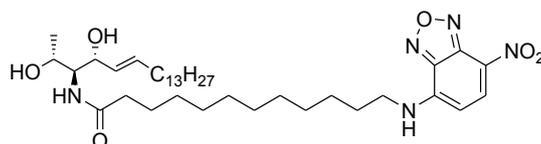
Die Verbindung **67** (100 mg, 0.21 mmol, 1 Äq.) wurde nach der gleichen Vorschrift wie bei **3** umgesetzt. Es wurde **12** (65.5 mg, 0.18 mmol, **82 %**) als weißer Feststoff erhalten.

$R_f$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 9:1) = 0.14. **<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 500.1 Hz)  $\delta$  [ppm] = 0.86 (t,  $J_1 = 7.0$  Hz,  $J_2 = 7.0$  Hz, 3H, Kette-CH<sub>3</sub>); 1.20 (d,  $J = 5.3$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-1); 1.25-1.28 (m, 20H, 10xKette-CH<sub>2</sub>); 1.39-1.42 (m, 2H, Kette-CH<sub>2</sub>); 2.09 (td,  $J_1 = 7.8$  Hz,  $J_2 = 4.0$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-6); 2.66 (br s, 1H, CH-2); 3.24 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.31 (s, 1H, OH); 3.62 (t,  $J_1 = 7.5$  Hz,  $J_2 = 7.5$  Hz, 1H, CH-3); 3.84 (br s, 1H, CH-1); 5.24 (dd,  $J_1 = 15.4$  Hz,  $J_2 = 8.5$  Hz, 1H, CH-4); 5.82 (td,  $J_1 = 15.3$  Hz,  $J_2 = 6.8$  Hz, 1H, CH-5). **<sup>13</sup>C APT NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 125.8 Hz)  $\delta$  [ppm] = 14.1 (Kette-CH<sub>3</sub>); 20.7 (CH<sub>3</sub>-1); 23.4 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.9 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.9 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.2 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.2 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.5 (Kette-CH<sub>2</sub>); 32.8 (Kette-CH<sub>2</sub>-7); 33.1 (Kette-CH<sub>2</sub>-6); 56.0 (OCH<sub>3</sub>); 61.2 (CH-2); 65.3 (CH-1); 82.6 (CH-3); 127.2 (CH-4); 139.5 (CH-5).  $[\alpha]^{20}_D = +9.9$  °(c 1.04, MeOH). **HRMS**

**ESI** [C<sub>20</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>2</sub>] cal. [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 328.3210, gef. 328.3210; cal. [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* = 350.3030, gef. 350.3030.

### 6.2.10 Markierung mit NBD-Fluorophor

#### 12-(4-Nitrobenzo[1,2,5]oxadiazol-7-ylamino)-*N*-((*E*,2*R*,3*S*,4*R*)-2,4-dihydroxynonadec-5-en-3-yl)dodecanamid (**13**):



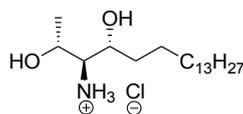
Zu einer Lösung aus 12-(7-Nitro-benzo[1,2,5]oxadiazol-4-ylamino)-dodekansäure (60 mg, 0.16 mmol, 1 Äq.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.5 mL) wurden 1-Hydroxybenzotriazol-hydrat (29 mg, 0.19 mmol, 1.2 Äq.) und Diisopropylethylamin (28 µL, 0.32 mmol, 2 Äq.) bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss hinzugegeben. Nach zehn Minuten Rühren wurde *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-hydrochlorid (36 mg, 0.189 mmol, 1.2 Äq.) zu der Reaktion hinzugegeben. Anschließend wurde eine Lösung aus **3** (40 mg, 0.13 mmol, 0.8 Äq.) und Diisopropylethylamin (41 µL, 0.47 mmol, 3 Äq.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.25 mL) tropfenweise hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und daraufhin das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan mit 0 % → 45 % EtOAc) gereinigt. Das Produkt **13** (53.0 mg, 0.08 mmol, **62** %) wurde als rot-brauner Feststoff erhalten.

**R<sub>f</sub>** (EtOAc:Cyclohexan 7:3) = 0.52. **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 500.1 Hz) = 0.87 (t, *J*<sub>1</sub> = 6.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.9 Hz, 3H, Kette-CH<sub>3</sub>); 1.14 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-1); 1.24-1.32 (br s, 32H, 16xKette-CH<sub>2</sub>); 1.33-1.35 (m, 4H, 2xKette-CH<sub>2</sub>); 1.44-1.48 (m, 2H, Kette-CH<sub>2</sub>); 1.63-1.66 (m, 2H, Kette-CH<sub>2</sub>); 1.79-1.82 (m, 2H, Kette-CH<sub>2</sub>); 2.05 (dd, *J*<sub>1</sub> = 14.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.1 Hz, 2H, Kette-CH<sub>2</sub>-6); 2.25 (t, *J*<sub>1</sub> = 7.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-C=O); 2.83 (br s, 1H, Kette-CH<sub>2a</sub>-NBD); 2.94 (br s, 1H, Kette-CH<sub>2b</sub>-NBD); 3.49 (dd, *J*<sub>1</sub> = 12.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.1 Hz, 1H, CH-2); 3.80 (dd, *J*<sub>1</sub> = 6.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 12.1 Hz, 1H, CHOH); 4.32 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.3 Hz, 1H, CH-1); 5.55 (dd, *J*<sub>1</sub> = 15.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.2 Hz, 1H, Kette-CH-4); 5.78 (dd, *J*<sub>1</sub> = 14.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.8 Hz, 1H, Kette-CH-5); 6.17 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, NBD-CH); 6.29 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, NBD-CH); 6.51 (m, 1H, NBD-NH); 8.49 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, NH-C=O). **<sup>13</sup>C APT NMR** (CDCl<sub>3</sub>; 125.75 Hz) = 14.1 (Kette-CH<sub>3</sub>); 20.3 (CH<sub>3</sub>); 22.7 (Kette-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 25.8 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO); 28.4 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.1 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.1 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.1 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.2 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.2 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.3 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.5 (Kette-CH<sub>2</sub>); 29.7 (Kette-CH<sub>2</sub>); 31.9 (Kette-CH<sub>2</sub>); 32.3 (Kette-CH<sub>2</sub>); 36.9 (Kette-CHCH<sub>2</sub>); 43.9 (CH<sub>2</sub>NH); 56.3 (CH-2); 66.0 (CH-1); 75.7 (CHOH); 98.4 (Ar-CH); 129.0 (=CHCH<sub>2</sub>); 133.9 (CHCH=); 136.5 (Ar-CH); 144.3 (Ar-C); 173.8 (C=O). **HRMS ESI**

[C<sub>37</sub>H<sub>63</sub>O<sub>6</sub>N<sub>5</sub>] cal. [M-H]<sup>-</sup> *m/z* = 672.4706, gef. 672.4700; cal. [M+Cl]<sup>-</sup> *m/z* = 708.4472, gef. 708.4475.

### 6.2.11 Synthese von Dihydrospingosin-Derivaten

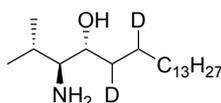
#### (2*R*,3*S*,4*R*)-3-Aminononadecan-2,4-diol-hydrochlorid (**14**):



Die Verbindung **3** (19 mg, 54.5 μmol, 1 Äq.) wurde in einem Dreihalskolben vorgelegt und in trockenem MeOH (2.0 mL) gelöst. Die Lösung wurde fünfmal entgast und der Kolben mit Argon geflutet. Anschließend wurde Pd auf Aktivkohle (2.5 mg, 30 %) im Argon-Gegenstrom hinzugegeben und die Atmosphäre gegen H<sub>2</sub> ausgetauscht, indem der Kolben fünfmal vakuumiert und mit H<sub>2</sub> geflutet wurde. Nach 43 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Lösung über Celite 545® filtriert und eingengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O 65:25:2) gereinigt. Es wurde **14** (13 mg, 37.0 μmol, **68** %) als weißer Feststoff erhalten.

**R<sub>f</sub>** (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH 40:10:1) = 0.73. **<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 500.1 Hz) δ [ppm] = 0.84 (t, *J*<sub>1</sub> = 6.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.9 Hz, 3H, Kette-CH<sub>3</sub>); 1.19 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-1); 1.23-1.32 (m, 25H, 12xKette-CH<sub>2</sub> und Kette-CH<sub>2a</sub>-4); 1.33-1.39 (m, 2H, Kette-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1.52-1.54 (m, 1H, CH<sub>2b</sub>-4); 2.86 (br s, 1H, CH-2); 3.69 (m, 1H, CH-3); 3.91 (br s, 1H, CH-1). **<sup>13</sup>C APT NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 125.8 Hz) δ [ppm] = 14.3 (Kette-CH<sub>3</sub>); 20.8 (CH<sub>3</sub>-1); 23.6 (Kette-CH<sub>2</sub>); 26.9 (Kette-CH<sub>2</sub>-5); 30.4 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.5 (Kette-CH<sub>2</sub>); 30.6 (Kette-CH<sub>2</sub>); 32.6 (Kette-CH<sub>2</sub>-4); 32.9 (Kette-CH<sub>2</sub>); 62.6 (CH-2); 65.4 (CH-1); 70.5 (CH-3). **HRMS ESI** [C<sub>19</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>2</sub>] cal. [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 316.3216, gef. 316.3210; cal. [M+Cl]<sup>-</sup> *m/z* = 350.2826, gef. 350.2835.

#### (2*R*,3*S*,4*R*)-3-Amino-[4,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]nonadecan-2,4-diol (**15**):



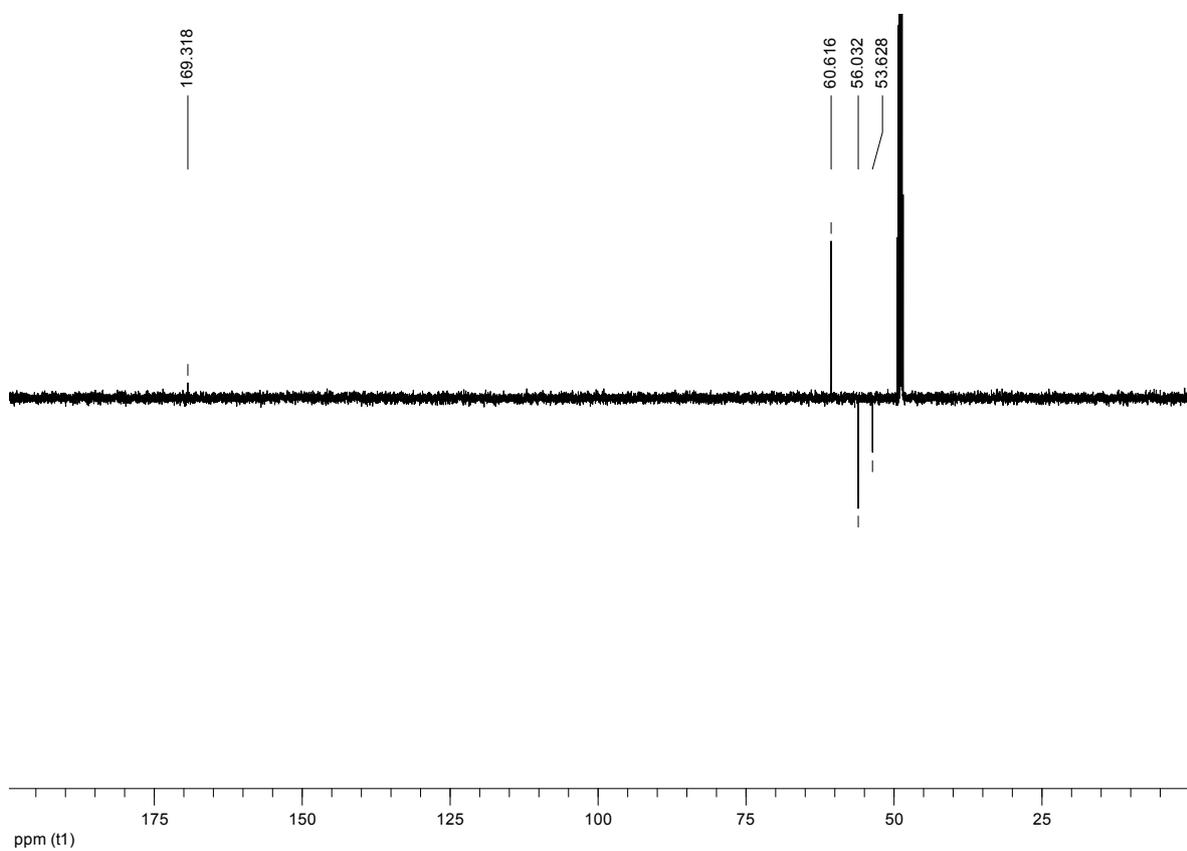
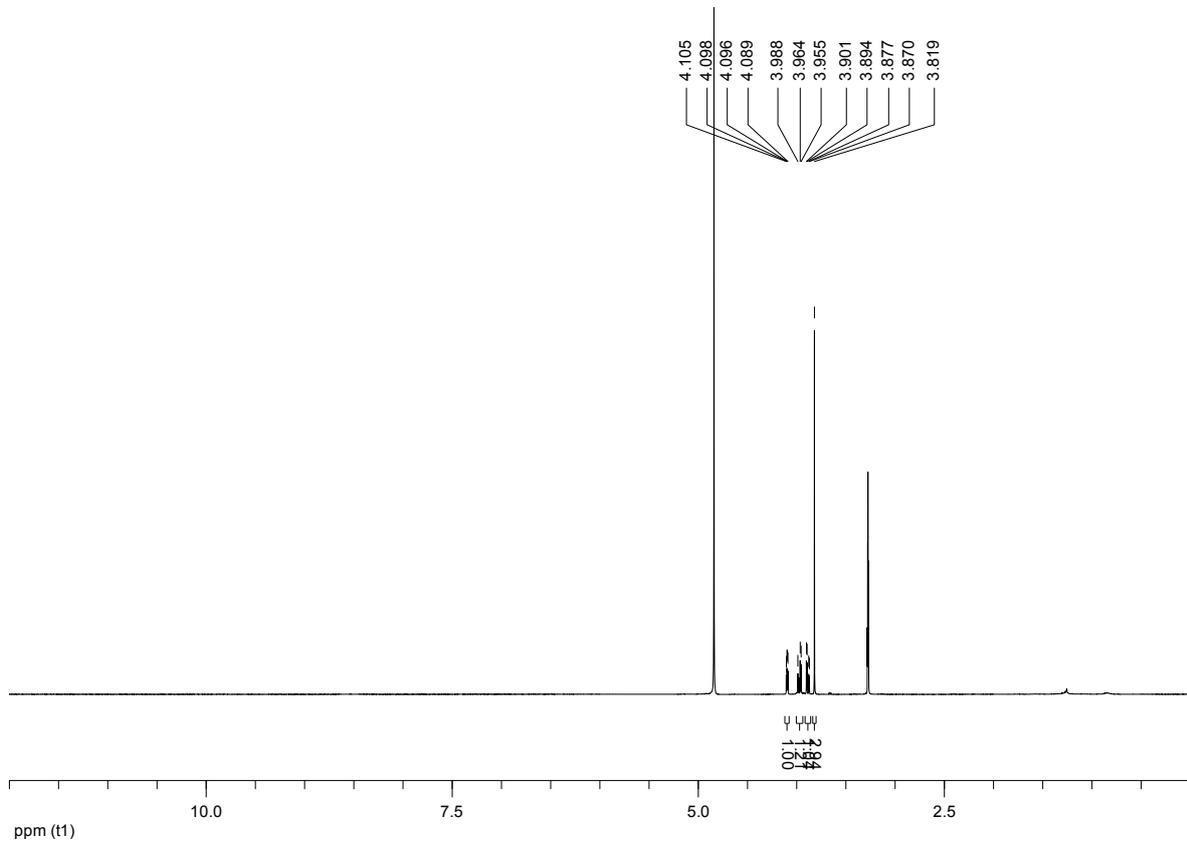
Die Verbindung **3** (19 mg, 54.5 μmol, 1 Äq.) wurde mittels Extraktion mit Et<sub>2</sub>O und gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung in das freie Amin überführt, in einem Dreihalskolben vorgelegt und in trockenem MeOH (2.0 mL) gelöst. Die Lösung wurde fünfmal entgast und der Kolben mit Argon geflutet. Anschließend wurde Pd auf Aktivkohle (2.5 mg, 30 %) im Argon-Gegenstrom hinzugegeben und die Atmosphäre gegen D<sub>2</sub> ausgetauscht, indem der Kolben fünfmal vakuumiert und mit D<sub>2</sub> geflutet wurde. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die

Lösung über Celite 545® filtriert und eingeeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O 65:25:2) gereinigt. Es wurde **15** (5 mg, 15.4 µmol, **28** %) als weißer Feststoff erhalten.

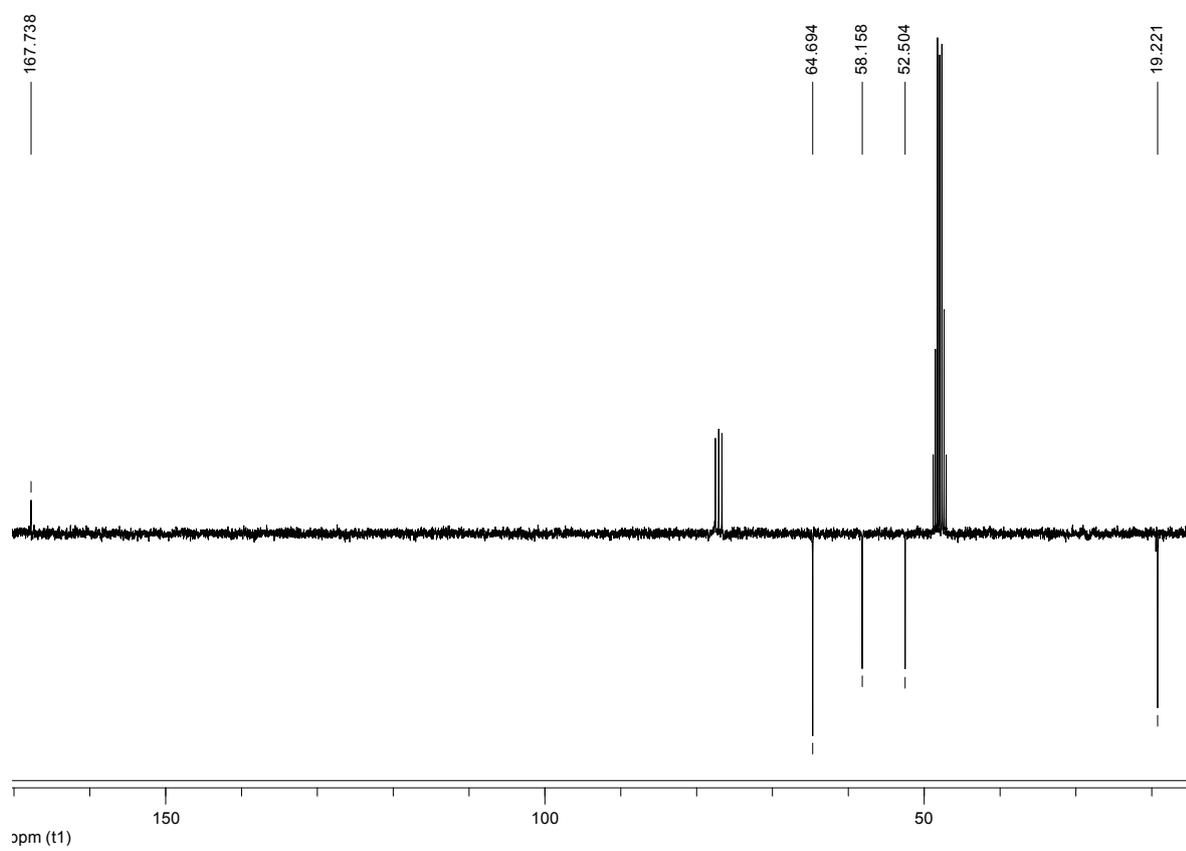
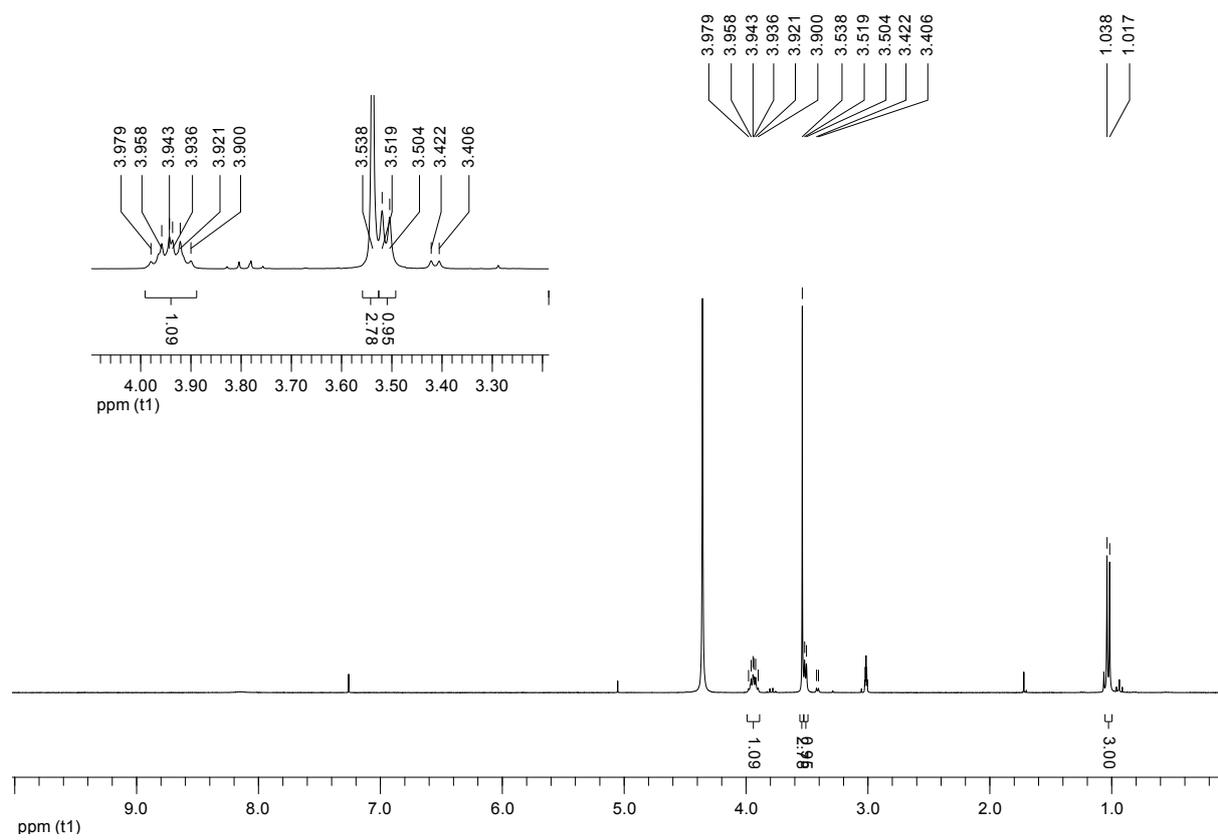
**R<sub>f</sub>** (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH 40:10:1) = 0.75. **<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 500.1 Hz) δ [ppm] = 0.86 (t,  $J_1 = 6.9$  Hz,  $J_2 = 6.9$  Hz, 3H, Kette-CH<sub>3</sub>); 1.20 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-1); 1.23-1.27 (m, 24H, 12xKette-CH<sub>2</sub>); 1.33-1.39 (m, 2H, 2xCHD); 2.85 (br s, 1H, CH-2); 3.69 (m, 1H, CH-3); 3.91-3.93 (br s, 1H, CH-1). **<sup>13</sup>C APT NMR** (CD<sub>3</sub>OD; 125.8 Hz) δ [ppm] = 14.7 (Kette-CH<sub>3</sub>); 21.1 (CH<sub>3</sub>-1); 23.9 (Kette-CH<sub>2</sub>); 26.6-26.9 (m, CHD-5); 30.7 (Kette-CH<sub>2</sub>); 31.0 (Kette-CH<sub>2</sub>); 32.3-32.6 (m, CHD-4); 33.3 (Kette-CH<sub>2</sub>-4); 62.9 (CH-2); 65.8 (CH-1); 70.9 (CH-3). Im NMR-Spektrum ist ein Signal vom Wasser aus dem Lösungsmittel zu erkennen. **HRMS ESI** [C<sub>19</sub>H<sub>39</sub>D<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>] cal. [M+H]<sup>+</sup>  $m/z = 318.3341$ , gef. 318.3336; cal. [M+Na]<sup>+</sup>  $m/z = 340.3161$ , gef. 340.3158.

# 7 Anhang

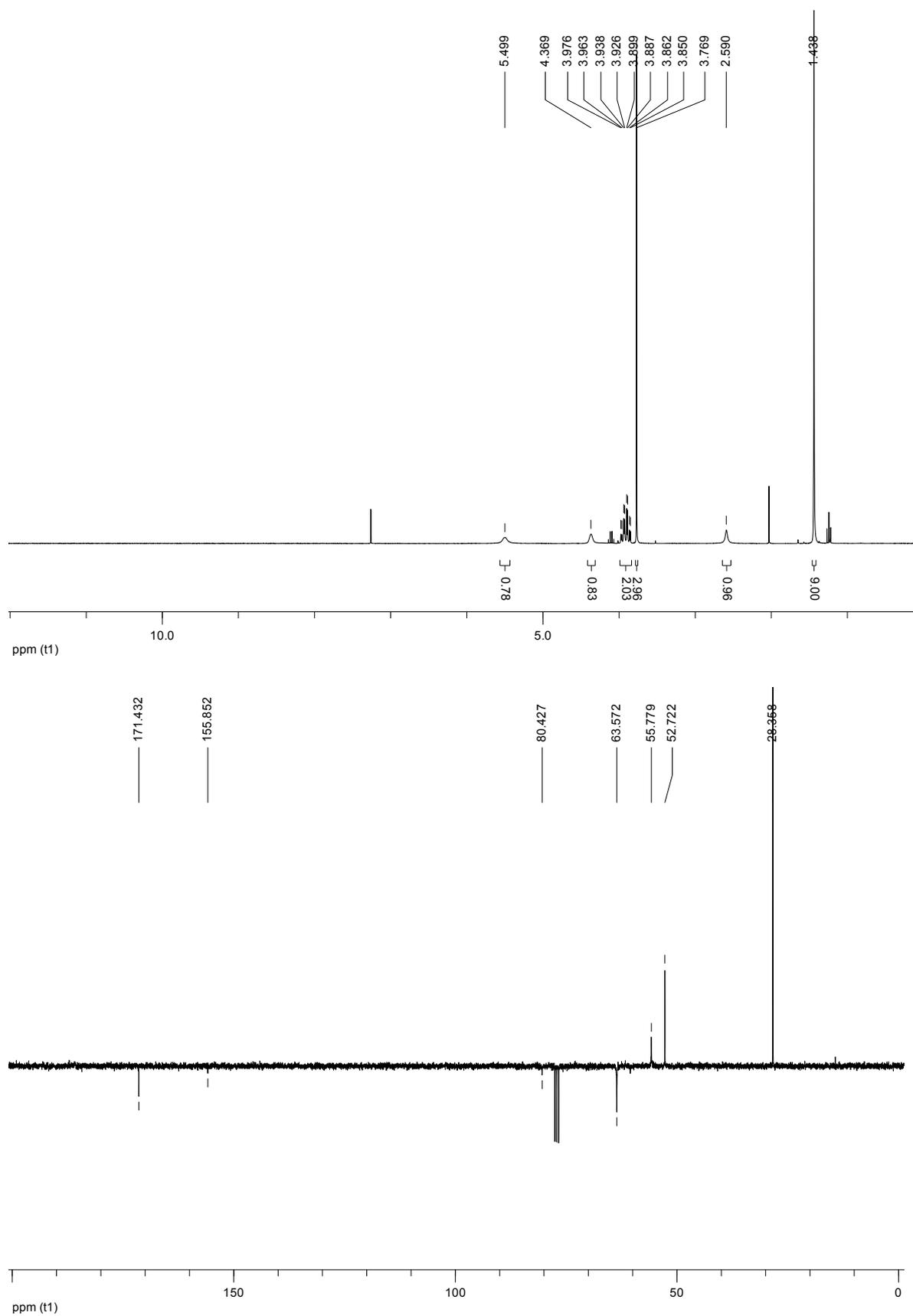
## (S)-Methyl-2-amino-3-hydroxypropanoat-hydrochlorid (16):



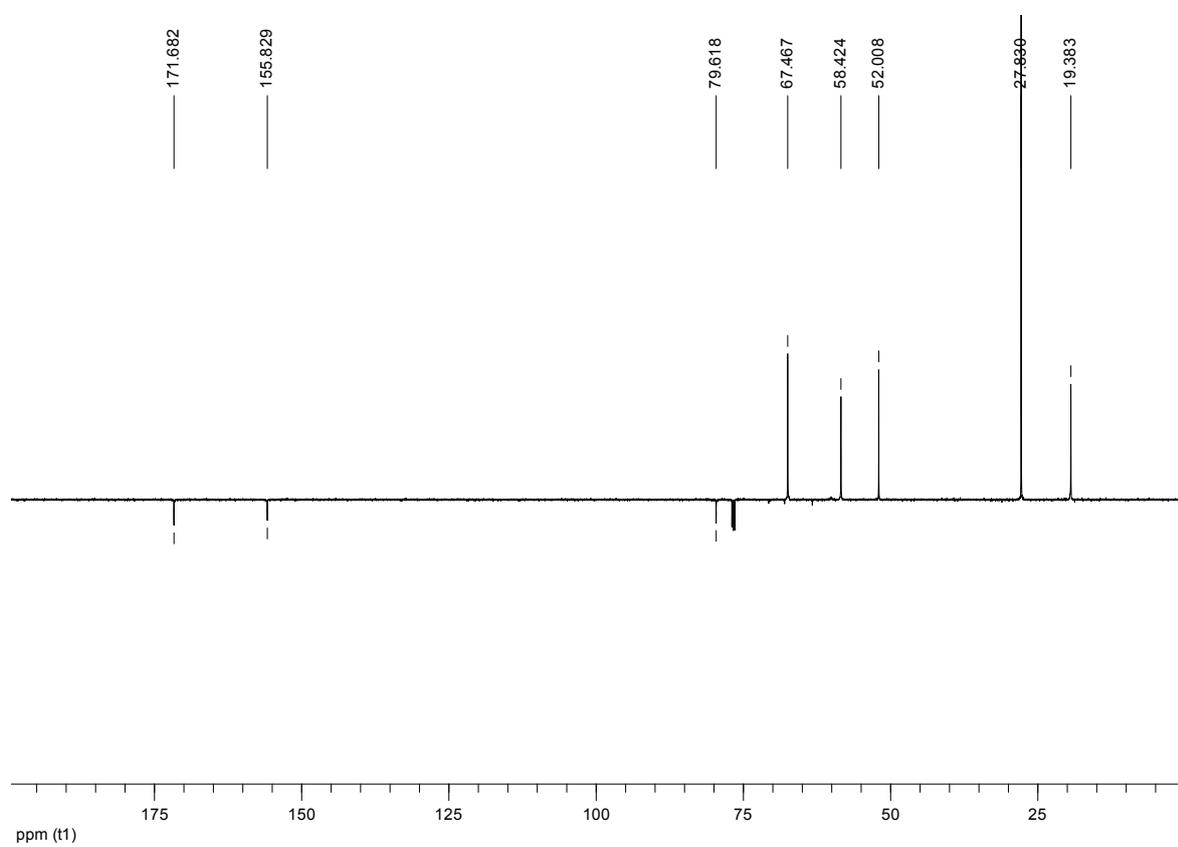
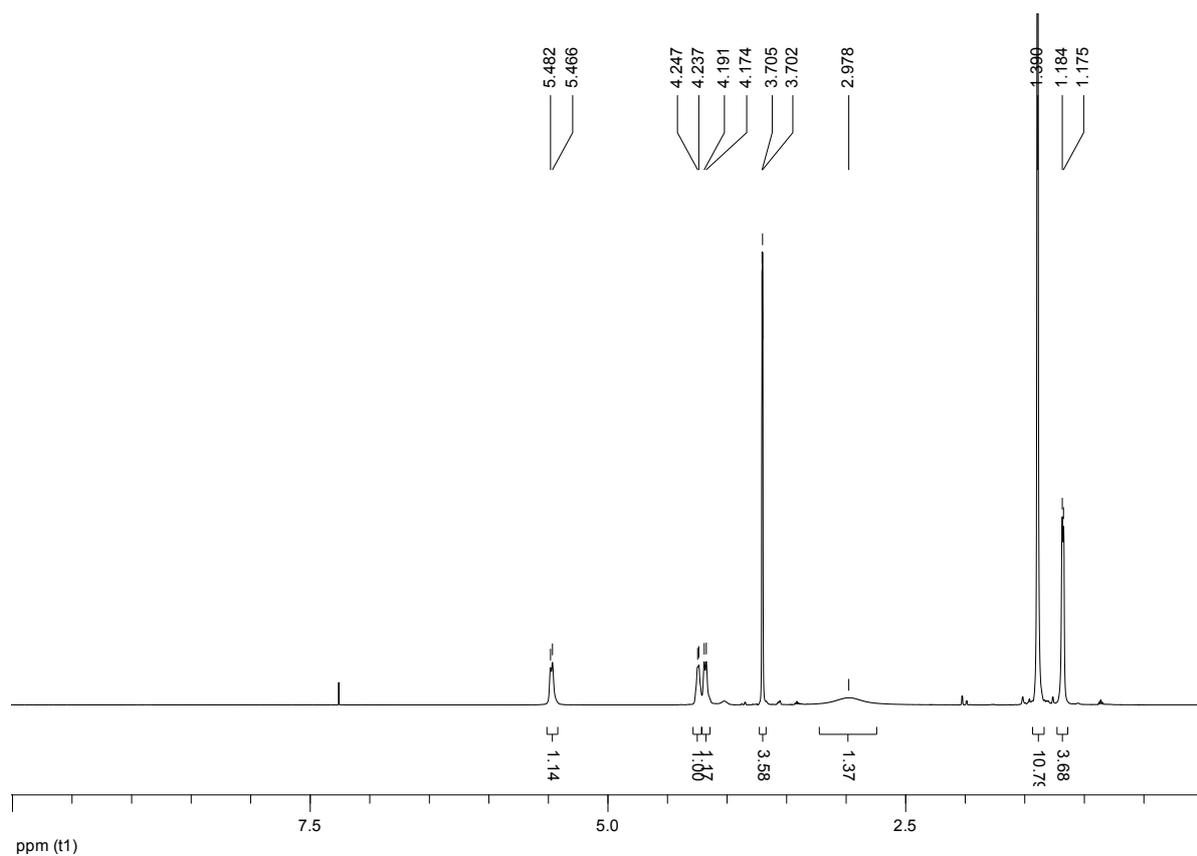
**(2S,3R)-Methyl-2-amino-3-hydroxybutanoat-hydrochlorid (17):**



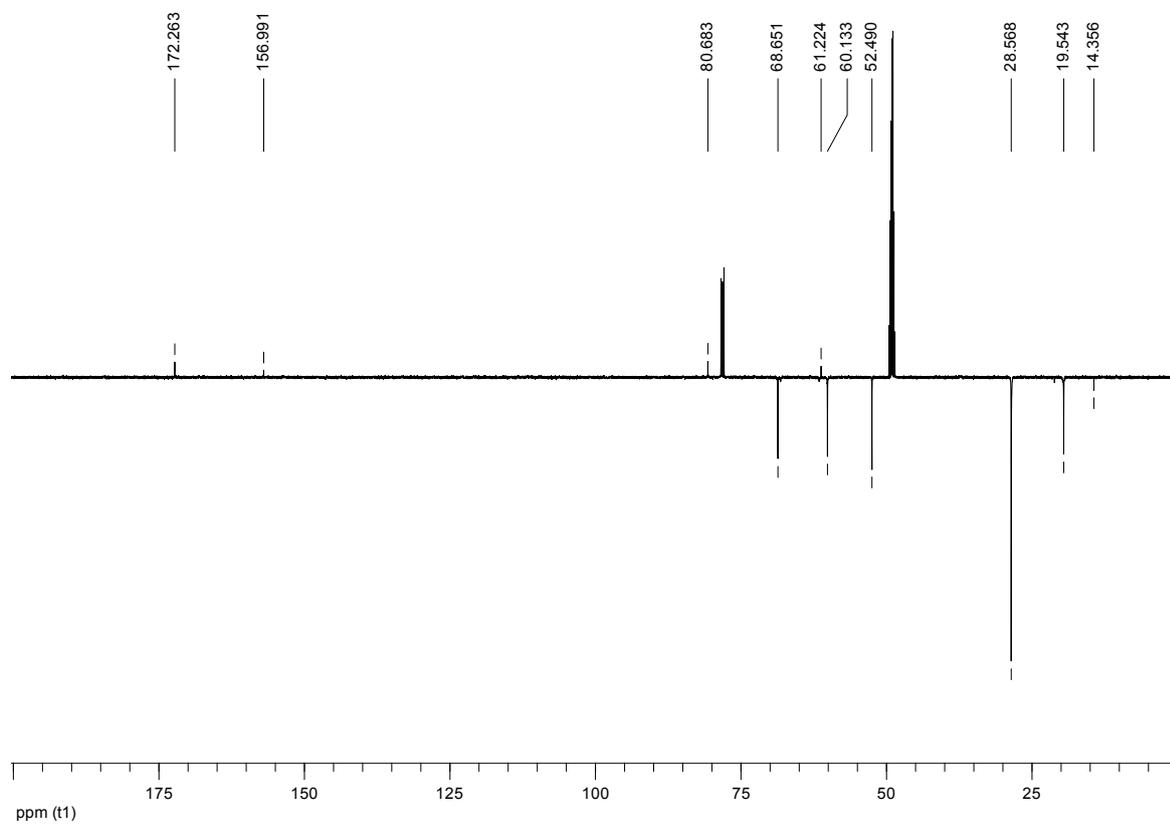
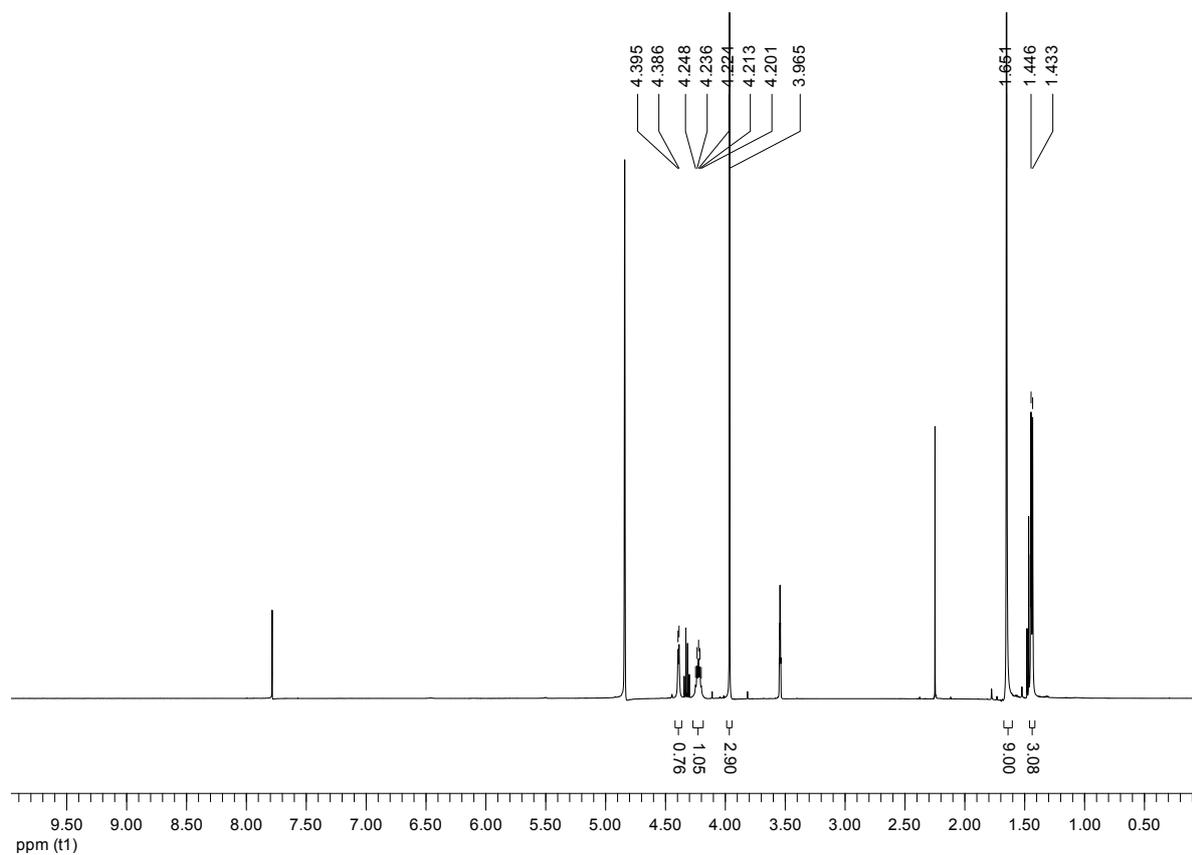
**tert-Butyl-(S)-1-(methoxycarbonyl)-2-hydroxyethylcarbamate (19):**



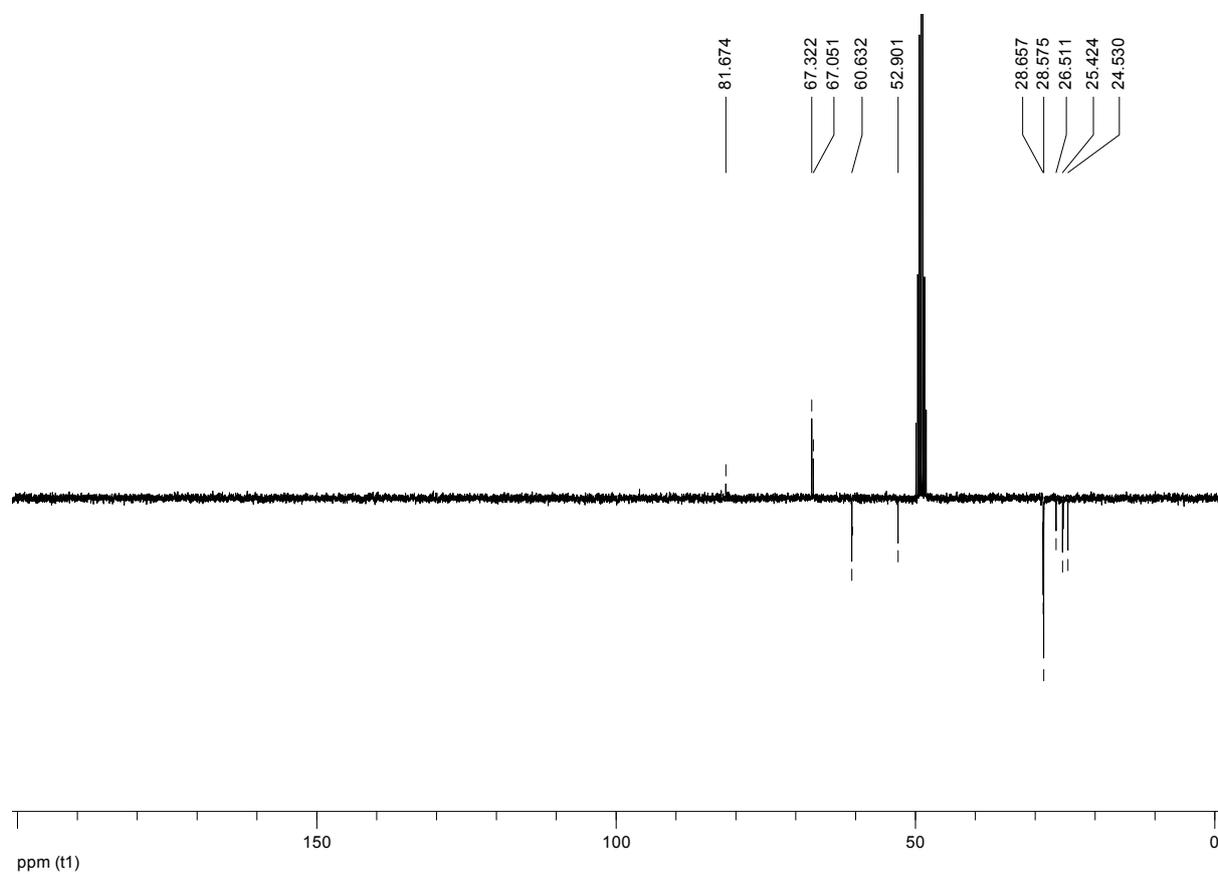
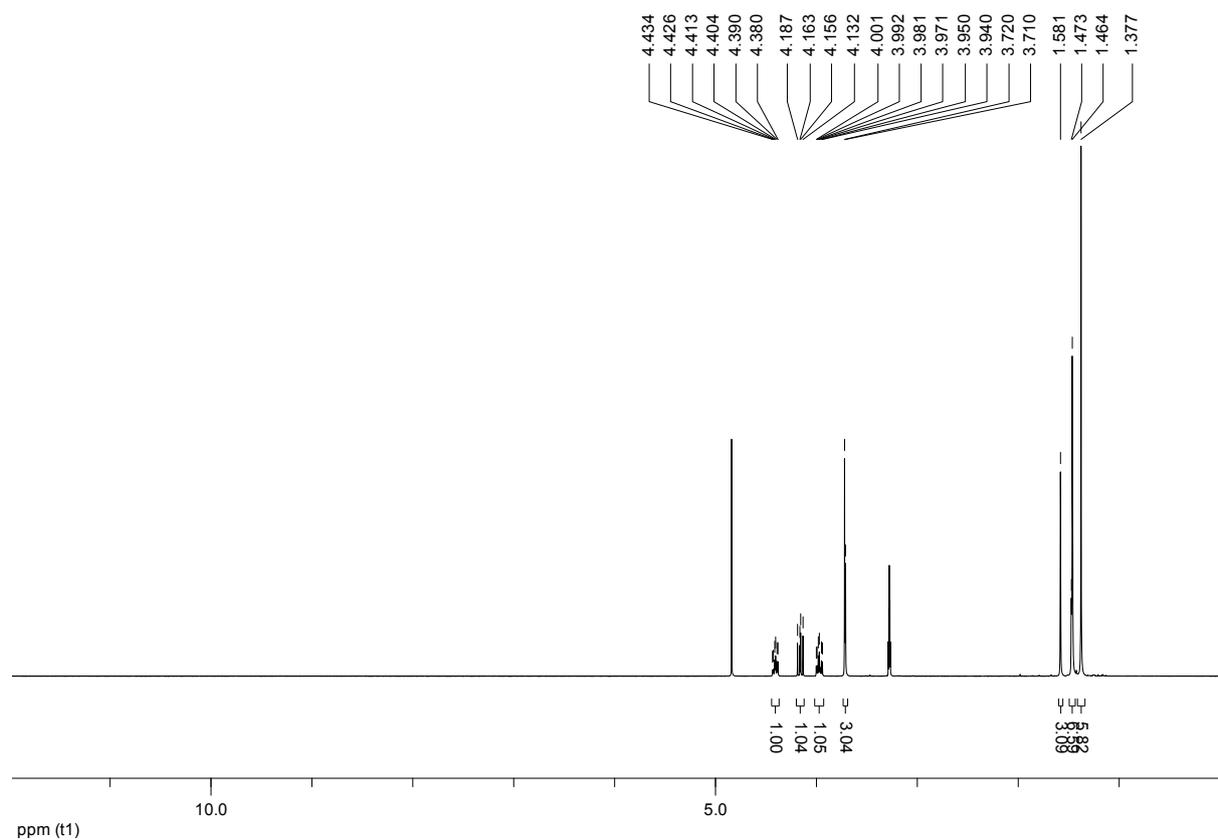
**tert-Butyl-(1S,2R)-1-(methoxycarbonyl)-2-hydroxypropylcarbamate (20):**



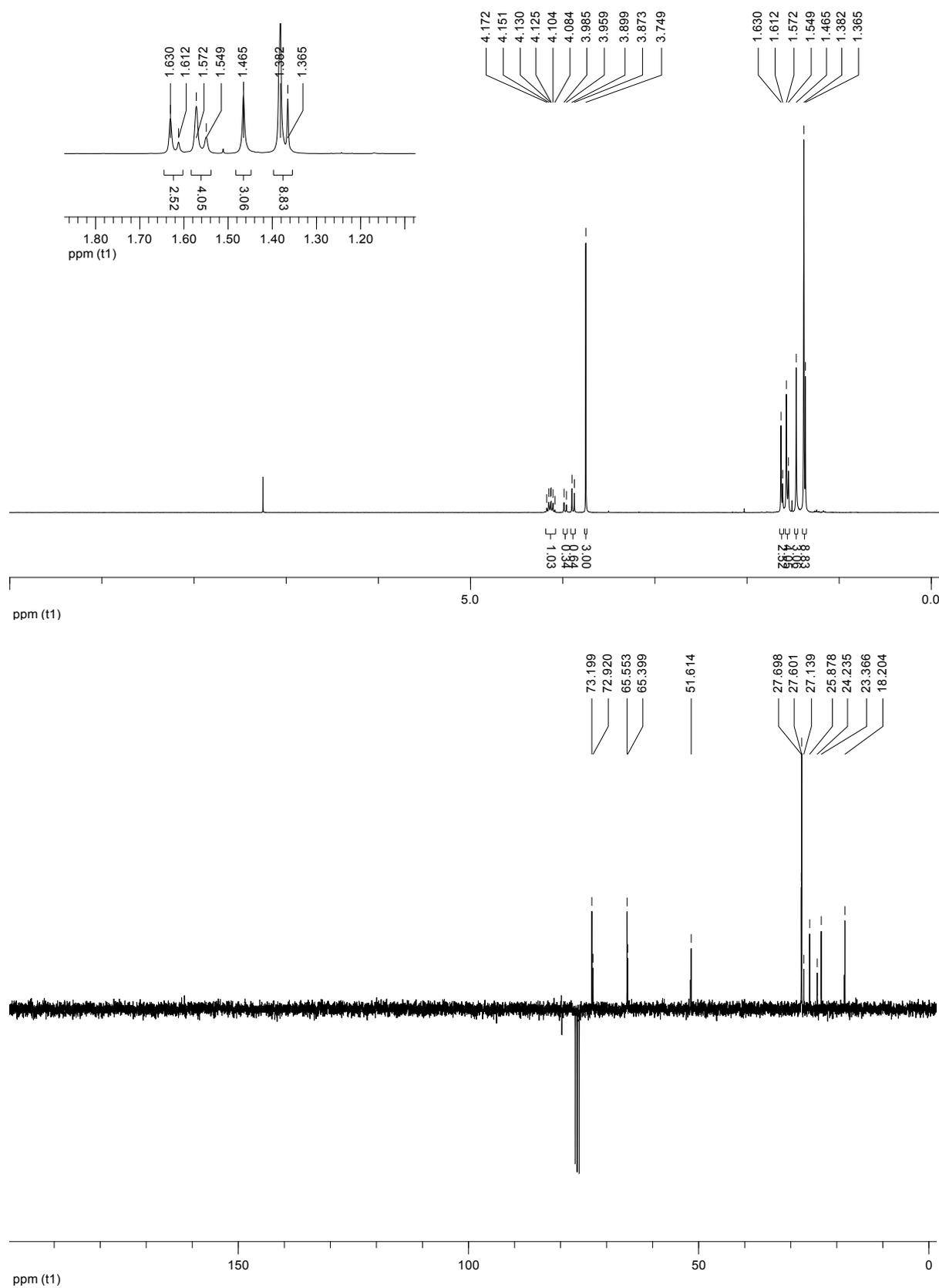
***tert*-Butyl-(1*S*,2*S*)-1-(methoxycarbonyl)-2-hydroxypropylcarbamate (21):**



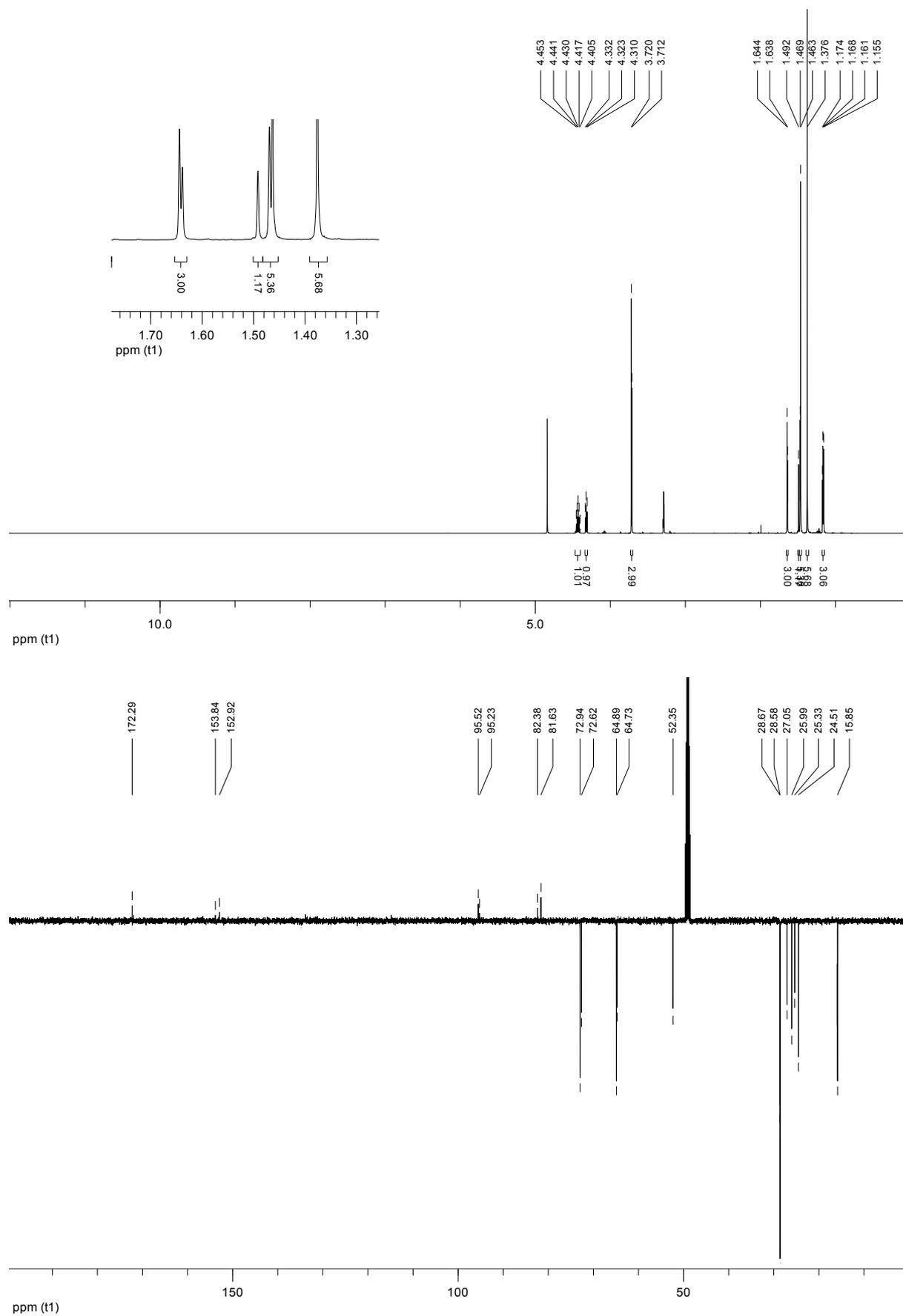
**(S)-3-*tert*-Butyl-4-methyl-2,2-dimethyloxazolidin-3,4-dicarboxylat (22):**



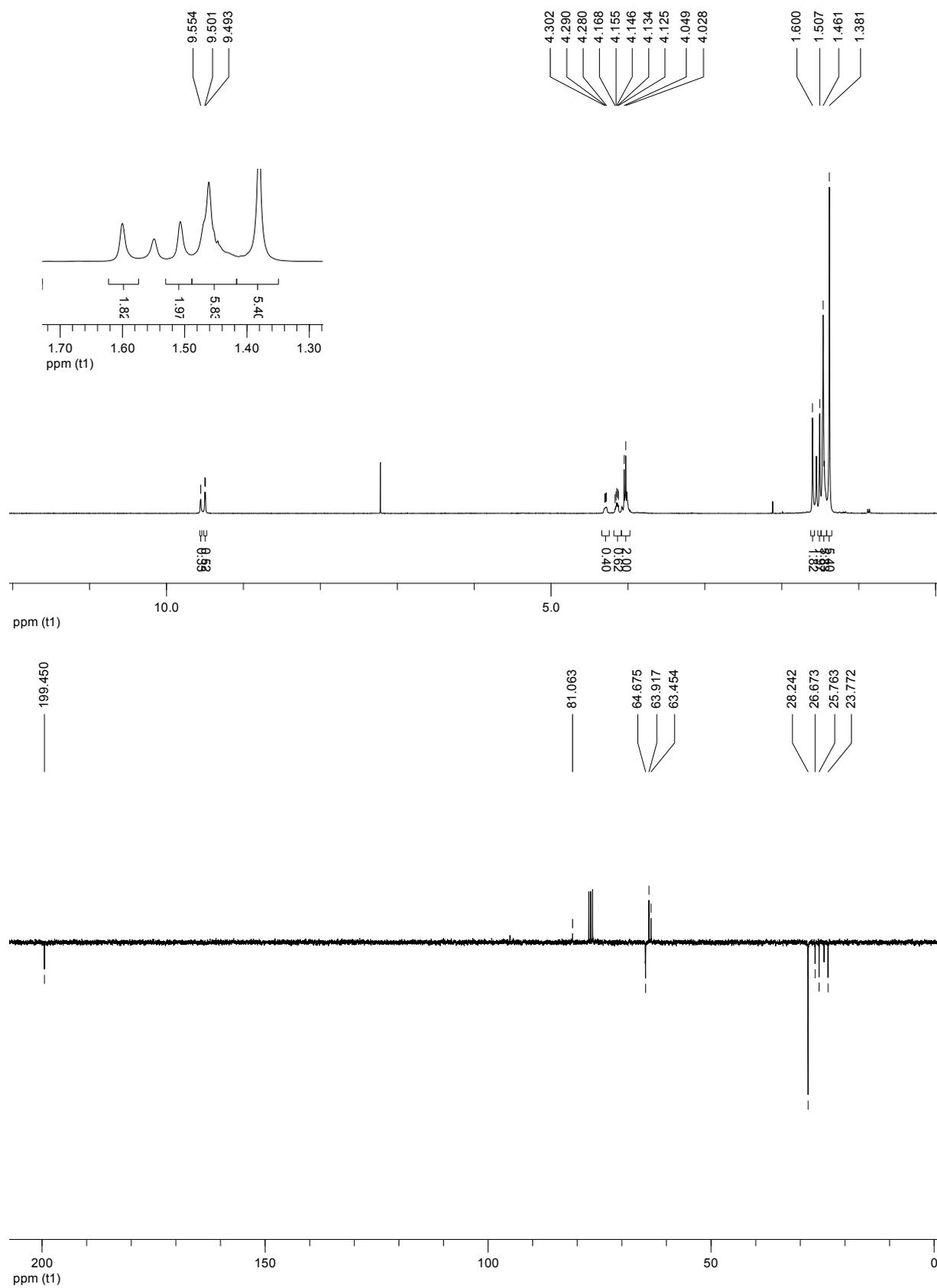
**(4*S*,5*R*)-3-*tert*-Butyl-4-methyl-2,2,5-trimethyloxazolidin-3,4-dicarboxylat (23):**



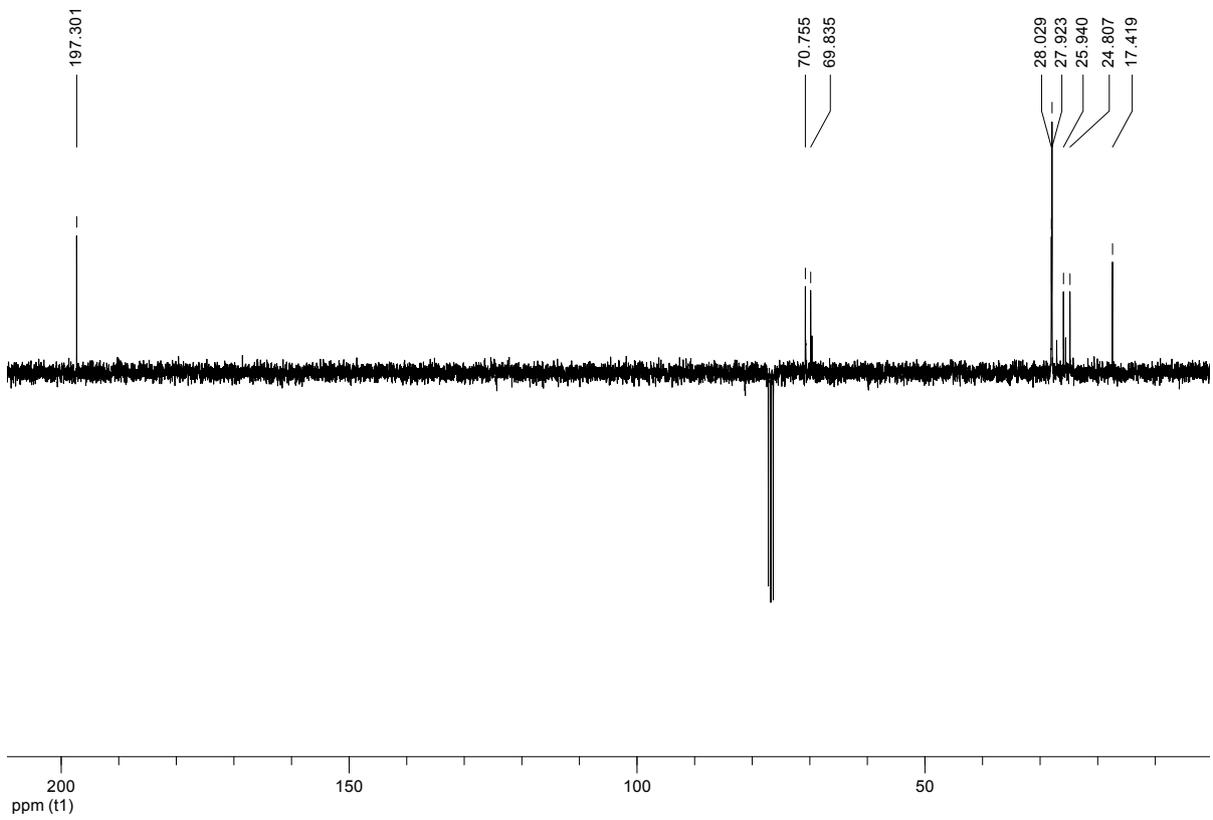
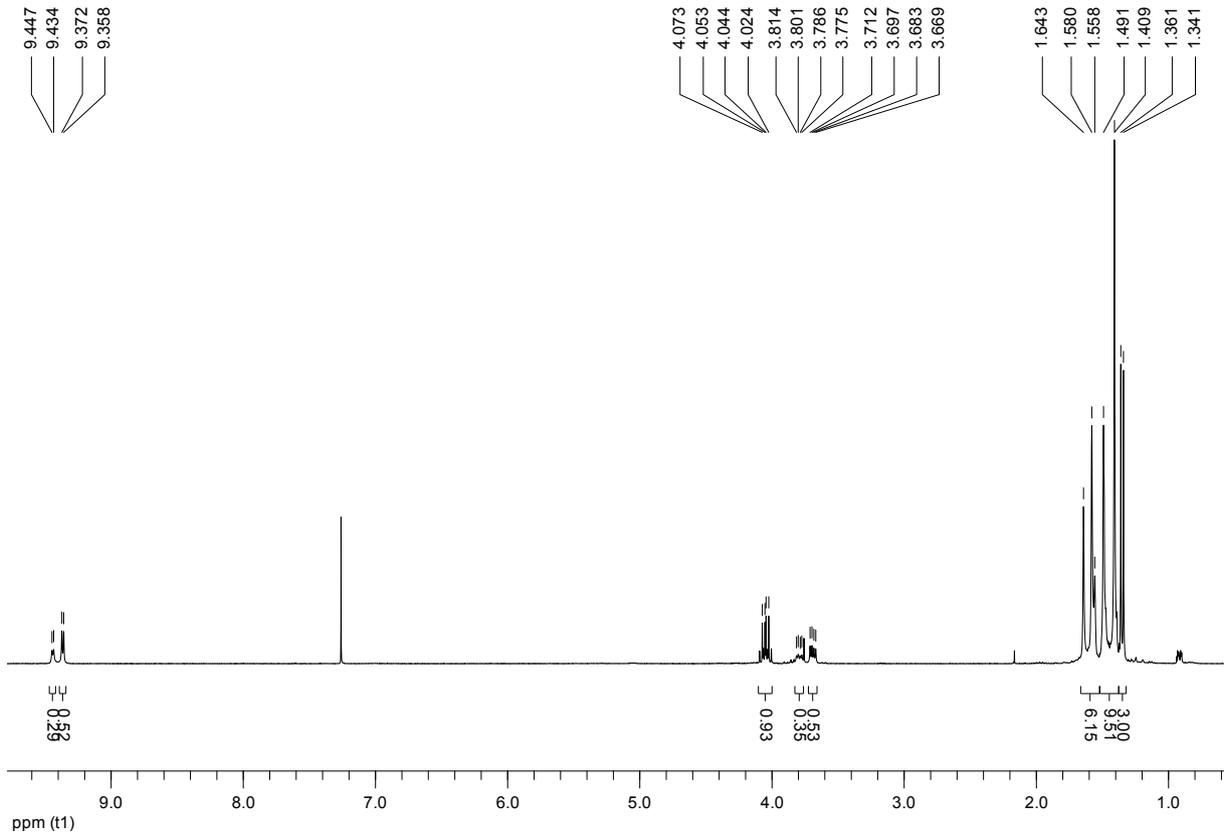
**(4S,5S)-3-tert-Butyl-4-methyl-2,2,5-trimethyloxazolidin-3,4-dicarboxylat (24):**



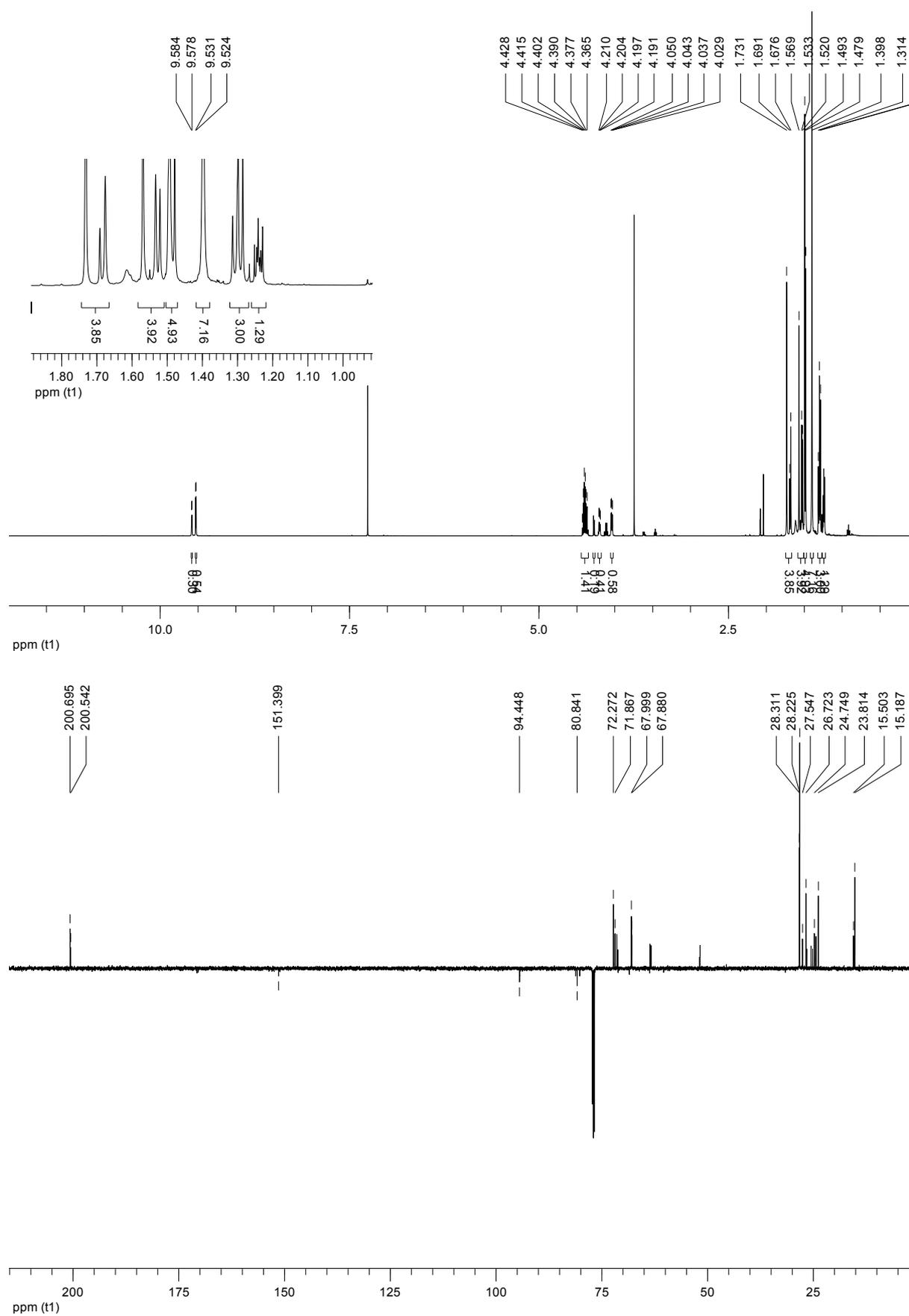
**(S)-tert-Butyl-4-formyl-2,2-dimethyloxazolidin-3-carboxylat (25):**



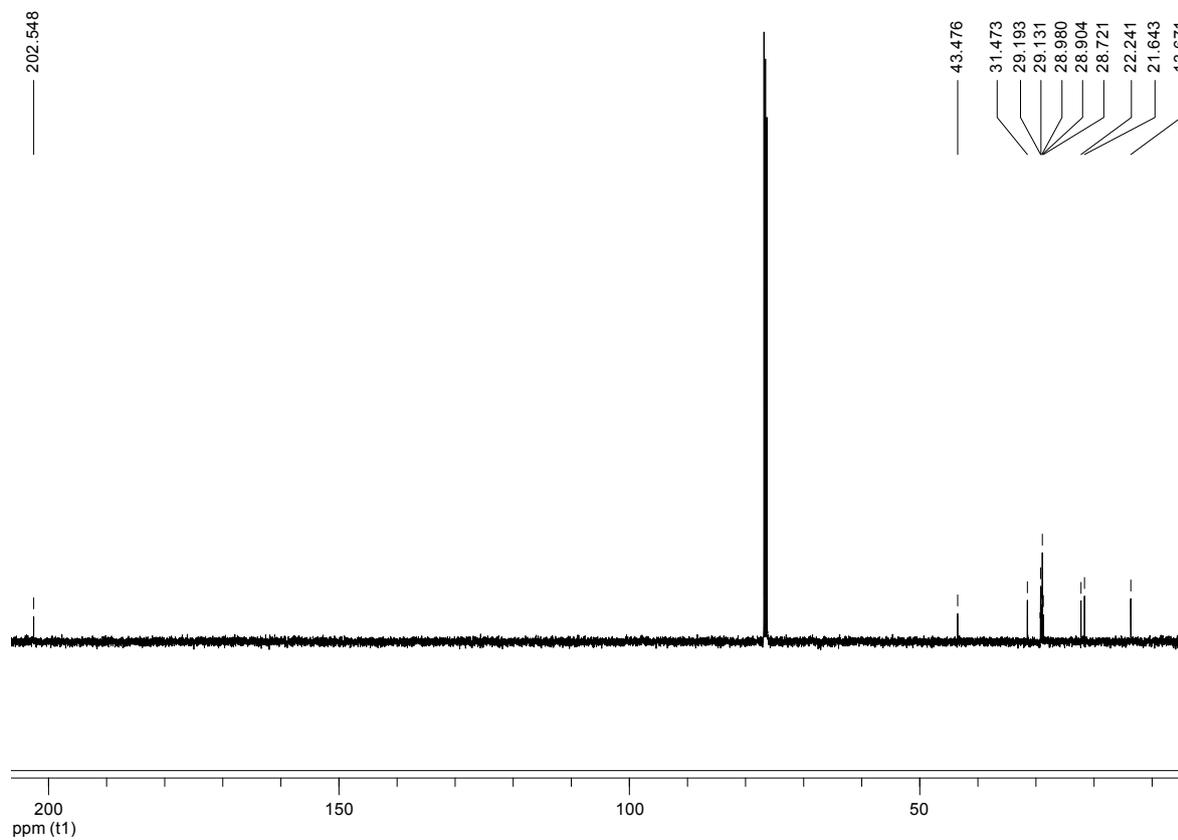
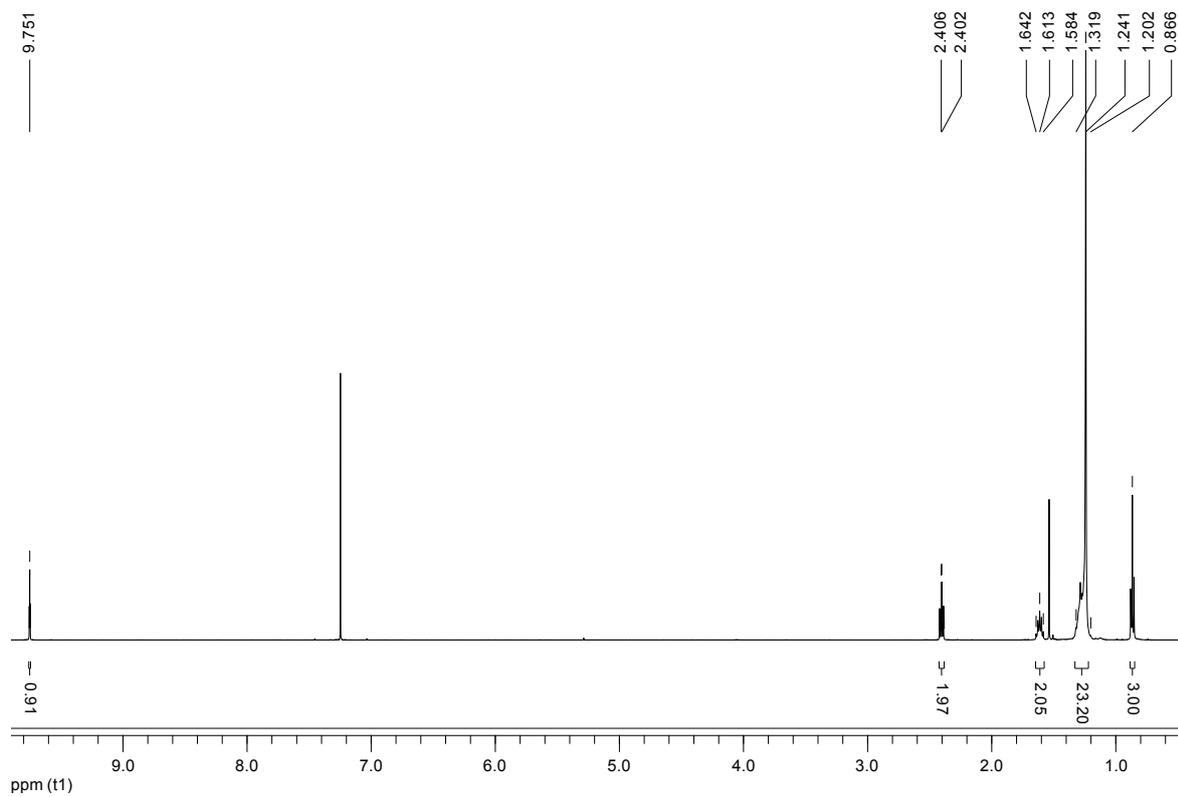
**(S)-tert-Butyl-4-formyl-2,2-dimethyloxazolidin-3-carboxylat (26):**



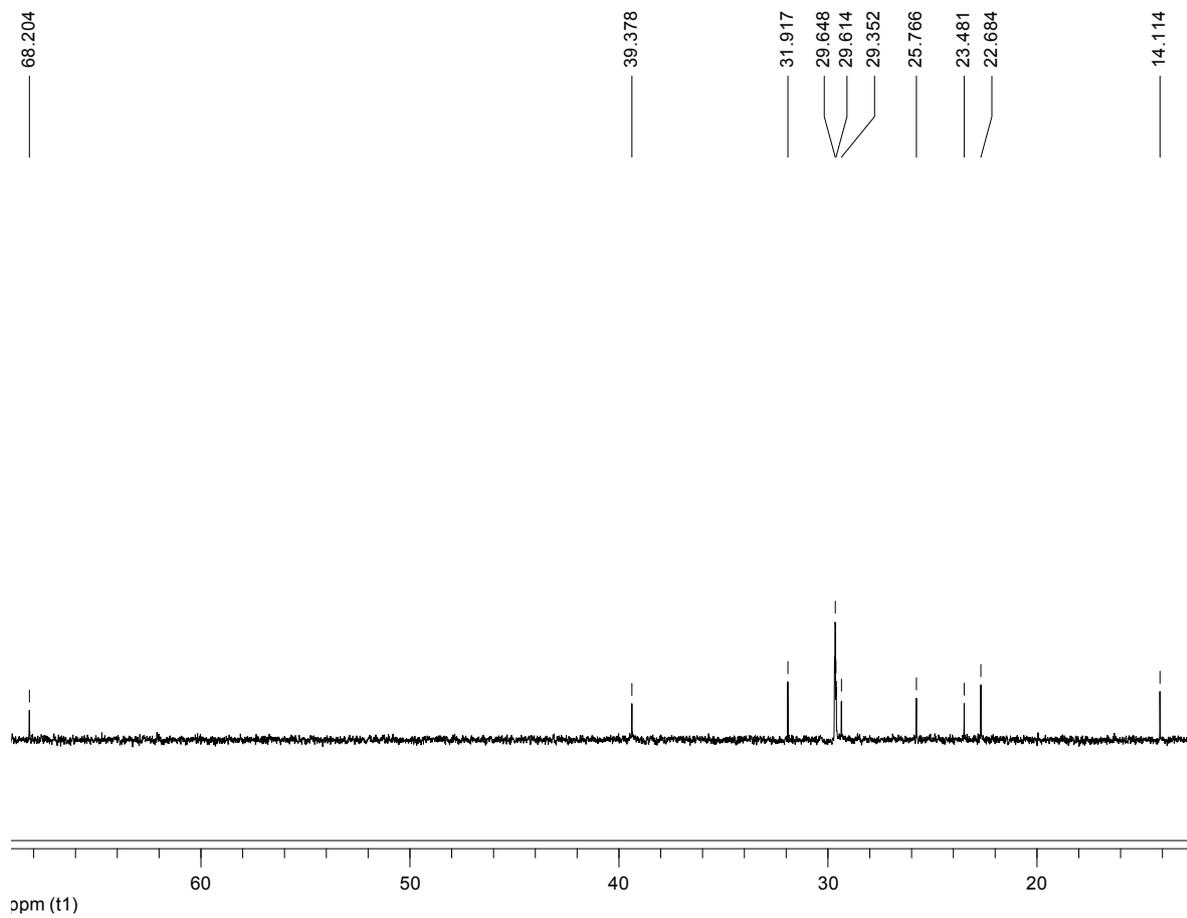
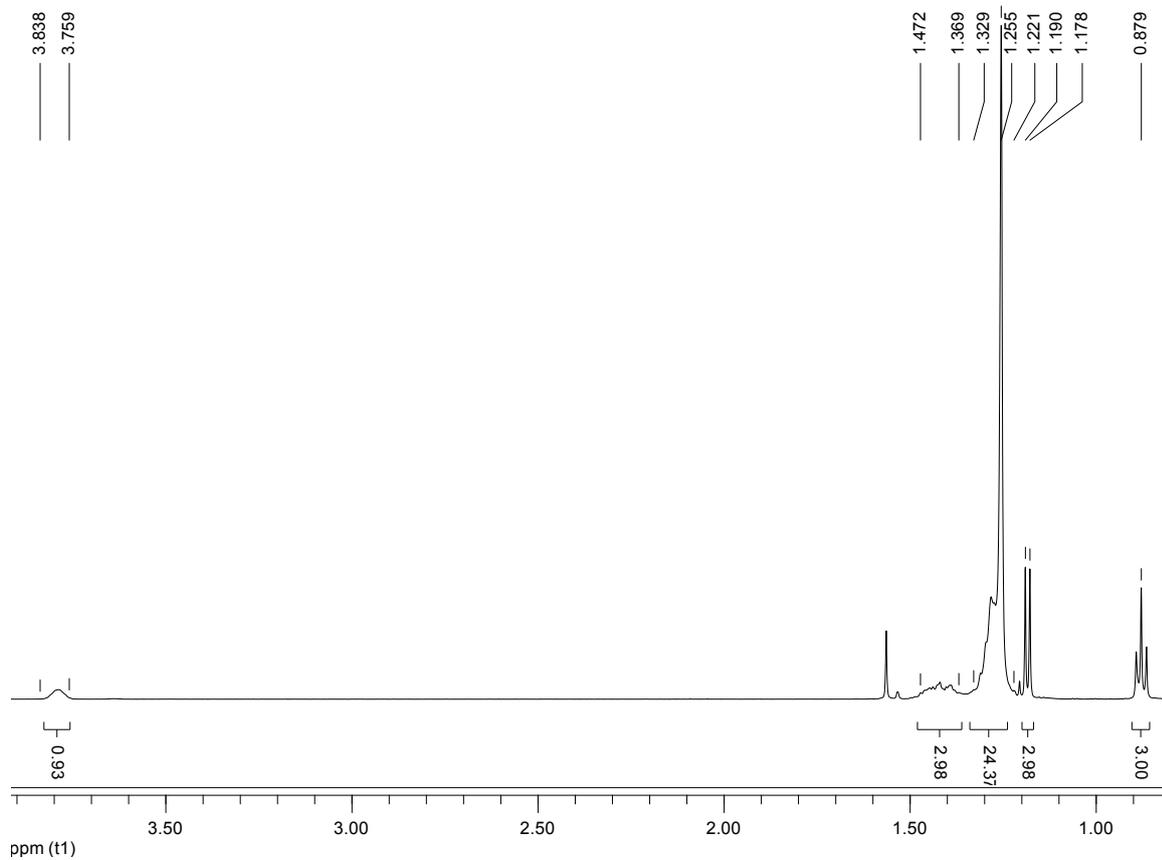
**(4*S*,5*S*)-*tert*-Butyl-4-formyl-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylat (27):**



# 1-Pentadecanal (28):

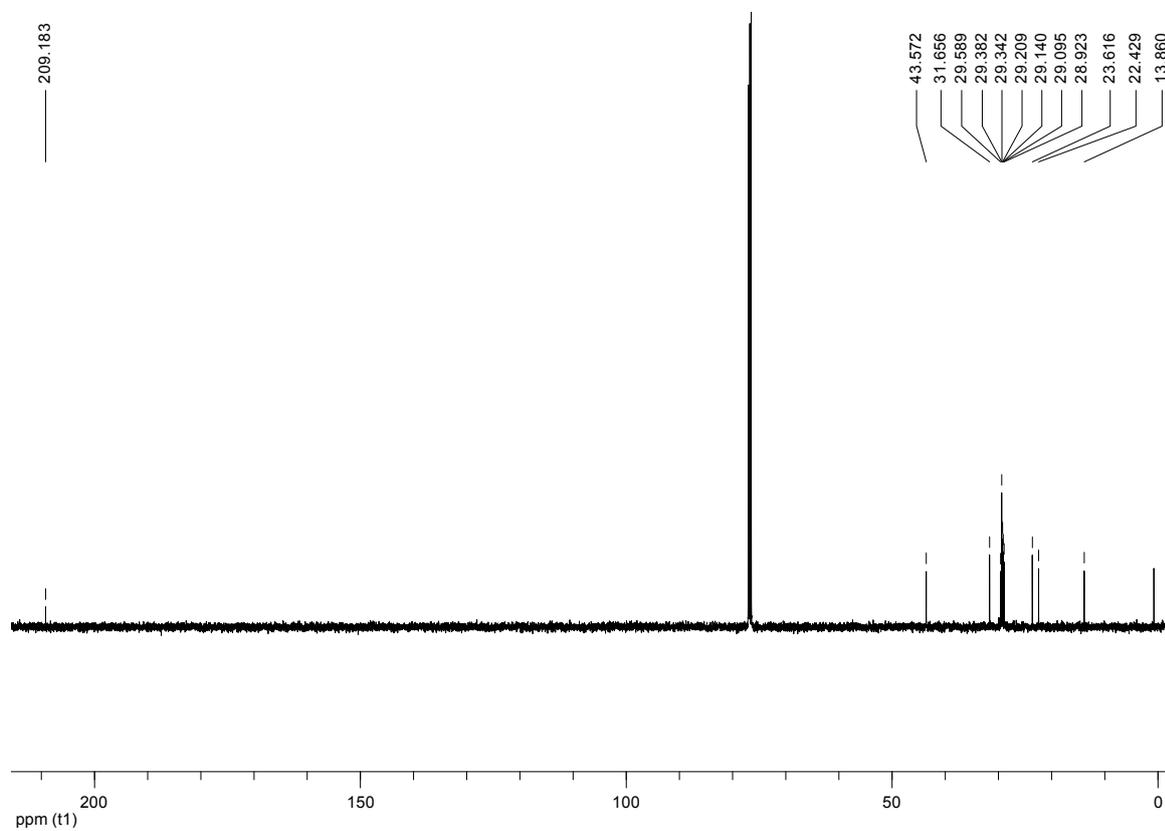
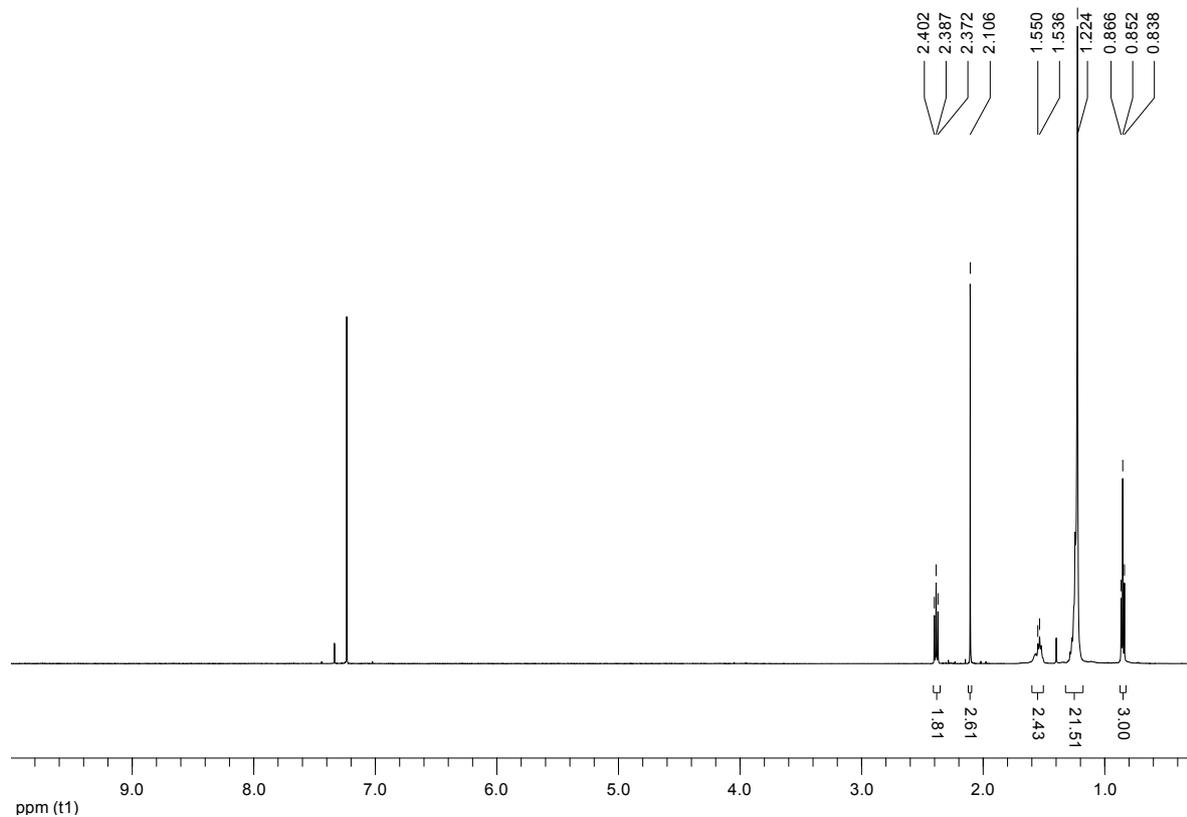


## 2-Hexadecanol (29):

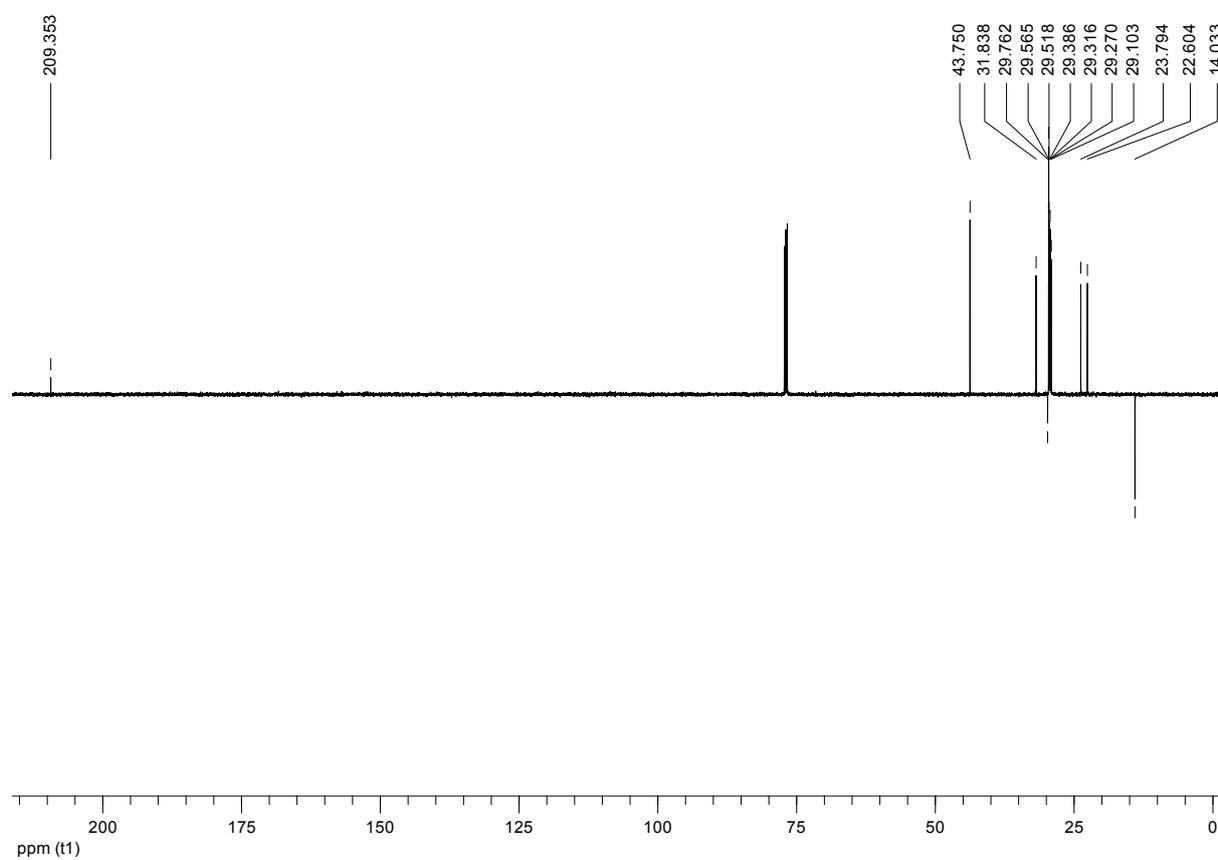
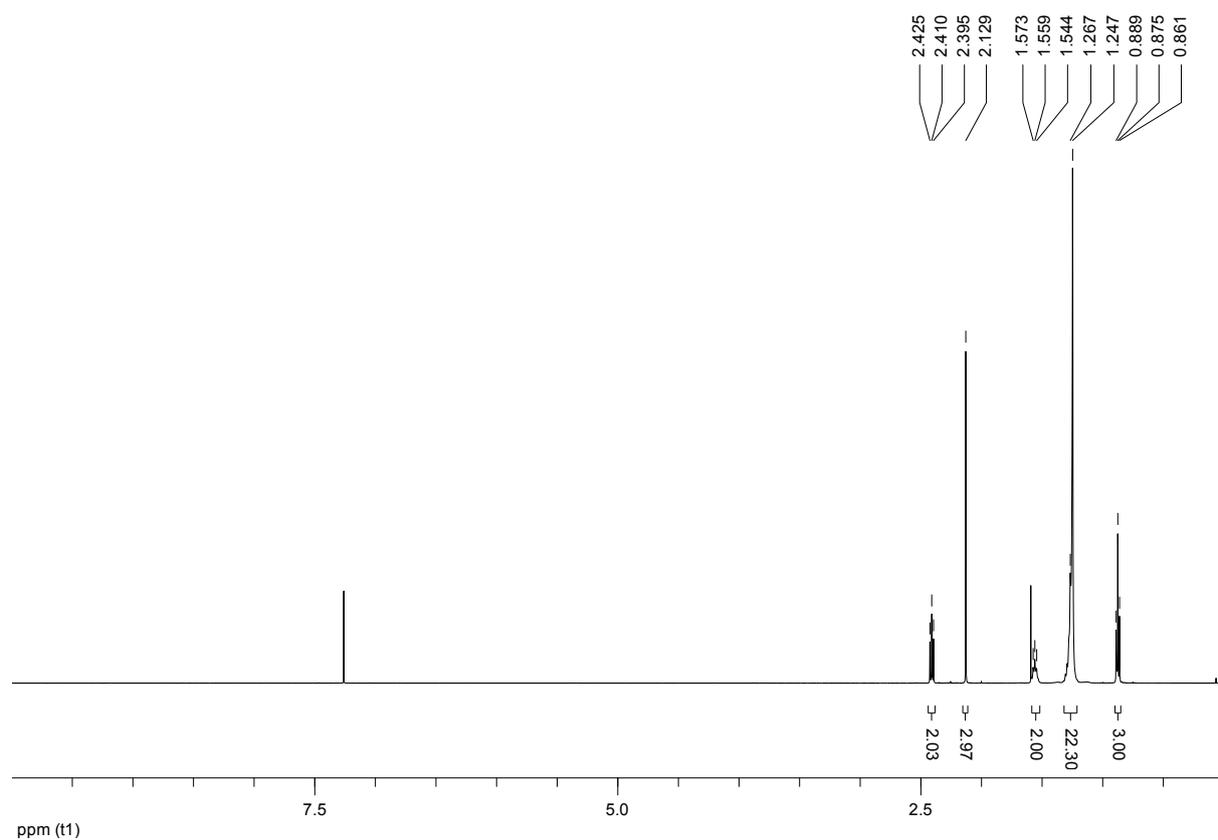


## 2-Hexadecanon (30):

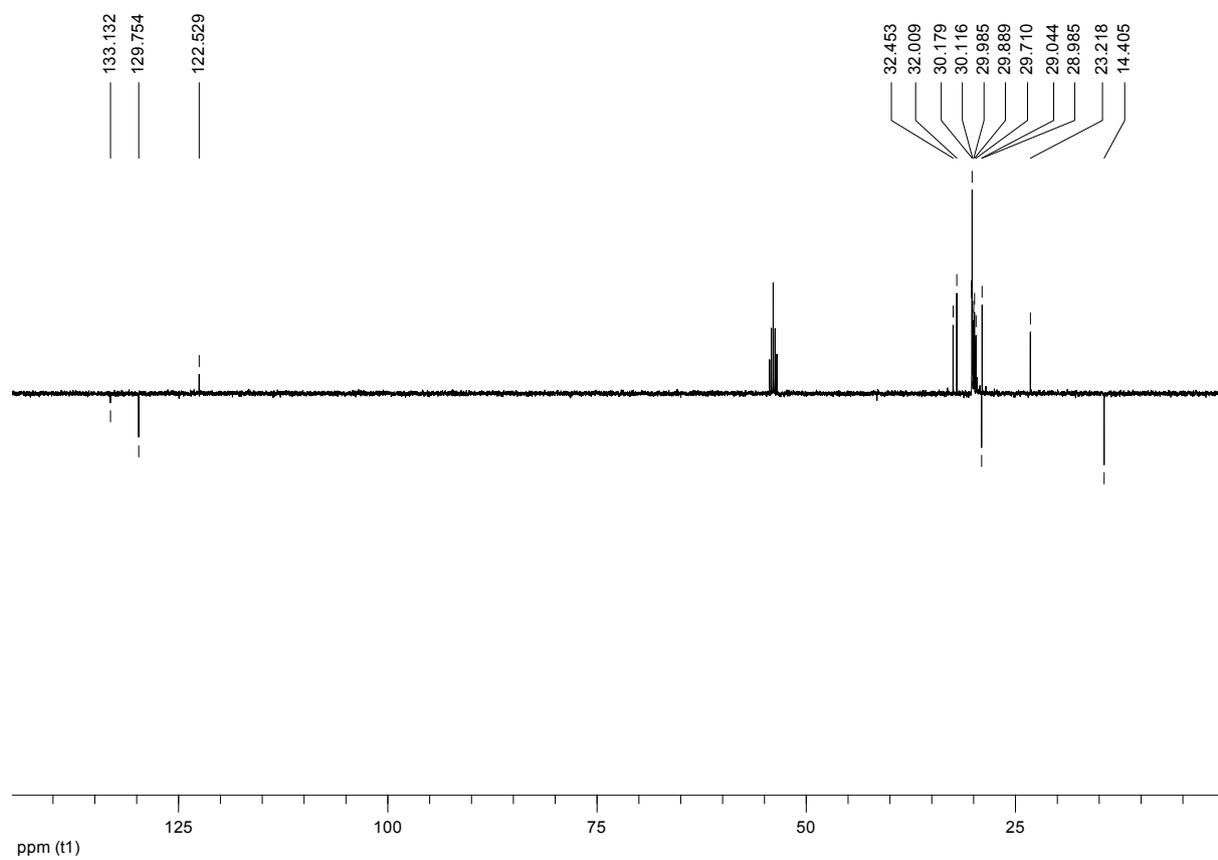
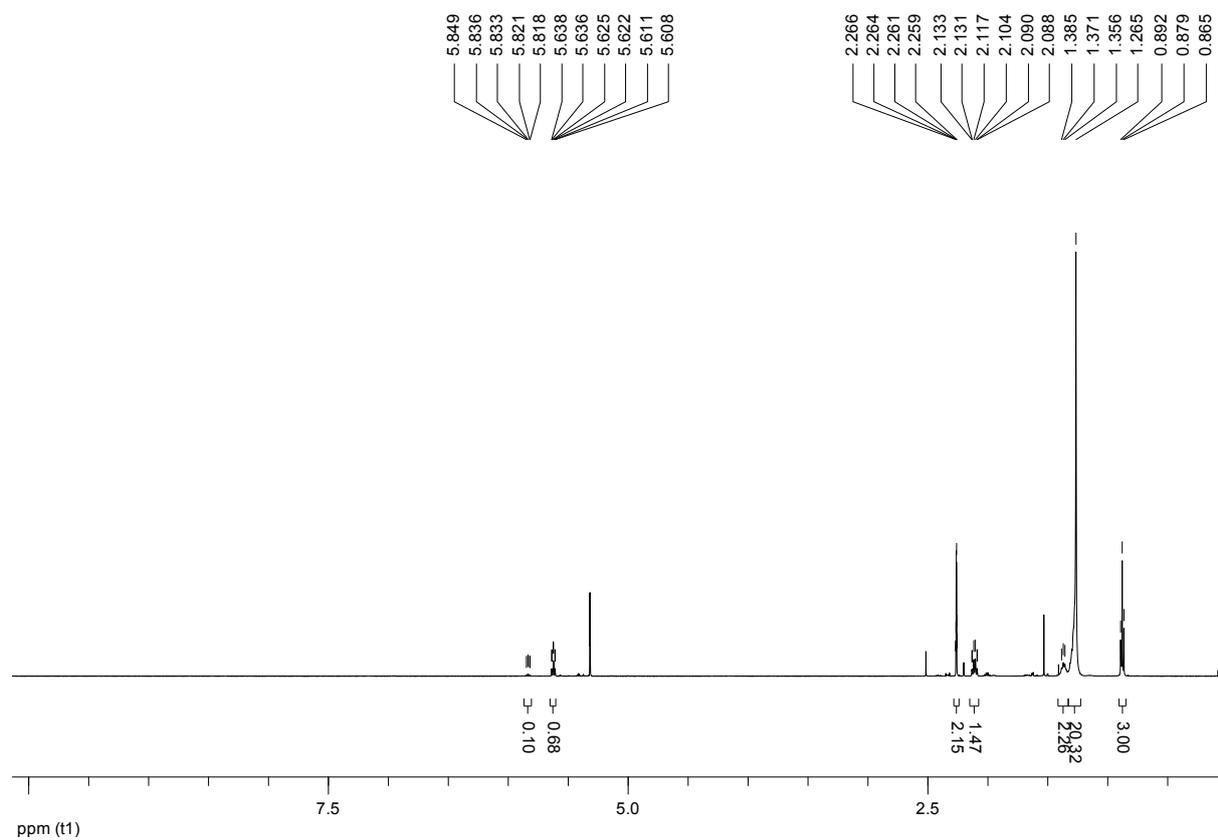
a)



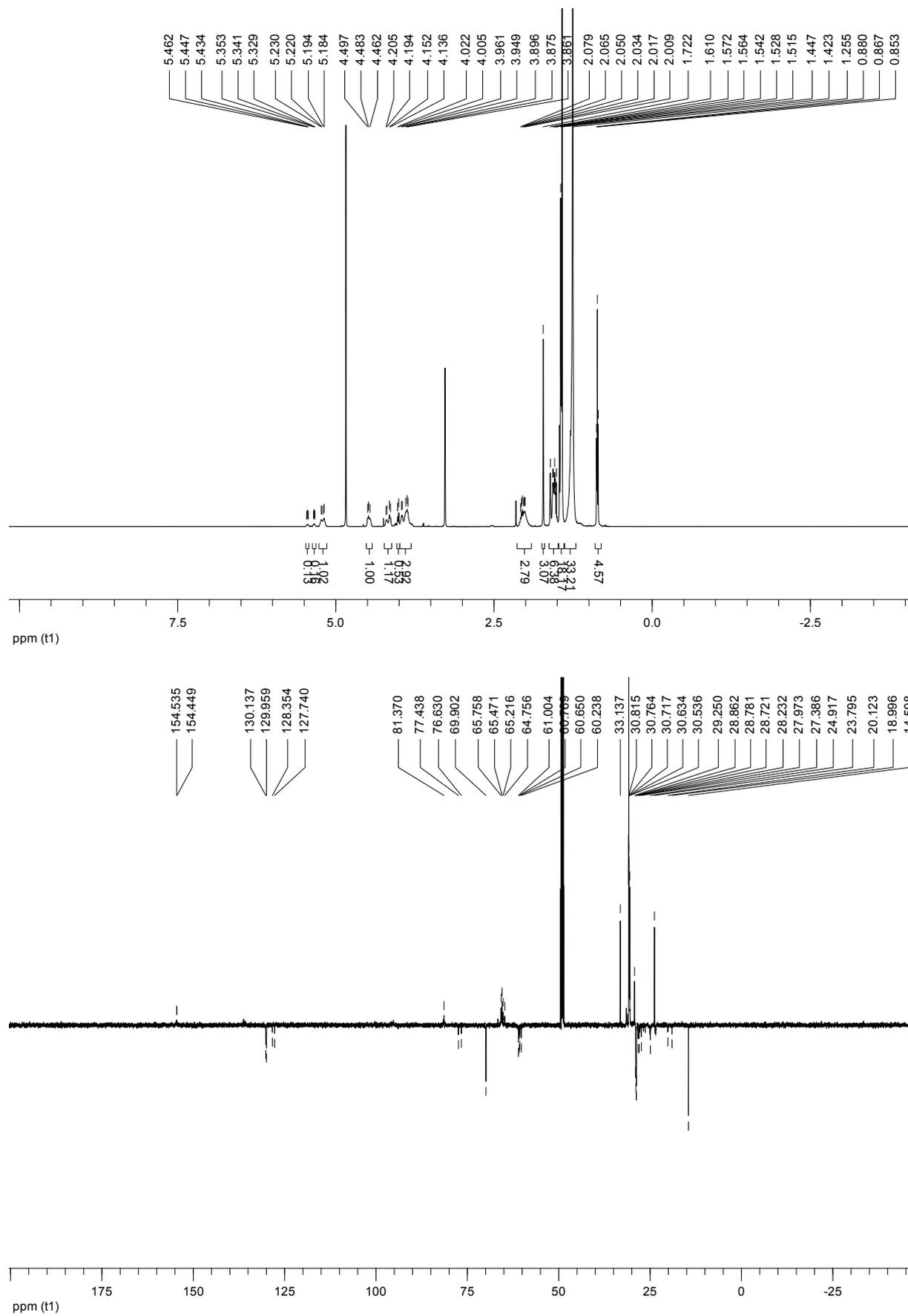
b)



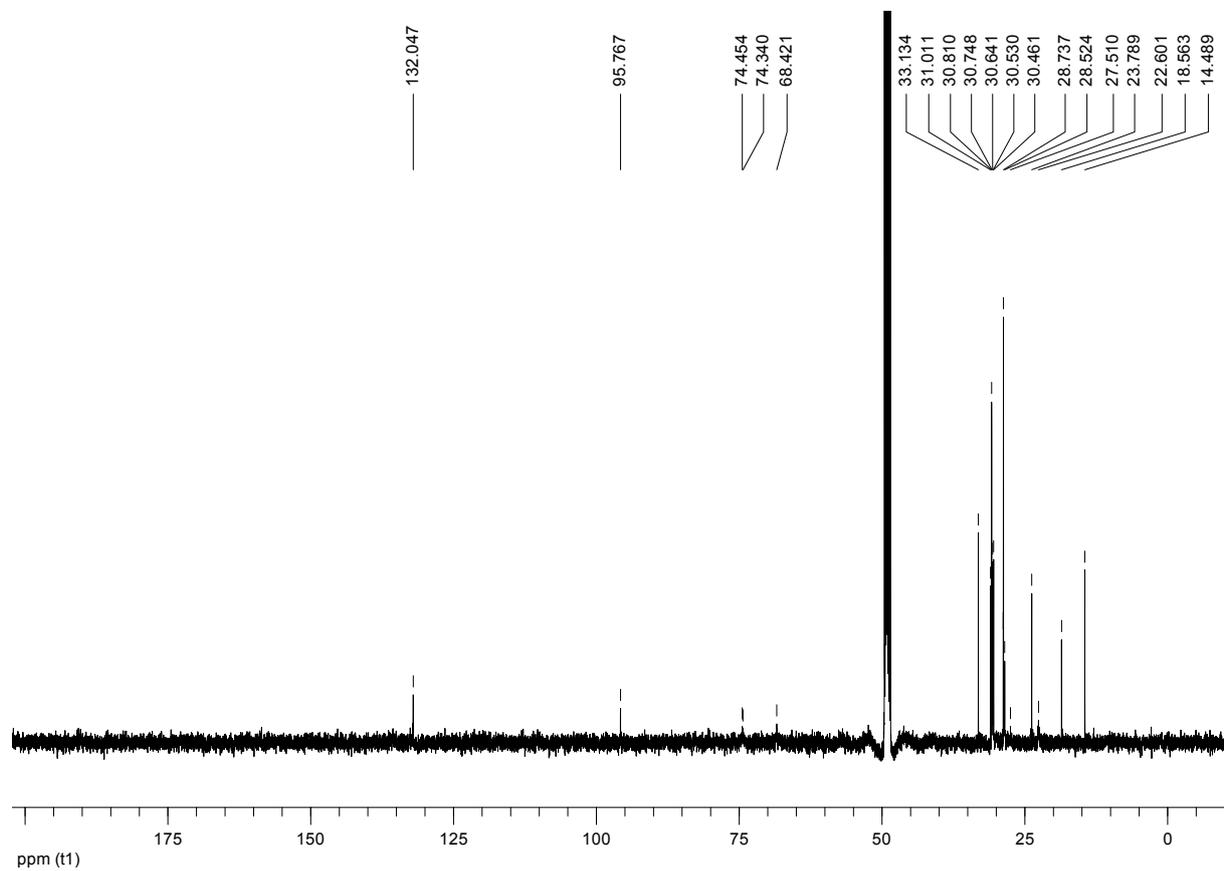
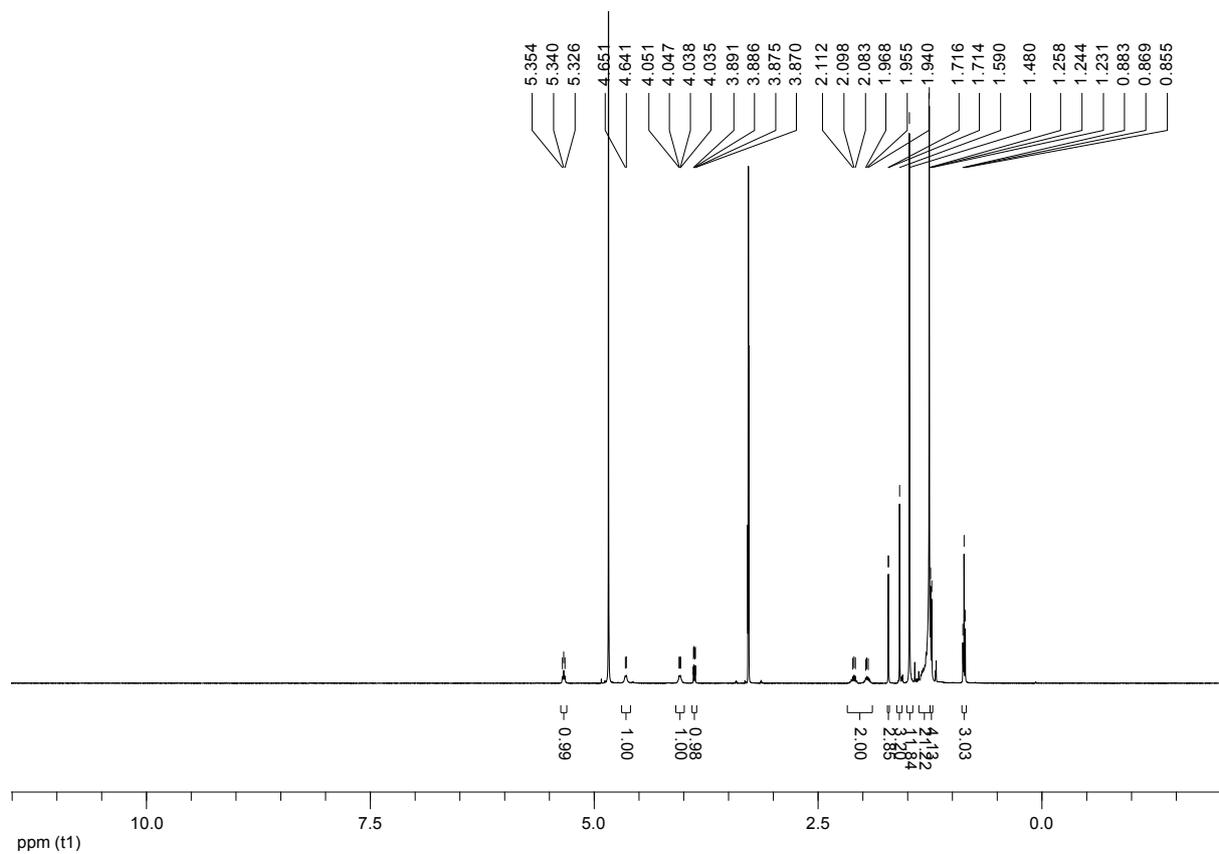
**(Z)-2-Bromohexadec-2-en (31):**



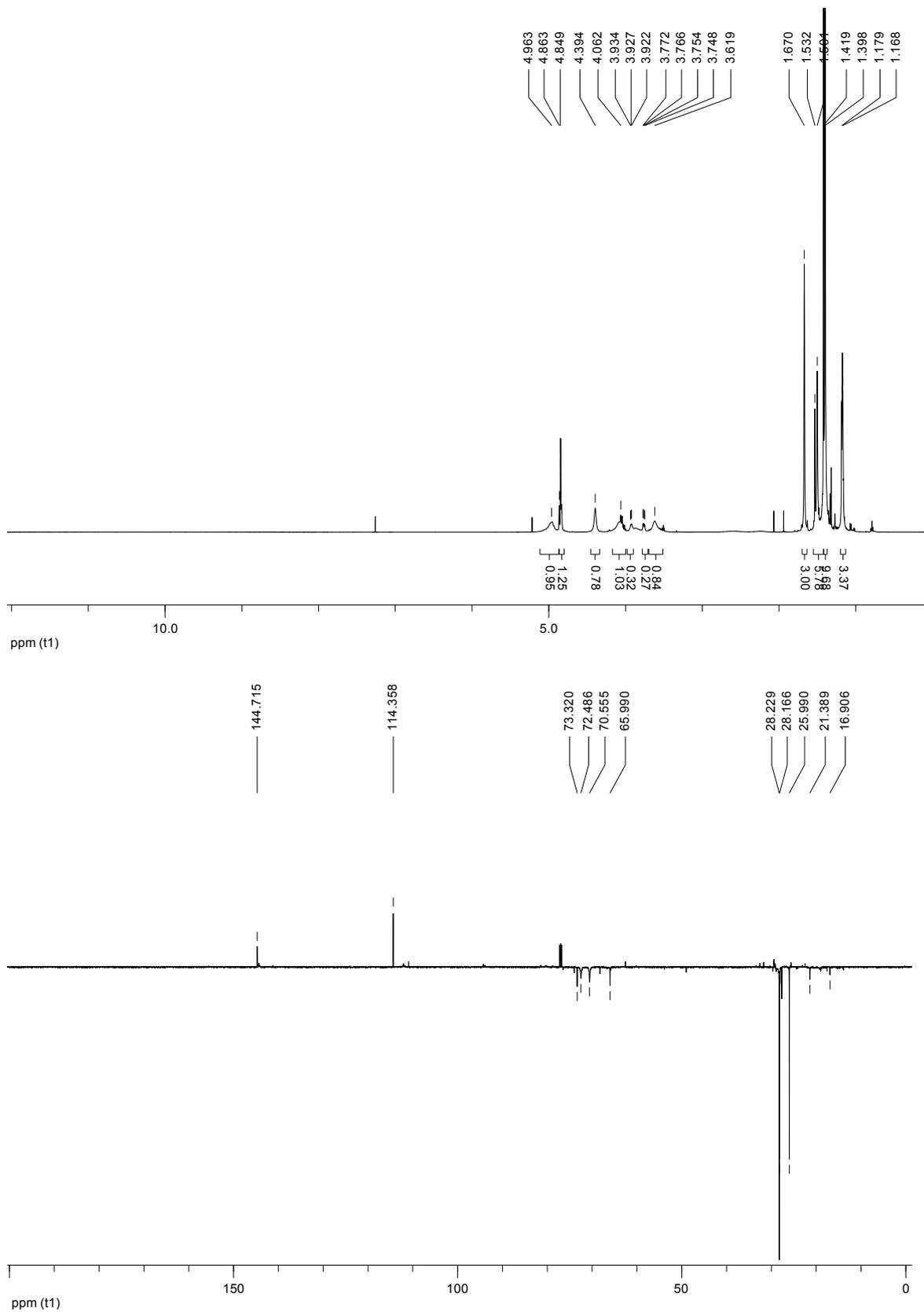
**(S)-tert-Butyl-4-((R,Z)-1-hydroxy-2-methylhexadec-2-enyl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-carboxylat (32):**



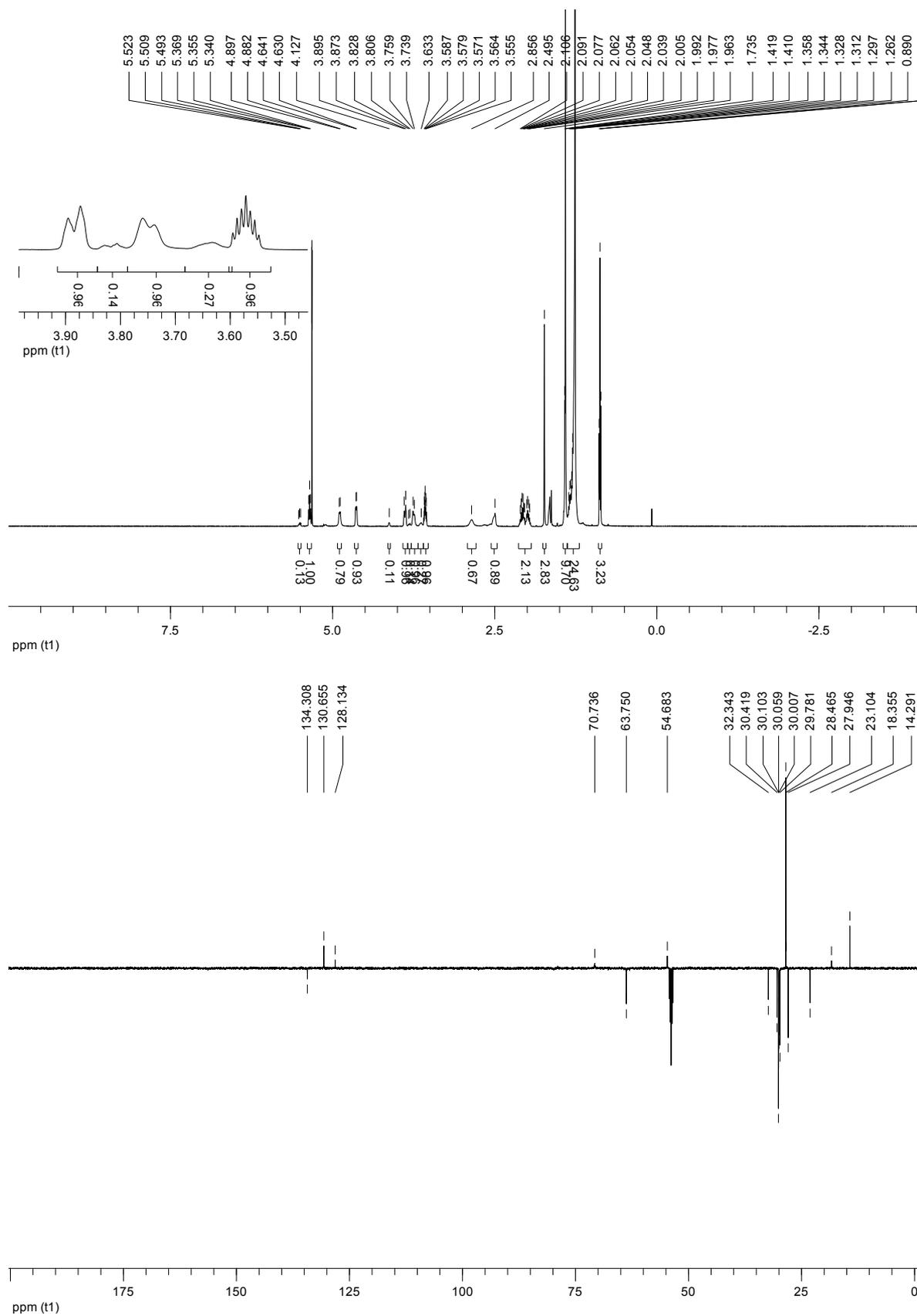
**(4*R*,5*R*)-*tert*-Butyl-4-((*R*,*Z*)-1-hydroxy-2-methylhexadec-2-enyl)-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylat (33):**



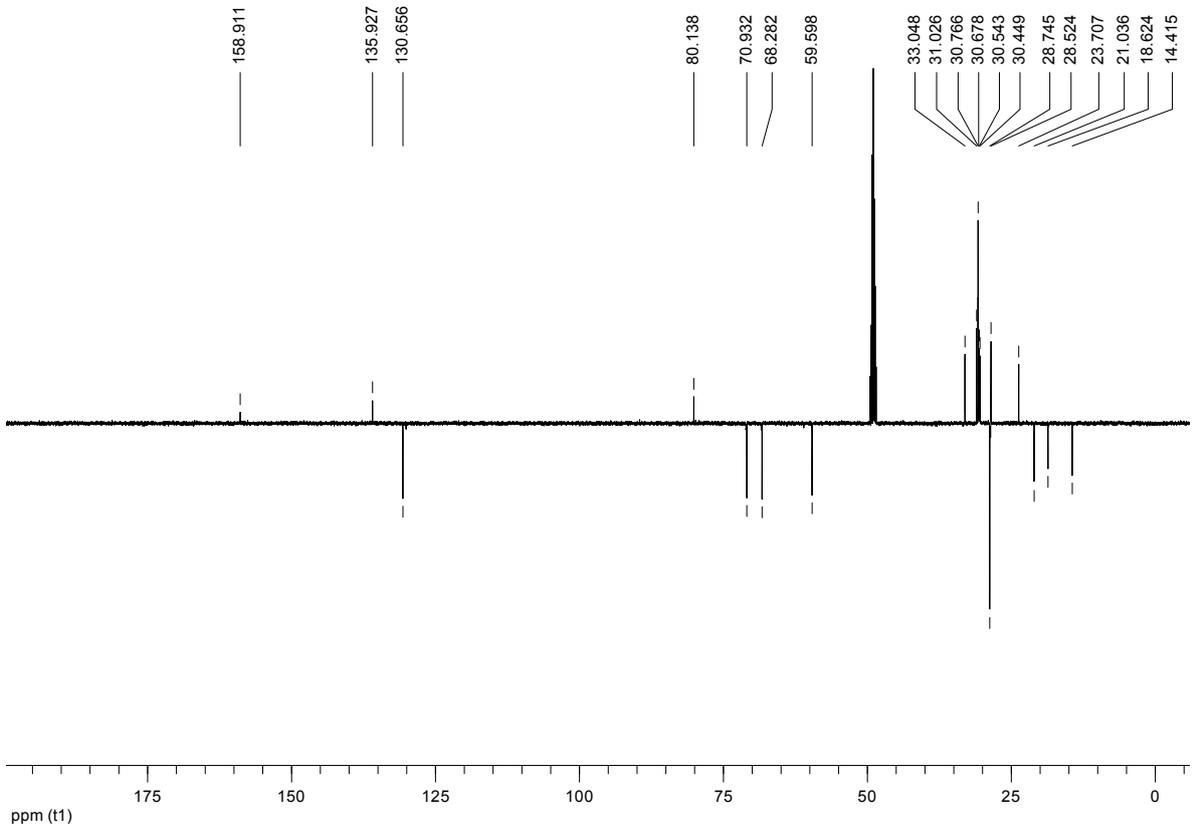
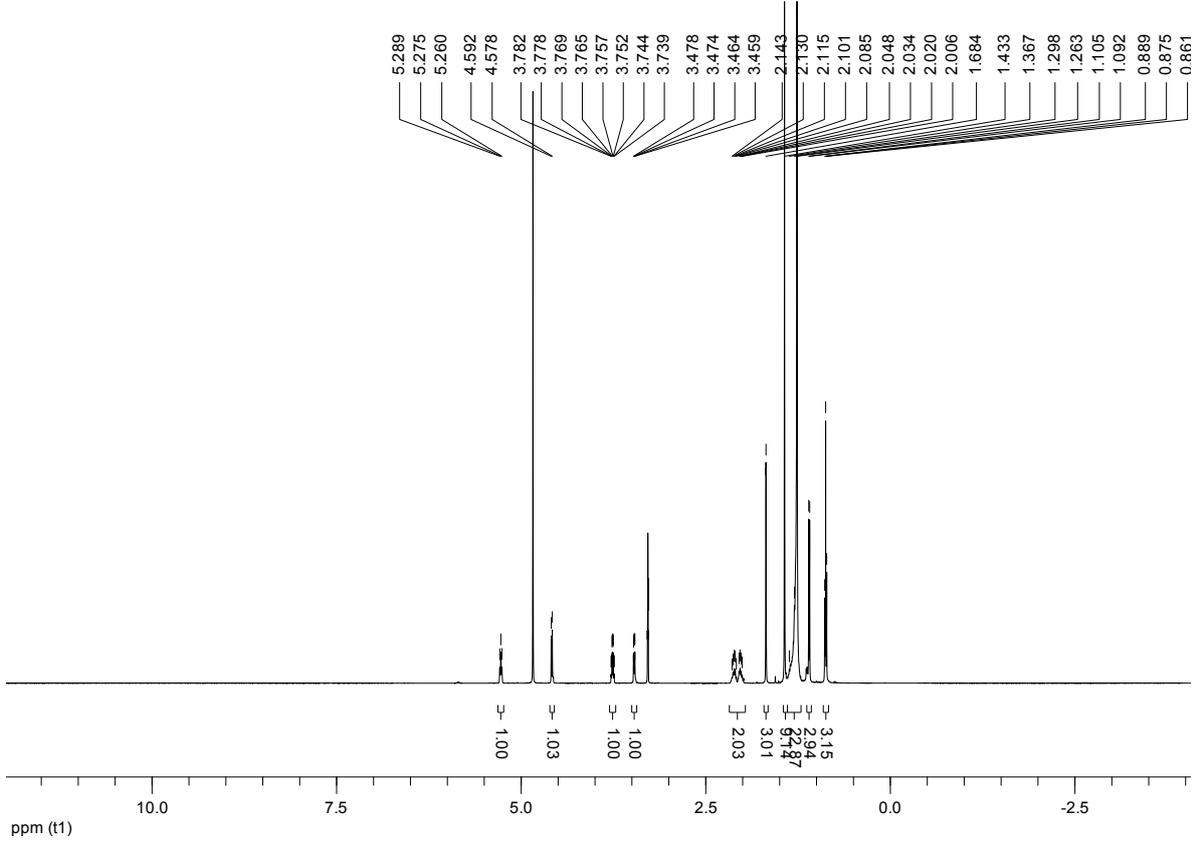
**(4R,5R)-tert-Butyl-4-((R)-1-hydroxy-2-methylallyl)-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylat (34):**



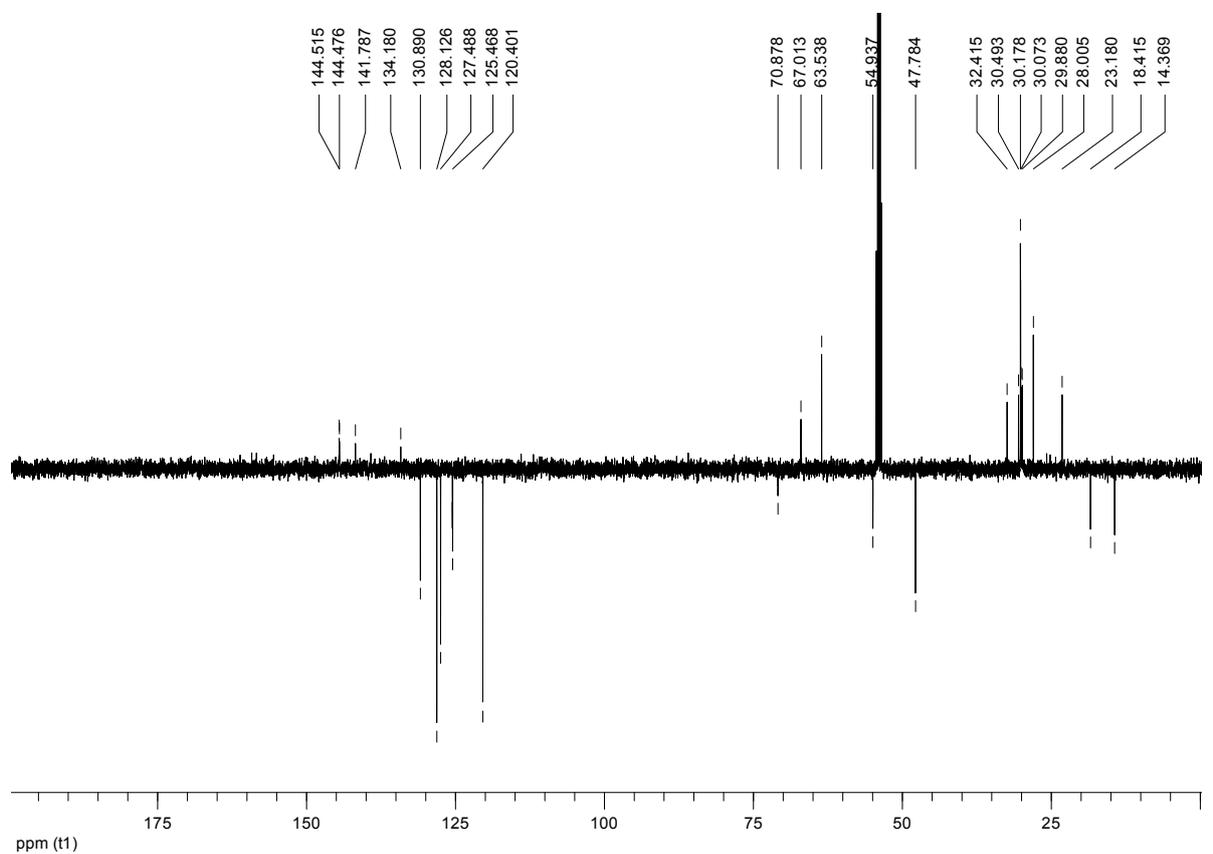
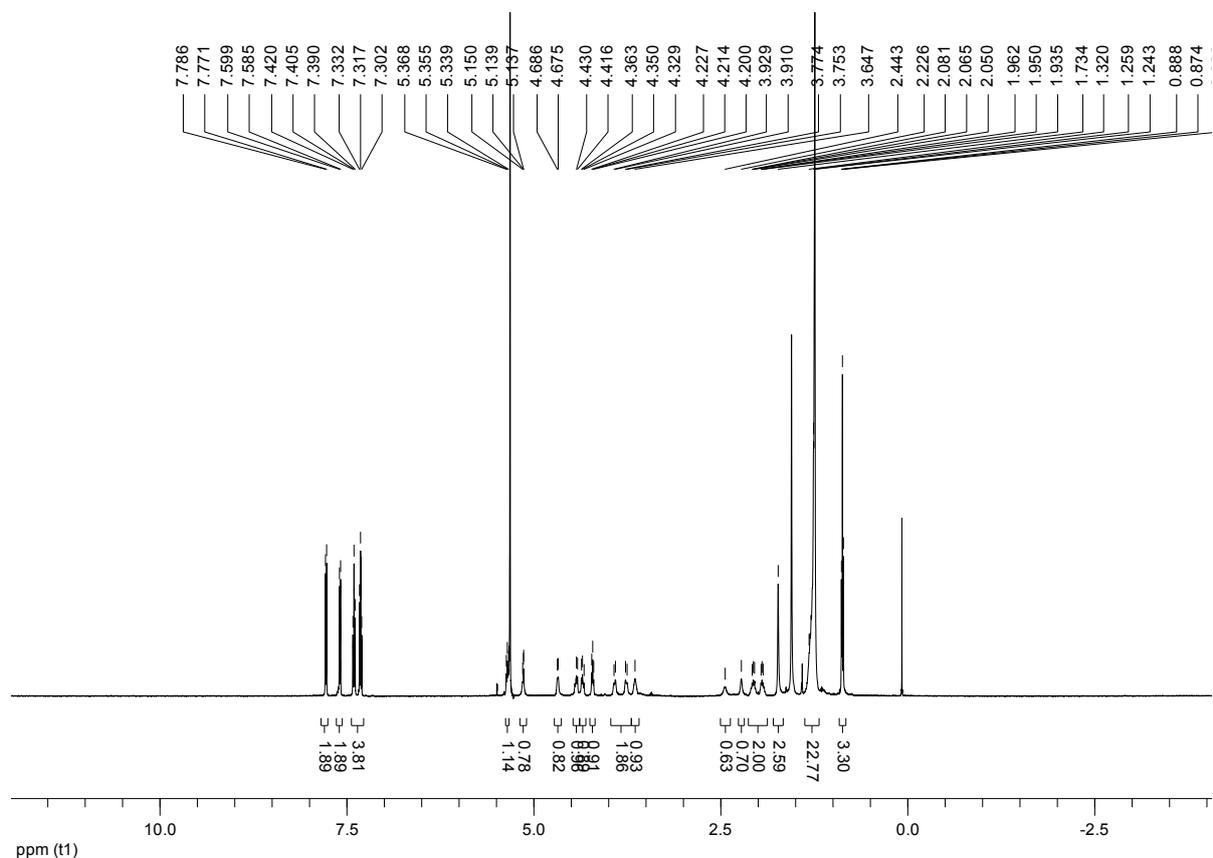
**tert-Butyl-(Z,2S,3R)-1,3-dihydroxy-4-methyloctadec-4-en-2-ylcarbamate (35):**



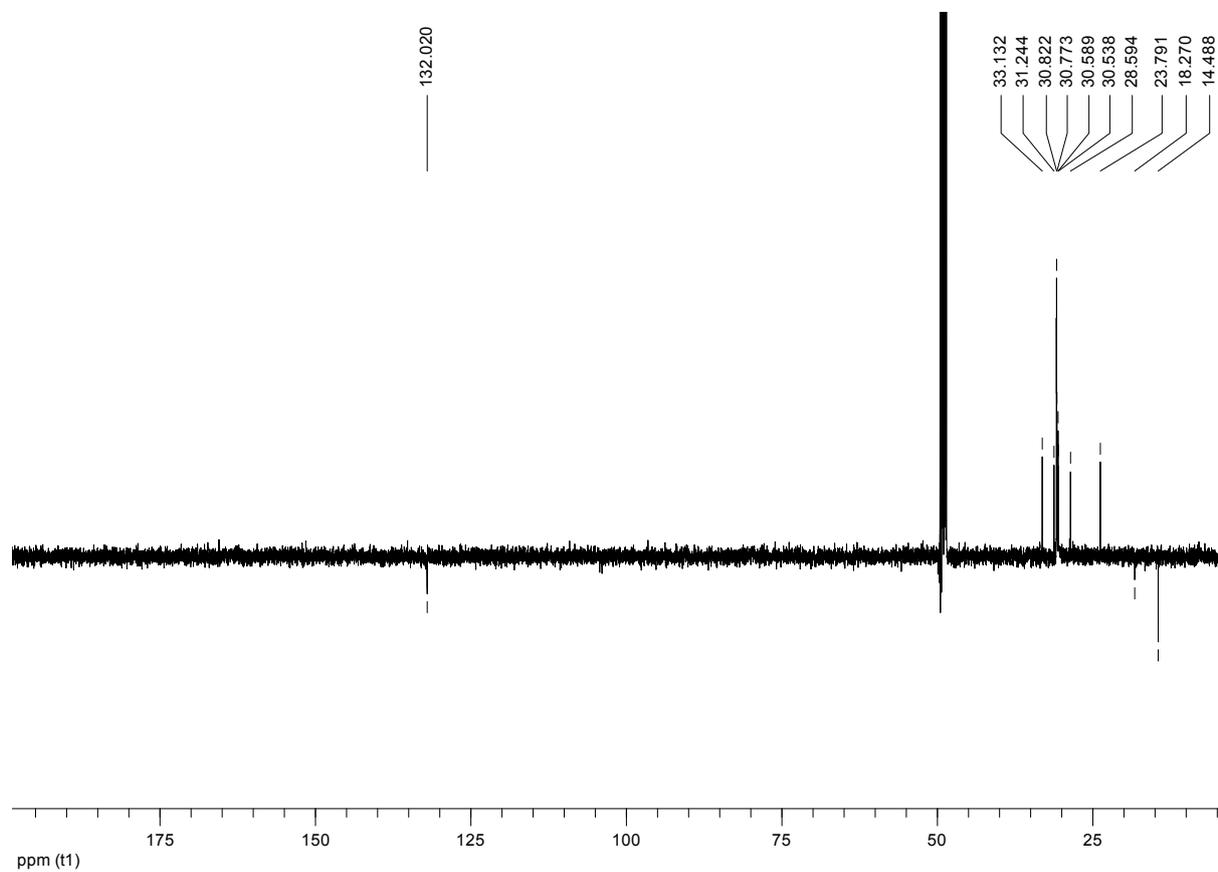
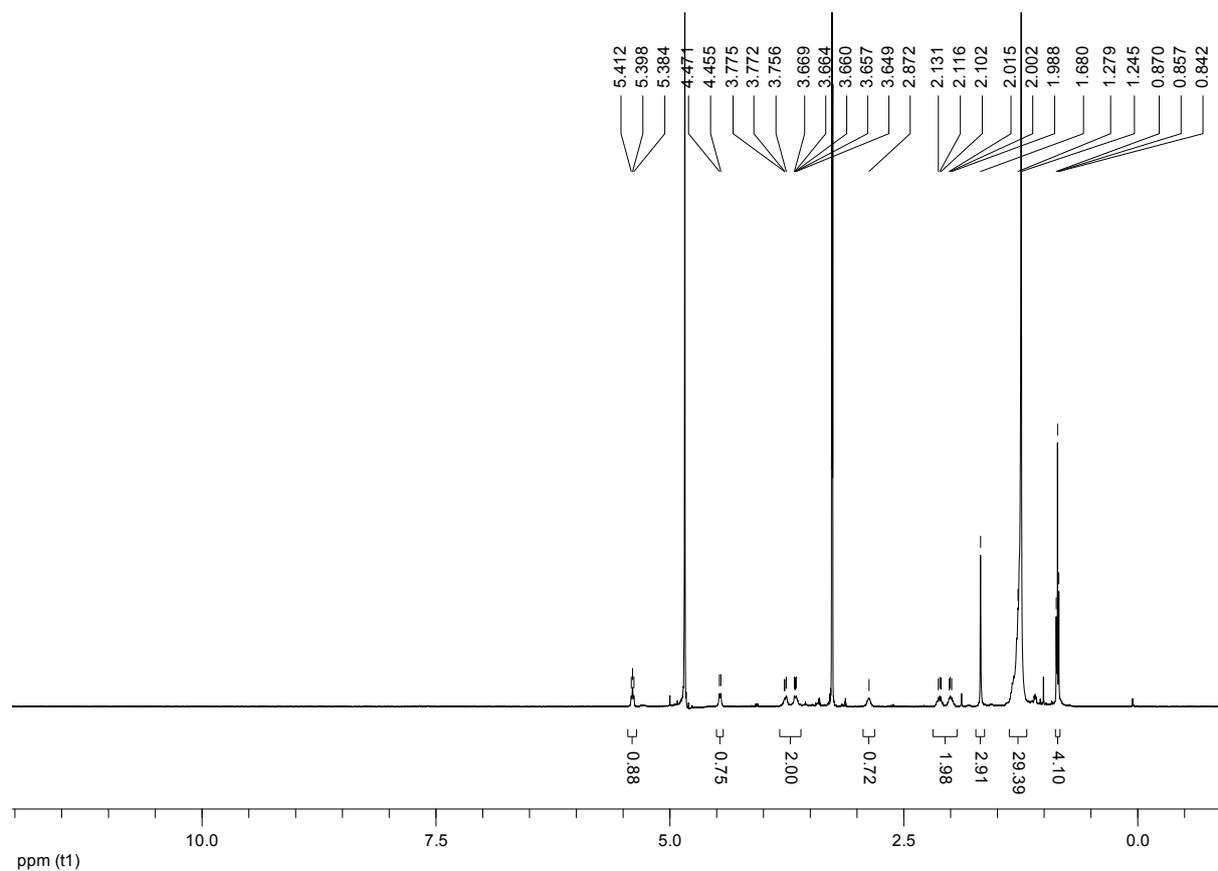
**tert-Butyl-(Z,2R,3S,4R)-2,4-dihydroxy-5-methylnonadec-5-en-3-ylcarbamate (36):**

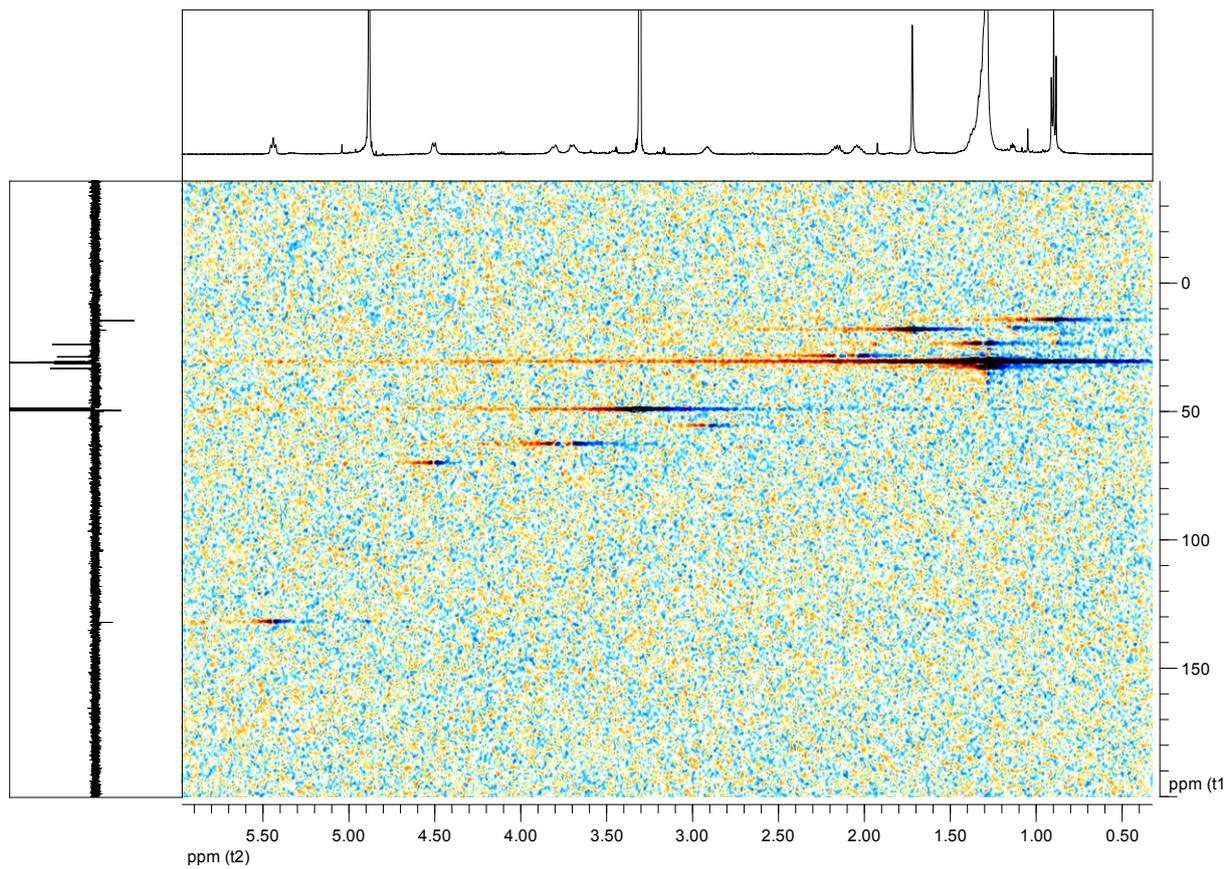


**(9H-Fluoren-9-yl)-methyl-(Z,2S,3R)-1,3-dihydroxy-4-methyloctadec-4-en-2-ylcarbamate (37):**

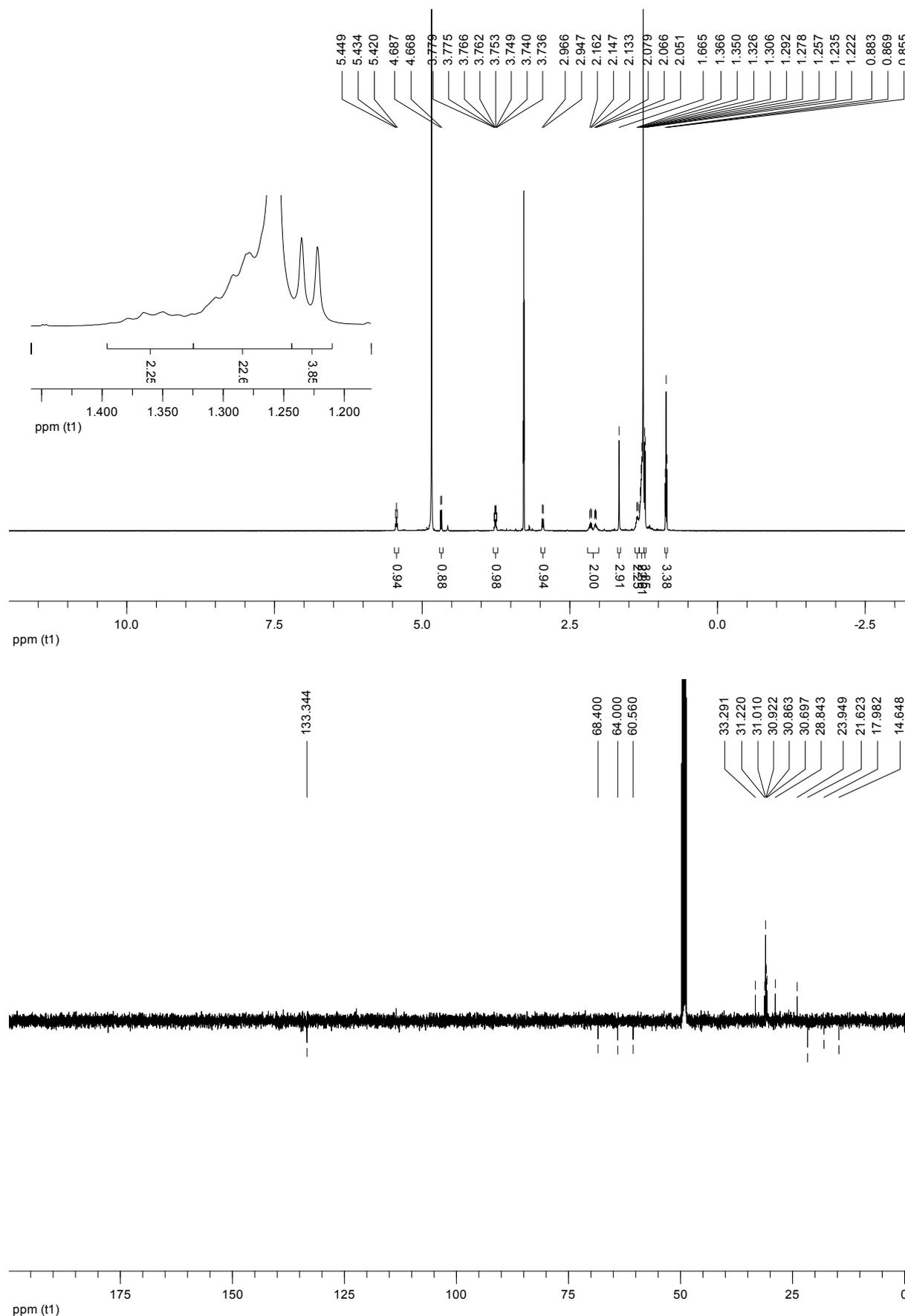


**(Z,2S,3R)-2-Amino-4-methyloctadec-4-en-1,3-diol (1):**

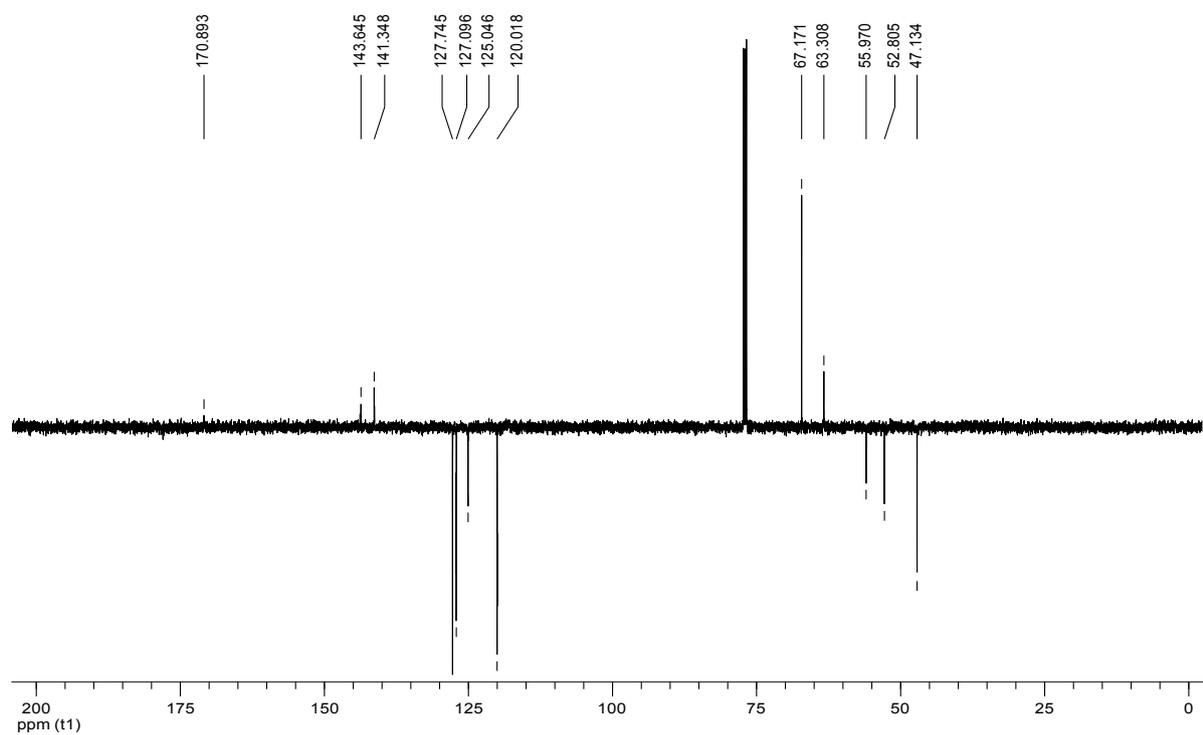
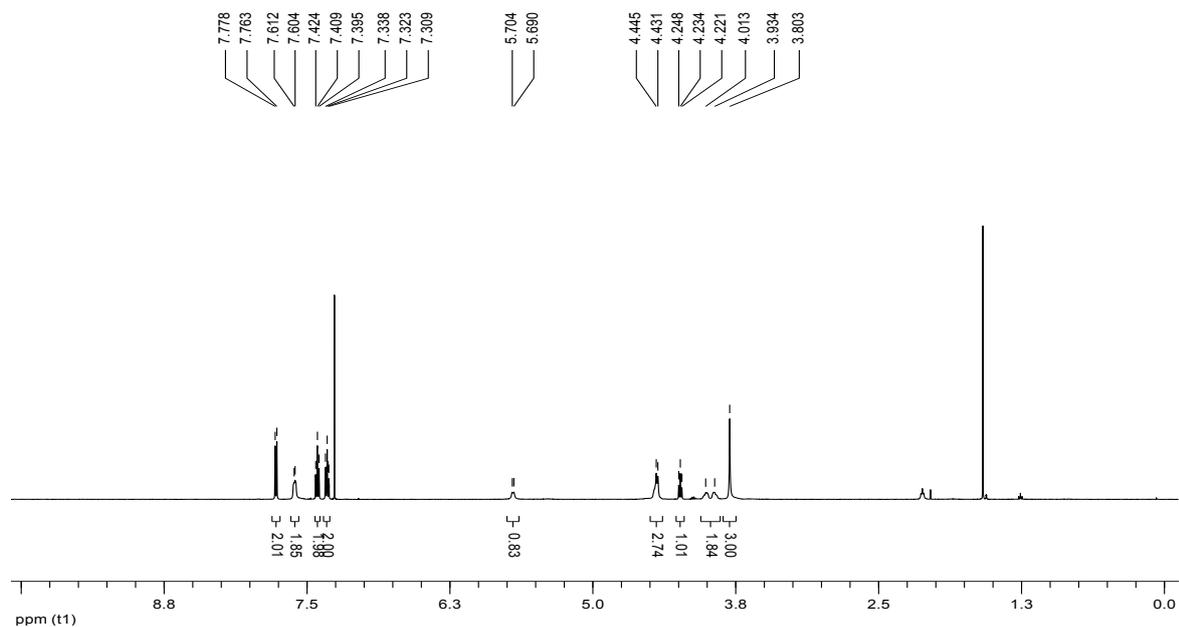




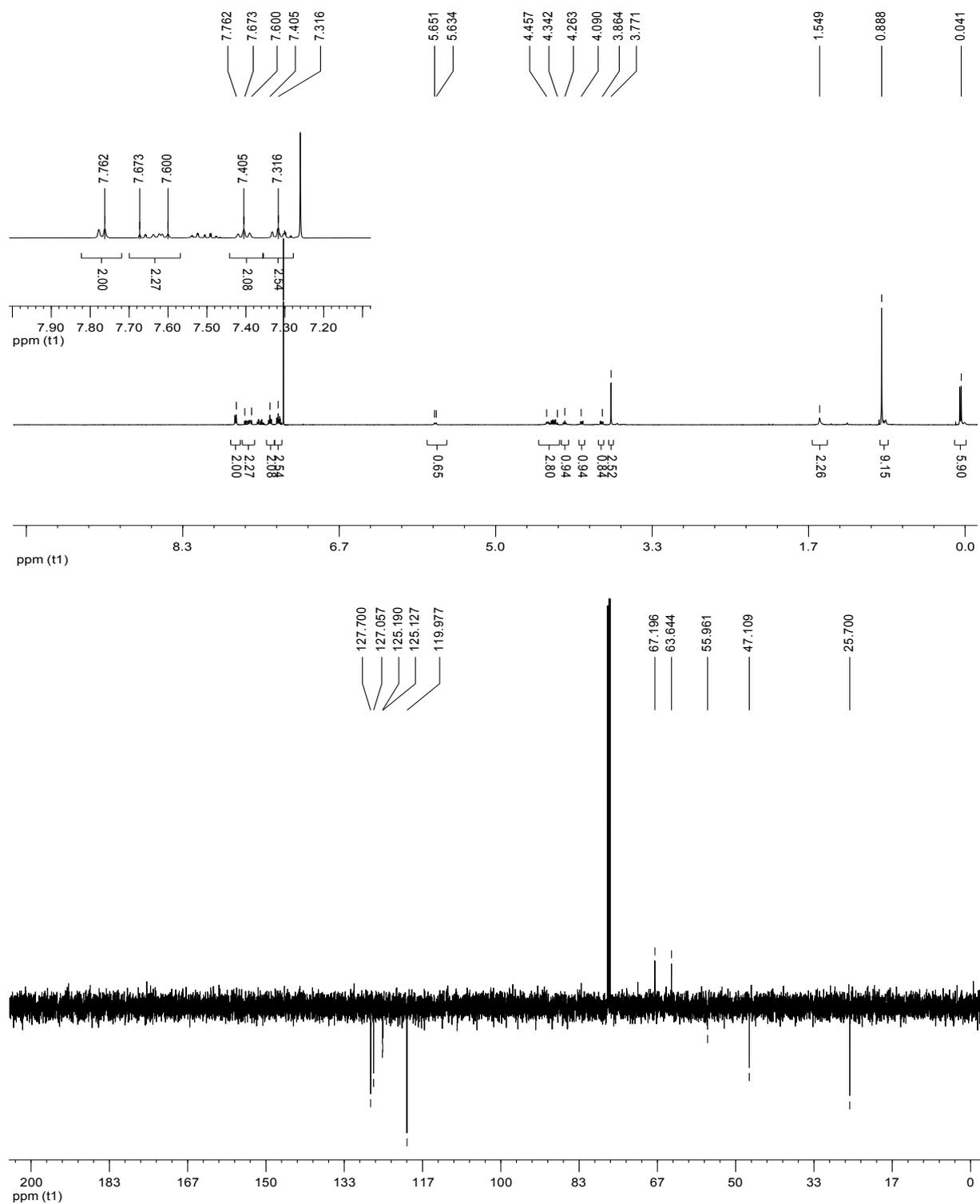
**(Z,2R,3S,4R)-3-Amino-5-methylnonadec-5-en-2,4-diol-hydroiodid (2):**



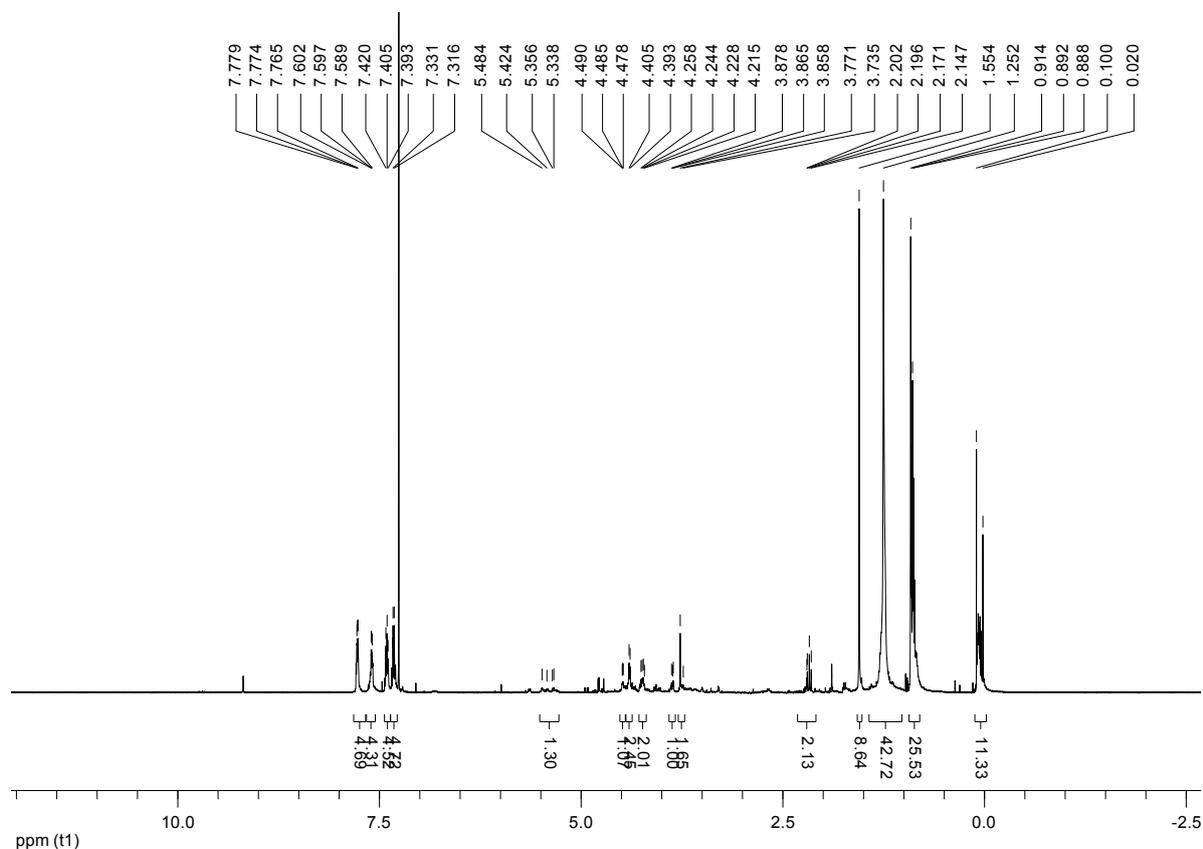
**(9H-Fluoren-9-yl)methyl-(S)-1-(methoxycarbonyl)-2-hydroxyethylcarbamate (38):**



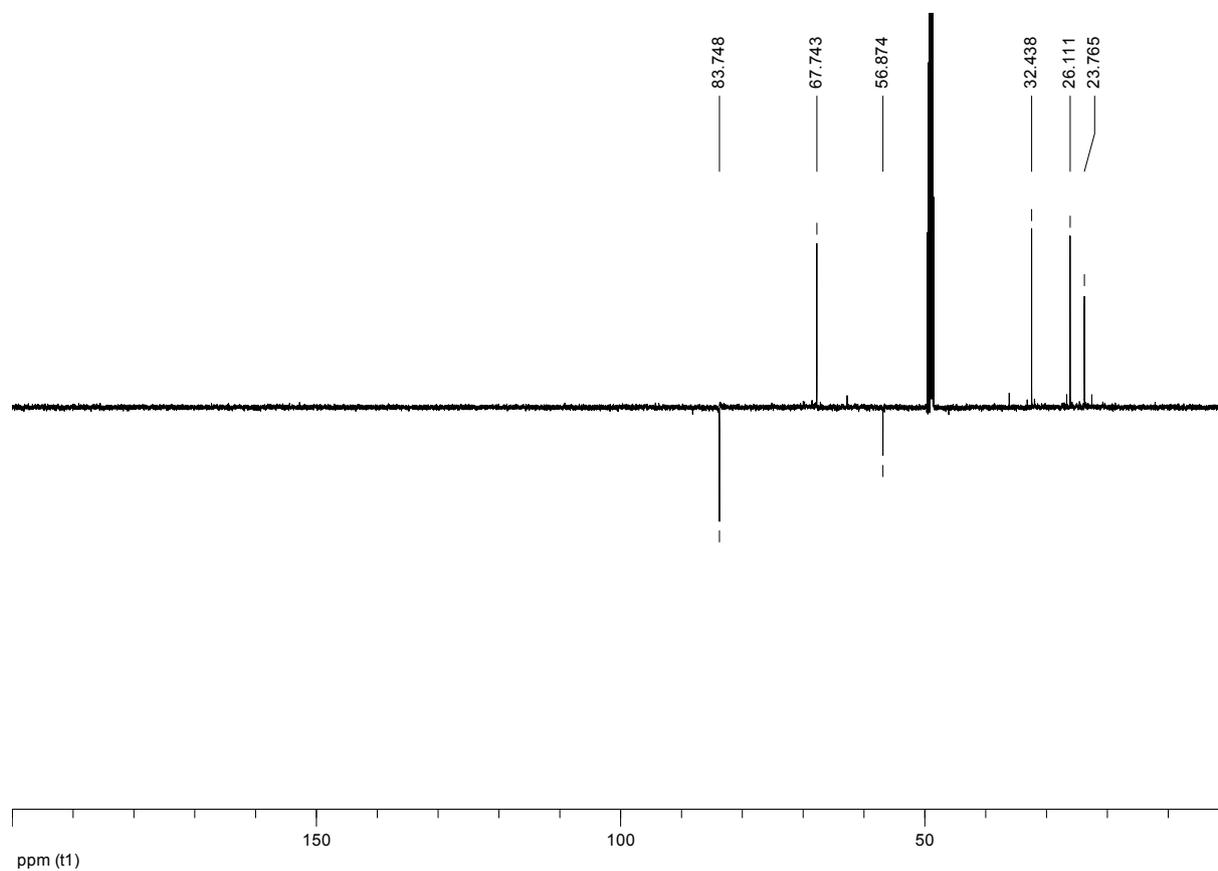
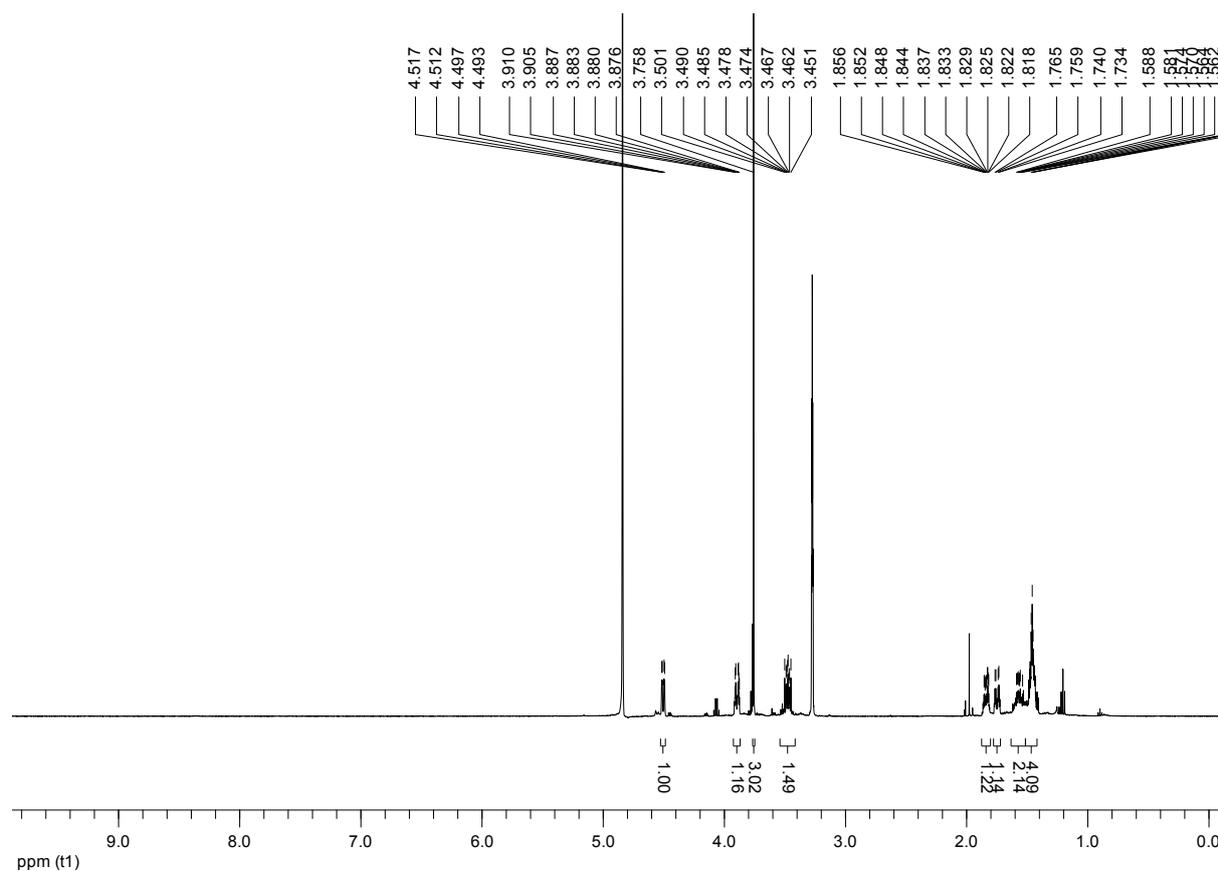
**(9H-Fluoren-9-yl)-methyl-(S)-1-(methoxycarbonyl)-2-tert-butylidiphenylsilyloxyethyl-carbamate (39):**



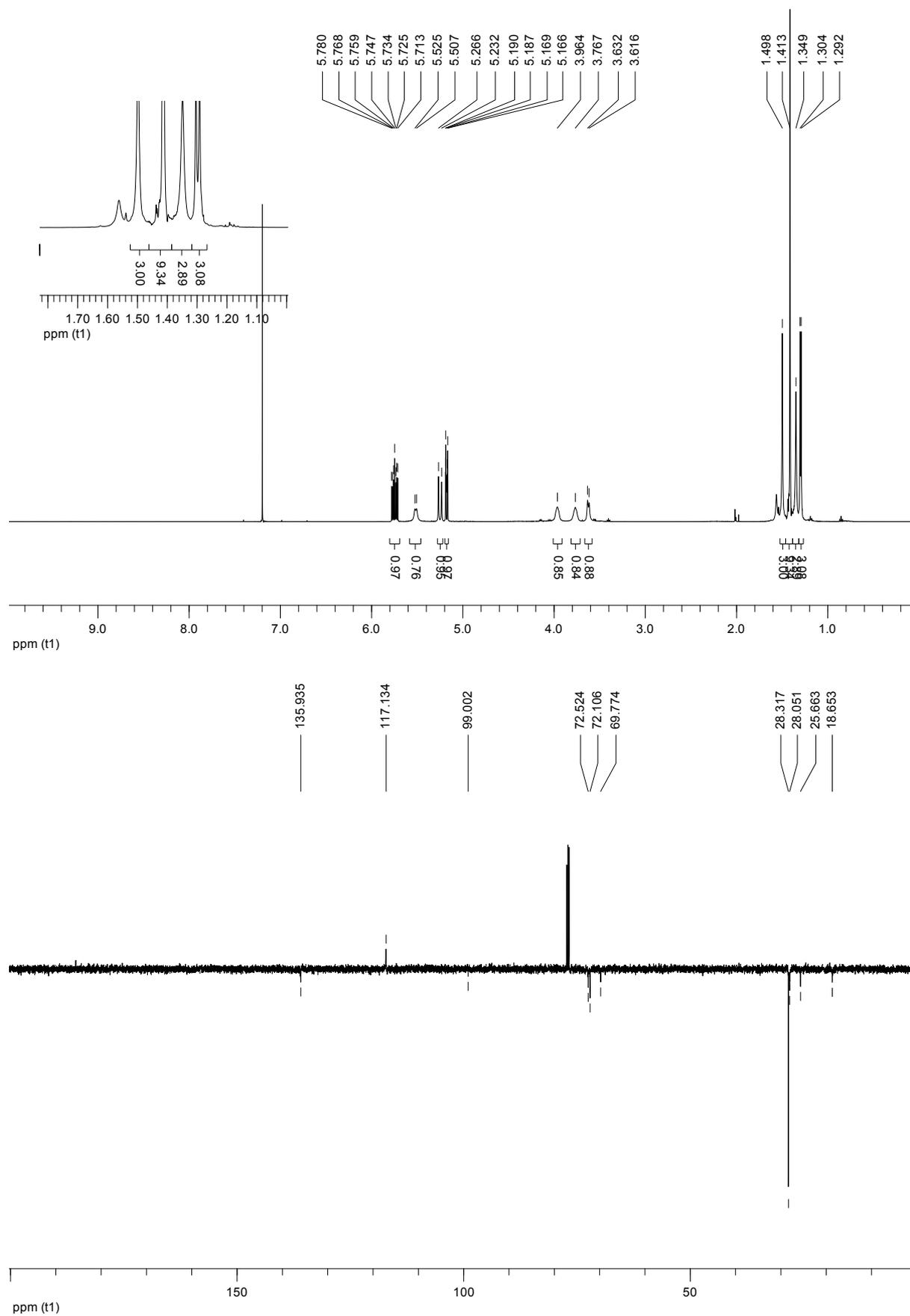
**(9H-Fluoren-9-yl)-methyl-(Z,2S,3R)-1,3-dihydroxy-4-methyloctadec-4-en-2-ylcarbamate (41):**



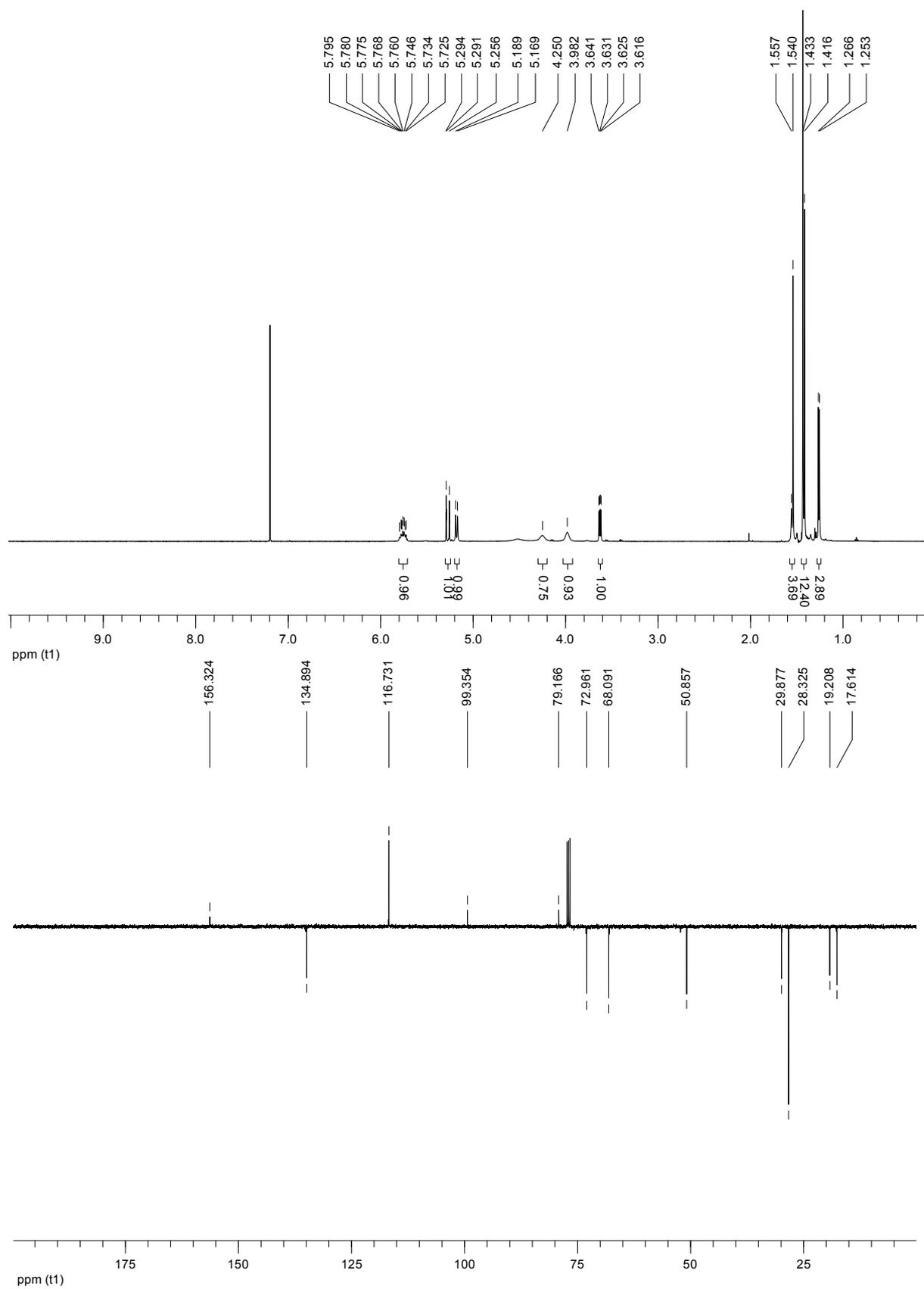
**(S)-Methyl-2-azido-3-(tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)propanoat (43):**



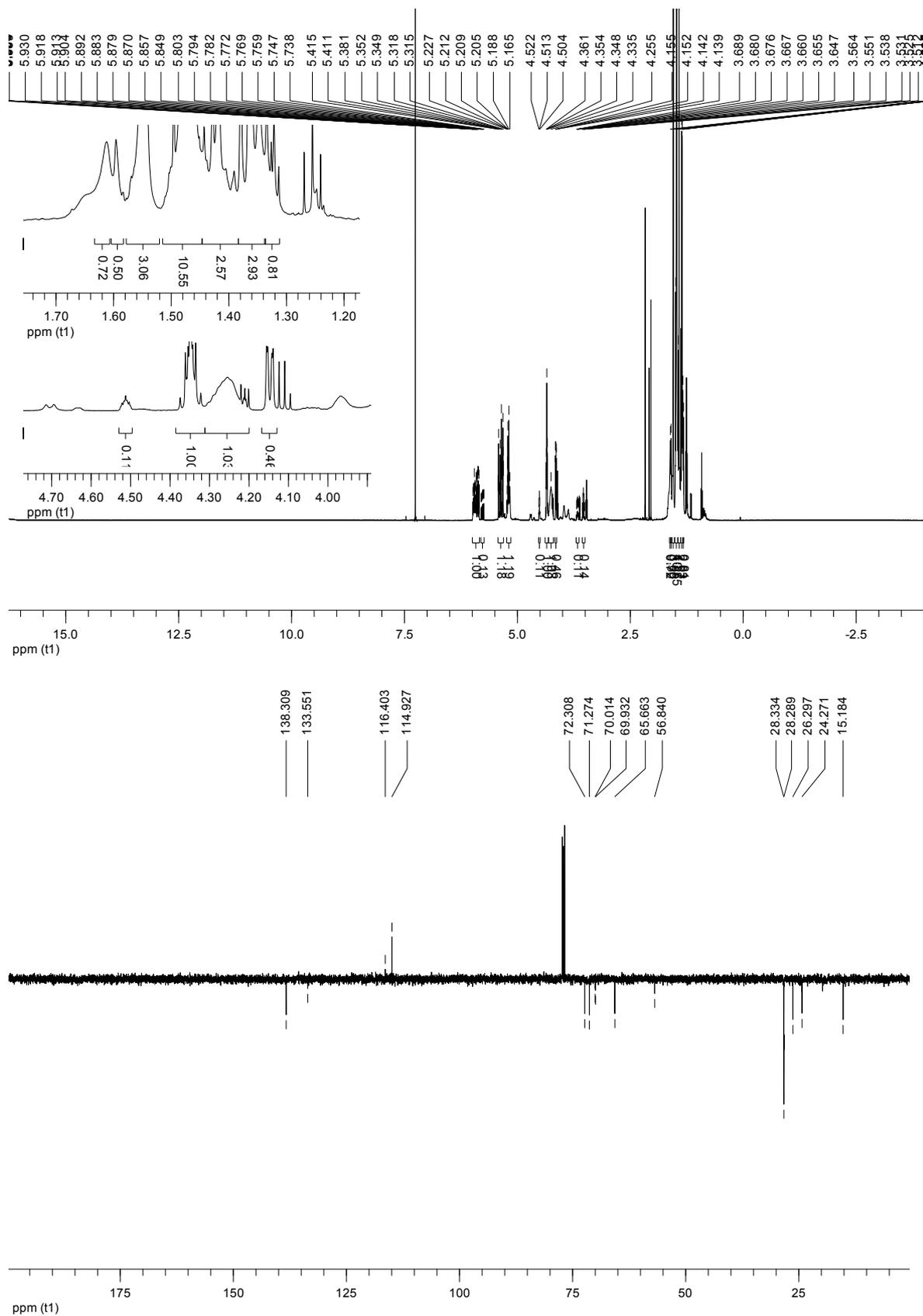
**(4*R*,5*R*)-*tert*-Butyl-4-((*R*)-1-hydroxyallyl)-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylat (45):**



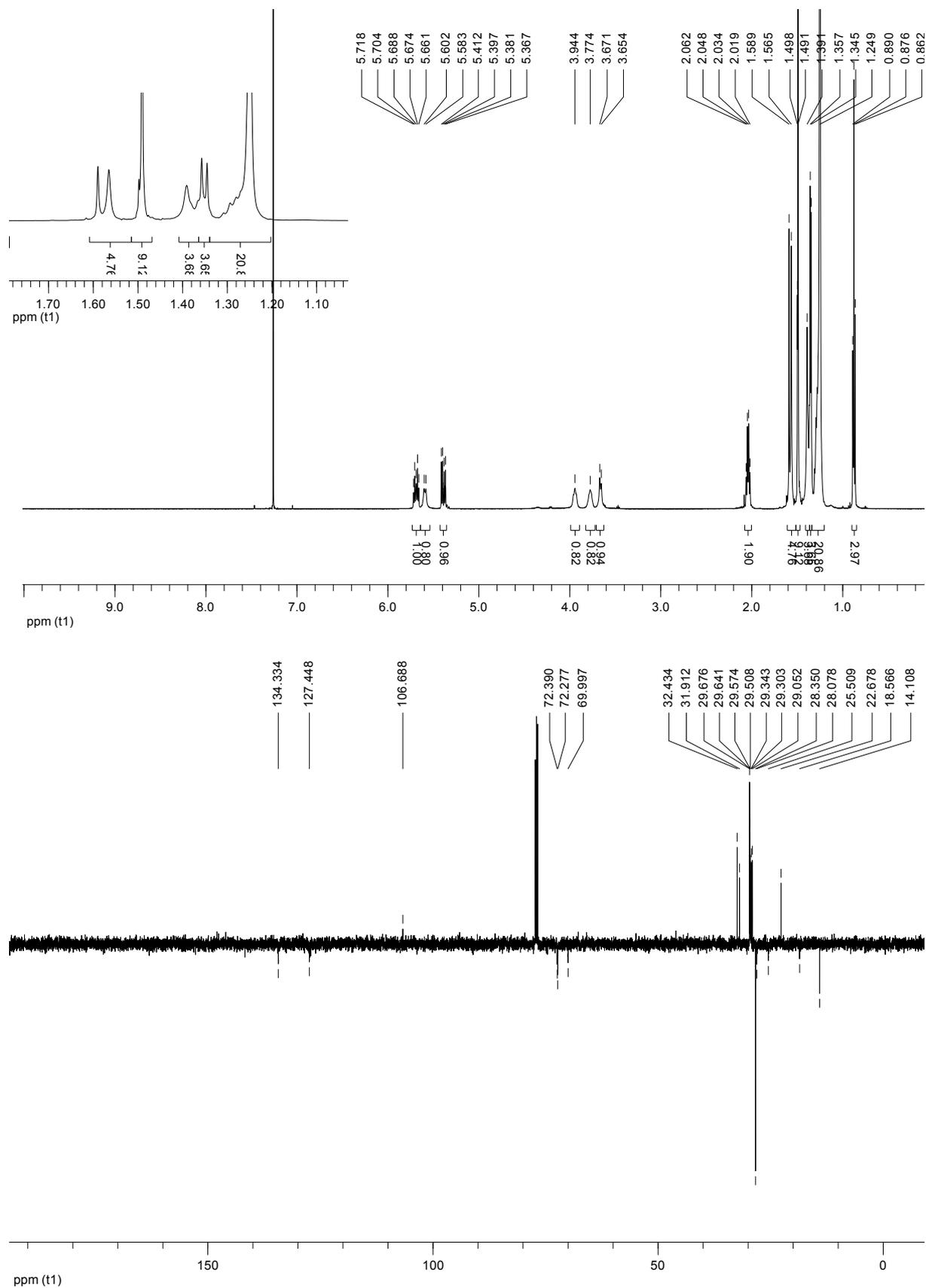
**(4*R*,5*R*)-*tert*-Butyl-4-((*S*)-1-hydroxyallyl)-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylat (46):**



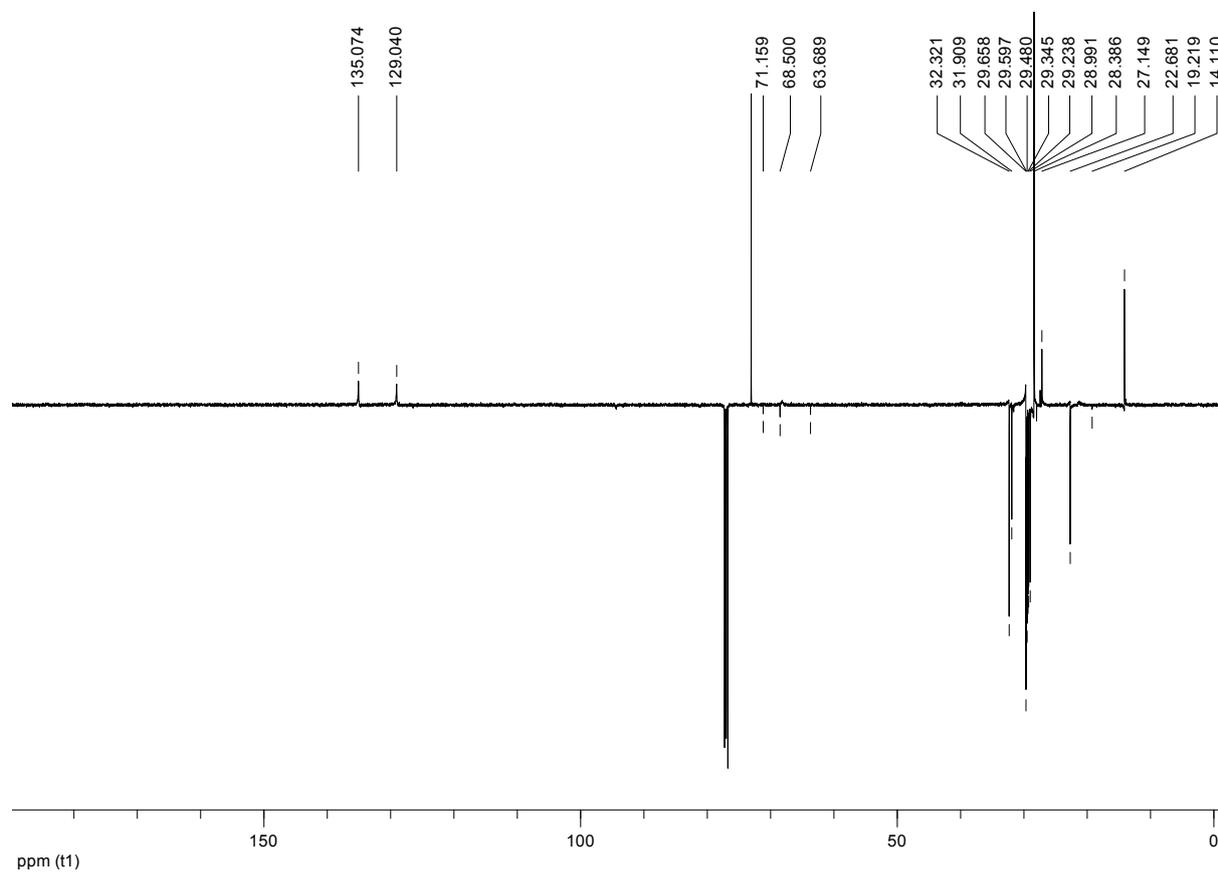
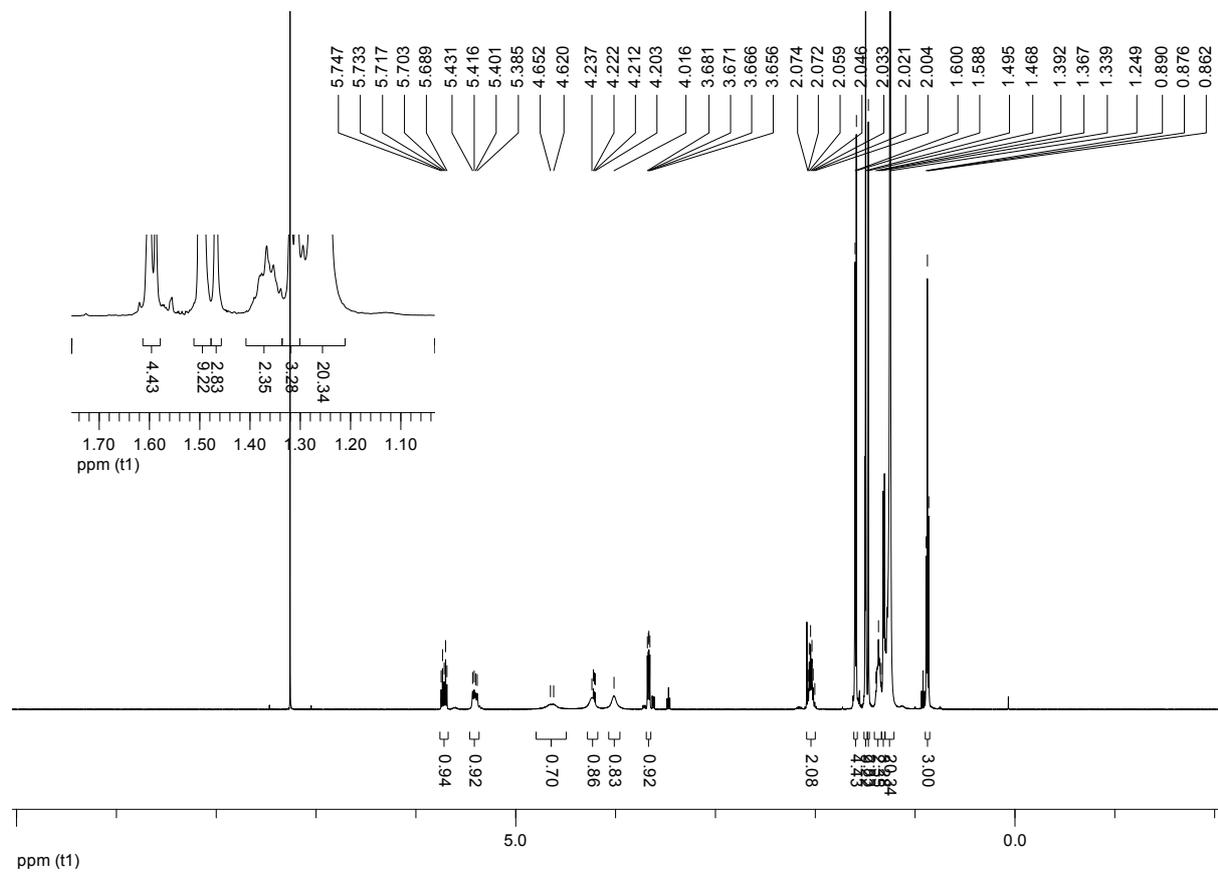
**(4*R*,5*S*)-*tert*-Butyl-4-((*R*)/(*S*)-1-hydroxyallyl)-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylat**  
**(47a/b):**



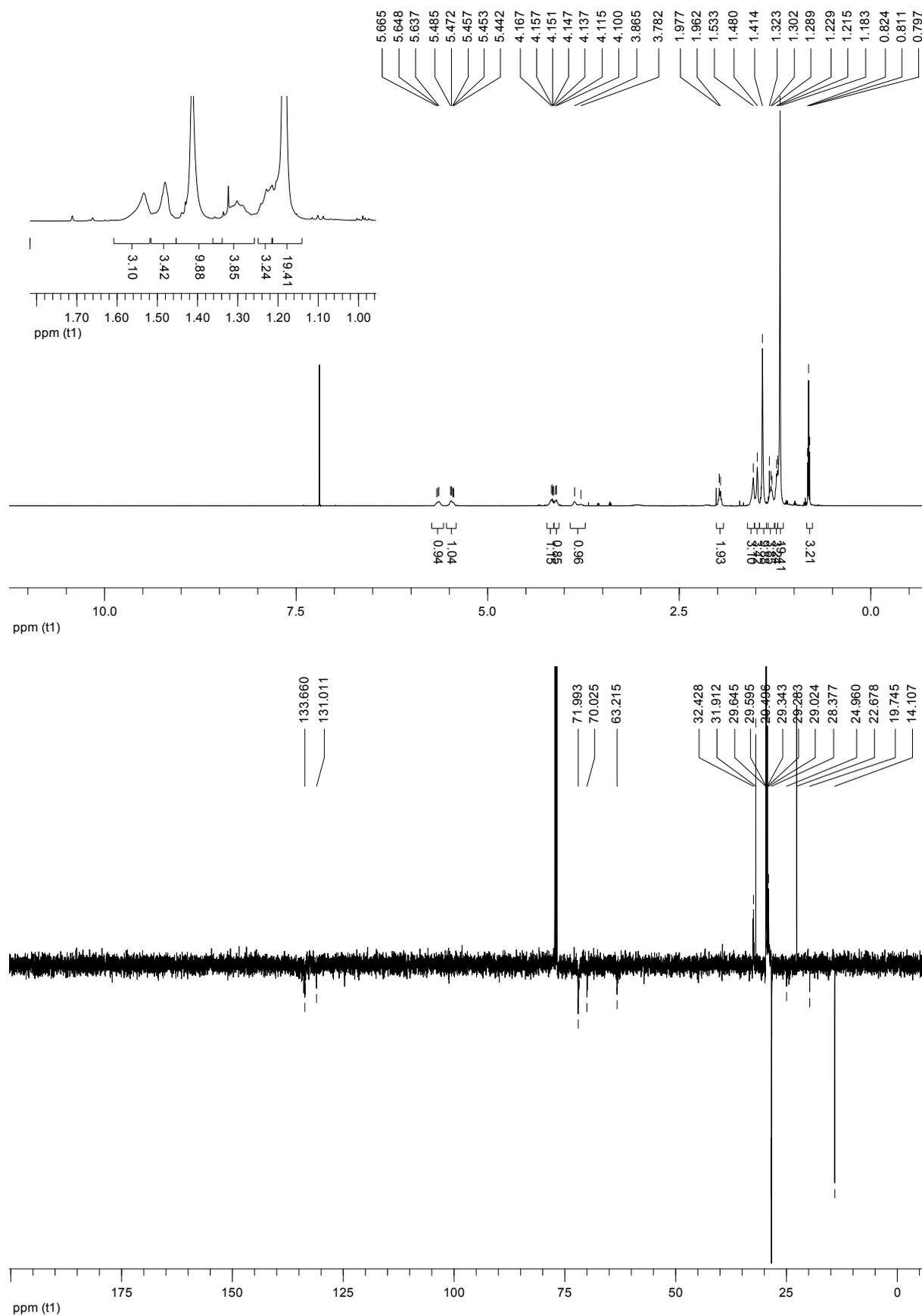
**(4*R*,5*R*)-*tert*-Butyl-4-((*R*,*E*)-1-hydroxyhexadec-2-enyl)-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylat (48):**



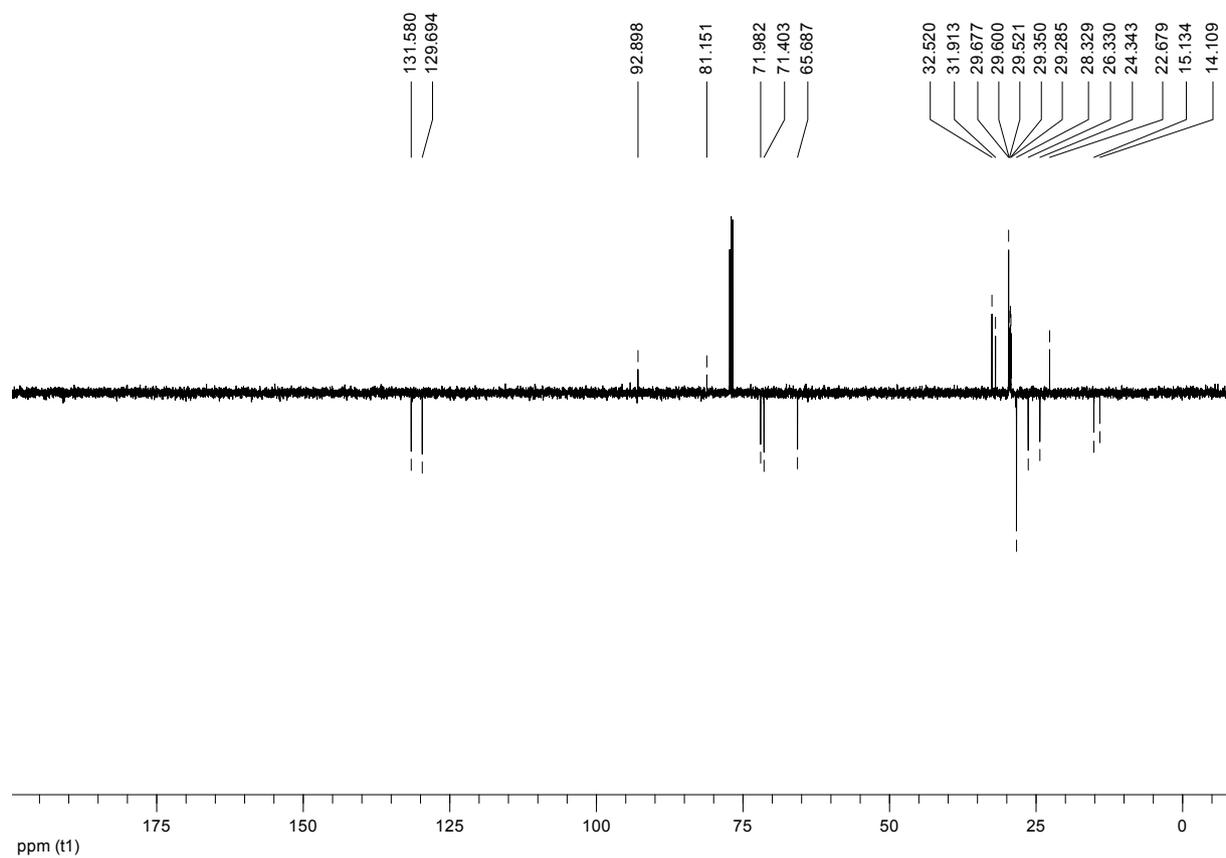
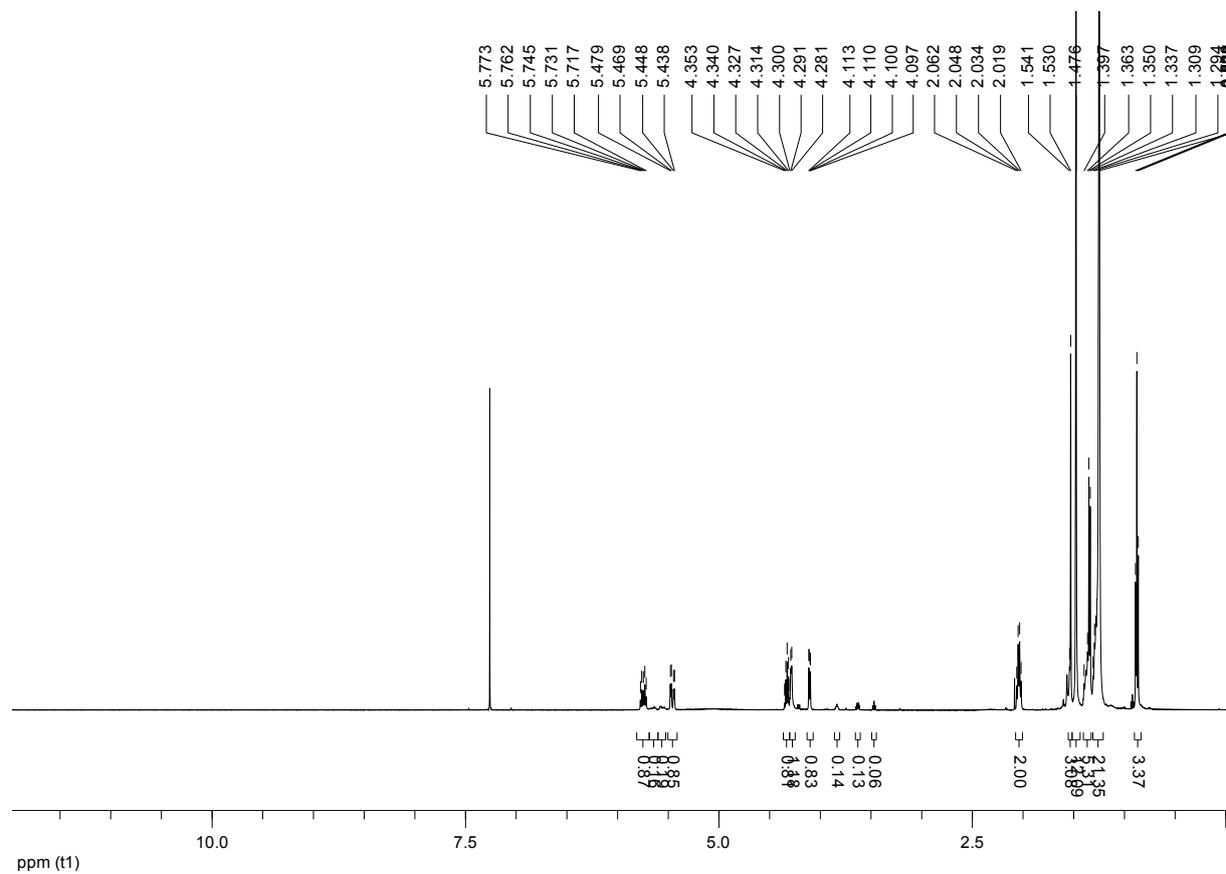
**(4*R*,5*R*)-*tert*-Butyl-4-((*S*,*E*)-1-hydroxyhexadec-2-enyl)-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylat (49):**



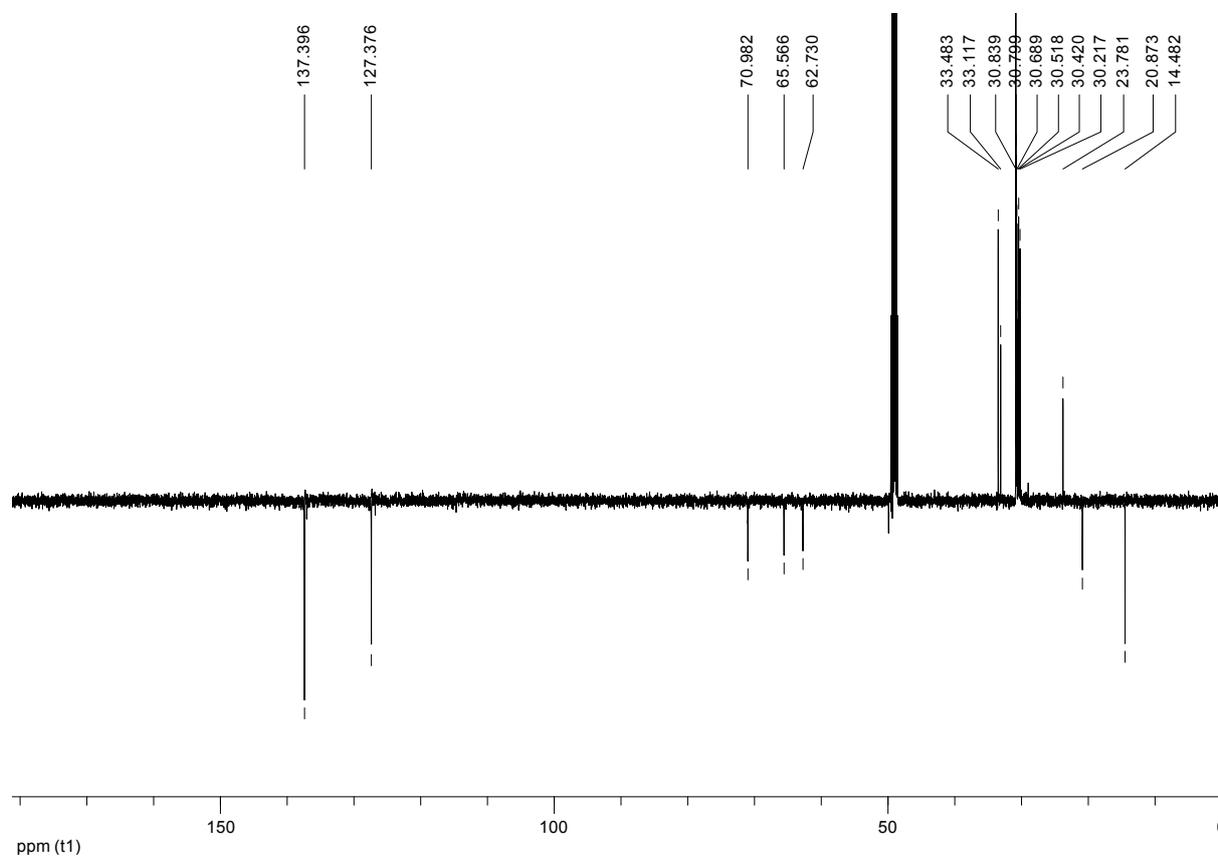
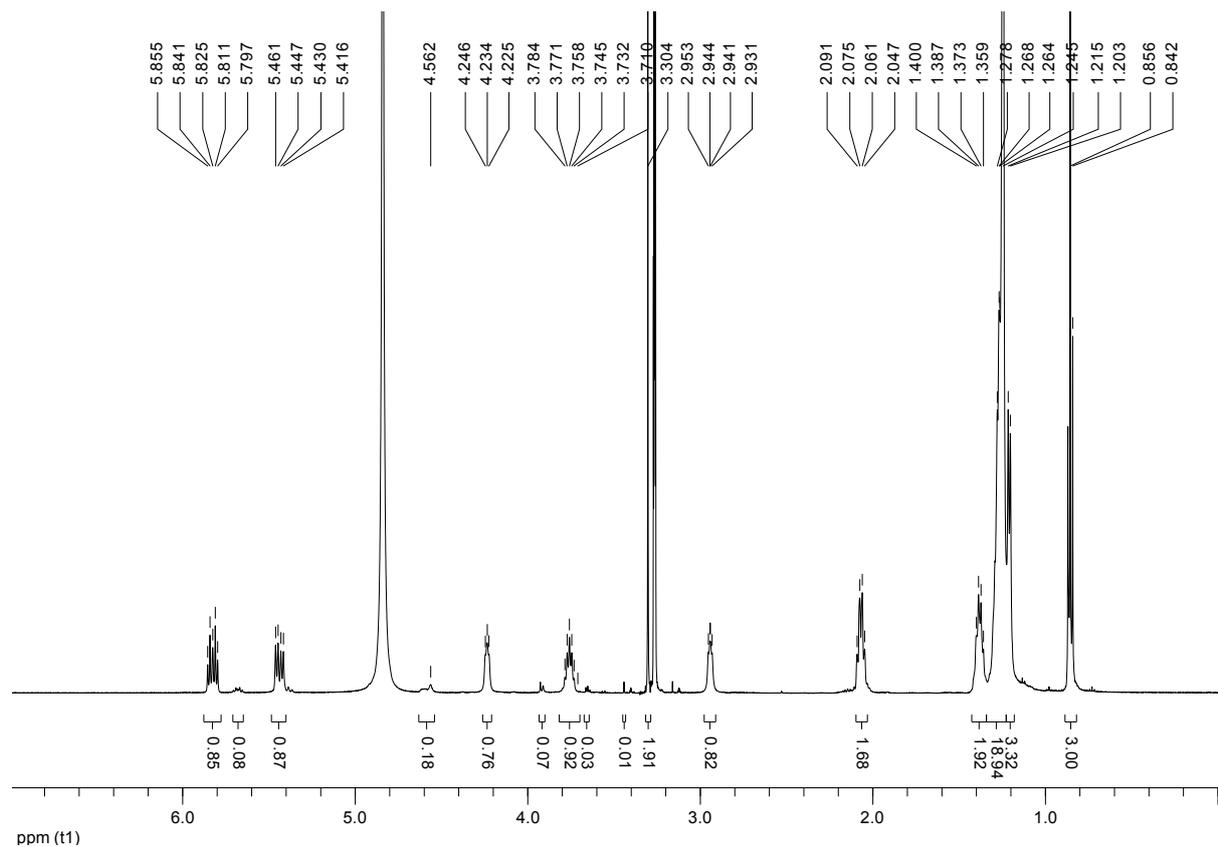
**(4*R*,5*S*)-*tert*-Butyl-4-((*R,E*)-1-hydroxyhexadec-2-enyl)-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylat (50):**



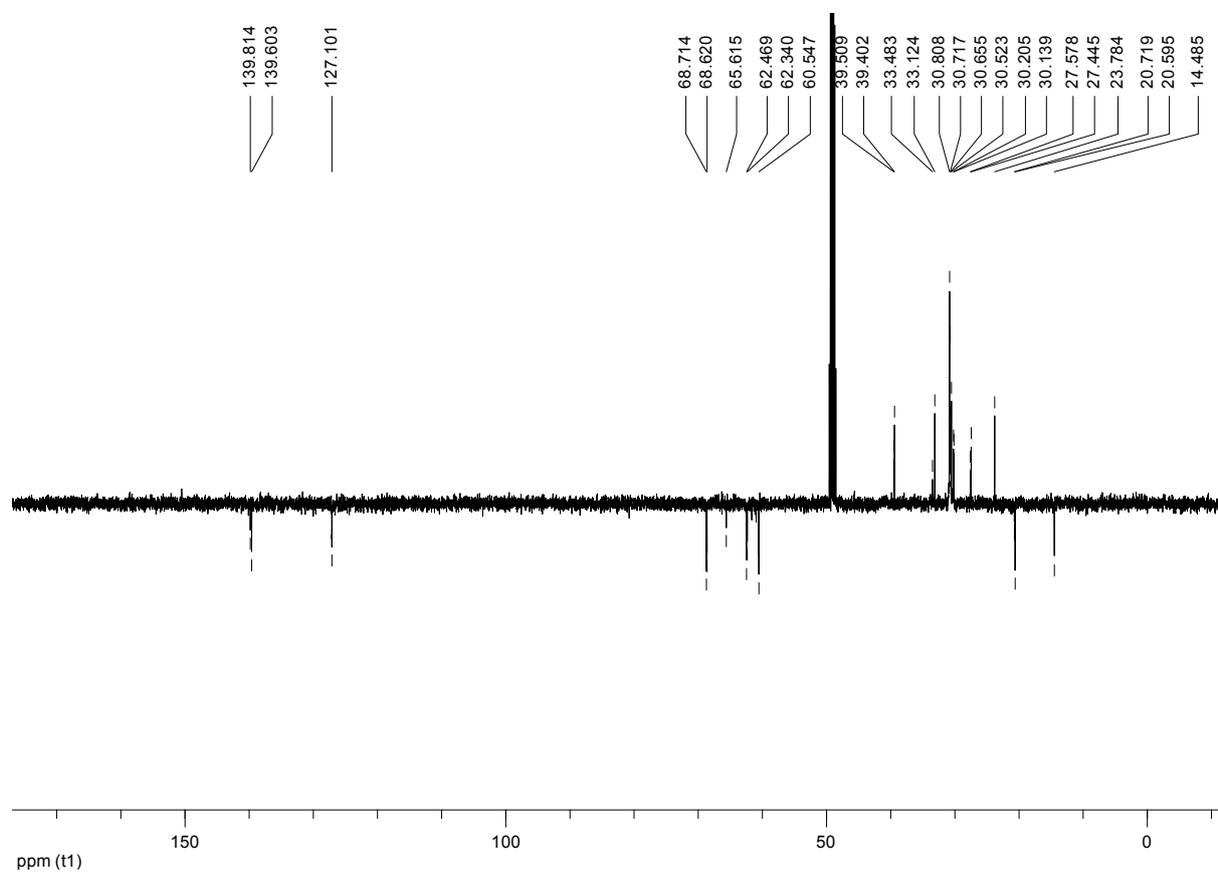
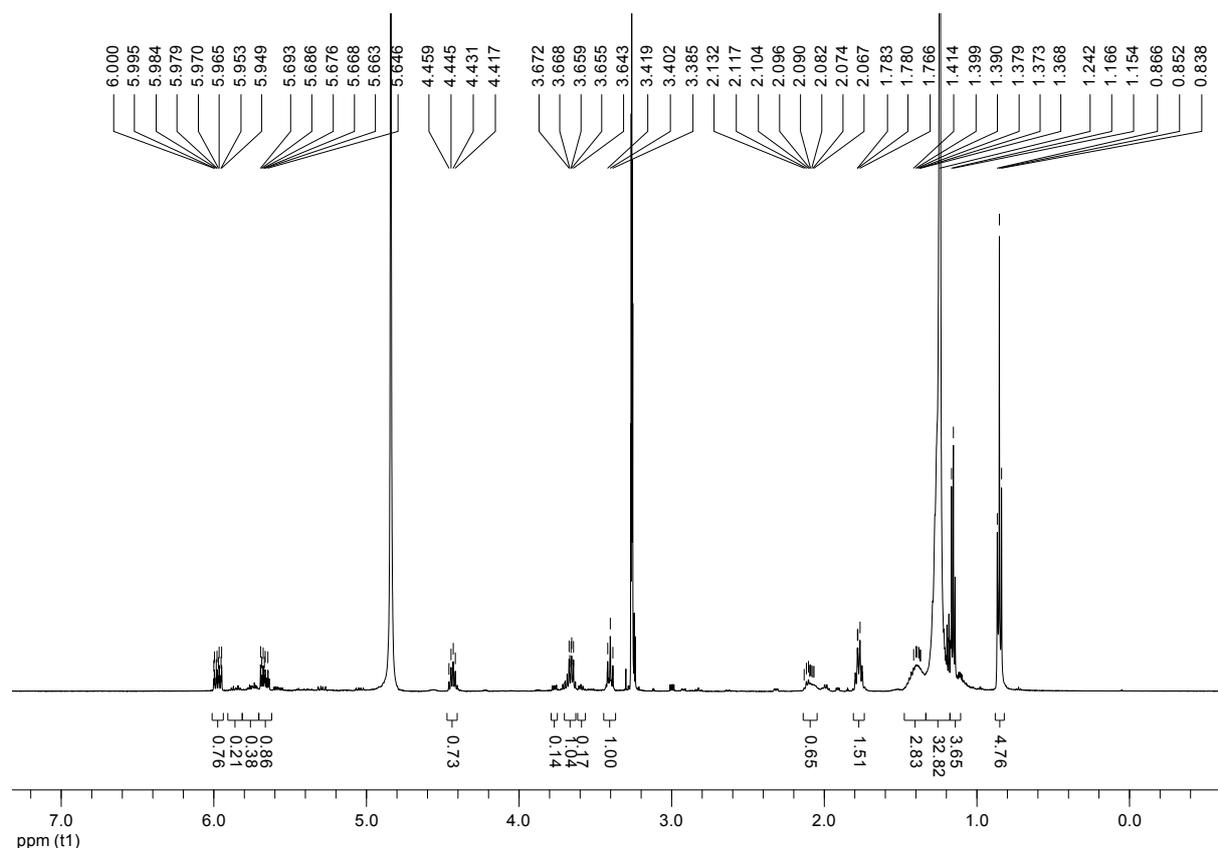
**(4*R*,5*S*)-*tert*-Butyl-4-((*S*,*E*)-1-hydroxyhexadec-2-enyl)-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylat (51):**



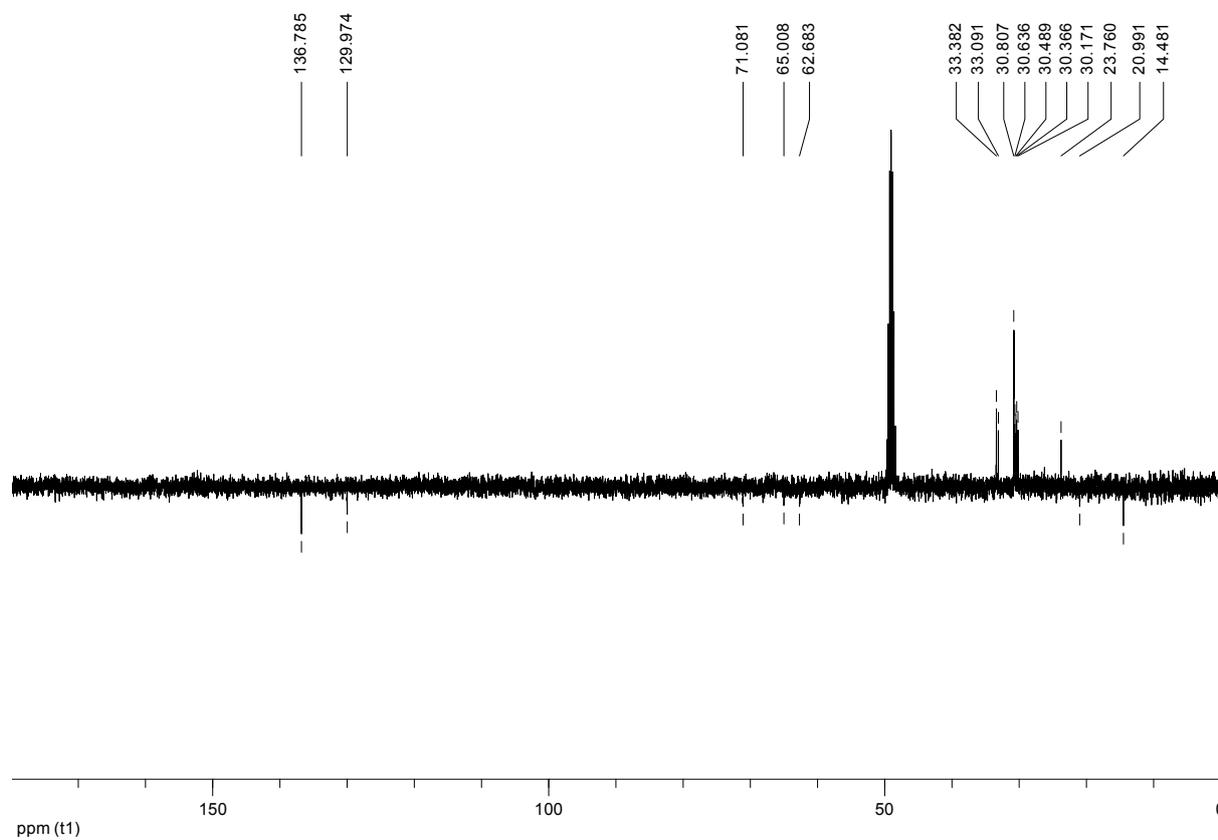
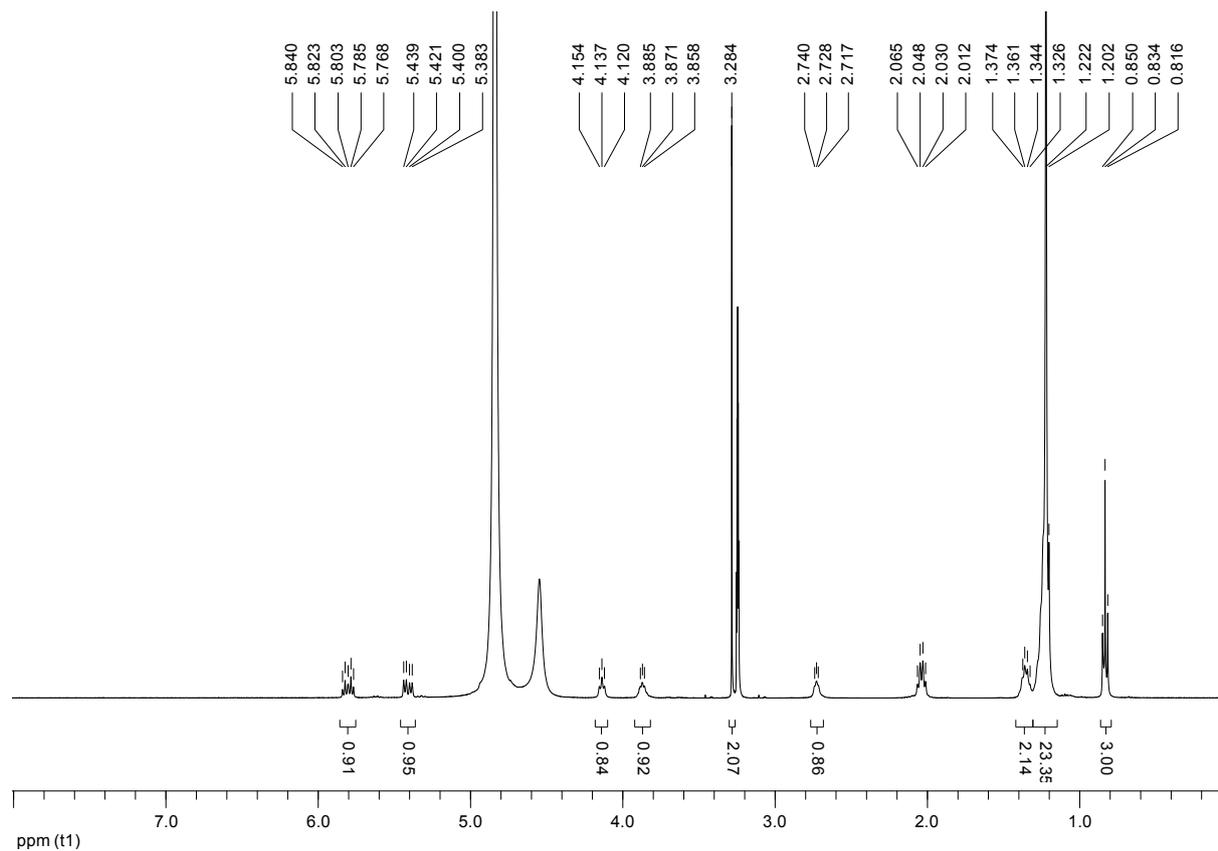
**(E,2R,3S,4R)-3-Aminononadec-5-en-2,4-diol-hydrochlorid (3):**



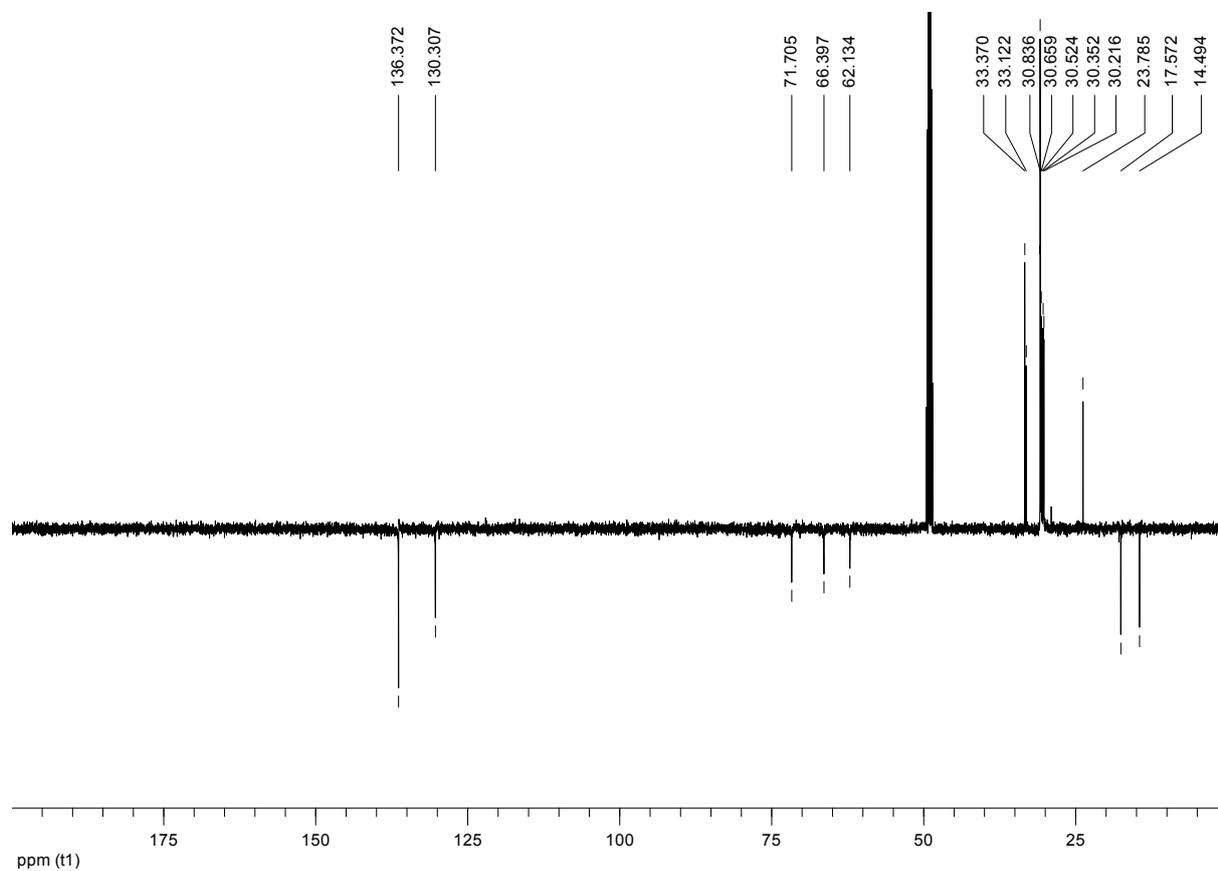
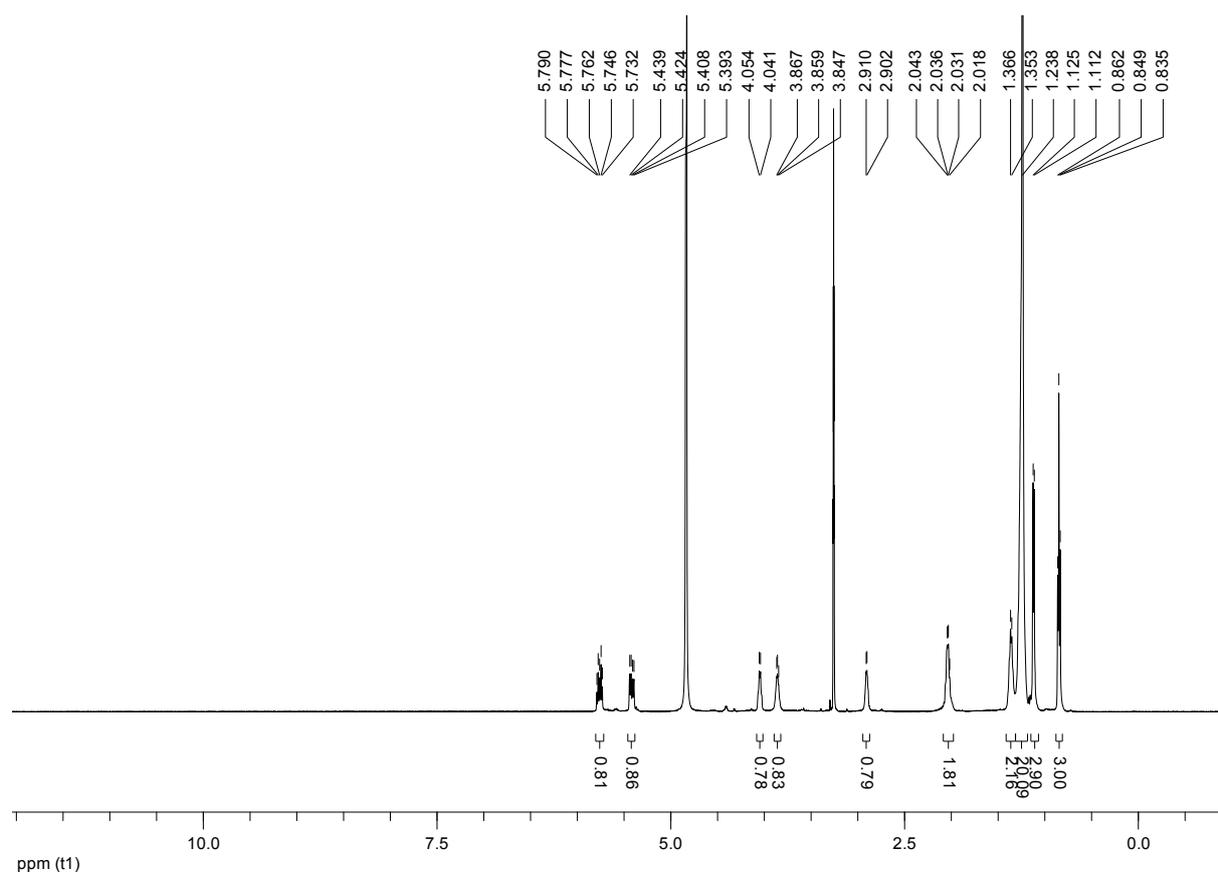
**(E,2R,3S)-3-Amino-4-chlorononadec-5-en-2-ol-hydrochlorid (7):**



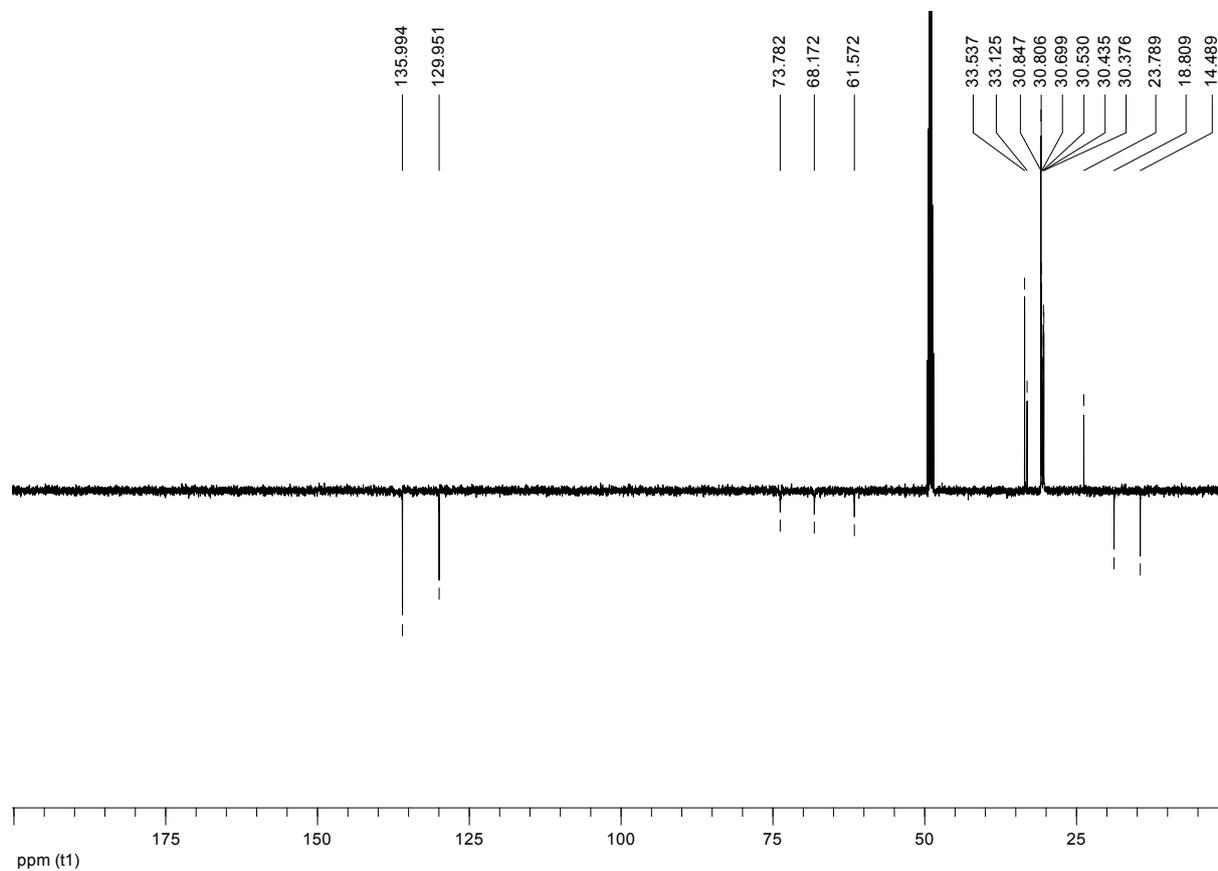
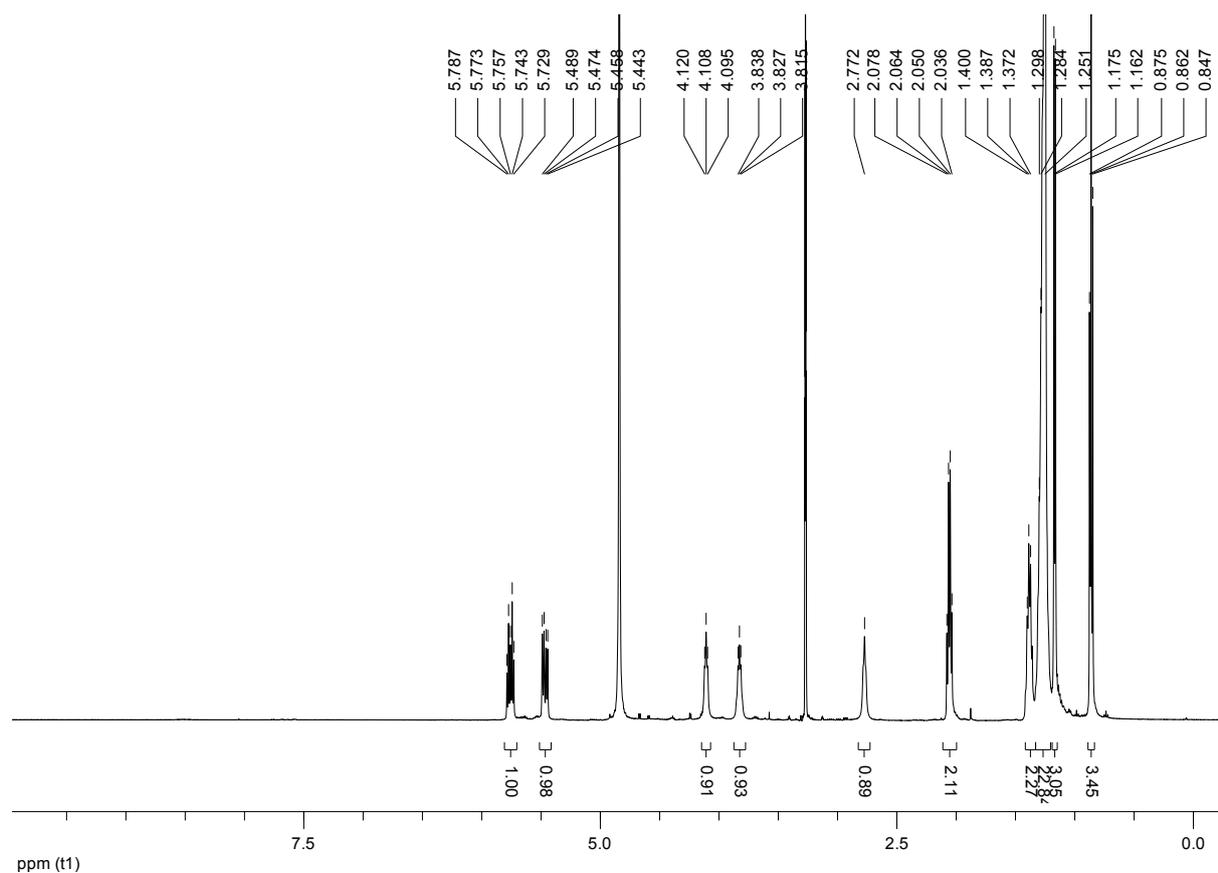
**(E,2R,3S,4S)-3-Aminononadec-5-en-2,4-diol-hydrochlorid (4):**



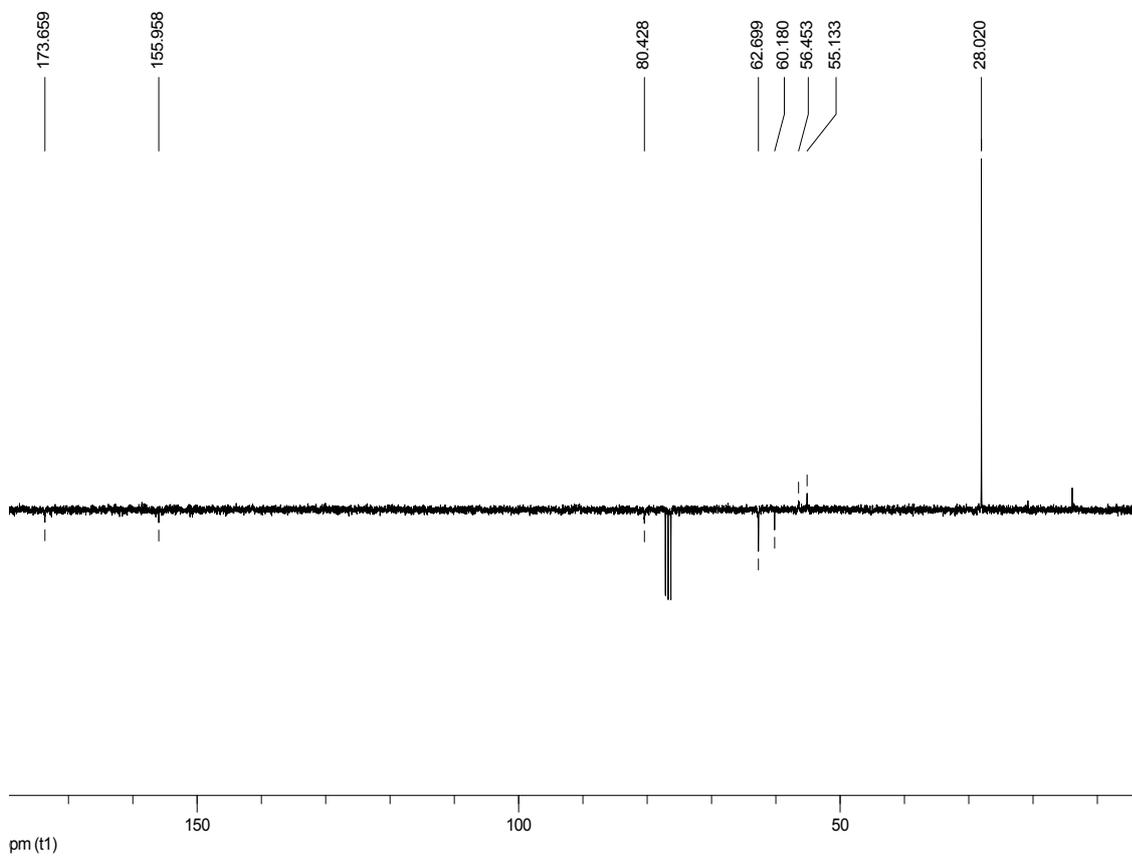
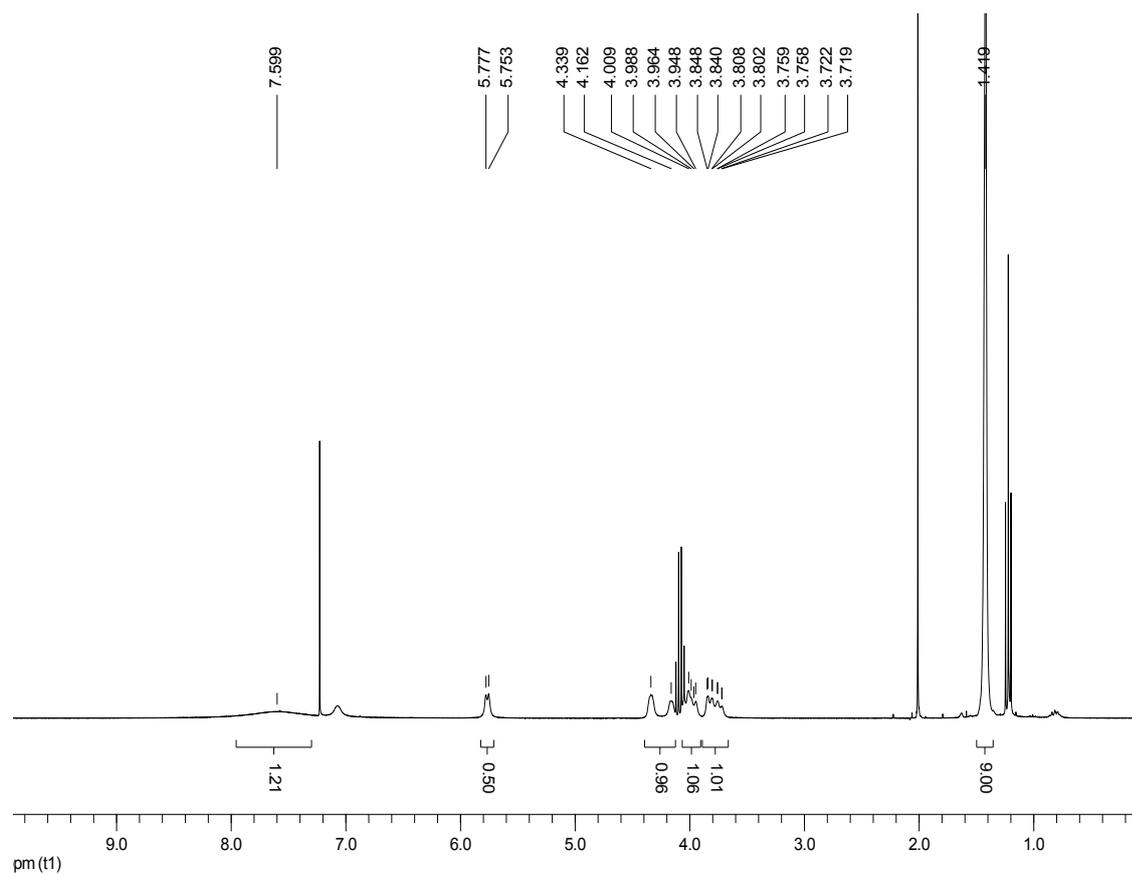
**(E,2S,3S,4R)-3-Aminononadec-5-en-2,4-diol-hydrochlorid (5):**



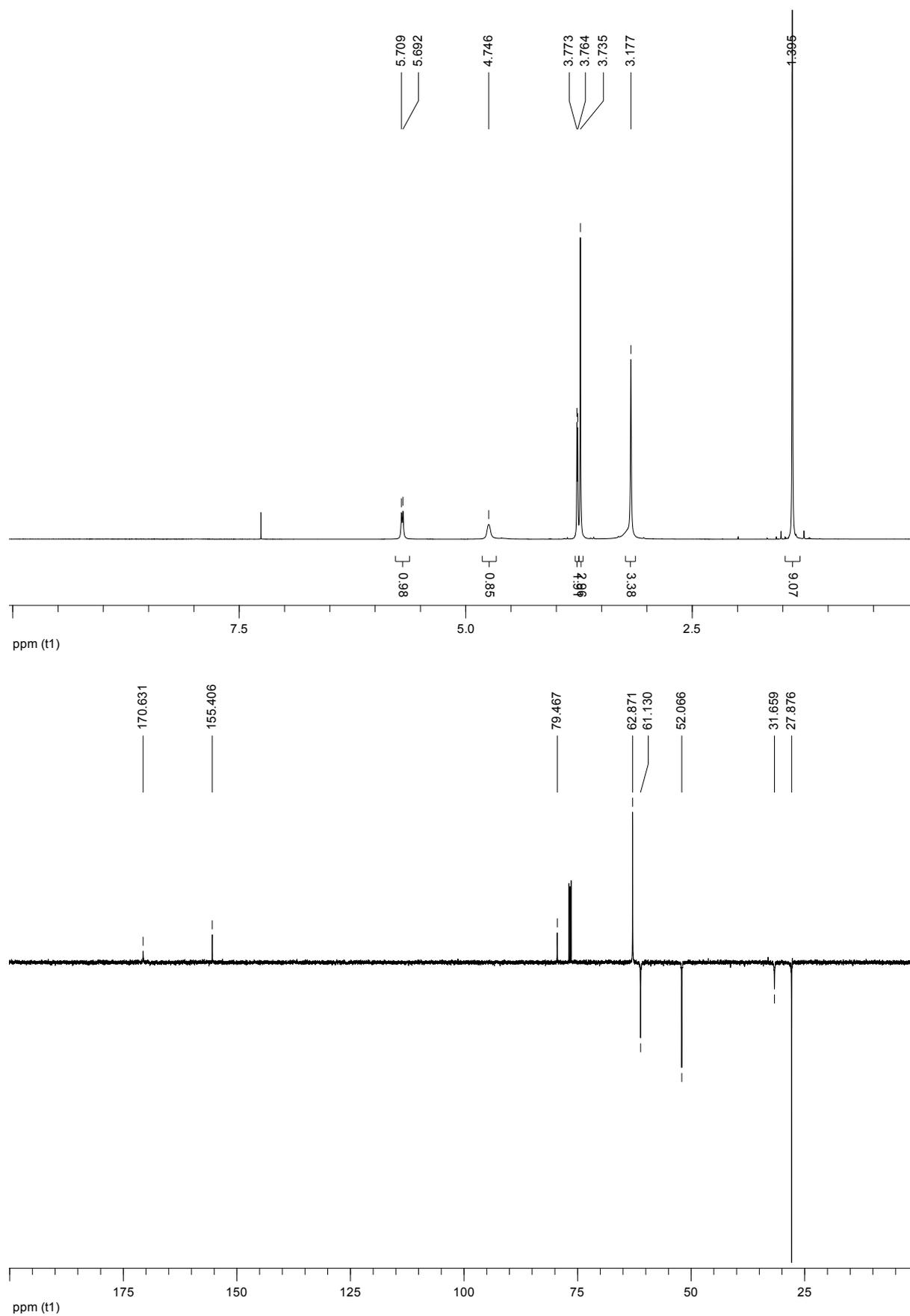
**(E,2S,3S,4S)-3-Aminononadec-5-en-2,4-diol-hydrochlorid (6):**



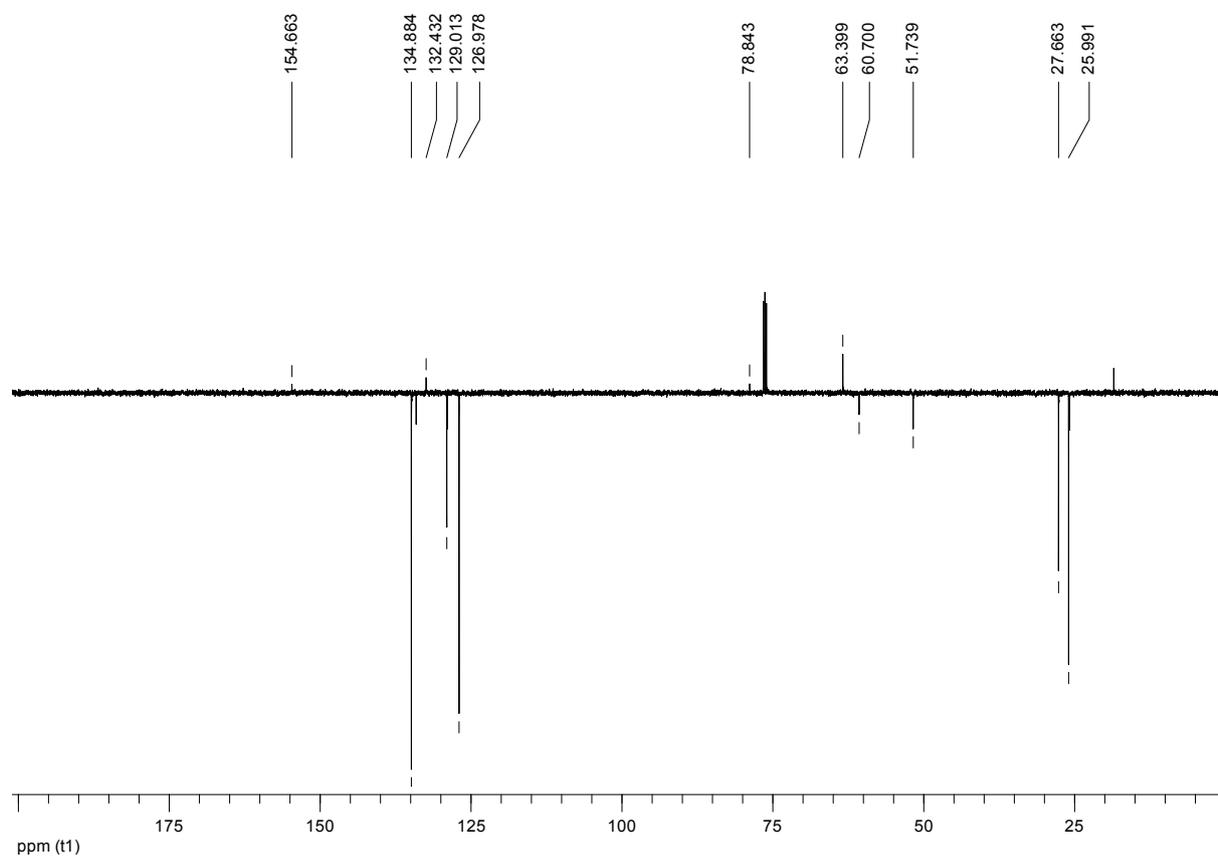
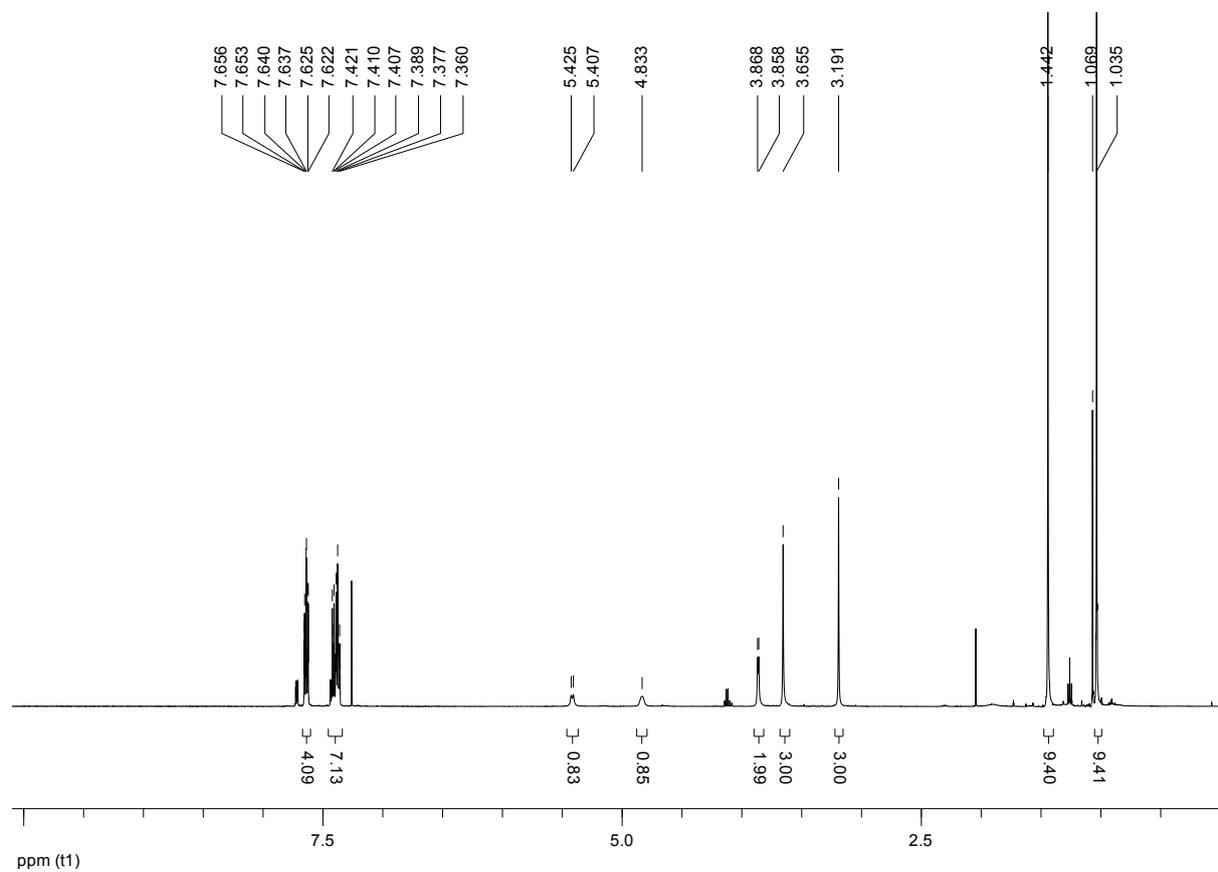
L-Boc-Serin (52):



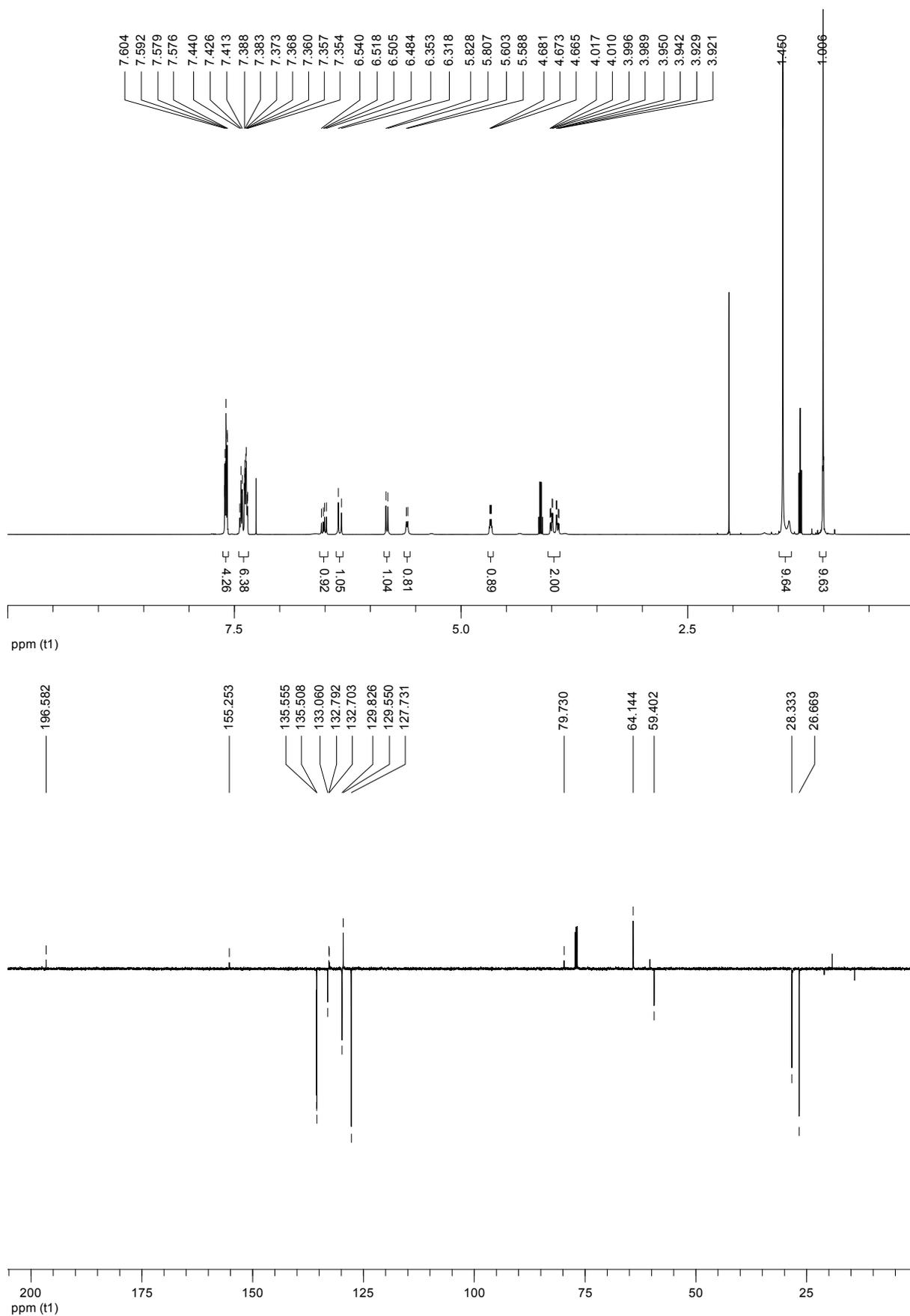
***tert*-Butyl-(*S*)-1-(*N*-methoxy-*N*-methylcarbamoyl)-2-hydroxyethylcarbamate (53):**



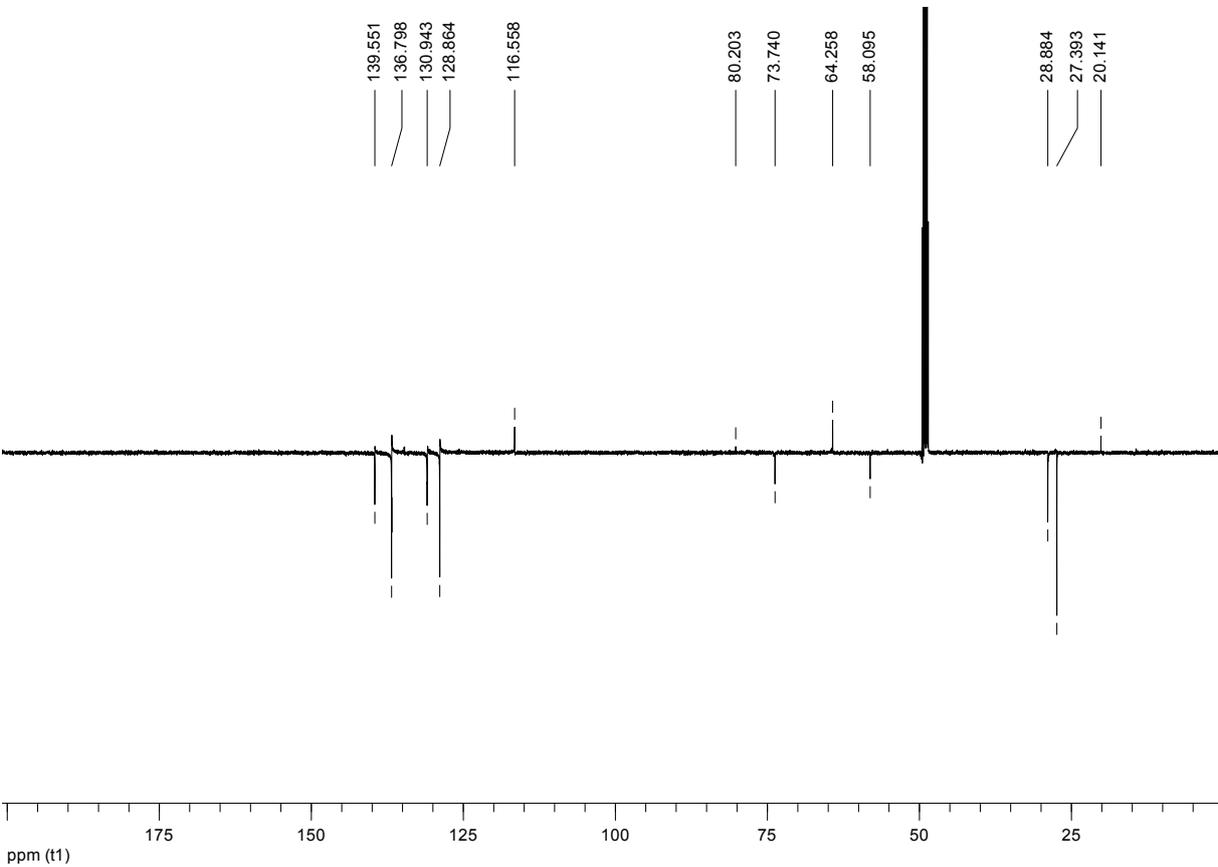
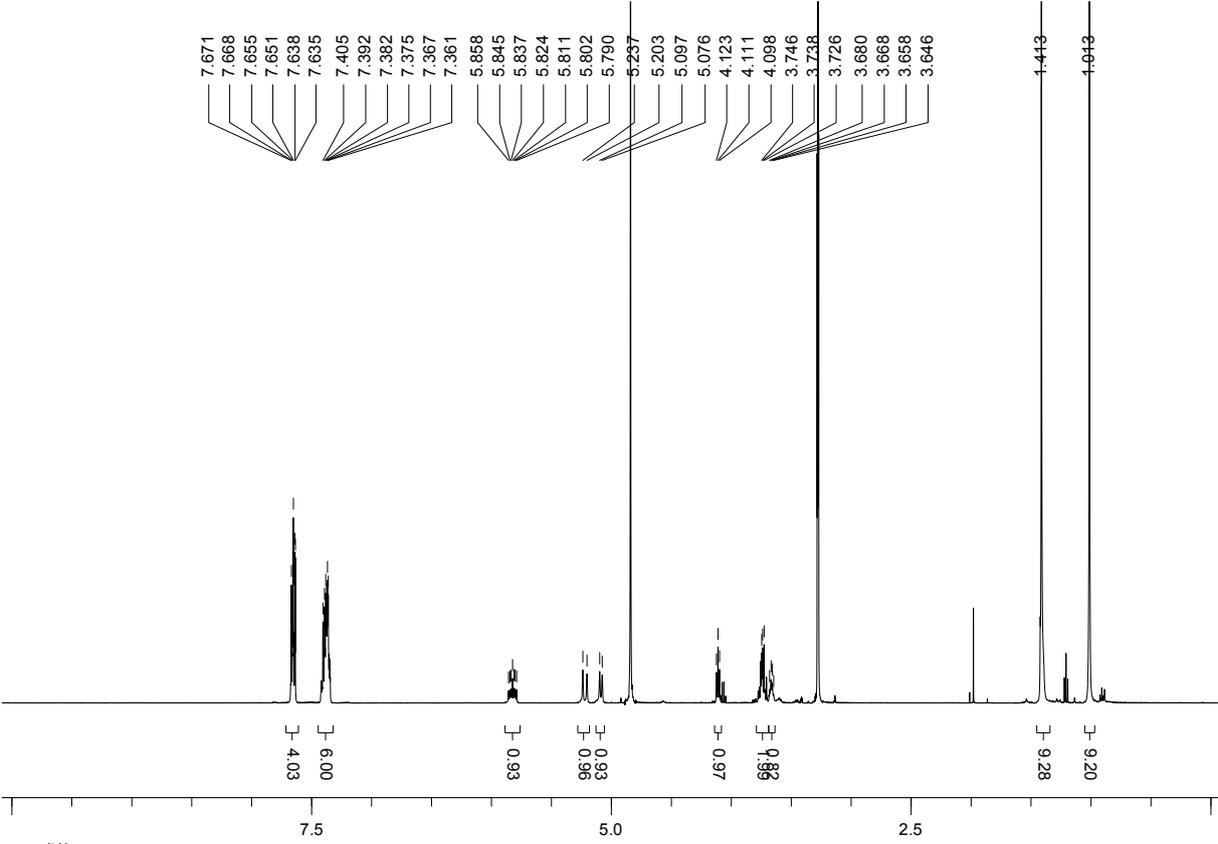
***tert*-Butyl-(*S*)-1-(*N*-methoxy-*N*-methylcarbamoyl)-2-*tert*-butyldiphenylsilyloxyethyl-carbamate (54):**



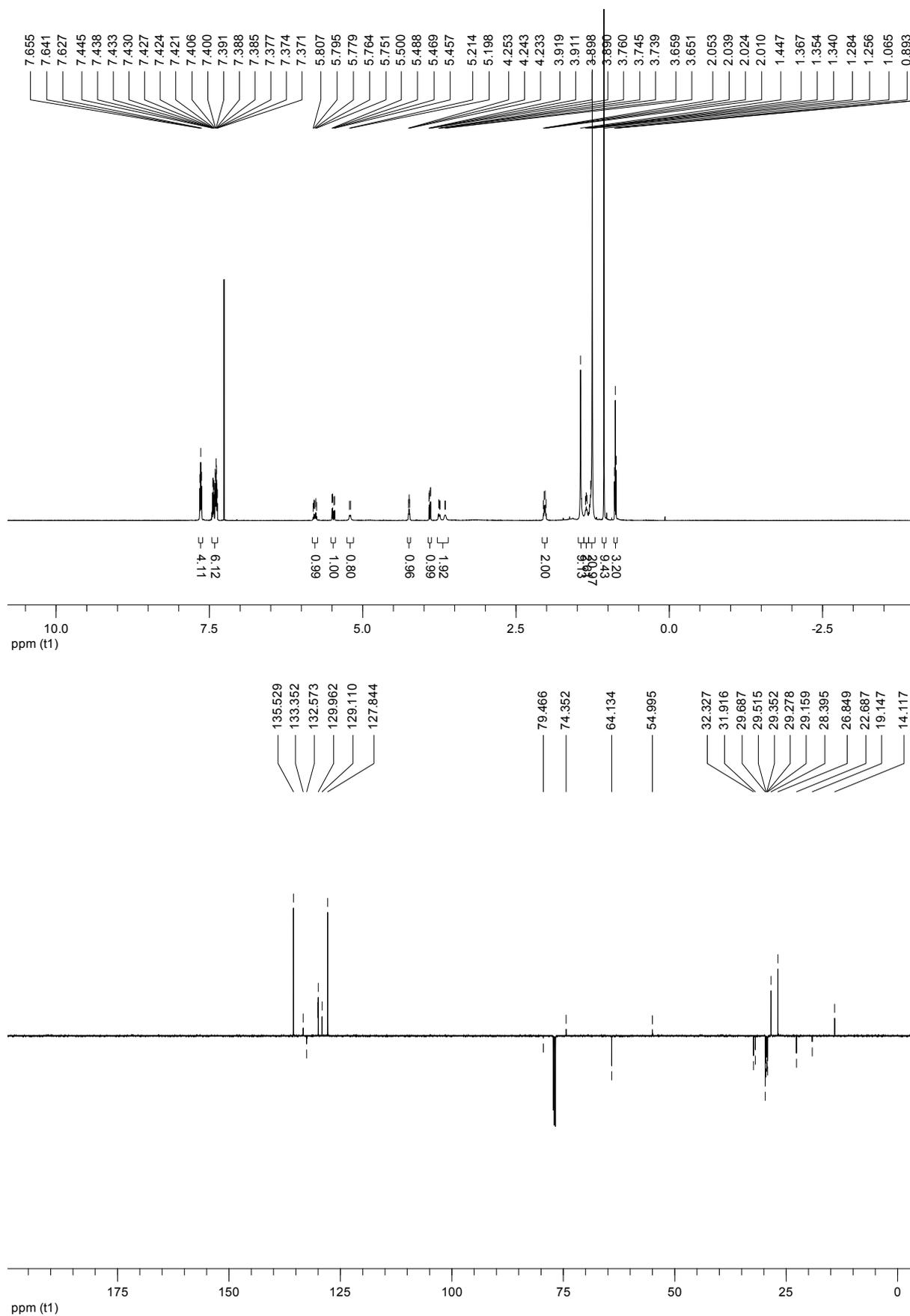
**tert-Butyl-(S)-1-tert-butyldiphenylsilyloxy-3-oxopent-4-en-2-ylcarbamate (55):**



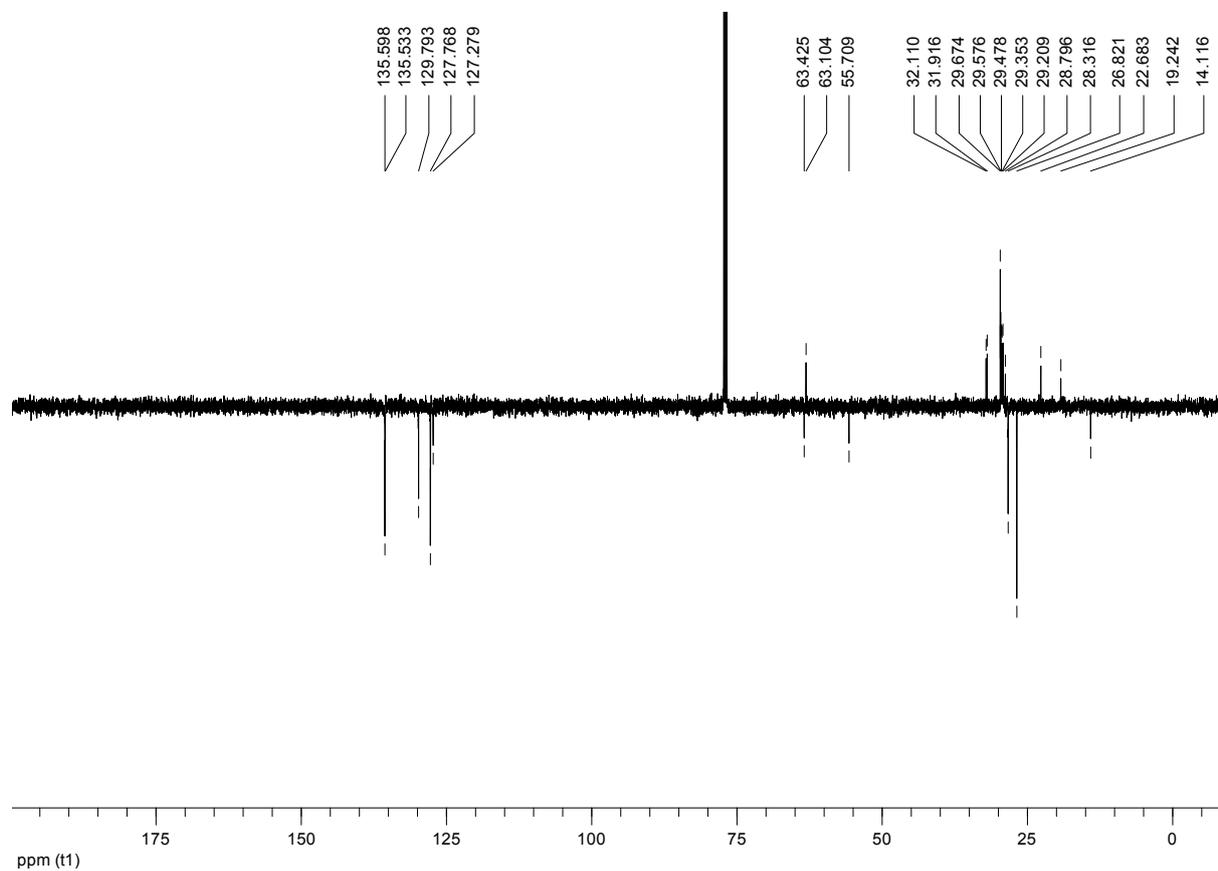
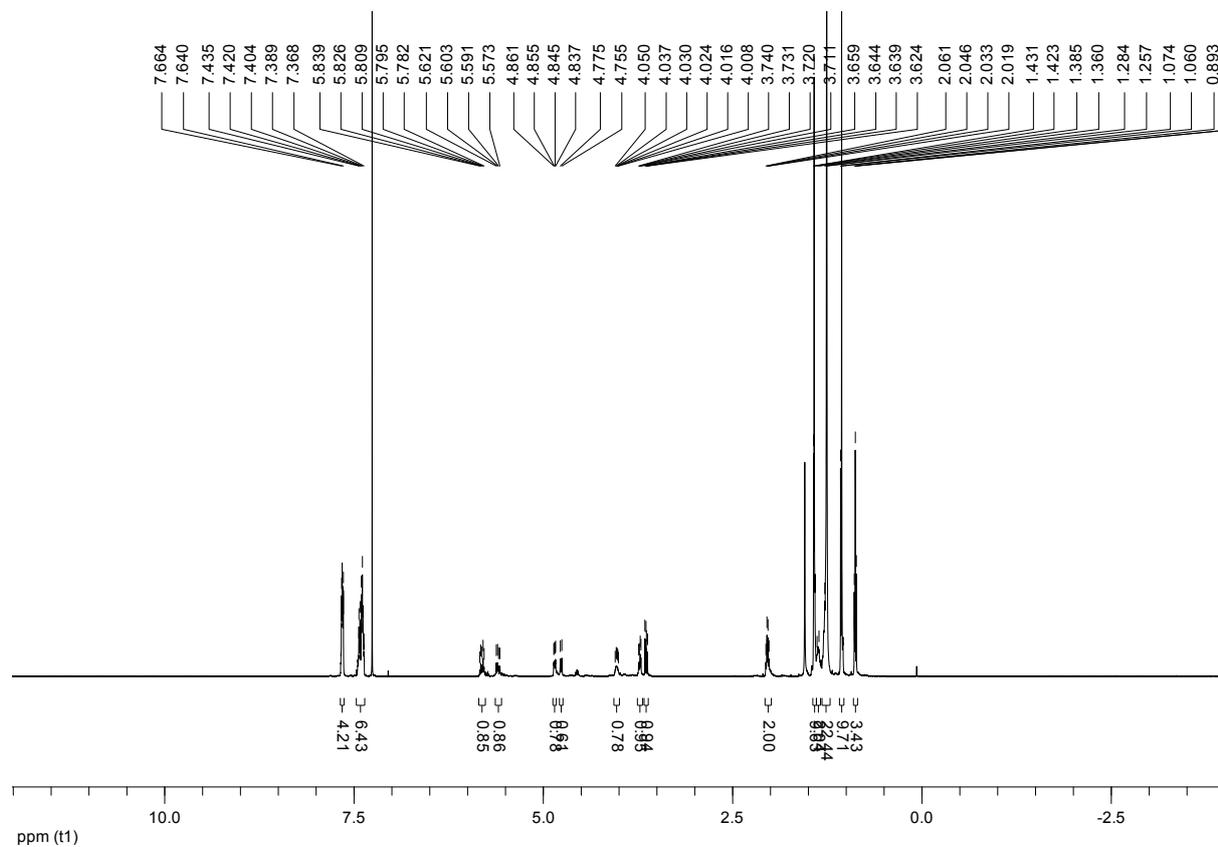
**tert-Butyl-(2S,3R)-3-hydroxy-1-tert-butylidiphenylsilyloxypent-4-en-2-ylcarbamate (56):**



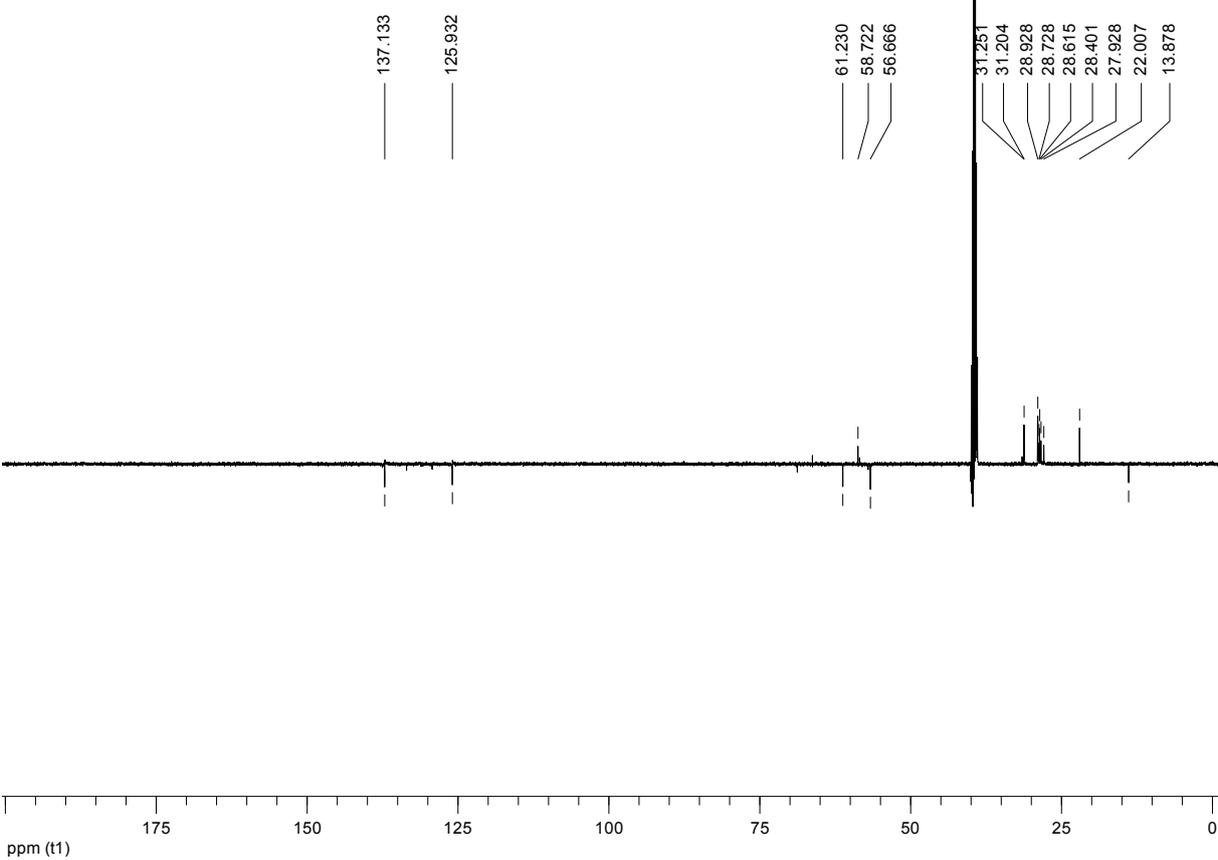
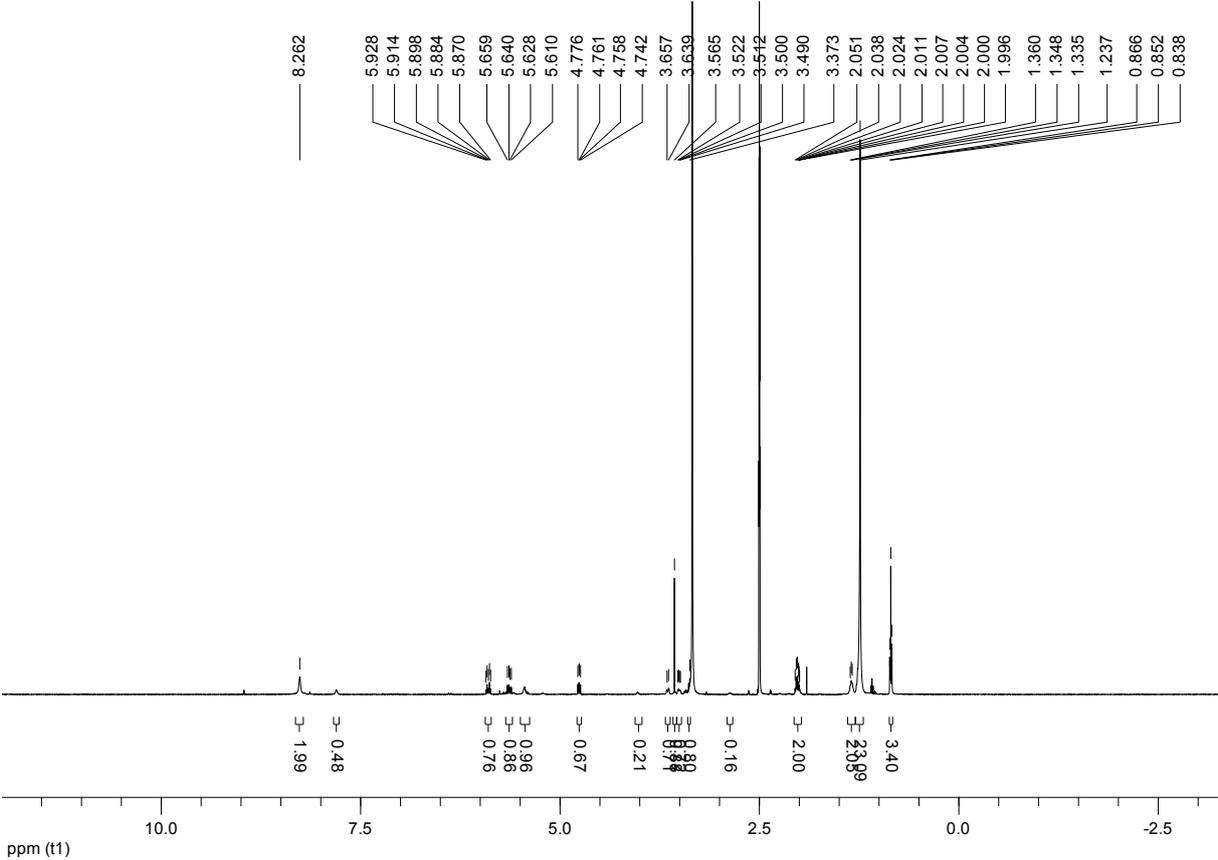
**tert-Butyl-(E,2S,3R)-3-hydroxy-1-tert-butylidiphenylsilyloxyoctadec-4-en-2-ylcarbamate (57):**



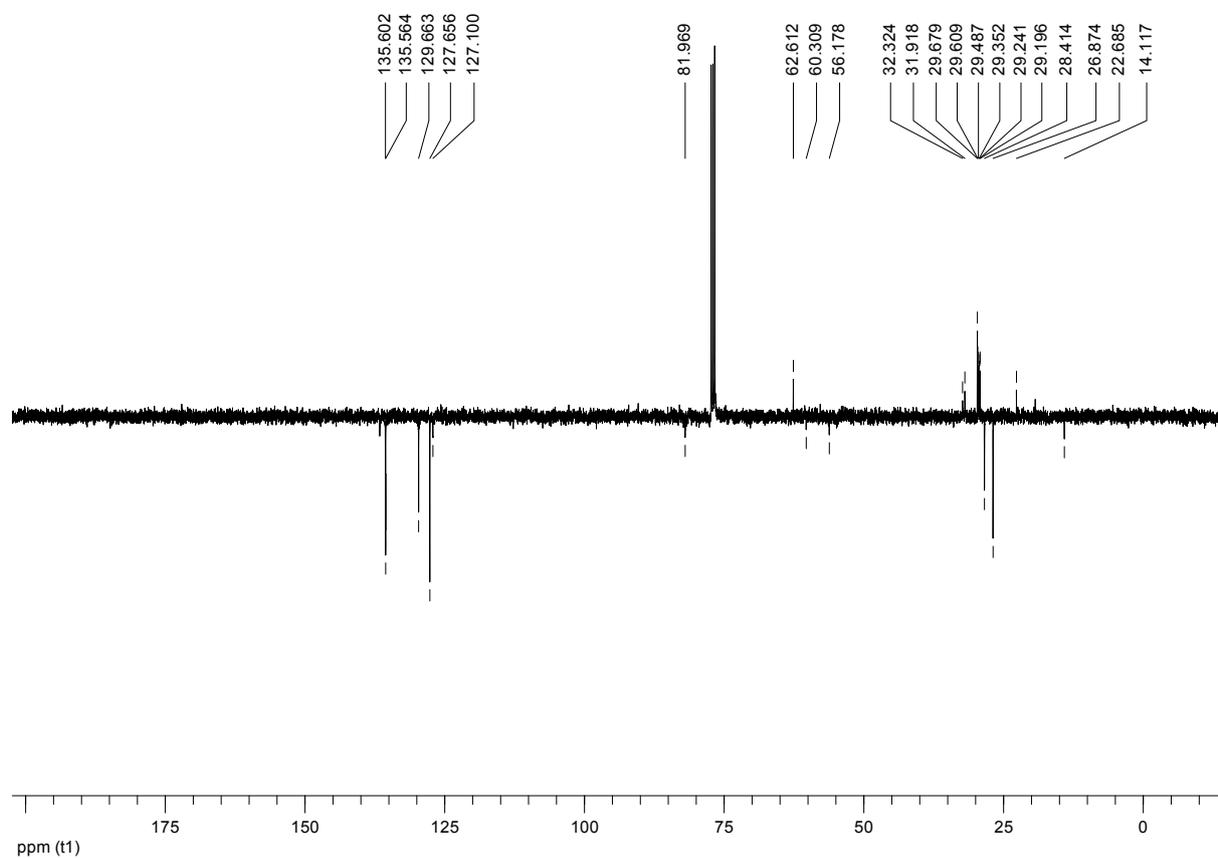
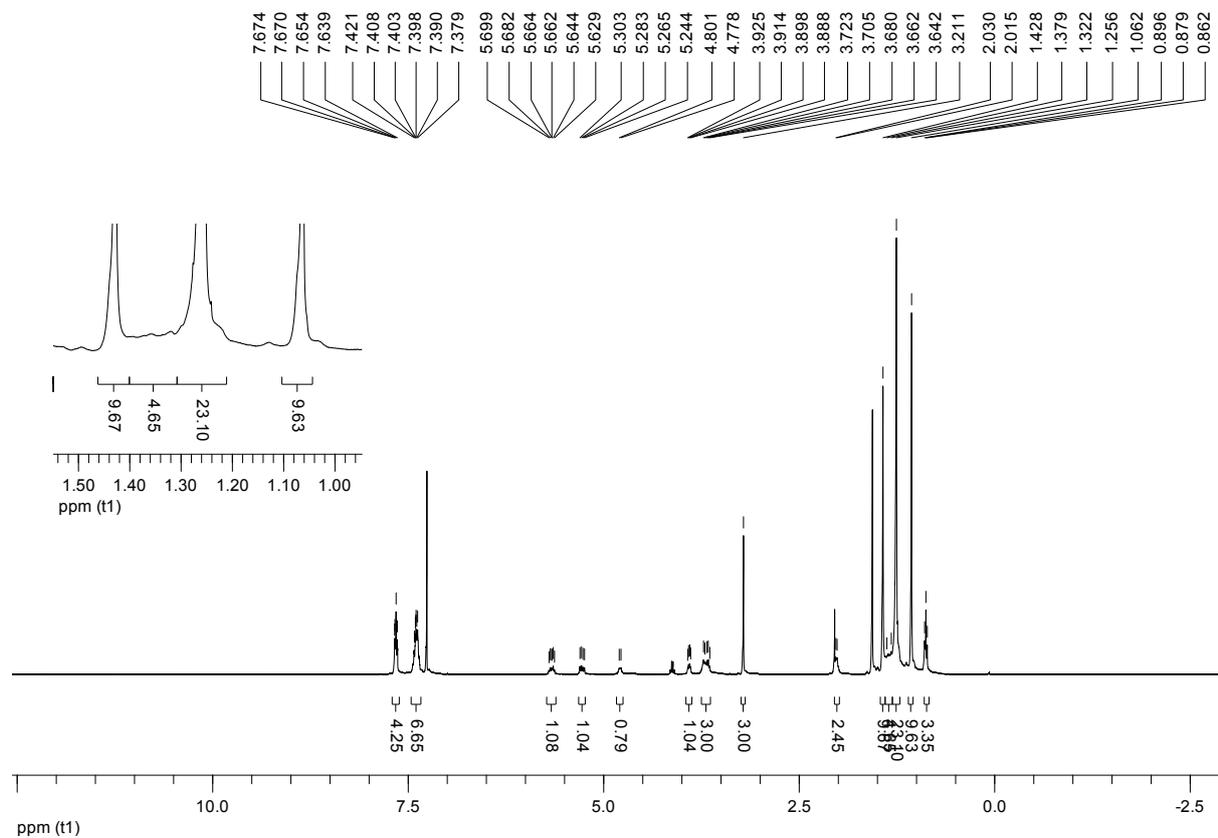
**tert-Butyl-(E,2S,3S)-3-chloro-1-tert-butylidiphenylsilyloxyoctadec-4-en-2-ylcarbamate (58):**



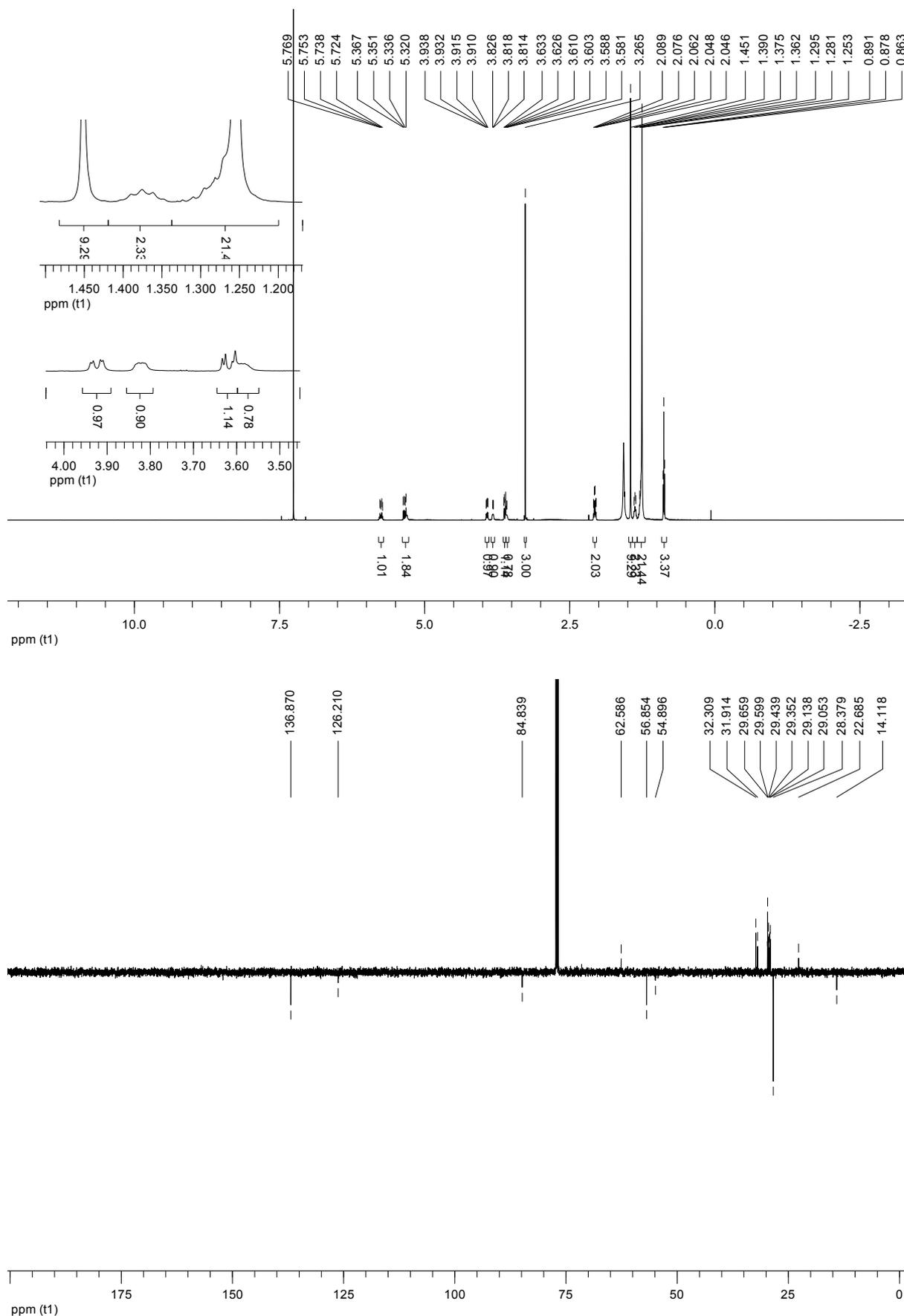
**(E,2S,3S)-2-Amino-3-chlorooctadec-4-en-1-ol-hydrochlorid (8):**



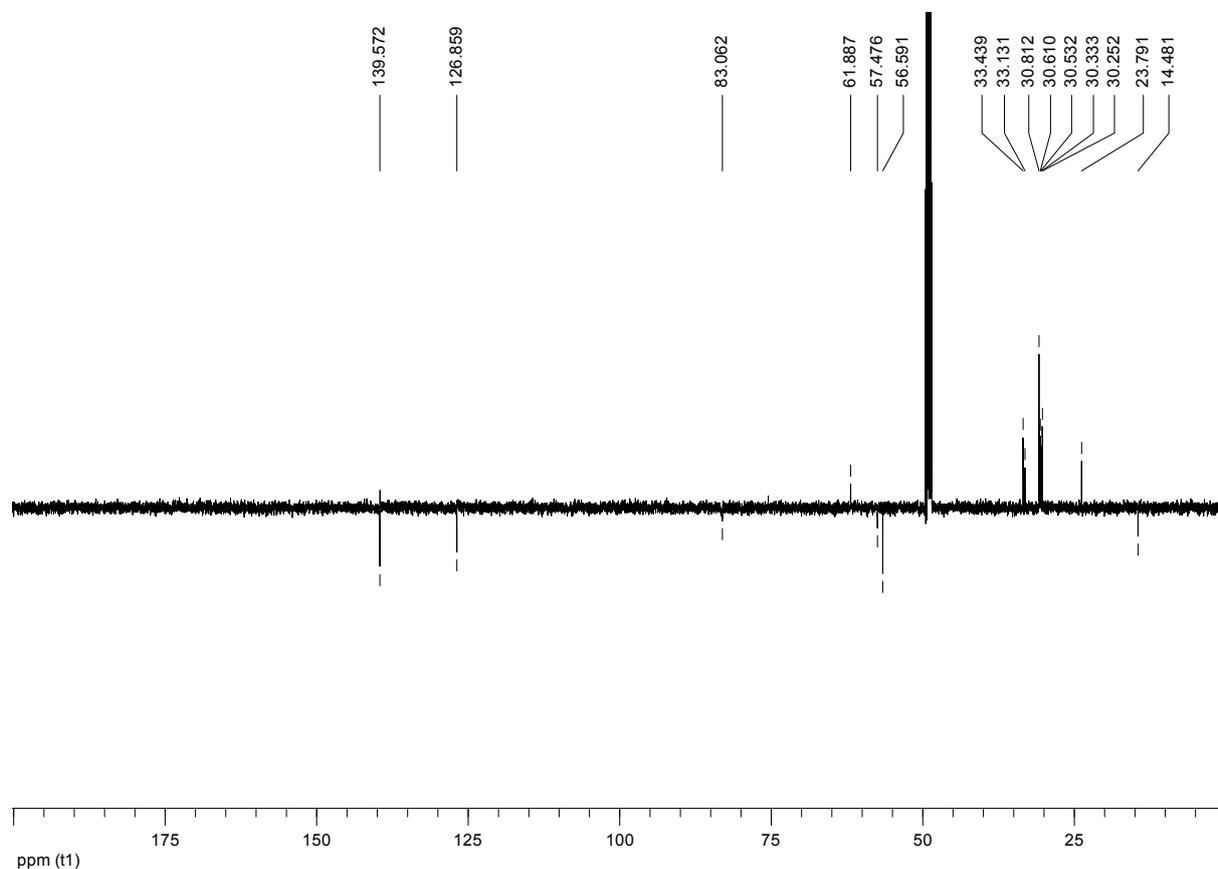
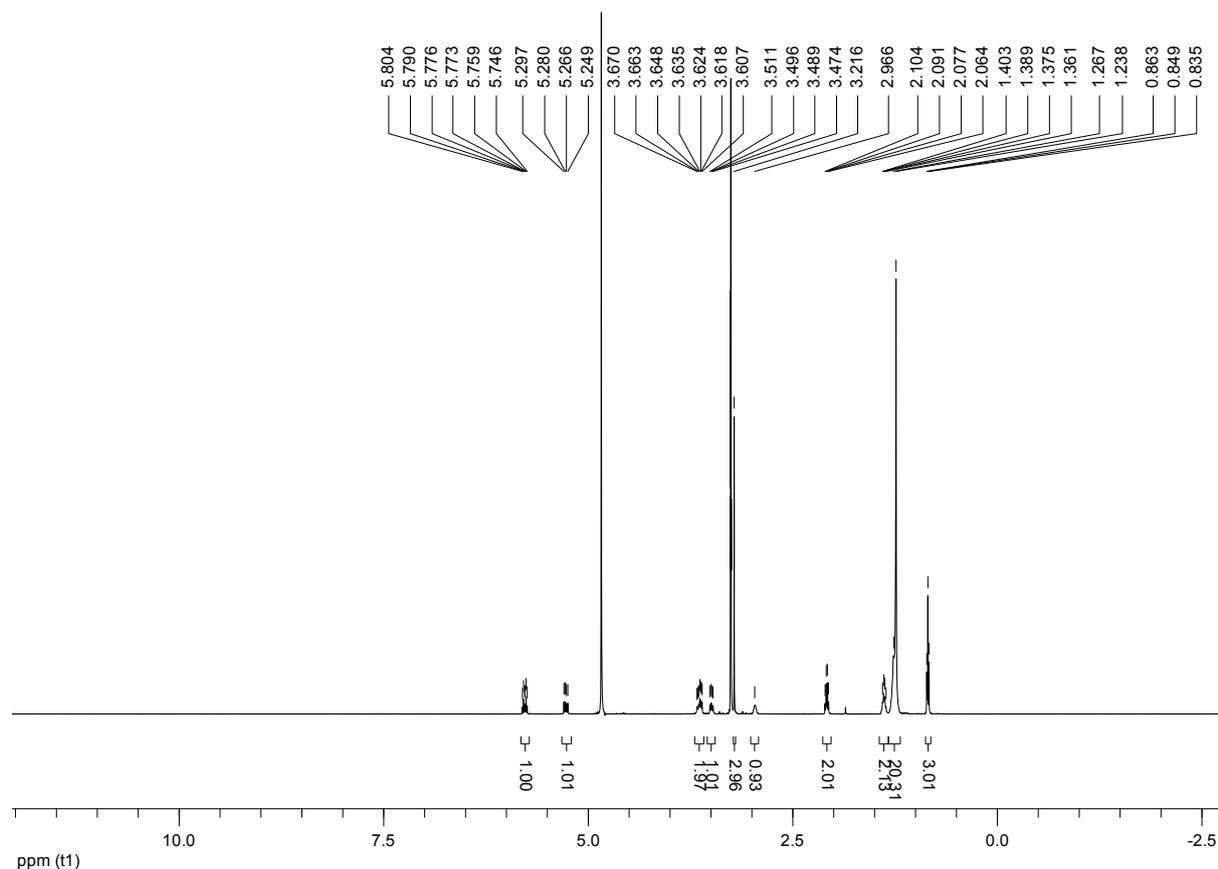
**tert-Butyl-(E,2S,3R)-1-tert-butyldiphenylsilyloxy-3-methoxyoctadec-4-en-2-ylcarbamate (60):**



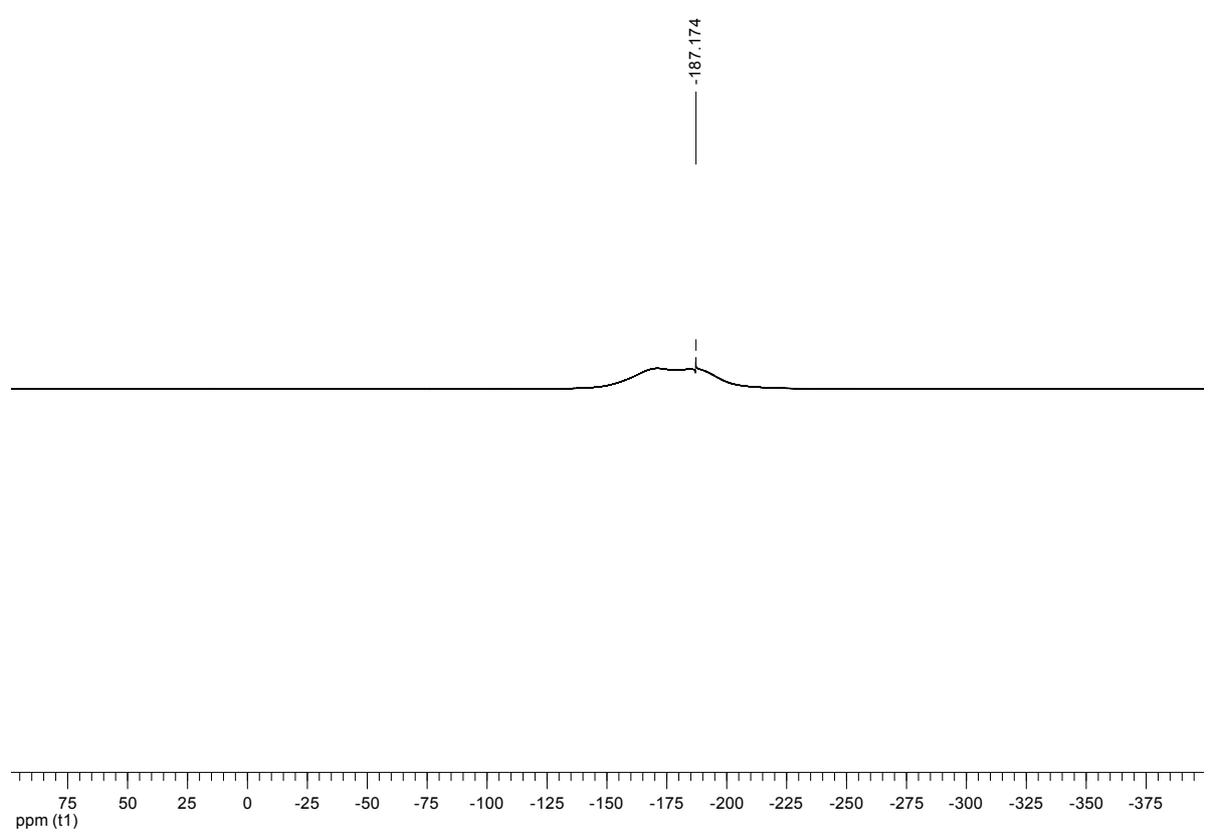
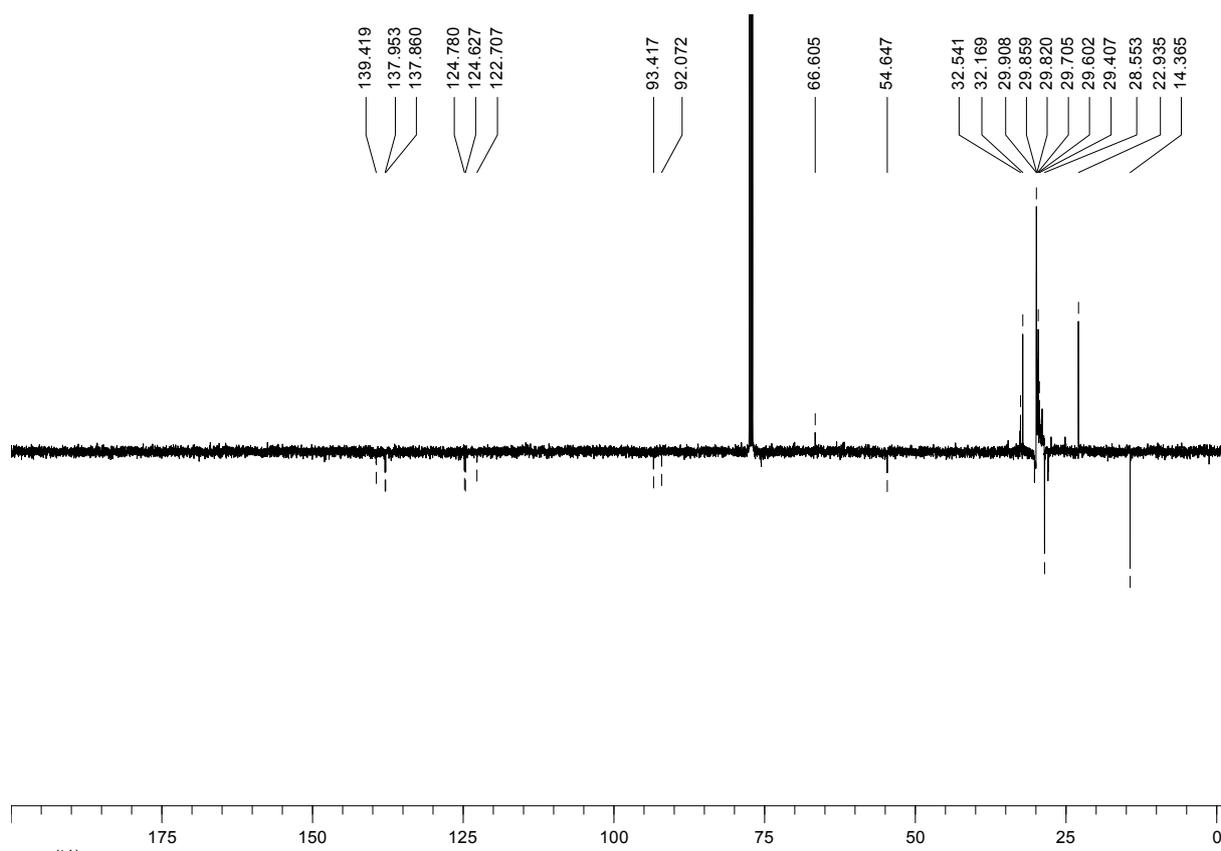
**tert-Butyl-(E,2S,3R)-1-hydroxy-3-methoxyoctadec-4-en-2-ylcarbamate (61):**



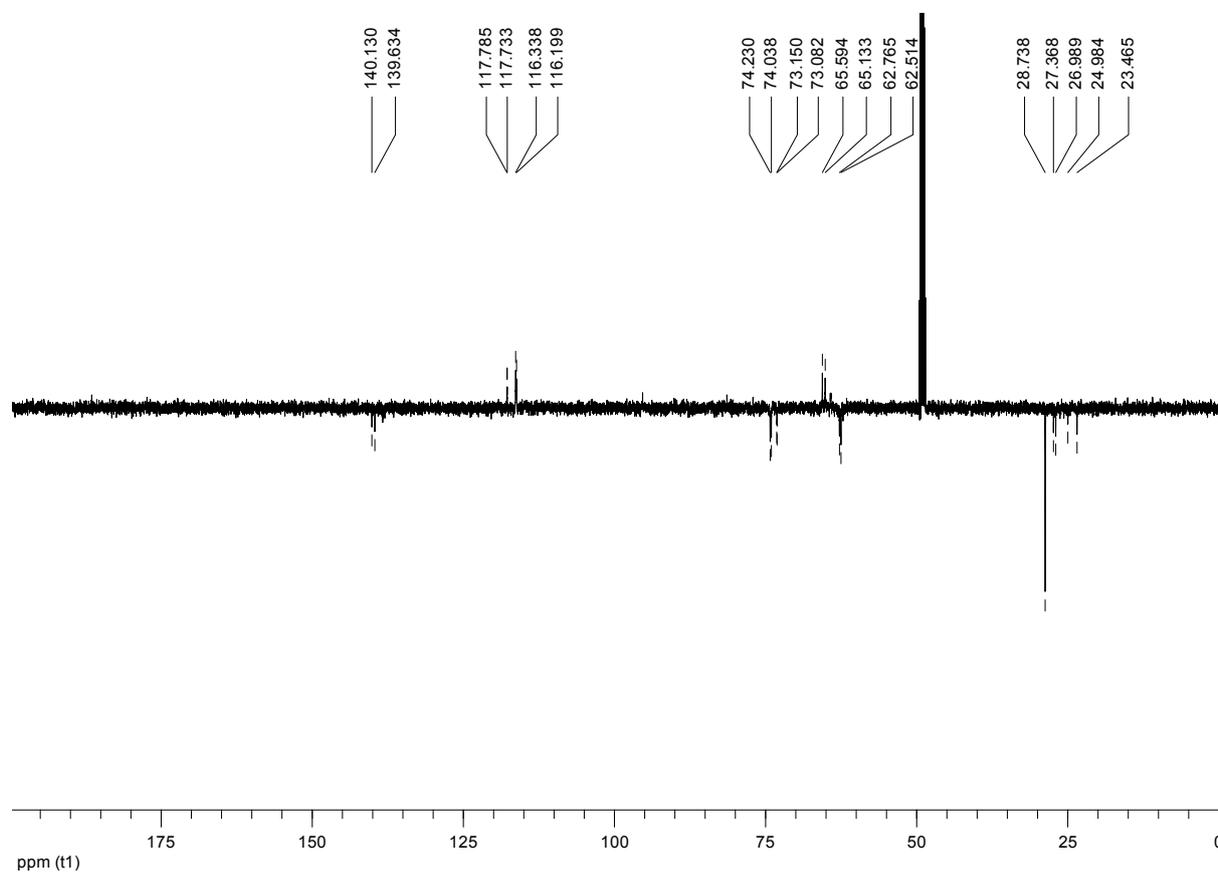
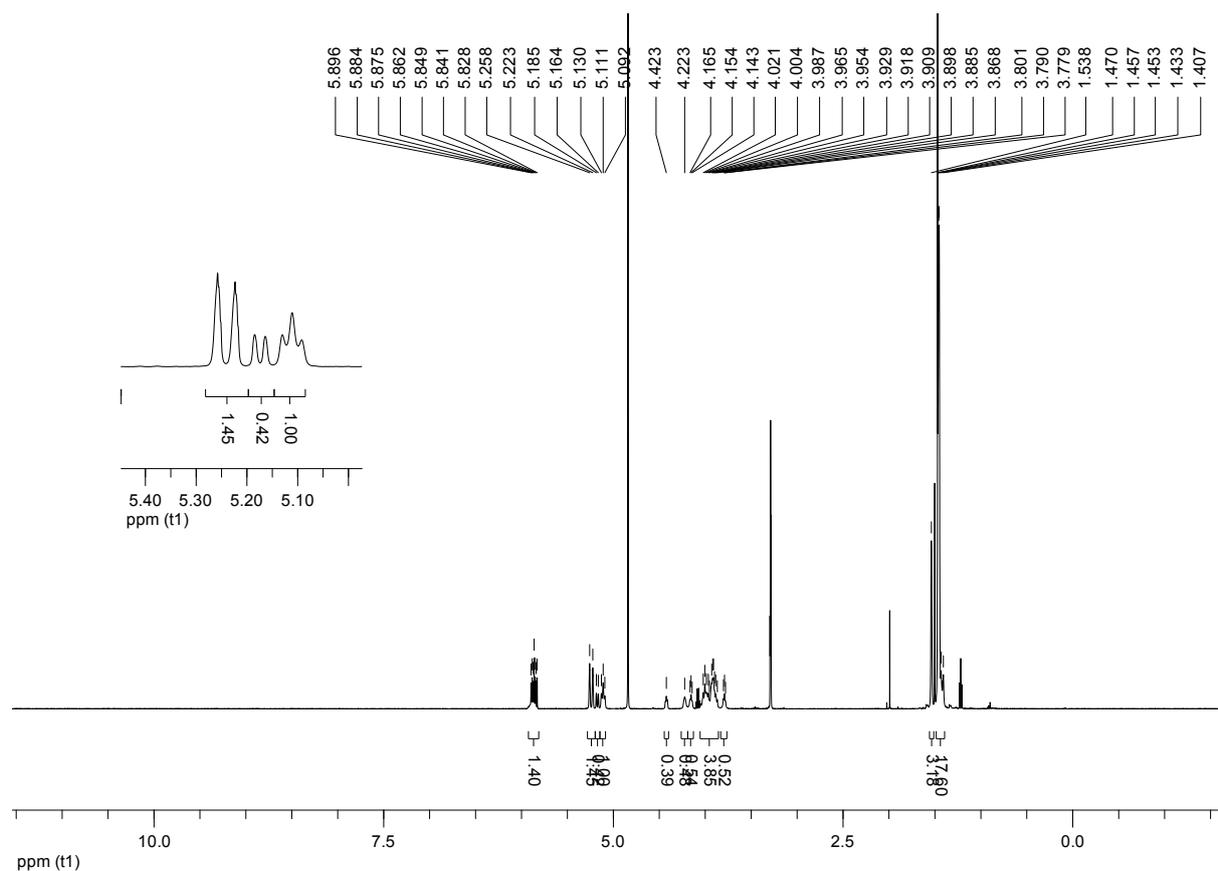
**(E,2S,3R)-2-Amino-3-methoxyoctadec-4-en-1-ol-hydrochlorid (9):**



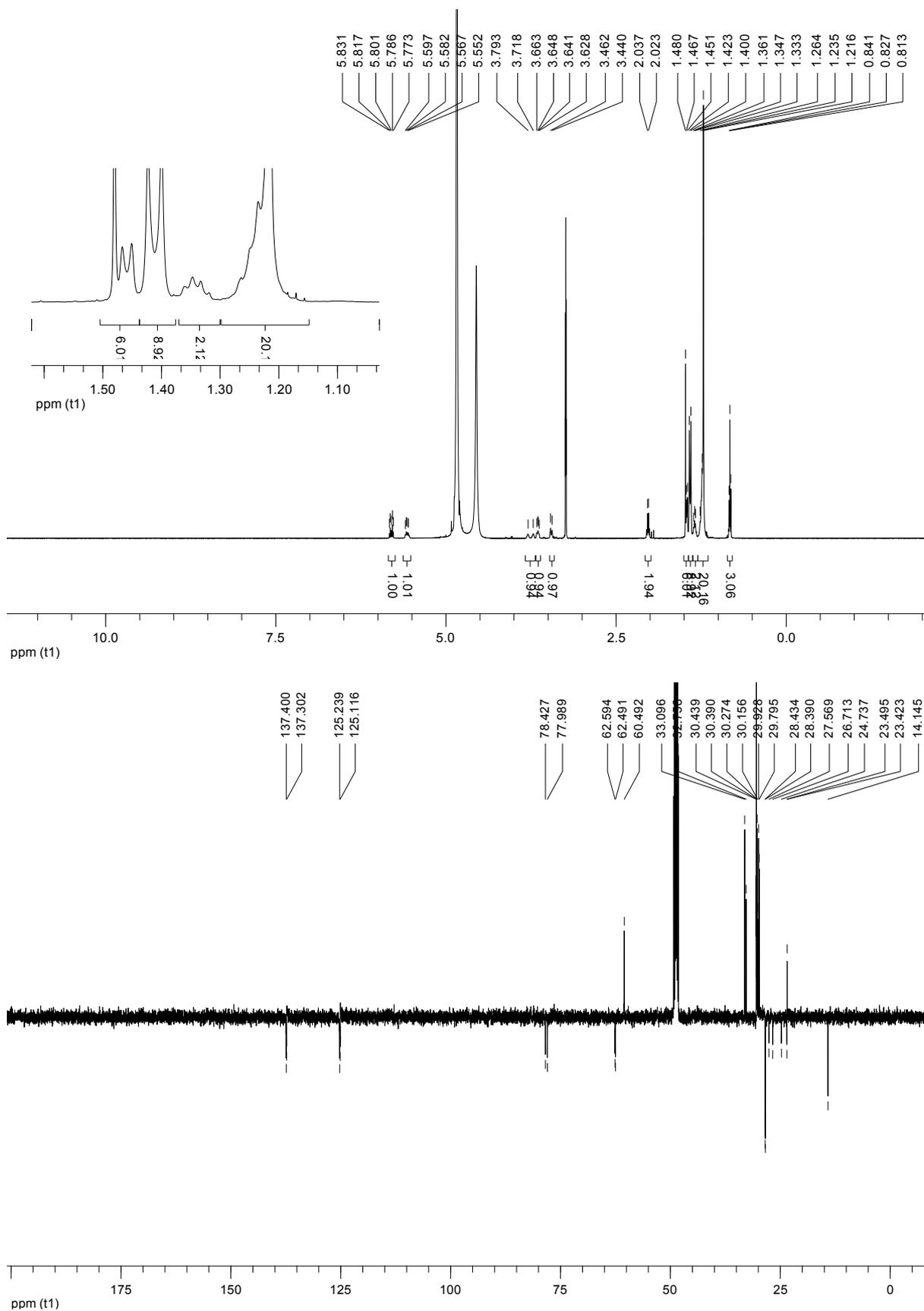
**tert-Butyl-(E,2S,3R)-3-fluoro-1-hydroxyoctadec-4-en-2-ylcarbamate (62):**



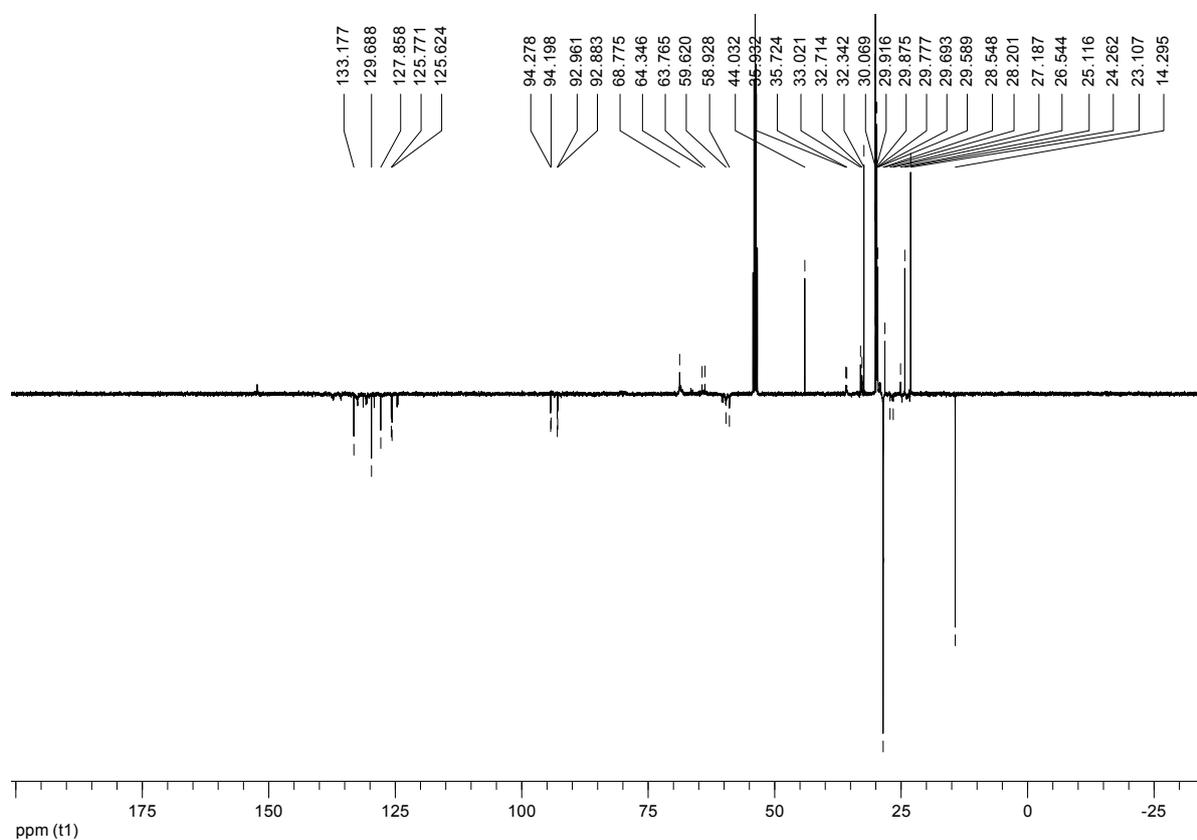
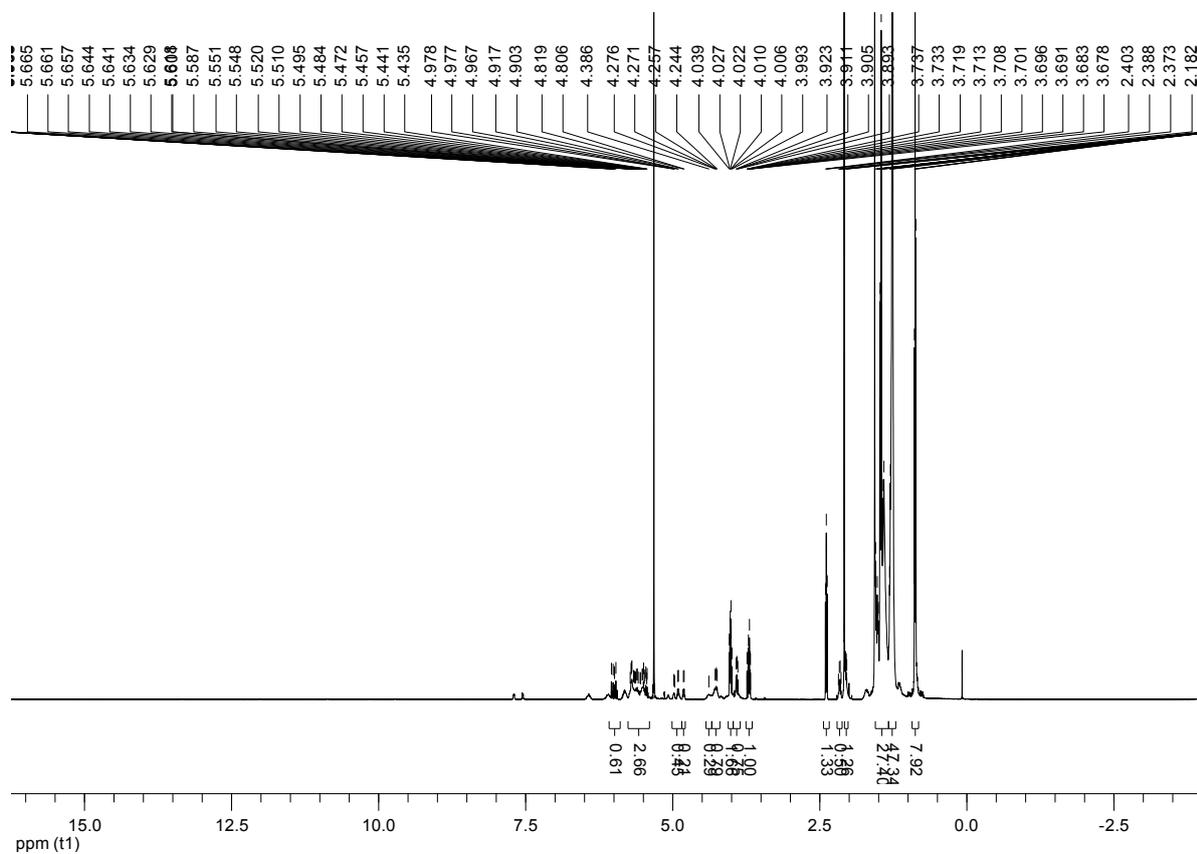
**(S)-tert-Butyl-4-(1-hydroxyallyl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-carboxylat (63):**

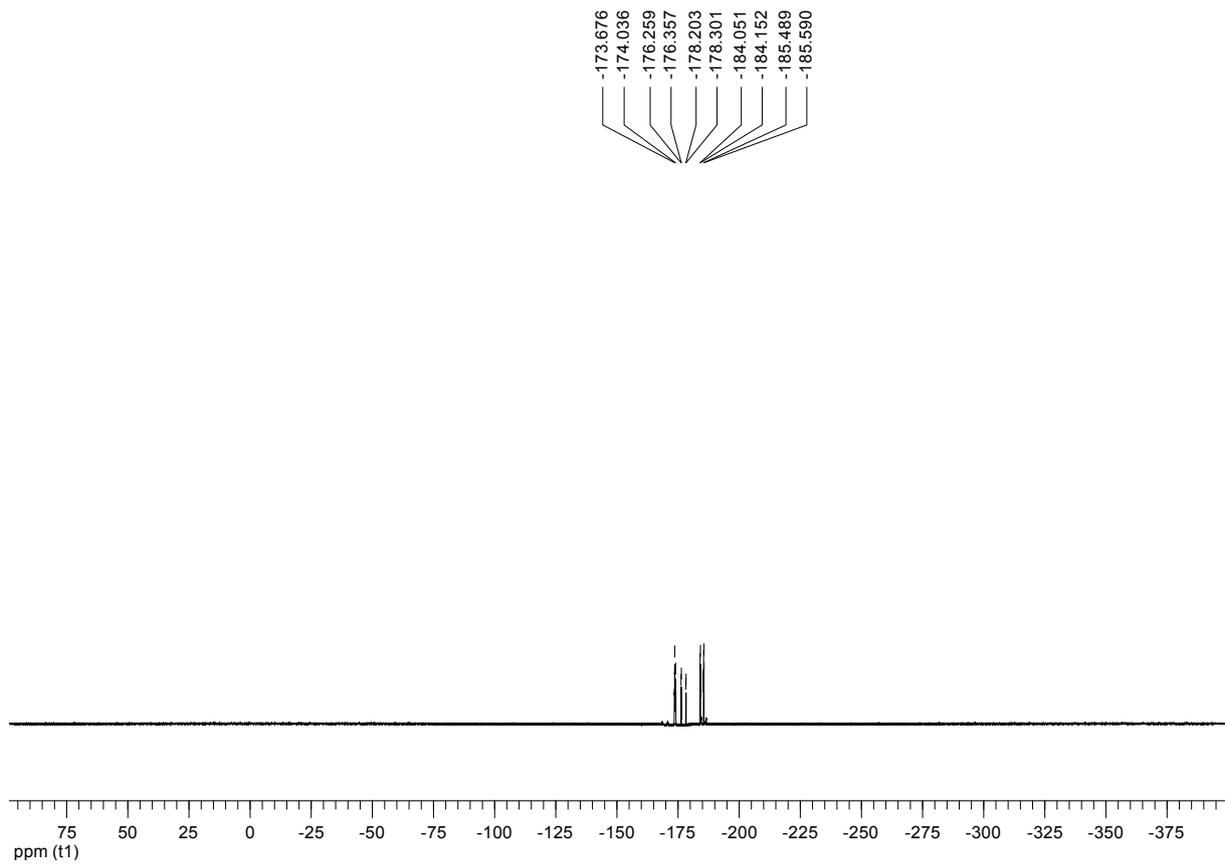


**(S)-tert-Butyl-4-((R,E)-1-hydroxyhexadec-2-enyl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-carboxylat (64):**

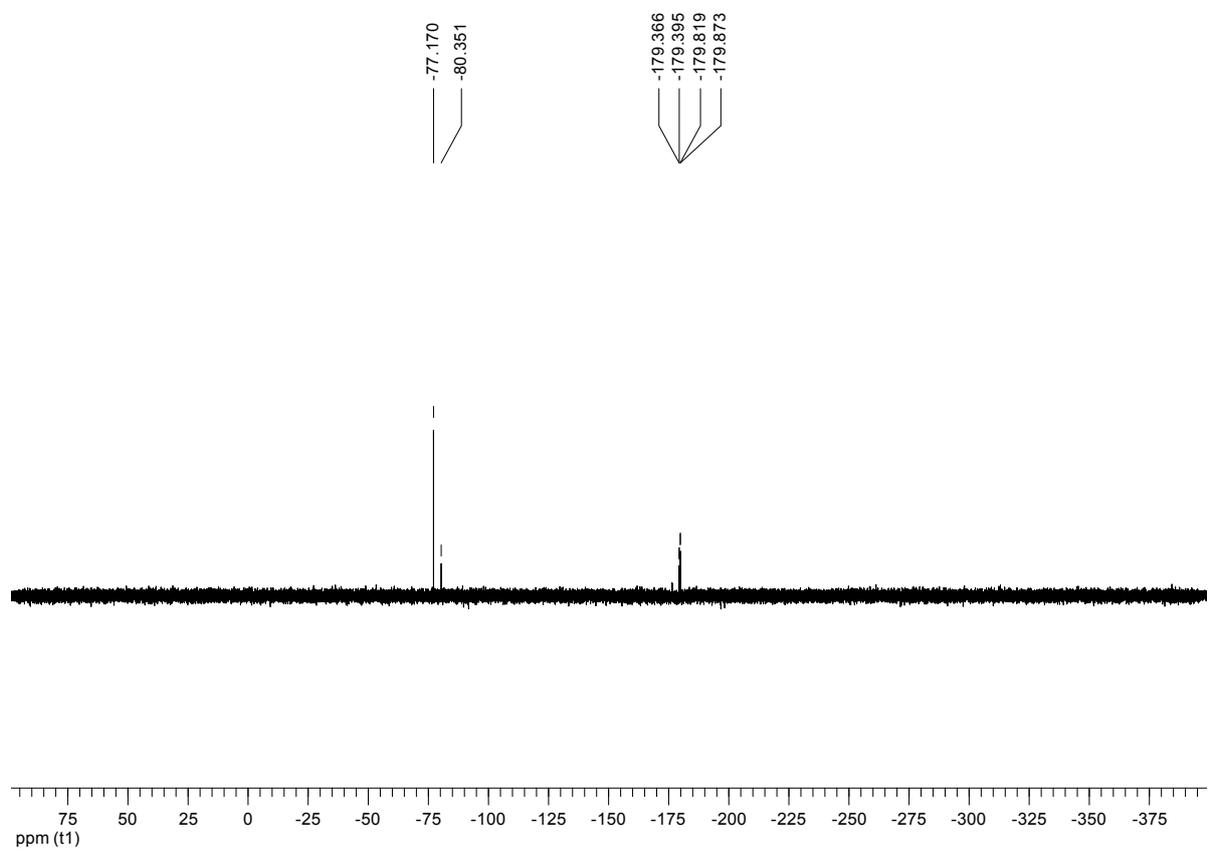
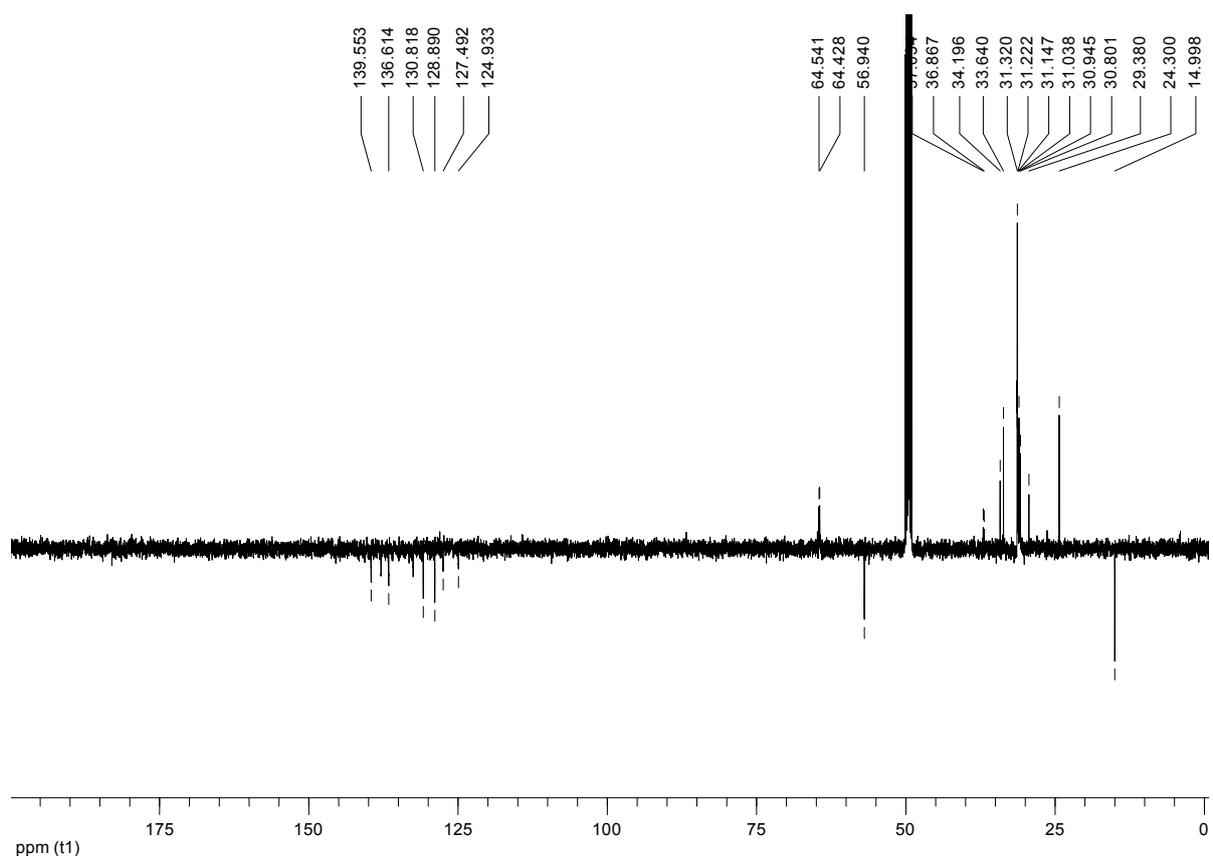


**(S)-tert-Butyl-4-((R,E)-1-fluorohexadec-2-enyl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-carboxylat (65):**

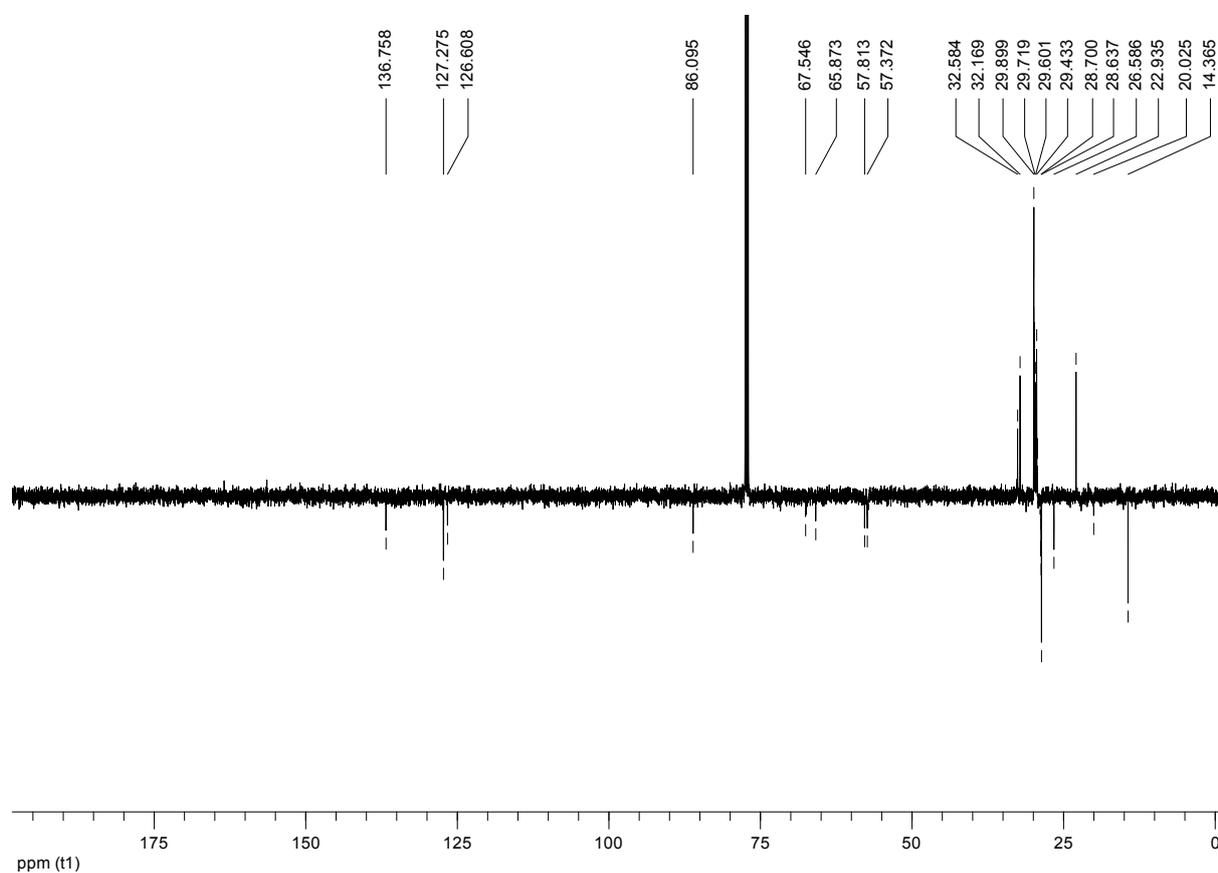
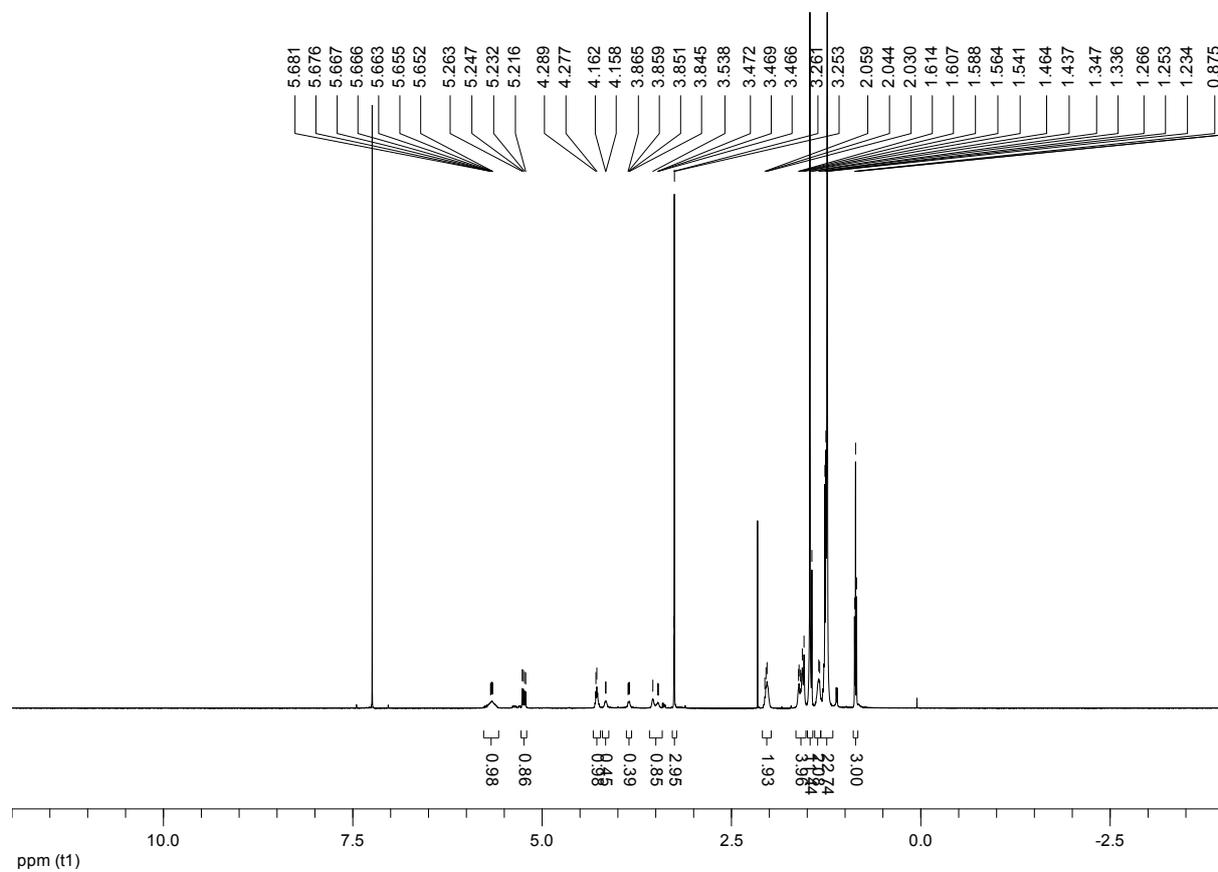




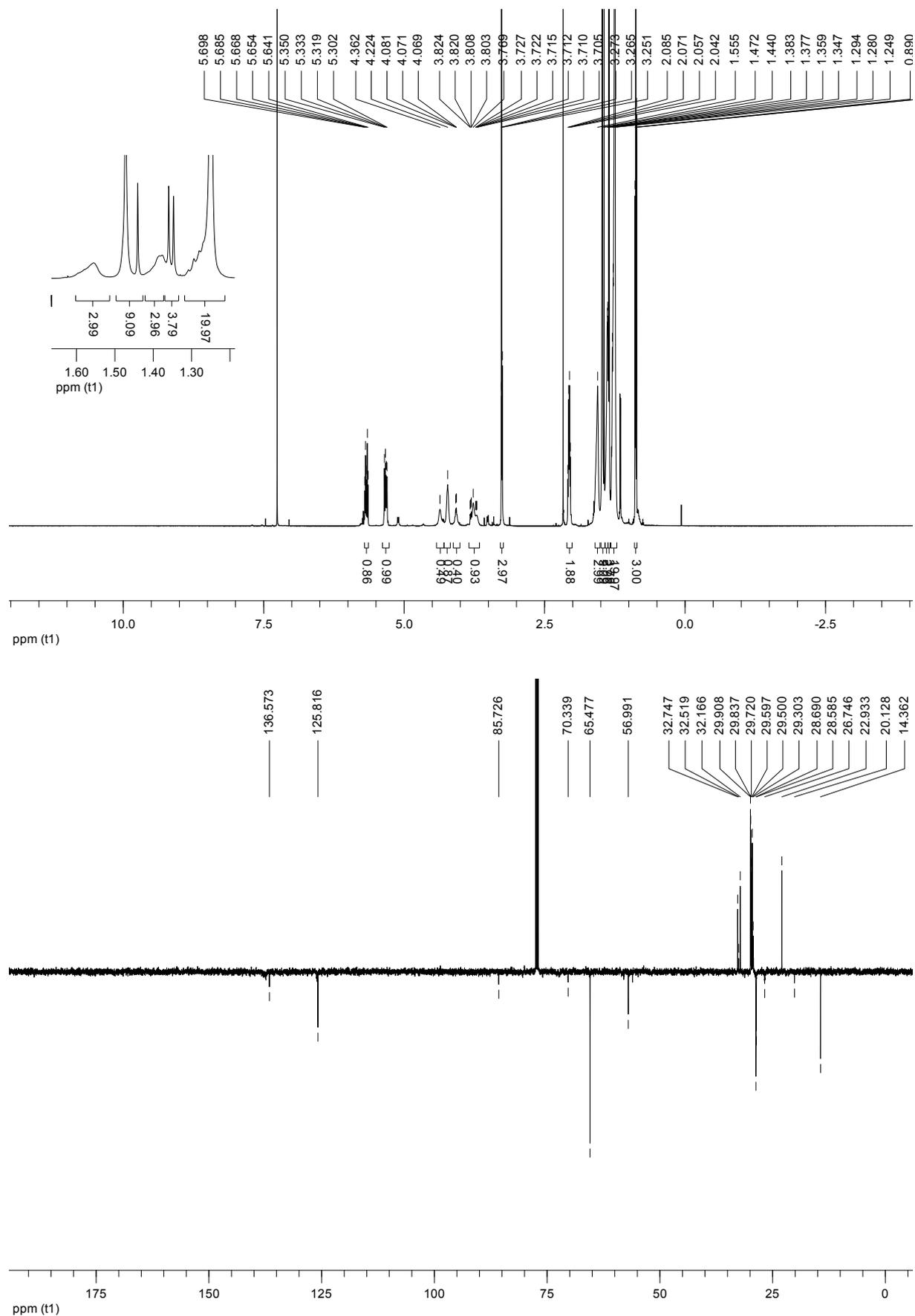
**(E,2S,3R)-2-Amino-3-fluorooctadec-4-en-1-ol (TFA-Salz) (10):**



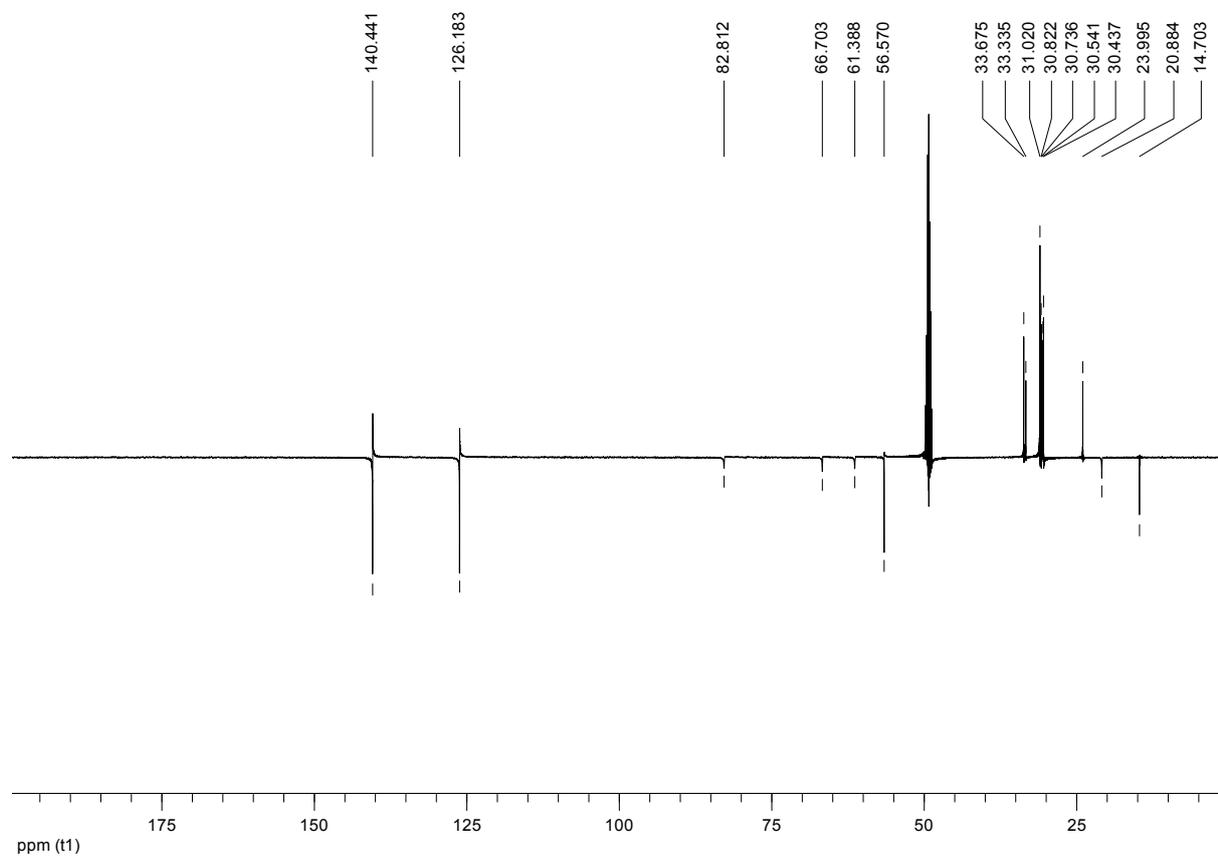
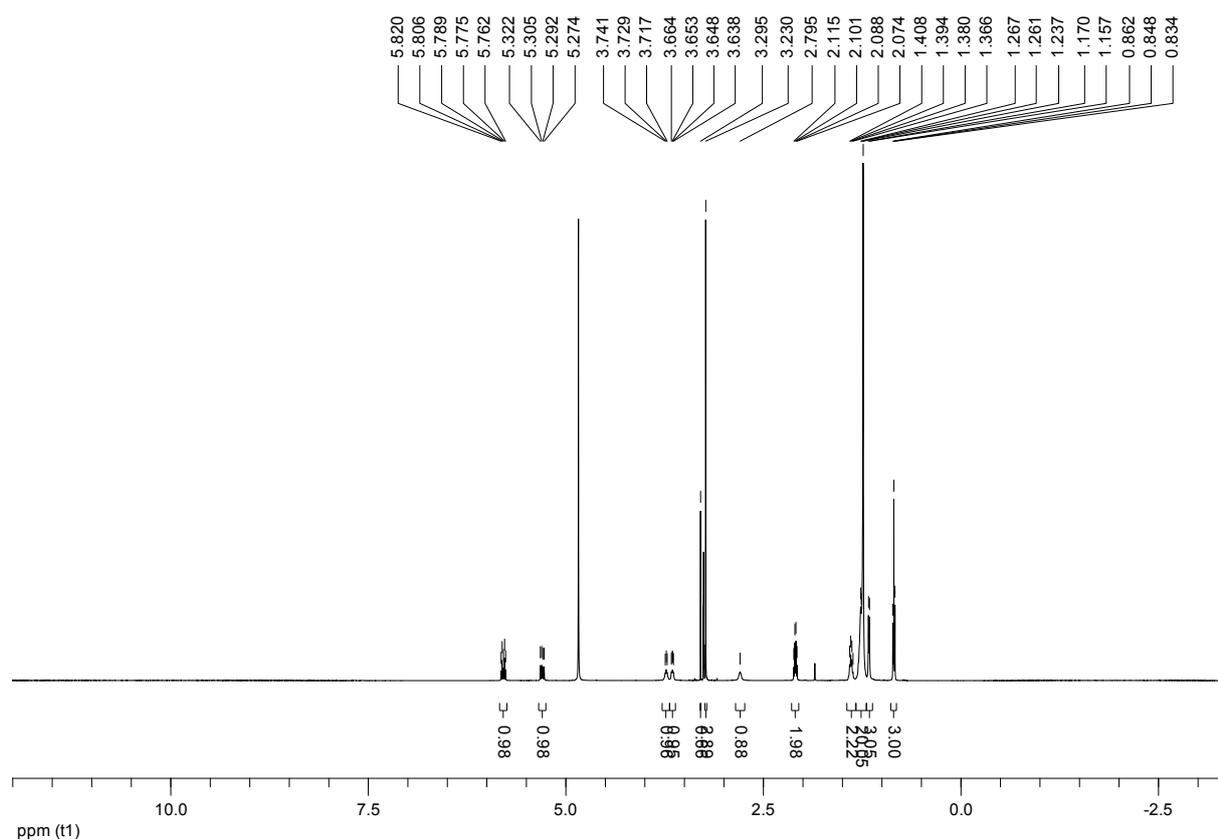
**(4*S*,5*R*)-*tert*-Butyl-4-((*R,E*)-1-methoxyhexadec-2-enyl)-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylate (66):**



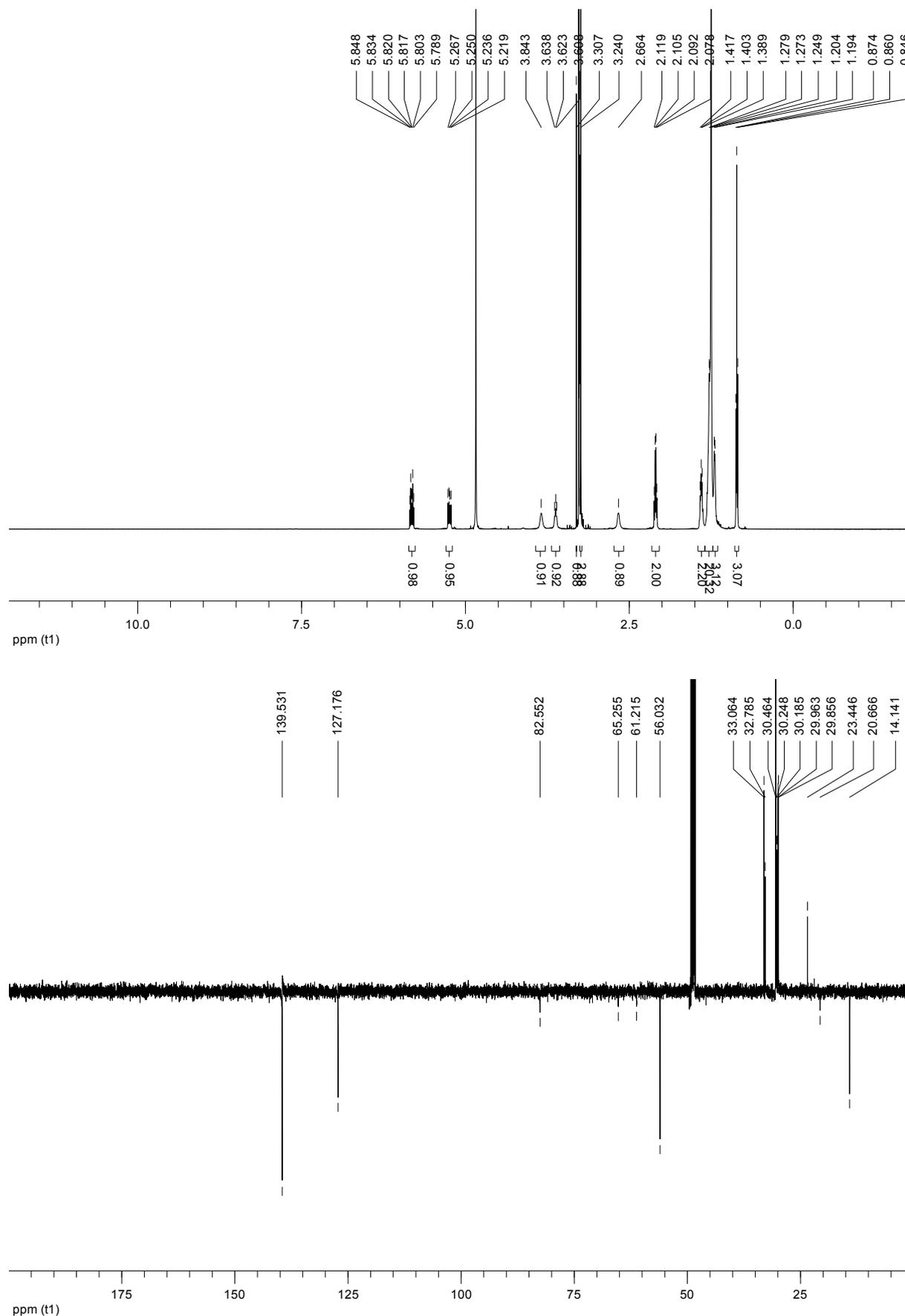
**(4*S*,5*R*)-*tert*-Butyl-4-((*S*,*E*)-1-methoxyhexadec-2-enyl)-2,2,5-trimethyloxazolidin-3-carboxylat (67):**



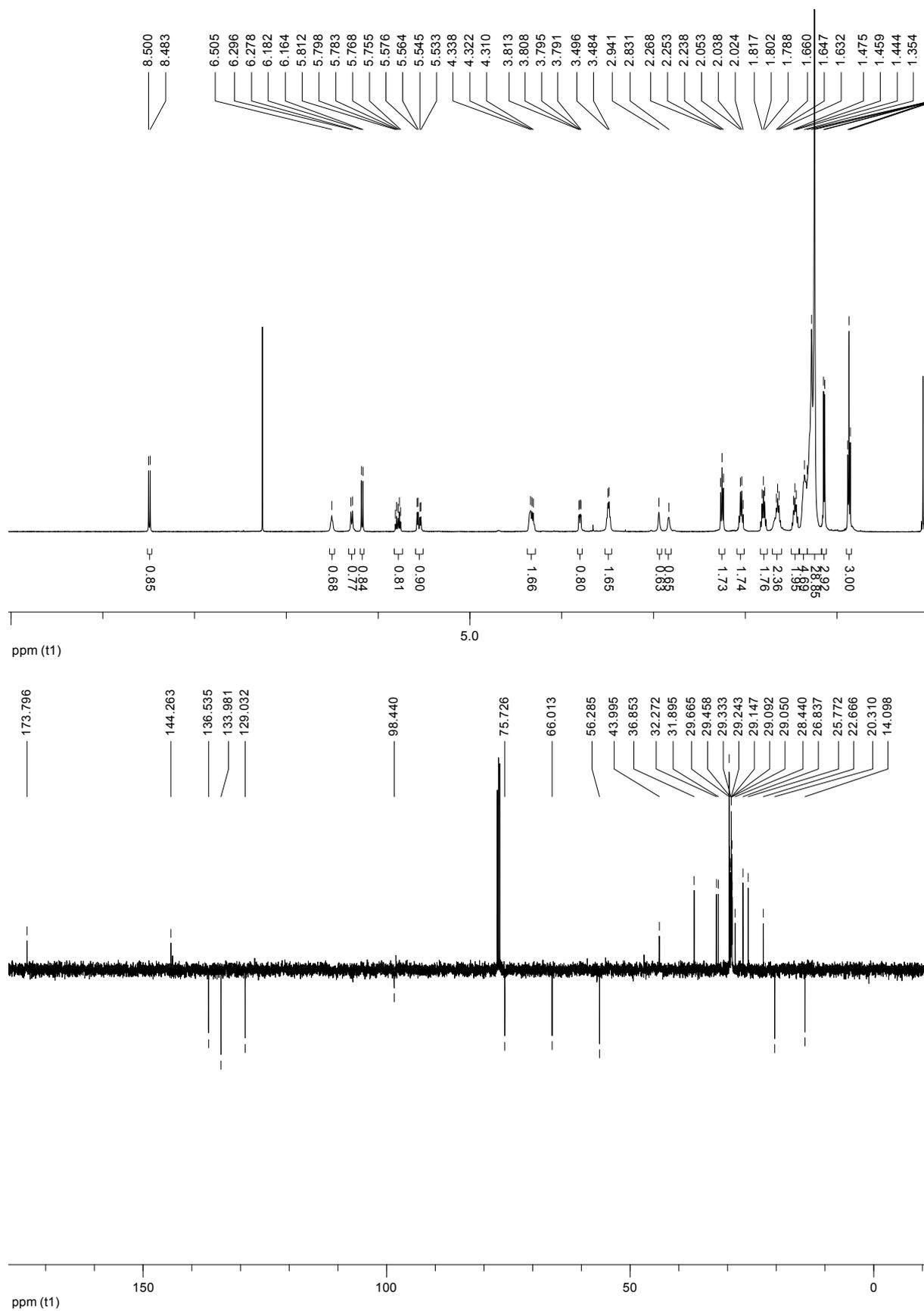
**(E,2R,3S,4R)-3-Amino-4-methoxynonadec-5-en-2-ol-hydrochlorid (11):**



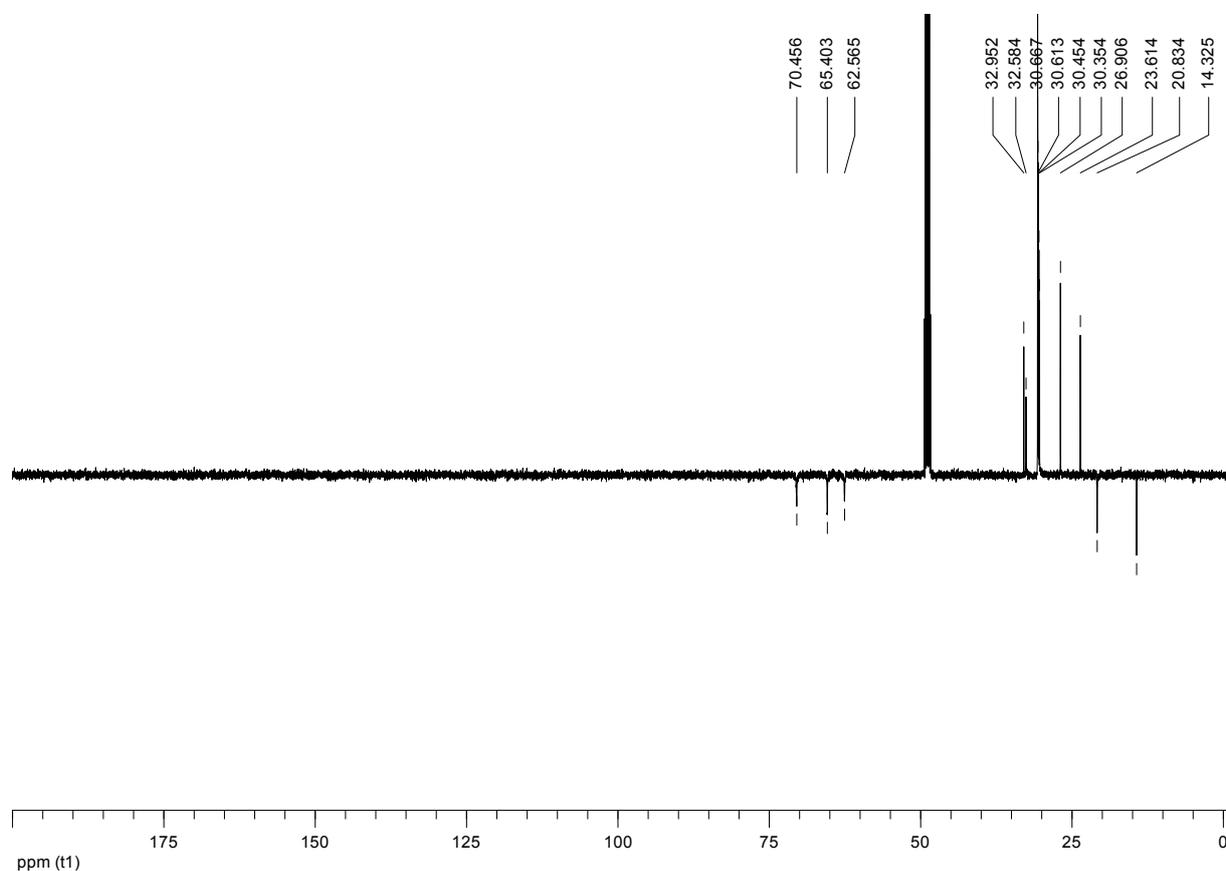
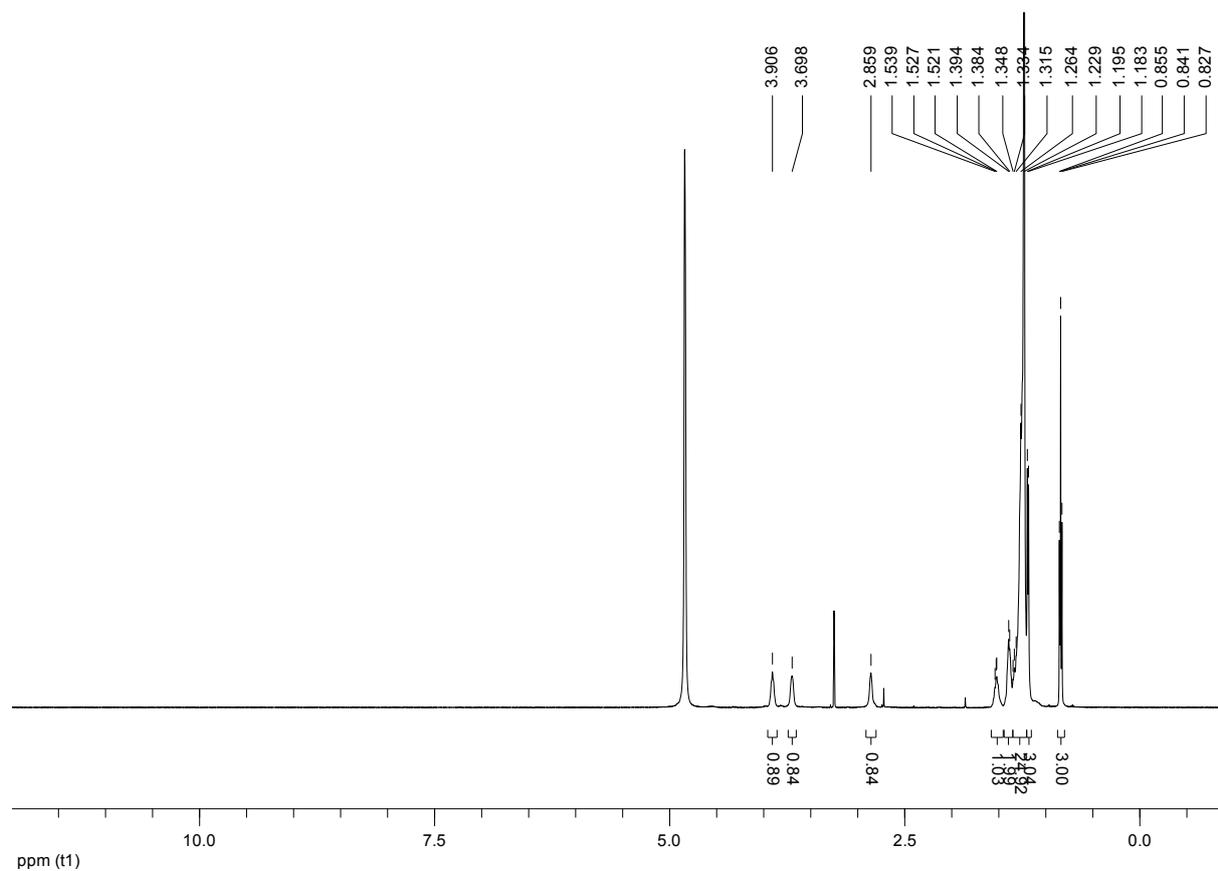
**(E,2R,3S,4S)-3-Amino-4-methoxynonadec-5-en-2-ol-hydrochlorid (12):**



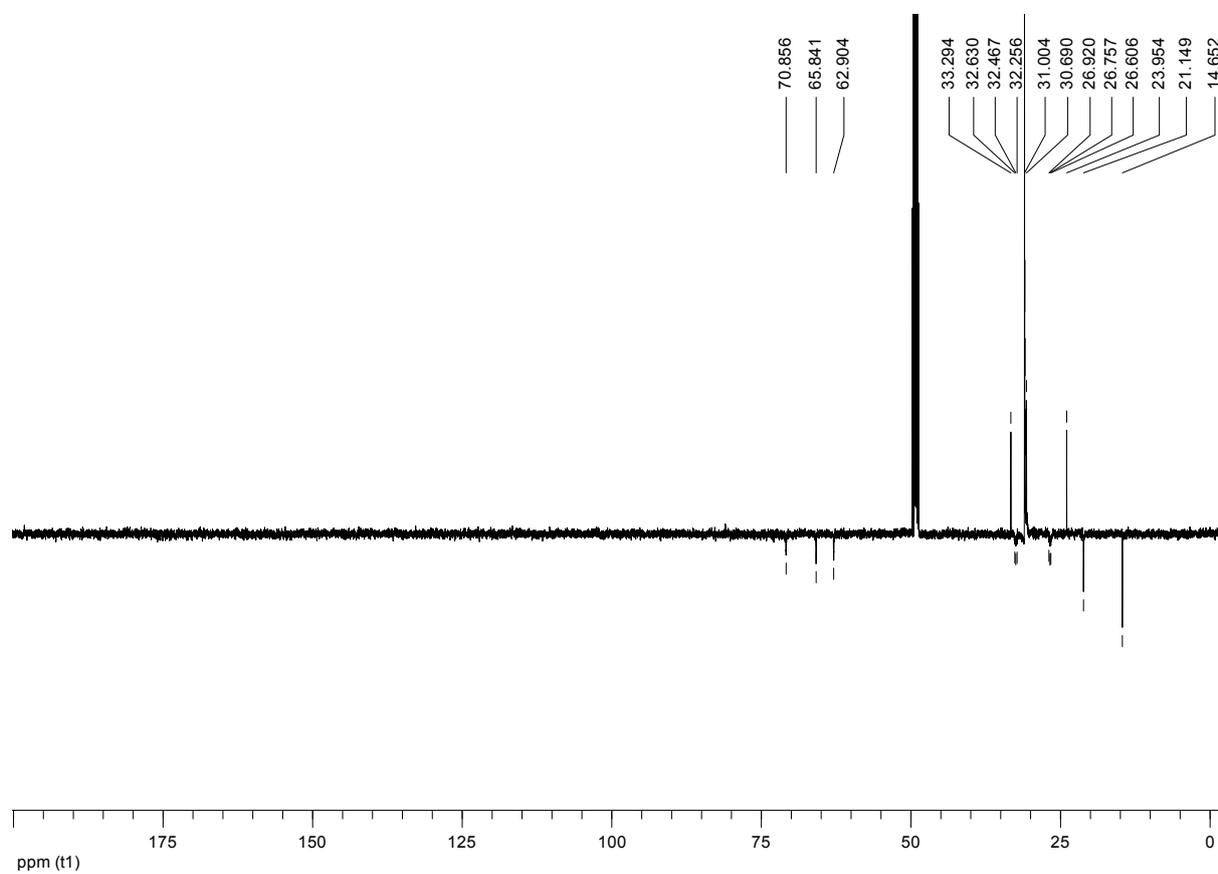
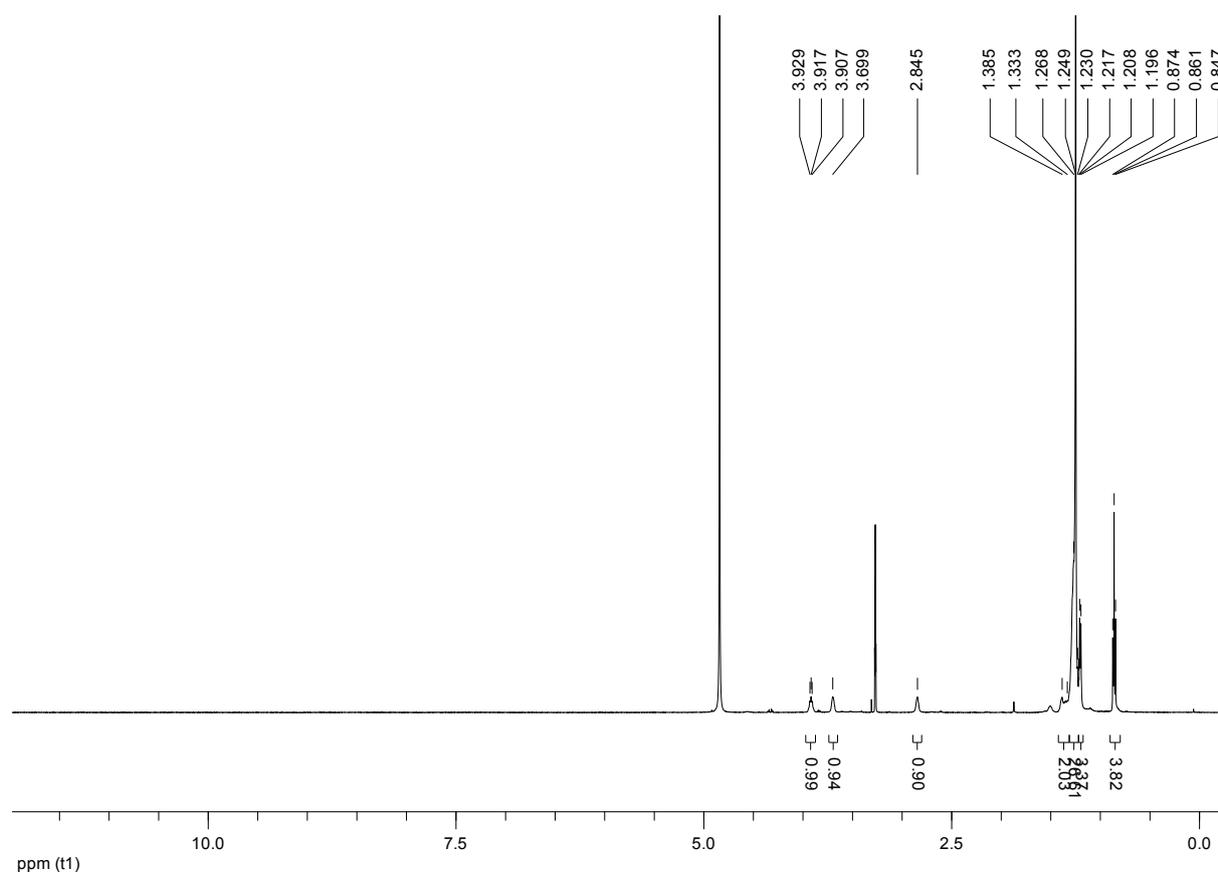
**12-(4-Nitrobenzo[1,2,5]oxadiazol-7-ylamino)-N-((E,2R,3S,4R)-2,4-dihydroxynonadec-5-en-3-yl)dodecanamid (13):**



**(2R,3S,4R)-3-Aminononadecan-2,4-diol-hydrochlorid (14):**



**(2R,3S,4R)-3-Amino-[4,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]nonadecan-2,4-diol (15):**





## A Literatur

- [1] J. Ko, T. F. Molinski, *The Journal of Organic Chemistry* **2012**, *78*, 498-505.
- [2] T. J. Devi, B. Saikia, N. C. Barua, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 3817-3822.
- [3] T. Ghosh, J. Bian, D. Gill, *Science* **1990**, *248*, 1653-1656.
- [4] J. L. W. Thudichum, *A treatise on the chemical constitution of the brain*, Bailliere, Tindall and Cox, London, **1884**.
- [5] J. A. Morales-Serna, A. Sauza, G. Padrón de Jesús, R. Gaviño, G. García de la Mora, J. Cárdenas, *Tetrahedron Letters* **2013**, *54*, 7111-7114.
- [6] B. Ogretmen, Y. A. Hannun, *Nature reviews. Cancer* **2004**, *4*, 604-616.
- [7] H. Suzuki, M. Mori, M. Shibakami, *Synlett* **2003**, *2003*, 2163-2166.
- [8] S. Milstien, S. Spiegel, *Cancer Cell* **2006**, *9*, 148-150.
- [9] S. Hakomori, *Annual review of biochemistry* **1981**, *50*, 733-764.
- [10] S. Hakomori, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **1999**, *1473*, 247-266.
- [11] N. C. Hait, C. A. Oskeritzian, S. W. Paugh, S. Milstien, S. Spiegel, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2006**, *1758*, 2016-2026.
- [12] I. Nieves, J.-L. Abad, L. R. Montes, F. M. Goñi, A. Delgado, *Tetrahedron* **2016**, *72*, 605-612.
- [13] P. M. Koskinen, A. M. P. Koskinen, *Synthesis* **1998**, *1998*, 1075-1091.
- [14] J. D. Saba, T. Hla, *Circulation Research* **2004**, *94*, 724-734.
- [15] H. E. Carter, F. J. Glick, W. P. Norris, G. E. Phillips, *The Journal of Biological Chemistry* **1947**, *170*, 285-294.
- [16] R. Bittman, T. P. Begley, in *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, John Wiley & Sons, Inc., **2007**.
- [17] A. Huwiler, T. Kolter, J. Pfeilschifter, K. Sandhoff, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2000**, *1485*, 63-99.
- [18] B. Olofsson, P. Somfai, *The Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 2514-2517.
- [19] A. M. P. Koskinen, L. A. Otsomaa, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 6473-6484.
- [20] M. A. Markwell, L. Svennerholm, J. C. Paulson, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **1981**, *78*, 5406-5410.
- [21] K. A. Karlsson, *Annual review of biochemistry* **1989**, *58*, 309-350.
- [22] C. A. Lingwood, R. Abram, M. Mylvaganum, T. P. Begley, in *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, John Wiley & Sons, Inc., **2007**.
- [23] L. Wong, S. S. L. Tan, Y. Lam, A. J. Melendez, *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52*, 3618-3626.
- [24] Y. A. Hannun, L. M. Obeid, *Nature reviews. Molecular cell biology* **2008**, *9*, 139-150.
- [25] K. Takabe, S. W. Paugh, S. Milstien, S. Spiegel, *Pharmacological Reviews* **2008**, *60*, 181-195.
- [26] E. C. Mandon, I. Ehses, J. Rother, G. van Echten, K. Sandhoff, *The Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267*, 11144-11148.
- [27] J. Usta, S. E. Bawab, P. Roddy, Z. M. Szulc, Y. A. Hannun, A. Bielawska, *Biochemistry* **2001**, *40*, 9657-9668.
- [28] T. Kolter, *Chemistry and Physics of Lipids* **2011**, *164*, 590-606.
- [29] J. Liao, J. Tao, G. Lin, D. Liu, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4715-4733.
- [30] C. R. Gault, L. M. Obeid, Y. A. Hannun, *Advances in experimental medicine and biology* **2010**, *688*, 1-23.
- [31] T. Linke, G. Wilkening, F. Sadeghlar, H. Mozcall, K. Bernardo, E. Schuchman, K. Sandhoff, *The Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 5760-5768.
- [32] G. M. Strub, M. Paillard, J. Liang, L. Gomez, J. C. Allegood, N. C. Hait, M. Maceyka, M. M. Price, Q. Chen, D. C. Simpson, T. Kordula, S. Milstien, E. J. Lesnefsky, S. Spiegel, *The FASEB Journal* **2011**, *25*, 600-612.
- [33] J. W. Choi, C.-W. Lee, J. Chun, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2008**, *1781*, 531-539.
- [34] A. H. Merrill, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 25843-25846.
- [35] S. Pyne, S. C. Lee, J. Long, N. J. Pyne, *Cellular Signalling* **2009**, *21*, 14-21.

- [36] O. Cuvillier, G. Pirianov, B. Kleuser, P. G. Vanek, O. A. Coso, S. Gutkind, S. Spiegel, *Nature* **1996**, *381*, 800-803.
- [37] S. M. Ulrich, T. P. Begley, in *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, John Wiley & Sons, Inc., **2007**.
- [38] S. De Jonghe, I. Van Overmeire, S. Poulton, C. Hendrix, R. Busson, S. Van Calenbergh, D. De Keukeleire, S. Spiegel, P. Herdewijn, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1999**, *9*, 3175-3180.
- [39] R. Alemany, C. J. van Koppen, K. Danneberg, M. Ter Braak, D. Meyer Zu Heringdorf, *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **2007**, *374*, 413-428.
- [40] M. Maceyka, H. Sankala, N. C. Hait, H. Le Stunff, H. Liu, R. Toman, C. Collier, M. Zhang, L. S. Satin, A. H. Merrill, S. Milstien, S. Spiegel, *The Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 37118-37129.
- [41] S. W. Paugh, S. G. Payne, S. E. Barbour, S. Milstien, S. Spiegel, *FEBS Letters* **2003**, *554*, 189-193.
- [42] D. Meyer zu Heringdorf, K. H. Jakobs, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2007**, *1768*, 923-940.
- [43] J. Wang, S. Knapp, N. J. Pyne, S. Pyne, J. M. Elkins, *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *5*, 1329-1333.
- [44] N. C. Hait, S. Sarkar, H. Le Stunff, A. Mikami, M. Maceyka, S. Milstien, S. Spiegel, *The Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 29462-29469.
- [45] N. C. Hait, A. Bellamy, S. Milstien, T. Kordula, S. Spiegel, *The Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 12058-12065.
- [46] G. Ding, H. Sonoda, H. Yu, T. Kajimoto, S. K. Goparaju, S. Jahangeer, T. Okada, S. Nakamura, *The Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 27493-27502.
- [47] W. Stoffel, G. Sticht, D. A. C. Lekim, in *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, Vol. 349*, **1968**, p. 1745.
- [48] P. P. Van Veldhoven, G. P. Mannaerts, *The Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266*, 12502-12507.
- [49] S. Pyne, N. J. Pyne, *Biochemical Journal* **2000**, *349*, 385-402.
- [50] M. Serra, J. D. Saba, *Advances in Enzyme Regulation* **2010**, *50*, 349-362.
- [51] S. R. Schwab, J. P. Pereira, M. Matloubian, Y. Xu, Y. Huang, J. G. Cyster, *Science* **2005**, *309*, 1735-1739.
- [52] H. Le Stunff, C. Peterson, H. Liu, S. Milstien, S. Spiegel, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **2002**, *1582*, 8-17.
- [53] P. Giussani, M. Maceyka, H. Le Stunff, A. Mikami, S. Lepine, E. Wang, S. Kelly, A. H. Merrill, Jr., S. Milstien, S. Spiegel, *Molecular and cellular biology* **2006**, *26*, 5055-5069.
- [54] D. Mechtcheriakova, A. Wlachos, J. Sobanov, T. Kopp, R. Reuschel, F. Bornancin, R. Cai, B. Zemann, N. Urtz, G. Stingl, G. Zlabinger, M. Woisetschlager, T. Baumruker, A. Billich, *Cell Signal* **2007**, *19*, 748-760.
- [55] H.-S. Lim, Y.-S. Oh, P.-G. Suh, S.-K. Chung, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13*, 237-240.
- [56] S. Spiegel, S. Milstien, *The Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 25851-25854.
- [57] K.-i. Uemura, A. Hara, T. Taketomi, *Journal of biochemistry* **1993**, *114*, 610-614.
- [58] V. Blot, Jacquemard, U., Reissig, H.-U., Kleuser, B., *Synthesis* **2009**, *5*, 759-766.
- [59] H. Zhang, N. N. Desai, A. Olivera, T. Seki, G. Brooker, S. Spiegel, *The Journal of Cell Biology* **1991**, *114*, 155-167.
- [60] L. C. Edsall, S. Spiegel, *Analytical biochemistry* **1999**, *272*, 80-86.
- [61] N. Murata, K. Sato, J. Kon, H. Tomura, M. Yanagita, A. Kuwabara, M. Ui, F. Okajima, *Biochemical Journal* **2000**, *352 Pt 3*, 809-815.
- [62] Y. Yatomi, Y. Igarashi, L. Yang, N. Hisano, R. Qi, N. Asazuma, K. Satoh, Y. Ozaki, S. Kume, *The Journal of Biochemistry* **1997**, *121*, 969-973.
- [63] P. Hanel, P. Andreani, M. H. Graler, *The FASEB Journal* **2007**, *21*, 1202-1209.
- [64] K. Venkataraman, Y. M. Lee, J. Michaud, S. Thangada, Y. Ai, H. L. Bonkovsky, N. S. Parikh, C. Habrukowich, T. Hla, *Circulation Research* **2008**, *102*, 669-676.

- [65] E. E. Prieschl, R. Csonga, V. Novotny, G. E. Kikuchi, T. Baumruker, *The Journal of experimental medicine* **1999**, *190*, 1-8.
- [66] C. Bode, S.-C. Sensken, U. Peest, G. Beutel, F. Thol, B. Levkau, Z. Li, R. Bittman, T. Huang, M. Tölle, M. van der Giet, M. H. Gräler, *Journal of cellular biochemistry* **2010**, *109*, 1232-1243.
- [67] R. Pappu, S. R. Schwab, I. Cornelissen, J. P. Pereira, J. B. Regard, Y. Xu, E. Camerer, Y. W. Zheng, Y. Huang, J. G. Cyster, S. R. Coughlin, *Science* **2007**, *316*, 295-298.
- [68] H. Rosen, P. J. Gonzalez-Cabrera, M. G. Sanna, S. Brown, *Annual review of biochemistry* **2009**, *78*, 743-768.
- [69] N. C. Hait, J. Allegood, M. Maceyka, G. M. Strub, K. B. Harikumar, S. K. Singh, C. Luo, R. Marmorstein, T. Kordula, S. Milstien, S. Spiegel, *Science* **2009**, *325*, 1254-1257.
- [70] J. R. Van Brocklyn, M. J. Lee, R. Menzeleev, A. Olivera, L. Edsall, O. Cuvillier, D. M. Thomas, P. J. Coopman, S. Thangada, C. H. Liu, T. Hla, S. Spiegel, *The Journal of Cell Biology* **1998**, *142*, 229-240.
- [71] H. M. Rosenfeldt, J. P. Hobson, M. Maceyka, A. Olivera, V. E. Nava, S. Milstien, S. Spiegel, *The FASEB Journal* **2001**, *15*, 2649-2659.
- [72] P. Mitra, C. A. Oskeritzian, S. G. Payne, M. A. Beaven, S. Milstien, S. Spiegel, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **2006**, *103*, 16394-16399.
- [73] M. Nagahashi, E. Y. Kim, A. Yamada, S. Ramachandran, J. C. Allegood, N. C. Hait, M. Maceyka, S. Milstien, K. Takabe, S. Spiegel, *The FASEB Journal* **2013**, *27*, 1001-1011.
- [74] R. H. Kim, K. Takabe, S. Milstien, S. Spiegel, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **2009**, *1791*, 692-696.
- [75] H. Rosen, E. J. Goetzl, *Nature Reviews Immunology* **2005**, *5*, 560-570.
- [76] M. J. Lee, J. R. Van Brocklyn, S. Thangada, C. H. Liu, A. R. Hand, R. Menzeleev, S. Spiegel, T. Hla, *Science* **1998**, *279*, 1552-1555.
- [77] H.-S. Lim, J.-J. Park, K. Ko, M.-H. Lee, S.-K. Chung, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, *14*, 2499-2503.
- [78] H. Newman, *Journal of the American Chemical Society* **1973**, *95*, 4098-4099.
- [79] K. Yanagida, T. Hla, *Annual Review of Physiology* **2017**, *79*, null.
- [80] P. Keul, M. M. G. J. van Borren, A. Ghanem, F. U. Müller, A. Baartscheer, A. O. Verkerk, F. Stümpel, J. S. Schulte, N. Hamdani, W. A. Linke, P. van Loenen, M. Matus, W. Schmitz, J. Stypmann, K. Tiemann, J. H. Ravesloot, A. E. Alewijnse, S. Hermann, L. J. A. Spijkers, K. H. Hiller, D. Herr, G. Heusch, M. Schäfers, S. L. M. Peters, J. Chun, B. Levkau, *Journal of the American Heart Association* **2016**, *5*.
- [81] A. J. Ammit, A. T. Hastie, L. C. Edsall, R. K. Hoffman, Y. Amrani, V. P. Krymskaya, S. A. Kane, S. P. Peters, R. B. Penn, S. Spiegel, R. A. Panettieri, Jr., *The FASEB Journal* **2001**, *15*, 1212-1214.
- [82] S. C. Sensken, M. H. Graler, *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* **2009**, *134*, 259-263.
- [83] W. K. Kroeze, M. F. Sassano, X.-P. Huang, K. Lansu, J. D. McCorvy, P. M. Giguere, N. Sciaky, B. L. Roth, *Nature Structural & Molecular Biology* **2015**, *22*, 362-369.
- [84] A. K. Nicole, G.-M. Silvia, C. H. Marius, L. Lothar, D. C. Andreas, G. G. Luke, G. Wolfgang, E. M. Rainer, M. Pari, H. P. P. Richard, P. S. Jay, W. Marcel, D. Henrietta, G. Uwe, H. Cornelia, N. Robert, G. P. Constantinos, K. Sabine, S. Lucinda, *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2011**, *11*, 1902-1924.
- [85] N. Young, J. R. Van Brocklyn, *The Scientific World Journal* **2006**, *6*, 946-966.
- [86] V. Brinkmann, *Pharmacology & Therapeutics* **2007**, *115*, 84-105.
- [87] M. Matloubian, C. G. Lo, G. Cinamon, M. J. Lesneski, Y. Xu, V. Brinkmann, M. L. Allende, R. L. Proia, J. G. Cyster, *Nature* **2004**, *427*, 355-360.
- [88] V. Brinkmann, M. D. Davis, C. E. Heise, R. Albert, S. Cottens, R. Hof, C. Bruns, E. Prieschl, T. Baumruker, P. Hiestand, C. A. Foster, M. Zollinger, K. R. Lynch, *The Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 21453-21457.

- [89] G. T. Kunkel, M. Maceyka, S. Milstien, S. Spiegel, *Nature Reviews Drug Discovery* **2013**, *12*, 688-702.
- [90] L. K. Ryland, T. E. Fox, X. Liu, T. P. Loughran, M. Kester, *Cancer Biology and Therapy* **2011**, *11*, 138-149.
- [91] S. Alexander, H. Alexander, *Seminars in cell & developmental biology* **2011**, *22*, 97-104.
- [92] S. M. Pitson, P. Xia, T. M. Leclercq, P. A. Moretti, J. R. Zebol, H. E. Lynn, B. W. Wattenberg, M. A. Vadas, *The Journal of experimental medicine* **2005**, *201*, 49-54.
- [93] L. C. Edsall, J. R. Van Brocklyn, O. Cuvillier, B. Kleuser, S. Spiegel, *Biochemistry* **1998**, *37*, 12892-12898.
- [94] A. P. Kozikowski, J.-P. Wu, *Tetrahedron Letters* **1990**, *31*, 4309-4312.
- [95] M. Ghoneum, L. Wang, S. Agrawal, S. Gollapudi, *In vivo (Athens, Greece)* **2007**, *21*, 251-258.
- [96] H. Symolon, A. Bushnev, Q. Peng, H. Ramaraju, S. G. Mays, J. C. Allegood, S. T. Pruett, M. C. Sullards, D. L. Dillehay, D. C. Liotta, A. H. Merrill, Jr., *Molecular cancer therapeutics* **2011**, *10*, 648-657.
- [97] E. G.-A. L. Liebeskind, D. Liotta, in *World Intellectual Property Organization, International Bureau, C07C 213/06, C07C 215/24, C07D 303/36, C07D 301/02* ed. (Ed.: P. C. T. (PCT)), USA, **2010**.
- [98] Y. Yoshimitsu, J. Miyagaki, S. Oishi, N. Fujii, H. Ohno, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 4211-4220.
- [99] N. Mulakayala, P. Rao, J. Iqbal, R. Bandichhor, S. Oruganti, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *60*, 170-186.
- [100] C. R. Strader, C. J. Pearce, N. H. Oberlies, *Journal of Natural Products* **2011**, *74*, 900-907.
- [101] J. Mazerski, S. Martelli, E. Borowski, *Acta biochimica Polonica* **1998**, *45*, 1-11.
- [102] P. O'Donovan, C. M. Perrett, X. Zhang, B. Montaner, Y.-Z. Xu, C. A. Harwood, J. M. McGregor, S. L. Walker, F. Hanaoka, P. Karran, *Science* **2005**, *309*, 1871-1874.
- [103] Z. Xu, F. Zhang, F. Sun, K. Gu, S. Dong, D. He, *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2015**, CD011076.
- [104] J. C. Lehmann, J. J. Listopad, C. U. Rentzsch, F. H. Igney, A. von Bonin, H. H. Hennekes, K. Asadullah, W. D. Docke, *Journal of Investigative Dermatology* **2007**, *127*, 835-845.
- [105] S.-K. Yang, M. Hong, J. Baek, H. Choi, W. Zhao, Y. Jung, T. Haritunians, B. D. Ye, K.-J. Kim, S. H. Park, S.-K. Park, D.-H. Yang, M. Dubinsky, I. Lee, D. P. B. McGovern, J. Liu, K. Song, *Nature Genetics* **2014**, *46*, 1017-1020.
- [106] J. F. U. Rennefahrt, F. Zipp, C. Infante-Duarte, R. Reszka, A. Hewelt, J. Kastler, G01N 33/564 ed. (Ed.: D. P.-u. Markenamt), Metalomics Health GmbH, Germany, **2012**.
- [107] B. van Ravenzwaay, G. A. Montoya, E. Fabian, M. Herold, G. Krennrich, R. Looser, W. Mellert, E. Peter, V. Strauss, T. Walk, H. Kamp, *Toxicology Letters* **2014**, *227*, 20-28.
- [108] T. F. T. Braxmeier, W. Fröhner, G. Jennings, G. Schlechtingen, C. Schroeder, H.-J. Knölker, K. Simons, M. Zerial, T. Kurzchalia, A61K 31/133, A61P 11/06, 31/12, 37/08 ed. (Ed.: P. C. T. (PCT)), **2006**.
- [109] J. Hunault, M. Diswall, J.-C. Frison, V. Blot, J. Rocher, S. Marionneau-Lambot, T. Oullier, J.-Y. Douillard, S. Guillarme, C. Saluzzo, G. Dujardin, D. Jacquemin, J. Graton, J.-Y. Le Questel, M. Evain, J. Lebreton, D. Dubreuil, J. Le Pendu, M. Pipelier, *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 1227-1241.
- [110] S. Banhart, E. M. Saied, A. Martini, S. Koch, L. Aeberhard, K. Madela, C. Arenz, D. Heuer, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2014**, *58*, 5537-5546.
- [111] C. Van Ooij, L. Kalman, S. Van Ijzendoorn, M. Nishijima, K. Hanada, K. Mostov, J. N. Engel, *Cellular Microbiology* **2000**, *2*, 627-637.
- [112] F. Mori, L. Pecorari, S. Pantano, M. E. Rossi, N. Pucci, M. De Martino, E. Novembre, *International journal of immunopathology and pharmacology* **2014**, *27*, 121-126.
- [113] A. Capmany, M. T. Damiani, *PLOS One* **2010**, *5*, e14084.

- [114] G. Furness, D. M. Graham, P. Reeve, *Journal of general microbiology* **1960**, *23*, 613-619.
- [115] T. Hackstadt, D. D. Rockey, R. A. Heinzen, M. A. Scidmore, *The EMBO journal* **1996**, *15*, 964-977.
- [116] E. M. Saied, S. Banhart, S. E. Bürkle, D. Heuer, C. Arenz, *Future Medicinal Chemistry* **2015**, *7*, 1971-1980.
- [117] V. Brinkmann, *British journal of pharmacology* **2009**, *158*, 1173-1182.
- [118] T. Fujita, K. Inoue, S. Yamamoto, T. Ikumoto, S. Sasaki, R. Toyama, K. Chiba, Y. Hoshino, T. Okumoto, *The Journal of Antibiotics (Tokyo)* **1994**, *47*, 208-215.
- [119] P. Bandhuvula, Y. Y. Tam, B. Oskouian, J. D. Saba, *The Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 33697-33700.
- [120] J. M. Wadsworth, D. J. Clarke, S. A. McMahon, J. P. Lowther, A. E. Beattie, P. R. Langridge-Smith, H. B. Broughton, T. M. Dunn, J. H. Naismith, D. J. Campopiano, *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 14276-14285.
- [121] T. Fujita, M. Yoneta, R. Hirose, S. Sasaki, K. Inoue, M. Kiuchi, S. Hirase, K. Adachi, M. Arita, K. Chiba, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1995**, *5*, 847-852.
- [122] N. Matsumoto, R. Hirose, S. Sasaki, T. Fujita, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* **2008**, *56*, 595-597.
- [123] X. Lu, R. Bittman, *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 825-827.
- [124] S. Kim, H. Lee, M. Lee, T. Lee, *Synthesis* **2006**, *2006*, 753-755.
- [125] Y. Hisano, N. Kobayashi, A. Kawahara, A. Yamaguchi, T. Nishi, *The Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 1758-1766.
- [126] R. Albert, K. Hinterding, V. Brinkmann, D. Guerini, C. Muller-Hartweg, H. Knecht, C. Simeon, M. Streiff, T. Wagner, K. Welzenbach, F. Zecri, M. Zollinger, N. Cooke, E. Francotte, *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 5373-5377.
- [127] V. Brinkmann, J. G. Cyster, T. Hla, *American Journal of Transplantation* **2004**, *4*, 1019-1025.
- [128] M. G. Sanna, S. K. Wang, P. J. Gonzalez-Cabrera, A. Don, D. Marsolais, M. P. Matheu, S. H. Wei, I. Parker, E. Jo, W. C. Cheng, M. D. Cahalan, C. H. Wong, H. Rosen, *Nature chemical biology* **2006**, *2*, 434-441.
- [129] S. Mandala, R. Hajdu, J. Bergstrom, E. Quackenbush, J. Xie, J. Milligan, R. Thornton, G. J. Shei, D. Card, C. Keohane, M. Rosenbach, J. Hale, C. L. Lynch, K. Rupprecht, W. Parsons, H. Rosen, *Science* **2002**, *296*, 346-349.
- [130] Singer, II, M. Tian, L. A. Wickham, J. Lin, S. S. Matheravidathu, M. J. Forrest, S. Mandala, E. J. Quackenbush, *The Journal of Immunology* **2005**, *175*, 7151-7161.
- [131] J. A. Cohen, F. Barkhof, G. Comi, H. P. Hartung, B. O. Khatri, X. Montalban, J. Pelletier, R. Capra, P. Gallo, G. Izquierdo, K. Tiel-Wilck, A. de Vera, J. Jin, T. Stites, S. Wu, S. Aradhye, L. Kappos, *The New England journal of medicine* **2010**, *362*, 402-415.
- [132] L. Kappos, E. W. Radue, P. O'Connor, C. Polman, R. Hohlfeld, P. Calabresi, K. Selmaj, C. Agoropoulou, M. Leyk, L. Zhang-Auberson, P. Burtin, *The New England journal of medicine* **2010**, *362*, 387-401.
- [133] L. D. Serpero, G. Filaci, A. Parodi, F. Battaglia, F. Kalli, D. Brogi, G. L. Mancardi, A. Uccelli, D. Fenoglio, *Journal of Neuroimmune Pharmacology* **2013**, *8*, 1106-1113.
- [134] H. Xu, Y. Jin, H. Ni, S. Hu, Q. Zhang, *Circulation Journal* **2014**, *78*, 2979-2986.
- [135] Z. Yang, M. Chen, L. B. Fialkow, J. D. Ellett, R. Wu, V. Brinkmann, J. L. Nadler, K. R. Lynch, *Clinical Immunology* **2003**, *107*, 30-35.
- [136] S. M. Camp, E. T. Chiang, C. Sun, P. V. Usatyuk, R. Bittman, V. Natarajan, J. G. N. Garcia, S. M. Dudek, *Chemistry and Physics of Lipids* **2015**, *191*, 16-24.
- [137] M. G. Sanna, J. Liao, E. Jo, C. Alfonso, M. Y. Ahn, M. S. Peterson, B. Webb, S. Lefebvre, J. Chun, N. Gray, H. Rosen, *The Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 13839-13848.
- [138] T. Bär, B. Kratzer, R. Wild, K. Sandhoff, R. R. Schmidt, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1993**, *1993*, 419-426.
- [139] G. van Echten-Deckert, A. Zschoche, T. Bär, R. R. Schmidt, A. Raths, T. Heinemann, K. Sandhoff, *The Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 15825-15833.

- [140] G. van Echten-Deckert, A. Schick, T. Heinemann, B. Schnieders, *The Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 23585-23589.
- [141] M. ter Braak, R. F. Claas, B. Hegen, S. Labocha, N. Ferreirós, J. Pfeilschifter, A. Huwiler, G. van Echten-Deckert, D. Meyer zu Heringdorf, *Biochemical Pharmacology* **2011**, *81*, 617-625.
- [142] D. Shapiro, K. Segal, *Journal of the American Chemical Society* **1954**, *76*, 5894-5895.
- [143] C. A. Grob, F. Gadiant, *Helvetica Chimica Acta* **1957**, *40*, 1145-1157.
- [144] R. M. Devant, *Kontakte* **1992**, *3*, 11-28.
- [145] E. J. Reist, P. H. Christie, *The Journal of Organic Chemistry* **1970**, *35*, 3521-3524.
- [146] R. R. Schmidt, P. Zimmermann, *Tetrahedron Letters* **1986**, *27*, 481-484.
- [147] P. Zimmermann, R. R. Schmidt, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1988**, *1988*, 663-667.
- [148] R. Julina, T. Herzig, B. Bernet, A. Vasella, *Helvetica Chimica Acta* **1986**, *69*, 368-373.
- [149] C. Siciliano, A. Barattucci, P. Bonaccorsi, M. L. Di Gioia, A. Leggio, L. Minuti, E. Romio, A. Temperini, *The Journal of Organic Chemistry* **2014**, *79*, 5320-5326.
- [150] K. C. Nicolaou, T. Caulfield, H. Kataoka, T. Kumazawa, *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 7910-7912.
- [151] U. Groth, U. Schöllkopf, T. Tiller, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2835-2842.
- [152] A. Solladie-Cavallo, J. L. Koessler, *The Journal of Organic Chemistry* **1994**, *59*, 3240-3242.
- [153] T. Oguri, N. Kawai, T. Shioiri, S. Yamada, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1978**, *26*, 803-808.
- [154] S. D. L. Guilloneau, O. Guerret, (Ed.: P. C. T. (PCT)), M2I Development, France, **2016**.
- [155] P. Garner, *Tetrahedron Letters* **1984**, *25*, 5855-5858.
- [156] P. Garner, J. M. Park, E. Malecki, *The Journal of Organic Chemistry* **1988**, *53*, 4395-4398.
- [157] P. Garner, S. Ramakanth, *The Journal of Organic Chemistry* **1986**, *51*, 2609-2612.
- [158] S. Bera, D. Mondal, M. Singh, R. K. Kale, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 969-1011.
- [159] H.-E. Radunz, R. M. Devant, V. Eiermann, *Liebigs Annalen der Chemie* **1988**, *1988*, 1103-1105.
- [160] P. Herold, *Helvetica Chimica Acta* **1988**, *71*, 354-362.
- [161] P. Garner, J. M. Park, *The Journal of Organic Chemistry* **1988**, *53*, 2979-2984.
- [162] T. Murakami, K. Furusawa, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 9257-9263.
- [163] H. Yang, L. S. Liebeskind, *Organic Letters* **2007**, *9*, 2993-2995.
- [164] T. Yamamoto, H. Hasegawa, T. Hakogi, S. Katsumura, *Organic Letters* **2006**, *8*, 5569-5572.
- [165] C. Peters, A. Billich, M. Ghobrial, K. Högenauer, T. Ullrich, P. Nussbaumer, *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, *72*, 1842-1845.
- [166] Y.-T. Chang, J. Choi, S. Ding, E. E. Prieschl, T. Baumruker, J.-M. Lee, S.-K. Chung, P. G. Schultz, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 1856-1857.
- [167] A. El-Dahshan, S. I. Al-Gharabli, S. Radetzki, T. H. Al-Tel, P. Kumar, J. Rademann, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2014**, *22*, 5506-5512.
- [168] A. Alcaide, A. Llebaria, *The Journal of Organic Chemistry* **2014**, *79*, 2993-3029.
- [169] C. Arenz, D. Proksch, Vol. WO/2012/150292, C07C215/24; C07D263/06; C07D309/12; C07F9/38 ed. (Ed.: P. C. T. (PCT)), Humboldt-Universität zu Berlin, Germany, **2012**.
- [170] K. P. Bhabak, A. Hauser, S. Redmer, S. Banhart, D. Heuer, C. Arenz, *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* **2013**, *14*, 1049-1052.
- [171] K. E. Sapsford, L. Berti, I. L. Medintz, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 4562-4589.
- [172] G. Gryniewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien, *The Journal of Biological Chemistry* **1985**, *260*, 3440-3450.
- [173] M. Brini, L. Fedrizzi, E. Carafoli, T. P. Begley, in *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, John Wiley & Sons, Inc., **2007**.

- [174] M. J. Berridge, P. Lipp, M. D. Bootman, *Nature reviews. Molecular cell biology* **2000**, *1*, 11-21.
- [175] D. Meyer Zu Heringdorf, *Journal of cellular biochemistry* **2004**, *92*, 937-948.
- [176] L. M. DiPilato, J. Zhang, T. P. Begley, in *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, John Wiley & Sons, Inc., **2007**.
- [177] G. Barnea, W. Strapps, G. Herrada, Y. Berman, J. Ong, B. Kloss, R. Axel, K. J. Lee, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105*, 64-69.
- [178] S. T. Smale, *Cold Spring Harbor protocols* **2010**, *2010*, pdb prot5421.
- [179] P. Garner, J. M. Park, *The Journal of Organic Chemistry* **1987**, *52*, 2361-2364.
- [180] Z. Li, F. Ke, H. Deng, H. Xu, H. Xiang, X. Zhou, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 2943-2946.
- [181] N. Baig R. B, C. K. Kanimozhi, V. Sai Sudhir, S. Chandrasekaran, *Synlett* **2009**, *2009*, 1227-1232.
- [182] G. Han, M. Tamaki, V. J. Hruby, *The Journal of Peptide Research* **2001**, *58*, 338-341.
- [183] J. M. Hoover, S. S. Stahl, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 16901-16910.
- [184] S. L. Kyung Hoon Min, Hwa Soon Kim, and Young-Ger Suh, *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2010**, *31*, 1501-1505.
- [185] J. D. More, N. S. Finney, *Organic Letters* **2002**, *4*, 3001-3003.
- [186] M. Frigerio, M. Santagostino, S. Sputore, *The Journal of Organic Chemistry* **1999**, *64*, 4537-4538.
- [187] K. Moriyama, M. Takemura, H. Togo, *The Journal of Organic Chemistry* **2014**, *79*, 6094-6104.
- [188] K. Moughamir, B. Mezgueldi, A. Atmani, H. Mestdagh, C. Rolando, *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 59-62.
- [189] H. Neumann, D. Seebach, *Tetrahedron Letters* **1976**, *17*, 4839-4842.
- [190] D. F. Aycock, *Organic Process Research & Development* **2006**, *11*, 156-159.
- [191] P. Nussbaumer, P. Etmayer, C. Peters, D. Rosenbeiger, K. Hogenauer, *Chemical Communications* **2005**, *0*, 5086-5087.
- [192] I. C. Stewart, C. J. Douglas, R. H. Grubbs, *Organic Letters* **2008**, *10*, 441-444.
- [193] F. A. H. Al-Qallaf, R. A. W. Johnstone, J.-Y. Liu, L. Lu, D. Whittaker, *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 2* **1999**, *0*, 1421-1424.
- [194] M. E. Jung, M. A. Lyster, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1978**, 315-316.
- [195] G. A. Olah, S. C. Narang, *Tetrahedron* **1982**, *38*, 2225-2277.
- [196] X. Zhang, W. A. van der Donk, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 2212-2213.
- [197] K. D. Park, P. Morieux, C. Salomé, S. W. Cotten, O. Reamtong, C. Eyers, S. J. Gaskell, J. P. Stables, R. Liu, H. Kohn, *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52*, 6897-6911.
- [198] M. Kurosu, K. Li, *Organic Letters* **2009**, *11*, 911-914.
- [199] E. D. Goddard-Borger, R. V. Stick, *Organic Letters* **2007**, *9*, 3797-3800.
- [200] F.-Y. Dupradeau, S.-i. Hakomori, T. Toyokuni, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1995**, 221-222.
- [201] I. Ojima, E. S. Vidal, *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63*, 7999-8003.
- [202] G. M. Nicholas, T. F. Molinski, *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 4011-4019.
- [203] C. Solorzano, F. Antonietti, A. Duranti, A. Tontini, S. Rivara, A. Lodola, F. Vacondio, G. Tarzia, D. Piomelli, M. Mor, *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53*, 5770-5781.
- [204] A. D. Campbell, T. M. Raynham, R. J. K. Taylor, *Synthesis* **1998**, *1998*, 1707-1709.
- [205] B. Schmidt, S. Hauke, *Organic and Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 4194-4206.
- [206] S. H. Hong, M. W. Day, R. H. Grubbs, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 7414-7415.
- [207] S. Fustero, M. Sánchez-Roselló, D. Jiménez, J. F. Sanz-Cervera, C. del Pozo, J. L. Aceña, *The Journal of Organic Chemistry* **2006**, *71*, 2706-2714.

- [208] B. R. Galan, K. P. Kalbarczyk, S. Szczepankiewicz, J. B. Keister, S. T. Diver, *Organic Letters* **2007**, *9*, 1203-1206.
- [209] B. Martín-Matute, K. Bogár, M. Edin, F. B. Kaynak, J.-E. Bäckvall, *Chemistry – A European Journal* **2005**, *11*, 5832-5842.
- [210] R. C. van der Drift, M. Gagliardo, H. Kooijman, A. L. Spek, E. Bouwman, E. Drent, *Journal of Organometallic Chemistry* **2005**, *690*, 1044-1055.
- [211] A. Blencowe, A. M. Celli, D. Donati, W. C. Hayes, C. Martin, P. J. Murphy, F. Ponticelli, J. K. Melville-Richards, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 3858-3862.
- [212] T. Yoshimitsu, N. Fukumoto, T. Tanaka, *The Journal of Organic Chemistry* **2009**, *74*, 696-702.
- [213] D. Grée, L. Vallerie, R. Grée, L. Toupet, I. Washington, J.-P. Pelicier, M. Villacampa, J. M. Pérez, K. N. Houk, *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66*, 2374-2381.
- [214] T. Liang, C. N. Neumann, T. Ritter, *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52*, 8214-8264.
- [215] V. P. Prasad, S. Wagner, P. Keul, S. Hermann, B. Levkau, M. Schäfers, G. Haufe, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2014**, *22*, 5168-5181.
- [216] R. S. Shaikh, S. S. Schilson, S. Wagner, S. Hermann, P. Keul, B. Levkau, M. Schäfers, G. Haufe, *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *58*, 3471-3484.
- [217] Z. Zhang, F. Wang, X. Mu, P. Chen, G. Liu, *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52*, 7549-7553.
- [218] V. Evans, M. F. Mahon, R. L. Webster, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 7593-7597.
- [219] J. Ichihara, T. Matsuo, T. Hanafusa, T. Ando, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1986**, 793-794.
- [220] J. Ichihara, Y. Takai, T. Hanafusa, K. Tomioka, *Journal of Fluorine Chemistry* **1995**, *71*, 131-133.
- [221] <http://chematsci.blog.fc2.com/blog-entry-3.html>, **05.10.2015**, **11:43**.
- [222] M. Kadirvel, F. Fanimarvasti, S. Forbes, A. McBain, J. M. Gardiner, G. D. Brown, S. Freeman, *Chemical Communications* **2014**, *50*, 5000-5002.
- [223] S. Son, G. C. Fu, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 2756-2757.
- [224] L. De Luca, G. Giacomelli, A. Porcheddu, *Organic Letters* **2002**, *4*, 553-555.
- [225] T. Blom, J. P. Slotte, S. M. Pitson, K. Tornquist, *Cell Signal* **2005**, *17*, 827-836.
- [226] K. Lichte, R. Rossi, K. Danneberg, M. ter Braak, U. Kurschner, K. H. Jakobs, B. Kleuser, D. Meyer zu Heringdorf, *Journal of Investigative Dermatology* **2008**, *128*, 1487-1498.
- [227] F. Bourquin, G. Capitani, M. G. Grütter, *Protein Science : A Publication of the Protein Society* **2011**, *20*, 1492-1508.
- [228] M. Ghoneum, N. K. Badr El-Din, E. Noaman, L. Tolentino, *Cancer Immunology, Immunotherapy* **2008**, *57*, 581-592.
- [229] M. Ghoneum, M. Matsuura, M. Braga, S. Gollapudi, *International journal of oncology* **2008**, *33*, 533-539.
- [230] K. A. D. D. K. Mohapatra, *ARKIVOC* **2005**, 20-28.
- [231] J. J. Topczewski, T. J. Tewson, H. M. Nguyen, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 19318-19321.
- [232] J. Zheng, B. Yin, W. Huang, X. Li, H. Yao, Z. Liu, J. Zhang, S. Jiang, *Tetrahedron Letters* **2009**, *50*, 5094-5097.
- [233] K. M. Lassen, J. Lee, M. M. Joullié, *Tetrahedron Letters* **2010**, *51*, 1635-1638.
- [234] J. Linder, T. P. Garner, H. E. Williams, M. S. Searle, C. J. Moody, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 1044-1051.
- [235] D. Channe Gowda, K. Abiraj, P. Augustine, *Letters in Peptide Science* **2002**, *9*, 43-47.

## B Abkürzungsverzeichnis

(Fura-2)-AM	Fura-2-Acetoxy-methylester
2,2-DMP	2,2-Dimethoxypropan
Ac	Acetyl
ADP	Adenosin-triphosphat
ANOVA	einfache Varianzanalyse, engl. <i>analysis of variance</i>
Äq.	Äquivalent(e)
ATP	Adenosin-triphosphat
ATP-(NMR)	engl. <i>attached proton test</i> -(NMR)
BCL2	engl. <i>B-cell lymphoma 2</i> (homologe Domäne)
Bhoc	Benzhydryloxy-carbonyl-
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxy-carbonyl-(Schutzgruppe)
BODIPY	Bordipyromethen
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C1P	Ceramid-1-phosphat
cal.	kalkuliert
Cbz	Benzoyloxy-carbonyl-(Schutzgruppe)
CDase(n)	Ceramidase(n)
Cer	Ceramid
CerK	Ceramidkinase
CerP	Ceramidphosphatase
CerS	Ceramidsynthase
CERT	Ceramidtransportprotein
d	Tag(e)
DAST	Diethylaminoschwefeltrifluorid
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DIBAL-H	<i>Di</i> isobutylaluminiumhydrid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMEM	Dulbecco-modifiziertes Eagle-Medium
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMS	<i>N,N</i> -Dimethylsphingosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EB	Elementarkörper
EC	Endothelzellen
EDC·HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid-hydrochlorid
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	engl. <i>extracellular-signal regulated kinase</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	lat. und andere
EtOAc	Essigsäureethylester
FCS	fötales Kälberserum
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl-(Schutzgruppe)
gef.	gefunden
GluCDase	Glycosylceramidase
GluCerS	Glycosylceramidsynthase
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren, engl. <i>G-protein-coupled receptors</i>
G-Proteine-	Guanin-Nukleotide-bindende Proteine
GSL	Glycosphingolipide
GTP	Grün fluoreszierendes Protein
GTPase(n)	Guanosin-triphosphatase(n)
h	Stunde(n)
HDAC	Histonacetylase

HDL	Lipoprotein hoher Dichte, engl. <i>high density lipoprotein</i>
HMPA	Hexamethylphosphorsäuretriamid
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Ultrahochleistungsflüssigkeits-chromatographie
HRMS	hochaufgelöste Massenspektrometrie
IBX	2-Iodoxybenzoesäure
kDa	Kilodalton
LPA	Lysophosphatidsäure
LPP	Lipidphosphatphosphatase(n)
Me	Methyl
Me-THF	Methyltetrahydrofuran
min	Minute(n)
Ms	Mesyl
MS	Multiple Sklerose oder Massenspektrometrie
NBD	Nitrobenzoxadiazol
NMR	kernmagnetische Resonanzspektroskopie
OSu	O-Succinimid
OTf	Triflat
Ph	Phenyl
Phth	Phthaloyl-(Schutzgruppe)
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PLP	Pyridoxal-5'-phosphat
PMB	<i>para</i> -Methoxybenzyl-(Schutzgruppe)
ppm	engl. <i>parts per million</i>
PRESTO-	engl. Parallel Receptorome Expression and Screening via Transcriptional Output
<i>p</i> TsOH	<i>para</i> -Toluensulfonsäure
quant.	quantitativ
RB	Retikularkörper
RBL	engl. <i>rat basophilic leukaemia</i> , Zelllinie
Rf	engl. <i>ration of fronts</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RP18	Umkehrphase C18, engl. <i>reverse phase</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
S1P	Sphingosin-1-phosphat
S1PL	Sphingosin-1-phosphat-Lyase
SAP	Sphingolipid-Aktivierungsprotein
SAR	Struktur-Wirkungsbeziehung, engl. <i>structure activity relationship</i>
SG	Schutzgruppe(n)
SMase(n)	Sphingomyelinase(n)
SMS	Sphingomyelinsynthase
Sph	Sphingosin
SphK	Sphingosinkinase
Spns2	Transportprotein Spinster 2
SPP	Sphingosin-1-phosphat-Phosphatase(n)
SPT	Serinpalmitoyltransferase
T	Temperatur
Tango-Assay	Assay mit transkriptionaler Aktivierung und darauffolgender Arrestin-Translokation
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl-(Schutzgruppe)
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl-(Schutzgruppe)
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMEDA	Tetramethylethyldiamin
TMGA	Tetramethylguanidiniumazid
TMS-I	Trimethylsilyliodid
u. a.	und andere

UPLC	Ultrahochleistungsflüssigkeits-chromatographie
XTal-Fluor-E®	Diethylaminodifluorosulfonium-tetrafluorborat
ZNS	zentrales Nervensystem
$\lambda$	Wellenlänge



## **C            Selbständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, Alexandra Klose-Stier, die vorliegende Dissertation selbständig erarbeitet und verfasst zu haben. Es wurden keine weiteren Quellen und Hilfsmittel verwendet, als hier angegeben.

Berlin, den

-----  
(Unterschrift)



## **D            Publikationsliste**

Diese Arbeit wurde bisher weder im Ganzen noch zum Teil veröffentlicht.



## E Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Christoph Arenz für die Möglichkeit an einer sehr aktuellen und fachübergreifenden wissenschaftlichen Fragestellung zu arbeiten. Besonders wertvoll waren für mich Ihre konstruktiven Anregungen und Hinweise, die mich stets motiviert und auch persönlich weiter gebracht haben, sowie die mir gegebene Gelegenheit zur Selbstentfaltung.

Ich danke jedem einzelnen Mitglied der Arbeitsgruppe für das angenehme Arbeitsklima, moralische sowie fachliche Unterstützung und Kollegialität. Dr. Christiane Schöniger, Christian Kimmich, Fabian Voigt, Essa M. Saied und Thomas Pinkert bin ich besonders dankbar. Von ganz besonderem Wert ist für mich die mehr als 10-jährige Freundschaft mit Christiane, die über den Arbeitsalltag hinaus besteht.

An dieser Stelle möchte ich mich beim gesamten Institut der Chemie bedanken, denn ich konnte jeden Mitarbeiter, egal ob Doktorand, wissenschaftlicher oder technischer Angestellter, immer um Hilfe und Rat bitten. Dabei möchte ich Prof. Dr. Rainer Mahrwald, Dr. Michael Pätzelt, Lutz Pospisil, Heidi Kossack und Marie-Louise Wind gesondert danken. In diesem Zusammenhang danke ich auch herzlich den Mitarbeitern der NMR- und Massen-Serviceabteilung, Dipl.-Ing. Angela Thiesies, Katharina Pfaff und Angelika Woyda, für die stetige Unterstützung beim Messen unzähliger Proben.

Ein großer Dank richtet sich an Prof. Dr. Dagmar Meyer zu Heringdorf und Anh-Tuan Sebastian Martin (Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, Frankfurt am Main) für die angenehme Zusammenarbeit und die Durchführung des Desensibilisierungs- und des Rezeptorinternalisierungsassays für meine Verbindungen. Des Weiteren danke ich Dr. Dagmar Heuer und Sophia Edelmann (Robert-Koch-Institut, Berlin) für die Messung der konfokalen Spektroskopie für das NBD-markierte Derivat.

Meiner großen Familie, insbesondere meiner Mama und Schwester, danke ich vom ganzen Herzen für das Verständnis, das Vertrauen und die Ermutigung.

Den größten Dank möchte ich meinem Mann Ben Klose für seine bedingungslose Unterstützung während des gesamten Studiums und der Promotion aussprechen. Denn „vollkommen egal für was wir uns beide entscheiden, wir machen es zu Zweit.“