

Ein einfacher Zugang zu cyclischen photoaktivierbaren Tubulysin-Derivaten**

Judith Hoffmann und Uli Kazmaier*

Abstract: Die Entwicklung einer neuen photolabilen Schutzgruppe mit integrierter Alleleinheit ermöglicht die Synthese cyclischer photoaktivierbarer Naturstoffderivate. Die Cyclisierung erfolgt dabei über die Alleleinheit der Schutzgruppe und eine zweite Doppelbindung durch Ringschlussmetathese. Die so induzierte Konformationsänderung soll zum einen die biologische Aktivität des Naturstoffs verringern, und durch die Cyclisierung soll gleichzeitig seine metabolische Stabilität erhöht werden. Photochemische Ringöffnung bewirkt schließlich eine Aktivierung des Wirkstoffs. Am Beispiel von Tubulysin-Derivaten wird gezeigt, wie in nur zwei Stufen ausgehend von einfachen Bausteinen durch Ugi-Reaktion und Ringschlussmetathese cyclische photoaktivierbare Wirkstoffe hergestellt werden können. Die photolabile Schutzgruppe wird dabei über die Isocyanid-Komponente während der Ugi-Reaktion eingeführt.

Seit dem Altertum wird Licht zur Behandlung von Hauterkrankungen eingesetzt. Bereits im alten Ägypten fand Psoralen^[1] Anwendung in der UV-Therapie, ein Verfahren, das heute als PUVA-Therapie („Psoralen + UVA“) bekannt ist.^[2] Psoralen, oder das zumeist verwendete 8-Methoxypsoralen, steigern dabei die Empfindlichkeit der Haut gegenüber der UV-Strahlung, was die Effizienz der Lichttherapie erhöht.^[3] Eine alternative Phototherapie, die photodynamische Therapie, kombiniert die UV-Bestrahlung mit der Verabreichung von Porphyrin-Derivaten als Photosensibilisatoren und findet vorwiegend Anwendung in der Tumorthherapie.^[4] Ein sehr modernes Forschungsgebiet ist der Einsatz von Photoschaltern, mit deren Hilfe sich die Konformation von Molekülen durch Belichtung ändern lässt.^[5] Mit Abstand die breiteste Anwendung finden hierbei Azobenzol-Derivate,^[6] jedoch kommen auch andere photoschaltbare Linker-Einheiten, wie etwa 1,2-Dithienylalkene, zum Einsatz.^[7] Durch lichtinduzierte Konformationsänderung lassen sich so zum Beispiel Ionenkanäle öffnen und schließen,^[8] und bei Wirk-

stoffen lässt sich deren Affinität zu ihrem Rezeptor manipulieren.^[9] Neben diesen medizinischen Anwendungen finden photoaktivierbare Verbindungen auch Anwendung in der Zellbiologie.^[10] Hierbei werden Wirkmoleküle durch Modifizierung mit einer photolabilen Gruppe deaktiviert,^[11] und erst bei Belichtung wird der eigentliche Wirkstoff in der Zelle freigesetzt.^[12] Dieses Verfahren findet z.B. Anwendung bei der Freisetzung von Neurotransmittern^[13] und Hormonen.^[14] Eine der ersten Anwendungen war die photolytische Freisetzung von ATP.^[15]

Eine ganze Reihe von photospaltbaren Gruppen kommt für solche Anwendungen in Frage,^[10a,11] wobei der *o*-Nitrobenzyl(NB)-Schutzgruppe eine dominierende Stellung zukommt (Abbildung 1), obwohl der bei der Photospaltung

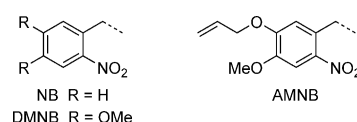


Abbildung 1. Photospaltbare Schutzgruppen.

gebildete *o*-Nitrosobenzaldehyd in zellulären Systemen zu Schädigungen führen kann.^[16] Die Einführung zweier Methoxygruppen (DMNB) verringert zwar die Quantenausbeute, verschiebt aber das Absorptionsmaximum zu größeren Wellenlängen (365 nm), was die DMNB-Schutzgruppe nahezu optimal für biologische Anwendungen macht.^[17]

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich seit Jahren mit der Synthese peptidischer Naturstoffe.^[18] Eine besonders interessante Verbindungsklasse sind dabei die Tubulysin-Derivate, vor allem Prä-tubulysin, eine biosynthetische Vorstufe des Tubulysins (Abbildung 2), welches das Wachstum einer Reihe von Tumorzellen im niederen nanomolaren Bereich hemmt.^[19] Prä-tubulysin wechselwirkt wie die Tubulysine mit

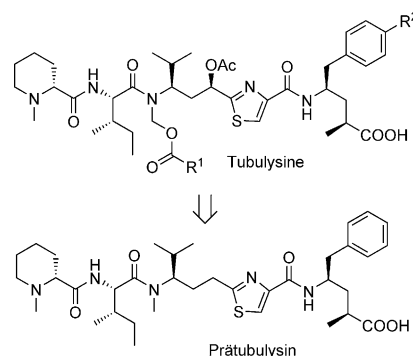


Abbildung 2. Tubulysine und Prä-tubulysin.

[*] J. Hoffmann, Prof. Dr. U. Kazmaier
Institut für Organische Chemie, Universität des Saarlandes
Postfach 151150, 66041 Saarbrücken (Deutschland)
E-Mail: u.kazmaier@mx.uni-saarland.de
Homepage: <http://www.uni-saarland.de/fak8/kazmaier>

[**] Diese Arbeiten wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt (FOR 1406, Ka880/10-1/2). J.H. dankt der Studienstiftung des deutschen Volkes für ein Promotionsstipendium. Ganz herzlich bedanken wir uns bei J. Herrmann und V. Schmitt vom Arbeitskreis R. Müller (Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland) für die Bestimmung der biologischen Aktivitäten.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201405650> zu finden.

dem Mikrotubuli-Skelett^[20] und inhibiert die Angiogenese,^[21] ist somit also ein guter Kandidat für die Entwicklung von Antitumorwirkstoffen.^[22] Studien zur Struktur-Wirkungs-Beziehung (SAR) ergaben, dass von Prä tubulysin abgeleitete Ester um den Faktor 3–6 mal weniger aktiv sind als Prä tubulysin, Amide um den Faktor 10–20 (je nach Derivat). Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Verbindungen als Prodrugs wirken könnten.

Wir waren nun daran interessiert, das Konzept der Photoaktivierung von Wirkstoffen für die gezielte Tumorthherapie von leicht zugänglichen Tumorarten wie etwa Haut- oder Darmkrebs zu nutzen. Dazu wollten wir Prä tubulysin in „inaktive“ Prodrugs (Abbildung 3) umwandeln, die sich durch

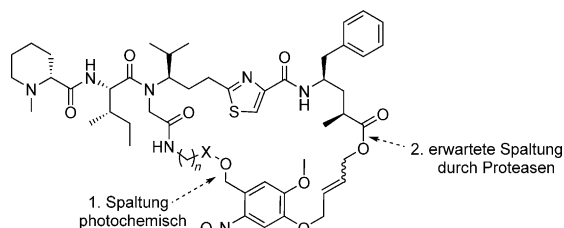
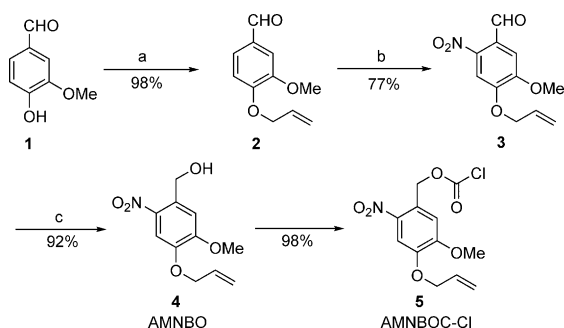


Abbildung 3. Photospaltbare Prä tubulysin-Derivate.

Belichten aktivieren lassen. Die Prä tubulysin-Derivate unterscheiden sich von den Tubulysinen vor allem im Fehlen der N-Acylal-Seitenkette. Also sollte es möglich sein, an dieser Position photolabile Seitenketten einzuführen, die zudem in der Lage sind, das Molekül durch Cyclisierung mit einem geeigneten C-terminalen Ester in eine Konformation zu bringen, die nicht, oder nur sehr schlecht, am biologischen Angriffspunkt bindet. Durch Belichten würde dann der Cyclus gespalten, und das Molekül könnte wieder seine natürliche Konformation einnehmen. Die photolabile Schutzgruppe wäre dann noch als Ester am Prä tubulysin gebunden, der idealerweise durch Proteasen zum freien Wirkstoff gespalten werden könnte.

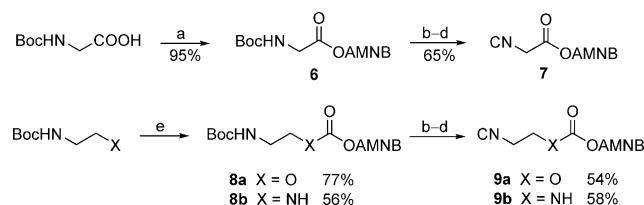
Aufgrund unserer bisherigen guten Erfahrungen mit Ringschlussmetathesen zur Peptidcyclisierung^[23] entwickelten wir eine kurze Syntheseroute zur metathesierbaren 4-Allyloxy-5-methoxy-3-nitrobenzyl (AMNB)-Schutzgruppe (Abbildung 1), ausgehend von Vanillin (**1**, Schema 1). Wäh-



Schema 1. Synthese metathesierbarer photolabiler Schutzgruppen: a) Allylbromid, K_2CO_3 , EtOH, 78 °C, 16 h; b) KNO_3 (1.0 Äquiv.), CF_3COOH , RT, 16 h; c) $NaBH_4$, EtOH, RT, 4 h; d) $COCl_2$ (20% in Toluol, 10 Äquiv.), THF, RT, 2 h.

rend die O-Allylierung^[24] von **1** quantitativ verlief, bereitete die anschließende Nitrierung Schwierigkeiten aufgrund der Bildung diverser Nebenprodukte. Die Verwendung von exakt 1 Äquiv. KNO_3 in Trifluoressigsäure ergab schließlich das gewünschte Produkt **3** in guter Ausbeute und Reinheit. Reduktion des Aldehyds lieferte den photolabilen Benzylalkohol AMNB (**4**), der direkt für die Schützung von Carbonsäuren eingesetzt werden kann. Zur Herstellung der entsprechenden Carbonat/Carbamat-Schutzgruppe wurde AMNB 2 h mit einem Überschuss Phosgen gerührt. Nach Entfernen des Phosgen-Überschusses konnte der entsprechende Chlorameisensäureester AMNBOC-Cl (**5**) in reiner Form und nahezu quantitativer Ausbeute erhalten werden. Dieses Säurechlorid ist zwar hoch reaktiv und hydrolyseempfindlich, lässt sich jedoch im Kühlschrank problemlos für einige Wochen ohne merkliche Zersetzung lagern.

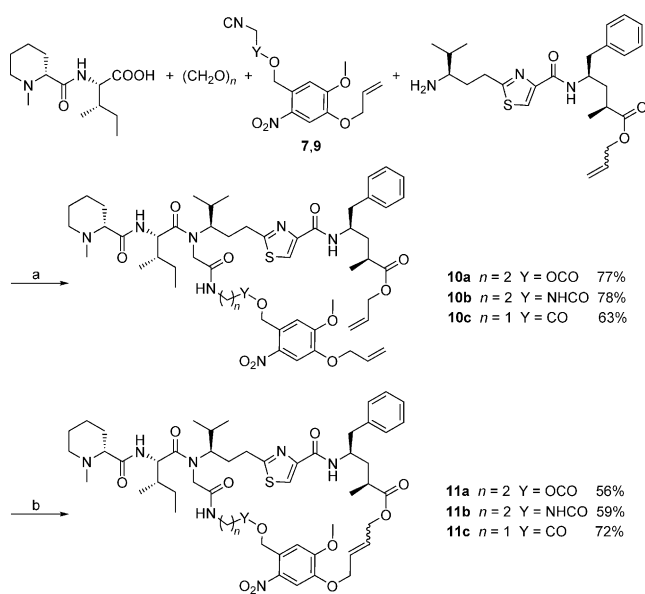
Während die Synthese von Tubulysin-Derivaten mit einer zentralen N-Methylamid-Bindung, wie etwa bei Prä tubulysin, problemlos gelingt,^[25] ist die Synthese anderer N-substituierter Derivate aufgrund sterischer Hinderung nicht trivial.^[26] Ein interessantes Konzept zum Aufbau N-substituierter Tubulysine, basierend auf Ugi-Reaktionen, stellten unlängst Wessjohann et al. vor.^[27] Die von ihnen als Tubugis bezeichneten Produkte zeigten exzellente biologische Aktivitäten, vergleichbar mit denen der Naturstoffe. Die Struktur der Tubulysin-Seitenkette wurde dabei durch die Struktur des verwendeten Isocyanids festgelegt. Dieses Konzept wollten wir nun auch zum Aufbau photoaktivierbarer Tubulysin-Derivate verwenden, indem wir die photolabile Schutzgruppe über das Isocyanid in die Seitenkette der Tubulysin-Derivate einführen. Die natürlichen Tubulysine unterscheiden sich in erster Linie in der Art der aliphatischen Acylal-Seitenketten. Um nun dort eine photolabile Schutzgruppe anzubringen, bedarf es einer Heterofunktionalität. Da bisher nicht bekannt ist, welche Funktionalitäten in dieser Seitenkette toleriert werden, entschlossen wir uns, neben einer OH-Gruppe auch entsprechend geschützte Amin- und Säurefunktionalitäten einzuführen. Die Synthese der hierfür benötigten Isocyanide ist in Schema 2 dargestellt. Das photoaktive, geschützte Säurederivat **7** konnte direkt ausgehend von **4** und Boc-Gly-OH über Standardtransformationen erhalten werden. Der einzige kritische Schritt war die Isocyanidbildung. Hier konnte bei 0 °C nach 1 h kein vollständiger Umsatz erreicht werden, die Gesamtausbeute über alle Stufen war mit 65 % dennoch akzeptabel. Verlängerung der Reaktionszeit und



Schema 2. Synthese photolabiler Isocyanide: a) **4**, TBTU [O-(Benzo-triazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat] (1.3 Äquiv.), DMAP (0.3 Äquiv.), DIPEA (2.0 Äquiv.), CH_2Cl_2 , RT, 16 h; b) 4 m HCl/Dioxan, CH_2Cl_2 , RT, 2 h; c) $HCOOEt$, NEt_3 , TsOH (kat.), 52 °C, 20 h; d) $POCl_3$ (1.0 Äquiv.), NEt_3 (3.0 Äquiv.), CH_2Cl_2 , 0 °C, 1 h; e) **5**, Pyridin (1.0 Äquiv.), THF, RT, 20 h.

Erhöhung der Reaktionstemperatur führte zu schlechteren Ausbeuten. Die Isocyanide mit photolabiler Carbamat- und Carbonat-Schutzgruppe (**9a** und **9b**) wurden analog hergestellt, wobei unter komplettem Feuchtigkeitsausschluss gearbeitet werden musste. Zur Synthese der Referenzsubstanzen wurden darüber hinaus die analogen, nicht-photolabil geschützten Isocyanide synthetisiert (siehe die Hintergrundinformationen).

Die Ugi-Reaktionen zum Aufbau der Prä-tubulysin-Grundgerüste wurden in CH_2Cl_2 (anstelle von MeOH oder Trifluorethanol) durchgeführt (Schema 3), um die Bildung



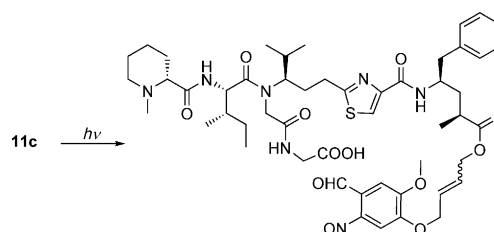
Schema 3. Synthese photospaltbarer Tubulysin-Derivate: a) CH_2Cl_2 , RT, 5 d; b) Benzyliden[1,3-bis(2,4,6-trimethylphenyl)-2-imidazolidinylidene]-dichlor(tricyclohexylphosphor)ruthenium (Grubbs-II-Katalysator, 15 Mol-%), HCl (5.0 Äquiv.), CH_2Cl_2 , 1. 40 °C, 1 h; 2. RT, 1 h.

von Nebenprodukten durch Angriff des Lösungsmittels^[28] zu umgehen. Paraformaldehyd erwies sich aufgrund seiner geringeren Reaktivität gegenüber wässriger Formaldehyd-Lösung als überlegen. Ebenso musste die Säurekomponente in neutraler Form vorliegen, da der Einsatz des entsprechenden Hydrochlorids des tertiärenamins die Ausbeute einbrechen ließ. Die Reaktionen dauerten zwar relativ lang (5 Tage), sie verliefen aber sehr sauber, und die gewünschten Produkte konnten in guten Ausbeuten erhalten werden.

Die anschließenden Ringschlussmetathesen gestalteten sich anfangs deutlich problematischer als erhofft.^[29] So konnten bei der Umsetzung von **10c** nur Spuren an Cyclisierungsprodukt erhalten werden, selbst wenn 0.6 Äquiv. des Grubbs-Katalysators verwendet wurden.^[30] Der Verdacht lag nahe, dass das Scheitern der Reaktion auf die Koordination des tertiären Stickstoffzentrums der N-terminalen Pipecolinsäure an den Ruthenium-Katalysator zurückzuführen ist.^[31] Möglichkeiten, diese Desaktivierung zu unterdrücken, bestehen beispielsweise in der Zugabe von $\text{Ti}(\text{O}i\text{Pr})_4$ ^[32] oder H^+ .^[33] Nach Testung diverser Optionen wurden die besten Resultate bei Zusatz von 5.0 Äquiv. HCl und Verwendung

von 15 Mol-% Grubbs-II-Katalysator^[34] erhalten. Unter diesen Bedingungen konnte das gewünschte Produkt **11c** nach Umkehrphasen-Mitteldruckchromatographie^[35] in 72 % Ausbeute (Reinheit > 95 %) erhalten werden. Übertragung dieser Bedingungen auf die anderen Ugi-Produkte ergaben vergleichbare Resultate. Somit erhält man die cyclischen Tubulysin-Derivate **11** in lediglich zwei Stufen aus relativ einfach zugänglichen Bausteinen (siehe die Hintergrundinformationen).

Um nachzuweisen, dass die Produkte tatsächlich durch Licht gespalten werden können, wurde exemplarisch das Cyclopeptid **11c** zwei Stunden in Acetonitril mit einer UV-LED-Lampe bei 365 nm belichtet. Die Reaktion wurde mit HPLC/MS verfolgt und analysiert. Erfolgt die Spaltung nach dem literaturbekannten Mechanismus, so sollte sich ein *o*-Nitrosobenzaldehyd-Derivat bilden (Schema 4),^[16] also ein



Schema 4. Erwartetes Produkt der Photospaltung von **11c**.

lineares Produkt mit exakt derselben Masse. In der Tat wurde neben noch kleinen Mengen an Startmaterial ein solches Produkt (m/z 503, $[M+2H]^{2+}$) identifiziert. Daneben wurde außerdem ein Signal bei m/z 496 beobachtet, das dem entsprechenden Produkt der Reduktion der Nitro(so)-Gruppe zum Anilin zugeordnet wurde $[M+2H-14]^{2+}$. Dies ist in Einklang mit dem typischen Ionisierungsmuster aromatischer Nitroso-Verbindungen.^[36]

Um nun zu prüfen, ob die cyclischen Verbindungen wie erhofft weniger biologisch aktiv sind als die potenziellen Spaltprodukte, wurden sie Cytotoxizitätstests^[22a] gegenüber diversen Krebszelllinien unterworfen, und die Aktivität (IC_{50}) mit der der linearen Referenzverbindungen **12** (Abbildung 4)

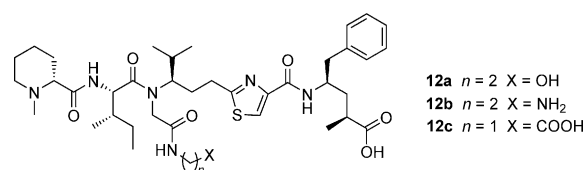


Abbildung 4. Potenzielle Spaltprodukte nach Belichtung und Esterspaltung.

verglichen. Die Ergebnisse mit der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HCT-116 und der Ovarzelllinie CHO-K1 sind in Tabelle 1 dargestellt. Interessanterweise waren das cyclische Carbonat **11a** mit einem IC_{50} -Wert von 120 ng mL^{-1} und der cyclische Ester **11c** (IC_{50} : 63 ng mL^{-1}) gegen HCT-116 unerwartet aktiv, während das cyclische Carbamat **11b** deutlich geringere Aktivität zeigte.

Tabelle 1: Biologische Aktivität der Derivate **11a–c** und **12a–c** im MTT-Assay (HCT-116-/CHO-K1-Zelllinie, IC_{50} [$\mu\text{g mL}^{-1}$]).

Cyclische, photoaktivierbare Tubulysin-Derivate		offenkettige, entschützte Referenzsubstanzen	
11a	0.12/0.35	12a	0.02/0.10
11b	0.57/4.54	12b	2.12/6.34
11c	0.063/n.e.	12c	0.58/0.64

n.e.: nicht ermittelt.

Beim Betrachten der offenkettigen Verbindungen fällt auf, dass eine Aminofunktion (**12b**) in der Seitenkette relativ schlecht toleriert wird, da die offenkettige Verbindung weniger aktiv war als das cyclische Carbamat **11b**. Auch die Carboxylverbindung **12c** zeigte deutlich geringere Aktivität, was darauf hindeutet, dass sich unter physiologischen Bedingungen geladene Seitenketten ungünstig auswirken, während eine OH-Gruppe (**12a**) offensichtlich problemlos toleriert wird. Das potenzielle Spaltprodukt von **11a** lag mit IC_{50} -Werten von 20 ng mL^{-1} (HCT-116) und 100 ng mL^{-1} (CHO-K1) in einem pharmakologisch interessanten Bereich.

Weshalb die cyclischen Tubulysin-Derivate **11a** und **11c** trotz ihrer großen Seitenketten im Vergleich zum Tubulysin immer noch eine relativ hohe Cytotoxizität aufweisen, ist im Moment noch unklar und Gegenstand weiterer Untersuchungen. Möglicherweise werden die Tubulysin-Derivate durch die Cyclisierung in einer für die Rezeptorbindung günstigen Konformation fixiert. Das hieße, dass sich Seitenkette und C-Terminus bei der Bindung an den Rezeptor nahe stünden, was mit Blick auf die Ergebnisse von Carlomagno et al.^[37] durchaus wahrscheinlich ist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Konzept der Photoaktivierung cyclischer Wirkstoffe am Beispiel von entsprechenden Tubulysin-Derivaten erfolgreich umgesetzt werden konnte. Die Synthese der photoaktivierbaren Cyclen erfolgte sehr effizient über zwei Stufen, ausgehend von einfach zugänglichen Bausteinen. Die Ergebnisse der biologischen Testung gaben darüber hinaus erstmals Aufschluss über die Aktivitäten von Tubulysin-Derivate mit funktionalisierten Seitenketten. Weitergehende Untersuchungen fokussieren sich nun auf die Photoaktivierung in Tumorzellen und Tumorgewebe.

Eingegangen am 26. Mai 2014,

veränderte Fassung am 28. Juli 2014

Online veröffentlicht am 4. September 2014

Stichwörter: Antitumorverbindungen · Naturstoffe · Photoaktivierung · Prä-tubulysin · Tubulysine

- [1] R. L. Edelson, *Sci. Am.* **1988**, 259, 50–57.
- [2] M. A. Pathak, T. B. Fitzpatrick, *J. Photochem. Photobiol. B* **1992**, 14, 3–22.
- [3] a) H. Hönigsmann, W. Brenner, W. Rauschmeier, K. Konrad, K. Wolff, *J. Am. Acad. Dermatol.* **1984**, 10, 238–245; b) D. M. Ashcroft, A. L. W. Po, C. E. M. Griffith, *J. Clin. Pharm. Ther.* **2000**, 25, 1–10; c) M. Nagy, E. Dalla Via, L. Ronconi, F. Dolores, *Curr. Pharm. Des.* **2010**, 16, 1863–1876.

- [4] a) T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, 12, 889–905; b) D. E. Dolmans, D. Fukumura, R. K. Jain, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 380–387; c) B. C. Wilson, *Can. J. Gastroenterology* **2002**, 16, 393; d) M. B. Vrounenraets, G. W. Visser, G. B. Snow, G. A. Dongen, *Anticancer Res.* **2003**, 23, 505–522.
- [5] E. Merino, M. Ribagorda, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, 8, 1071–1090.
- [6] a) J. Garcia-Amorós, M. Diaz-Lobo, S. Nonell, D. Velasco, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 12820–12823; *Angew. Chem.* **2012**, 124, 12992–12995; b) C. Hoppmann, V. K. Lacey, G. V. Louie, J. Wei, J. P. Noel, L. Wang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 3932–3936; *Angew. Chem.* **2014**, 126, 4013–4017.
- [7] a) M. Irie, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 1685–1716; b) D. Vomasta, A. Innocenti, B. König, C. T. Supuran, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 1283–1286; c) B. Reisinger, N. Kuzmanovic, P. Löffler, R. Merkl, B. König, R. Sterner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 595–598; *Angew. Chem.* **2014**, 126, 606–609.
- [8] a) W. J. Deal, B. F. Erlanger, D. Nachmansohn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1969**, 64, 1230–1234; b) M. Volgraf, P. Gorostiza, S. Szobota, M. R. Helix, E. Y. Isacoff, D. Trauner, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 260–261; c) M. R. Banghart, A. Mourrot, D. L. Fortin, J. Z. Yao, R. H. Kramer, D. Trauner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 9097–9101; *Angew. Chem.* **2009**, 121, 9261–9265.
- [9] a) M. A. Kienzler, A. Reiner, E. Trautman, S. Yoa, D. Trauner, E. Y. Isacoff, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 17683–17686; b) M. Stein, S. J. Middendorp, V. Carta, E. Pejo, D. E. Raines, S. A. Forman, E. Sigel, D. Trauner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 10500–10504; *Angew. Chem.* **2012**, 124, 10652–10656; c) A. Reiter, A. Skerra, D. Trauner, A. Schiefner, *Biochemistry* **2013**, 52, 8972–8974; d) M. Schönberger, D. Trauner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 3264–3267; *Angew. Chem.* **2014**, 126, 3329–3332.
- [10] Reviews: a) G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 4900–4921; *Angew. Chem.* **2006**, 118, 5020–5042; b) H. Yu, J. Li, D. Wu, Z. Qiu, Y. Zhang, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 464–473; c) Q. Shao, B. Ying, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 2835–2846.
- [11] a) V. N. Rajasekharan Pillai, *Synthesis* **1980**, 1–26; b) C. G. J. Bochet, *Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2002**, 125–142.
- [12] a) G. Dormán, G. D. Prestwich, *Trends Biotechnol.* **2000**, 18, 64–77; b) O. Srinivas, N. Mitra, A. Surolia, N. Jayaraman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2124–2125; c) J. Juodaityte, N. Sewald, *J. Biotechnol.* **2004**, 112, 127–138.
- [13] a) E. M. Callaway, R. Yuste, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2002**, 12, 587–592; b) L.-R. Shao, F. E. Dudek, *J. Neurophysiol.* **2004**, 93, 3007–3011; c) W. Maier, J. E. T. Corrie, G. Papageorgiu, B. Laube, C. Grewer, *J. Neurosci. Methods* **2005**, 142, 1–9; d) T. H. Lee, K. R. Gee, C. Davidson, E. H. Ellinwood, *Neuroscience* **2002**, 112, 647–654; e) H.-G. A. Breitingner, R. Wieboldt, D. Ramesh, B. K. Carpenter, C. P. Hess, *Biochemistry* **2000**, 39, 5500–5508.
- [14] a) F. G. Cruz, J. T. Koh, K. H. Link, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8777–8778; b) Y. H. Shi, J. T. Koh, *ChemBioChem* **2004**, 5, 788–796.
- [15] a) J. A. McCray, L. Herbet, T. Kihara, D. R. Trentham, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 7237–7241; b) J. W. Walker, G. P. Reid, J. A. McCray, D. R. Trentham, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 7170–7177.
- [16] a) A. P. Pelliccioli, J. Wia, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, 1, 441–458; b) J. E. T. Corrie, A. Barth, V. R. N. Munasinghe, D. R. Trentham, M. C. Hutter, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8546–8554.
- [17] R. S. Adams, J. P. Y. Kao, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 7957–7968.
- [18] a) C. Quirin, U. Kazmaier, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 371–377; b) J. Deska, S. Hähn, U. Kazmaier, *Org. Lett.* **2011**, 13, 3210–3213.

- [19] a) A. Ullrich, Y. Chai, D. Pistorius, Y. A. Elnakady, J. E. Herrmann, K. J. Weissman, U. Kazmaier, R. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4422–4425; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4486–4489; b) A. Ullrich, J. Herrmann, R. Müller, U. Kazmaier, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 6367–6378; c) Y. Chai, D. Pistorius, A. Ullrich, K. J. Weissman, U. Kazmaier, R. Müller, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 296–309; d) J. L. Burkhart, R. Müller, U. Kazmaier, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3050–3059; e) U. Kazmaier, A. Ullrich, J. Hoffmann, *Open Nat. Prod. J.* **2013**, *6*, 12–30.
- [20] a) J. Eirich, J. L. Burkhart, A. Ullrich, A. Vollmar, S. Zahler, U. Kazmaier, S. A. Sieber, *Mol. BioSyst.* **2012**, *8*, 2067–2075; b) R. Kubisch, M. von Gamm, S. Braig, A. Ullrich, J. L. Burkhart, L. Colling, J. Hermann, O. Scherer, R. Müller, O. Werz, U. Kazmaier, A. M. Vollmar, *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 536–542.
- [21] a) S. Rath, J. Liebl, R. Fürst, A. Ullrich, J. L. Burkhart, U. Kazmaier, J. Herrmann, R. Müller, M. Günther, L. Schreiner, E. Wagner, A. M. Vollmar, S. Zahler, *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *167*, 1048–1061; b) V. K. Kretschmann, D. Gellrich, A. Ullrich, S. Zahler, A. M. Vollmar, U. Kazmaier, R. Fürst, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2014**, *34*, 294–303.
- [22] a) J. Herrmann, R. M. Wiedmann, Y. A. Elnakady, A. Ullrich, M. Rohde, U. Kazmaier, A. M. Vollmar, R. Müller, *PlosOne* **2012**, *7*, e37416; b) S. Braig, R. M. Wiedmann, J. Liebl, M. Singer, R. Kubisch, L. Schreiner, B. A. Abhari, E. Wagner, U. Kazmaier, S. Fulda, A. M. Vollmar, *Cell Death Disease* **2014**, *5*, e1001.
- [23] a) U. Kazmaier, S. Maier, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1763–1766; b) C. Hebach, U. Kazmaier, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **2003**, 596–597; c) U. Kazmaier, C. Hebach, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 136–145.
- [24] P. J. Gross, S. Braese, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 12660–12667.
- [25] a) P. Wipf, Z. Wang, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1605–1607; b) A. W. Patterson, H. M. Peltier, F. Sasse, J. A. Ellman, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9534–9541; c) A. W. Patterson, H. M. Peltier, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4362–4369.
- [26] a) H. M. Peltier, J. P. McMahon, A. W. Patterson, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16018–16019; b) O. Pando, S. Dörner, R. Preusentanz, A. Denkert, A. Porzel, W. Richter, L. Wessjohann, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5567–5569; c) T. Shibue, I. Okamoto, N. Morita, H. Morita, Y. Hirasawa, T. Hosoya, O. Tamura, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 431–434.
- [27] O. Pando, S. Stark, A. Denkert, A. Porzel, R. Preusentanz, L. A. Wessjohann, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7692–7695.
- [28] a) U. Kazmaier, C. Hebach, *Synlett* **2003**, 1591–1594; b) R. Pick, M. Bauer, U. Kazmaier, C. Hebach, *Synlett* **2005**, 757–760.
- [29] a) M. Schuster, S. Blechert, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2036–2056; *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2124–2144; b) R. H. Grubbs, T. M. Trnka in *Ruthenium in Organic Synthesis* (Hrsg.: S.-I. Murahashi), Wiley-VCH, Weinheim, **2004**, S. 153–177; c) H. Clavier, K. Grela, A. Kirschning, M. Mauduit, S. P. Nolan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6786–6801; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6906–6922.
- [30] G. C. Fu, S. T. Nguyen, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9856–9857.
- [31] P. Compain, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1829–1846.
- [32] Q. Yang, W.-J. Xiao, Z. Yu, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 871–874.
- [33] C. P. Woodward, N. D. Spiccia, W. R. Jackson, A. J. Robinson, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 779–781.
- [34] a) M. Scholl, S. Ding, C. W. Lee, R. H. Grubbs, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 953; b) A. K. Chatterjee, T.-L. Choi, D. P. Sanders, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11360–11370; c) S. H. Hong, D. P. Sander, C. W. Lee, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17160–17161.
- [35] Säulenchromatographische Trennungen mithilfe einer automatisierten Grace Reveleris Flash-Apparatur.
- [36] J. J. Brophy, V. Diakiw, R. J. Goldsack, D. Nelson, J. S. Shannon, *Org. Mass Spect.* **1979**, *14*, 201–203.
- [37] K. Kubicek, S. K. Grimm, J. Orts, F. Sasse, T. Carlomagno, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4809–4812; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 4919–4922.