

Struktur-Reaktivitätsbeziehung von Cyanin-Styryl-Farbstoffen und deren Anwendung in der fluoreszenten Bioanalytik lebender Zellen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)



genehmigte

DISSERTATION

von

M.Sc. Christian Schwechheimer

KIT-Dekan:

Prof. Dr. Reinhard Fischer

Referent:

Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Korreferent:

Priv.-Doz. Andreas-Neil Unterreiner

Tag der mündlichen Prüfung:

10. Dezember 2018

STUFEN

Wie jede Blüte welkt und jede Jugend
Dem Alter weicht, blüht jede Lebensstufe,
Blüht jede Weisheit auch und jede Tugend
Zu ihrer Zeit und darf nicht ewig dauern.
Es muß das Herz bei jedem Lebensrufe
Bereit zum Abschied sein und Neubeginne,
Um sich in Tapferkeit und ohne Trauern
In andre, neue Bindungen zu geben.
Und jedem Anfang wohnt ein Zauber inne,
Der uns beschützt und der uns hilft, zu leben.

Wir sollen heiter Raum um Raum durchschreiten,
An keinem wie an einer Heimat hängen,
Der Weltgeist will nicht fesseln uns und engen,
Er will uns Stuf' um Stufe heben, weiten.
Kaum sind wir heimisch einem Lebenskreise
Und traulich eingewohnt, so droht Erschlaffen,
Nur wer bereit zu Aufbruch ist und Reise,
Mag lähmender Gewöhnung sich entrafen.

Es wird vielleicht auch noch die Todesstunde
Uns neuen Räumen jung entgegen senden,
Des Lebens Ruf an uns wird niemals enden...
Wohlan denn, Herz, nimm Abschied und gesunde!

H E R M A N N H E S S E

Danksagung

Im Zeitraum von Oktober 2015 bis Dezember 2018 wurde die vorliegende Dissertation unter Anleitung von Herr Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht am Karlsruher Institut für Technologie angefertigt.

Ich möchte mich hiermit zunächst bei Ihnen für die optimale Betreuung, die interessante Themenstellung und das tolle Arbeitsklima bedanken. Danke für die große Freiheit mit der ich diese Dissertation bearbeiten durfte.

Ich danke dem GRK 2039 für die finanzielle Unterstützung, spannenden Seminartagungen und die lieben Menschen, die ich dort kennenlernen durfte. Weiterhin danke ich der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh) für das Reisekostenstipendium, welches mir die Reise zur 23. IUPAC Conference on Physical Organic Chemistry (ICPOC-23) in Sydney erleichtert hat. Diese Konferenz war sehr prägend und motivierend für die gesamte Bearbeitungsphase der vorliegenden Dissertation.

Ebenso danke ich Dr. Peggy R. Bohländer für Ihre stetig positive Art, Ihre Expertise und die Einführung in die schönste Chemie der Farbstoffe.

Jeannine – Dir danke ich für eine innige Freundschaft und der andauernden Ermutigung immer weiter zu machen, wenn es mal schwer ist. Ebenso warst Du mir die liebste Mitbewohnerin, eine so tolle Freundin und ein Anker in stürmischen Zeiten.

David – Dir danke ich für unzählige, leckere Giant Cheeseburger im Ox, die tollen Gespräche, Partys, vertieften Gespräche übers Fach und Deine immer fröhliche Art. Weiterhin bleibt mir unsere gemeinsame Australienzeit im Herzen und ich vermisse es manchmal noch morgens am Meer aufzuwachen und zu schauen wohin einen der Tag so treibt.

Marcus – Dir danke ich für die spontansten Partys und Dein immer offenes Ohr. Dein ansteckendes Lachen und die gemeinsamen Plünderungen der Cafete als Ölgobline mit Philipp. So viel Schmutz in unseren Köpfen, aber das hat immer für die perfekten Lacher Anderer und bei uns selbst gesorgt.

Andrea – Dir danke ich für die schönste Zeit im Studium, unsere Joggingrunden, unsere Gespräche, unser bedingungsloses Verständnis füreinander und eine tolle Freundschaft.

Meine lieben Laborkollegen Robert und Heidi: So viele einzigartige Momente werden mir immer als wunderschöne Erinnerung erhalten bleiben. Das L-Labor und die spaßige Zeit mit Ed von Leck, aber auch die immerwährenden Musikekszesse werde ich in freudiger Erinnerung behalten. Sie mögen Sich PENG! Ebenso gehören auch mein Kollege Christoph und meine Liebe Azubine Katharina dazu, die mir gerade in der Endzeit den Rücken freigehalten haben und auf die man sich immer verlassen konnte.

Bei Julian bedanke ich mich für die Messung des Extinktionskoeffizienten des Farbstoffes **PhInAN₃**.

Weiter bedanke ich mich bei allen anderen Arbeitskollegen für die angenehmen Gespräche und Mittagspausen und das ein oder andere Feierabendbier. Ich könnte so viel Tolles über jeden von Euch schreiben. Danke für die schöne Zeit, an Claudia, Damian, Heidi, David, Philipp, Nadine, Stefanie, Sergej, Benjamin, Linda, Robert, Jack, Christoph, Martin, Andrea,

Andreas, Tamina, Annette, Ulrike, Franziska, Larissa, Yannic, Sara, Fabienne, Samantha, Katja, Fabian, Arthur, Julian und Daniel.

Weiter möchte ich mich bei Dr. Andreas Rapp, Dr. Norbert Foitzik, Angelika Mösle, Ingrid Roßnagel, Pia Lang, Tanja Ohmer, Richard von Budberg, Lennart Oberle, Ciske Faber und weiteren Angehörigen des IOC für die Messung von Proben, Reparatur von Geräten und vieles mehr bedanken.

Ilona und Franziska danke ich für die tolle Unterstützung bei unzähligen Zellexperimenten. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht in diesem Maße möglich gewesen. Vielen, vielen Dank!

Bedanken möchte ich mich außerdem für den Einsatz meiner Bacheloranden Zeynep, Daniel und Rafael, sowie bei Dennis, für den Beitrag, welchen er mit seiner Vertieferarbeit geleistet hat. Ebenso bedanke ich mich bei Katharina für ein tolles Jahr in Deiner (und meiner) Ausbildungszeit – ich weiß, dass Du viel gelernt hast (aber ich auch!).

Zudem bedanke ich mich bei den Menschen, die sich die Zeit genommen haben diese Arbeit Korrektur zu lesen. Danke Ingmar, Bella, Tim und Fabi.

Andy, Chrissy und Daniel. Danke für eine so schöne Freundschaft!

Dancemove Fabi – danke für die tollen Partys, Dein immer offenes Ohr und die loyale Freundschaft wie auch Dein ehrliches Verständnis.

Meiner Hood von Zuhause' dank' ich auch! Ingmi und Jules, ich habe Euch lieb und könnte mir keine schöneren Menschen als Nachbarn vorstellen. Unsere auffallend oft und plötzlich eskalierenden Karaokeabende haben unsere Nachbarn (~~vielleicht gestört~~) geliebt und ich habe Euch Beide ganz arg ins Herz geschlossen! Danke, dass es Euch gibt!

Besonderer Dank geht an Tim und Bella. Ihr Beiden seid mir echt ans Herz gewachsen und ich möchte Euch niemals missen müssen! Ihr macht mich verrückt glücklich und die Unterstützung, die ich durch Euch erfahre, ist das Schönste auf der Welt.

Bella – meine beste Freundin. Dem ist nichts Weiteres hinzuzufügen außer, dass „zwei halbe Ewigkeiten auch `ne ganze...“ ist. Ich hab Dich lieb so wie Du bist und dafür, dass ich mich so bedingungslos Verstanden fühle – mit der Prämisse, dass Du mir auch mal ordentlich die Meinung geist ;) Danke Du toller toller Mensch!

Tim. Hinter jedem starken Mann, steht ein Stärkerer(!) – oder so? Danke, dass Du mein Fels in der Brandung bist, meine Unausstehlichkeiten aushältst, mich liebst – wie ich bin – und mein engster Vertrauter und bester Berater bist (auch wenn ich Dich ab und an echt mal pew pew pew könnte!). Liebe.

Großer Dank gebührt meiner geliebten Familie. Danke Mama, dass Du mich immer unterstützt hast in Allem. Danke Tanja für die leckersten Mitternachtssnacks und dass wir auch mal heimlich aus dem Fenster gestiegen sind, um Feiern zu gehen ^^ . Danke Michi und Mascha, dass Ihr immer da seid, wenn ich Euch brauche. Danke Florian – einfach weil Du mein kleiner, aber riesiger, süßer Neffe bist. Ich liebe Euch.

Ich möchte mich abschließend noch einmal bei allen obenstehenden, sowie weiteren Freunden und Weggefährten für die moralische Unterstützung und die lieben Worte speziell während der Erstellung dieser Dissertation bedanken. Entschuldigung an die Vergessenen, aber dennoch einen herzlichen Dank für die ganze Unterstützung auch an Euch.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Themenstellung.....	3
3	Theoretischer Hintergrund.....	5
3.1	Optische Spektroskopie	5
3.2	Photostabilität von Cyanin-Styryl-Farbstoffen	11
4	Photostabile Cyanin-Styryl-Farbstoffe.....	22
4.1	Einleitende Worte zum <i>Cyanine Indole Quinoline</i> (CyIQ)	23
4.2	Exkurs: Nomenklatur von Cyanin-Styryl-Farbstoffen	24
4.3	Eigenschaften von Cyanin-Styryl-Farbstoffen	25
4.4	Synthese verschiedenster Cyanin-Styryl-Farbstoffderivate	33
4.5	Optische Spektroskopie der COT-Konjugaten	36
5	Quantitative Struktur-Reaktivitätsbeziehung.....	41
5.1	Optische Spektroskopie der indolmodifizierten Farbstoffe	42
5.2	Thermisches Bleichen mit Singulett-Sauerstoff	47
5.3	Korrelation von Extinktionskoeffizient und Nukleophilie-Parameter	49
5.4	Korrelationsanalyse von Nukleophilie und Reaktivität	51
5.5	Untersuchung von <i>Cyanine Indole Pyridine</i> -Farbstoffen	53
6	Fluoreszente Bildgebung lebender Zellen.....	55
6.1	Zytotoxizität von Cyanin-Styryl-Farbstoffen	56
6.2	<i>In vivo</i> -Lokalisation in HeLa-Zellen	59
6.3	Spezifische Fluoreszenzmarkierung von Mitochondrien	63
6.4	Kovalente Fluorophormarkierung von Mitochondrien	64
7	<i>In vitro</i> Detektion von Nukleinsäuren.....	66
7.1	microRNA-155-5p als Modellzielsequenz	67
7.2	Konzeptionierung der hybridisierungsresponsiven Detektion	68
7.3	Abstandsoptimierung des Intrastrangchromophorpaars	70
7.4	Einführung des PEG- <i>Spacers</i>	72
7.5	Binäre Nukleinsäuresonden	74
8	Zusammenfassung.....	75
9	Ausblick.....	77

10 Experimenteller Teil	79
10.1 Materialien und Geräte	79
10.2 Synthesevorschriften und Charakterisierung	83
10.3 Nukleinsäuresynthese	143
10.4 Charakterisierung der Cyanin-Styryl-Farbstoffe	150
10.5 Charakterisierung der fluorophormarkierten Nukleinsäuren	177
10.6 Nukleophilie und Stabilität von Cyanin-Styryl-Farbstoffen	211
10.7 Fluoreszenzmikroskopische Lebendzell-Untersuchungen	215
10.8 Zytotoxizität der Cyanin-Styryl-Farbstoffe	221
Abkürzungsverzeichnis und Glossar.....	III
Literaturverzeichnis.....	XII
Appendix.....	XVI
Vorträge, Weiterbildungen & Auszeichnungen	XVI
Publikationsliste	XVII
Lehre	XVIII
Eidesstattliche Versicherung	XIX

1 Einleitung

Tagtäglich sind wir Mikroorganismen ausgesetzt, die versuchen, unseren Körper als Wirt zu verwenden. Gerade Viren, die nicht als Lebewesen zählen, nutzen unsere Zellen aus, um sich schlicht zu replizieren. Sie besitzen keine Ribosomen und sind strukturell von nicht kompliziertem Aufbau. Durch spezifische Bindung an Rezeptoren werden Viren durch Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen und deren Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder Ribonukleinsäure (RNA), sowie einige Proteine werden freigesetzt. RNA-Viren, wie das Influenza-Virus, nutzen anschließend die körpereigene Maschinerie aus, wobei eine Vielzahl viraler Proteine und RNA in kürzester Zeit gebildet werden. In Kombination von RNA und einigen Proteinen, verlässt das Grippe-Virus seinen Wirt und so nimmt die Schädigung des Körpers durch den Virus weiter zu. Gerade die „Schweinegrippewelle“ erregte viel Aufmerksamkeit. Bei einem Husten oder Unwohlsein fällt häufig die Floskel „Ich hab’ Grippe.“, jedoch ist dies nicht immer der Fall und eine Erkältung liegt vor, die von weit mehr Erregern ausgelöst werden kann.

Seitz *et al.* konnten gezielt Peptidnukleinsäuren (PNA) entwickeln, die hierbei die RNA-Expression innerhalb lebender Zellen nachweisen. Hierfür verwendeten sie das Cyanin Thiazolorange (TO) als Basensurrogat und wiesen mit der PNA als Erkennungsmodul die Boten-RNA (*messenger RNA*, mRNA) des Neuraminidase-Proteins nach. Die Anwendung von TO als Basensurrogat konnte hierbei mit geeignetem Strangdesign die mRNA nachweisen, da konformationelle Freiheit des Cyaninfarbstoffes durch Hybridisierung eingeschränkt wird.^[1] Infolgedessen ist nach Anregung von TO ein hoher Anstieg der Fluoreszenzintensität charakteristisch für die Anwesenheit der mRNA. Infizierte Zellen weisen einen 4.5-fachen Anstieg der Fluoreszenzintensität infolge der Hybridisierung von Sonde und mRNA auf (Abbildung 1).^[2]

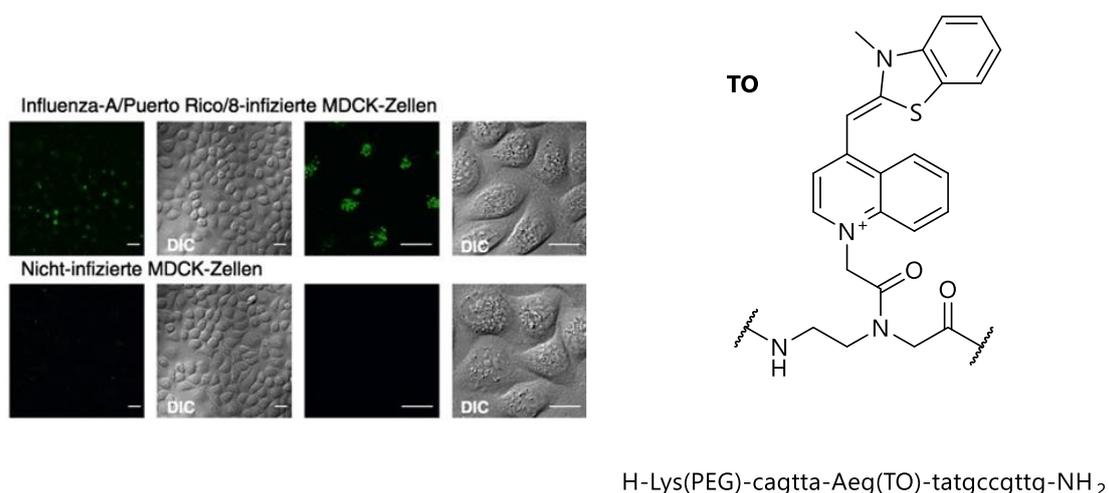
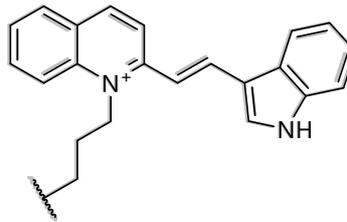


Abbildung 1: Konfokale Lasermikroskopie von MDCK-Zellen. Mit freundlicher Genehmigung aus Ref. ^[2]. (Copyright © 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim)

Für Langzeituntersuchungen sind diese Sonden jedoch nicht geeignet, was an der geringen Photostabilität des verwendeten Chromophors liegt.^[3-4] Die Steigerung der Photostabilität ist Gegenstand der vorliegenden Dissertation, um leistungsstarke Fluorophore hervorzubringen und deren Photoabbaumechanismus besser zu verstehen.^[5-8]

2 Themenstellung

In der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* wurde der Farbstoff **CyIQ** (*Cyanine Indole Quinoline*, Abbildung 2) erstmals als Nukleinsäuresonde verwendet. In Anwesenheit von Nukleinsäuren zeigen Farbstoffe des CyIQ-Typs wie auch Cyanine (z. B. **TO**) einen hohen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Zwar zeigt **CyIQ** eine höhere Photostabilität als **TO** (Abbildung 1) jedoch ist diese nicht für Langzeituntersuchungen innerhalb lebender Zellen ausreichend.^[8]



CyIQ
(Cyanine Indole Quinoline)

Abbildung 2: Struktur des CyIQ.

In diesem Zuge wurden weitere Fluorophore entwickelt, die durch strukturelle Variation eine weit gesteigerte Photostabilität wie auch verbesserte optische Eigenschaften besitzen und im Gegensatz zu kommerziell verfügbare, photostabile Fluorophore (wie ATTO 488) sensitiv auf die Anwesenheit von Nukleinsäuren sind. Insbesondere die Methylierung des Indol-Stickstoffs konnte hierbei eine Steigerung der Photostabilität um Faktor 2 und die 6-Methoxylierung des Chinoliniumteils um Faktor 3 erreichen. Besitzt das Chromophor beide Modifikationen, so konnte eine um Faktor 5 – also eine additiv – gesteigerte Photostabilität erzielt werden.^[6, 9-10]

Entgegen der Substituentenvariation verfolgte *Blanchard et al.* den Ansatz, Triplettzustände des Chromophors zu löschen (*triplet state quencher*, TSQ). Hierfür wurde Cyclooctatetraen (COT) als kovalent-gebundene Modifikation verwendet, welches effizient den Triplettzustand verschiedenster Cyanine, wie Cy5, löschen konnte. Triplettzustände können ebenso effizient durch molekularen Sauerstoff gelöscht werden, wobei hochreaktiver Singulett-Sauerstoff entsteht. In diesem Ansatz wird somit versucht, die Bildung von Singulett-Sauerstoff zu verhindern, damit dieser nicht den Fluorophor bleicht und so das Zeitfenster für Langzeituntersuchungen vergrößert wird. Jedoch besitzt Singulett-Sauerstoff eine begrenzte Lebensdauer in wässrigen Medien, was zu einem konzentrationsabhängigen Beitrag zum Photoabbaumechanismus führt. In Hinblick auf die fluoreszenzmikroskopische Detektion wird jedoch mit Konzentrationen im nanomolaren Bereich gearbeitet, weshalb der Photoabbaumechanismus unwahrscheinlich ist. Ein anderer Photoabbauweg für Fluorophore resultiert aus dem Stoß von molekularem Sauerstoff und dem jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff. Hierbei kommt es zum photoinduzierten Elektronentransfer, wobei der Farbstoff oxidiert und das Superoxid-Radikalanion gebildet wird.^[3-4, 11-17]

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollen verschiedene COT-Konjugate des **CyIQ** synthetisiert und deren optische Eigenschaften ermittelt werden. Bezüglich des zweiten Abbaumechanismus unter dem Aspekt des Elektronentransfers sollten weitere Fluorophore mit unterschiedlicher Elektronendichte am Indolnukleus synthetisiert werden (Abbildung 3). Die so synthetisierten Chromophore sollen in Photostabilitätsuntersuchungen und Reaktionen mit reaktiven Sauerstoffspezies untersucht werden. Aus den erhaltenen Daten soll eine Struktur-Reaktivitätsbeziehung eruiert werden, die die Photoabbaumechanismen von Cyanin-Styryl-Farbstoffen beleuchtet und dadurch die optischen Eigenschaften dieser Fluorophorklasse verbessern.

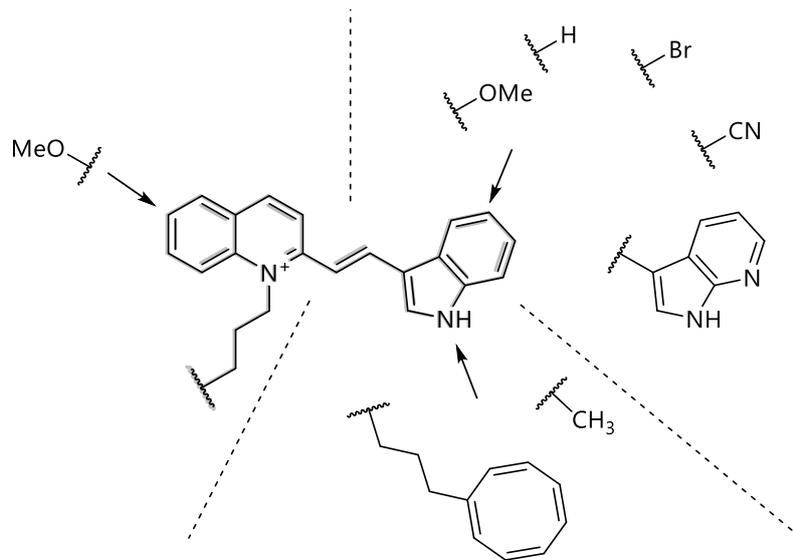


Abbildung 3: Modifikationsstellen der zu synthetisierenden Chromophore.

Darüber hinaus sollen die synthetisierten Fluorophore in ihrer Anwendbarkeit in der fluoreszenten Bioanalytik innerhalb lebender Zellen getestet werden. Dafür soll zunächst die Zytotoxizität der Chromophore ermittelt werden und weiter deren zellpenetrierende Eigenschaft und Lokalisation bestimmt werden. Überdies sollen weitere zelluläre Strukturen spezifisch fluorophormarkiert werden. Ebenso sollen die Chromophore ihre Eignung für hybridisierungsresponsive Nukleinsäuresonden unter Beweis stellen.

3 Theoretischer Hintergrund

3.1 Optische Spektroskopie

3.1.1 Absorption von sichtbarem Licht^[18-19]

Die Wechselwirkung von Materie und Strahlung kann kausal auf zwei Prozesse zurückgeführt werden. Neben der Aufnahme der Photonenenergie (Absorption), ist die Streuung bedeutender Prozess der die Photon-Materie-Interaktion beschreibt. Während sich die Ausbreitungsrichtung des Lichtes in Folge von Absorption nicht ändert, aber deren Intensität exponentiell abnimmt (Abbildung 1), besitzt gestreutes Licht eine andere Ausbreitungsrichtung.

Die durch Absorption verursachte exponentielle Abnahme der Lichtintensität ist hierbei proportional zur Schichtdicke x der durchstrahlten Lösung, deren Konzentration c und zur Ausgangsintensität I_0 .

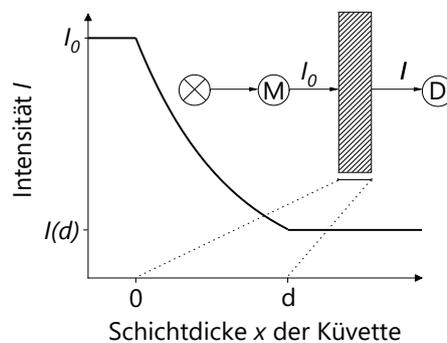


Abbildung 4: Exponentielle Abnahme der Lichtintensität in Folge von Absorption und vereinfachter Messaufbau. [Die Strahlungsquelle (X) emittiert polychromatisches Licht, welches mit Hilfe eines Monochromators (M) spektral gefiltert wird, dass lediglich Strahlung einer gewünschten Wellenlänge die Probe durchtritt und am Detektor (D) detektiert wird.]

Als Proportionalitätskonstante wird hierfür der Absorptionskoeffizient $\alpha(\lambda)$ verwendet, der eine (i) stoffspezifische Konstante darstellt und (ii) wellenlängenabhängig ist.

$$dI = -\alpha(\lambda) \cdot c \cdot I \, dx \tag{Gl. 3.1-1}$$

(λ die Wellenlänge)

Durch Integration von Gleichung 3.1-1 erhält man

$$I = I_0 \cdot \exp(-\alpha(\lambda) \cdot c \cdot d) \tag{Gl. 3.1-2}$$

(I die Intensität nach Probendurchtritt),

was durch Umrechnung zum Logarithmus der Basis 10 das *Lambert-Beer-Gesetz* mit dem molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten $\varepsilon(\lambda)$ liefert:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d} \tag{Gl. 3.1-3}$$

Die Transmission T ist weiter definiert über das Verhältnis der Lichtintensität nach dem Durchtritt der Probenlösung zur ursprünglichen Intensität.

$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-\varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d} \tag{Gl. 3.1-4}$$

Als Absorbanz A wird hierbei der dekadische Logarithmus des Kehrwerts der Transmission verstanden und stellt das *Lambert-Beer-Gesetz* in seiner häufigsten Anwendung dar.

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (\text{Gl. 3.1-5})$$

Die Gültigkeit des *Lambert-Beer-Gesetzes* liegt in der strengen Einhaltung folgender Bedingungen: dass monochromatisches Licht verwendet wird, der Analyt in starker Verdünnung vorliegt, das Lösungsmittel nicht bei der Messwellenlänge absorbiert wird und Strahlungsverluste durch Reflexion an den Küvettenwänden vernachlässigbar klein sind.

Apparativ können moderne Absorptionsspektrometer monochromatische Strahlung durch Verwendung geeigneter Monochromatoren erzeugen. Die Probenkonzentration wie auch die Wahl des Lösungsmittels beeinflussen die Absorbanz jedoch immens. Bei der Messung von Absorbanzen von 2 wird die ursprüngliche Strahlungsintensität auf 1 % abgeschwächt. Dies veranschaulicht die Wichtigkeit geringer Analytkonzentrationen wie auch die Wahl eines geeigneten Lösungsmittels, da die Detektorempfindlichkeit hierbei an ihre Grenzen stößt und so fehlerbelastete Absorbanzen gemessen werden. Weiter ergibt sich hieraus der unabdingbare Einsatz geeigneter Küvetten, die im jeweiligen Messbereich nicht absorbieren. Aus diesem Grund wurden Quarzglasküvetten verwendet, welche einen Anwendungsbereich bis ins ferne UV besitzen

Durch Absorption eines Photons wird ein Elektron des betreffenden Atoms oder Moleküls in einen elektronisch höher angeregten Zustand promoviert und beschreibt den Übergang von einem bindenden (σ , π) oder nicht-bindenden (n) Elektron in die antibindenden Molekülorbitale (σ^* , π^*). Dieser elektronische Übergang kann weiter kategorisiert werden:

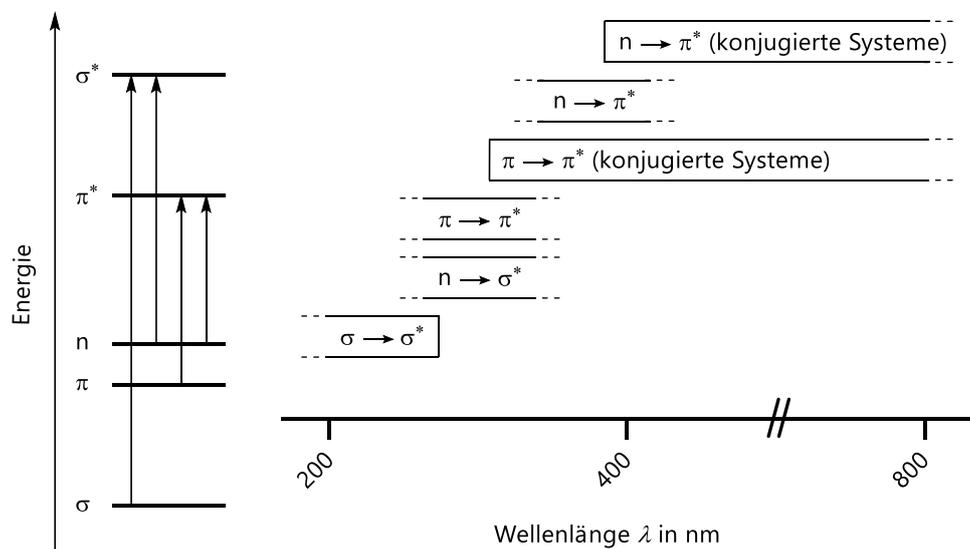


Abbildung 5: Elektronische Übergänge organischer Moleküle und deren korrespondierende Absorptionsbereiche.

Hierbei ist der elektronische Übergang eines Elektrons aus dem π - in das π^* -Molekülorbital maßgeblich für die meisten organischen Chromophore und stellt die niedrigste Anregung im sichtbaren Wellenlängenbereich dar (Abbildung 5). Inwieweit dieser Übergang jedoch erlaubt ist, hängt von den allgemeingültigen Auswahlregeln ab, und kann über den integralen Extinktionskoeffizienten der Chromophor-Bande bestimmt werden:

$$\int \varepsilon(\nu) \cdot d\nu = \int \frac{A}{c \cdot d} \cdot d\nu, \quad [\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}] \quad (\text{Gl. 3.1-6})$$

(ν die Frequenz).

Hinsichtlich dieser Tatsache kann die Oszillatorstärke f berechnet werden, welche mit dimensionslosen Werten über 0.1 für erlaubte Übergänge steht. Kleinere Werte charakterisieren in Folge dessen schwach erlaubte oder verbotene Übergänge:

$$f = \frac{4 \cdot \epsilon_0 \cdot c_0 \cdot m_e \cdot \ln(10)}{N_A \cdot e^2 \cdot \eta \cdot 10} \cdot \int \epsilon(\nu) \cdot d\nu \quad (\text{Gl. 3.1-7})$$

(ϵ_0 die Permittivität des Vakuums, c_0 die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum, m_e die Elektronenmasse, N_A die Avogadrokonstante, e die Elementarladung des Elektrons, η der Brechungsindex des Mediums).

Die so berechnete theoretische Oszillatorstärke f_{mn} ist proportional zum Betragsquadrat des Übergangsdipolmoments μ_{mn} für den Übergang zwischen den Zuständen n und m .

$$|\mu_{mn}|^2 = \frac{3 \cdot h \cdot e^2}{8 \cdot \pi^2 \cdot \nu_{mn} \cdot m_e} f_{mn} \quad (\text{Gl. 3.1-8})$$

(h das Plancksche Wirkungsquantum, ν_{mn} die Resonanzfrequenz)

Weiter nimmt das Übergangs-Matrixelement μ_{mn} Bezug auf die Wellenfunktionen des Anfangs- und Endzustands

$$\mu_{mn} = -e \cdot \int \psi_m^* \cdot \mathbf{r} \cdot \psi_n dV \quad (\text{Gl. 3.1-9})$$

(ψ_n, ψ_m die Wellenfunktionen der Zustände n und m , \mathbf{r} der Abstand der Ladungsschwerpunkte, dV das Volumenintegral)

und stellt einen oszillierenden Dipol dar, wenn dieses einen endlichen Wert annimmt. Dementsprechend ist die hinreichende Bedingung für die Absorption von elektromagnetischer Strahlung, neben der notwendigen Verschiedenheit der Parität des Ausgangs- und Endzustands, erfüllt.

Das *Franck-Condon-Prinzip* beschreibt die Wahrscheinlichkeit der einzelnen elektronisch-vibronischen Übergänge und lässt Annahmen zur Grobstruktur und Intensität im jeweiligen Spektrum zu. Jeder elektronische Zustand kann hierbei durch eine Potentialkurve beschrieben werden. Unter Annahme der *Born-Oppenheimer-Näherung* kann die elektronische *Schrödinger-Gleichung* durch Parametrisierung der Kernabstände R gelöst werden. Die jeweiligen Energieeigenwerte $V_n(\mathbf{R}_i)$ bilden die Potentialkurven $R \rightarrow V_n$ mit der Quantenzahl n ($n \in \mathbb{N}^*$) des jeweiligen elektronischen Zustands ab. Weiter stellen die Lösungen der Kern-*Schrödinger-Gleichung* die einzelnen Rotations- und Vibrationszustände dar. Da die Elektronenbewegungen bei weitem schneller sind als die schweren und damit trägen Atomkerne, erfolgt der elektronische Übergang unter Erhalt der Kernwellenfunktion – also vertikal. In Gl. 3.1-9 wurde bereits das Übergangs-Matrixelement für rein-elektronische Übergänge vorgestellt. Unter Berücksichtigung der *Born-Oppenheimer-Näherung* kann der Dipolmomentoperator $\hat{\mu}$ durch Faktorzerlegung in getrennter Abhängigkeit von Kern- und Elektronenkoordinaten dargestellt werden:

$$\hat{\mu} = -e \cdot \sum_i \mathbf{r}_i + e \cdot \sum_i Z_i \cdot \mathbf{R}_i \quad (\text{Gl. 3.1-10})$$

(Z_i die Kernladungszahl).

Das Übergangs-Matrixelement für den elektronisch-vibronischen Übergang ist dann durch

$$\mu_{mn}^{el+vib} = \int \psi_m^{*,el} \cdot \psi_m^{*,vib} \cdot [-e \cdot \sum_i \mathbf{r}_i + e \cdot \sum_i Z_i \cdot \mathbf{R}_i] \cdot \psi_n^{el} \cdot \psi_n^{vib} \cdot dV \quad (\text{Gl. 3.1-11})$$

($\psi_n^{\text{el}}, \psi_m^{\text{el}}$ die elektronischen Wellenfunktionen der Zustände n und m , $\psi_n^{\text{vib}}, \psi_m^{\text{vib}}$ die vibronischen Wellenfunktionen der Zustände n und m)

gegeben. Wirkt der Operator auf die elektronischen und in gleicher Weise auf die vibronischen Wellenfunktionen von Ausgangs- und Endzustand erhält man

$$\begin{aligned} \mu_{mn}^{\text{el+vib}} = & -e \cdot \sum_i \left[\int \psi_m^{*,\text{el}} \cdot \mathbf{r}_i \cdot \psi_n^{\text{el}} \cdot dV_{\text{el}} \cdot \int \psi_m^{*,\text{vib}} \cdot \psi_n^{\text{vib}} \cdot dV_{\text{Kern}} \right] \\ & + e \cdot \sum_i \left[\int \psi_m^{*,\text{vib}} \cdot \mathbf{R}_i \cdot \psi_n^{\text{vib}} \cdot dV_{\text{Kern}} \cdot \underbrace{\int \psi_m^{*,\text{el}} \cdot \psi_n^{\text{el}} \cdot dV_{\text{EL}}}_{\delta_{mn} \begin{cases} 0, m \neq n \\ 1, m = n \end{cases}} \right], \end{aligned} \quad (\text{Gl. 3.1-12})$$

(δ_{mn} das Kronecker-Delta),

wobei das Überlappungsintegral der elektronischen Wellenfunktionen, aufgrund ihrer Orthogonalität, gleich Null ist. Der verbleibende Term lässt sich überdies als Produkt des elektronischen Übergangs-Matrixelements μ_{mn}^{el} (Vgl. Gl. 3.1-8) und dem Überlappungsintegral S_{mn}^{vib} des beteiligten Schwingungsübergangs darstellen:

$$\mu_{mn}^{\text{el+vib}} = \underbrace{-e \cdot \sum_i \int \psi_m^{*,\text{el}} \cdot \mathbf{r}_i \cdot \psi_n^{\text{el}} \cdot dV_{\text{el}}}_{\mu_{mn}^{\text{el}}} \cdot \underbrace{\int \psi_m^{*,\text{vib}} \cdot \psi_n^{\text{vib}} \cdot dV_{\text{Kern}}}_{S_{mn}^{\text{vib}}}. \quad (\text{Gl. 3.1-13})$$

Das Betragsquadrat des jeweiligen Schwingungsüberlappungsintegrals S_{mn}^{vib} wird auch *Franck-Condon-Faktor* genannt und spiegelt die Übergangswahrscheinlichkeit P_{mn}^{vib} der jeweiligen Schwingungsübergänge bei elektronischer Anregung wider:

$$|S_{mn}^{\text{vib}}|^2 = P_{mn}^{\text{vib}}. \quad (\text{Gl. 3.1-14})$$

In dieser Weise wird der jeweilige elektronische Übergang ($\mu_{mn}^{\text{el}} = \text{konst.}$) im Bereich der Nulllinie $\nu_{0,0} + \Delta\nu$ so moduliert, dass nicht ein einziger, sondern mehrere Schwingungsübergänge in höhere Schwingungszustände des angeregten Zustands wahrscheinlich werden und so die übliche Gestalt eines Absorptionsspektrums erhalten wird. Im umgekehrten Fall erhält man für die Emission ebenfalls ein Bandenspektrum, dessen Gestalt auch von den *Franck-Condon-Faktoren* der einzelnen Schwingungsübergänge geprägt ist und kleinere Werte $\nu_{0,0} - \Delta\nu$ annimmt. Wichtige Randbedingung für letzteren Fall ist, dass die Emission jeweils aus dem Schwingungsgrundzustand erfolgt. Hierbei ist die Gültigkeit der *Kasha-Regel* zu beachten, die aufgrund von Stoßprozessen und der damit verbundenen Schwingungsrelaxation Berechtigung findet. Der Absorptionsprozess kann jedoch ebenso aus höheren Schwingungszuständen des elektronischen Grundzustands erfolgen, da vielatomige Moleküle (wie kommerziell erhältliche organische Chromophore) meist energieärmere Schwingungszustände aufweisen, die entsprechend der *Boltzmann-Statistik* wahrscheinlicher besetzt sind als bei zweiatomigen Molekülen ($\Delta E_{\nu'_m \leftarrow \nu'_n} \gg kT$ für zweiatomige und $\rightarrow kT$ für mehratomige Moleküle, wobei der Schwingungszustand m energetisch höher als n liegt). Oftmals beobachtet man jedoch glatte, breite Chromophorbanden, da sich die Schwingungszustände energetisch in geringem Maße unterscheiden und zusätzlich in Rotationsniveaus aufspalten. Überdies kommt es durch Stoßereignisse gerade in kondensierter Phase und durch Wechselwirkung mit polaren Lösungsmitteln zu verbreiterten Bandenstruktur.

3.1.2 Entvölkerung von angeregten Zuständen

In einem Gedankenexperiment betrachten wir nun einen Fluoreszenzfarbstoff. Die Absorption eines Photons geeigneter Wellenlänge erfolgt innerhalb weniger Femtosekunden und ermöglicht schließlich den elektronischen Übergang (Anregung) vom Grund- in den angeregten Zustand des Fluorophors (Abbildung 6). Darüber hinaus besitzen die meisten organischen Verbindungen eine gerade Anzahl an Elektronen, die im Grundzustand gepaart sind – infolgedessen kann ein Gesamtspin $S = 0$ zugeordnet werden, was man in diesem Fall als Singulettgrundzustand (S_0) bezeichnen kann. Der bevölkerte erste angeregte Singulettzustand (S_1) dissipiert die, vom System aufgenommene, Photonenenergie hauptsächlich (i) strahlungslos durch innere Umwandlung von $S_1 \rightarrow S_0$ (*internal conversion, IC*) und Schwingungsrelaxation oder (ii) durch Emission eines Photons aus dem Schwingungsgrundzustand des S_1 und ist unabhängig von der Anregungswellenlänge (Regel von *Kasha*). Überdies stellt die spinverbotene Interkombination (*intersystem crossing, ISC*) zwar häufig einen unwahrscheinlichen, aber bedeutsamen Relaxationskanal dar. Der bevölkerte Triplettzustand (T_1) besitzt aufgrund des Spinverbots eine sehr lange Lebensdauer, welche letztendlich durch Schwingungsrelaxation oder Phosphoreszenz zum Fluorophorgrundzustand führt.^[4, 20-23]

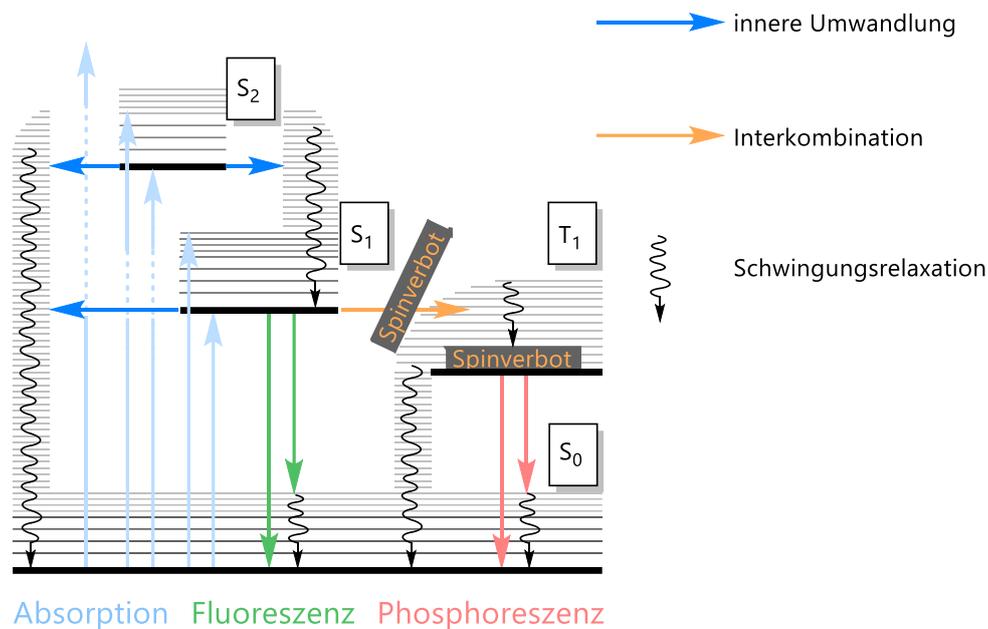


Abbildung 6: Jablonski-Diagramm. S_0 : Singulett-Grundzustand, S_1 : erster angeregter Singulett-Zustand, S_2 : zweiter angeregter Singulett-Zustand, T_1 : erster angeregter Triplett-Zustand, \uparrow : Absorption, \leftrightarrow : innere Umwandlung, \leftrightarrow : Interkombination, \downarrow : Fluoreszenzemission, \downarrow : Phosphoreszenzemission, \ddagger : Schwingungsrelaxation.

Weiter kann so für jeden Prozess eine Quantenausbeute angegeben werden, welche aus dem Quotient des jeweiligen Prozesses und der Summe aller Größen definiert ist.^[22, 24]

So gibt beispielsweise die Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_F das Verhältnis von Emission und absorbiertem Licht wieder:

$$\phi_F = \frac{k_F}{k_F + \sum k_{NR}} \quad (\text{Gl. 3.1-15})$$

(k_F , k_{NR} sind die Geschwindigkeitskonstanten der Fluoreszenzemission und nicht-strahlender Prozesse)

und ginge gegen 1 für einen idealen Fluorophor.^[22-23]

Darüber hinaus stellt die Fluoreszenzlebensdauer τ_F eine, in Hinblick auf mikroskopische Methoden, einfacher zugängliche Größe dar und ist definiert als reziproke Summe der Geschwindigkeitskonstanten strahlender und nicht-strahlender Prozesse.^[22]

$$\tau_F = \frac{1}{k_F + \sum k_{nr}} \quad (\text{Gl. 3.1-16})$$

Im Falle von Cyanin-Styryl-Farbstoffen handelt es sich um $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge, wodurch sich der Gleichgewichtsabstand im angeregten Zustand vergrößert. Die ultraschnelle Absorption regt den Fluorophor in der oben genannten Zeit an, wobei die Kernwellenfunktion im Vergleich zum leichten Elektron erhalten bleibt (vertikale Anregung, siehe Kapitel 3.1.1). Durch Reorganisation der Solvathülle kommt es zu einer Energieabsenkung des angeregten Zustandes und zur Energieanhebung des Grundzustandes. Wie gehaltvoll diese einzelnen Beiträge sind, hängt von der Art und Stärke der Wechselwirkung zwischen dem Fluorophor (im Grund- und angeregten Zustand) und seiner Umgebung ab. Hierbei ergibt sich ein im Idealfall zum Absorptionsspektrum spiegelbildliches und zu größeren Wellenlängen verschobenes Emissionsspektrum. Die Energiedifferenz des energieärmsten Absorptions- und energiereichsten Emissionsmaximum wird *Stokes-Verschiebung* λ_{Stokes} genannt.^[22]

Durch die oben eingeführte Fluoreszenzlebensdauer τ_F und *Stokes-Verschiebung* λ_{Stokes} können in der Fluoreszenzbioanalytik Rückschlüsse auf die direkte Fluorophorumgebung gezogen werden. Überdies ist eine große *Stokes-Verschiebung* λ_{Stokes} vorteilhaft für das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis und ermöglicht eine dichtere Fluorophormarkierung mit nur einem Fluoreszenzfarbstoff, da die Energietransferrate entsprechend kleiner wird und ansonsten in einer ausgeprägten Fluoreszenzlöschung resultieren würde.

Der *Förster-Resonanzenergietransfer* (FRET) ist ein strahlungsloser Energietransfer von einem angeregten Donormolekül auf ein Akzeptormolekül, das sich im Grundzustand befindet.^{[24] [22, 24]} Über die Dipol-Dipol-Wechselwirkungen findet hierbei die in besonderem Maße abstandsabhängige Übertragung der Energie statt und ist wie folgt definiert:^[25]

$$k_{FRET} = \frac{1}{\tau_D} \cdot \left(\frac{R_0}{r}\right)^6 \quad (\text{Gl. 3.1-17})$$

(τ_D die Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffes in Anwesenheit des Akzeptors, R_0 der sogenannte *Förster-Radius*, r der Abstand zwischen Donor- und Akzeptorfluorophors).

Der *Förster-Radius* spiegelt hierbei den Fluorophorabstand bei 50 % Energietransfer-Effizienz wider und ist proportional zum spektralen Überlappungsintegral $J(\lambda)$, der Donor-Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_{Do} , dem Orientierungsfaktor κ^2 und dem Brechungsindex η zwischen beiden Fluorophoren:

$$R_0^6 = \frac{9000 \cdot \ln(10) \cdot \kappa^2 \cdot \phi_{Do} \cdot J(\lambda)}{128 \cdot \pi^5 \cdot \eta^4 \cdot N_A} \quad (\text{Gl. 3.1-18})$$

Zur Mehrfachmarkierung von Biomolekülen mit nur einem Fluorophor (homo-FRET) sollte demnach das spektrale Überlappungsintegral klein sein und für hetero-FRET-Systeme, wie "DNA/RNA Traffic Lights", entsprechend groß sein.^[7, 22-23, 26-29]

$$J(\lambda) = \int_0^\infty I_{Do}(\lambda) \cdot \varepsilon_{Ak}(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda. \quad (\text{Gl. 3.1-19})$$

3.2 Photostabilität von Cyanin-Styryl-Farbstoffen

Im vorherigen Kapitel konnten die Voraussetzungen für die Be- und auch Entvölkerung von angeregten Zuständen eines Fluorophors mit den wichtigsten Kenngrößen vermittelt werden. Um langfristige Beobachtungen innerhalb lebender Zellen zu ermöglichen, muss der vorzugsweise helle Fluorophor bei stetiger Anregung langanhaltend stabil bleiben. Demnach ist mit einer Fluoreszenzintensitätsabnahme im zeitlichen Verlauf zu rechnen – insofern der angeregte Fluoreszenzfarbstoff photochemisch aktiv ist. Neben der irreversiblen Zerstörung des Fluorophors, was als Photobleichen bezeichnet wird, kann auch ein Übergang in einen langlebigen Dunkelzustand erfolgen. Gerade in der Einzelmolekülspektroskopie ist der Triplettzustand eines Fluorophors wegen seiner langen Lebensdauer als Dunkelzustand anzusehen. Weiter konnte gezeigt werden, dass durch Entfernung von molekularem Sauerstoff ($\sim 0.3 \text{ mM}$) eine Erhöhung der Photostabilität erzielt werden konnte. Entsprechend verlängert sich die Lebensdauer des Triplettzustands und der Fluorophor verbleibt länger im Dunkelzustand. Dieser Umstand zeigt nicht nur die kritische Rolle von molekularem Sauerstoff, sondern viel mehr auch, dass Triplettzustände in Bezugnahme auf einzelmolekülspektroskopische Untersuchungen durch Entfernen von molekularem Sauerstoff aus dem Medium in ihrer zeitlichen Auflösung eingeschränkt werden. Molekularer Sauerstoff löscht demnach den Triplettzustand des Fluorophors, also verkürzt die Lebensdauer von Dunkelzuständen, durch Triplett-Triplett-Löschung (*triplet-triplet annihilation*, TTA) oder photoinduziertem Elektronentransfer (pET). Hierbei wird entweder Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) und der Fluorophor im Grundzustand oder das Superoxid-Radikalanion (O_2^-) und das Radikalkation des Farbstoffes gebildet (Abbildung 7 und 8). Beide Sauerstoffverbindungen zählen zu den reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) und sind hauptverantwortlich für das Photobleichen von Fluoreszenzfarbstoffen in der zellulären Bildgebung. [3-4, 11-17, 20, 22-23]

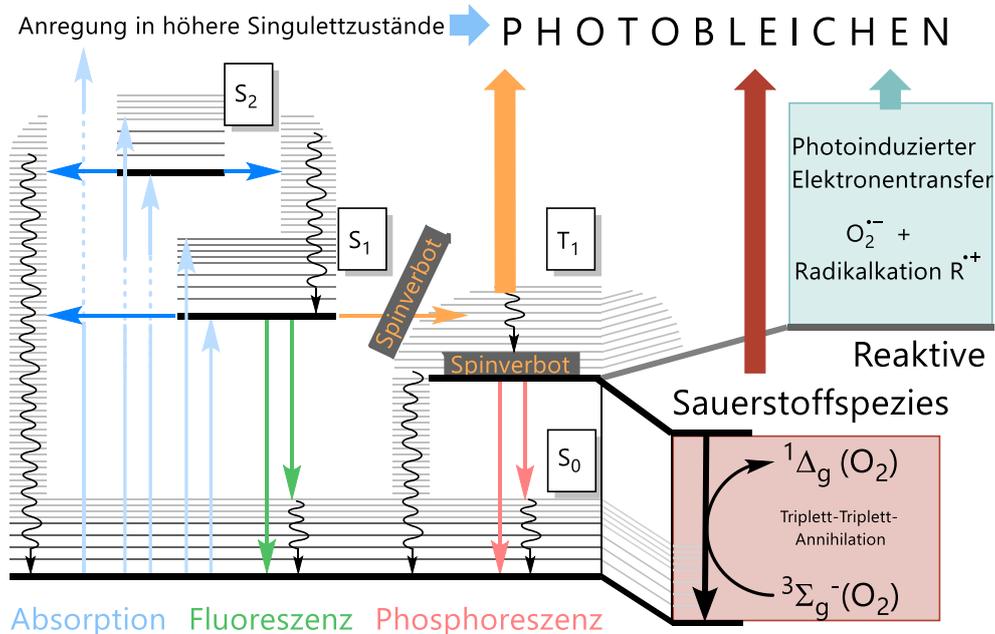


Abbildung 7: Jablonski-Diagramm und 3D-Veranschaulichung der Triplett-Löschung durch molekularen Sauerstoff. S_0 : Singulett-Grundzustand, S_1 : erster angeregter Singulett-Zustand, S_2 : zweiter angeregter Singulett-Zustand, T_1 : erster angeregter Triplett-Zustand, O_2^- : Superoxid-Radikalanion, R^+ : Fluorophor-Radikalkation, $^1\Delta_g/{}^3\Sigma_g^-(\text{O}_2)$: molekularer Sauerstoff im Singulett- bzw. Triplett-Zustand, \uparrow : Absorption, \leftrightarrow : innere Umwandlung, \rightarrow : Interkombination, \downarrow : Fluoreszenzemission, \downarrow : Phosphoreszenzemission, \ddagger : Schwingungsrelaxation.

Welcher initiale Prozess (TTA oder pET) zum Photobleichen führt, hängt mit der Fluorophorkonzentration, der energetischen Lage des Triplettzustandes und/oder dessen Redoxpotential zusammen. So muss der Fluorophor-Triplettzustand energetisch um 94.7 kJ/mol (1269 nm bzw. 7918 cm⁻¹)^[30] über dem Singulett-Grundzustand liegen, sodass die Triplett-Triplett-Löschung in der Bildung von Singulett-Sauerstoff resultiert. Dies ist im Prinzip für die meisten Fluorophore, die im sichtbarem Licht oder nahem Infrarot absorbieren, erfüllt. Weiter ist auch ein Singulett-Triplett-Energietransfer denkbar, jedoch ist die Lebensdauer der angeregten Fluorophor-Singulettzustände im Bereich von wenigen Nanosekunden und somit signifikant kleiner als die Triplett-Lebensdauer organischer Fluorophore. Aufgrund der kurzen Lebensdauer von angeregten Singulett-Zuständen ist die Stoßwahrscheinlichkeit mit Triplett-Sauerstoff klein.^[31] Dementgegen kann durch Oxidation mit Triplett-Sauerstoff das Superoxid-Radikalanion und das entsprechende Fluorophor-Radikalkation gebildet werden. Hierbei beträgt das Standardelektrodenpotential $E^0(^3\text{O}_2 / \text{O}_2^-) = -0.33 \text{ V}$ ^[32] und veranschaulicht die schwächere Oxidationskraft von Triplett-Sauerstoff im Vergleich zu Singulett-Sauerstoff [$E^0(^1\text{O}_2 / \text{O}_2^-) = +0.65 \text{ V}$].^[33] Das hierbei gebildete Superoxid-Radikalanion ist aufgrund seiner negativen Ladung ein besseres Reduktions- statt Oxidationsmittel [$E^0(\text{O}_2^- / \text{O}_2^{2-}) = -1.7 \text{ V}$]. Weiter ist das Superoxid-Radikalanion basisch und kann durch Abstraktion eines Protons ($\text{pK}_s = 4.8$)^[34-35] das ungeladene Hydroperoxyl-Radikal (HO_2^\cdot) bilden, welches ein starkes Oxidationsmittel darstellt und zu Wasserstoffperoxid reduziert wird [$\text{pK}_{s1} = 11.7$, $E^0(\text{HO}_2^\cdot, \text{H}^+ / \text{H}_2\text{O}_2) = +1.1 \text{ V}$].^[36-37] Letztere reaktive Sauerstoffspezies ist ein nur schwaches Ein-Elektronen-Oxidationsmittel [$E^0(\text{H}_2\text{O}_2, \text{H}^+ / \text{HO}^\cdot, \text{H}_2\text{O}) = +0.38 \text{ V}$],^[37] das intrazellulär im Rahmen einer *Fenton*-Reaktion das Hydroxyl-Radikal (HO^\cdot) bilden kann (Abbildung 8). Das Hydroxyl-Radikal besitzt ein besonders hohes Standardelektrodenpotential von $E^0(\text{HO}^\cdot, \text{H}^+ / \text{H}_2\text{O}) = +2.31 \text{ V}$ ^[36] und stellt die reaktive Sauerstoffspezies mit größter Oxidationskraft dar. Schließlich limitiert die Fluorophorkonzentration die Reaktivität gegenüber der gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies. Die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff ist 3.1 μs ^[38] und die des Superoxid-Radikalanions 50 μs (ohne Radikalfänger)^[39] in Wasser. Hieraus wird klar, dass Fluorophormoleküle mit steigendem Verdünnungsgrad nicht mehr innerhalb der Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff erreicht werden können. Die zurücklegbare Distanz d der jeweiligen Sauerstoffspezies kann mit einem mittleren Diffusionskoeffizienten $D = 2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 / \text{s}$ ^[40] und der jeweiligen Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff bzw. des Superoxid-Radikalanions über $d = (6D\tau)^{1/2}$ angenähert werden.^[41] So legt Singulett-Sauerstoff eine mittlere Distanz von ~193 nm zurück während das Superoxid-Radikalanion innerhalb einer Lebensdauer eine Distanz von ~775 nm zurücklegt. In einem Gedankenexperiment beträgt der mittlere Abstand zwischen den Fluorophormolekülen in 2.5 μM Lösung bereits ~873 nm [$a = (V/N_i)^{1/3}$], was mehr als der vierfachen Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff entspricht. Demnach ist der photoinduzierte Elektronentransfer (pET) in fluoreszenzbioanalytische Anwendungen (meist im nanomolaren Bereich) als initialer, dominierender Mechanismus des Photobleichens anzunehmen, wobei hierbei nicht von einer räumlichen Anreicherung der jeweiligen Fluorophore *in vivo* ausgegangen wird.

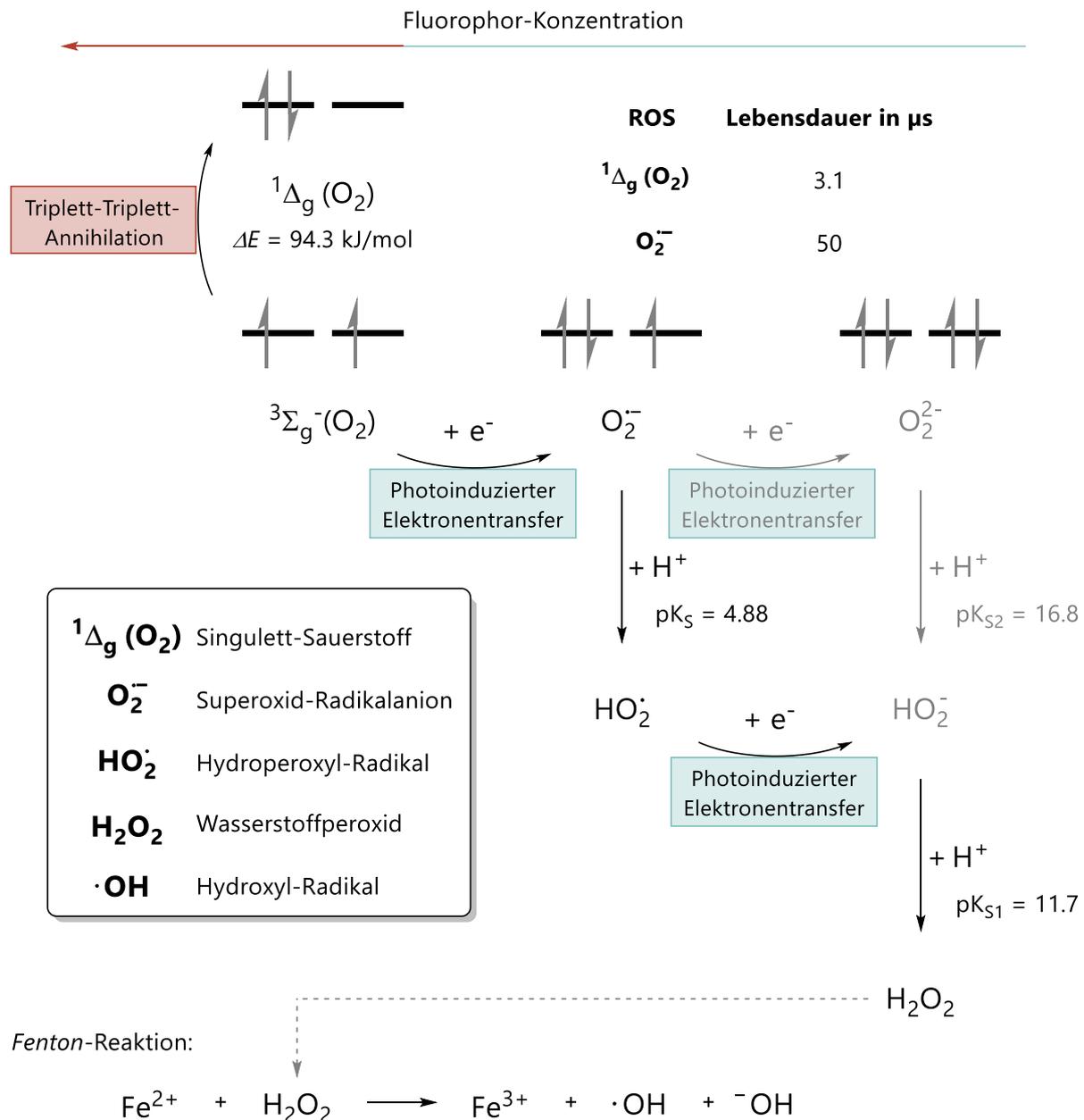


Abbildung 8: Pi^* -Orbitale der Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies, sowie deren Bildung, Lebensdauer und Säurekonstante in Wasser (oben) und Fenton-Reaktion zur Bildung von Hydroxyl-Radikalen.^[34-35, 37-39, 42-45]

Blanchard *et al.* synthetisierten gezielt verschiedene Fluorophore (Cy5, ATTO 647N, ATTO 655) mit kovalent angebundenen Schutzstrukturen (Cyclooctatetraen, Trolox und NBA) und konnten zeigen, dass hierdurch die Lebensdauer des jeweiligen Triplettzustands wie auch deren Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeuten abnehmen (Abbildung 9). Weiter ist für die Bildung von $^1\text{O}_2$ eine Abhängigkeit von der Fluorophorkonzentration zu beobachten. Bei kleinen Fluorophorkonzentrationen ist demnach die Wahrscheinlichkeit geringer, dass ein Fluorophor und $^1\text{O}_2$ stoßen, und innerhalb der Lebensdauer von $^1\text{O}_2$ reagieren. Ebenso zeigten die untersuchten Fluorophore eine geringere Bildung von Hydroxyl-Radikalen bei Konjugation von Schutzstrukturen, was entsprechend zu einer verringerten Phototoxizität der Farbstoffe selbst führt. Im direkten Vergleich zeigte Cy5 und dessen Konjugaten eine geringere Bildung von $^1\text{O}_2$ und HO^{\cdot} im Vergleich zu ATTO 647N und ATTO 655.^[46]

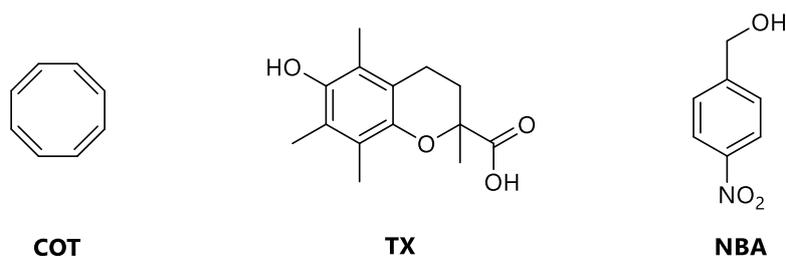


Abbildung 9: Die Triplet-Zustandslöscher Cyclooctatetraen (COT), Trolox (TX) und Nitrobenzylalkohol (NBA).

Die Triplettlöschung des Cy5-COT-Konjugat erfolgte hierbei über einen Dexter-Energietransfer-Mechanismus, wobei die Trolox- und NBA-Konjugaten durch ihre Redoxaktivität über dunkle Radikalkationen/-anion den Triplet- und selbst den Singulett-Zustand löschen. Demnach sind letztere Konjugate weniger hell. Da der erste angeregte Singulett-Zustand von COT energetisch über dem des Cy5 liegt, kommt es zu keiner Verschlechterung der Helligkeit dieses Konjugates. Dieser Triplet-Singulett-Energietransfers ist kollisionsbasiert, weshalb die kovalente Knüpfung der Löscher mit kurzem Linker von Vorteil ist.^[3-4, 13, 17, 20, 47-48]

COT (Abbildung 9) mit dessen nicht-konjugierten, elektronenreichen Doppelbindungen reagiert jedoch ebenfalls mit Singulett-Sauerstoff. Durch Reaktion mit ROS geht die Funktion als Triplet-Zustandslöscher verloren. Durch kovalente Knüpfung per Amid-Bindung wird die Elektronendichte dahingehend reduziert und die Oxidierbarkeit gegenüber ROS vermindert.^[49]

Hahn *et al.* synthetisierten ein Merocyanin mit Nitril-Funktion am α -Kohlenstoffatom der Brücke und vermieden auf diese Weise die Reaktion mit Singulett-Sauerstoff (S-SO-CN). Alle Messungen wurden hierbei in Methanol durchgeführt, wobei sich die quadratisch gemittelte Weglänge von Singulett-Sauerstoff mit 476 nm (in Methanol: $\tau = 9.4 \mu\text{s}$, $D = 4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$)^[50-51] wesentlich größer ist als in Wasser (*vide supra*). In Photobleich-Experimenten wurden 10 μM der entsprechenden Farbstoffe belichtet, was einem mittleren Fluorophorabstand von 550 nm [$a = (V/N_i)^{1/3}$] entspricht und innerhalb weniger als zwei Lebensdauern erreicht werden kann. Die Reaktivität gegenüber Singulett-Sauerstoff wurde mit dem Sensibilisator Methylenblau verifiziert, wobei darauf geachtet wurde, dass der zu untersuchende Fluorophor nicht angeregt wurde. Weiter konnte per LC-MS ein Benzothiazolon-Derivat isoliert werden, was auf die vorhergehende Bildung eines Dioxetans und in diesem Kontext auf die elektrophile Natur von Singulett-Sauerstoff schließen lässt (Abbildung 10).^[52]

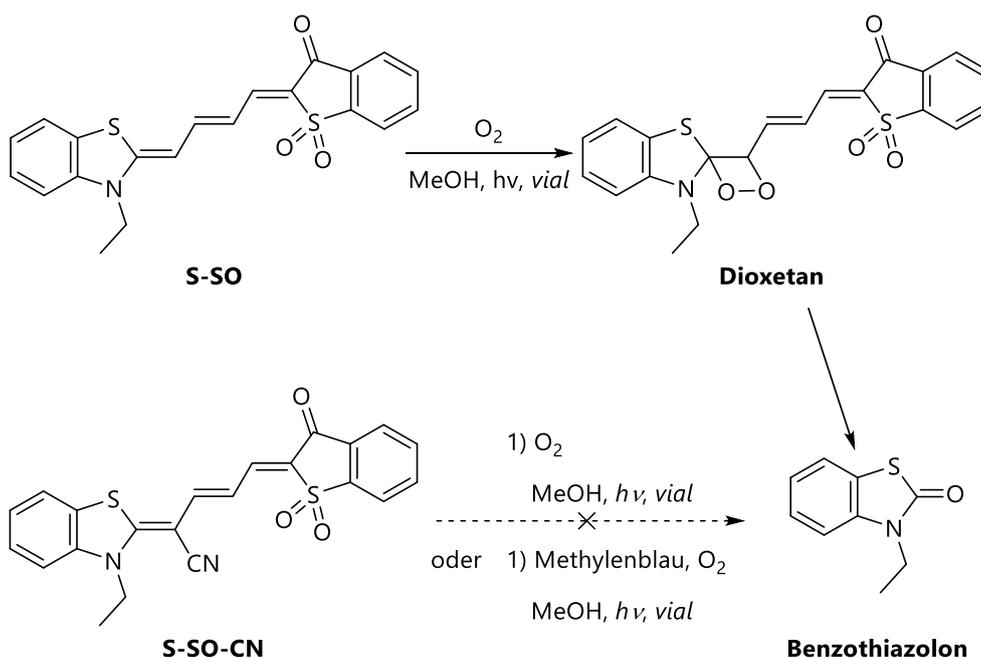


Abbildung 10: Photobleichen von S-SO und Hahn et al. vorgeschlagener Mechanismus.^[52]

Im Gegensatz zu Hahn perfluorinierten Armitage et al. den Benzothiazol-Kern (F8-S5) und untersuchten Aggregationsverhalten wie auch die Photostabilität der Farbstoffe S5 und F8-S5 (Abbildung 11). Hierbei konnte ein um 50 % verminderter Extinktionskoeffizient in Methanol der Perfluorierung zugeschrieben werden. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Bildung von H-Aggregaten durch Perfluorierung beider Benzothiazol-Kerne stark vermindert werden kann. Ebenso konnte Photostabilitätssteigerung in drei gemittelten Experimenten bei gleicher Belichtungsdauer beobachtet werden. Nach zweiminütiger Belichtung in 20 % Methanol in NaPi-Puffer (10 mM, pH 7) wird der Farbstoff S5 um 32 % gebleicht, während F8-S5 lediglich eine Absorbanzabnahme um 9 % zeigt.^[53]

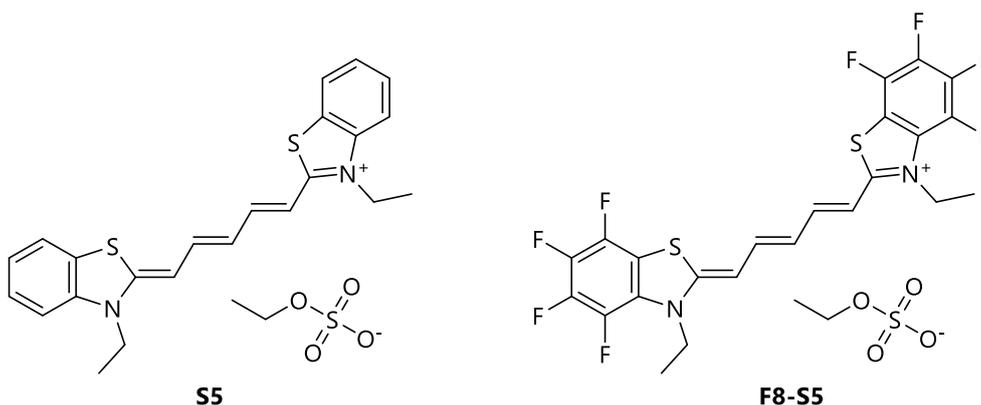


Abbildung 11: Struktur von S5 und dem von Armitage et al. synthetisierten perfluorierten Analogon F8-S5.

Dieses Experiment sollte mit dem Singulett-Sauerstoff-Sensibilisator Eosin Y bestätigt werden und zeigt einen ähnlichen Trend wie bei direkter Fluorophoranregung. Dabei wurde ein Bandpass-Filter bis 525 nm verwendet, obwohl die in diesem Spektralbereich eine leichte Absorbanz der Fluorophore ersichtlich ist. Aufgrund des weit rotverschobenen Absorptionsmaximum des Eosin Y und kleinen pK_s-Werten (pK_{s1} = 2.0 und pK_{s2} = 3.8 in Wasser)^[54] kann davon ausgegangen werden, dass das dianionische Salz des Eosin Y verwendet wurde.

Die Wechselwirkung der positiv-geladenen Farbstoffe **S5** bzw. **F8-S5** mit dem dianionischen Eosin Y sollte hierbei nicht außer Acht gelassen werden, da hierbei die Lebensdauer der angeregten Zustände stark beeinflusst werden kann. Die Wechselwirkung von **S5** bzw. **F8-S5** mit der dianionischen Form des Eosin Y lässt sich durch deren unterschiedliche Fluoreszenzintensität bei An- und Abwesenheit von Eosin Y erahnen – jedoch sind in beiden Fällen keine Angaben zu (in vermutlich beiden Experimenten gleich großen) spektralen Spaltbreiten gemacht worden.^[53] Weiterhin sollte ebenfalls ein Energietransfer von Eosin Y auf den jeweiligen Fluorophor in Betracht gezogen werden, was die Reaktivität gegenüber Singulett-Sauerstoff nicht mehr lichtunabhängig macht. Mit großer Wahrscheinlichkeit wurde aus diesem Umstand heraus der Trend aus den Photobleich-Experimenten wiederholt bestätigt.

Umgekehrt zeigen Experimente von *Wagenknecht et al.*, dass die aufgeführte Grundzustandwechselwirkungen die Lebensdauer der angeregten Zustände des Photosensibilisators maßgeblich beeinflussen.

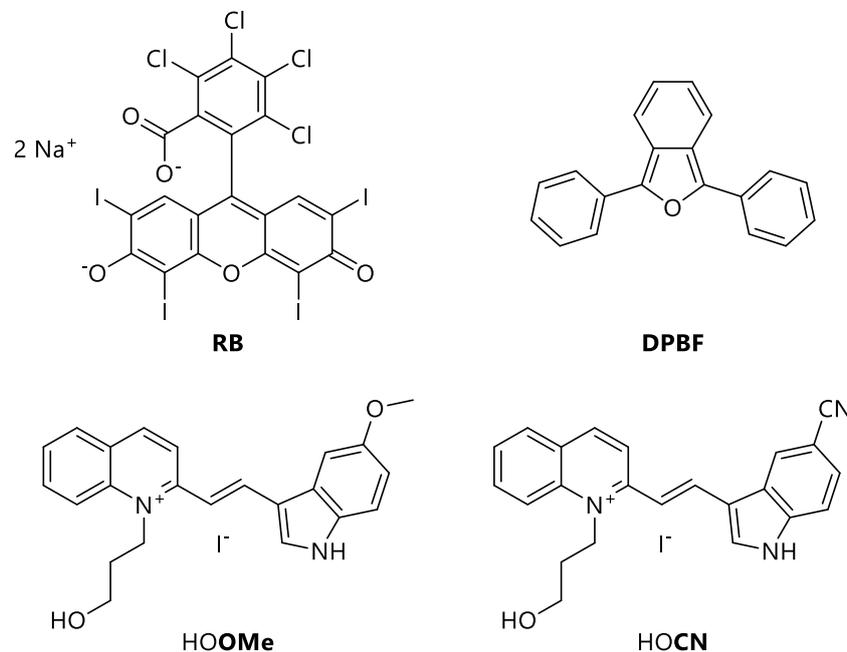


Abbildung 12: Struktur des ¹O₂-Sensibilisators Bengalrosa (RB), des ¹O₂--Löschers 1,3-Diphenylisobenzofuran (DPBF) und der Cyanin-Styryl-Farbstoffe HOOMe und HOCN.

So zeigte der Einsatz des Singulett-Sauerstoff-Sensibilisators Bengalrosa als Natriumsalz (*rose bengal*, **RB**) im ersten Versuch mit den Farbstoffen HOOMe bzw. HOCN (Abbildung 12) eine unterschiedliche Fluoreszenzquantenausbeute. Demnach ändern sich die Lebensdauern der angeregten Zustände in unterschiedlicher Wechselwirkung mit den kationischen Fluorophoren Während bei dem Photobleich-Experiment mit HOOMe die Absorbanz des Bengalrosa nicht abnahm, war eine deutlich beschleunigte Abnahme mit dem Fluorophor HOCN ersichtlich. Mit dem Singulett-Sauerstofflöscher 1,3-Diphenylisobenzofuran (**DPBF**) als Positivkontrolle konnte die direkte Reaktivität gegenüber Singulett-Sauerstoff gezeigt werden (Abbildung 13).^[55]

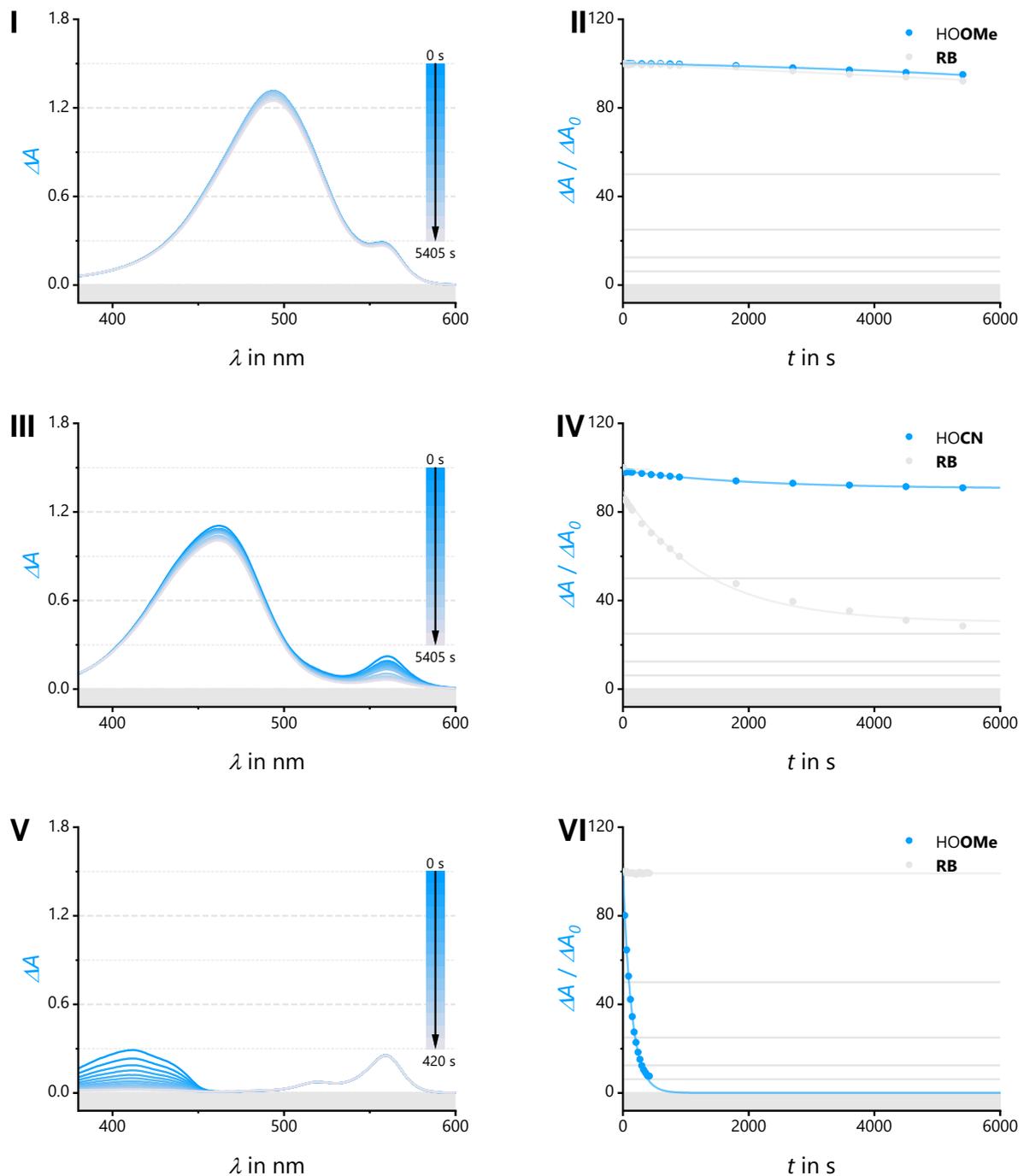


Abbildung 13: Thermisches Bleichen von 25 μM HOOMe (I, II), HOCN (III, IV) und DPBF (V, VI) mit 2 μM RB als Singulett-Sauerstoff-Sensibilisator in Ethanol. (RB angeregt mit einer 625 nm LED)

Wie oben schon angedeutet, ist die (in allen drei Fällen) veränderte Lebensdauer der angeregten Zustände maßgeblich verantwortlich hierfür. Aus diesem Grund unterscheiden sich die Emissionsspektren von Bengalrosa in Anwesenheit von HOOMe oder HOCN (Abbildung 14).

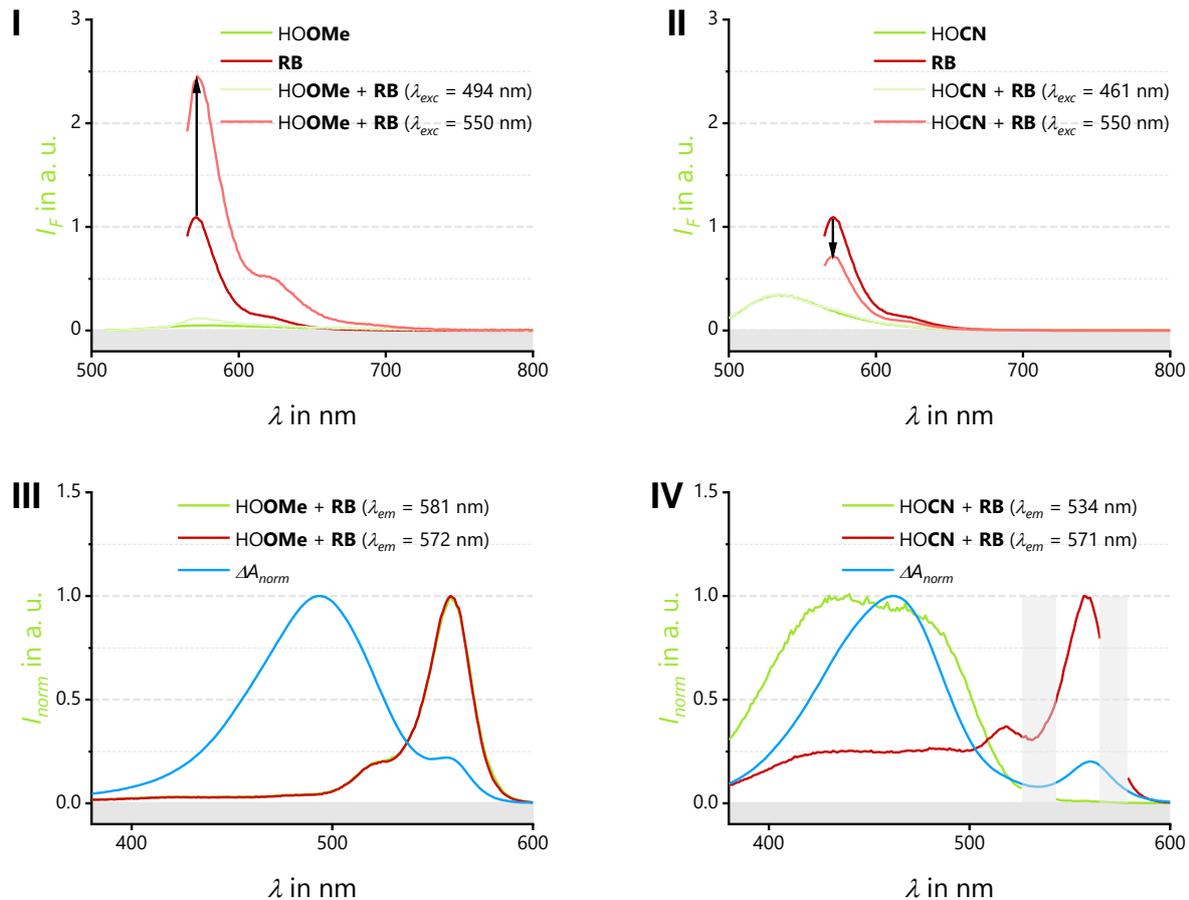


Abbildung 14: Emissionsspektren der Fluorophore HOOMe (I) und HOCN (II) in An- und Abwesenheit von RB bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen und die korrespondierenden, intensitätsnormierten Anregungsspektren im Vergleich zur intensitätsnormierten Absorbanz (III, IV). (25 μ M Farbstoff, 2 μ M RB in Ethanol)

Da die Anregungsspektren der Emission mit längerer Wellenlänge (RB) den Absorptionsspektren mit HOCN nicht ähneln, kann eine Grundzustandswechselwirkung angenommen werden. So kommt es zum Verlust der Kontrolle über den Singulett-Sauerstoff-Sensibilisator Bengalrosa. Im Falle des Farbstoffs HOOMe emittieren beide Fluorophore mit derselben Wellenlänge und daher zeigen die Anregungsspektren dasselbe Profil. Trotzdem zeigt die Anregung von Bengalrosa eine erhöhte Fluoreszenz, die teilweise auf ein Crosstalk von HOOMe zurückzuführen ist, aber deutlich höher ist als die summierten Spektren. Demnach kann eine Wechselwirkung von HOOMe und Bengalrosa nicht ausgeschlossen werden. Bengalrosa kann demnach nicht als Singulett Sauerstoff-Sensibilisator für das thermische Bleichen kationischer Cyanin-Styryl-Farbstoffe genutzt werden, da die Lebensdauer der angeregten Zustände durch verschiedene Farbstoffe unterschiedlich beeinflusst werden (Abbildung 14).^[55]

Neben dem perfluorierten F8-S5 wurden von Armitage *et al.* auch mono-, di-, tetrafluorierte und ein trifluormethyliertes TO-Derivat synthetisiert und untersucht (Abbildung 15). Hierbei konnte in gepufferter Salzlösung eine verminderte Aggregation der di- und tetrafluorierten Derivate (TO-p2F und TO-4F), sowie eine weit gesteigerte Photostabilität derer detektiert werden. Interessanterweise war das Photobleichen der Fluorophore in gepufferter Salzlösung schneller in Abwesenheit von DNA. Weiter konnte für keinen der Fluorophore (auch TO) ein Photobleichen in Methanol beobachtet werden.

Hieraus lässt sich ableiten, dass das Photobleichen durch Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeute bei Anlagerung an DNA verlangsamt wird und die Bildung von Singulett-Sauerstoff primär nicht zum Photobleichen beiträgt. Demnach ist die Hypothese wahrscheinlicher, dass unter Beteiligung der angeregter Triplett-Zustände Elektronentransfer-Prozesse (pET) zum Superoxid-Radikalanion führen, da die Diffusionslänge von Singulett-Sauerstoff größer ist in Methanol und sich nicht mit den Experimenten von *Armitage et al.* deckt (*vide supra*).^[56] Darüberhinaus ist literaturbekannt, dass die Umsetzung des Superoxid-Radikalanions in Methanol um zwei Größenordnungen schneller verläuft als in Wasser und bestärkt die pET-Hypothese in verdünnter Lösung weiter.^[57]

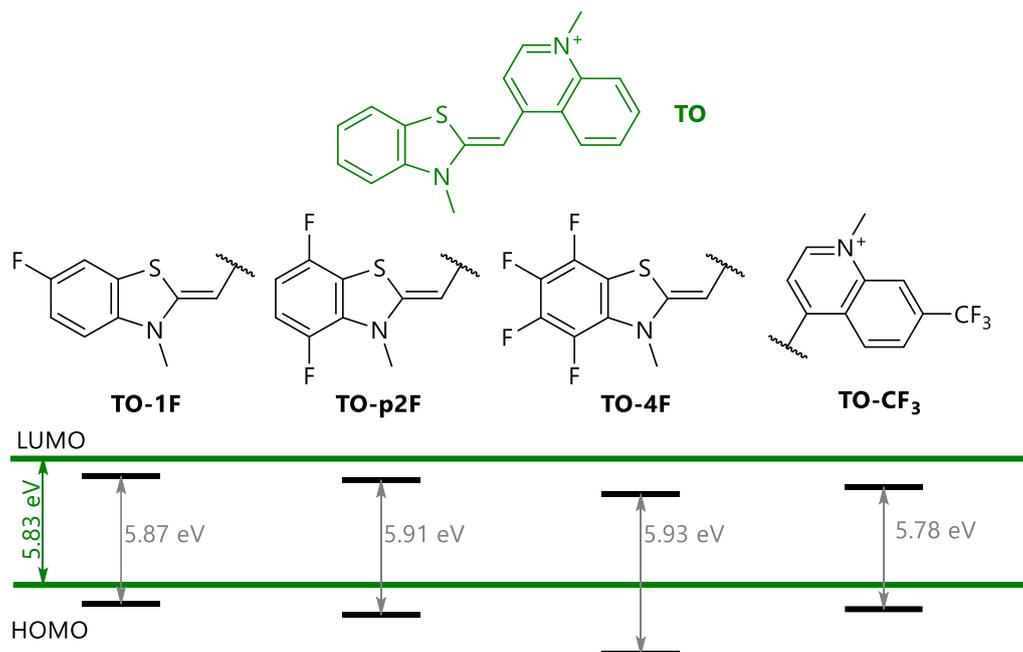


Abbildung 15: HOMO-/LUMO-Energien und vertikale Übergangsenergie von TO-Derivaten (TO, TO-1F, TO-p2F, TO-4F, TO-CF₃) im Vergleich.

Während mit steigendem Fluorierungsgrad des Benzothiazol-Teils das höchste besetzte Molekülorbital (HOMO) energetisch stärker abgesenkt wird, wird durch elektronenziehende Substituenten am Chinolinium-Teil das niedrigste unbesetzte Molekülorbital (LUMO) besser stabilisiert. Weiter vergrößert sich die vertikale Anregungsenergie durch Fluorierung des Benzothiazol-Kerns und verkleinert sich umgekehrt durch Trifluormethylierung des Chinolinium-Motivs (Abbildung 15). Die vertikale Anregungsenergie wurde hierbei über die Differenz der HOMO-/LUMO-Energien berechnet, die computerchemisch über eine semi-empirische, quantenchemische Methode (INDO, *Intermediate Neglect of Differential Overlap*) bestimmt worden sind. Daraus ergab sich eine Erklärung für die experimentell beobachtete bathochrome Verschiebung des Absorptions- bzw. Emissionsmaximum von TO-CF₃ und der vom Fluorierungsgrad-abhängigen hypsochromen Verschiebung der Absorptionsmaxima der am Benzothiazol derivatisierten Fluorophore (TO-1F, TO-p2F, TO-4F) im Vergleich zu TO. Demnach ist das HOMO gleichmäßig über das aromatische System verteilt und das LUMO am Chinolinium-Teil lokalisiert.^[56]

Weiter wurde von *Armitage et al.* der Ansatz von *Hahn* aufgegriffen, der die Einführung einer Nitrilfunktion am α -Kohlenstoff der Brücke des Fluorophors **DIR** (*Dimethylindole Red*)^[58] und auch **TO**^[59] vorsieht (Abbildung 16).

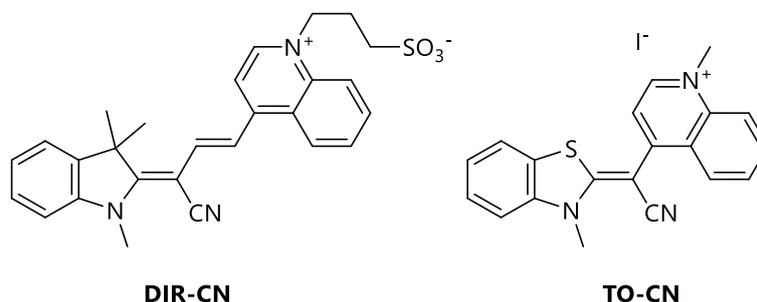


Abbildung 16: Struktur von **DIR-CN** und **TO-CN**.

Der Fluorophor **DIR** und **DIR-CN** wurden in diesem Kontext in ihrer Photostabilität als auch in ihrer Bindung an das von Hefepilzen exprimierte Protein K7 untersucht und verglichen. Die so ermittelten Bindungskonstanten zeigten hierbei eine schwächere Bindung von **DIR-CN** an das Protein (~63 nM vs. 10 nM) und eine kleinere Fluoreszenzquantenausbeute (0.18 vs. 0.33) als der Leitfluorophor **DIR**. Weiterhin wurden die Photostabilitätsuntersuchungen in viskosem Medium (90 % Glycerin) und in am Protein gebundener Lösung durchgeführt. **DIR-CN** zeigt hierbei in beiden Fällen eine gesteigerte Photostabilität, die als angelagerter Fluorophor signifikant größer ist. Bei gleicher Fluoreszenzquantenausbeute (in 90 % Glycerin bzw. angelagert an K7) kann hieraus auf einen schützenden Effekt der Proteinmatrix geschlossen werden. In einer lichtunabhängigen Reaktion (häufig als *thermal bleaching*, thermisches Bleichen, bezeichnet) wurden **DIR** und das cyanomodifizierte Analogon in einer molybdatkatalysierten Reaktion mit Singulett-Sauerstoff umgesetzt. Während **DIR** nach 40 min um 42 % bleicht, wird **DIR-CN** lediglich um 8 % gebleicht. In einem wiederholten Experiment zeigten *Armitage et al.* in 90 % D₂O ein beschleunigtes Bleichen des Fluorophors **DIR**, was sie direkt mit der verlängerten Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in D₂O begründen. In Anwesenheit des Proteins K7 (äquimolar zum Fluorophor) bleicht **DIR** nur um 20 % und bestärkt den schützenden Effekt des Proteins im nicht-kovalenten Protein Konjugat. Dementgegen wird kein beschleunigtes Bleichen von **DIR** in 90 % D₂O und der Anwesenheit von K7 beobachtet, worauf durch *Armitage et al.* nicht weiter eingegangen wurde.^[58]

TO-CN (Abbildung 16) zeigte in Photobleichexperimenten in phostgepufferter Salzlösung und 90 % Glycerin keinen Verlust der Absorbanz. **TO** dagegen wurde in 90 % Glycerin um 23 % und in phosphatgepufferter Salzlösung um 69 % nach 60 min. Die höhere Photostabilität in viskosem Medium (90 % Glycerin) kann hierbei auf die gesteigerte Fluoreszenzquantenausbeute des **TO** als auch auf verminderte Konzentrationen an gelöstem Sauerstoff zurückgeführt werden. Weiterhin kann auch von einer unterschiedlichen Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff bzw. einem veränderten Diffusionskoeffizienten in 90 % Glycerin ausgegangen werden. In thermischen Bleichexperimenten zeigte **TO-CN** ebenfalls keine Reaktivität gegenüber Singulett-Sauerstoff. Nachteilig wirkte sich die Nitrilfunktion jedoch in der Responsivität gegenüber Nukleinsäuren aus. So kann der Fluorophor durch Anlagerung an Nukleinsäuren nicht planarisieren und zeigt im Vergleich zu **TO** keinen nennenswerten Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute.^[59]

Wagenknecht et al. synthetisierten ein nitrilfunktionalisiertes Derivat des Thiazolrot (**TR**) zur Steigerung dessen Photostabilität (Abbildung 17). Bemerkenswert hierbei war die starke hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums des **TR-CN** im Vergleich zu **TR** selbst. Weiterhin konnte so auch eine Vergrößerung der *Stokes*-Verschiebung von wenigen bis ~50 nm erzielt werden, was (i) zu einer verbesserten Separation von Anregungs- und Emissionslicht führt und (ii) die Selbstlöschung des Fluorophors mindert. In Anlagerungsexperimenten zeigten sich die weit verbesserten optischen Eigenschaften insbesondere in einer um Faktor 9 gesteigerten Photostabilität, um Faktor 3 gesteigerten Fluoreszenzquantenausbeute und der oben genannten *Stokes*-Verschiebung. Nichtsdestotrotz zeigen die Cyanine **TO**, **TR** und **TR-CN** eine nur geringe Photostabilität, weshalb von *Wagenknecht et al.* Cyanin-Styryl-Farbstoffe synthetisiert wurden, die – unsubstituiert – eine deutliche Steigerung der Photostabilität zeigen. *P. R. Bohländer* konnte in der hierbei in der geschickten Variation der Substituenten gezielte Stabilitätsparameter erschließen, die im nächsten Kapitel weiter erläutert werden.^[6-7, 9-10, 60-61] Grundständig hierfür war die diversitätsorientierte Studie von *Chang et al.*, die im Rahmen der kombinatorischen Synthese 1336 verschiedene Cyanin-Styryl-Farbstoffe hervorbrachte und deren Spezifität und Responsivität in einem Multi-Analyt-Screening untersuchten. Insbesondere **CyIQ** zeigte hierbei gute Eigenschaften als RNA-responsiver Fluorophor.^[62-65]

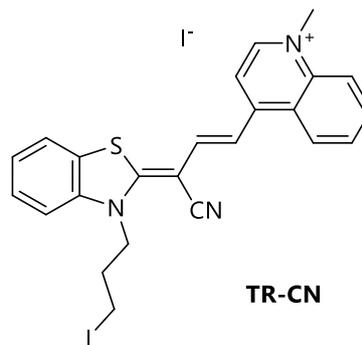


Abbildung 17: Struktur von **TR-CN**.

4 Photostabile Cyanin-Styryl-Farbstoffe

Mit dem Ziel besonders helle und photostabile Fluoreszenzfarbstoffe mit großer Stokes-Verschiebung zur fluoreszenten Bildgebung in lebenden Zellen zu entwerfen, wurden Variationen an einzelnen strukturellen Parametern vorgenommen. Unter der Grundannahme des physikalischen Widerspruchs: „Der Fluorophor soll keine bevölkerten angeregten Zustände besitzen“, begründet sich so die Optimierungsaufgabe als Balanceakt zwischen der energetischen Lage, Lebensdauer und Reaktivität der angeregten Zustände. Dieses Kapitel beschreibt die erforderlichen synthetischen Schritte zum Aufbau des Cyanin-Styryl-Farbstoffgerüsts und die gezielte Funktionalisierung dieser. Weiter wird hier auf die jeweiligen, in der Literatur kontrovers diskutierten, Photoabbaumechanismen eingegangen und eine Struktur-Reaktivität-Beziehung für Farbstoffe mit derivatisiertem Indol-Nukleus aufgestellt. Abschließend werden verschiedene Bleichexperimente mit definierten Konzentrationen an ROS betrachtet. Die ermittelten Daten zu diesem Kapitel sind in ihrer Gesamtheit im Experimententeil wiederzufinden (Seite 150f).

4.1 Einleitende Worte zum *Cyanine Indole Quinoline* (CylQ)

In der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* konnte der Polymethin-Farbstoff **CyIQ** (*Cyanine Indole Quinoline*) bereits für eine Vielzahl biologischer Untersuchungen angewandt werden. In diesem Zuge konnten *M. M. Rubner* und *P. R. Bohländer* eine erfolgreiche Synthesestrategie entwickeln, die es vorsieht, den alkoholfunktionalisierten Farbstoff in das jeweilige Bromid umzusetzen, wobei der Farbstoff zur kovalenten Bindung an Nucleinsäuren zum Azid umgesetzt wird.^[6, 9-10] Die kupfer(I)-katalysierte Huisgen-Alkin-Azid-Zykloaddition (CuAAC, *copper(I)-catalyzed azide alkyne cycloaddition*, Abbildung 18) an alkinmodifizierte Nucleinsäuren, unterschiedlichster Sequenzen, stellt indes eine weitere Expertise dieser Forschungsgruppe dar, um in einem interdisziplinären Umfeld (Ultrakurzzeitspektroskopie, Einzelmolekülspektroskopie, Ensembleuntersuchungen, Molekularbiologie, theoretische Chemie) innovative Lösungsansätze mit leistungsstarken Fluoreszenzreportern und hoher Spezifität zu erzielen.^[66-68] Nachfolgend sind die *Appel*-Reaktion, der Bromid-Azid-Austausch (nach S_N2), sowie die „Klick“-Konjugation an eine beliebige, alkinfunktionalisierte Nucleinsäure dargestellt:

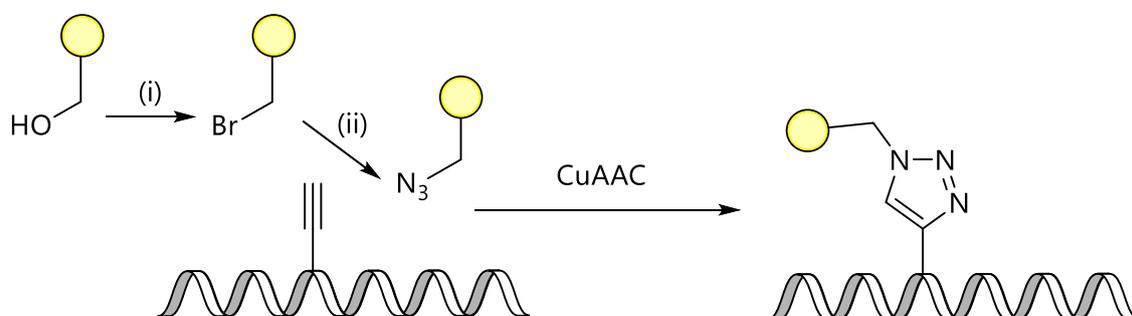


Abbildung 18: *Synthese eines Farbstoffazides und postsynthetische kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Zykloaddition (CuAAC) an einer alkinmodifizierten Nucleinsäure. (i) Appel-Reaktion: PPh₃, CBr₄, DCM, RT, 19 h, vial; (ii) Nucleophile Substitution 2. Ordnung: NaN₃, NaI, DMF, RT, 19 h, vial; CuAAC: [(CH₃CN)₄Cu]PF₆, TBTA, NaAsc, H₂O/(DMSO/tBuOH v:v=3:1) v:v=1:2.2, .60 °C, Mikroreaktionsgefäß.*

4.2 Exkurs: Nomenklatur von Cyanin-Styryl-Farbstoffen

Wie eingangs erwähnt, wird in diesem Kapitel ein Fluorophor-Set vorgestellt. Die Charakterisierung erfolgte hierbei per elektronischer Absorptionsspektroskopie und umfasst, neben Absorptions- und Emissionsspektren, auch zeitaufgelöste Einzelphotonenzählungen und absolute Fluoreszenzquantenausbeuten. Zur einfacheren Zuordnung von Messwert und Struktur wird das folgende Nomenklatursystem (Abbildung 19) für die vorliegende Dissertation eingeführt:

Optimierungsaufwand & Nomenklatur

1. Kovalente Bindung an Oligonukleotid:
Freier Farbstoff / an ssDNA / an dsDNA?
Präfix: Funktion / ss / ds

2. Derivatisierung des Chinoliniumteils:
 R^1 wird nur benannt, wenn nicht H.
OMe

3. Derivatisierung der Indolfunktion/
Substitution mit 7-Azaindol:
 R^2 werden immer benannt.
OMe **Br** 7-Azaindol **CN**

4. Methylierung / Alkylierung mit
Tripletzustandslöschern:
 R^3 immer benannt (außer H).
Indol-N: methyliert, oder
 CH_3 **3** . COT **8** .

Leitstruktur des CyIQ

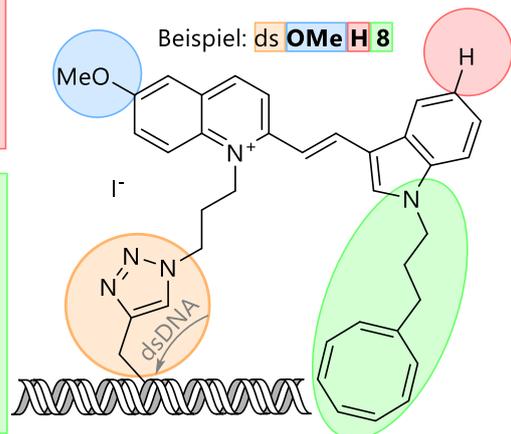
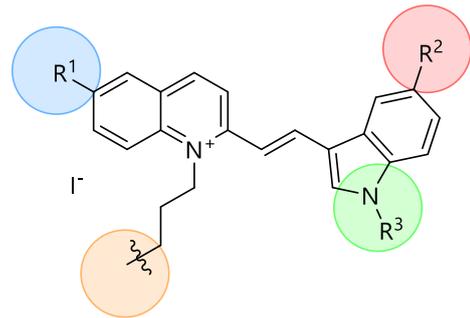


Abbildung 19: Nomenklatursystem zu vereinfachten Zuordnung von Struktur und Messwert. (Im Experimentaltteil, Seite 150f, sind alle Substanzen, den jeweiligen Bezeichnungen zugeordnet, aufzufinden.)

4.3 Eigenschaften von Cyanin-Styryl-Farbstoffen

Dem Strukturmotiv der Cyanin-Styryl-Farbstoffe gehen die Stilbene als einfachste Vertreter voraus. Diese lassen sich durch ein sehr breites, synthetisches Repertoire organischer Reaktionen herstellen. Gerade Varianten der Kreuzkupplungen können heute viele verschiedene Möglichkeiten zur Funktionalisierung bieten. Zum einen stellt die C-H-Bindung eine sehr starke Bindung dar und kann so nicht weiter substituiert werden. Zum anderen besitzen unterschiedliche C-H-Bindungen ähnliche Bindungsenergien und erschweren damit die Selektivität. Exemplarisch hierfür ist in Abbildung 20 eine beliebige Kreuzkupplung ohne weitere Spezifikation dargestellt, da je nach Substitutionsmuster der beiden Kupplungspartner ein geeignetes Übergangsmetall gewählt werden kann, welches im Rahmen einer Transmetallierung den zweiten Reaktionspartner auf den Palladiumkomplex überträgt. Gerade die Toxizität, wie auch die schlechte Abtrennbarkeit von Übergangsmetallkatalysatoren, erfordern eine neue Konzeptionierung der Synthesepipeline relevanter Substanzen. In diesem Zusammenhang stellt die *Peterson-Olefinierung* einen geschickten Clou dar, der den Einsatz von Übergangsmetallen vermeidet, und stabile Edukte (*bench stable*) erfordert. Hierbei wird durch Zugabe einer geringen Menge Fluorid der autokatalytische Mechanismus durch Bildung des Carbanions in Gang gesetzt.^[69]

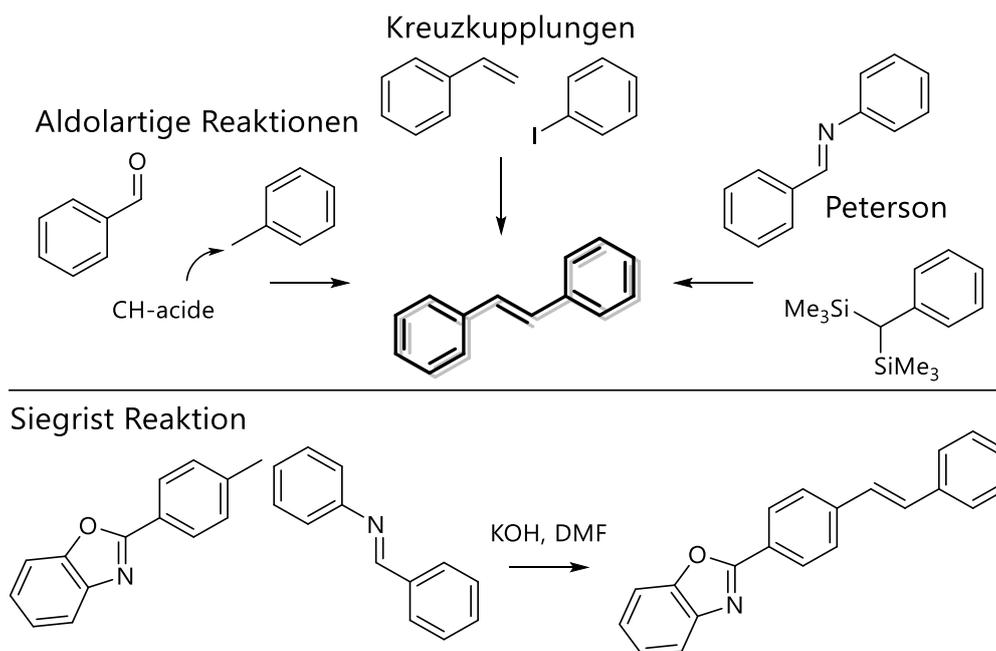


Abbildung 20: Ausgewählte Reaktionen zur Stilbensynthese.^[69-70]

Die verbleibenden zwei Reaktionen stellen im Rahmen dieser Dissertation jedoch eine große Bandbreite dar. Die von *Adolf Ernst Siegrist* entwickelte Synthesemethode zur Herstellung einer großen Anzahl an Stilbenen verdeutlicht weiter deren Robustheit.^[70] Triebkraft hierbei ist die Bildung von Anilin, welches aus der Reaktion als Nukleofug hervorgeht. Die Methylgruppe des 4-substituierten Toluolderivates ist dabei C-H-azide und greift nukleophil am Imin-Kohlenstoffatom an. Gängige Synthesen der kommerziell erhältlichen Fluorochrome (Cy3, Cy5, Cy7) gehen auf diese Synthese zurück, da die leicht zu deprotonierende Methylgruppe des begrenzenden Heterozyklus' nukleophil an einem Vorläufer-Molekül der Polyenkette angreift, und so die zweite Möglichkeit zur Substitution eröffnet (Abbildung 21).

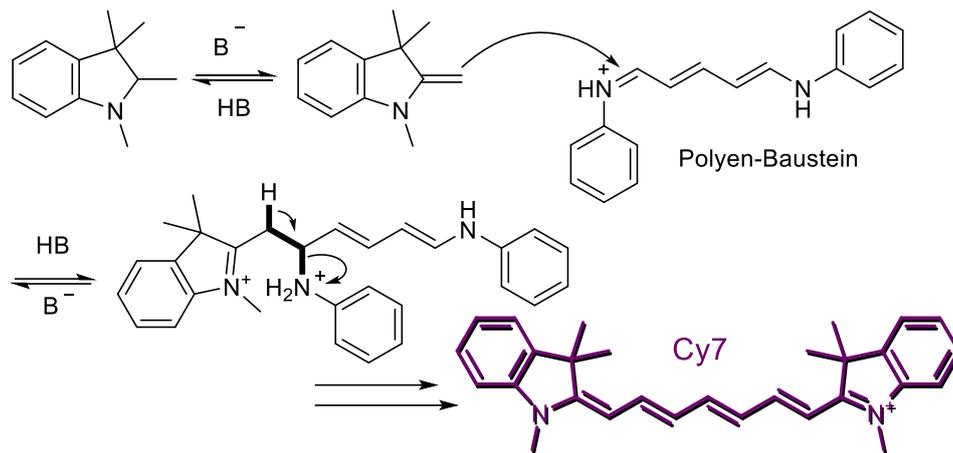


Abbildung 21: Synthese von Cy7 mit Hilfe der Siegrist-Reaktion.

Hierbei ist klar ersichtlich, dass das Nukleophil leicht gebildet wird, wodurch der Einsatz von Natriumacetat als Base ausreichend ist. Ebenso sind aldolartige Reaktionen zusammengefasst. Die Kombination einer ohnehin elektrophilen Carbonylfunktion mit einem guten Nukleophil ist Kernpunkt der verwendeten Synthesemethodik zur Herstellung von Cyanin-Styryl-Farbstoffen. Insbesondere 2- und 4-Methylpyridin (Picoline), wie auch deren benzo[*b*]-kondensierten Homologe 2- und 4-Methylchinolin, zeigen unter milden basischen Bedingungen sehr gute C-H-acide Eigenschaften. Nach Deprotonierung konnte per Kristallstrukturanalyse und theoretischen Berechnungen gezeigt werden, dass zwar die negative Ladung über den ganzen Aromaten verteilt wird, aber der Ladungsschwerpunkt am aza-allylischen Strukturmotiv liegt (Abbildung 22). Hier sind im Vergleich zum restlichen Molekül die Bindungslängen verkürzt, was die Bindungsstärke durch Konjugationseffekte gut beschreibt.^[71]

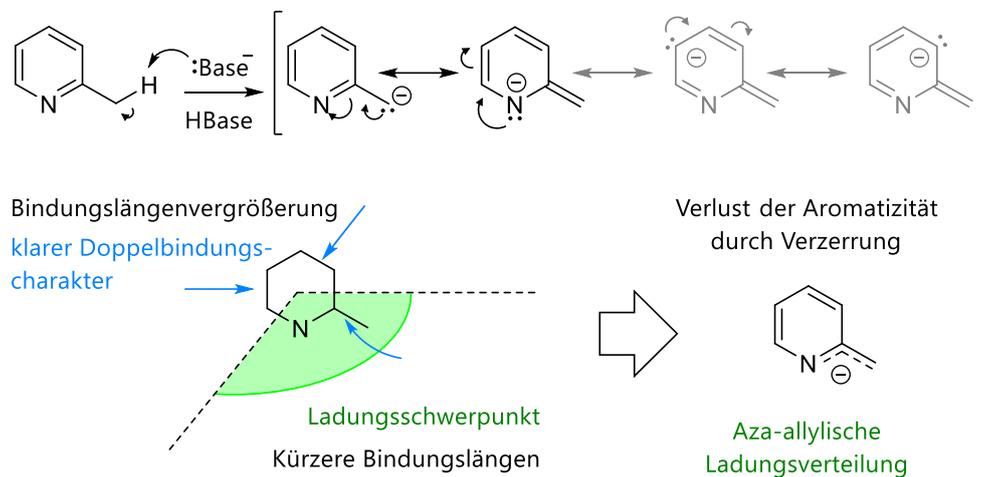


Abbildung 22: Struktur, Reaktivität und Ladungsdichteverteilung von deprotoniertem 2-Methylpyridin (2-Picolin).

Ein anderer Vorteil wird hierbei noch durch *N*-Alkylierung des jeweiligen Heteroaromaten erreicht, welche genau an dem Ort im Molekül stabilisiert, wo durch Deprotonierung die Elektronendichte ansteigt. Die Alkylierung mit 3-Iodpropanol ist in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* eine etablierte Methode, die eine spätere Funktionalisierung zur Biokonjugation ermöglicht.^[6-7, 9-10, 61]

Die so erhaltenen organischen Iodidsalze werden gemeinsam mit Piperidin als Base und auch Organokatalysator bei der Umsetzung von verschiedenen substituierten Indol-3-carbaldehyden genutzt, um Cyanin-Styryl-Farbstoffe mit Dimethinbrücke in durchweg guten Ausbeuten zu erhalten.

Mit dieser Reaktionsführung (Ethanol, 80 °C, 19 h, vial) konnten mehr als 16 verschiedene Cyanin-Styryl-Farbstoffe synthetisiert werden. Mit kleineren Ausnahmen liegen die Ausbeuten im oberen Drittel der theoretisch erreichbaren Quantität. Bezüglich der photophysikalischen Eigenschaften konnten *M. M. Rubner* und *P. R. Bohländer* ebenso wichtige Hinarbeiten liefern.^[6, 9-10] Im Rahmen dieser Arbeiten konnten folgende Strukturmerkmale untersucht und die Performance verschiedenster Cyanin-Styryl-Farbstoffe gesteigert werden:

Methylierung des Indolteils (Abbildung 23). Die, formal als elektronenschiebende Komponente anzusehende *N*-Methylierung des Indolteils bewirkte in allen zuvor synthetisierten Derivaten eine bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima. In 10% Ethanol in Wasser als Lösungsmittel konnte eine Rotverschiebung um 8-18 nm bzw. 300-1000 cm⁻¹ beobachtet werden. Nebenbei sei zu erwähnen, dass Cyanin-Styryl-Farbstoffe eine negative Solvatochromie zeigen. Während deren Absorptionsmaxima in phosphatgepufferter Salzlösung hypsochrom im Vergleich zum obigen Lösungsmittel verschoben sind, zeigen sie eine starke Rotverschiebung um 10-56 nm bzw. 700-2000 cm⁻¹. Eine Ausnahme stellen hierbei die grün emittierenden Fluorophore dar, die nur ein sehr schwaches negativ-solvatochromes Verhalten zeigen. Dies ist vermutlich durch deren bessere Löslichkeit in polaren Medien bedingt und erklärt das solvatochrome Verhalten der rot emittierenden, hydrophoben Fluorophore. Die Polarität der rot emittierenden Farbstoffe ist entscheidend verschieden zur Bindungstasche der doppelsträngigen DNA. Jedoch ist deren Polarisierbarkeit größer im Vergleich zu den grün emittierenden Farbstoffen, was deren ausgeprägtes solvatochromes Verhalten vermutlich erklärt und schließlich auf hydrophobe Wechselwirkungen zurückgeführt werden kann. Überdies konnte in allen Fällen eine Steigerung des Extinktionskoeffizienten, wie auch der Quantenausbeute bei Anlagerung an doppelsträngige DNA, und somit eine Steigerung der Helligkeit detektiert werden. Dieser Umstand deutet auf eine entscheidende Beteiligung des Indol-NH an der Entvölkerung des angeregten Zustands hin. So wird ein ultraschneller Protonentransfer auf das umgebende Lösungsmittel oder Anionen denkbar, der einen ungeladenen Cyanin-Styryl-Farbstoff hinterlässt bzw. inklusive Rückreaktion die eingeführte Strahlungsenergie auf nicht-fluoreszente Wege umwandelt. Ebenso erhöhte sich die Halbwertszeit bei Belichtung der an DNA angelagerten Fluorophore – jedoch nicht im Kollektiv. Gerade Fluorophore mit starker Änderung des Extinktionskoeffizienten zeigten eine starke Abnahme der Belichtungsstabilität.^[9-10] Im Allgemeinen lassen sich hieraus nur unter bestimmten Randbedingungen Stabilitätsmerkmale herauslesen. Diese sind vor allem bedingt durch (i) ähnliche Extinktionskoeffizienten, die eine ähnliche Absorption von Lichtquanten zulassen, und (ii) ähnliche Anregungswellenlängen, die eine ähnliche Strahlungsleistung der verwendeten Xenon-Gasentladungsröhre gewährleisten. Jedoch lassen sich stabilisierende Tendenzen durch Methylierung des Indolteils ablesen, die erhaltenen Werte für grün-fluoreszierende Chromophore lassen sich hingegen in keinem Fall vergleichen.

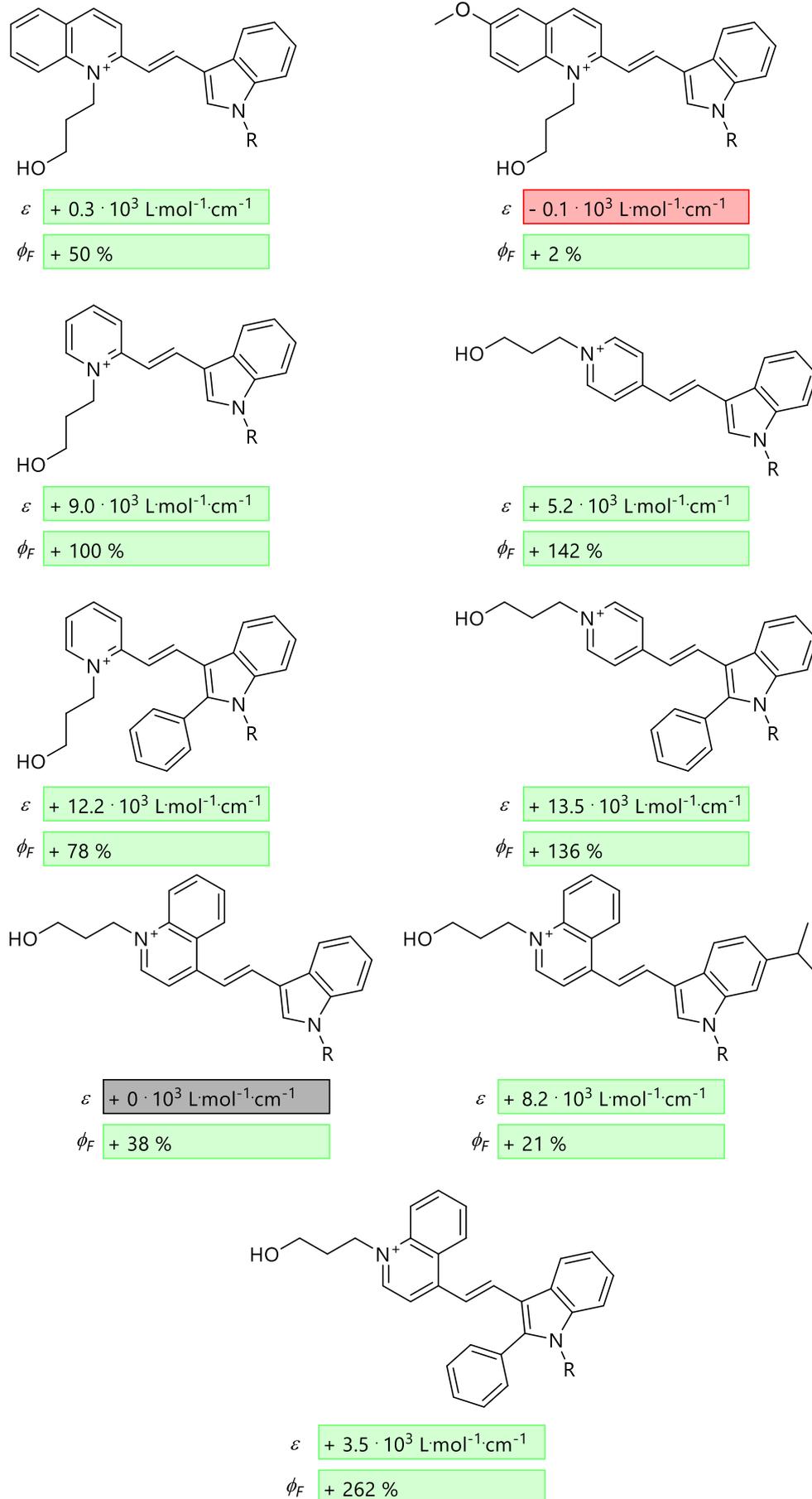
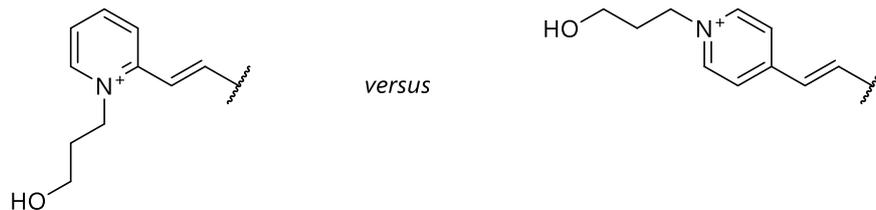


Abbildung 23: Nicht-methylierte versus methylierte Cyanin-Styryl-Farbstoffe und deren optische Eigenschaften im Vergleich.

2- versus 4-verknüpfter Pyridiniumteil (Abbildung 24). Cyanin-Styryl-Farbstoffe mit 4- statt 2-verknüpftem Pyridiniumteil besitzen einen größeren Extinktionskoeffizienten. Darüber hinaus besitzen 4-verknüpfte Farbstoffe eine weit höhere Fluoreszenzquantenausbeute bei Anlagerung an doppelsträngige DNA und damit eine größere Helligkeit als ihre 2-verknüpften Analoga. Überdies lassen sich Tendenzen ablesen, die eine größere Photostabilität von 4-verknüpften Pyridiniumderivaten rechtfertigen. Neben dem sehr schwachen negativ solvatochromen Verhalten von 4-verknüpften Fluorophoren zeigen 2-verknüpfte Derivate ein uneinheitliches Muster, welches zu diesem Zeitpunkt noch nicht in einem systemchemischen Zusammenhang erklärt werden kann.



Konstante Strukturparameter:

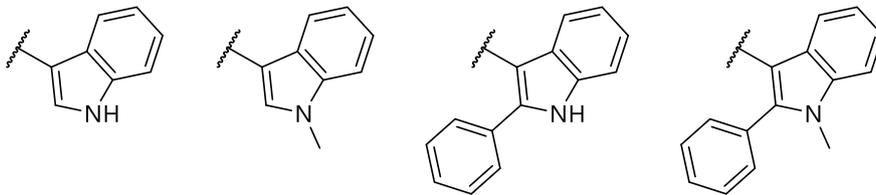
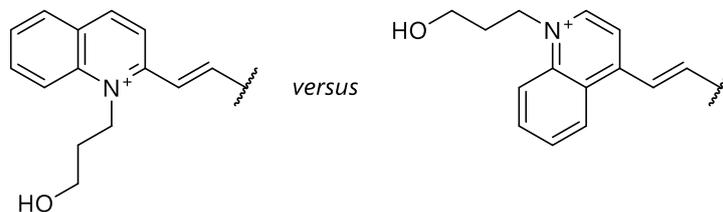


Abbildung 24: Vergleich von 2- bzw. 4-verknüpften Cyanin-Styryl-Farbstoffen mit Pyridiniummotiv.

2- versus 4-verknüpfter Chinoliniumteil (Abbildung 25). Auffallend hier sind die um 25 % reduzierten Extinktionskoeffizienten von 4-verknüpften Chromophoren – ergänzend steigt jedoch die Fluoreszenzquantenausbeute und dem zugrundeliegend die Helligkeit. Ebenfalls lässt sich durch die Verknüpfung an der 4-Position des Chinoliniumteils eine bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima um 13-24 nm bzw. 600-1000 cm^{-1} erzielen, was in gleichem Maße auch die Emissionsmaxima stabilisiert und als verbesserte Mesomeriestabilisierung verstanden werden kann.



Konstante Strukturparameter:

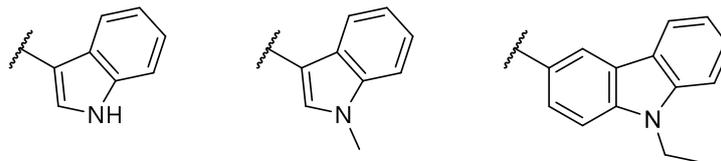
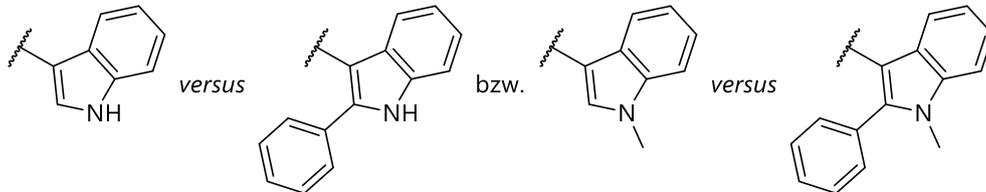


Abbildung 25: Vergleich von 2- bzw. 4-verknüpften Cyanin-Styryl-Farbstoffen mit Chinoliniummotiv.

2-Phenylindolteil (Abbildung 26). Nicht-methylierte Chromophore, die eine Phenylgruppe an der 2-Position des Indolteils tragen, weisen einen um 10-30 % kleineren Extinktionskoeffizienten als die Vergleichschromophore auf, die keine Phenylgruppe tragen.

Die Methylierung des Indol-NH relativiert diesen Effekt jedoch. Wie auch die Methylierung wirkt sich die Einführung des 2-Phenylindolteils positiv auf die Quantenausbeute und somit auf die Helligkeit der Chromophore aus, was vermutlich bedingt durch sterische Hinderung auf eine erhöhte Rotationsbarriere um die Dimethinbrücke hinweist. Entgegen den verbesserten optischen Eigenschaften lassen sich destabilisierende Tendenzen bei Belichtung erkennen, die trotz Methylierung des jeweiligen Chromophors weiterhin eine Instabilität des Chromophors zeigen.



Konstante Strukturparameter:

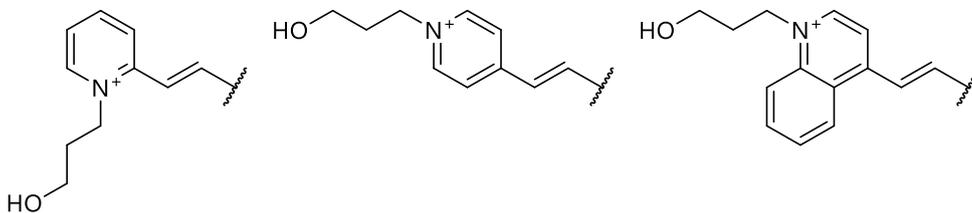
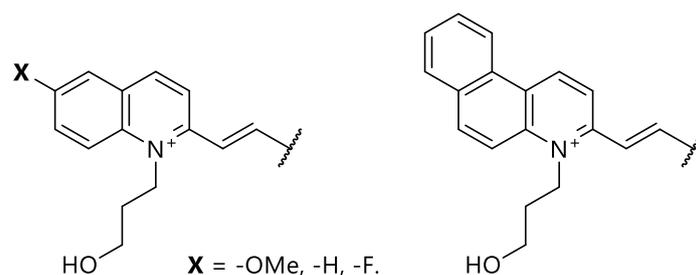


Abbildung 26: Vergleich von unsubstituierten Cyanin-Styryl-Farbstoffen mit Chromophoren, die an der 2-Position des Indols phenylsubstituiert sind.

Derivatisierung des Chinoliniumteils (Abbildung 27). Sowohl die Einführung eines Fluor-Substituenten an der 6-Position des Chinoliniumteils, wie auch die Benzanellierung an der [f]-Bindung, zeigten verminderte Belichtungsstabilitäten bei in etwa gleichbleibenden Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten. Lediglich die 6-Methoxylierung zeigte eine um Faktor 3 vergrößerte Photostabilität und kann durch Methylierung weiter auf das 5-fache gesteigert werden, was aber eine Verschlechterung der Helligkeit mit sich bringt.



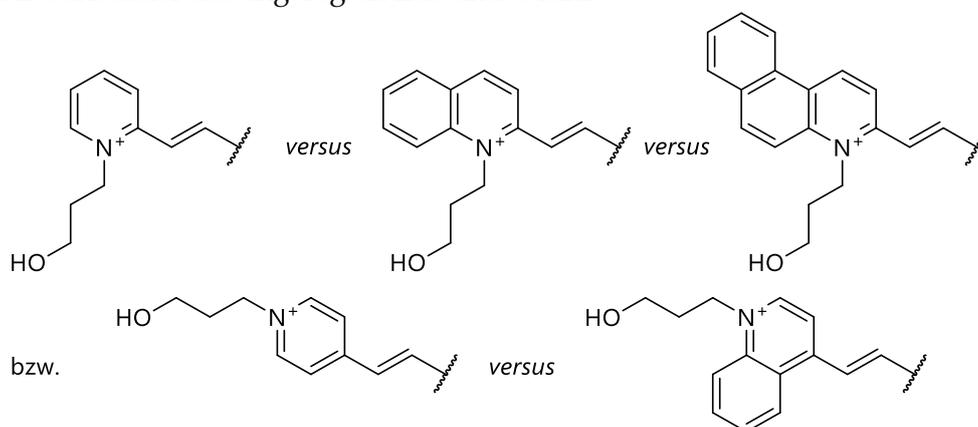
Konstante Strukturparameter:



Abbildung 27: Vergleich verschiedener Cyanin-Styryl-Farbstoffe mit substituierter bzw. benzanellierter Chinoliniumfunktion.

Benzanellierung (Abbildung 28). Durch Benzanellierung vergrößert sich das konjugierte System, was zu einer bathochromen Verschiebung von Absorptions- und Emissionsmaxima führt. Im Falle von 2-verknüpften Pyridiniumchromophoren vergrößert sich der

Extinktionskoeffizient. Die Absorptionsmaxima sind um 44-52 nm bzw. 2200-2800 cm^{-1} rotverschoben. Der Einfluss auf den Chromophor ist jedoch limitiert, was aus der ausbleibenden bathochromen Verschiebung des benzo[*f*]chinolinhaltigen Fluorophors ersichtlich ist. Lediglich die Fluoreszenzquantenausbeute bei Anlagerung an doppelsträngige DNA nimmt mit dem Grad an Benzanellierung zu und ist vermutlich auf eine höhere Rotationsbarriere der Dimethinbrücke zurückzuführen, die in größeren Chromophorsystemen die *cis-trans*-Photoisomerisierung erschwert. Generell zeigen 4-verknüpfte Chromophore kleinere Extinktionskoeffizienten als ihre 2-verknüpften Chinolinanaloge. Benzanellierung am Pyridiniumteil zeigt bei 4-verknüpften Chromophoren eine maximale Vergrößerung des Extinktionskoeffizienten und eine Rotverschiebung um 58 - 60 nm bzw. 2600-3300 cm^{-1} . Trotz vergrößertem Chromophorgerüst und einer damit einhergehenden Vermehrung der Freiheitsgrade bzw. Relaxationskanäle, besitzen die benzanellierten 4-verknüpften Chromophore eine stark vergrößerte Fluoreszenzquantenausbeute bei Anlagerung an DNA. Wie zuvor beschrieben, liegt dieser Umstand vermutlich an einer (i) sterisch gehinderten Photoisomerisierung, was zu einer (ii) längeren Lebensdauer des angeregten Zustandes führt.



Konstante Strukturparameter:

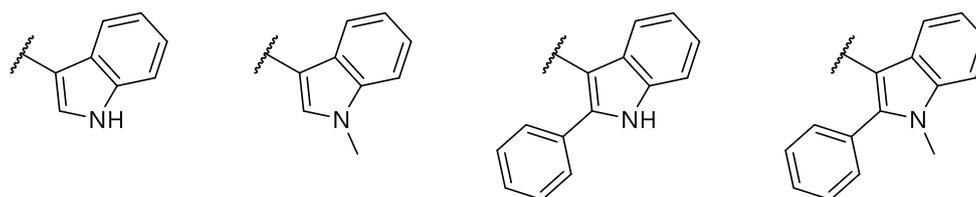
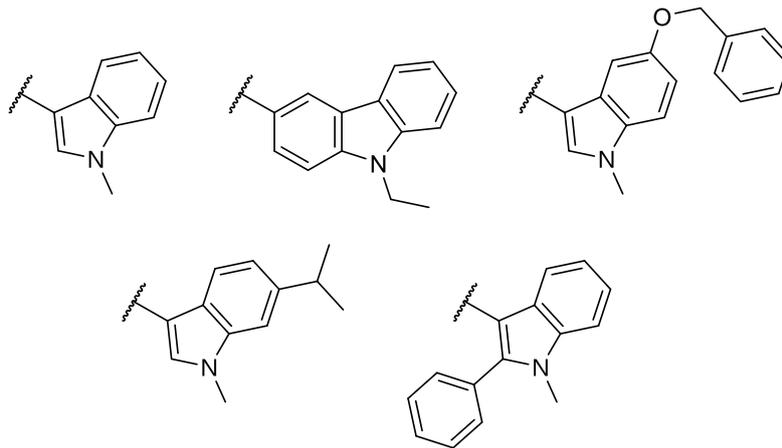


Abbildung 28: Benzanellierung an 2- bzw. 4-verknüpfte Cyanin-Styryl-Farbstoffe.

Derivatisierung des Indolteils (Abbildung 29). Neben dem Phenylsubstituenten an der 2-Position wurden ebenfalls *N*-Ethylcarbazol und 5-(Benzyloxy)-, 6-Isopropylindol untersucht. Das Carbazol-Derivat zeigte einen kleineren Extinktionskoeffizienten als der korrespondierende Chromophor mit *N*-Methylindol – jedoch konnte hierbei eine *Stokes*-Verschiebung von 131 nm bzw. 4100 cm^{-1} (an DNA gebunden) und 168 nm bzw. 5700 cm^{-1} (frei in Lösung) realisiert werden. Weiter zeigen (+)-*M*- wie auch (+)-*I*-Substituenten an der 6- bzw. 2-Position einen kleineren Extinktionskoeffizienten, wenn der Indol-Stickstoff nicht methyliert ist. Die Methylierung dieser Fluorochrome erweckt den Eindruck, dass obige Substituenten den Extinktionskoeffizienten positiv beeinflussen, was jedoch nicht der Fall ist. Darüber hinaus verschlechtern diese Substituenten die Photostabilität und verbessern die Helligkeiten der Fluorophore in keinem Fall. Zudem sei zu bemerken, dass speziell die 5-(Benzyloxy)-Funktionalität für eine drastische Reduktion der Helligkeit verantwortlich ist.



Konstanter Strukturparameter:

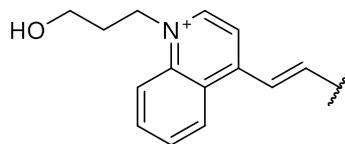


Abbildung 29: Vergleichsgruppe verschieden substituierter Indolfunktionen von 4-verknüpften Cyanin-Styryl-Farbstoffen.

Speziell die Methylierung des Indol-Stickstoffs korreliert in allen Fällen mit einer positiven Verbesserung der optischen Eigenschaften (ausgenommen der Photostabilität). Weiter ist die Aussage zulässig, dass das Ausmaß der negativen Solvatochromie mit der Blauverschiebung der Anregungswellenlänge abnimmt. Demnach ist der Grundzustand des Chromophors polar, was durch dessen einfach positive Ladung klar ersichtlich ist. Nach Absorption erfolgt demnach ein Übergang in einen unpolaren angeregten Franck-Condon-Zustand, welcher aus einer gleichmäßigen Verteilung der positiven Ladung im Chromophorsystem resultiert.

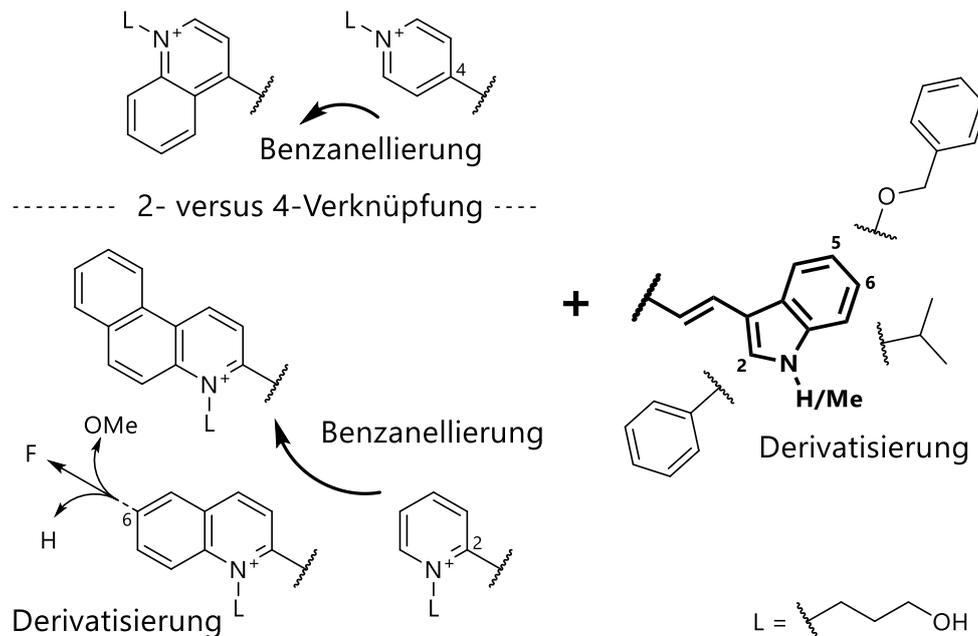


Abbildung 30: Übersicht der bereits bekannten Modifikationen.

4.4 Synthese verschiedenster Cyanin-Styryl-Farbstoffderivate

Aufgrund des weiten Anwendungsspektrums von Indol und dessen abgeleiteten Verbindungen, ist eine große Bandbreite verschieden substituierter Derivate kommerziell erhältlich. Überdies stellt auch die Carbonyl-Funktionalisierung an der 3-Position eine geläufige Modifikation dar und unterstreicht nochmals die beachtlichen Synthesemöglichkeiten dieser mit besonderer Note.^[72] Nichtsdestotrotz ist die Formylierung von Indolderivaten problemlos durchführbar:

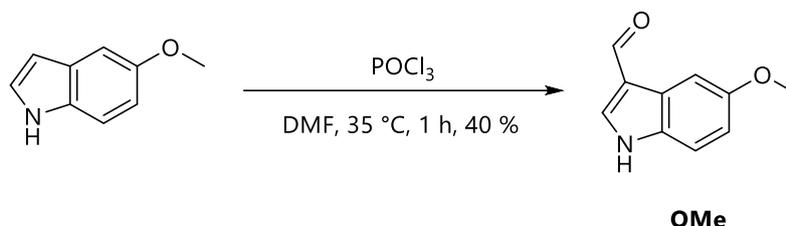


Abbildung 31: Formylierung von 5-Methoxyindol zu OMe.

Zu diesem Zeitpunkt waren die anderweitigen Indolderivate **H**, **Br**, **A** und **CN** mit entsprechender Modifikation kommerziell erhältlich und wurden lediglich per basenkatalysierter Methylierung durch Dimethylcarbonat alkyliert. Die *N*-Methylindol-Derivate (**OMe3**, **H3**, **Br3**, **A3**, **CN3**) konnten in sehr guten Ausbeuten erhalten werden –das alkylierte 7-Azaindol (**A3**) musste säulenchromatographisch aufgereinigt werden:

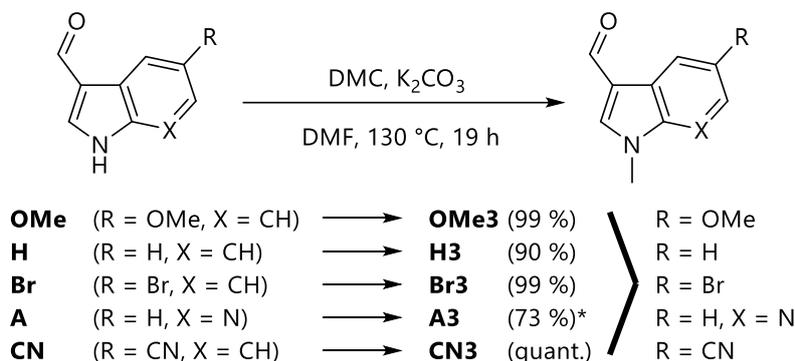


Abbildung 32: *N*-Methylierung der Indole OMe, H, Br, A und CN. *Lediglich bei A3 war eine säulenchromatographische Aufreinigung nötig.

Aufgrund des energiereichen S_1 -Zustands wurde Cyclooctatetraen als Triplett-Zustand-Löcher verwendet. So konnte eine Löschung der Singulett-Zustände der mit diesem Motiv synthetisierten Fluorophore ausgeschlossen und der Beitrag des TSQ getrennt betrachtet werden. Hierbei wurde anfänglich auf die Synthese von *Altman et al.* zurückgegriffen und der entsprechende COT-Alkohol erhalten.^[17] Dieser wurde anschließend per *Appel*-Reaktion zum Bromid **1** umgesetzt:

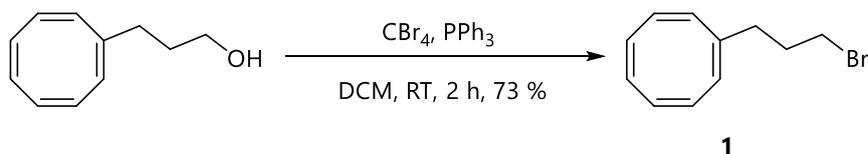


Abbildung 33: *Appel*-Reaktion zur Halogenierung des COT-Alkohols zu **1**.

Die anschließende Alkylierung von Indol-3-carbaldehyd mit Hilfe von Natriumhydrid lieferte schließlich den COT-modifizierten Baustein **H8**.

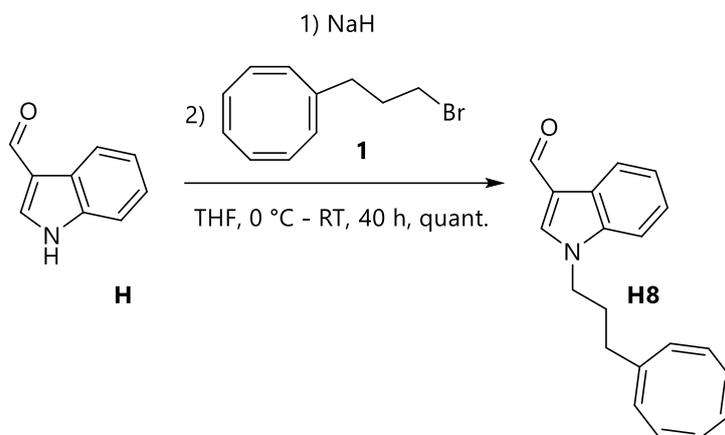


Abbildung 34: Alkylierung von Indol-3-carbaldehyd zum COT-modifizierten Indolbaustein.

Die so erhaltenen modifizierten Indol-Derivate konnten weiter mit den Pyridinium- bzw. Chinolinium-Salzen in einer aldolartigen Reaktion umgesetzt werden (Abbildung 35). Die Synthese der entsprechenden Pyridinium- bzw. Chinolinium-Salze ist indes eine etablierte Methode in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht*.^[6, 9-10]

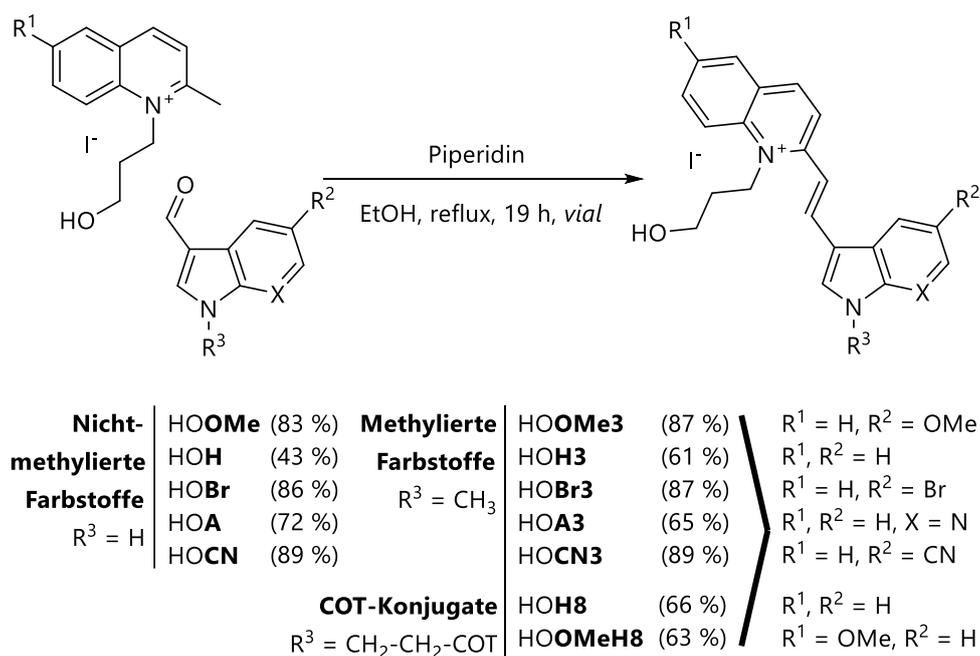


Abbildung 35: Synthese der Cyanin-Styryl-Farbstoffe HOOMe, HOH, HOBr, HOA, HOCN, HOOMe3, HOH3, HOBr3, HOA3, HOCN3, HOH8, HOOMeH8.^[6, 9-10]

Die so erhaltenen Farbstoffe wurden zur folgenden Bestimmung des Extinktionskoeffizienten, sowie zur Reaktivitätsuntersuchung gegenüber Singulett-Sauerstoff bzw. Wasserstoffperoxid (*vide infra*) verwendet. Aufgrund der Hydrophobizität der COT-Konjugaten wurden die Farbstoffe zu den jeweiligen Aziden umgesetzt und anschließend über die kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Zykloaddition an DNA konjugiert (Abbildung 18). Anschließend konnte deren Photostabilität unter anwendungsorientierten Versuchsbedingungen, wie zum Beispiel in Nukleinsäuresonden, ermittelt werden.

Hierfür wurden die Farbstoffe HOOMe, HOH, HOBr, HOA, HOCN, HOOMe3, HOH3, HOBr3, HOA3, HOCN3, HOH8 und HOOMeH8 zunächst in einer Appel-Reaktion zu den Bromiden BrOMe, BrH, BrBr, BrA, BrCN, BrOMe3, BrH3, BrBr3, BrA3, BrCN3, BrH8 und BrOMeH8 umgesetzt, um abschließend die Azidfunktion mit Natriumazid im Rahmen einer nukleophilen Substitution zweiter Ordnung einzuführen und die Azide N₃OMe, N₃H, N₃Br, BrA, N₃CN, N₃OMe3, N₃H3, N₃Br3, N₃A3, N₃CN3, N₃H8, N₃OMeH8 zu erhalten.

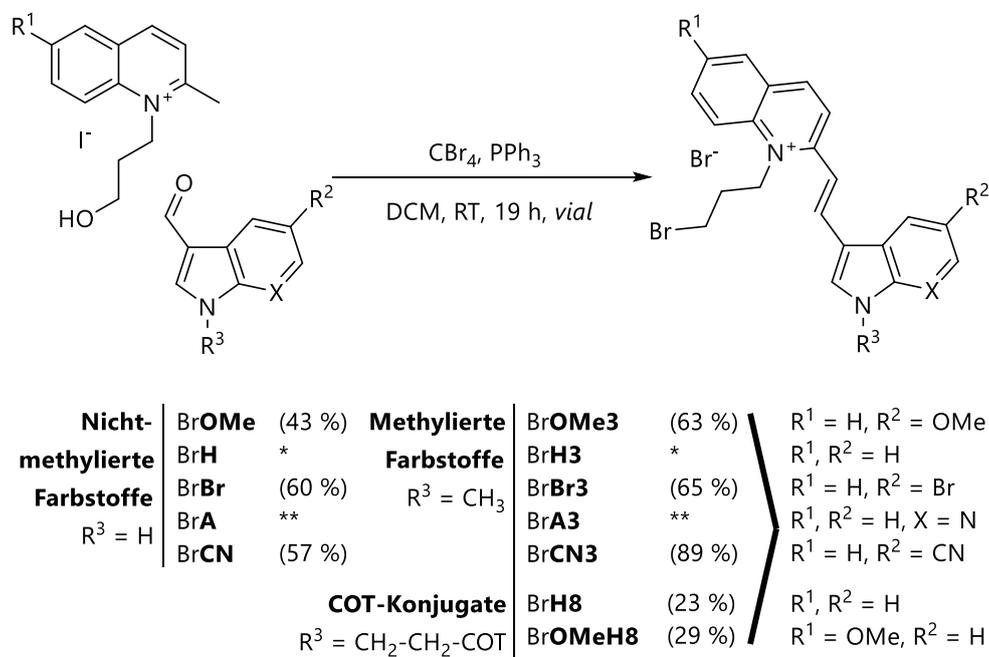


Abbildung 36: Synthese der Farbstoffbromide. *Die jeweiligen Farbstoffe wurden nach literaturbekanntem Synthesemethoden synthetisiert;^[6, 9-10] **Diese Chromophore wurden mit Iod, Imidazol und PPh₃ zum jeweiligen Iodid umgesetzt, und konnten nicht in Reinform erhalten werden, weshalb bevorzugt auf die klassische Synthesemethode verwiesen wird.

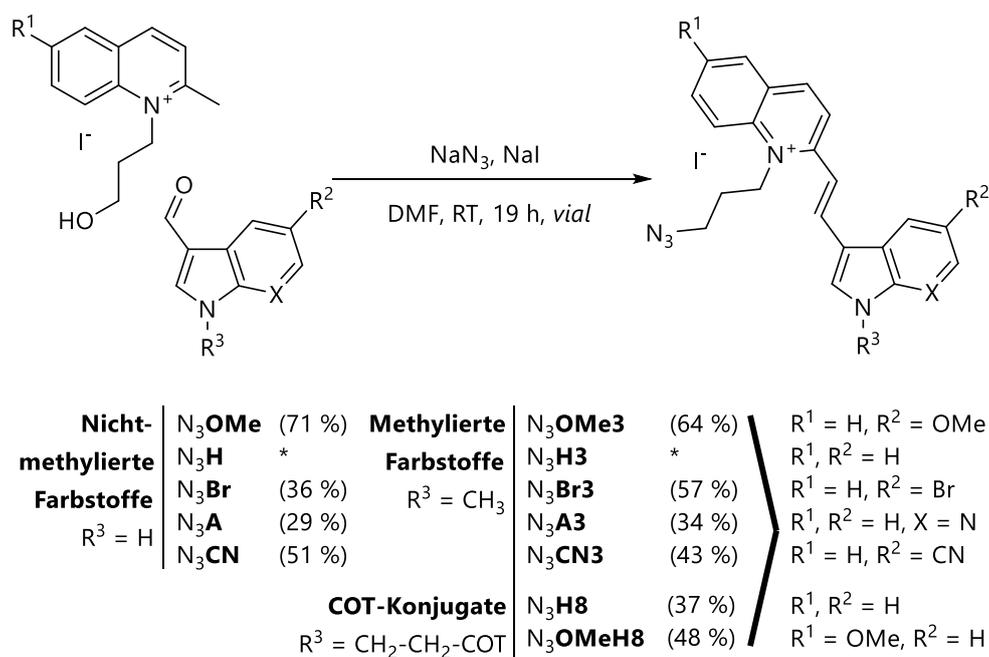


Abbildung 37: Synthese der Farbstoffazide. *Die jeweiligen Farbstoffe wurden nach literaturbekanntem Synthesemethoden synthetisiert. ^[6, 9-10]

4.5 Optische Spektroskopie der COT-Konjugaten

Zur Vergleichbarkeit der optischen Eigenschaften von HOH mit den COT-Konjugaten HOH8 und HOOMeH8 wurden diese über die kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Zykloaddition kovalent an DNA gebunden. Darüber hinaus wurde der Farbstoff HOH3, wie auch HOOMe und HOOMe3, zum direkten Vergleich herangezogen, da das Proton des Indol-Stickstoffs eine Sonderrolle einzunehmen scheint. Hierfür wurde folgende DNA-Sequenz verwendet:



Abbildung 38: Verwendete DNA-Sequenz zur optischen Charakterisierung der Farbstoffe (FS).

Die kovalente Knüpfung des Triplett-Zustandslöschers COT erfolgte hierbei über einen Propyl-Linker an den Indol-Stickstoff. Demnach ist mit einem bathochromen Effekt sowie einer Erhöhung des Extinktionskoeffizienten zu rechnen (vgl. Kapitel 4.3).

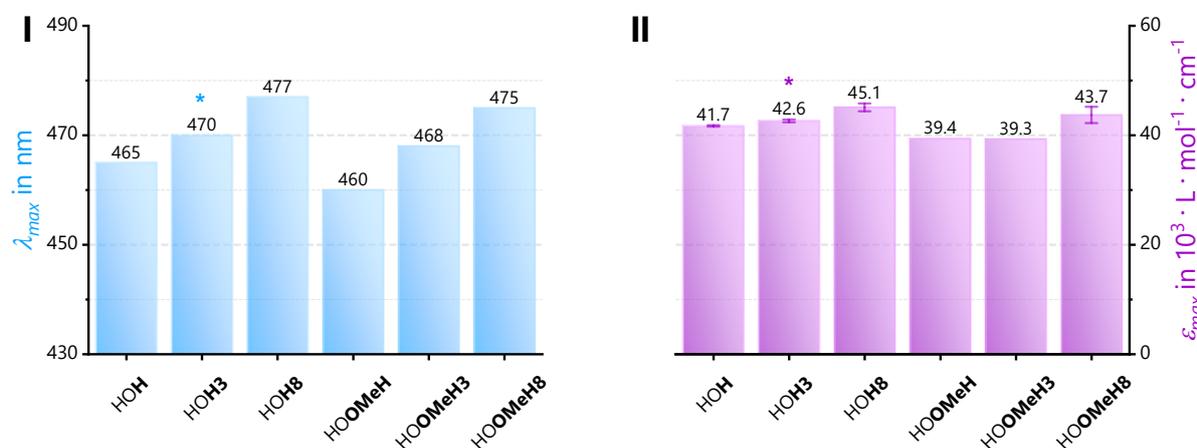


Abbildung 39: Absorptionsmaxima λ_{max} (I) und Extinktionskoeffizienten ϵ_{max} (II) der Farbstoffe im Vergleich. (20 % Ethanol in Millipore-Wasser) *Das Absorptionsmaximum und der Extinktionskoeffizient von HOH3 wurden in 10 % Ethanol ermittelt und die Daten aus der Literatur entnommen.^[10]

Beide Effekte lassen sich im Trend erkennen. Jedoch zeigen die Fluorophore mit 6-Methoxy-Funktion (HOOMeH, HOOMeH3 und HOOMeH8) im Vergleich zu den unsubstituierten Chromophoren HOH, HOH3 und HOH8 ein leicht zu kleineren Wellenlängen verschobenes Absorptionsmaximum (2-5 nm), sowie einen kleineren Extinktionskoeffizienten ($\sim 2.3 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Inwieweit sich die bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums bzw. die Vergrößerung des Extinktionskoeffizienten sich auf die Länge der Alkylkette oder der COT-Funktion beziehen, kann hierbei nicht abschließend erörtert werden.

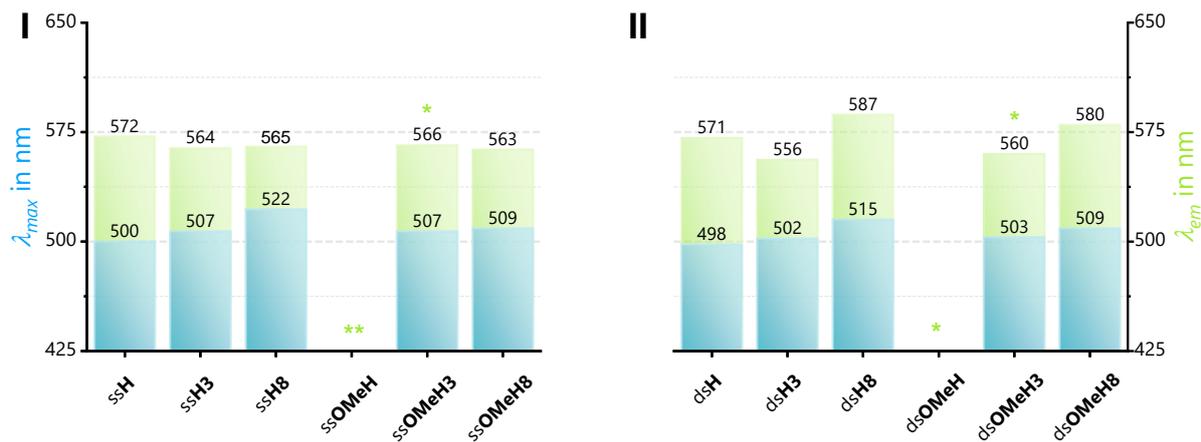


Abbildung 40: Absorptions- (λ_{max}) und Emissionsmaxima (λ_{em}) der Farbstoff-DNA-Konjugate im Vergleich. I: einfach-modifizierte Einzelstränge, II: einfach-modifizierte Doppelstränge. (2.5 μ M Einzelstrang oder 2.5 μ M hybridisierter Doppelstrang, 10 mM NaPi-Puffer, pH 7, 250 mM NaCl in Millipore-Wasser) *Daten entnommen von Referenz.^[10] **Daten nicht ermittelt.

In den entsprechenden DNA-Konjugaten ist der oben beschriebene Trend ebenfalls zu beobachten. Während die Absorptionsmaxima zu größeren Wellenlängen verschoben sind, sind die Emissionsmaxima in den Einzelsträngen ähnlich zueinander. Dies ist vermutlich auf die ähnliche Fluorophorstruktur zurückzuführen, da sich allein die Substituenten des Indol-Stickstoffs ändern. Durch Hybridisierung des Gegenstrangs missfällt zunächst die obige Darstellung, welche durch die Abbildung der Stokes-Verschiebungen in inversen Zentimetern klarer wird. Abgesehen von den COT-Konjugaten ändern sich die Stokes-Verschiebungen aufgrund von Hybridisierung nicht. Erstere erfahren nach Anregung sehr wahrscheinlich eine Stabilisierung des unpolaren, ersten angeregten Zustandes durch die COT-Funktion.

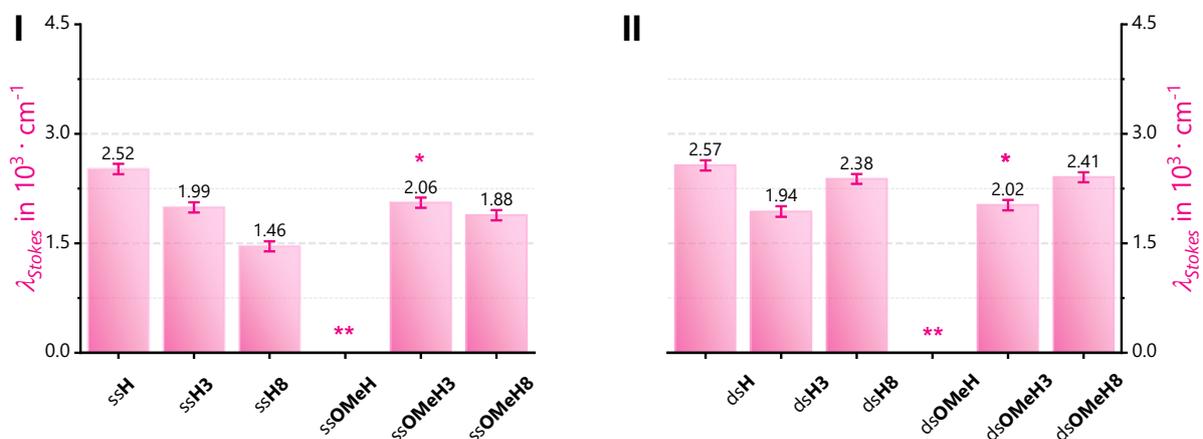


Abbildung 41: Stokes-Verschiebungen der Farbstoff-DNA-Konjugate im Vergleich. I: einfach modifizierte Einzelstränge, II: einfach-modifizierte Doppelstränge. (2.5 μ M Einzelstrang oder 2.5 μ M hybridisierter Doppelstrang, 10 mM NaPi-Puffer, pH 7, 250 mM NaCl in Millipore-Wasser) *Daten entnommen von Referenz.^[10] **Daten nicht ermittelt.

Auffällig sinkt jedoch die Fluoreszenzquantenausbeute drastisch durch Hybridisierung (43 – 57 %). Entsprechend verringern sich die durchschnittlichen Fluoreszenzlebensdauern der Fluorophore ss/dsH, ss/dsH3 und ss/dsOMeH8 um 8 – 20 %. Die abgeleiteten Geschwindigkeitskonstanten für nicht-strahlende Prozesse nehmen 20 – 70 % zu. Dessen Ursprung liegt wohl in der gesteigerten Stoßhäufigkeit der kovalent an doppelsträngige DNA gebundenen Fluorophore mit dem umgebenden Lösungsmittel. Das Paar ss/dsH8 nimmt mit gleichbleibendem k_F und Erhöhung von k_{NR} eine Sonderstellung ein.

Dagegen jedoch scheint die Geschwindigkeitskonstante für strahlende Prozesse im Einzelstrang (ssH, ssH3, ssH8 und ssOMeH8; $9.66 - 12.9 \times 10^7 \text{s}^{-1}$) gleichbleibend zu sein. Weiter ist zu bemerken, dass k_{NR} durch Methylierung im Vergleich von doppel- und einzelsträngiger Nukleinsäuresonde gleichmäßig um $13.9 - 16.3 \times 10^7 \text{s}^{-1}$ abnimmt. Ein denkbarer Grund hierfür könnte ein unterbundener Protonentransfer aus dem angeregten Zustand sein, da das Proton durch seine geringe Größe aus dem Einzelsträngen bestehenden DNA-Käfig um den Farbstoff leicht ausgetauscht werden könnte. Darüber hinaus ist in ssH8 und auch ssOMeH8 eine weitere Reduktion von k_{NR} zu sehen, was sehr wahrscheinlich auf ein erfolgreiches Löschen des Triplett-Zustandes zurückzuführen ist.

Table 1: Fluoreszenzquantenausbeuten (Φ_F) und -lebensdauern (τ_F), sowie abgeleitete Geschwindigkeitskonstanten für strahlende (k_F) und nicht strahlende Prozesse (k_{NR}). (2.5 μM Einzelstrang oder 2.5 μM hybridisierter Doppelstrang, 10 mM NaPi-Puffer, pH 7, 250 mM NaCl in Millipore-Wasser)

	Φ_F	$\Delta\Phi_F$	τ_F in ns	$\Delta\tau_F$ in ns	k_F in 10^7s^{-1}	Δk_F in 10^7s^{-1}	k_{NR} in 10^7s^{-1}	Δk_{NR} in 10^7s^{-1}
ssH	0.21	0.06	2.08	0.00	10.1	2.88	38.0	2.88
dsH	0.11	0.002	1.92	0.03	5.72	0.14	46.3	0.81
ssH3	0.35	0.002	2.99	0.11	11.7	0.45	21.7	1.34
dsH3	0.20	0.002	2.47	0.02	8.10	0.10	32.4	0.32
ssH8	0.46	0.011	4.76	0.03	9.66	0.24	11.3	0.28
dsH8	0.20	0.002	2.02	0.02	9.92	0.13	39.7	0.44
ssOMeH8	0.39	0.073	3.03	0.04	12.9	2.42	20.1	2.46
dsOMeH8	0.17	0.002	2.42	0.09	7.03	0.26	34.3	1.49

Letztlich bleibt die Frage offen, ob COT einen Effekt auf die Fluorophorstabilität bei Belichtung hat. Hierzu wurden die farbstoffmarkierten DNA-Einzelstränge ssH, ssH3, ssH8 und ssOMeH8 in jeweils 2.5 μM Lösung mit einer 468 nm-LED belichtet. Währenddessen wurden in bestimmten Zeitabständen Emissionsspektren aufgenommen, die den Photoabbau quantifizieren sollten. Hierfür wurden die jeweiligen Intensitäten an den Emissionsmaxima gegen die Zeit aufgetragen, monoexponentiell angepasst und die Halbwertszeit $t_{1/2}$ ermittelt. Entgegen dem erwarteten Trend verhielten sich die einzelsträngigen Nukleinsäuresonden nicht entsprechend der literaturbekannten Daten. Gewöhnlich sollte die Methylierung des Indol-Stickstoffs (wie in HOH3 bzw. ssH3) eine Steigerung der Photostabilität um Faktor 2 erzielen. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass die 6-Methoxy-Funktion (HOOMeH bzw. ssOMeH) eine Steigerung um Faktor 3 und in Kombination mit der Methylierung (HOOMeH3 bzw. ssOMeH3) eine additive Steigerung der Photostabilität um Faktor 5 verursacht.^[9-10] Letzterer Trend bestätigte sich ebenfalls nicht für die COT-Konjugate HOH8 bzw. ssH8 und HOOMeH8 bzw. ssOMeH8.

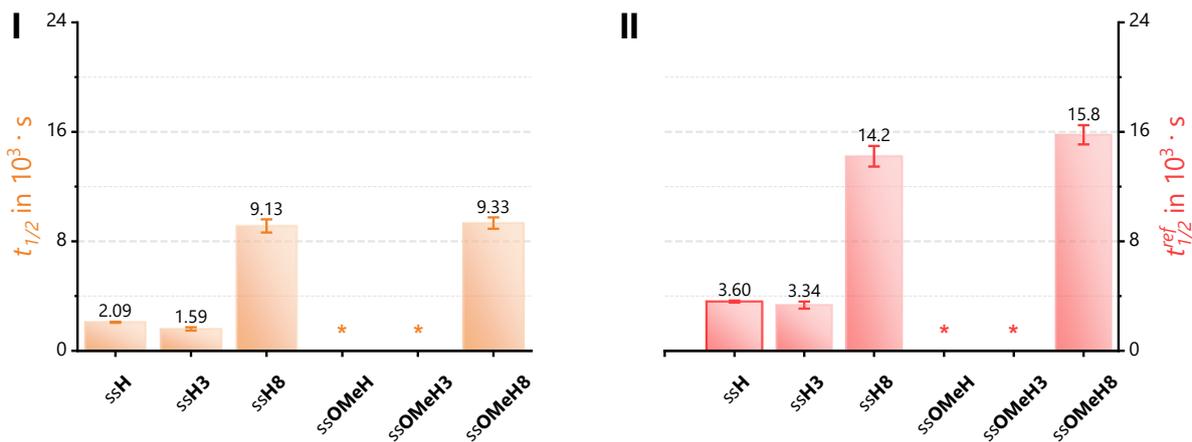


Abbildung 42: Halbwertszeit $t_{1/2}$ und referenzierte Halbwertszeit $t_{1/2}^{ref}$ der Fluorophor-DNA-Konjugate ssH, ssH3, ssH8 und ssOMeH8. (2.5 μ M Einzelstrang 10 mM NaPi-Puffer, pH 7, 250 mM NaCl in Millipore-Wasser, $\lambda_{LED} = 468$ nm) *Daten nicht ermittelt.

Zunächst wurde angenommen, dass die verwendete LED (468 nm) weit außerhalb der Absorption der COT-Konjugaten emittiert und so deren erhöhten en zu erklären seien (Abbildung 43). Jedoch widerspricht dies der stark verkürzten Halbwertszeit $t_{1/2}$ von ssH3.

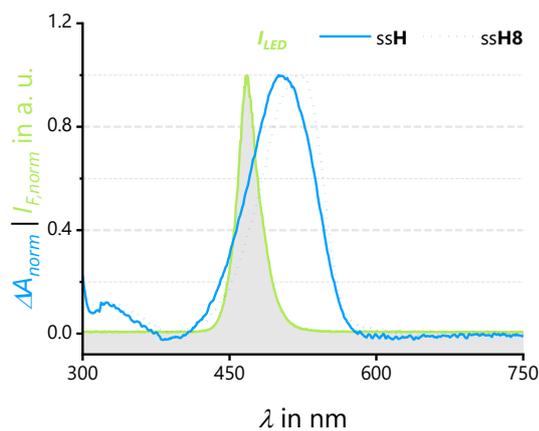


Abbildung 43: Intensitätsnormiertes Emissionsspektrum der verwendeten LED (468 nm) und intensitätsnormierte Absorbanz der einfach modifizierten DNA-Einzelstränge ssH und ssH8.

Die Gegenüberstellung der hier und in der Literatur angewandten Methoden war zu diesem Zeitpunkt unabdingbar. Statt einer LED, bei der man über längere Zeiträume von einer konstanten Intensität ausgehen kann, wurde eine Xenon-Gasentladungsröhre verwendet. Letztere emittiert über ein breites Spektrum mit inhomogener Intensität und besitzt eine begrenzte Lebensdauer. Aus diesem Grund wurde der Absorptionsgrad α für die LED-Emission und Farbstoffabsorption ermittelt:

$$\alpha = \int I_{LED} (1 - 10^{-A}) d\lambda,$$

$$\text{wobei } \int I_{LED} d\lambda = 1 \text{ ist} \quad (\text{Gl. 4.5-1})$$

(I_{LED} das flächennormierte Emissionsspektrum der LED).

Die entsprechende Halbwertszeit $t_{1/2}$ wurden daraufhin mit dem Absorptionsgrad multipliziert und anschließend auf die (willkürlich) gewählte Halbwertszeit $t_{1/2}$ von ssH ($t_{1/2}(\text{ssH}) = 3600$ s) referenziert. Hierbei konnte eine nur geringfügige Änderung des vorliegenden Trends beobachtet werden.

In früheren Photostabilitätsuntersuchungen wurden 10 μM Farbstofflösungen von an DNA angelagerter Farbstoffe verwendet. Die Farbstoffkonzentration betrug in den genannten Studien 10 μM und ist damit 4 Mal größer als die hier verwendete Konzentration. Unweigerlich führte dies zur Annahme, dass die Bildung von Singulett-Sauerstoff maßgeblich zum Photobleichen beigetragen haben muss. Dies deckt sich mit den jetzigen Untersuchungen, die zeigten, dass die 6-Methoxylierung ohne (großen) Effekt in verdünnten Lösungen ist. Im Umkehrschluss vermindert die 6-Methoxylierung nicht die Bildung, sondern die Reaktivität von Fluorophor und Singulett-Sauerstoff. Überdies könnte die verminderte Reaktivität von methylierten Fluorophoren mit der Hypothese des Protonentransfers aus dem angeregten Singulett-Zustand einhergehen, da der deprotonierte Fluorophor (i) ungeladen wäre, wie auch (ii) eine höhere Elektronendichte besitzen würde und Singulett-Sauerstoff als elektrophiles Reagenz einfacher mit diesem reagieren könne. Demnach könnte es in verdünnter Lösung hinderlich sein, die Elektronendichte des Indols zu erhöhen, da die verbesserten Elektronendonator-Eigenschaften eine Bildung des Superoxid-Radikalanions noch vorantreiben würde. Die Modifikation und systemchemische Untersuchung verschiedener Cyanin-Styryl-Farbstoffe mit derivatisiertem Indolkern stellt aus diesem Grund das fundamentale Forschungsexposé dieser Dissertation dar.

5 Quantitative Struktur-Reaktivitätsbeziehung

Im vorhergehenden Kapitel konnten die verbesserten Fluorophoreigenschaften durch Konjugation eines Triplett-Zustandslöscher (COT) gezeigt werden. Trotz längerer durchschnittlicher Fluoreszenzlebensdauer von ssH3 konnten Untersuchungen an diesem Farbstoff eine geringere Photostabilität nachweisen. Wesentliche Strukturparameter, wie die Rolle des Protons am Indolnukleus oder die Elektronendichte des Indols, werden in diesem Kapitel systemchemisch untersucht, und es wird versucht eine quantitative Struktur-Reaktivitätsbeziehung (*quantitative structure reactivity relationship*, QSRR) aufzustellen. Bereits im voraus konnte die Schlüsselrolle des Indol-Strukturmotivs in ihrer Wichtigkeit identifiziert werden, um über die Systemchemie der Cyanin-Styryl-Farbstoffe photostabile, helle und kleine Chromophore für die fluoreszente Bildgebung lebender Zellen gezielt entwickeln zu können. Die Synthese der hier aufgeführten Fluorophore, deren optischen Eigenschaften und Trivialnamen zur einfachen und schnellen Zuordnung von Struktur und korrelierten Variablen sind im vorherigen Kapitel erläutert und im Experimententeil vollständig aufgeführt.

5.1 Optische Spektroskopie der indolmodifizierten Farbstoffe

Nach erfolgreicher Synthese der verschieden substituierten Cyanin-Styryl-Farbstoffe (HOOMe, HOH, HOBr, HOA, HOCN, HOOMe3, HOBr3, HOA3 und HOCN3) wurde deren molarer dekadischer Extinktionskoeffizient in 20 % Ethanol in Wasser bestimmt. Auffallend hierbei ist dessen Abnahme je elektronenziehender der Substituent an der 5-Position des Indolteils ist. Ebenso sind die Absorptionsmaxima in nicht-methylierten Farbstoffen hypsochrom verschoben – mit Ausnahme des 7-Azaindols HOA. Bei den methylierten Farbstoffen lässt sich dieser Trend nicht eindeutig zuordnen. HOH3 und HOA3 sind in dieser Reihe weiter ins kurzwellige verschoben, wobei im Vergleich nicht-methyliert vs. methyliert eine leichte bathochrome Verschiebung ersichtlich ist. Während auch die Extinktionskoeffizienten der methylierten Farbstoffe anfänglich größer sind, verkleinern sich diese bei den Farbstoffen mit 7-Azaindol (HOA3) und 5-Cyanoindol (HOCN3).

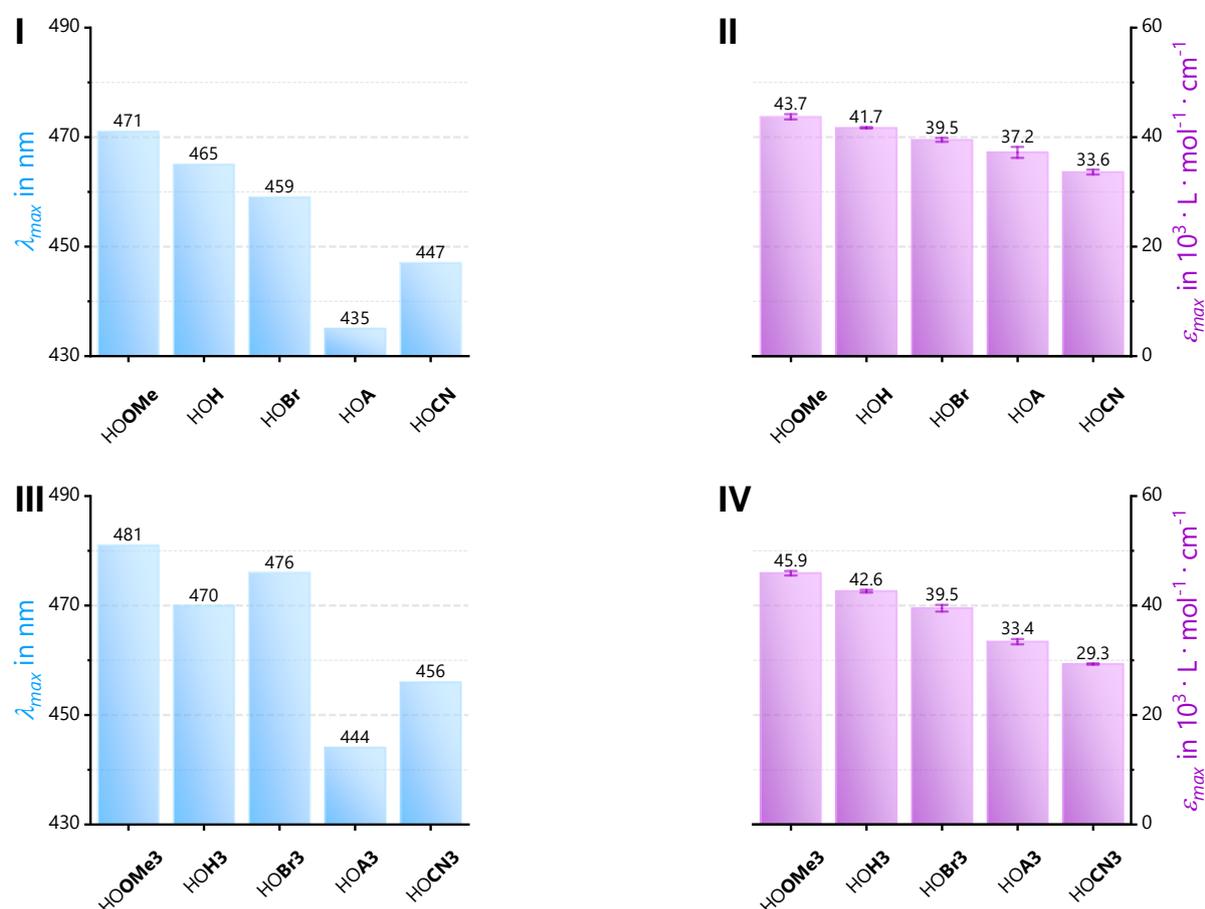


Abbildung 44: Absorptionsmaxima λ_{max} (I, III) und Extinktionskoeffizienten ϵ_{max} (II, IV) der Farbstoffe HOOMe, HOH, HOBr, HOA, HOCN, HOOMe3, HOH3, HOBr3, HOA3 und HOCN3 im Vergleich. (20 % Ethanol in Millipore-Wasser)

Die Ausdehnung des Chromophorsystems wird durch π -Donorsubstituenten, wie in HOOMe oder HOOMe3, vergrößert. Hierdurch wird das HOMO destabilisiert, und das Absorptionsmaximum λ_{max} ist bathochrom verschoben. Weiter wird das Chromophorsystem erweitert, was zu einer Vergrößerung des Extinktionskoeffizienten führt. Umgekehrt entzieht ein π -Akzeptorsubstituent, wie in HOCN oder HOCN3, über die π -Bindungen Elektronendichte aus dem System.

Folglich erniedrigt sich ebenso die π -Elektronendichte am Indol-Stickstoff, wodurch dessen s-Charakter steigt und es zur Bindungslängenverkürzung im ganzen System kommt.

Nach Konjugation der Farbstoffazide $N_3\text{OMe}$, $N_3\text{H}$, $N_3\text{Br}$, $N_3\text{A}$, $N_3\text{CN}$, $N_3\text{OMe3}$, $N_3\text{H3}$, $N_3\text{Br3}$, $N_3\text{A3}$ und $N_3\text{CN3}$ an DNA wurden sowohl die Einzel- (ss) als auch Doppelstränge (ds) spektroskopisch untersucht. Die jeweiligen Absorptionsmaxima liegen zwischen 459 und 512 nm, deren Emissionsmaxima zwischen 532 und 583 nm und deren Stokes-Verschiebung zwischen 54 und 85 nm. Die Absorptionsmaxima sind in der Substituentenreihe von $\text{ssH} < \text{ssOMe} < \text{ssBr} < \text{ssCN} < \text{ssA}$ und im Vergleich zu ihren methylierten Analogen hypsochrom verschoben. Für die Emissionsmaxima der Einzelstränge gilt in etwa dieselbe Korrelation. Die Absorptionsmaxima der Doppelstränge folgen der Reihe $\text{dsH} = \text{dsOMe} < \text{dsBr} < \text{dsCN} < \text{dsA}$ und sind ebenfalls hypsochrom zu den methylierten Analoga verschoben.

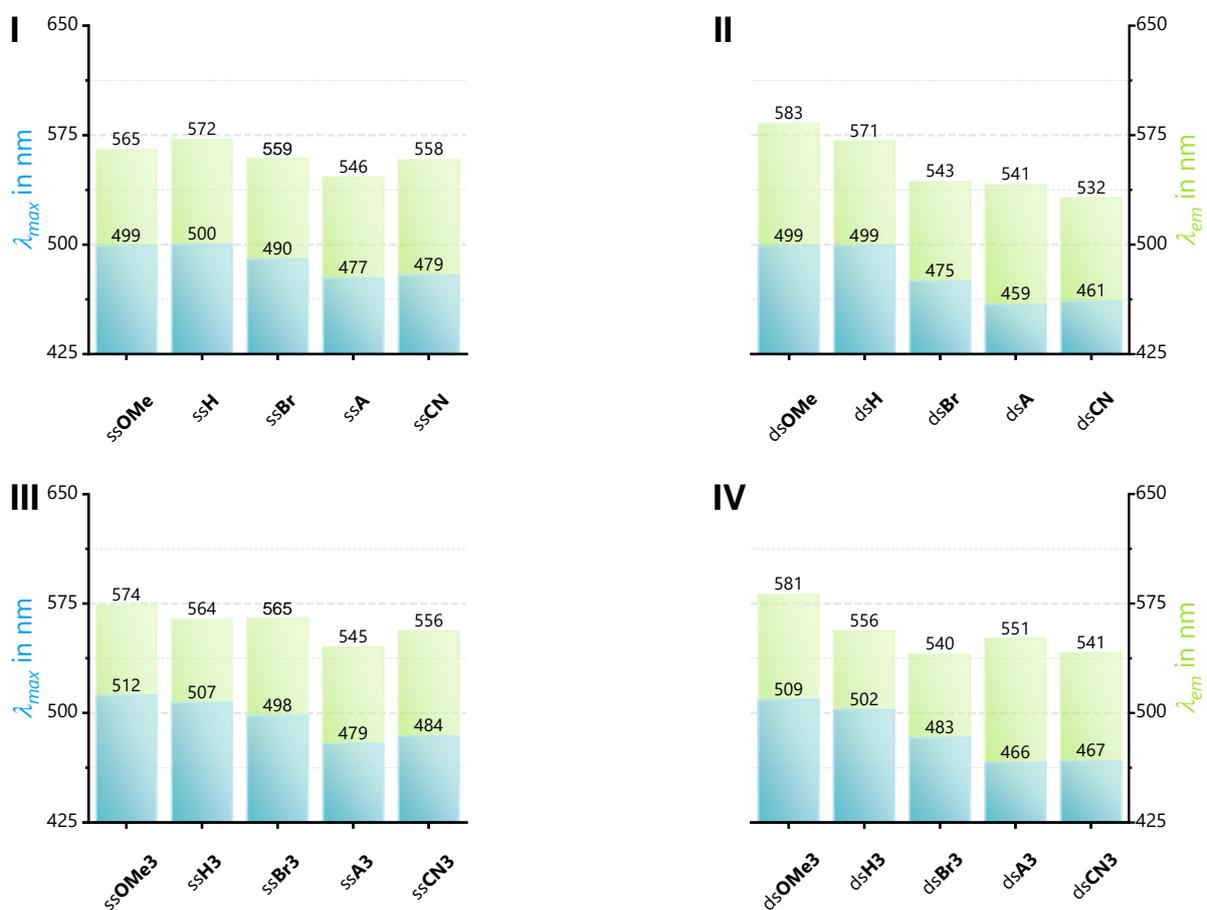


Abbildung 45: Absorptions- (λ_{max}) und Emissionsmaxima (λ_{em}) der Farbstoff-DNA-Konjugate *ss/dsOMe*, *ss/dsH*, *ss/dsBr*, *ss/dsA*, *ss/dsCN*, *ss/dsOMe3*, *ss/dsH3*, *ss/dsBr3*, *ss/dsA3* und *ss/dsCN3* im Vergleich. **I, III:** einfach-modifizierte Einzelstränge, **II, IV:** einfach-modifizierte Doppelstränge. (2.5 μM Einzelstrang oder 2.5 μM hybridisierter Doppelstrang, 10 mM NaPi-Puffer, pH 7, 250 mM NaCl in Millipore-Wasser)

Insbesondere die Farbstoffe *dsOMe* und *dsA3* zeigen jeweils gut spektral separierte Emissionsbanden, die um 84 nm bzw. 85 nm zu größeren Wellenlängen verschoben sind. Energetisch spiegelt sich dies ebenso wider. Während in den Einzelsträngen klar von einem Trend zu größeren Stokes-Verschiebungen bei schwächerem π -Donorsubstituenten ersichtlich ist – zeigt sich in den Doppelsträngen derselbe Trend mit einigen Ausnahmen. Durch Hybridisierung erfahren *dsOMe* bzw. *dsOMe3* und *dsA* bzw. *dsA3* eine weitaus größere Stabilisierung als ihre entsprechenden Einzelstränge.

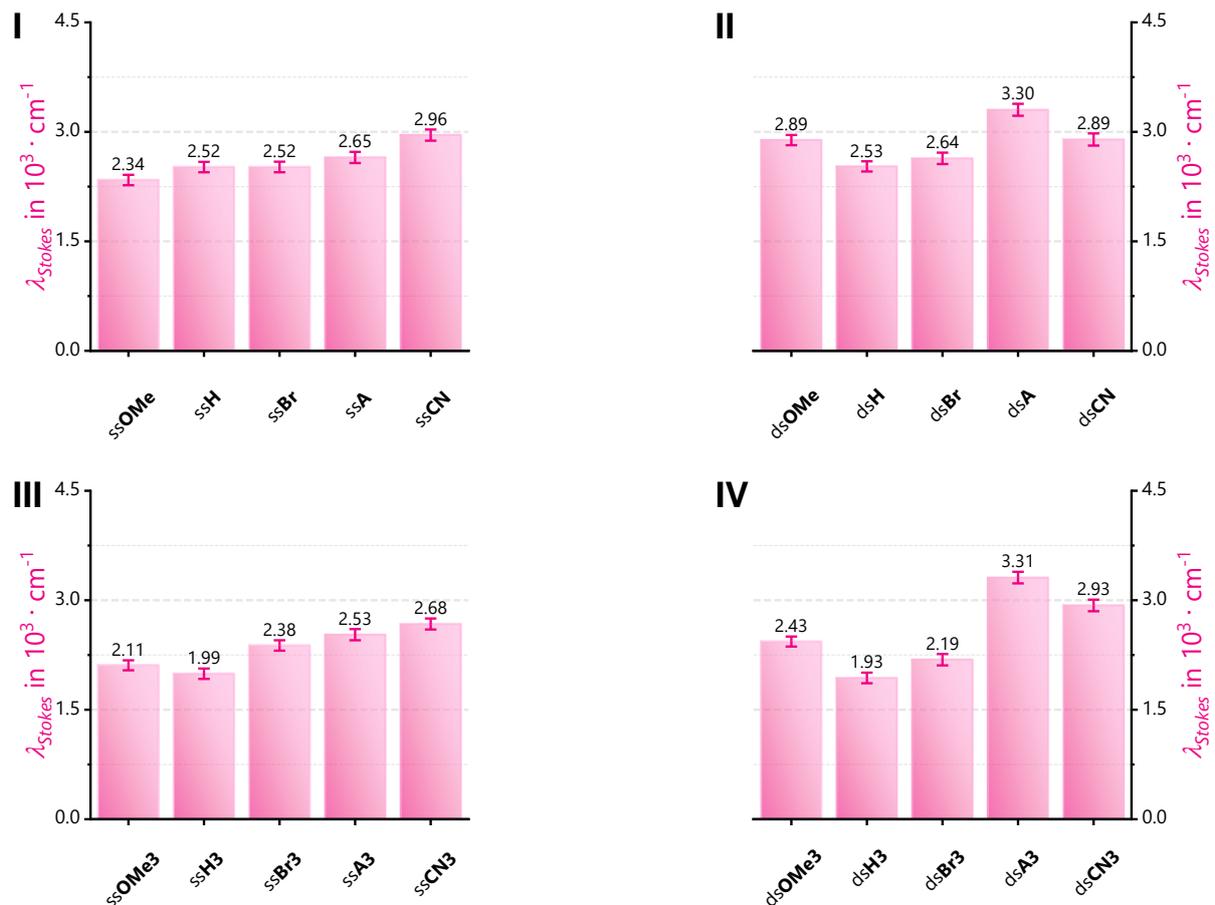


Abbildung 46: Stokes-Verschiebungen λ_{Stokes} der Farbstoff-DNA-Konjugate *ss/dsOMe*, *ss/dsH*, *ss/dsBr*, *ss/dsA*, *ss/dsCN*, *ss/dsOMe3*, *ss/dsH3*, *ss/dsBr3*, *ss/dsA3* und *ss/dsCN3* im Vergleich. I, III: einfach modifizierte Einzelstränge, II, IV: einfach-modifizierte Doppelstränge. (2.5 μM Einzelstrang oder 2.5 μM hybridisierter Doppelstrang, 10 mM NaPi -Puffer, pH 7, 250 mM NaCl in Millipore-Wasser)

Aus den Fluoreszenzquantenausbeuten (Φ_F) und –lebensdauer (τ_F) der Farbstoffe *ssOMe*, *ssH*, *ssA*, *ssCN*, *ssOMe3*, *ssH3*, *ssA3* und *ssCN3* geht– mit Ausnahme von *ssBr* und *ssBr3* – hervor, dass durch Hybridisierung des Gegenstranges die Geschwindigkeitskonstante für nicht-strahlende Prozesse (k_{NR}) erhöht wird. Ebenso sind die Geschwindigkeitskonstanten für strahlende Prozesse (k_F) verkleinert, jedoch nicht für *ss/dsCN*. Hier kommt es zu einer aussagekräftigen Steigerung um Faktor 2.2. Sowohl *ssBr* als auch *ssCN* zeigen hierdurch eine Hybridisierungsresponsivität mit unterschiedlichem Ursprung.

Tabelle 2: Fluoreszenzquantenausbeuten (Φ_F) und -lebensdauern (τ_F), sowie abgeleitete Geschwindigkeitskonstanten für strahlende (k_F) und nicht strahlende Prozesse (k_{NR}) der Farbstoff-DNA-Konjugate *ss/dsOMe*, *ss/dsH*, *ss/dsBr*, *ss/dsA*, *ss/dsCN*, *ss/dsOMe3*, *ss/dsH3*, *ss/dsBr3*, *ss/dsA3* und *ss/dsCN3*. (2.5 μ M Einzelstrang oder 2.5 μ M hybridisierter Doppelstrang, 10 mM NaP_i-Puffer, pH 7, 250 mM NaCl in Millipore-Wasser)

	Φ_F	$\Delta\Phi_F$	τ_F in ns	$\Delta\tau_F$ in ns	k_F in 10 ⁷ s ⁻¹	Δk_F in 10 ⁷ s ⁻¹	k_{NR} in 10 ⁷ s ⁻¹	Δk_{NR} in 10 ⁷ s ⁻¹
ssOMe	0.03	0.002	0.48	0.01	6.29	0.46	203	6.18
dsOMe	0.01	0.004	-	-	-	-	-	-
ssH	0.21	0.006	2.08	0.00	10.1	0.29	38.0	0.31
dsH	0.11	0.002	1.92	0.03	5.72	0.14	46.3	0.81
ssBr	0.22	0.003	2.17	0.06	10.1	0.29	35.9	1.2
dsBr	0.32	0.01	3.68	0.03	8.71	0.28	18.5	0.36
ssA	0.49	0.011	3.82	0.03	12.8	0.31	13.3	0.39
dsA	0.20	0.005	2.27	0.09	8.83	0.4	35.3	1.7
ssCN	0.26	0.006	2.98	0.01	8.73	0.2	24.8	0.22
dsCN	0.32	0.012	1.67	0.05	19.1	0.91	40.6	1.98
ssOMe3	0.05	0.002	0.71	0.01	7.08	0.3	134	1.81
dsOMe3	0.04	0.002	-	-	-	-	-	-
ssH3	0.35	0.002	2.99	0.11	11.7	0.45	21.7	1.34
dsH3	0.20	0.002	2.47	0.02	8.10	0.10	32.4	0.32
ssBr3	0.30	0.005	2.70	0.07	11.1	0.33	26.0	0.98
dsBr3	0.30	0.005	4.18	0.05	7.18	0.14	16.7	0.30
ssA3	0.51	0.011	3.17	0.01	16.1	0.35	15.4	0.36
dsA3	0.22	0.011	2.16	0.05	10.2	0.56	36.0	1.19
ssCN3	0.28	0.004	5.04	0.02	5.56	0.08	14.3	0.11
dsCN3	0.19	0.005	2.25	0.06	8.44	0.31	36.0	1.14

Die Geschwindigkeitskonstante nicht-strahlender Prozesse der methylierten Farbstoffe im Einzelstrang (*ssOMe*, *ssH*, *ssBr* und *ssCN*) sinkt signifikant um 28 – 43 % im Vergleich zu den unmethylierten Farbstoffen (*ssOMe3*, *ssH3*, *ssBr3* und *ssCN3*). Die Abnahme der Geschwindigkeitskonstante nicht-strahlender Prozesse durch Methylierung in doppelsträngiger DNA (*dsOMe*, *dsH*, *dsBr* und *dsCN*) ist mit 10 – 30 % weniger stark ausgeprägt. Weiter nimmt die strahlende Geschwindigkeitskonstante durch Methylierung der Einzelstränge *ssOMe*, *ssH*, *ssBr* um 10 – 16 % zu und in den Doppelsträngen für *dsOMe* um 42 % und *dsBr* um 16 % zu bzw. um 16 % ab für *dsH3*. Eine Ausnahme bilden hier die Paare *ssA/ssA3* und *dsA/dsA3*, deren nicht-strahlende Geschwindigkeitskonstante um 16 % ansteigt (*ssA/ssA3*) oder nahezu gleichbleibend (2% für *dsA/dsA3*) ist. Jedoch gehen die Einbußen in der nicht-strahlenden Geschwindigkeitskonstanten von *ssA/ssA3* und *dsA/dsA3* mit einer um 16 -26 % gesteigerten strahlenden Geschwindigkeitskonstante einher. Demnach gewichtet sich die Balance dieser beiden Konstanten zu einer überwiegend verbesserten optischen Fluorophorleistung durch Methylierung des Azaindolfarbstoffes sowohl im Einzel- als auch Doppelstrang. Die Paare *ssCN/ssCN3* und *dsCN/dsCN3* zeigen eine um 36 – 56 % reduzierte strahlende Geschwindigkeitskonstante, die durch signifikante Reduktion der nicht-strahlenden Geschwindigkeitskonstante zu einer ebenfalls verbesserten Fluorophorleistung führen.

Mit Augenmerk auf die Geschwindigkeitskonstanten der Fluorophore mit 5-Bromindol (ss/dsBr und ss/dsBr3) lässt sich hier vermuten, dass es durch den Schweratom-Effekt häufiger zur Interkombination kommt – jedoch in beide Richtungen. Der Brom-Substituent agiert hier sehr wahrscheinlich als Triplett-Promotor, was sich ungünstig auf dessen Photostabilität auswirkt.

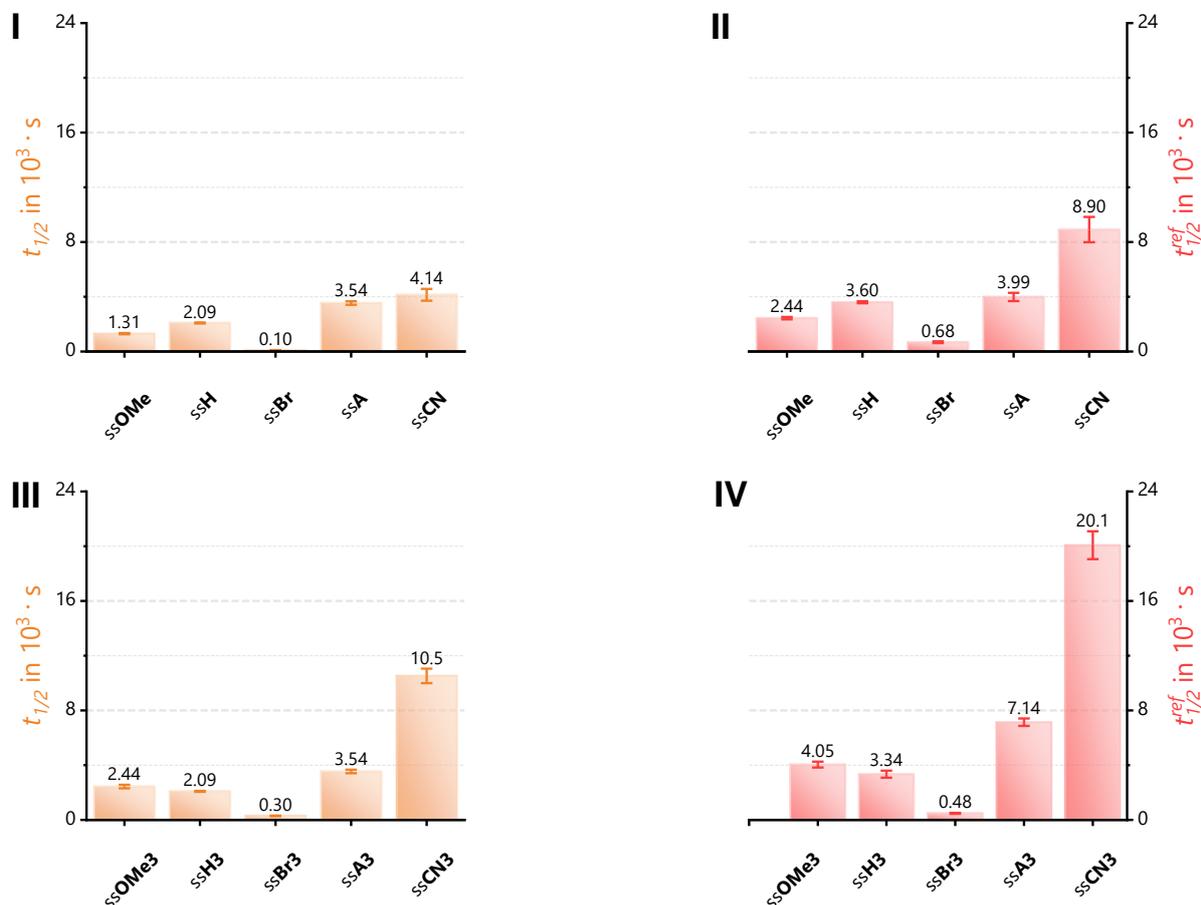


Abbildung 47: Halbwertszeit $t_{1/2}$ und referenzierte Halbwertszeit $t_{1/2}^{ref}$ der einfach-modifizierten Einzelstränge ssOMe, ssH, ssBr, ssA, ssCN, ssOMe3, ssH3, ssBr3, ssA3 und ssCN3 im Vergleich. I, III: gemessene Halbwertszeiten $t_{1/2}$, II, IV: referenzierte Halbwertszeiten $t_{1/2}^{ref}$. (2.5 μ M Einzelstrang, 10 mM NaPi-Puffer, pH 7, 250 mM NaCl in Millipore-Wasser belichtet mit 468 nm-LED)

Die Photostabilität erhöhte sich bei ssCN3 um Faktor 5 im Vergleich zur Leitstruktur in ssH. Die stabilisierenden Effekte der Methylgruppe waren überdies bei allen Chromophoren zu beobachten – mit Ausnahme zum Farbstoffpaar ssH und ssH3. Jedoch absorbieren die unterschiedlichen Chromophoren nicht identisch bei dem Emissionsspektrum der verwendeten LED. Aus diesem Grund wurden die erhaltenen en mit dem Absorptionsgrad multipliziert. Anschließend wurde auf die Fluorophor-Leitstruktur ssH referenziert, in dem ihr (willkürlich) die Halbwertszeit von $t_{1/2} = 3600$ s zugewiesen wurde. Farbstoffe, deren Absorptionsmaxima nahe oder ferner dem LED-Emissionsspektrum liegen, erfahren durch das Referenzieren bedeutende Änderungen in ihrer Halbwertszeit.

5.4 Thermisches Bleichen mit Singulett-Sauerstoff

Im Gegensatz zu Photostabilitätsuntersuchungen bedient man sich beim thermischen Bleichen an Reaktionen, die Singulett-Sauerstoff ohne Anregung mit Licht erzeugen – wie die molybdat-katalysierte Disproportionierung von Wasserstoffperoxid:^[73-74]

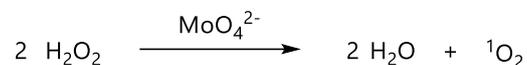


Abbildung 48: Molybdat-katalysierte Zersetzung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Singulett-Sauerstoff.

Hierfür wurden die Farbstoffe gelöst in Ethanol zu einer phosphatgepufferten Lösung von Natriummolybdat gegeben und für 15 min bei 20 °C äquilibriert. Nach Zusatz von Wasserstoffperoxid wurden Absorptionsspektren aufgenommen, um den Reaktionsverlauf spektroskopisch nachvollziehen zu können. Die Endlösung bestand aus 10 µM Farbstoff, 1 mM Natriummolybdat, 100 mM NaPi-Puffer (pH 9) und 50 mM Wasserstoffperoxid. Dies entspricht einem Zusatz von 100 eq Natriummolybdat und 5000 eq Wasserstoffperoxid. Diese hohe Menge wurde gewählt, damit eine Kinetik pseudo-erster Ordnung erhalten wird. Um etwaige Nebenreaktionen auszuschließen, wurden zur Kontrolle ebenfalls Absorptionsspektren von Lösungen aufgenommen, in denen einer der beiden Reagenzien – also entweder Natriummolybdat (Abbildung 108, Seite 162) oder Wasserstoffperoxid (Abbildung 49) – durch Wasser ersetzt wurden. Die zeitaufgelösten Untersuchungen zeigten hierbei, dass die Farbstoffe nicht durch alleinigen Zusatz von Natriummolybdat degradieren. Dagegen war bei dem alleinigen Zusatz von Wasserstoffperoxid eine signifikante Untergrundreaktion ersichtlich. Aus diesem Grund wurden die entsprechenden Reaktivitäten mit Singulett-Sauerstoff korrigiert. Die entsprechenden Daten hierfür sind dem Experimentalteil zu entnehmen.

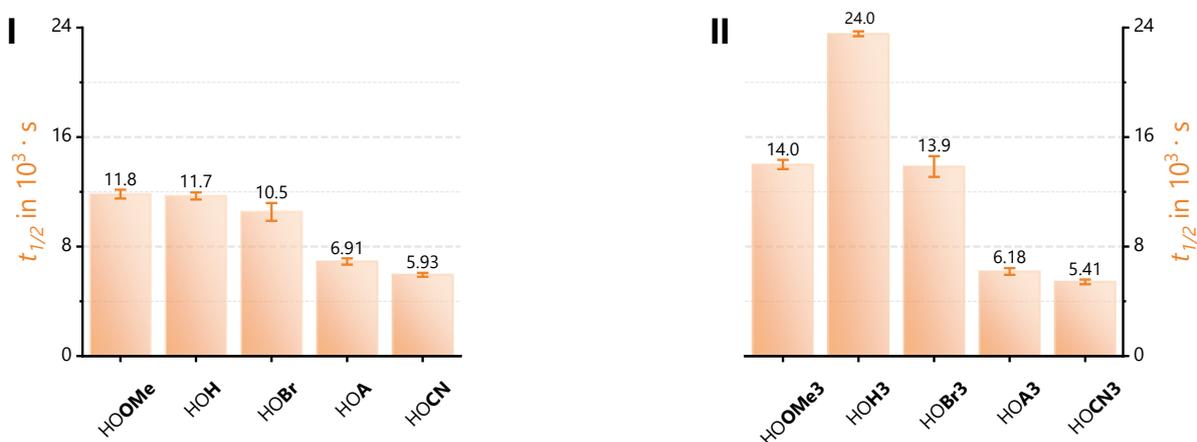


Abbildung 49: Halbwertszeiten $t_{1/2}$ für die Nebenreaktion mit Wasserstoffperoxid. (10 µM Farbstoff, 50 mM H_2O_2 , 100 mM NaPi-Puffer (pH 9) in 2 % Ethanol in Millipore-Wasser)

Die Reaktivität gegenüber Wasserstoffperoxid nimmt in der Reihe mit sinkender Nukleophilie der unmethylierten Farbstoffe $\text{HOOMe} > \text{HOH} > \text{HOBr} > \text{HOA} > \text{HOCN}$ ab. Ebenso wirkt sich die Methylierung von HOOMe (x 1.2) und HOBr (x 1.3) positiv auf deren Stabilität gegenüber Wasserstoffperoxid aus. Darüber hinaus zeigt HOH3 eine um Faktor 2.1 verlängerte Halbwertszeit. Wasserstoffperoxid reagiert hierbei als klassisches Nukleophil, dessen Reaktivität mit der Elektrophilie des Farbstoffes zunimmt.

Zudem erscheint es so, dass sich der positive, zusätzliche Nutzen der Methylierung ab einer gewissen „Schwelle“ (HOA und HOCN) umkehrt (Abbildung 49).

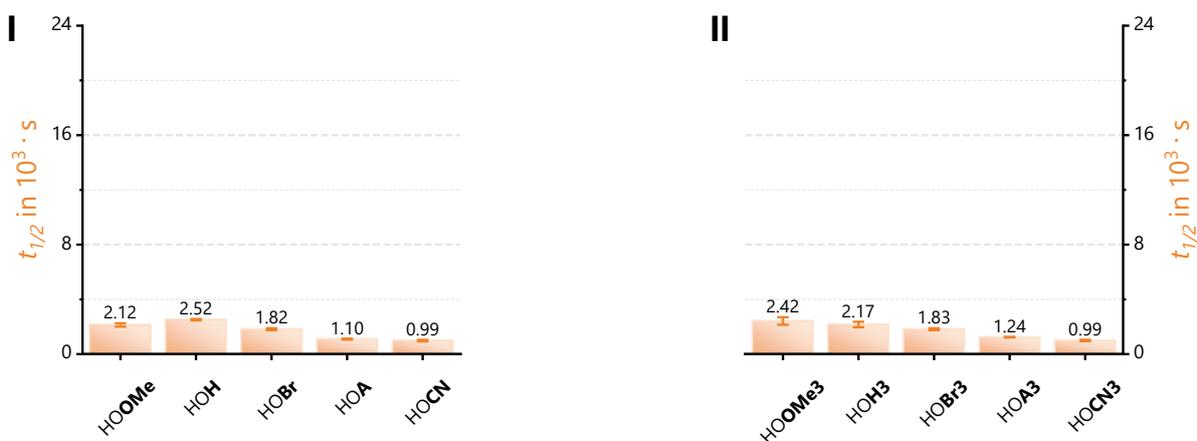


Abbildung 50: Korrigierte Halbwertszeiten $t_{1/2}$ für die Reaktion mit Singulett-Sauerstoff ohne Belichtung. (10 μ M Farbstoff, 1 mM Na_2MoO_4 , 50 mM H_2O_2 , 100 mM NaP_i -Puffer, pH 9, in 2 % Ethanol in Millipore-Wasser)

Bei Betrachtung der korrigierten Halbwertszeiten $t_{1/2}$ für die Reaktion mit Singulett-Sauerstoff fällt im Vergleich zur Reaktivität mit Wasserstoffperoxid der schnellere Fluorophorabbau auf. Weiterhin ist ersichtlich, dass die Reaktivität mit einer verminderten Nukleophilie des Farbstoffes einhergeht, trotz der Elektrophilie von Singulett-Sauerstoff. So bleibt zunächst offen, inwieweit sich diese gegensätzliche Reaktivität begründen lässt.

5.3 Korrelation von Extinktionskoeffizient und Nucleophilie-Parameter

Aufgrund der Tatsache, dass Singulett-Sauerstoff ein Elektrophil darstellt, wurde die nucleophile Reaktivität der Farbstoffe bestimmt.^[75-76] Aus diesem Grund werden in dieser Struktur-Reaktivitätsbeziehung ausschließlich Indolderivate der Cyanin-Styryl-Farbstoffe (HOOMe, HOH, HOBr, HOA, HOCN, HOOMe3, HOH3, HOBr3, HOA3 und HOCN3) beachtet (Abbildung 51, I). Je höher das HOMO der Farbstoffe, desto höher sollte die Reaktivität mit Elektrophilen sein, da die Wechselwirkung mit dessen LUMO entsprechend der Stabilisierung beider wechselwirkender Orbitale energetisch günstiger wird. Da Cyanin-Styryl-Farbstoffe vollständig konjugierte Systeme darstellen, wird ihre Reaktivität denen der π -Nucleophilen zugeordnet. Die Bildung des initialen π -Komplex mit Singulett-Sauerstoff wäre abhängig von der Lage des HOMO, welches in seiner energetischen Lage direkt mit der Elektronendichte des Indolteils (Abbildung 51, III) zusammenhängt. Der molare dekadische Extinktionskoeffizient beschreibt wie die π -Elektronendichte in Abhängigkeit des Substituenten verändert wird. Vermutlich wird hierdurch die σ -Elektronendichte beeinflusst, die mit sinkender π -Elektronendichte den s-Charakter des Indol-Stickstoffs erhöht. Ebenso verringert die Einbringung eines endozyklischen Stickstoffs die HOMO-Energie des Chromophors (Abbildung 51, II). Dieser Umstand führt zu einer gesteigerten Elektronegativität und letzten Endes zur Bindungsverkürzung im konjugierten Chromophorsystem (Abbildung 51, IV). Die Höhe des Extinktionskoeffizienten spiegelt demnach (i) die Größe des Chromophors, da im Allgemeinen der Photoneneinfangsquerschnitt abhängig von der Größe ist, und (ii) die energetische Lage des HOMOs wider.

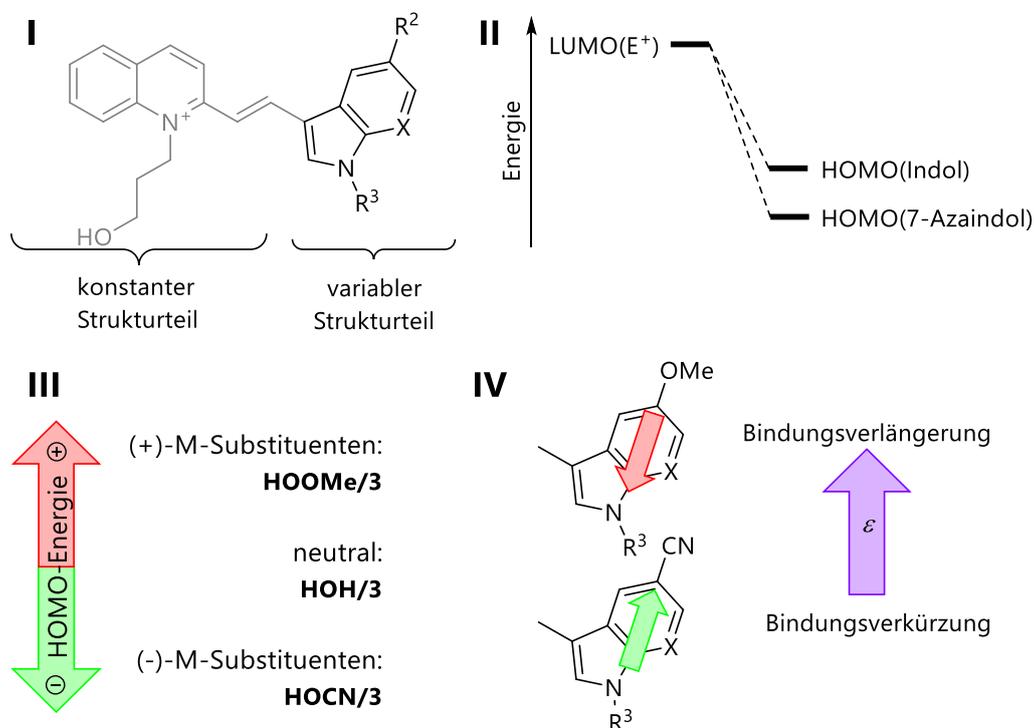


Abbildung 51: Visualisierung des Konzepts zur Korrelation von Nucleophilie, Elektrophilie und dem Extinktionskoeffizienten. I: zeigt den konstanten und variablen Teil dieser Struktur-Reaktivitätsbeziehung, II: Exemplarische HOMO-Energien von Indol und 7-Azaindol gegenüber der energetischen Lage eines Elektrophils (E⁺), III: Beeinflussung der HOMO-Energien durch Substituenten, IV: Mesomere Effekte beeinflussen Bindungslängen und Extinktionskoeffizienten.

Mayr *et al.* konnten in diesem Zusammenhang eine Reihe an 5-substituierten Indolen bezüglich ihrer Reaktivität gegenüber verschiedener Benzhydrylkationen untersuchen. Weiter konnten sie die Geschwindigkeitskonstanten, $k_{20\text{ }^\circ\text{C}}$, zweiter Ordnung linear mit der Elektrophilie E des Benzhydrylkations korrelieren. So konnte für das Set an Indolderivaten der Nukleophilie-Parameter N wie auch der nukleophilie-spezifische Parameter s ermittelt werden. Hierzu wurde folgende Gleichung verwendet, die die obigen Parameter enthält:^[77]

$$\log k_{20\text{ }^\circ\text{C}} = s(E + N) \quad (\text{Gl. 5.2-1})$$

Die substituentenabhängige Elektronendichte des Indolteils der Cyanin-Styryl-Farbstoffe wird durch den Extinktionskoeffizienten ϵ_{max} beschrieben. Gleichwohl ist die energetische Lage des HOMO nicht absolut, sondern nur in Relation zueinander zu bestimmen. In diesem Zusammenhang sollte eine Korrelation von Extinktionskoeffizient und dem Nukleophilie-Parameter bestehen.

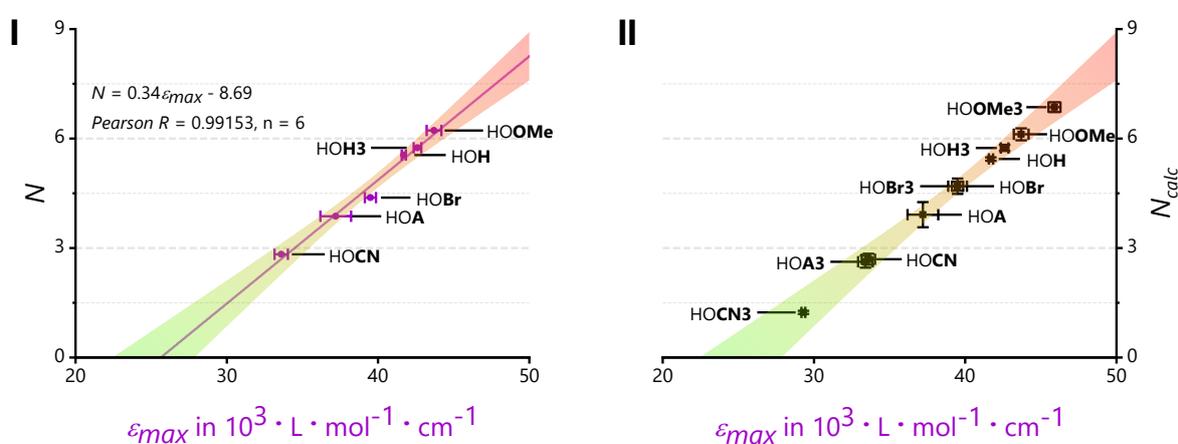


Abbildung 52: Korrelation des Nukleophilie-Parameters N und dem molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten. I: Korrelation und lineare Regression für bekannte Indole, II: berechnete Nukleophilie-Parameter N_{calc} .

Der Nukleophilie-Parameter N korreliert in einem sehr guten, positiven Zusammenhang mit dem molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten ϵ_{max} (Abbildung 52). Dies wird durch die Lage der Punkte auf der Geraden und schlussendlich durch die Stärke (Betrag) des *Pearson*-Korrelationskoeffizienten klar. Dieser deterministische Zusammenhang erlaubt nun die Bestimmung von Nukleophilie-Parametern N_{calc} , die nicht aufgrund experimenteller Grundlagen erlangt wurden. In den vorherigen Unterkapiteln wurden drei wesentliche Abbauege für Cyanin-Styryl-Farbstoffe betrachtet:

- Photobleichen
- Reaktion mit Wasserstoffperoxid
- Reaktion mit thermisch synthetisiertem Singulett-Sauerstoff

Inwieweit hierbei ein Zusammenhang zwischen dem Extinktionskoeffizienten ϵ_{max} , der Nukleophilie N_{calc} und der Reaktivität, sowohl photochemisch als auch mit zwei reaktiven Sauerstoffspezies, besteht, wird im nächsten Kapitel behandelt.

5.4 Korrelationsanalyse von Nucleophilie und Reaktivität

Der eben eingeführte starke Zusammenhang von Extinktionskoeffizient ϵ_{max} und Nucleophilie N_{calc} soll nun ein besseres Verständnis für die Reaktivität der in diesem Kapitel eingeführten Fluorophore liefern. Hierzu werden die Geschwindigkeitskonstanten k der verschiedenen Reaktionen mit der Nucleophilie korreliert.

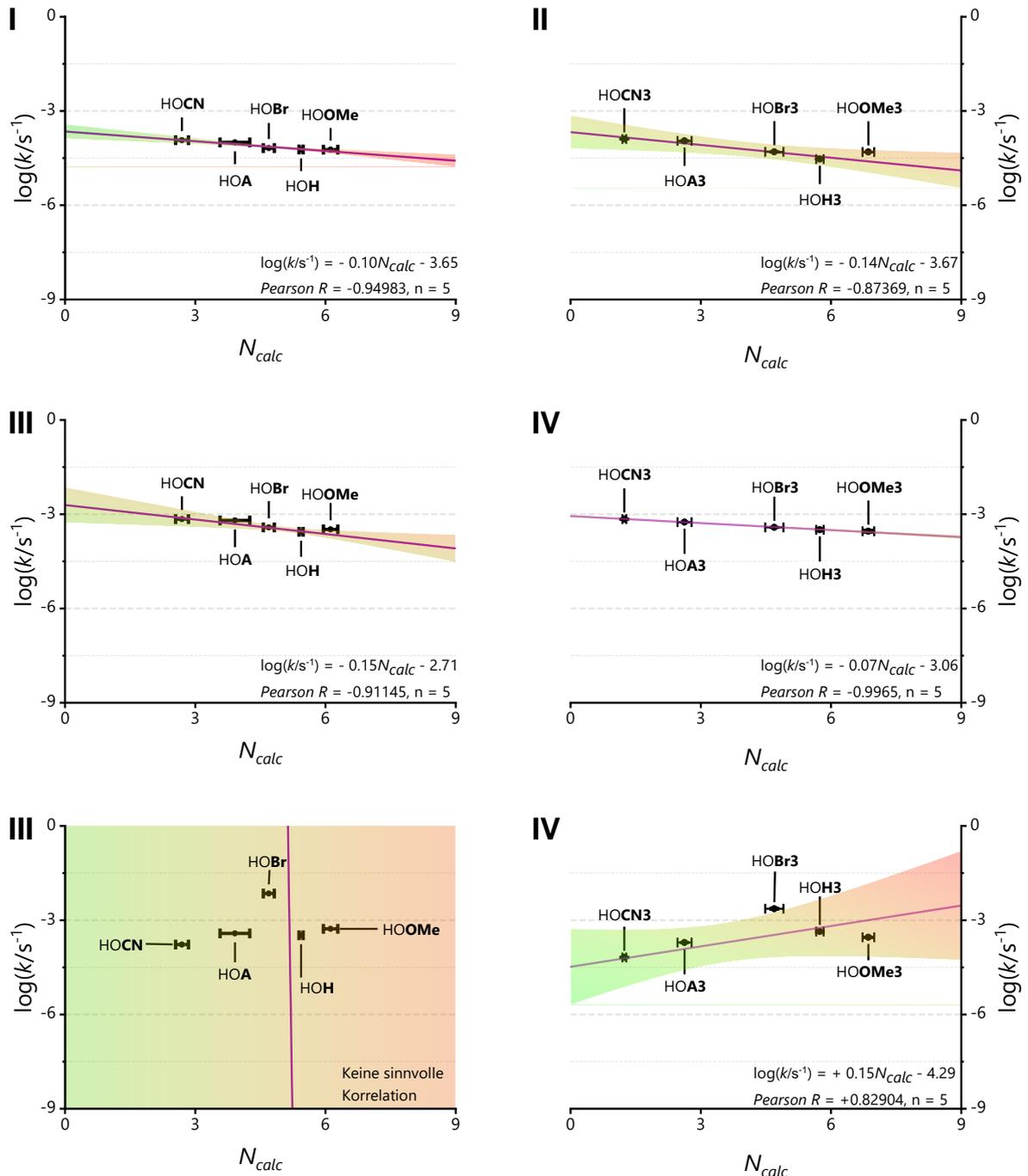


Abbildung 53: Korrelationsanalyse zum Zusammenhang von Nucleophilie N_{calc} und der Reaktivität (k) der Cyanin-Styryl-Farbstoffe HOOMe, HOH, HOBr, HOA, HOCN, HOOMe3, HOH3, HOBr3, HOA3 und HOCN3 mit Wasserstoffperoxid (I, II), thermisch synthetisiertem Singulett-Sauerstoff (III, IV) und beim Photobleichen (V, VI).

Der Steigung der Korrelation für Reaktionen mit Singulett-Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid (Abbildung 53, I-IV) ist zum einen betragsmäßig klein sowie negativ. Korrelationen mit einer Steigung gegen Null lassen vermuten, dass die Nukleophilie keinen großen Einfluss auf die Reaktivität hat beziehungsweise wenig Selektivität in der ablaufenden Reaktion herrscht. Lediglich die Photostabilität zeigt einen starken, wie auch positiven, Zusammenhang zur Nukleophilie. Im Umkehrschluss gilt dann auch, dass mit abnehmender Nukleophilie die Photostabilität der hier (!) untersuchten Farbstoffe steigt. Um diesen Zusammenhang noch klarer und dessen Identität greifbarer zu machen, sollen nun alle methylierten (HOOMe3, HOH3, HOBr3, HOA3, HOCN3) und nicht-methylierten Farbstoffe (HOOMe, HOH, HOBr, HOA, HOCN) der vorherigen Korrelationsanalyse gemeinsam unterzogen werden.

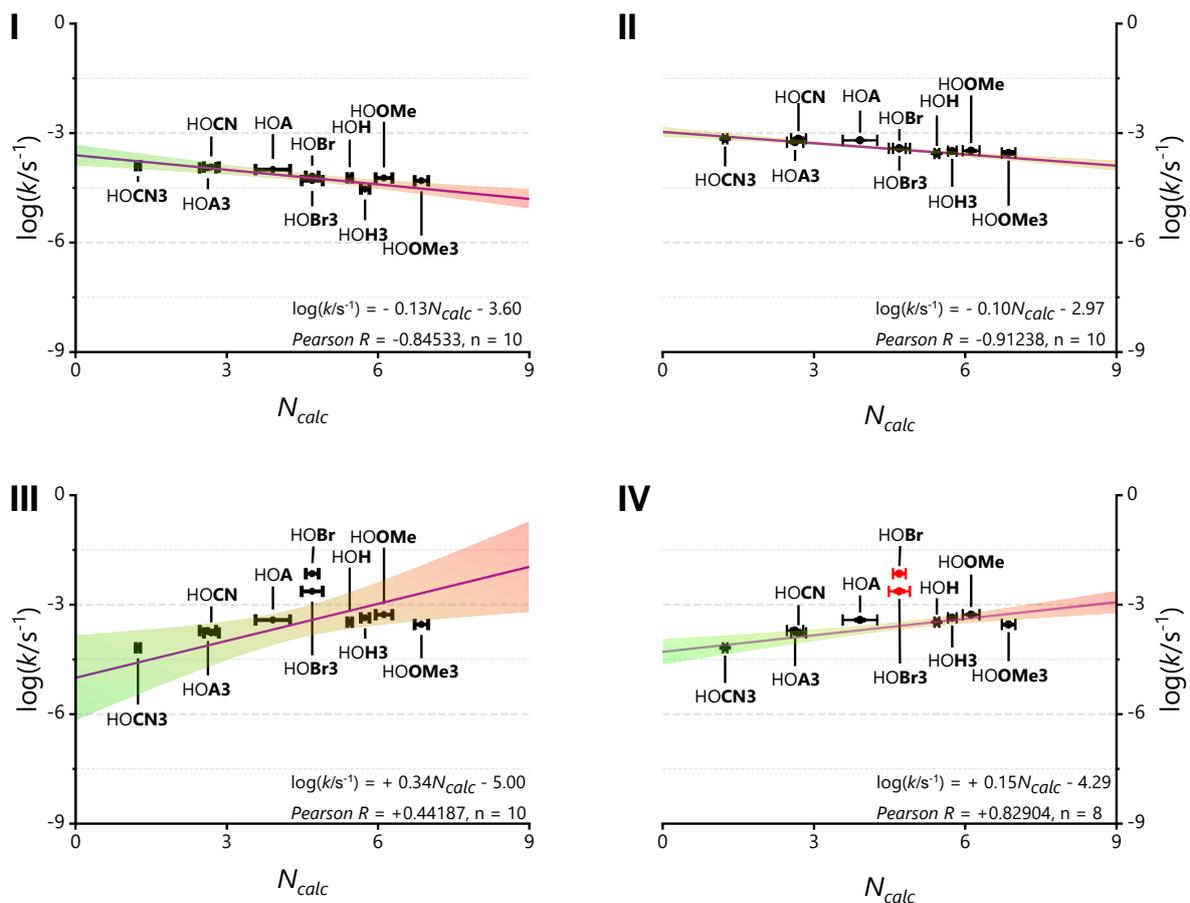


Abbildung 54: Gemeinsame Korrelationsanalyse der methylierten und nicht-methylierten Farbstoffe HOOMe, HOH, HOBr, HOA, HOCN, HOOMe3, HOH3, HOBr3, HOA3 und HOCN3. I: Reaktivität (k) gegenüber Wasserstoffperoxid, II: Reaktivität (k) gegenüber thermisch-synthetisiertem Singulett-Sauerstoff, III: Photostabilität unter Einbeziehung von HOBr und HOBr3, IV: Photostabilität unter Ausschluss der Farbstoffe HOBr und HOBr3.

Die synthetisierten Cyanin-Styryl-Farbstoffe lassen sich nun im systemchemischen Kontext besser einordnen. Die zuvor klassifizierten Zusammenhänge erhärteten sich weiter und es konnte ein starker Zusammenhang zwischen der Nukleophilie und der Reaktionsfreud- oder -leidigkeit erschlossen werden. Ebenso erhärtete sich der obige Zusammenhang zwischen Nukleophilie und Photostabilität (Abbildung 54). Bei Betrachtung zweier daraus abgeleiteten Halbwertzeiten $t_{1/2}$ bei $N_{calc} = 0$ und $N_{calc} = 10$ erhält man für das Photobleichen von 3.75 bis 0.11 h, für die Reaktivität mit Wasserstoffperoxid 0.77 bis 15.3 h und für die Reaktivität mit Singulett-Sauerstoff 0.18 bis 1.80 h.

5.5 Untersuchung von Cyanine Indole Pyridine-Farbstoffen

Neben den Cyanin-Styryl-Farbstoffen mit CyIQ-Leitstruktur wurden ebenfalls Farbstoffe mit der Leitstruktur zum Cyanine Indole Pyridine (CyIP) untersucht. Aus der vorherigen Studie ist hervorgegangen, dass Cyanin-Styryl-Farbstoffe mit methyliertem Indolteil und einem (-)-M-Substituenten oder endozyklischen Stickstoffatom besonders photostabil sind. Entsprechend wurden die Farbstoffe HOPyA3 und HOPyCN3 synthetisiert:

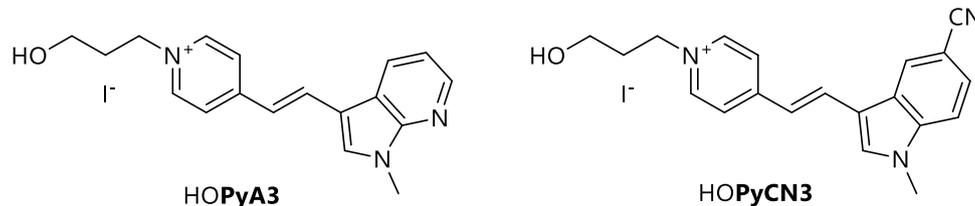


Abbildung 55: Strukturen der CyIP-Farbstoffe HOPyA3 und HOPyCN3.

Nachfolgend sind die Daten der spektroskopischen Untersuchung von HOPyA3 und HOPyCN3, sowie deren DNA-Konjugaten ss/dsPyCN3 bzw. ss/dsPyA3 dargestellt:

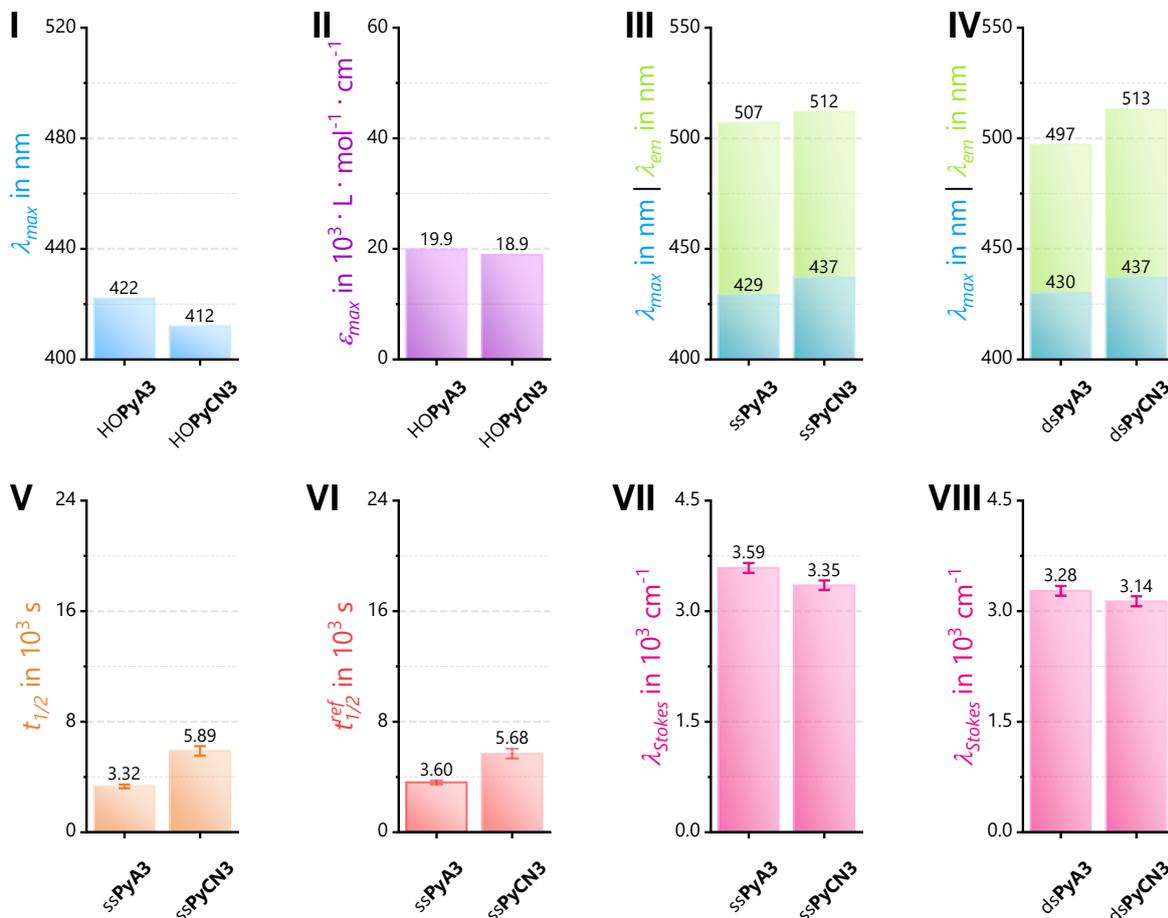


Abbildung 56: Optische Charakterisierung der Fluorophore HOPyA3 und HOPyCN3. I, II: Absorptionsmaximum λ_{max} und Extinktionskoeffizient ϵ_{max} in 20 % Ethanol in Millipore-Wasser, III: Absorptions- (λ_{max}) und Emissionsmaxima (λ_{em}) der einfach-modifizierten Einzelstränge, IV: Absorptions- (λ_{max}) und Emissionsmaxima (λ_{em}) der einfach-modifizierten Doppelstränge, V: Photostabilität ($t_{1/2}$) der Einzelstränge, VI: Korrigierte Halbwertzeit $t_{1/2}^{ref}$ [referenziert mit Absorptionsgrad der 408 nm LED, $t_{1/2}(ssPyA3)$ willkürlich auf 3600 s gesetzt], VII: Stokes-Verschiebung λ_{Stokes} der einfach-modifizierten Einzelstränge, VIII: Stokes-Verschiebung λ_{Stokes} der einfach-modifizierten Doppelstränge. (III-VIII: 2.5 μ M Einzelstrang oder 2.5 μ M hybridisierter Doppelstrang, 10 mM NaPi-Puffer, pH 7, 250 mM NaCl in Millipore-Wasser)

Der Übergang der Chinolinium- zu den entsprechenden CyIP-Farbstoffen ist mit einem hypsochromem Shift des Absorptionsmaximums λ_{max} verbunden, was sehr wahrscheinlich auf die kleinere Ausdehnung des aromatischen Systems zurückgeführt werden kann. Bei **HOPyCN3** beträgt der Unterschied zu **HOCN3** 2300 cm^{-1} und im Azaindolpaar (**HOA3**) 1200 cm^{-1} . In gleichem Maße nehmen auch die Extinktionskoeffizienten ϵ_{max} um 13.5 für **HOPyA3** und $14.6\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ für **HOPyCN3** ab (Abbildung 44 & 56).

In den einfach-modifizierten Einzelsträngen ist das Absorptionsmaximum λ_{max} der Pyridinium-Farbstoffe um 50 nm ($2400\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$) blauverschoben. Ebenso ist auch das Emissionsmaximum λ_{em} um 41 nm ($1400\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$) verschoben. **HOA** und **HOA3** zeigen eine größere Stokes-Verschiebung λ_{Stokes} nach Hybridisierung (Abbildung 45, 45 & 55). Dieser Effekt zeigt sich nicht bei **HOPyA3**. Hierbei ist zu erwähnen, dass **HOA** und **HOA3** über eine Verknüpfung in 2-Position des Chinoliniumteils an das Azaindol geknüpft sind und **HOPyA3** über die 4-Position des Pyridiniumteils. Sehr wahrscheinlich sind hierfür andere Bindungsmodi zugänglich.

Die ermittelten Halbwertzeiten sind nicht direkt vergleichbar mit denen der CyIQ-Derivate, da für die Belichtungsexperimente von **ssPyA3** und **ssPyCN3** eine andere LED verwendet wurde, deren Emissionsbereich und Leistung nicht den vorgegangenen Versuchen entspricht. Jedoch wurden erneut Versuche zur Reaktivität der Farbstoffe mit Singulett-Sauerstoff und Wasserstoffperoxid durchgeführt, die keine Reaktivität mit diesen Farbstoffen zeigten (Abbildung 123f, Seite 175). Demnach ist die Reaktion von Wasserstoffperoxid und Singulett-Sauerstoff mit dem Chinoliniumteil der Chromophore zu begründen.^[26-28]

Weiter wurde im Falle von **HOPyCN3** die Linkerlänge und somit die Bindungsnähe zur DNA verkürzt (**HO²PyCN3**):

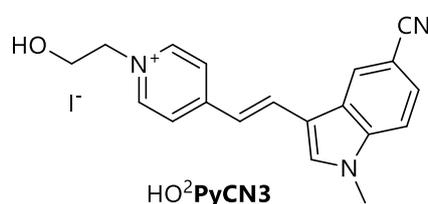


Abbildung 57: Struktur des Farbstoffs **HO²PyCN3**.

Der erhaltene Chromophor konnte sowohl in einzel- als auch in doppelsträngiger DNA eine höhere Fluoreszenzemission aufweisen. Weiter weist **ss²PyCN3** eine um 10 min verkürzte Halbwertzeit $t_{1/2}$ im Vergleich zum Fluorophor **ssPyCN3** auf. Ebenso führt die kürzere Anbindung an DNA zu einer bathochromen Verschiebung von Absorption und Emission um 10 nm (Abbildung 142, Seite 184).

6 Fluoreszente Bildgebung lebender Zellen

Cyanin-Styryl-Farbstoffe im Speziellen, und Cyanine allgemein sind aufgrund ihrer hohen Fluoreszenzintensitätssteigerung geeignete Reporter für Nukleinsäuren. Für die fluoreszente Bildgebung innerhalb lebender Zellen müssen die Fluorophore jedoch einige Anforderungen erfüllen. Zum einen sollten sie in besonderem Maße hell (*brightness*, $B = \Phi_F \times \epsilon$) sein und bei einer Wellenlänge über 450 nm anregbar sein – zum anderen sollten sie eine große Stokes-Verschiebung besitzen und photostabil sein. Die Helligkeit bewirkt in diesem Zusammenhang eine erleichterte Detektion des jeweiligen Fluorophors und ist speziell durch hohe Fluoreszenzquantenausbeuten gegeben. Ebenso wirkt sich die große Stokes-Verschiebung positiv auf die Separation von Anregungs- und Emissionslicht aus. Die Cyanine Thiazolorange (TO) und Thiazolrot (TR) konnten in diesem Zusammenhang schon als Fluoreszenzreporter in Nukleinsäure-Sonden innerhalb lebender Zellen eingesetzt werden. Als Inter- und Intrastangchromophorpaar konnten diese bereits in der fluoreszenten Bioanalytik Anwendung finden. [26-28, 78-79]

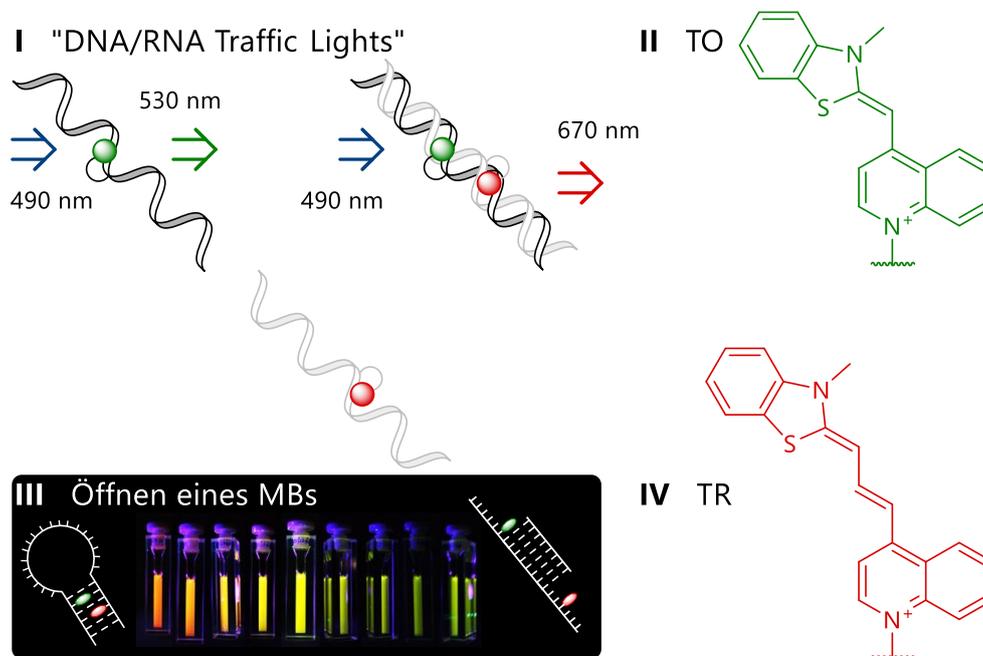


Abbildung 58: Konzept der "DNA/RNA Traffic lights" mit den Chromophoren TO und TR (I). II: Struktur von TO; III: Anwendung als Molecular Beacon (MB). Mit freundlicher Genehmigung aus Ref. [80]. (Copyright © 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim); IV: Struktur von TR. [26-28, 78-79]

Im Rahmen des Konzepts „DNA/RNA Traffic Lights“ konnten mit den Chromophoren TO und TR bereits Zielsequenzen *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden. Hierbei wird die räumliche Orientierung der Chromophore zueinander ausgenutzt, sodass es je nach Strangdesign zum Energietransfer von TO auf TR kommt. *Molecular Beacons* (MBs) nutzen hierbei eine kurze Stammsequenz, die beide Chromophore in räumlicher Nähe bringt. Daraus resultiert die Emission des Akzeptorfarbstoffes nach Anregung des Donors. In Anwesenheit einer zur Haarnadelschleife komplementären Zielsequenz öffnet sich der MB und aus der Donoranregung erfolgt die Donoremission (Abbildung 58). Aufgrund der geringen Photostabilität von TO und TR sind jedoch Langzeituntersuchungen innerhalb lebender Zellen nicht realisierbar. [6-7, 9-10, 61, 81]

6.1 Zytotoxizität von Cyanin-Styryl-Farbstoffen

Neben der Problematik endogener Photosensibilisatoren – die die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, siehe Kapitel 3.2) bei Anregungswellenlängen unterhalb 450 nm zur Folge haben – spielt auch die intrinsische Toxizität der eingesetzten Fluoreszenzreporter eine wichtige Rolle im Einsatz innerhalb lebender Zellen.

Zellwachstum und Zellteilung, aber auch die Homöostase, stellen grundlegende Prozesse lebender Systeme dar. Um den hohen Grad an Organisiertheit aufrechtzuerhalten, ist ein Stoff- und Energieaustausch mit der Umwelt nötig. Originärer Bestandteil ist hierbei der Abbau von Nährstoffen zur Energiegewinnung (Katabolismus) und der Aufbau neuer Zellbestandteile, was in seiner Gesamtheit als Stoffwechsel (Metabolismus) bezeichnet wird.^[82] Der Einfluss der synthetisierten Cyanin-Styryl-Farbstoffe auf die metabolische Aktivität von HeLa-Zellen wurde über einen *Assay* bestimmt, welcher die standardisierte Reduktion von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazol-3-ium Bromid (MTT) durch Succinat-Dehydrogenase nutzt.^[83-85]

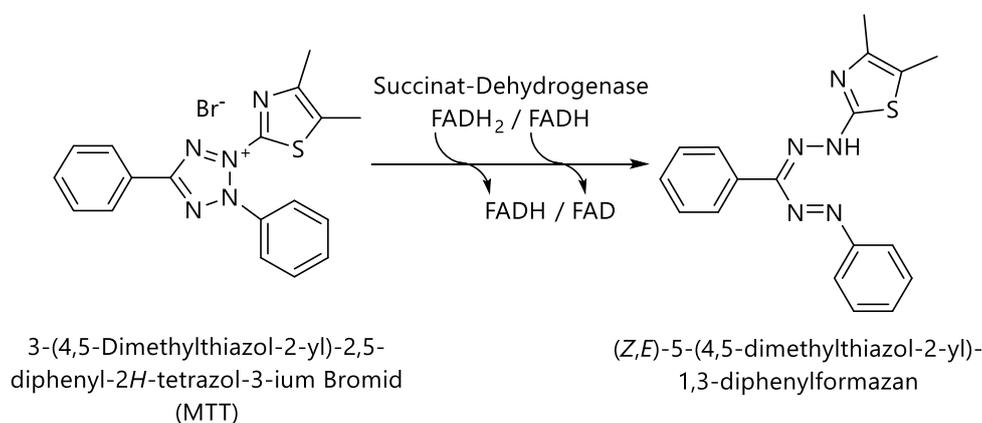


Abbildung 59: Reduktion des MTT-Reagenz durch Succinat-Dehydrogenase mit FADH oder FADH₂ als prosthetische Gruppe zum Formazanprodukt.

Die Reduktion des MTT-Reagenzes findet hierbei nur in metabolisch aktiven Zellen statt und resultiert in der Bildung von blau-violetter Formazankristalle. Nach 72 h Inkubation der Farbstoffe in verschiedenen Konzentrationen wird das zellpermeable MTT-Reagenz zugegeben. Innerhalb der folgenden vierstündigen Inkubation findet dessen Umsetzung zum unlöslichen Formazanprodukt statt. Der Zusatz eines *Solubilization Solution / Stop Mix*, welcher Natriumdodecylsulfat (SDS) enthält, löst die Zellmembran auf und beendet durch Proteindenaturierung die Reaktion. Weiter ist *N,N*-Dimethylformamid enthalten, welches das Formazanprodukt löst und so eine Detektion per Absorptionsspektroskopie ermöglicht. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet, wohingegen der Positivkontrolle Triton X-100 zugesetzt wurde. Letzteres Reagenz löst die Zellmembran im Vorfeld auf, wobei mit einer nur geringen Umsetzung des MTT-Reagenz zu rechnen ist. Die Aufnahme der Absorption ist demnach ein direktes Maß für die metabolische Aktivität und zeigt die Viabilität der Zellen in Anwesenheit der inkubierten Cyanin-Styryl-Farbstoffe an.

In der folgenden Abbildung ist die Viabilität von HeLa-Zellen in Abhängigkeit vom Chromophor und dessen Konzentration angegeben.

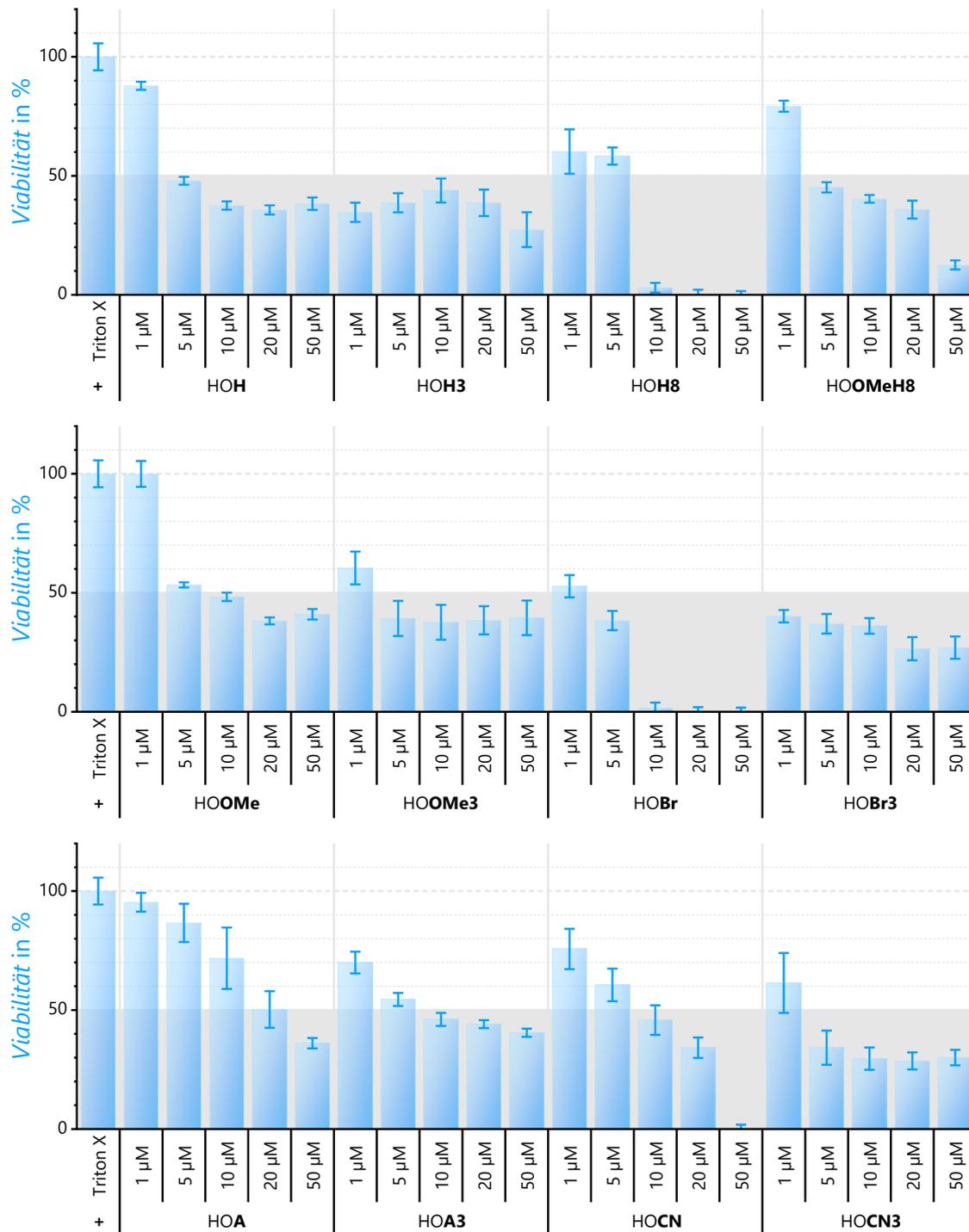


Abbildung 60: Viabilität von HeLa-Zellen nach 72 h Inkubation der synthetisierten Cyanin-Styryl-Farbstoffe.

Bei Betrachtung der Zellviabilitäten fallen HOH3 und HOBr3 mit einer gesteigerten Zytotoxizität ins Auge. Deren mittlere letale Konzentration (LC₅₀) liegt unter 1 µM. Dementgegen besitzen die restlichen Farbstoffe einen LC₅₀-Wert zwischen 1-5 µM (HOH, HOOMeH8, HOOMe3, HOBr, HOCN3) und 5-10 µM (HOH8, HOOMe, HOA3, HOCN3). Lediglich gegenüber dem Azaindol-Chromophor HOA zeigen HeLa-Zellen eine herausragende Verträglichkeit mit einem LC₅₀-Wert von 20-50 µM.

HOH8 und HOBr zeigen über ihre mittlere letale Konzentration eine immense Steigerung der Zytotoxizität. Ebenso scheinen sich die methylierten Farbstoffe HOOMe3, HOH3, HOBr3, HOA3 und HOCN3 einem Plateau anzunähern. Dieser Effekt kann vermutlich auf die unterschiedlich starke Aufnahme der jeweiligen methylierten Chromophore zurückgeführt werden. Demnach scheint sich ein Gleichgewicht zwischen Endo- und Exozytose einzustellen – wohingegen die nicht-methylierten Chromophore HOBr, HOA und HOCN verstärkt aufgenommen werden würden.

Für die Fluoreszenzfarbstoffe HOPyA3 und HOPyCN3 wurde ebenfalls die Zellviabilität von HeLa-Zellen bestimmt.

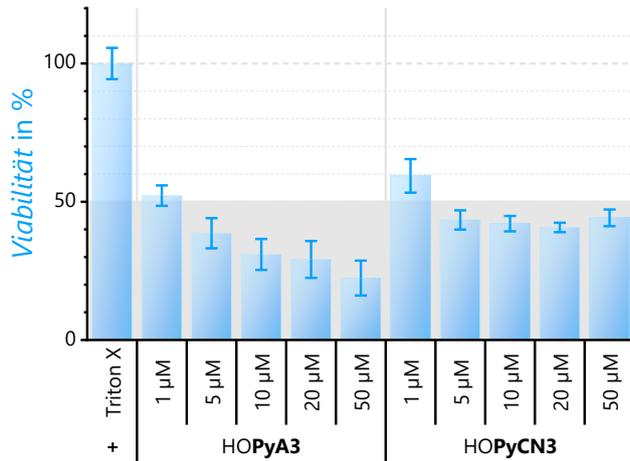


Abbildung 61: Zellviabilität von HeLa-Zellen in Abhängigkeit der Konzentration von HOPyA3 und HOPyCN3.

Sowohl HOPyA3 als auch HOPyCN3 besitzen eine mittlere letale Konzentration zwischen 1-5µM. Im Gegensatz zu HOPyA3 zeigt HOPyCN3 die Annäherung eines Plateaus und scheint geringfügig weniger toxisch als das korrespondierende CyIQ-Derivat HOCN3 zu sein.

In der Gesamtheit betrachtet erscheinen die synthetisierten Chromophore in Hinblick auf eine Inkubationszeit über 72 h und deren Konzentration wenig toxisch zu sein. Ebenso zeigt der HOH8 mit kovalent gebundenem Cyclooctatetraen eine besondere Toxizität zu besitzen, die vermutlich auf die COT-Funktion direkt zurückgeführt werden kann, da weder HOH noch HOH3 ein solches Viabilitätsprofil zeigen. Die Lipophilie, die Cyclooctatetraen mit sich bringt, begünstigt infolgedessen die Aufnahme des Fluorophors oder wirkt mit negativem Einfluss auf die Zellmembran. Darüber hinaus sei an dieser Stelle zu erwähnen, dass der photostabilere Fluorophor mit kleiner synthetischer Cyano-Modifikation am Indolteil (HOCN3) eine geringere Zytotoxizität zeigt.

6.2 *In vivo*-Lokalisation in HeLa-Zellen

Trotz des Anstiegs der Fluoreszenzintensität von Cyaninen und Cyanin-Styryl-Farbstoffen in Gegenwart von Nukleinsäuren, können diese auch durch unspezifische, nicht-kovalente Wechselwirkungen mit Biomolekülen stärker fluoreszieren. Aus diesem Grund wurde die Zelllokalisierung der Fluorophore in HeLa-Zellen getestet. Hierfür wurden die Zellen 24 h mit dem jeweiligen 10 μ M Farbstoff inkubiert und anschließend mikroskopiert.

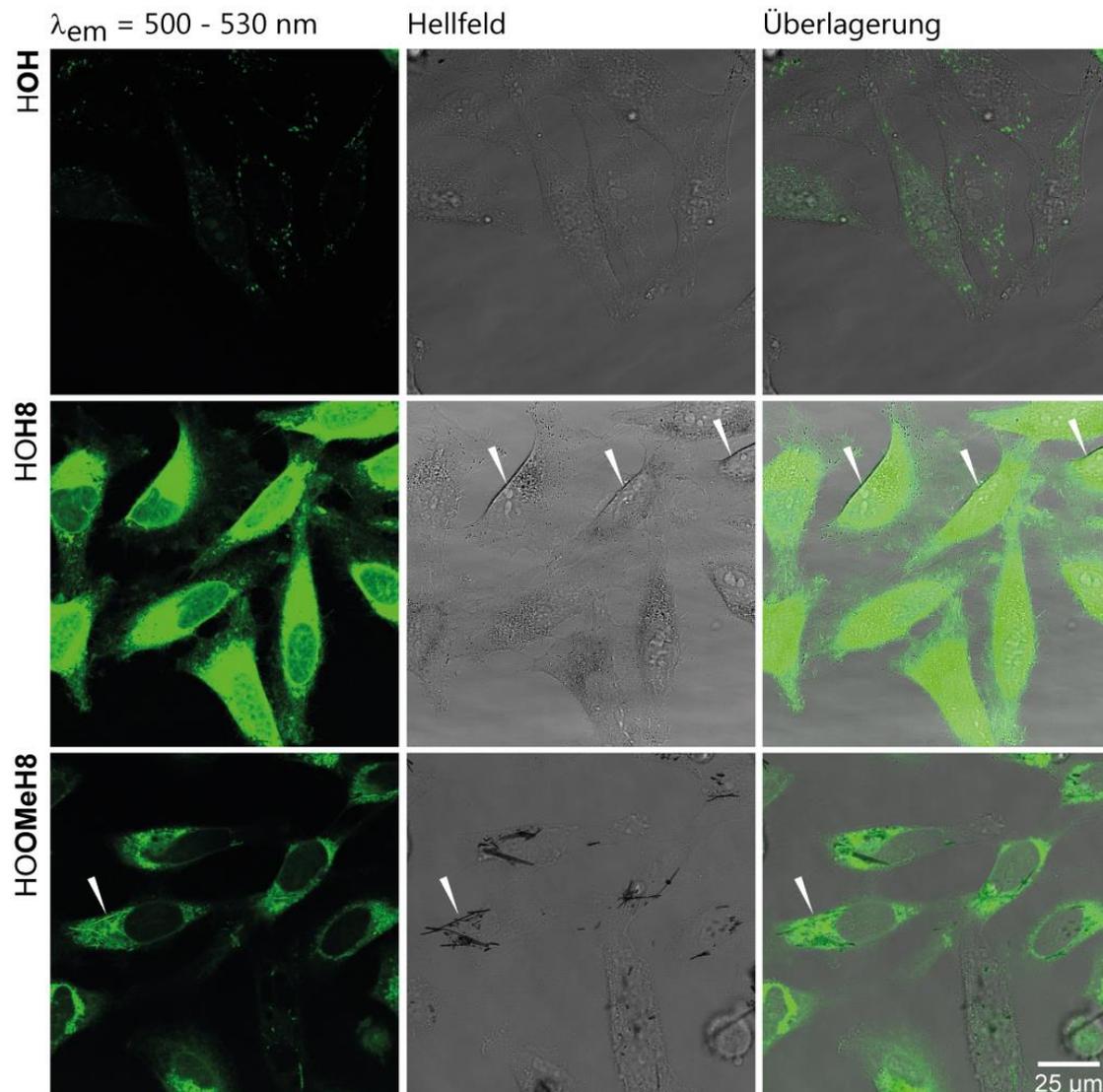


Abbildung 62: Fluoreszenzmikroskopie lebender HeLa-Zellen nach Inkubation mit den Farbstoffen HOH, HOH8 und HOOMeH8. HOH8: Pfeile zeigen beginnende Ablösung der HeLa-Zellen, HOOMeH8: Pfeile zeigen Kristallisation des Farbstoffes. ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$)

Die Leitstruktur HOH zeigt lediglich eine schwache Fluoreszenz im Vergleich zu den COT-Konjugaten HOH8 und HOOMeH8. Die Lokalisation von HOH ist vorwiegend endosomal und gering mitochondrial. Das COT-Konjugat HOH8 besitzt eine sehr helle Fluoreszenz und färbt die komplette HeLa-Zelle. Die Pfeile in Abbildung 62 zeigen für HOH8 eine beginnende Ablösung der Zellen, welche vermutlich auf einen Proliferationsstopp in Folge der ausgeprägten Zytotoxizität des Farbstoffes zurückzuführen ist.

Ebenso scheint HOH8, trotz mehrmaligem Waschen der Zellen, an extrazelluläre Strukturen zu binden. Intrazellulär sind in der Hellfeld-Aufnahme viele kleine, dunkle Punkte sichtbar, die auf Kristallisationskeime hinweisen. Letztere sind stark ausgeprägt bei HOOMeH8. In Abbildung 62 sind die langen, nadelförmigen Kristalle durch Pfeile kenntlich gemacht. Die gute Aufnahme von HOH8 ist sehr wahrscheinlich verantwortlich für dessen Zytotoxizität. Dagegen besitzt HOOMeH8 eine moderate Zytotoxizität, die vermutlich auf dessen Kristallisation zurückzuführen ist.

Die synthetisierten Cyanin-Styryl-Farbstoffe mit 5-Methoxyfunktion (HOOMe und HOOMe3) zeigten in den DNA-Biokonjugaten eine nur geringe Fluoreszenz. In der Fluoreszenzmikroskopie ist jedoch ersichtlich, dass HOOMe sich ähnlich zur Leitstruktur HOH verhält.

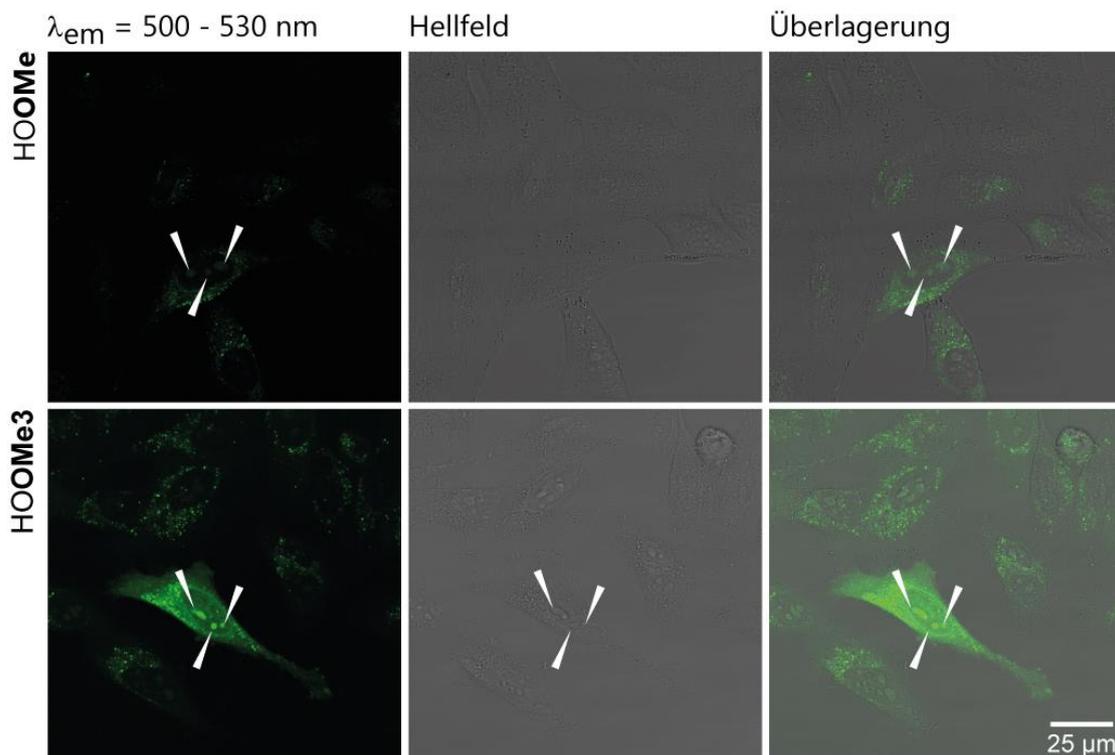


Abbildung 63: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen lebender HeLa-Zellen nach Inkubation mit den Farbstoffen HOOMe und HOOMe3. Pfeile: fluorophormarkierte Strukturen im Zellkern. ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$)

HOOMe3 erwies sich gegenüber HOOMe und HOH als weitaus heller und konnte wie HOOMe vorwiegend endosomal lokalisiert werden. Darüber hinaus können fluorophormarkierte Strukturen im Zellkern erkannt werden, was vermutlich Nucleoli sind.

Während mit HOOMe und HOOMe3 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen möglich waren, konnten mit den Farbstoffen HOBr, HOBr3 und HOH3 keine Bildgebung lebender Zellen erzielt werden. Die erhöhte Zytotoxizität dieser Farbstoffe und deren geringe Photostabilität führten wahrscheinlich frühzeitig zum Zelltod.

Im vorherigen Unterkapitel konnten die verwendeten HeLa-Zellen Fluorophore mit Azaindol- statt Indolkern in besonderem Maß tolerieren. Dementgegen zeigte gerade HOA keine Fluoreszenz in HeLa-Zellen –der methylierte Vertreter (HOA3) jedoch schon.

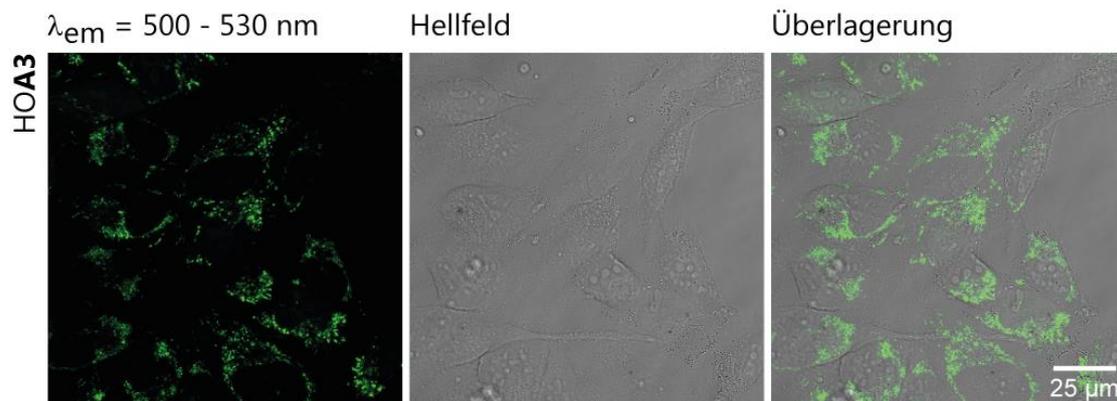


Abbildung 64: Fluoreszente Bildgebung von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation von HOA3. ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$)

Es ist anzunehmen, dass die hohe Zellviabilität der HeLa-Zellen in Gegenwart von HOA auf eine stark verminderte intrazelluläre Aufnahme von HOA zurückzuführen ist. Nichtsdestotrotz zeigt HOA3 ebenso eine sehr geringe Zytotoxizität, wie auch eine endosomal und mitochondriale Lokalisation *in vivo*.

Im Vergleich zu den COT-Konjugaten konnte sich HOCN3 in den Punkten Photostabilität und Zytotoxizität klar durchsetzen.

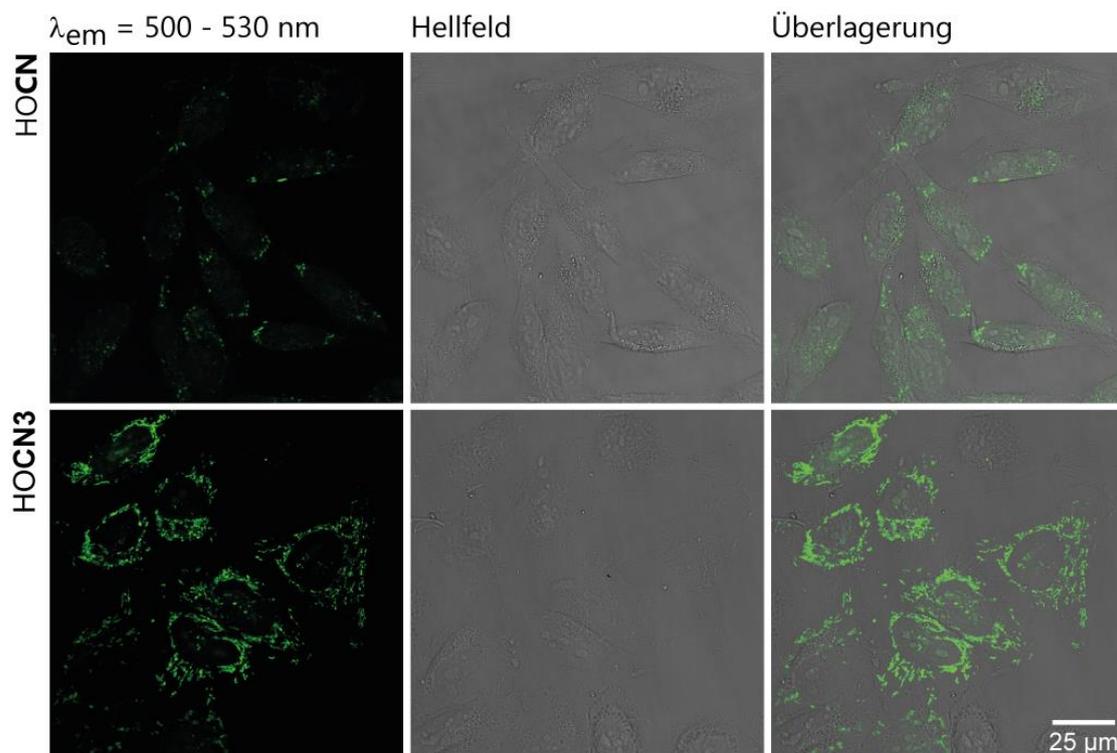


Abbildung 65: Fluoreszente Bildgebung von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation von 10 μM HOCN bzw. HOCN3. ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$)

Sowohl HOCN als auch HOCN3 werden gut durch HeLa-Zellen aufgenommen, sind vorwiegend in den Mitochondrien lokalisiert und besonders hell.

Neben der unspezifischen Lokalisation des HOH8 lässt die spezifische Lokalisation von HOCN3 die Annahme zu, dass die geschickte synthetische Modifikation an der 5-Position des Indols zu verbesserten fluoreszenzmikroskopischen Eigenschaften führt.

Weiter wurden die ersten beiden CyIP-Farbstoffderivate HOPyA3 und HOPyCN3 bezüglich ihrer fluoreszenzmikroskopischen Eigenschaften getestet.

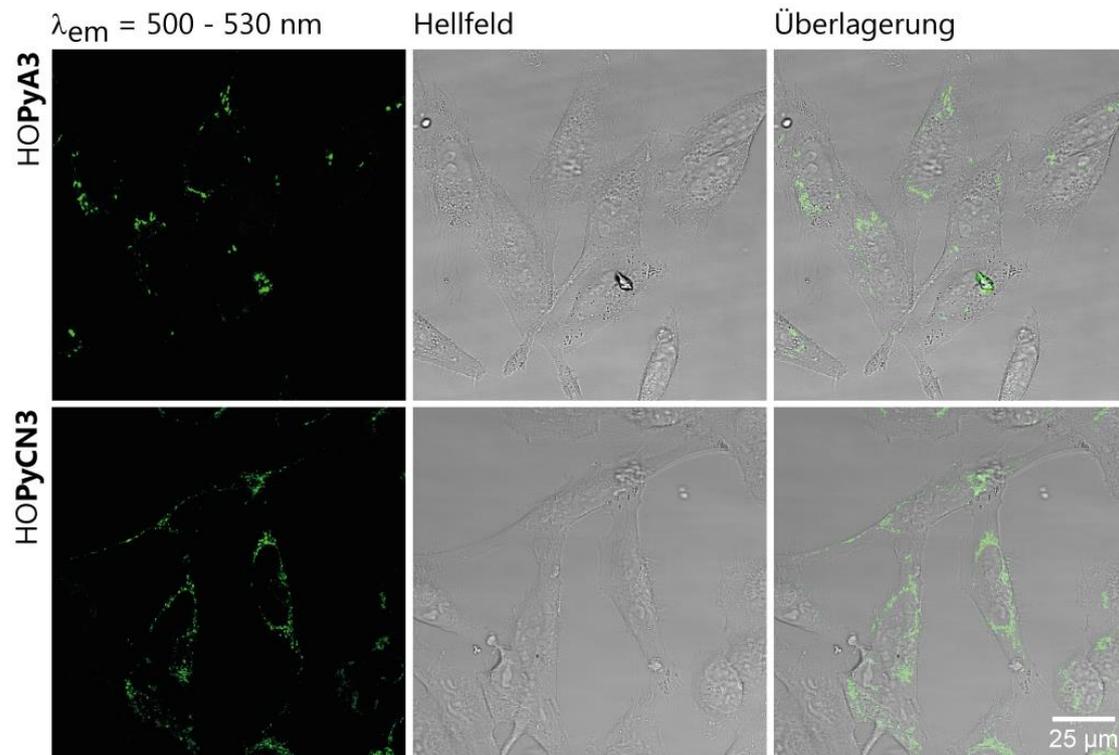


Abbildung 66: Fluoreszenzmikroskopische Eigenschaften von HOPyA3 und HOPyCN3 in lebenden HeLa-Zellen. ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$)

Beide Farbstoffe sind gut in lebenden HeLa-Zellen zu sehen, wobei HOPyCN3 heller ist und demnach besser den intrazellulären Raum passiert.

6.3 Spezifische Fluoreszenzmarkierung von Mitochondrien

Bei Betrachtung aller drei cyanofunktionalisierten Farbstoffe (HOCN, HOCN3, HOPyCN3) fällt die mitochondriale Lokalisation auf. Dieser Umstand konnte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe *Nienhaus* weiter untersucht werden und wurden von *X. Ge* durchgeführt. Hierzu wurden COS-7-Zellen jeweils mit den Fluorophoren HOCN3 und HOPyCN3 (10 μ M) und *MitoTracker*TM *Deep Red FM* für 30 min inkubiert und fluoreszenzmikroskopiert:

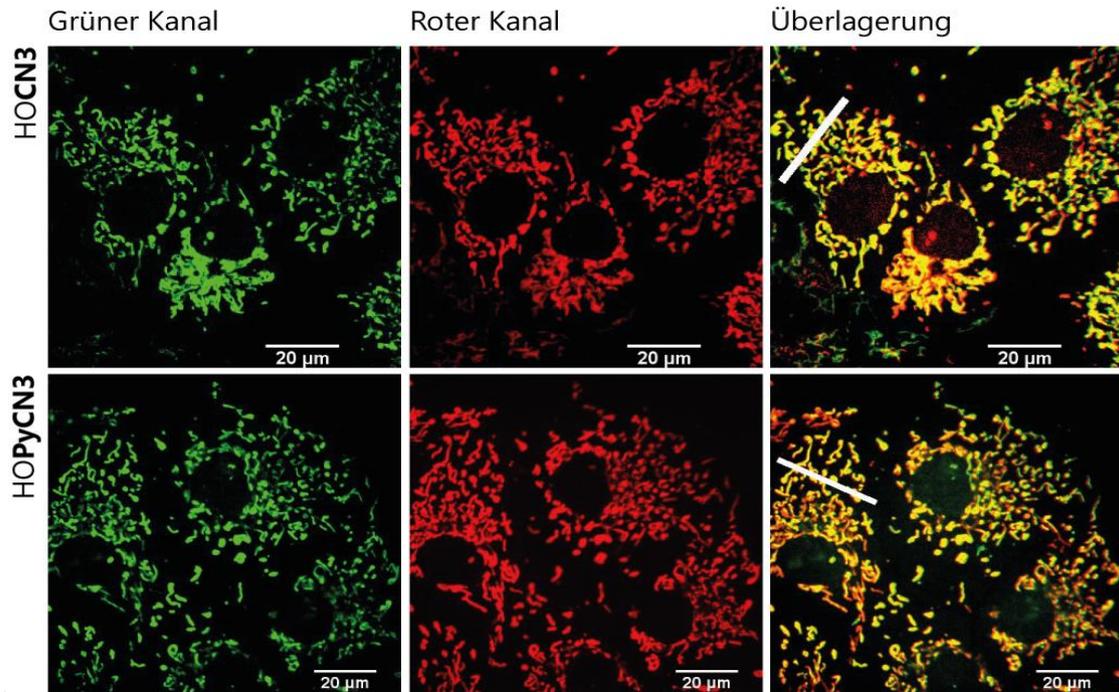


Abbildung 67: Fluoreszenzmikroskopie lebender COS-7-Zellen nach 30 min Inkubation mit HOCN3 oder HOPyCN3 und gleichzeitiger Färbung mit *MitoTracker*TM *Deep Red FM*. Querschnitt: Kolokalisationsanalyse.

Anschließend wurde in einem Querschnitt der Aufnahme die Intensität des roten Emissionskanals mit dem Grünen korreliert:

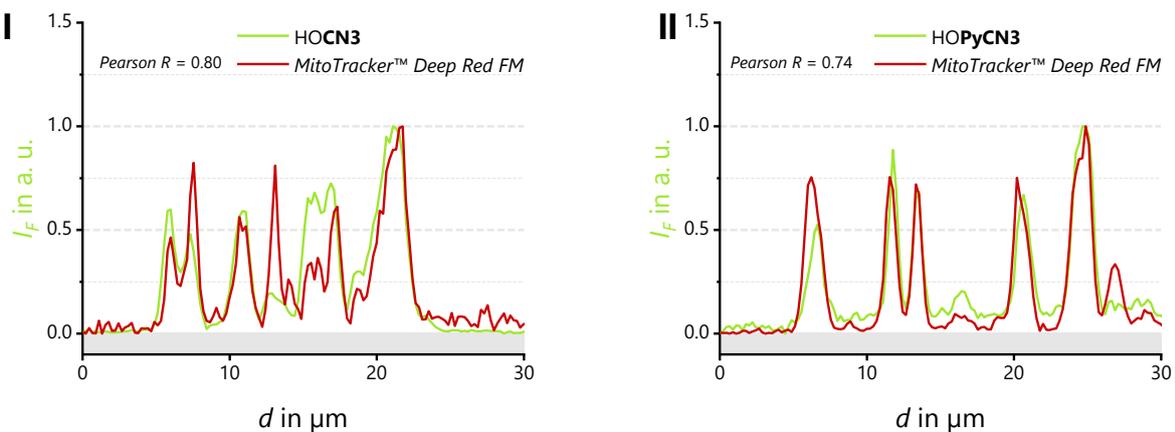


Abbildung 68: Intensitätsnormierte Fluoreszenzemission im Querschnitt der Fluoreszenzmikroskopieaufnahme.

Der starke Zusammenhang im Querschnitt ist gut ersichtlich aus dem *Pearson*-Korrelationskoeffizienten nahe eins. Demnach sind HOCN3 und HOPyCN3 geeignet zur selektiven, nicht-kovalenten Fluoreszenzmarkierung von Mitochondrien.

6.4 Kovalente Fluorophormarkierung von Mitochondrien

Mit dem Ziel, eine permanente Fluorophormarkierung von Mitochondrien zu erzielen, wurde ein Fluorophor entwickelt, der an der 5-Position des Indolteils eine Azidfunktion besitzt.

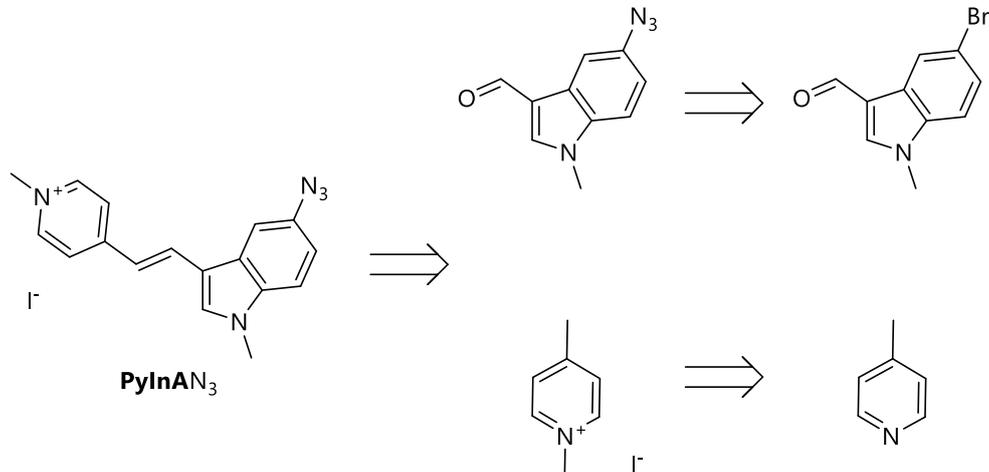


Abbildung 69: Struktur und Retrosynthese des azidmodifizierten Fluorophors **PyInAN₃**.

Durch Belichtung des Farbstoffes kommt es innerhalb von wenigen Sekunden zur Bildung des hochreaktiven Nitren-Radikals, welches direkt am Bildungsort abreagiert.

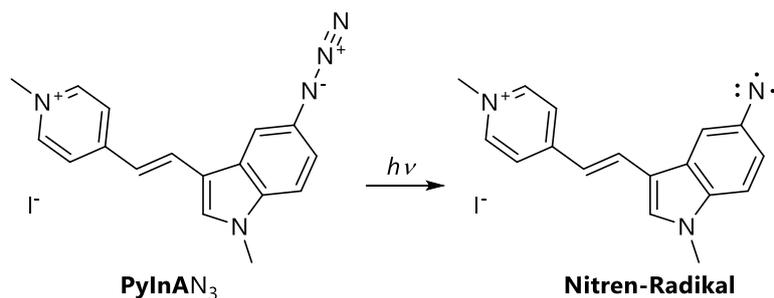


Abbildung 70: Bildung des Nitren-Radikals aus **PhInN₃**.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *I. Wehl* aus der Arbeitsgruppe *Schepers* zeigte, dass vorwiegend mitochondriale Strukturen und Strukturen innerhalb des Nukleus markiert werden:

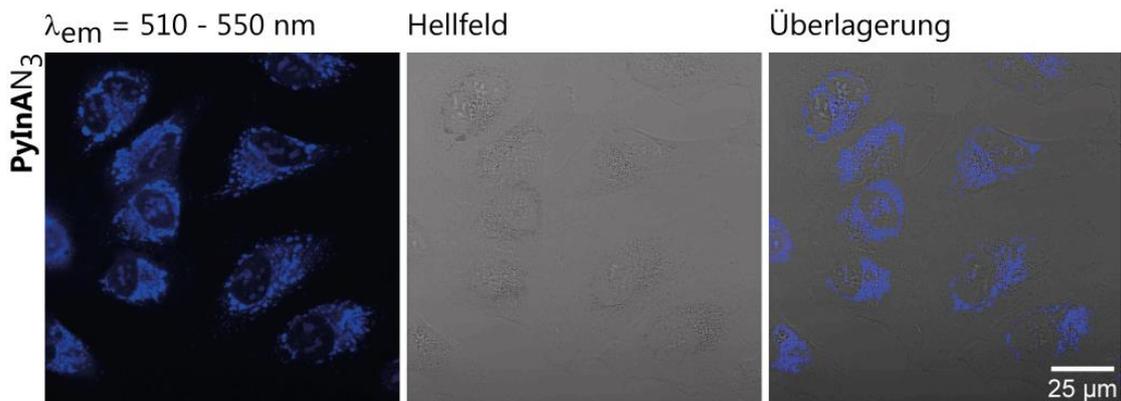


Abbildung 71: Fluoreszenzmikroskopie von **PhInAN₃** in lebenden HeLa-Zellen.

Neben der Photoaffinitätsmarkierung zellulärer Bestandteile lassen sich mit **PhInAN₃** ebenfalls gezielt Biomoleküle markieren, die im Rahmen einer spannungsvermittelten Azid-Alkin-Zykloaddition (*strain-promoted azide-alkyne cycloaddition*, SPAAC) reagieren.^[86-90] Hierbei können verschiedene Cyclooctin-Derivate (**DBCO**,^[91] **COMBO**,^[92] ...) an Biomoleküle kovalent gebunden sein.

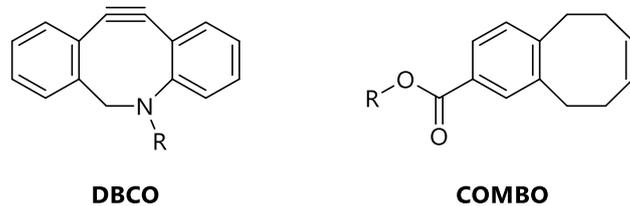


Abbildung 72: Struktur eines Dibenzocyclooctin- und Monobenzocyclooctin-Derivats.

In diesem Rahmen wurde der fluorige Charakter von **PhInAN₃** in Anwesenheit von doppel- und einzelsträngiger DNA mit dem „Klick“-konjugierten Einzelstrang verglichen. So konnte durch Anlagerung von **PhInAN₃** an einzel- und doppelsträngige DNA lediglich eine Fluoreszenzsteigerung um Faktor 3 beobachtet werden, während das Farbstoff-DNA-Konjugat **ssPyInA** gegenüber freien **PhInAN₃** in Lösung eine Intensitätssteigerung um Faktor 21 zeigt.

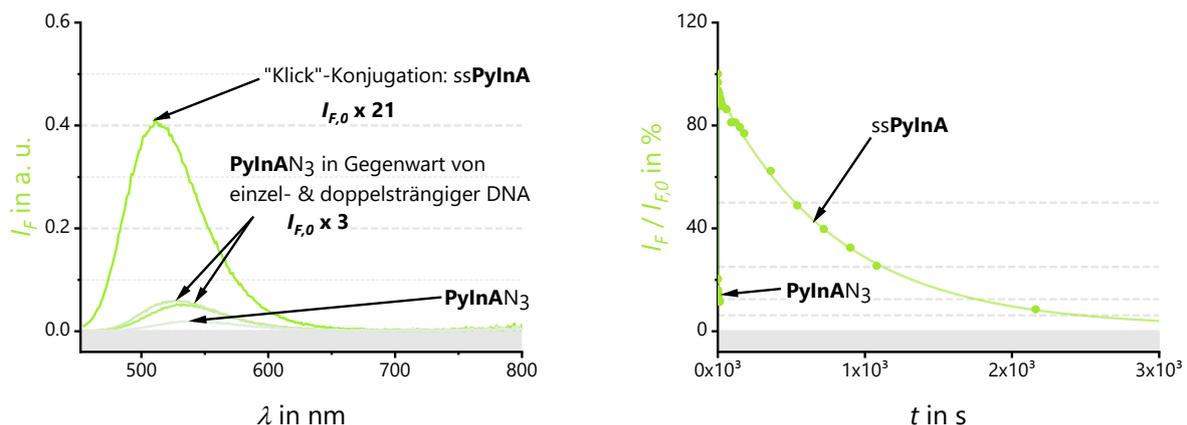


Abbildung 73: Vergleich der Fluoreszenzemission von **PhInAN₃** in An- und Abwesenheit von einzel- oder doppelsträngiger DNA und dem Farbstoff-DNA-Konjugat **ssPhInA** (links), sowie die Photostabilität von **ssPyInA** und freiem **PhInAN₃**. (2.5 μ M **ssPyInA**, 10 mM **NaPi**-Puffer, pH 7, 250 mM **NaCl** in Millipore-Wasser bzw. 2.5 μ M **PyInAN₃**, 10 mM **NaPi**-Puffer, pH 7, 250 mM **NaCl** 2 % **Ethanol** in Millipore-Wasser belichtet mit 408 nm-LED)

Weiterhin ist nach kupfer(I)-katalysierter Azid-Alkin-Zykloaddition eine immense Steigerung der Photostabilität zu beobachten, was über den (-)-I/-M-Effekt des gebildeten Triazols an der 5-Position des Indolteils erklärt werden kann. Hieraus lässt sich kovalente Fluoreszenzmarkierung in Abbildung 71 verstehen. Abschließend sei zu bemerken, dass die Photostabilität von **ssPhInA** ($t_{1/2} = 5691$ s) der des leistungsstarken Konjugats **ssPyCN3** ($t_{1/2} = 5887$ s) nahe kommt unter Beachtung beider Standardabweichungen.

7 In vitro Detektion von Nukleinsäuren

Eines der empfindlichsten bildgebenden Verfahren in der Biotechnologie ist die Fluoreszenz. Daher ist die kovalente Bindung von Fluorophoren an Nukleinsäuren – als flexibles und einzigartiges Erkennungselement – eine angewandte und einfache Methode. Diese Sonden können unterschieden werden in Hybridisierungssonden, die Informationen über das Vorhandensein und die Position einer komplementären Nukleinsäure liefern, und Aptamere, die eine Vielzahl von Zielmolekülen adressieren.^[8, 27, 61]

Die Kombination von Oligonukleotiden (die komplementär zur Zielsequenz sind) mit kovalent gebundenen Fluorophoren ermöglicht die Entwicklung von hochspezifischen Hybridisierungssonden. Wie bereits erwähnt, dient das Nukleinsäuregerüst als Erkennungselement und der Fluorophor als Reporter. Daher ist eine Unterscheidung zwischen hybridisierten und unhybridisierten Strängen nicht möglich und es müssen clevere Architekturen verwendet werden. Die am häufigsten verwendeten Strategien sind binäre Nukleinsäuresonden (BPs) und *Molecular Beacons* (MBs).

BPs bestehen aus zwei separaten Einzelsträngen, die komplementär zur Zielsequenz sind. Um den Hybridisierungsprozess nachzuweisen, wird ein Strang mit einem Fluorophor und der andere mit einem Quencher oder einem anderen Fluorophor konjugiert. Demnach führt die Hybridisierung in den ersten Fällen zu einem Emissionsverlust, im letzteren Fall aber zu einer bathochromen Verschiebung durch einen effizienten Energietransfer, der sich aus der Nähe beider Fluoreszenzfarbstoffe ergibt. Dennoch muss die Hybridisierung von BPs mit der Zielsequenz die langsame Kinetik und Gleichgewichtslage überwinden (Entropie). Es ist weiter zu beachten, dass große *Stokes*-Verschiebungen eine vereinfachte Filterung von (i) Anregungslicht, (ii) verbleibender Donoremision und auch einer (iii) reduzierten direkten Anregung des Akzeptors ermöglichen, was unweigerlich zu einem falsch-positiven Signal führen könnte.^[93]

MBs sind Nukleinsäurehaarnadeln, die aus einer sich selbstkomplementären Stamm- und Schleifenstruktur bestehen. Neben BPs kann die Fluoreszenzantwort von MBs entweder aus einem Quencher-Farbstoffpaar, Dual- oder Mehrfach-Farbstoffpaar realisiert werden. Fluoreszenzlöscher-Fluorophor-Paare resultieren in der Emission von Licht einer Wellenlänge, während Zwei- und Mehrfarben-Paare eine wellenlängenverschobene Emission liefern. Letztere verringern die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Signale. Die (i) Denaturierung der Schleifenregion durch Endonukleasen und (ii) die Auflösung der Haarnadel durch Proteine, die Einzelstränge binden (*single strand binding proteins*), oder (iii) Fluktuationen der Stammhybridisierung und -dehybridisierung sind immer noch eine Herausforderung und machen die *in vivo*-Anwendung von MBs fragwürdig.^[81, 94-96]

7.1 microRNA-155-5p als Modellzielsequenz

MicroRNAs (miR) sind nicht-kodierende RNA-Stränge mit einer Länge von 17-25 Nukleotiden und liegen in geringer Konzentration im Zytoplasma vor, was bereits deren Detektion in räumlicher Auflösung erschwert. Die Dynamik von zellulären Prozessen, die mit miR assoziiert sind, erfahren jedoch heute besondere Aufmerksamkeit. MicroRNAs spielen eine wichtige Rolle in vielen biologischen Prozessen, z. B. bei der RNA-Interferenz (RNAi).^[97] Daher bietet die Bildung von miRNA wertvolle Informationen für miRNA-assoziierte zelluläre Entwicklungen und Krankheiten, wie Krebs (oncomiR). In zunehmendem Maß zeigen miR eine Schlüsselrolle in der posttranskriptionellen Genregulation. Je nach Grad der Komplementarität wird die Genexpression über den *miR induced silencing complex* durch den beschleunigten Abbau der mRNA oder durch Inhibition des Translationsprozesses inhibiert.^[98-99]

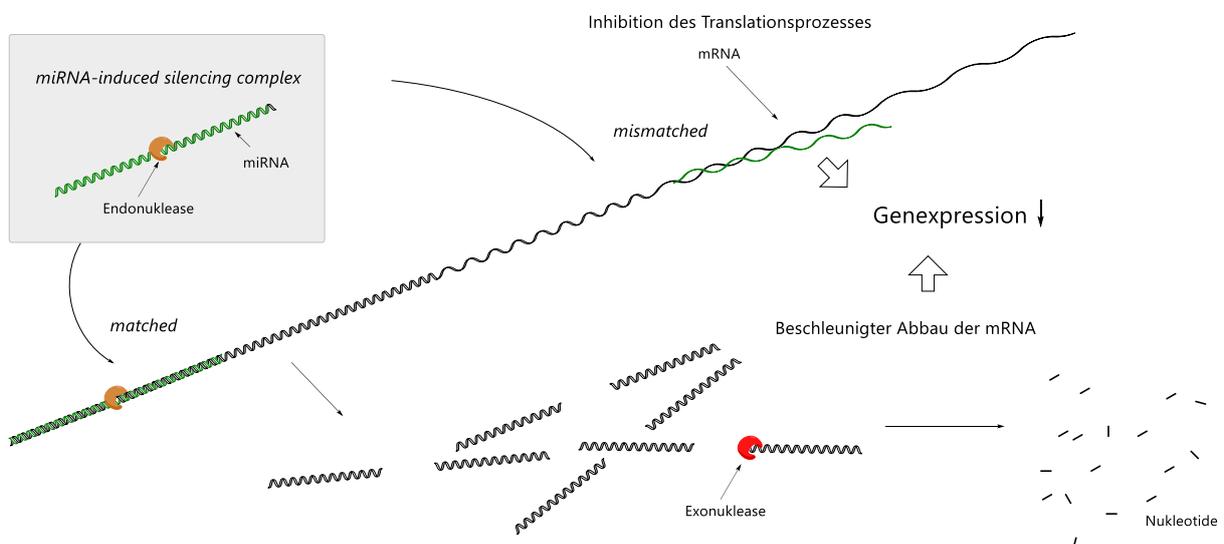


Abbildung 74: Posttranskriptionelle Genregulation durch microRNAs.

Die Bildung von Blutzellen geht von hämatopoetischen Stammzellen aus, die miR-155-5p exprimieren. In *Knock-Out*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass diese miR eine besondere Rolle in der Entwicklung von Lymphozyten einnimmt. Die Antigenstimulation dieser Immunzellen hat eine erhöhte Expression von miR-155-5p zur Folge und stellt deren Schlüsselrolle in Entzündungsprozessen und der Immunantwort dar.^[100-102]

Verschiedene Krebsformen, wie lymphatische Leukämien aber auch in Tumoren des Körpergewebes, haben jedoch eine Überexpression von miR-155-5p zur Folge. Dieser Umstand verdeutlicht das fein abgestimmte System der posttranskriptionellen Genregulation durch microRNAs und den entscheidenden Beitrag des Immunsystems in der Krebsentstehung.^[97, 103]

7.2 Konzeptionierung der hybridisierungsresponsiven Detektion

In Hinblick auf *in vivo*-Anwendungen besitzen MBs entscheidende Nachteile. Insbesondere die Wahrscheinlichkeit für endonukleolytische Spaltung der Schleifenregion birgt die Gefahr für falsch-positive Ergebnisse innerhalb lebender Zellen. Aus diesem Grund wurde in der Konzeptionierung der hybridisierungsresponsiven Detektion von miR-155-5p auf das Grundprinzip der binären Nukleinsäuresonden zurückgegriffen. Diese sollten weiter über eine PEG-Spacereinheit miteinander verknüpft werden, um die entropische Hinderung zu minimieren. Hierfür wurden zunächst die Donor-Akzeptor-Distanz optimiert. Weiter wurden die einfach donormarkierten Oligonukleotide synthetisiert, um die Energietransfer-Effizienz des jeweiligen Intrastrangchromophorpaars zu ermitteln.

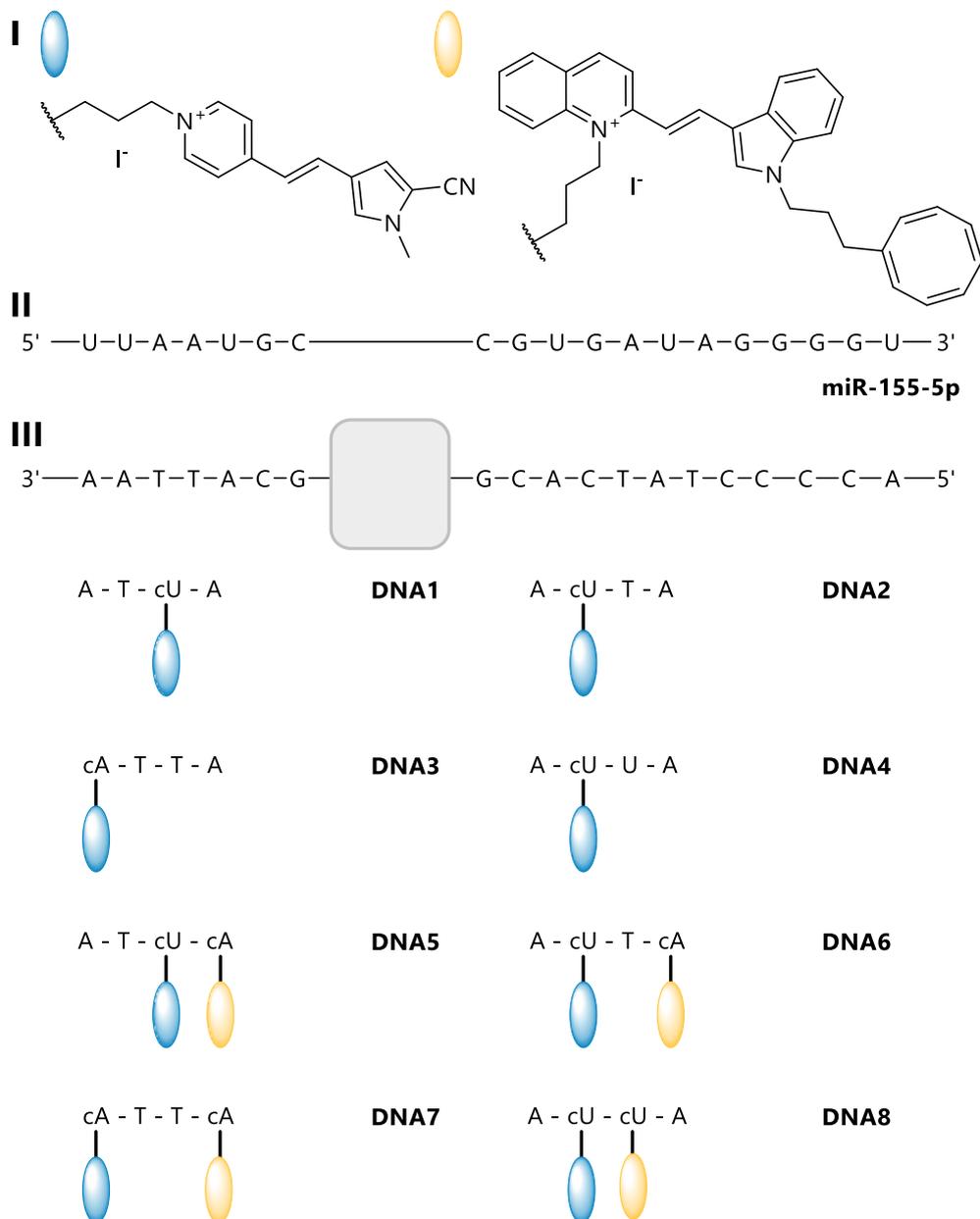


Abbildung 75: Verwendete Fluorophoren (I), Sequenz von miR-155-5p und synthetisierte DNA-Sequenzen zur Abstandsoptimierung des Energietransfers und zur Bestimmung der Energietransfer-Effizienz.

Zur Einführung von zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen per kupfer(I)-katalysierter Azid-Alkin-Zykloaddition (CuAAC) wurde die DNA-Synthese zwischen den beiden „klickbaren“ Bausteinen cU und /oder cA unterbrochen. Dabei wurde zunächst der Donorfarbstoff per CuAAC an der festen Phase eingeführt (*on bead click*) und anschließend die restliche DNA-Sequenz fertiggestellt (Abbildung 78). Da die verwendeten Chromophoren basenlabil sind, mussten die doppelt modifizierten Stränge mit 1 M Kaliumcarbonat in Methanol (statt wie gewöhnlich 25 % Ammoniaklösung) von der festen Phase abgespalten und die Basen entschützt werden. Letzterer Umstand machte die Synthese eines phenoxyacetylgeschützten 2'-O-Propargyladenosin notwendig, wodurch eine wichtige Variabilität in der Synthese von ein- und mehrfach-farbstoffmarkierter Nukleinsäuresonden geschaffen wurde.

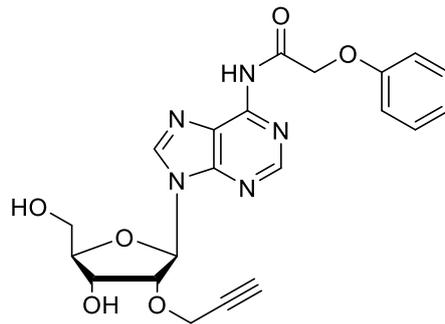


Abbildung 76: Struktur des ultamild abspalt- und "klickbaren" Adenosinnukleosids cA^{Pac} .

Die Hybridisierungsresponsivität sollte durch räumliche Trennung beider Chromophoren erzielt werden. Diese wurde durch Einbringen einer PEG-Spacereinheit realisiert und ist nachfolgend dargestellt:

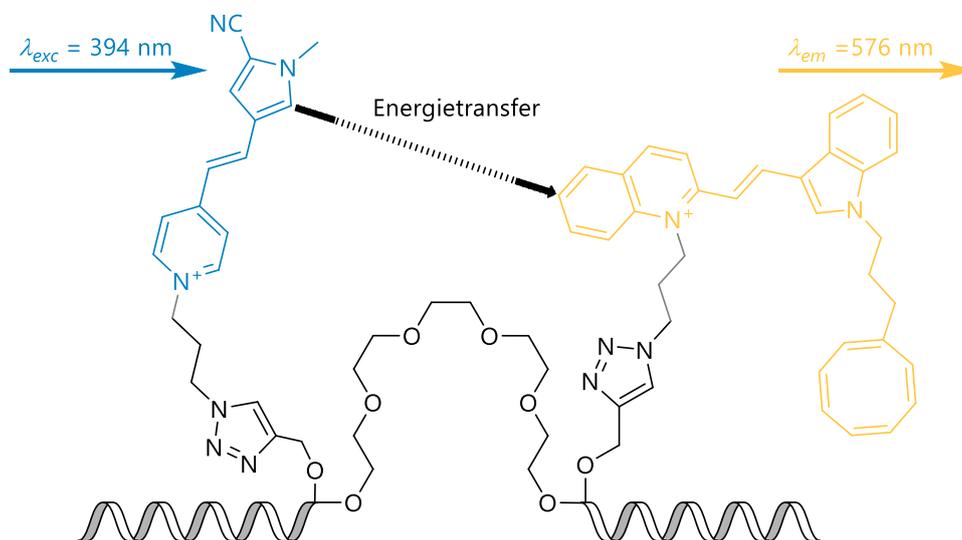


Abbildung 77: Hybridisierungsresponsivität durch Einfügen eines PEG-Spacers.

In Anwesenheit der Ziel-miR werden beide Fluorophore in räumliche Nähe gebracht und der Energietransfer-Prozess wird relevant für die Entvölkerung des angeregten Zustandes des Donorfarbstoffes. Umgekehrt ist in Abwesenheit der miR mit einer intensiveren Donoremission zu rechnen, da die Chromophore nicht in räumlicher Nähe sind. Das Oligonukleotid stellt in diesem Konzept das Erkennungselement für die miR-155-5p dar und die Fluorophore ermöglichen die Detektion.

7.3 Abstandsoptimierung des Intrastrangchromophorpaars

Die Synthese der einfach- und doppelt modifizierten Oligonukleotide wurde auf unterschiedliche Weise durchgeführt. Während die einfach modifizierten Stränge **DNA1-DNA3** nach der Standard-Phosphoramiditmethode mit anschließender CuAAC (postsynthetische Fluorophormarkierung) synthetisiert wurden, musste für die Oligonukleotide mit zwei unterschiedlichen Chromophoren die *On-Bead*-Methode angewandt werden. Hierbei wird das Oligonukleotid sequentiell aufgebaut:

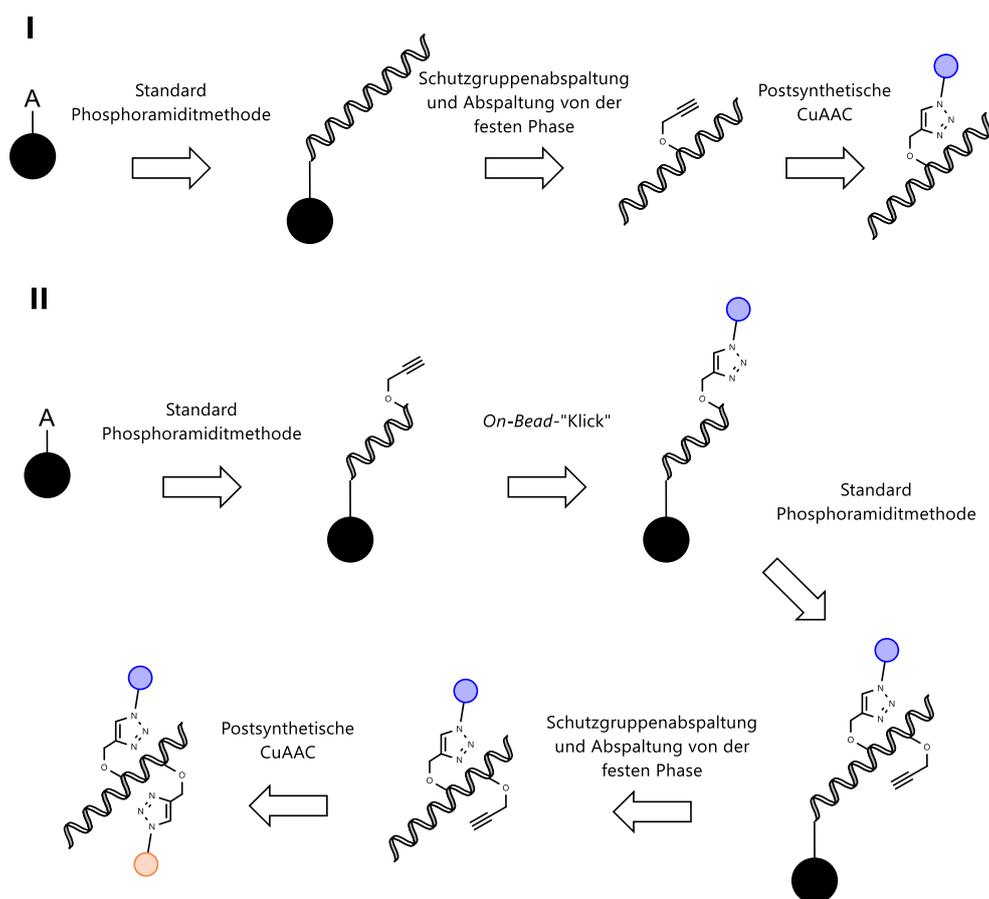


Abbildung 78: Modifikation von Oligonukleotiden mit einem (I) und zwei unterschiedlichen Fluorophoren (II) über die CuAAC.

Die erste Fluorophormarkierung mit dem Donorfarbstoff erwies sich hierbei als vorteilhaft in der Aufreinigung der doppeltmodifizierten Stränge. Während die einfach donormodifizierten Sequenzen schneller eluiert werden, ist die Retentionszeit der doppelt modifizierten Stränge verlängert. So konnten **DNA5-DNA8** nach zweiter „Klick“-Reaktion durch einfache HPLC-Trennung in hoher Reinheit erhalten werden.

Als Maß für den optimalen Abstand der Chromophore zueinander in den Intrastrangchromophorpaaren wurde das größte Kontrastverhältnis von Donor- zu Akzeptoremission gewählt. Die Fluoreszenzintensität der einfach donormodifizierten Stränge sollte ebenso maximiert werden, um in der später synthetisierten, PEG-verbrückten binären Sonde ein hohes Maß an Hybridisierungsresponsivität zu erzielen.

Nachfolgend sind die Fluoreszenzemissionen der einfach donormodifizierten Oligonukleotide in Ab- (ss) und Anwesenheit von miR-155-5p (ds) dargestellt:

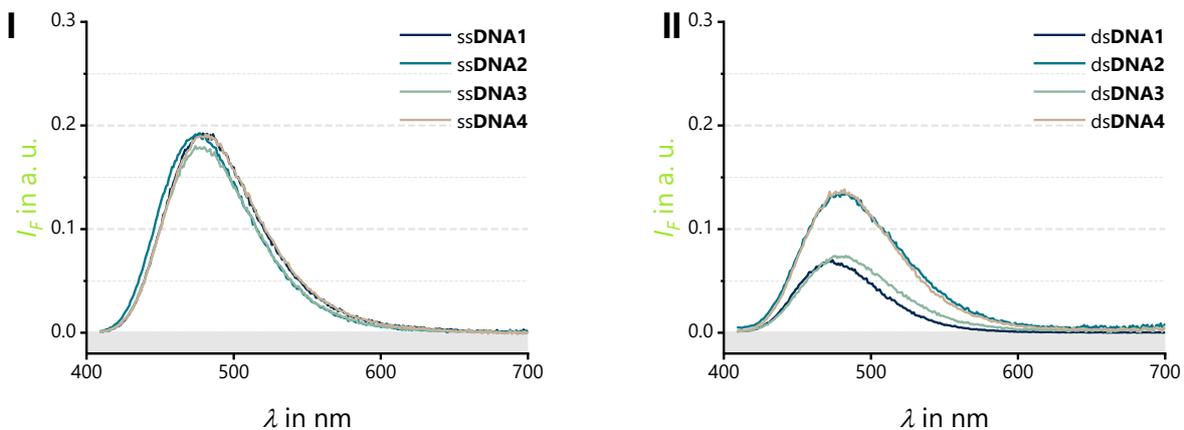


Abbildung 79: Fluoreszenzemission der einfach donormodifizierten Stränge DNA1-DNA4.

Insbesondere **DNA2** und **DNA4** zeigt, sowohl in An- (ds**DNA2**, ds**DNA4**) als auch Abwesenheit (ss**DNA2**, ss**DNA4**) von miR-155-5p, eine zufriedenstellende Fluoreszenzemission. Die Fluoreszenz von ds**DNA1** und ds**DNA3** sind dagegen stärker gelöscht. Die Nachbarbase G zum Modifikationsort von **DNA3** scheint hierbei maßgeblich beteiligt zu sein. Für **DNA1** kann keine zufriedenstellende Hypothese aufgestellt werden. Lediglich eine ungeschickte Chromophororientierung zu den Nukleobasen scheint hier sinnvoll, da die Nachbarbasen A, T und U die Fluoreszenz des Donorfarbstoffes nicht löschen. Bei Betrachtung der Intrastrangchromophorpaare stellt sich bereits ein potentielles Strangdesign zur Einführung der Hybridisierungsresponsivität heraus:

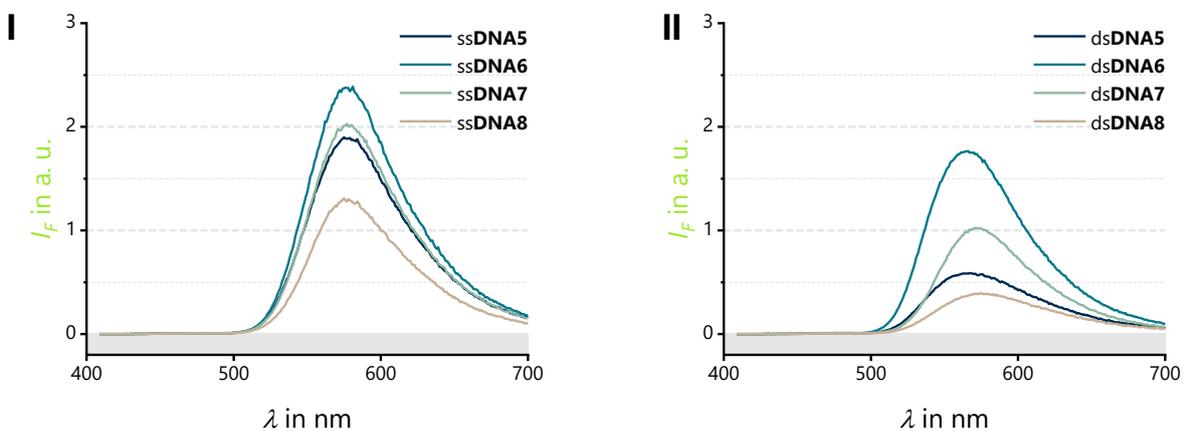


Abbildung 80: Fluoreszenzintensität der Intrastrangchromophorpaare bei Donoranregung.

ss**DNA6** zeigt hierbei die stärkste Emission, deren Fluoreszenz durch Hybridisierung (ds**DNA6**) wenig gelöscht wird. Im Gegensatz hierzu dissipiert ein Großteil der Anregungsenergie bei ds**DNA5** in nicht-strahlenden Prozessen. Demnach löscht U bzw. die direkte Nachbarschaft der Fluorophore die Akzeptorfluoreszenz in ss**DNA5**, ss**DNA8** bzw. ds**DNA5**, ds**DNA8**. Die schwächere Akzeptoremission von ds**DNA7** kann auf die Löschung der Donorfluoreszenz (ds**DNA3**) bzw. dem vergrößerten Donor-Akzeptor-Abstand zurückgeführt werden. Der optimale Chromophorabstand beläuft sich demnach auf ein/e Base/Basenpaar zwischen den jeweiligen Modifikationsstellen, wie in ss/ds**DNA6**.

7.4 Einführung des PEG-Spacers

Die Energietransfer-Effizienz der Intrastrangchromophorpaare wurde über die Fluoreszenzintensität des Donors in An- und Abwesenheit des Akzeptorfluorophors ermittelt. Diese zeigen in den Einzelsträngen eine besonders hohe Effizienz von 96 %. In Anwesenheit von miR-155-5p wandelt sich dieses Bild. Während dsDNA5 nur noch eine Energietransfer-Effizienz von 91 % besitzt, sind es immer noch 96 % in dsDNA8. Demzufolge ist es wahrscheinlich, dass die Donorfluoreszenz in dsDNA5 und die Akzeptorfluoreszenz im Falle von dsDNA8 gelöscht sind. Dies deckt sich auch mit den Emissionsspektren der einfach-donormodifizierten Stränge dsDNA1 und dsDNA2. Dagegen resultiert die niedrige Akzeptoremission von dsDNA7 aus der geringeren Donorquantenausbeute und einer verschlechterten Energietransfer-Effizienz (84 %). dsDNA6 überzeugt mit einer hohen Energietransfer-Effizienz von 95 % und der im Vergleich zu den anderen DNA-Strängen ungelöschten Akzeptoremission. Aus diesem Grund wurde das Markierungsmuster von DNA5 genutzt, um die Hybridisierungsresponsivität einzuführen.

Über das beschriebene *On-Bead*-Verfahren konnten ebenfalls die doppelt fluorophormarkierte DNA-Stränge mit PEG-Spacereinheit zwischen den Modifikationsstellen synthetisiert werden. Hierfür wurde ein Triethylenglykol- und ein Hexaethylenglykol-Phosphoramidit verwendet, welche beide kommerziell erhältlich sind.

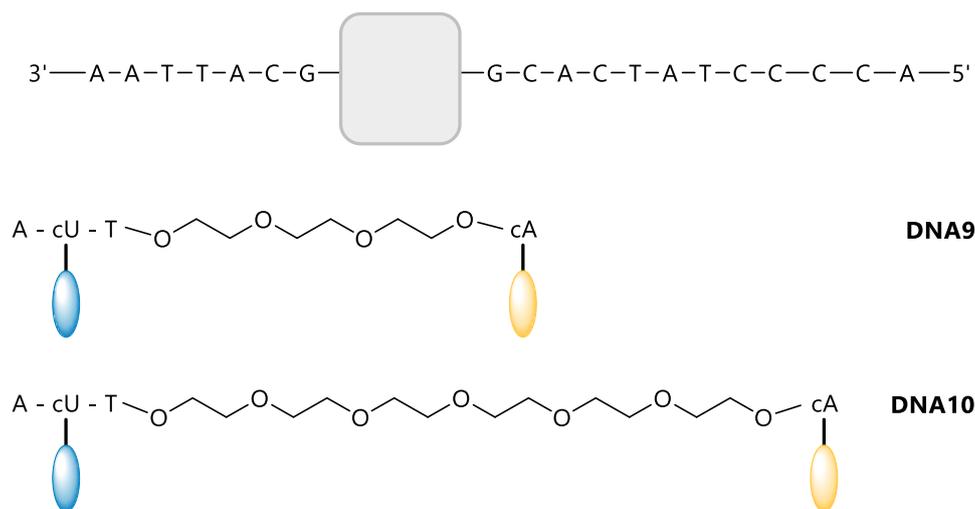


Abbildung 81: Sequenzen der hybridisierungsresponsiven Nukleinsäuresonden DNA9 und DNA10. (Die Phosphatgruppen zwischen der Endgruppen der PEG-Einheiten sind nicht dargestellt.)

Die Aufreinigung der synthetisierten Hybridisierungssonden erfolgte analog der doppelt modifizierten Stränge. Anschließend wurde die Hybridisierungsresponsivität der erhaltenen Sonden per Fluoreszenzspektroskopie getestet. Hierbei zeigten die einzelsträngigen Hybridisierungssonden bereits einen sehr ausgeprägten Energietransfer, welcher in ssDNA9 zu einer ähnlichen und in ssDNA10 zu einer höheren Emission wie ssDNA6 des Akzeptorfluorophors führt. Demnach wechselwirken beide Fluorophoren miteinander ohne die Anwesenheit von miR-155-5p und können sich im Falle von ssDNA10 optimal zueinander ausrichten.

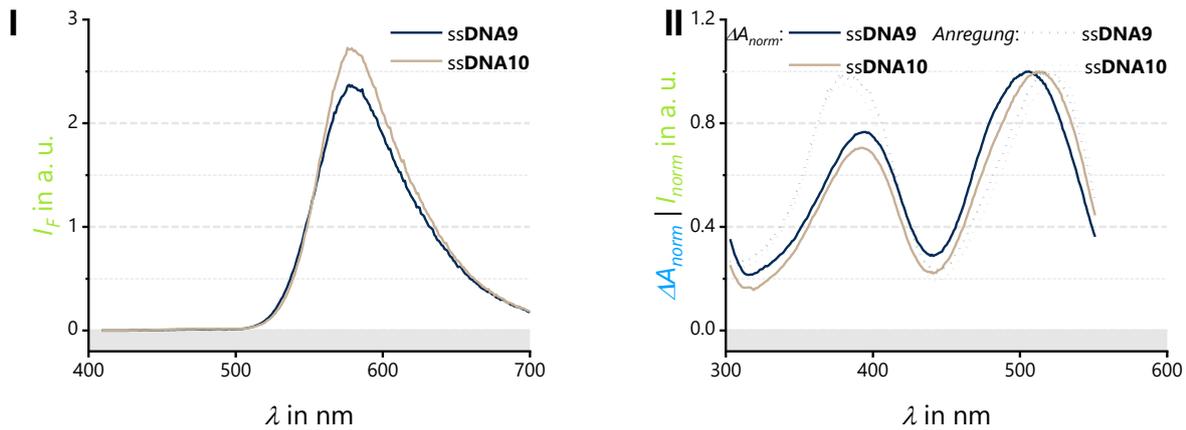


Abbildung 82: Fluoreszenzemission der Hybridisierungssonden ssDNA9 und ssDNA10 (I), sowie intensitätsnormierte Absorptions- und Anregungsspektren (II).

Um welche Wechselwirkungen es sich zwischen Donor und Akzeptor handelt, wurde über den Vergleich von Absorptions- und Anregungsspektren bestimmt. Hierbei ist klar ersichtlich, dass beide Spektren nicht dieselbe Form besitzen und die Wechselwirkung der Chromophore im Grundzustand vorliegt. Weiter ist Intensität der Anregungsspektren proportional zur absorbierten Lichtintensität des Grundzustandes. Die Intensität der Donorfluorophoren ist größer als deren jeweilige Absorption und gleich groß, wie die Intensität der Akzeptorfluorophoren. Hieraus geht hervor, dass beide Fluorophore nicht getrennt voneinander anregbar sind. Weiter zeigt die Donorintensität eine hypsochrome Verschiebung und die Akzeptorintensität eine bathochrome Verschiebung im Vergleich zum Absorptionsspektrum. Die Fluoreszenzemission des Akzeptors ist demnach maximal, wenn der Donor mit Licht höherer Wellenlänge angeregt wird. Dies entspricht nach der Excitonen-Theorie von *Kasha* für eine parallele Ausrichtung der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor. Überdies ist der Orientierungsfaktor κ^2 dann 1 und größer als der weitläufig angewandte Wert von $2/3$. Die Energietransfer-Effizienz wird dementsprechend groß und ist aufgrund der Flexibilität der PEG-Einheit in ssDNA9 größer als für ssDNA8.^[22, 24, 104]

8 Zusammenfassung

Kernthema der vorliegenden Dissertation war die Steigerung der Photostabilität von Fluorophoren mit CyIQ-Leitstruktur. Im Rahmen der Stabilitätsuntersuchungen bei Belichtung der Chromophor-DNA-Konjugaten konnte eine Struktur-Reaktivitätsbeziehung eruiert werden, die erstmals mit der Nukleophilie korreliert werden konnte. Weitere Bleichexperimente mit Singulett-Sauerstoff durch molybdat-katalysierte Oxidation von Wasserstoffperoxid belegten indes eine nur schwache Korrelation mit der Elektronendichte – also der Nukleophilie – des Indolteils der Fluoreszenzfarbstoffe. Ebenso wurde die Untergrundreaktion mit Wasserstoffperoxid genauer untersucht, um deren Einfluss auf die Bleichexperimente auszuschließen. Während die Geschwindigkeit der Reaktion mit Singulett-Sauerstoff wenig durch die Elektronendichte des Indolnukleus beeinflusst wird, zeigt die Reaktivitätsbeziehung mit Wasserstoffperoxid einen deutlichen, aber kinetisch langsameren Zusammenhang mit der Nukleophilie. In diesem Kontext agiert Wasserstoffperoxid als nukleophiles Reagenz und greift den Chinoliniumteil der Cyanin-Styryl-Farbstoffe bevorzugt an. Die geringe Korrelation der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten mit Singulett-Sauerstoff zeigten in Kontrollexperimenten mit Farbstoffen, die am Chinoliniumteil substituiert sind, die primäre Reaktionsseite an dieser Stelle. Während Farbstoffe vom CyIQ-Typ mit Singulett-Sauerstoff reagierten, zeigten CyIP-Farbstoffe keine Reaktivität gegenüber Singulett-Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. Ebenso führte die 6-Methoxyfunktion des Chinoliniumteils zu einer immensen Steigerung der Stabilität gegenüber der reaktiven Sauerstoffspezies: Singulett-Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. Beide Untersuchungsergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Singulett-Sauerstoff hierbei nicht als Elektrophil, sondern viel mehr als Dienophil im Rahmen einer Zykoadditionsreaktion mit dem Chinoliniumteil reagiert. Eindrucksvoll wird hierdurch auch gezeigt, wie sich die Wechselwirkungen innerhalb des *Push-Pull*-Systems in ihrer Reaktivität beeinflussen.

Rekapitulierend stellen die Photostabilitätsuntersuchungen der ersten Stunde den Ausgangspunkt dieser Dissertation dar. *P. R. Bohländer* konnte hierbei zeigen, dass insbesondere die geschickte 6-Methoxysubstitution des Chinoliniumteils zu einer Photostabilitätssteigerung um Faktor 3 führt. Ebenso wurde gezeigt, dass die Methylierung des Indol-Stickstoff zu einer weiter erhöhten Photostabilität führt, die additiv ist, falls beide strukturellen Modifikationen am Chromophor angebracht sind. Die darauffolgende Fragestellung, ob Cyclooctatetraen als Triplett-Zustandslöscher die Photostabilität der Leitstruktur des CyIQ weiter steigert, wurde im Rahmen dieser Dissertation beantwortet. Die anfänglich paradox erscheinenden Ergebnisse dieser Dissertation stellten die ausgearbeiteten Stabilitätsmerkmale von *P. R. Bohländer* zunächst in Frage – jedoch konnte durch breite Literaturrecherche sowie durch die hier beschriebene Struktur-Reaktivitätsbeziehung, Klarheit über die Photostabilität von Cyanin-Styryl-Farbstoffe erlangt werden. Gerade Belichtungsexperimente mit höheren Konzentrationen ($\geq 10 \mu\text{M}$) an Farbstoff bedingen eine besondere Stabilität gegenüber Singulett-Sauerstoff, während Verdünnung ($\leq 2.5 \mu\text{M}$) eine klare Unabhängigkeit in der Reaktivität mit Singulett-Sauerstoff gezeigt haben. Beides lässt sich auf die geringe Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff zurückführen und verknüpft somit die Konzentration des jeweiligen Chromophors mit dessen Photoabbaumechanismus. In folgendem Gedankenexperiment wird klar, dass man in einem Raum voller Menschen eher jemanden stößt als in einem Raum mit wenigen Menschen.

Die Anwendung von Nukleinsäuresonden innerhalb lebender Zellen (~ nM) ist im Falle der Cyanin-Styryl-Farbstoffe weniger beeinflusst von Singulett-Sauerstoff als oftmals primär angeführtes, reaktives Teilchen beim Photobleichen von fluoreszenten Reporter-molekülen. Die Methylierung der Indolfunktion (ssH3) hat im Vergleich zum Referenzfluorophor ssH eine um 20 % geringere Photostabilität in 2.5 µM Lösung, während die Cyanosubstitution alleine (HOCN) schon eine um Faktor 2 verlängerte Halbwertszeit $t_{1/2}$ besitzt. Die Kombination von cyanofunktionalisiertem Indolteil und Methylierung des Indolstickstoffs (HOCN3) erhöht die Photostabilität um Faktor 5 – und ist damit photostabiler als die COT-Konjugate ssH8 und ssOMeH8 mit gleicher Stabilität. Dies zeigt zwei wichtige Punkte auf: (i) je elektronenärmer, desto ausschlaggebender ist der stabilitätserhöhende Effekt der Methylierung und (ii) die 6-Methoxylierung des Chinoliniumteils hat keinen Effekt in verdünnter Lösung (kleiner 2.5 µM). Beides führt zur Annahme einer basischen, reaktiven Sauerstoffspezies, welche durch das Superoxid-Radikalanion mit konträrer Reaktivität zu Singulett-Sauerstoff bestens in das weite Bild der Photostabilitätsuntersuchungen, sowie ROS-Reaktivitäten passt.

Darüberhinaus konnten die im Rahmen der Struktur-Reaktivitätsuntersuchung synthetisierten Fluoreszenzfarbstoffe Anwendung in der zellulären Bildgebung lebender HeLa- und COS-7-Zellen finden. Hierbei zeigten alle Farbstoffe – mit Ausnahme von HOA – zellpenetrierende Eigenschaften und wurden in unterschiedliche Zellkompartimente internalisiert. Insbesondere ist hierbei das COT-Konjugat HOH8 zu nennen, das vermutlich durch den lipophilen Charakter des Cyclooctatetraens überaus gut aufgenommen wurde. Diese ist zwar hell, färbt aber unspezifisch alle Kompartimente innerhalb der Zelle an. Sehr wahrscheinlich resultiert hieraus auch die besondere Toxizität dieses Chromophors. Interessanterweise zeigte das 6-methoxyfunktionalisierte COT-Konjugat eine weit weniger ausgeprägte Toxizität – und ist sehr wahrscheinlich auf die fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesene Kristallisation zu langen Nadeln innerhalb lebender Zellen zurückzuführen. Während die Aufnahme von HOA fast nicht per Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden konnte, zeigte dessen methylierter Strukturverwandter (HOA3) eine gute endosomale Aufnahme in lebenden HeLa-Zellen. Die äußerst photostabilen Farbstoffe HOCN und HOCN3 zeigten eine vorwiegend mitochondriale Aufnahme, was auch durch parallele Färbung mit *MitoTracker™ Deep Red FM* und Überlagerung der jeweiligen Farbkanäle als spezifisch anzunehmen ist. Ebenso konnte durch gezielte Synthese eines azidfunktionalisierten Farbstoffes die kovalente Färbung zellulärer Bestandteile erzielt werden. Hierbei wird der Farbstoff inkubiert und das, durch Fluoreszenzmikroskopie gebildete Nitren reagiert nahe seines Bildungsortes mit Biomolekülen ab. Vorwiegend war dieser Farbstoff in Mitochondrien zu finden, aber eröffnet nicht nur deren kovalente Anfärbung – sondern auch die Fluoreszenzmarkierung von ringgespannten Alkinen, worauf im nächsten Kapitel eingegangen werden soll.

Die abschließende Behandlung von Intrastangchromophorpaaren mit PEG-Spacereinheit zur Detektion der microRNA-155-5p konnte indes interessante photophysikalische Eigenschaften von heterodimeren Farbstoffaggregaten zeigen. Diese verhindern den Einsatz als hybridisierungsresponsive Nukleinsäuresonden, was durch Trennung des Interstrangchromophorpaars zu binären Nukleinsäuresonden umgangen werden konnte und mit einem Kontrastfaktor von 3 miR-155-5p *in vitro* nachgewiesen konnte.

9 Ausblick

Hinsichtlich der Photostabilitätsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass insbesondere elektronenarme Indolfunktionen, wie auch deren Methylierung zu einer um Faktor 5 gesteigerten Photostabilität führen. Dabei wird das Superoxid-Radikalanion gebildet, während der Indolnukleus zum Radikalkation oxidiert wird. Aus diesem Zusammenhang wird die besondere Elektronendonoreigenschaft des Indolteils für die weitere Forschung auf dem Gebiet der Fluorophorstabilisierung bei Belichtung ersichtlich. In diesem Rahmen könnte die Einführung einer COT-Funktion Klarheit über den Verlauf des Fluorophorschicksals bringen. Insbesondere die Einführung der COT-Funktion an den 5-Cyanoindolfarbstoff könnte hierbei interessante photophysikalische Mechanismen ergründen, wie etwa die Multiplizität des Zustandes, welcher das Elektron für die Bildung des Superoxid-Radikalanions liefert.

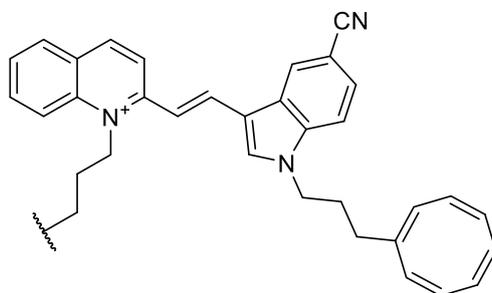


Abbildung 85: Strukturvorschlag für die Untersuchung der Multiplizität des Elektronendonors.

Durch den Triplett-Zustandslöcher Cyclooctatetraen könnte neben der obigen Fragestellung sehr wahrscheinlich ein heller Fluorophor hervorgebracht werden. Daneben wäre eine klare Photostabilitätssteigerung Indikator für die Beteiligung des Triplettzustands im Rahmen der Photoabbaumechanismen von Cyanin-Styryl-Farbstoffen.

Zur weiteren Steigerung der Photostabilität könnten Heteroaromaten mit hohem Redoxpotential dienen. Stellvertretend sollten hierbei Benzofurane oder auch Thiophene in Betracht gezogen werden.

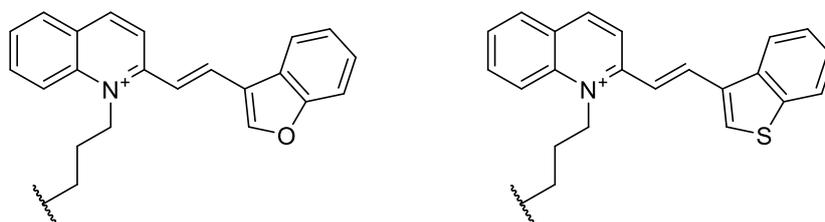


Abbildung 86: Strukturvorschläge zur Erhöhung der Photostabilität.

Darüberhinaus könnte so eine weiter gefasste Struktur-Reaktivitätsbeziehung aufgestellt werden. In Hinblick auf die optischen Eigenschaften sollte der Fokus auf einer Emission im nahen Infrarotbereich liegen und einer Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F liegen. Speziell der intramolekulare Ladungstransfer könnte weiter ausgenutzt werden, um hohe Stokes-Verschiebungen λ_{Stokes} zu erzielen.

Strukturell könnte so das Strukturkonzept der Xanthylium-Farbstoffe mit dem der Cyanin-Styryl-Farbstoffe kombiniert werden, um so die Responsivität gegenüber Nukleinsäuren zu erhalten. Die zuerst genannten Farbstoffe unter welche ATTO 488 und Rhodamin 110 fallen sind überaus photostabile Laserfarbstoffe aus denen die folgenden Strukturvorschläge folgen:

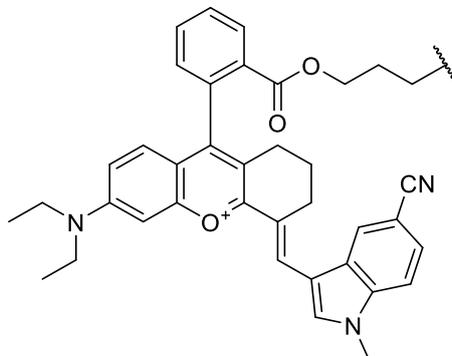


Abbildung 87: Strukturvorschlag für einen photostabilen Farbstoff mit großer Stokes-Verschiebung.

Weiter kann der Farbstoff **PyInAN₃** für die fluorogene Markierung innerhalb lebender Zellen angewandt werden. Hierzu könnte das zu beobachtende Biomolekül mit einem ringgespannten Alkin modifiziert werden und im Rahmen einer spannungsvermittelten Azid-Alkin-Zykloaddition (*strain-promoted azide alkyne cycloaddition, SPAAC*)^[86-90] mit dem fluorogenen Fluorophorazid markiert werden (Abbildung 88).

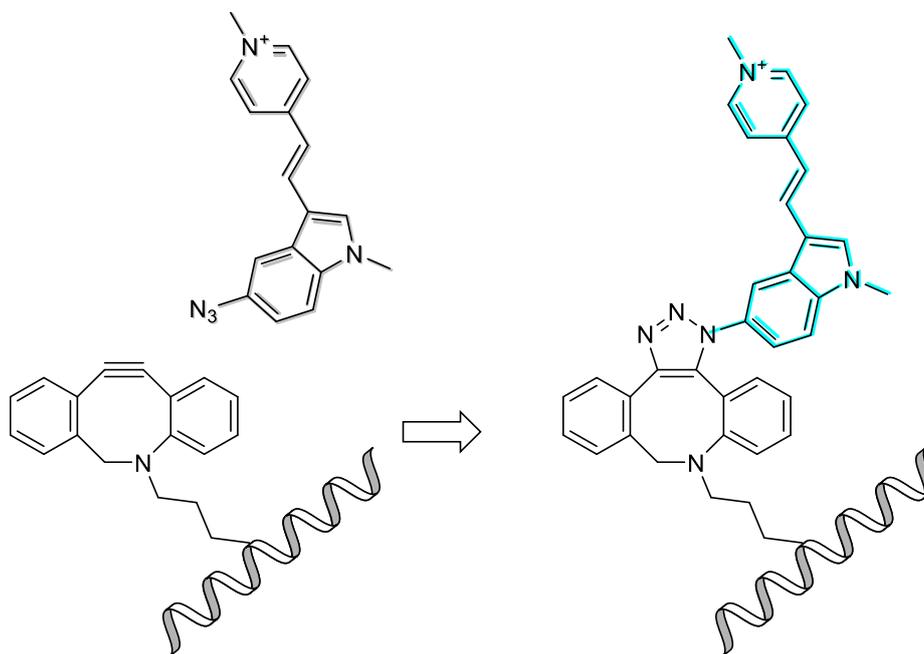


Abbildung 88: Fluoreszenzmarkierung von Dibenzocyclooctin-modifizierten Nukleinsäuren als Beispiel für eine spannungsvermittelte Azid-Alkin-Zykloaddition.^[91]

10 Experimenteller Teil

10.1 Materialien und Geräte

10.1.1 Reagenzien

Reagenzien und Chemikalien, die zur Synthese eingesetzt wurden, wurden von den Firmen *abcr*, *Acros Organics*, *Alfa Aesar*, *Carbolution*, *Carbosynth*, *Fisher Scientific*, *Merck*, *VWR* und *Sigma Aldrich* bezogen.

10.1.2 Reaktionsführung

Lösungsmittel für die Synthesen wurden mindestens in der Qualitätsstufe *p. A. (pro analysii)* oder höher eingesetzt. Trockene Lösungsmittel wurden von der Firma *Acros Organics* bezogen. Für die anschließende Aufarbeitung der Reaktionsmischungen und bei der Säulenchromatographie wurden technische Lösungsmittel verwendet.

Reaktionen unter Ausschluss von Luft und Feuchtigkeit wurden in vorgetrockneten Glasapparaturen unter Argonatmosphäre (Schweißargon 4.6, 99.999 %) durchgeführt. Luft- und feuchtigkeitsempfindliche Substanzen wurden per Standard-*Schlenk*-Technik überführt und gehandhabt.

Tieftemperaturreaktionen wurden durch Zuhilfenahme von Kältemischungen durchgeführt:

Wasser/Eis	0 °C
2-Propanol/Trockeneis	-78 °C

10.1.3 Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden die DC-Platten *Kieselgel 60 F₂₅₄* (Schichtdicke: 0.25 mm *Kieselgel 60*) mit Fluoreszenzindikator der Firma *Merck* verwendet. Die Detektion erfolgte mit einer UV-Handlampe bei $\lambda = 254$ nm und $\lambda = 366$ nm.

Zum Anfärben von COT-Derivaten wurde eine Kaliumpermanganat-Lösung (450 mg KMnO_4 , 630 mg K_2CO_3 , 45 mL Wasser, 750 μL 5 % NaOH), von Zuckern 1 % Schwefelsäure in Methanol und von Aminen eine Ninhydrin-Lösung in Ethanol verwendet und eventuell durch Erhitzen mit dem Heißluftfön entwickelt.

10.1.4 Flash-Säulenchromatographie

Für die durchgeführten Säulenchromatographien wurde *Silica gel 60* (Kieselgel mit Korndurchmesser 40 - 63 μm) der Firma *Merck* als stationäre Phase verwendet. Die zu reinigende Substanz wurde in der mobilen Phase gelöst.

10.1.5 Nukleinsäure-Festphasensynthese

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte an einem *Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer* System von *Applied Biosystems (ABI)*. Als feste Phase wurden CPG (*Controlled Pore Glass*) mit einer Belegung von 1 μmol (500 Å) verwendet. Phosphoramidite, Synthesizer-Chemikalien und CPG-Säulen stammten von *ABI*, *Glen Research*, *ChemGenes* und *Proligo*. Das 2'-*O*-Propargyluridin (cU) wurde als Phosphoramidit von *ChemGenes* und *Glen Research* bezogen.

Unmodifizierte DNA-Stränge wurden von *Metabion international* in HPLC gereinigtem Zustand bezogen.

10.1.6 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) von Nukleinsäuren wurde an einem modularen HPLC-System von *Shimadzu* durchgeführt (Autosampler *SIL-10AD*, Pumpenmodul *LC-10AT*, Steuereinheit *SCL-10A*, Multidiodenarray *SPD-M10A*, Fluoreszenzdetektor *RF-10A XL*). Detektion, Steuerung und Auswertung erfolgte mit der Software *Class VP*. Semipräparative Trennungen erfolgten über eine *reversed phase Supelcosil™ LC-318*-Säule (250 x 10 mm, 5 μm) und die analytischen Trennungen erfolgten über eine *Supercosil™ LC 318* Umkehrphasen-Säule (250 x 4.6 mm, 5 μm). Die Flussrate bei semipräparativen Trennungen betrug 2.5 mL/min und bei analytischen Trennungen 1.0 mL/min. Die entsprechende Säule wurde mit 50 mM Ammoniumacetat-Puffer für DNA (pH 6.5, Laufmittel A) equilibriert und anschließend mit verschiedenen Acetonitril-Gradienten (Laufmittel B) eluiert.

Die Detektion erfolgte über die DNA typische UV/VIS-Absorption bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 290$ nm. Bei DNA-Strängen mit kovalent gebundenen Farbstoffen wurde zusätzlich deren charakteristische UV/VIS-Absorption detektiert. Zur HPLC-Trennung wurden hochreine (*HPLC grade*) Lösungsmittel von *Fischer* und *VWR* sowie Wasser verwendet, das zuvor frisch in einer *Millipore*-Anlage *Q8* entionisiert und ultrafiltriert wurde.

10.1.7 Sublimationstrocknung

Wässrige Lösungen wurden an einer *Christ Alpha 1-2 LD Plus* Lyophilisierungsanlage nach Ausfrieren in flüssigem Stickstoff getrocknet.

10.1.8 Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektren wurden von der Analytikabteilung des Instituts für Organische Chemie an dem Gerät *MAT95* der Firma *Finnigan* oder dem Gerät *LTQ-XL Orbitrap Spectrometer* der Firma *Thermo Fisher Scientific* gemessen. Als Ionisierungsverfahren wurde FAB (*Fast Atom Bombardement*), EI (Elektronenstoß-Ionisation) oder ESI (Elektronenspray-Ionisation) verwendet.

10.1.9 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Analysen wurden mit folgenden Geräten durchgeführt

- ^1H -NMR-Spektren, 300 MHz; ^{13}C -NMR-Spektren, 75 MHz *Bruker B-ACS 60*
- ^1H -NMR-Spektren, 400 MHz; ^{13}C -NMR-Spektren, 100 MHz *Bruker Avance 400*
- ^1H -NMR-Spektren, 500 MHz; ^{13}C -NMR-Spektren, 125 MHz *Bruker Avance 500*
- ^1H -NMR-Spektren, 500 MHz; ^{13}C -NMR-Spektren, 125 MHz *Bruker Ascend 500*
- ^1H -NMR-Spektren, 600 MHz; ^{13}C -NMR-Spektren, 150 MHz *Bruker Avance I*

Die Kopplungskonstanten J wurden in Hz angegeben. Die Signalmuster wurden mit den üblichen Abkürzungen *s* (Singulett), *d* (Dublett), *t* (Triplet), *q* (Quartett), *p* (Quintett), *m* (Multipllett) beschrieben. Alle ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden auf charakteristische Lösungsmittelsignale kalibriert:^[105]

- DMSO- d_6 : ^1H -NMR: $\delta = 2.50$ ppm, ^{13}C -NMR: $\delta = 39.52$ ppm
- D_2O - d_2 : ^1H -NMR: $\delta = 4.79$ ppm
- MeOD- d_4 : ^1H -NMR: $\delta = 4.87$ ppm, ^{13}C -NMR: $\delta = 49.00$ ppm
- CD_2Cl_2 - d_2 : ^1H -NMR: $\delta = 5.32$ ppm, ^{13}C -NMR: $\delta = 54.00$ ppm
- CDCl_3 : ^1H -NMR: $\delta = 7.26$ ppm, ^{13}C -NMR: $\delta = 77.16$ ppm

10.1.10 Infrarotspektroskopie

Die Infrarotspektren wurden an einem FT-IR-Gerät *IFS88* der Firma *Bruker* aufgenommen. Feststoffe wurden im *ATR*-Modus aufgenommen. Angegeben wurde die Lage der Absorptionsbanden in Wellenzahlen [cm^{-1}]. Die Intensitäten wurden abgeschätzt und mit den Abkürzungen *s* (*strong*), *m* (*middle*), *w* (*weak*) versehen.

10.1.11 UV/Vis-Spektroskopie

Es wurden Quarzglas-Küvetten der Firma *Starna* mit einer Schichtdicke von $d = 1$ cm verwendet. Die Messungen erfolgten, soweit nicht anders angegeben, bei einer Temperatur von 20 °C. Die Absorptionsspektren wurden an einem *Lambda 750* UV/Vis-Spektrometer mit Temperaturregler (*PTP 6+6 Peltier Temperature Programmer*) der Firma *PerkinElmer* aufgenommen. Die Spektren wurden gegen die Absorbanz des Lösungsmittels basislinienkorrigiert. Alle Messungen erfolgten, sofern nicht anders angegeben, in 10 mM NaPi -Puffer (pH 7) und 250 mM NaCl in *Millipore*-Wasser. Die DNA-Konzentration der modifizierten Stränge und unmodifizierten Stränge betrug 2.5 μM . Folgende Messparameter wurden verwendet:

- *Spectral band width* 2.0 nm
- *Average time* 0.1 s
- *Data interval* 1.0
- *Light source change over* 350 nm.

Schmelztemperaturmessungen wurden an einem *Cary 100 Bio* der Firma *Varian* mit Temperaturregler (*Cary 100 Temperature Controller*) und dem Programm *Thermal* durchgeführt. Dabei wurde die Absorptionsänderung der DNA bei $\lambda = 260$ nm verfolgt. Die Messungen erfolgten über einen Temperaturbereich von 10 bis 90 °C. Die Heiz- bzw. Kühlrate betrug 0.7 °C / min. Die Messdaten wurden in 0.5 °C Schritten aufgezeichnet.

Die Messung der Absorbanz zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgten an einem *ND-1000 Spectrophotometer* der Firma *NanoDrop* im Nukleinsäure-Modus.

10.1.12 Fluoreszenzspektroskopie

Die Emissionsspektren wurden an einem *Fluoromax-4 Spectrofluorometer* der Firma *HORIBA-Scientific* mit einem *Peltier*-Element aufgenommen. Es wurden Quarzglas-Küvetten der Firma *Starna* mit einer Schichtdicke $d = 1$ cm verwendet. Die Messungen erfolgten, soweit nicht anders angegeben, in 10 mM NaP_i-Puffer (pH 7) und 250 mM NaCl in *Millipore*-Wasser und bei einer Temperatur von 20 ± 0.001 °C. Die Hintergrundkorrektur der Spektren erfolgte gegen die Ramanstreuung des reinen Lösungsmittels. Folgende Einstellungen wurden verwendet:

Increment: 1.0 nm,

Integration time: 0.1 s,

Entrance & exit slits: 3 nm & 3 nm.

10.1.13 Fluoreszenzquantenausbeuten

Fluoreszenzquantenausbeuten wurden an einem *Quantaaurus QY C11347* in 5 mL-Quarzglasküvetten der Firma *Hamamatsu* bestimmt.

10.1.14 Fluoreszenzlebensdauer

Fluoreszenzlebensdauern wurden per zeitlich korrelierter Einzelphotonenzählung an einem *Fluoromax-4 Spectrofluorometer* mit *DeltaTime-NL Timing module* und *NL-C2* gepulster Diodensteuerung von *HORIBA-Scientific* gemessen. Als Anregungslichtquelle wurde eine gepulste *NanoLED* (456 = nm) mit einer Wiederholungsrate von 1 MHz benutzt.

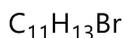
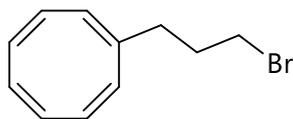
Das jeweilige Fluoreszenzabklingen wurde mit 2.5 µM fluorophormarkierter Nukleinsäure in 10 mM NaP_i-Puffer (pH 7), 250 mM NaCl in *Millipore* Wasser bei 20 °C bestimmt. Die Impulsantwort des Systems wurde mit einer verdünnten *LUDOX*®-Lösung (30 % in Wasser, *Sigma Aldrich*) unter gleichen Bedingungen, jedoch bei Anregungswellenlänge der *NanoLED*, gemessen. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit der Software *DAS6 v 6.8* von *HORIBA-Scientific*, wobei eine biexponentielle Anpassungsfunktion parametrisiert.

10.1.15 Belichtungsapparaturen

Für die Belichtungsexperimente wurde der Photoreaktor *FRITZ* mit eingebautem Temperaturregler und eingebauter Luftkühlung verwendet. Dieser wurde unter Anleitung von *M. Weinberger* von der zentralen feinmechanischen und elektronischen Werkstatt des Fachbereichs Chemie an der Universität Regensburg entwickelt. Für alle Belichtungen wurde eine *LED* mit einer Wellenlänge von $\lambda_{LED} = 408, 468, 520$ und 625 nm verwendet und die Temperatur konstant bei 20 °C gehalten.

10.2 Synthesevorschriften und Charakterisierung

(1Z,3Z,5Z,7Z)-1-(3-Brompropyl)cycloocta-1,3,5,7-tetraen (**1**)



225.1290 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurden 5.72 g (3.00 eq, 21.8 mmol) Triphenylphosphin und 1.18 g (1.00 eq, 7.27 mmol) (1Z,3Z,5Z,7Z)-1-(3-Hydroxypropyl)cycloocta-1,3,5,7-tetraen^[17] in 50 mL trockenem Dichlormethan gelöst und 7.95 g (3.30 eq, 24.0 mmol) Tetrabrommethan zugegeben. Es wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt. Der Rückstand wurde in 120 mL Methanol gelöst und vier Mal mit je 150 mL *n*-Hexan extrahiert. Die vereinigten Hexanphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt. Es wurden 1.97 g des Rohproduktes erhalten. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (EE / hex v : v = 0 : 1 bis v : v = 1 : 0) aufgereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck bei 40 °C und Trocknen im Vakuum wurden 1.18 g (5.27 mmol) eines gelben Öls isoliert (73 %).

DC (EE / hex, v : v = 1 : 10): $R_f = 0.56$.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.92 - 5.57$ (m, 3 H), 3.49 (t, $J = 6.7$ Hz, 1 H), 2.24 - 2.16 (m, 1 H), 1.94 (p, $J = 6.9$ Hz, 1 H).

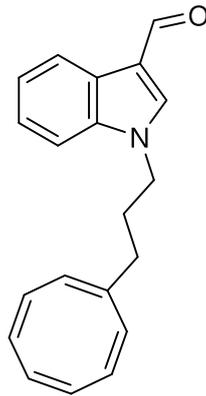
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 31.4, 33.4, 35.9, 100.1, 127.9, 131.3, 131.7, 132.0, 132.4, 133.9, 142.4$.

MS (EI): m/z (%) = 117.1 (100), 224.1 (10).

HR-MS (EI): berechnet für C₁₁H₁₃⁷⁹Br⁺ = 224.0195, gefunden = 224.0196.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2997 (m), 1639 (w).

1-(3-((1Z,3Z,5Z,7Z)-Cycloocta-1,3,5,7-tetraen-1-yl)propyl)-1*H*-indol-3-carbaldehyd
(H8)



$C_{20}H_{19}NO$

289.3780 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurden 218 mg (1.00 eq, 1.50 mmol) 1*H*-Indol-3-carbaldehyd wurden im 5.00 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurden 72.0 mg (1.20 eq, 1.80 eq) Natriumhydrid (60 %) zugefügt. Es wurde für 15 Minuten bei 0 °C gerührt und 405 mg (1.20 eq, 1.80 mmol) **1** zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmen gelassen und anschließend 40 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde zwischen 50 mL Essigsäureethylester und 30 mL destilliertem Wasser verteilt und die organische Phase abgetrennt. Die organische Phase wurde mit 30 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit 25 mL Essigsäureethylester nachextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt. Nach Trocknen im Vakuum konnten 434 mg (1.50 mmol) des braungelben Reinstoffes als Öl isoliert werden (quant.).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 10.01 (s, 1 H), 8.36 – 8.26 (m, 1 H), 7.75 (s, 1 H), 7.46 – 7.28 (m, 3 H), 5.98 – 5.54 (m, 7 H), 4.27 (t, J = 6.9 Hz, 2 H), 2.12 (t, J = 6.7 Hz, 2 H), 2.07 – 1.92 (m, 2 H).

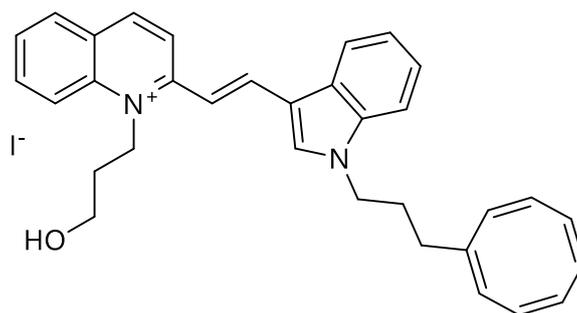
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 28.0, 34.6, 46.4, 110.3, 118.2, 122.3, 123.0, 124.0, 125.7, 128.4, 131.5, 131.8, 132.2, 132.4, 132.7, 133.8, 137.4, 138.4, 142.2, 184.6.

MS (EI): m/z (%) = 289.5 (100), 290.5 (22).

HR-MS (EI): berechnet für $C_{20}H_{19}O_1N_1^+$ = 289.1461, gefunden = 289.1463.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2996 (w), 2940 (w), 1654 (s).

2-((*E*)-2-(1-(3-((1*Z*,3*Z*,5*Z*,7*Z*)-Cycloocta-1,3,5,7-tetraen-1-yl)propyl)-1*H*-indol-3-yl)vinyl)-1-(3-hydroxypropyl)chinolin-1-ium Iodid (HOH8)



$C_{33}H_{33}IN_2O$
600.5445 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurden in einem Bördelglas 150 mg (1.00 eq, 0.46 mmol) 1-(3-Hydroxypropyl)-4-methylchinolin-1-ium Iodid^[6, 9-10] und 268 mg (2.03 eq, 0.92 mmol) **H8** in 4.50 mL Ethanol (99.6 %) gelöst und 99.0 μ L (85.4 mg, 2.20 eq, 1.00 mmol) Piperidin zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 16 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit 5 mL Diethylether verdünnt und der Niederschlag abfiltriert. Der Niederschlag wurde drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 181 mg (0.30 mmol) des orangeroten Reinproduktes erhalten (66 %).

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ = 8.82 (d, J = 9.1 Hz, 1 H), 8.67 (d, J = 15.5 Hz, 1 H), 8.62 (d, J = 9.1 Hz, 1 H), 8.48 (d, J = 8.9 Hz, 1 H), 8.31 (m, 2 H), 8.25 (d, J = 8.5 Hz, 1 H), 8.15 – 8.03 (m, 1 H), 7.90 – 7.79 (m, 1 H), 7.67 (d, J = 8.0 Hz, 1 H), 7.58 (d, J = 15.3 Hz, 1 H), 7.44 – 7.27 (m, 2 H), 5.91 – 5.67 (m, 6 H), 5.57 (s, 1 H), 5.26 (t, J = 4.5 Hz, 1 H), 5.10 – 4.96 (m, 2 H), 4.35 (t, J = 7.0 Hz, 2 H), 3.82 – 3.69 (m, 2 H), 2.25-2.12 (m, 2 H), 2.09 (t, J = 7.3 Hz, 2 H), 2.00 – 1.84 (m, 2 H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ = 28.3, 31.2, 34.0, 45.8, 47.6, 57.5, 110.5, 111.3, 113.9, 118.4, 119.9, 120.9, 122.4, 123.6, 125.5, 126.9, 127.1, 127.9, 130.0, 131.2, 131.8, 132.2, 134.0, 134.3, 137.2, 137.5, 138.4, 141.9, 142.6, 142.9, 155.9.

MS (FAB): m/z (%) = 473.1 (100), 474.1 (40).

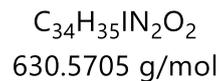
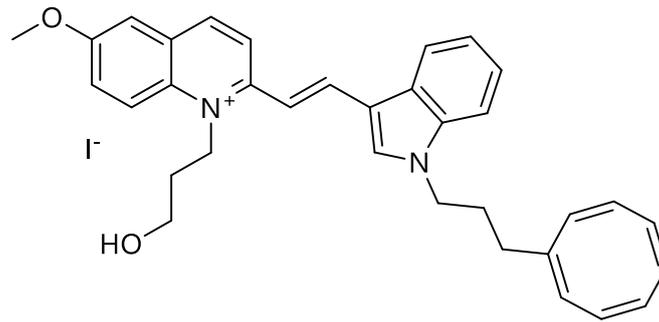
HR-MS (FAB): berechnet für $C_{33}H_{33}O_1N_2^+$ = 473.2587, gefunden = 473.2587.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3306 (w), 1592 (s), 1393 (s), 1244 (m).

EA berechnet für $C_{33}H_{33}O_1N_2I_1$: C, 66.00; H, 5.54; N, 4.66. Gefunden: C, 65.63; H, 5.63; N, 4.75.

Weitere Experimente: DEPT90, DEPT135.

2-((*E*)-2-(1-(3-((1*Z*,3*Z*,5*Z*,7*Z*)-Cycloocta-1,3,5,7-tetraen-1-yl)propyl)-1*H*-indol-3-yl)vinyl)-1-(3-hydroxypropyl)-6-methoxychinolin-1-ium Iodid (**HOOMeH8**)



Unter Argonatmosphäre wurden in einem Bördelglas 150 mg (1.00 eq, 0.41 mmol) 1-(3-Hydroxypropyl)-6-Methoxy-4-methylchinolin-1-ium Iodid^[6, 9-10] und 268 mg (2.21 eq, 0.92 mmol) **H8** in 4.50 mL Ethanol (99.6 %) gelöst und 91.0 μ L (78.2 mg, 2.20 eq, 0.92 mmol) Piperidin zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 16 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit 5 mL Diethylether verdünnt und der Niederschlag gesammelt. Der Niederschlag wurde drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen und aus Methanol und Diethylether umkristallisiert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum konnten 165 mg (0.26 mmol) des orangefarbenen Reinproduktes isoliert werden (63 %).

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ = 8.72 (d, J = 9.1 Hz, 1 H), 8.62 – 8.49 (m, 3 H), 8.42 (d, J = 9.7 Hz, 1 H), 8.27 (d, J = 7.7 Hz, 1 H), 8.23 (s, 1 H), 7.77-7.63 (m, 3 H), 7.55 (d, J = 15.4 Hz, 1 H), 7.42 – 7.25 (m, 2 H), 5.90 – 5.66 (m, 6 H), 5.56 (s, 1 H), 5.26-5.20 (m, 1 H), 5.08 – 4.94 (m, 2 H), 4.33 (t, J = 7.1 Hz, 2 H), 3.97 (s, 3 H), 3.78 – 3.66 (m, 2 H), 2.21 – 2.10 (m, 2 H), 2.08 (t, J = 7.3 Hz, 2 H), 1.98 – 1.83 (m, 2 H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ = 28.3, 31.4, 34.0, 45.7, 47.8, 56.1, 57.4, 109.1, 110.7, 111.2, 113.6, 120.3, 120.4, 120.8, 122.1, 123.4, 125.0, 125.5, 127.1, 128.8, 131.2, 131.7, 132.2, 133.5, 134.0, 136.3, 137.4, 141.0, 141.3, 142.6, 153.6, 158.1.

MS (FAB): m/z (%) = 503.1 (100), 504.2 (40).

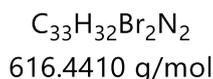
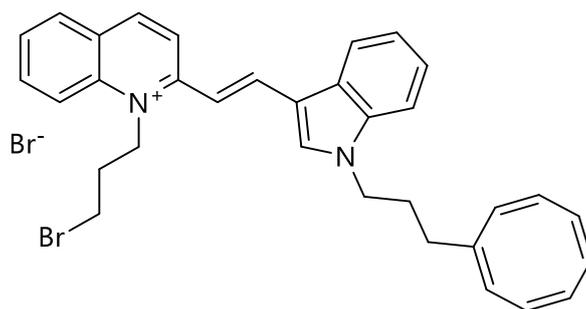
HR-MS (FAB): berechnet für $C_{34}H_{35}O_2N_2^+$ = 503.2693, gefunden = 503.2693.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3373 (w), 1512 (s), 1392 (m), 1240 (m).

EA berechnet für $C_{34}H_{35}O_2N_2I_1$: C, 64.76; H, 5.59; N, 4.44. Gefunden: C, 63.67; H, 5.51; N, 4.34.

Weitere Experimente: DEPT90, DEPT135.

1-(3-Bromopropyl)-2-((E)-2-(1-(3-((1Z,3Z,5Z,7Z)-cycloocta-1,3,5,7-tetraen-1-yl)propyl)-1H-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-ium Bromid (BrH8)



Unter Argonatmosphäre wurden in einem Bördelglas 228 mg (1.00 eq, 379 μ mol) HOH8, 301 mg (3.00 eq, 1.14 mmol) Triphenylphosphin und 419 mg (3.30 eq, 1.25 mmol) Tetrabrommethan in 3.80 mL Dichlormethan gelöst und 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 2 mL Methanol aufgenommen. Die Suspension wurde 10 min im Ultraschallbad behandelt, abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Anschließend wurden 2 g Natriumbromid zugegeben und das Gemisch zwischen 150 mL Dichlormethan und 50 mL Wasser verteilt. Nach Abtrennen der organischen Phase wurde die wässrige Phase drei Mal mit je 100 mL Dichlormethan nachextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden unter vermindertem Druck bei 40 °C eingeeengt. Der Rückstand wurde mit 2 mL Methanol versetzt und erneut 10 min im Ultraschallbad behandelt. Das Reinprodukt wurde abschließend durch Filtration und dreimaligem Waschen mit jeweils 5 mL Diethylether isoliert. Nach Trocknen im Hochvakuum konnten 53.7 mg (87.2 μ mol) des Reinproduktes erhalten werden (23 %).

1H NMR (500 MHz, DMSO) δ = 8.85 (d, J = 9.1 Hz, 1 H), 8.70 (d, J = 15.2, 1 H), 8.64 (d, J = 9.3 Hz, 1 H), 8.46 (d, J = 9.0 Hz, 1 H), 8.37 (s, 1 H), 8.26 (t, J = 8.3 Hz, 2 H), 8.15 – 8.07 (m, 1 H), 8.04 – 7.99 (m, 1 H), 7.70 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 15.2 Hz, 1H), 7.39 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.34 (t, J = 7.7, 1H), 5.88 – 5.70 (m, 6 H), 5.57 (s, 1 H), 5.10 (t, J = 8.1 Hz, 2 H), 4.37 (t, J = 7.0 Hz, 2 H), 3.94 (t, J = 6.2 Hz, 2 H), 2.50 (unter DMSO Signal, 2 H), 2.14 – 2.05 (m, 2 H), 2.00 – 1.89 (m, 2 H).

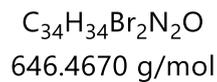
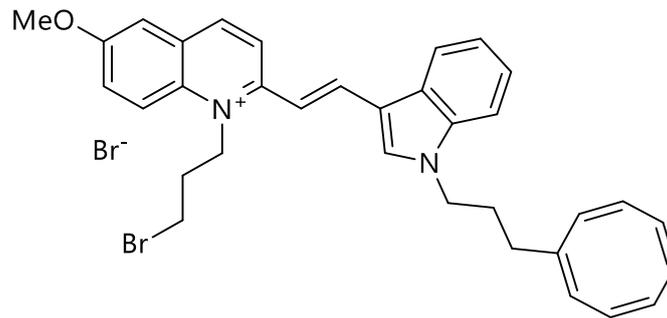
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ = 28.3, 30.6, 31.4, 34.0, 45.9, 48.7, 110.6, 111.5, 113.9, 118.2, 120.1, 120.7, 122.3, 123.7, 125.7, 127.0, 128.0, 130.2, 131.2, 131.8, 132.3, 134.1, 134.4, 136.9, 137.5, 138.4, 142.2, 142.6, 143.1, 156.2.

MS (FAB): m/z (%) = 535.2 (100), 538.2 (37).

HR-MS (FAB): berechnet für $C_{33}H_{32}N_2^{79}Br_1^+$ = 535.1743, gefunden = 535.1745.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3369 (w), 2919 (m), 2850 (w), 1730 (w), 1586 (s), 1311 (w), 1251 (w).

1-(3-Brompropyl)-2-((E)-2-(1-(3-((1Z,3Z,5Z,7Z)-cycloocta-1,3,5,7-tetraen-1-yl)propyl)-1H-indol-3-yl)vinyl)-6-methoxyquinolin-1-ium Bromid (BrOMeH8)



Unter Argonatmosphäre wurden in einem Bördelglas 20.6 mg (1.00 eq, 32.7 μ mol) HOOMeH8, 25.7 mg (3.00 eq, 98.0 μ mol) Triphenylphosphin und 35.8 mg (3.30 eq, 108 μ mol) Tetrabrommethan in 1.00 mL Dichlormethan gelöst und 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 2 mL Methanol aufgenommen. Die Suspension wurde 10 min im Ultraschallbad behandelt, abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Anschließend wurden 2 g Natriumbromid zugegeben und das Gemisch zwischen 150 mL Dichlormethan und 50 mL Wasser verteilt. Nach Abtrennen der organischen Phase wurde die wässrige Phase drei Mal mit je 100 mL Dichlormethan nachextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden unter vermindertem Druck bei 40 °C eingengt. Der Rückstand wurde mit 2 mL Methanol versetzt und erneut 10 min im Ultraschallbad behandelt. Das Reinprodukt wurde abschließend durch Filtration und dreimaligem Waschen mit jeweils 5 mL Diethylether isoliert. Nach Trocknen im Hochvakuum konnten 8.3 mg (12.7 μ mol) des Reinproduktes erhalten werden (39 %).

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ = 8.75 (d, J = 9.1 Hz, 1 H), 8.65 – 8.52 (m, 2 H), 8.41 (d, J = 9.7 Hz, 1 H), 8.30 (s, 1 H), 8.23 (d, J = 7.9 Hz, 1 H), 7.80 – 7.64 (m, 3 H), 7.45 (d, J = 15.3 Hz, 1 H), 7.41 – 7.27 (m, 2 H), 5.88 – 5.68 (m, 6 H), 5.56 (s, 1 H), 5.09 (t, J = 7.7 Hz, 2 H), 4.40 – 4.30 (m, 2 H), 3.98 (s, 3 H), 3.92 (t, J = 6.4 Hz, 2 H), 2.08 (t, J = 7.4 Hz, 2 H), 1.98 – 1.87 (m, 2 H).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ = 28.3, 30.8, 31.3, 34.0, 45.8, 48.9, 56.1, 109.2, 110.7, 111.4, 113.6, 120.1, 120.6, 122.0, 123.5, 125.1, 125.7, 127.1, 128.9, 131.7, 132.3, 133.5, 136.0, 137.4, 141.3, 141.5, 142.6, 153.9, 158.1.

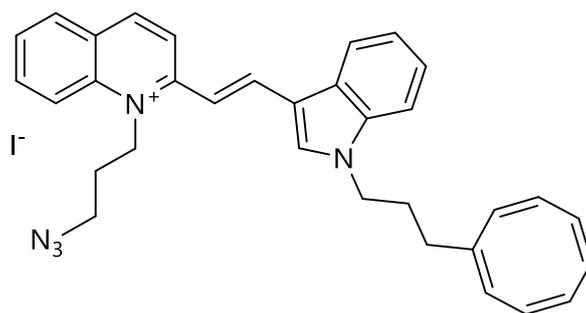
MS (FAB): m/z (%) = 565.2 (94), 566.2 (42), 567.2(100), 568.2 (38).

HR-MS (FAB): berechnet für $C_{34}H_{34}O_1N_2^{79}Br_1^+$ = 565.1855, gefunden = 565.1855.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2991 (w), 1569 (s), 1374 (m), 1252 (m).

Weitere Experimente: COSY, multiplicity-edited HSQC.

1-(3-Azidopropyl)-2-((E)-2-(1-(3-((1Z,3Z,5Z,7Z)-cycloocta-1,3,5,7-tetraen-1-yl)propyl)-1H-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-ium Iodid (**N₃H8**)



C₃₃H₃₂N₅
625.5585 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurden in einem Bördelglas 39.6 mg (1.00 eq, 0.06 mmol) **IH8**, 36.2 mg (10.0 eq, 0.56 mmol) Natriumazid und 27.8 mg (3.33 eq, 0.19 mmol) Natriumiodid in 1.56 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Das Bördelglas wurde verschlossen und 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 200 mL Diethylether / *n*-Hexan v : v = 3 : 1 verdünnt und die überstehende Lösung vom ausgefallenen Niederschlag abdekantiert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen und mit 2 g Natriumiodid versetzt. Die Mischung wurde zwischen 50 mL destilliertem Wasser und 150 mL Dichlormethan verteilt und die wässrige Phase drei Mal mit je 100 mL Dichlormethan nachextrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Extrakte wurde unter vermindertem Druck bei Raumtemperatur entfernt und der Rückstand aus Methanol und Diethylether umkristallisiert. Das Produkt wurde abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum konnten 12.9 mg (0.02 mmol) des orangefarbenen Reinstoffes isoliert werden (37 %).

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ = 8.84 (d, *J* = 9.1 Hz, 1 H), 8.68 (d, *J* = 15.3 Hz, 1 H), 8.63 (d, *J* = 9.2 Hz, 1 H), 8.46 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H), 8.33 (s, 1 H), 8.28 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 8.26 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 8.16 – 8.06 (m, 1 H), 7.86 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 7.71 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H), 7.48 (d, *J* = 15.2 Hz, 1 H), 7.40 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 7.35 (t, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 5.90 – 5.68 (m, 6 H), 5.56 (s, 1 H), 5.03 (t, *J* = 8.3 Hz, 2 H), 4.37 (t, *J* = 7.2 Hz, 2 H), 3.80 (t, *J* = 6.0 Hz, 2 H), 2.28 – 2.14 (m, 2 H), 2.08 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H), 2.03 – 1.86 (m, 2 H).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO) δ = 27.4, 28.3, 34.0, 45.9, 47.4, 48.1, 110.6, 111.6, 113.9, 118.4, 120.0, 120.6, 122.3, 123.7, 125.6, 127.0, 127.1, 128.0, 130.2, 131.2, 131.8, 132.3, 134.1, 134.4, 137.3, 137.6, 138.3, 142.1, 142.6, 143.1, 156.1.

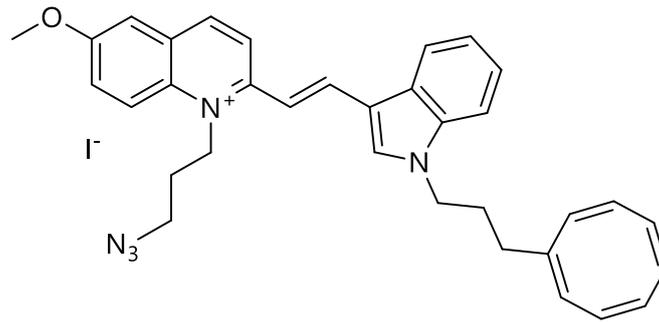
MS (FAB): *m/z* (%) = 498.3 (100), 499.3 (41).

HR-MS (FAB): berechnet für C₃₃H₃₂N₅⁺ = 498.2652, gefunden = 498.2651.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2095 (m), 1566 (m), 1350 (w), 1238 (m).

Weitere Experimente: DEPT90, DEPT135, COSY.

1-(3-Azidopropyl)-2-((*E*)-2-(1-(3-((1*Z*,3*Z*,5*Z*,7*Z*)-cycloocta-1,3,5,7-tetraen-1-yl)propyl)-1*H*-indol-3-yl)vinyl)-6-methoxychinolin-1-ium Iodid (**N₃OMeH8**)



$C_{34}H_{34}IN_5O$
655.5845 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurden in einem Bördelglas 54.5 mg (1.00 eq, 0.07 mmol) **IOMeH8**, 47.8 mg (10.0 eq, 0.74 mmol) Natriumazid und 36.7 mg (3.33 eq, 0.24 mmol) Natriumiodid in 1.74 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Das Bördelglas wurde verschlossen und 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 200 mL Diethylether / *n*-Hexan *v*:*v* = 3:1 verdünnt und die überstehende Lösung vom ausgefallenen Niederschlag abdekantiert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen und mit 2 g Natriumiodid versetzt. Die Mischung wurde zwischen 50 mL destilliertem Wasser und 150 mL Dichlormethan verteilt und die wässrige Phase drei Mal mit je 100 mL Dichlormethan nachextrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Extrakte wurde unter vermindertem Druck bei Raumtemperatur entfernt und der Rückstand aus Methanol und Diethylether umkristallisiert. Das Produkt wurde abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum konnten 23.0 mg (0.04 mmol) des orangefarbenen Reinstoffes isoliert werden (48 %).

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO) δ = 8.74 (d, *J* = 9.1 Hz, 1 H), 8.65 – 8.50 (m, 2 H), 8.41 (d, *J* = 9.7 Hz, 1 H), 8.28 (s, 1 H), 8.25 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H), 7.75 (d, *J* = 3.0 Hz, 1 H), 7.71 (dd, *J* = 9.7, 2.9 Hz, 1 H), 7.67 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H), 7.43 (d, *J* = 15.3 Hz, 1 H), 7.37 (t, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 7.32 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 5.92 - 5.67 (m, 6 H), 5.56 (s, 1 H), 5.01 (t, *J* = 8.4 Hz, 2 H), 4.34 (t, *J* = 7.2 Hz, 2 H), 3.97 (s, 3 H), 3.78 (t, *J* = 6.2 Hz, 2 H), 2.25 – 2.12 (m, 2 H), 2.08 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H), 2.00 – 1.84 (m, 2 H).

$^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ = 27.6, 28.3, 34.0, 45.7, 47.6, 48.0, 56.1, 109.2, 110.7, 111.4, 113.6, 120.2, 120.5, 120.5, 122.1, 123.5, 125.1, 125.6, 127.1, 128.8, 131.2, 131.8, 132.3, 133.4, 134.1, 136.4, 137.4, 141.2, 141.5, 142.6, 153.7, 158.1.

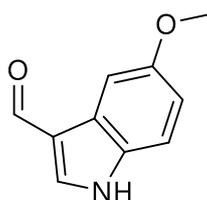
MS (FAB): *m/z* (%) = 528.3 (51), 529.3 (22).

HR-MS (FAB): berechnet für $C_{34}H_{34}O_1N_5^+$ = 528.2758, gefunden = 528.2759.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2094 (m), 1570 (w), 1347 (m), 1262 (w).

Weitere Experimente: DEPT90, DEPT135, COSY.

5-Methoxy-1*H*-indol-3-carbaldehyd (**OMe**)



$C_{10}H_9NO_2$
175.1870 g/mol

In einem ausgeheizten Kolben wurden unter Argonatmosphäre 1.00 g (1.00 eq, 6.79 mmol) 5-Methoxy-1*H*-indol in 10.5 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurde eine Lösung 1.27 mL (2.08 g, 2.00 eq, 13.6 mmol) Phosphoroxychlorid in 10.5 mL *N,N*-Dimethylformamid zugetropft und das Reaktionsgemisch auf 35 °C erwärmt. Nach 1 h wurde die Reaktion mit 80 mL destilliertem Wasser gestoppt, mit 5 M NaOH_{aq} auf pH 6 gebracht und 5 min zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde drei Mal mit je 100 mL Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (EE / hex v : v = 1 : 1) konnten 480 mg (2.74 mmol) des farblosen Reinproduktes isoliert werden (40 %).

DC (EE / hex, v : v = 1 : 1): $R_f = 0.24$.

¹H NMR (400 MHz, DMSO): $\delta = 12.02$ (s, 1 H), 9.90 (s, 1 H), 8.21 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H), 7.59 (d, $J = 2.6$ Hz, 1 H), 7.40 (d, $J = 8.8$ Hz, 1 H), 6.88 (dd, $J = 8.8, 2.6$ Hz, 1 H), 3.78 (s, 3 H).

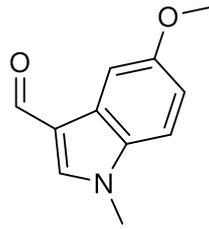
¹³C NMR (100 MHz, DMSO): $\delta = 55.3, 102.5, 113.2, 113.3, 118.0, 124.9, 131.8, 138.4, 155.6, 184.8$.

MS (FAB): m/z (%) = 175.1 (62), 176.1 (100), 177.1 (14).

HR-MS (FAB): berechnet für $C_{10}H_{10}O_2N_1^+$ = 176.0706, gefunden = 176.0707.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3104 (m), 1621 (m), 1208 (s).

Weitere Experimente: DEPT90, DEPT135, COSY.

5-Methoxy-1-methyl-1*H*-indol-3-carbaldehyd (**OMe3**)

$C_{11}H_{11}NO_2$
189.2140 g/mol

200 mg (1.00 eq, 1.14 mmol) 5-Methoxy-1*H*-indol-3-carbaldehyd (**OMe**) und 158 mg (1.00 eq, 1.14 mmol) Kaliumcarbonat wurden in 1.14 mL *N,N*-Dimethylformamid suspendiert und 385 μ L (411 mg, 4.00 eq, 4.57 mmol) Dimethylcarbonat zugegeben. Die Suspension wurde bei 130 °C für 19 h gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung auf 50 mL Eiswasser gegeben und die wässrige Phase drei Mal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 50 mL destilliertem Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt. Nach Trocknen im Hochvakuum konnten 214 mg (1.13 mmol) des Reinproduktes erhalten werden (99 %).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ = 9.85 (s, 1 H), 8.19 (s, 1 H), 7.60 (d, J = 2.5 Hz, 1 H), 7.48 (d, J = 8.9 Hz, 1 H), 6.94 (dd, J = 8.9, 2.6 Hz, 1 H), 3.86 (s, 3 H), 3.79 (s, 3 H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO): δ = 33.5, 55.3, 102.6, 111.8, 113.2, 116.7, 125.4, 132.6, 141.4, 156.0, 184.2.

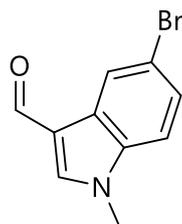
MS (EI): m/z (%) = 188.1 (40), 189.1 (100), 190.1 (12).

HR-MS (EI): berechnet für $C_{11}H_{11}O_2N_1^+$ = 189.0784, gefunden = 189.0783.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3104 (w), 2802 (w), 1643 (s), 1220 (m).

Weitere Experimente: DEPT90, DEPT135, COSY.

5-Brom-1-methyl-1*H*-indol-3-carbaldehyd (**Br3**)



$C_{10}H_8BrNO$
238.0840 g/mol

2.24 g (1.00 eq, 10.0 mmol) 5-Bromo-1*H*-indol-3-carbaldehyd (**Br**) und 1.52 g (1.10 eq, 11.0 mmol) Kaliumcarbonat wurden in 10.0 mL *N,N*-Dimethylformamid suspendiert und 3.40 mL (3.64 mg, 4.00 eq, 40.0 mmol) Dimethylcarbonat zugegeben. Die Suspension wurde bei 130 °C für 19 h gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung auf 50 mL Eiswasser gegeben und die wässrige Phase drei Mal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 50 mL destilliertem Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt. Nach Trocknen im Hochvakuum konnten 2.35 g (9.87 mmol) des Reinproduktes erhalten werden (99 %).

1H NMR (400 MHz, DMSO): δ = 9.88 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.21 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.55 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.44 (dd, J = 8.7, 2.0 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H).

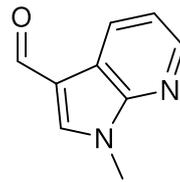
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO): δ = 33.5, 113.1, 115.3, 116.2, 123.0, 126.0, 126.2, 136.4, 142.4, 184.5.

MS (EI): m/z (%) = 236.1 (31), 237.1 (34), 238.1 (33), 239.1 (34).

HR-MS (EI): berechnet für $C_{10}H_8O_1N_1^{79}Br_1^+$ = 236.9789, gefunden = 236.9788.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3104 (w), 2813 (w), 1649 (s), 1240 (w).

Weitere Experimente: DEPT90, DEPT135, COSY.

1-Methyl-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-3-carbaldehyd (**A3**)

$C_9H_8N_2O$
160.1760 g/mol

438 mg (1.00 eq, 3.00 mmol) 1*H*-Pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-3-carbaldehyd (**A**) und 476 mg (1.15 eq, 3.45 mmol) Kaliumcarbonat wurden in 3.00 mL *N,N*-Dimethylformamid suspendiert und 1.02 mL (1.08 g, 4.00 eq, 12.0 mmol) Dimethylcarbonat zugegeben. Die Suspension wurde bei 130 °C für 19 h gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung auf 100 mL Eiswasser gegeben und die wässrige Phase vier Mal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 50 mL destilliertem Wasser und 50 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (EE / hex v : v = 1 / 2) und Trocknen im Hochvakuum konnten 353 mg (2.20 mmol) des Reinproduktes erhalten werden (73 %).

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ = 9.90 (s, 1 H), 8.48 (s, 1 H), 8.41 (s, 1 H), 8.41 – 8.38 (m, 1 H), 7.36 – 7.22 (m, 1 H), 3.90 (s, 3 H).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ = 31.7, 115.1, 116.8, 118.6, 129.4, 141.5, 144.6, 148.4, 184.9.

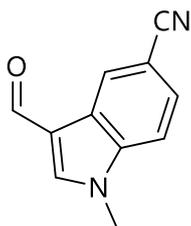
MS (EI): m/z (%) = 159.1 (97), 160.1 (85).

HR-MS (EI): berechnet für $C_9H_8O_1N_2^+$ = 160.0637, gefunden = 160.0638.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3089 (w), 2779 (w), 1646 (s), 1205 (w).

Weitere Experimente: DEPT90, DEPT135, COSY, HSQC.

3-Formyl-1-methyl-1*H*-indol-5-carbonitril (**CN3**)



$C_{11}H_8N_2O$
184.1980 g/mol

511 mg (1.00 eq, 3.00 mmol) 3-Formyl-1*H*-indol-5-carbonitril (**CN**) und 456 mg (1.10 eq, 3.30 mmol) Kaliumcarbonat wurden in 3.00 mL *N,N*-Dimethylformamid suspendiert und 1.01 mL (1.08 g, 4.00 eq, 12.0 mmol) Dimethylcarbonat zugegeben. Die Suspension wurde bei 130 °C für 19 h gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung auf 50 mL Eiswasser gegeben und die wässrige Phase drei Mal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 50 mL destilliertem Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt. Nach Trocknen im Hochvakuum konnten 550 mg (2.99 mmol) des Reinproduktes erhalten werden (quant.).

1H NMR (400 MHz, DMSO): δ = 9.95 (s, 1 H), 8.48 (s, 1 H), 8.45 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 8.5 Hz, 1 H), 7.71 (dd, J = 8.5, 1.6 Hz, 1 H), 3.94 (s, 3 H).

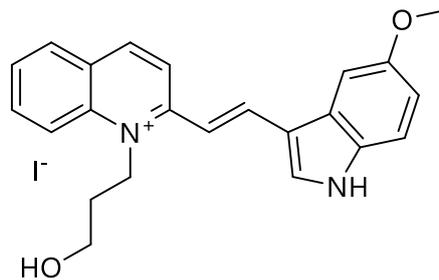
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO): δ = 33.7, 39.5, 104.7, 112.6, 116.8, 119.8, 124.3, 125.7, 126.4, 139.3, 143.3, 184.8.

MS (FAB): m/z (%) = 184.1 (20), 185.1 (100), 186.1 (17).

HR-MS (FAB): berechnet für $C_{11}H_9O_1N_2^+$ = 185.0709, gefunden = 185.0709.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2835 (w), 2219 (m), 1654 (s).

Weitere Experimente: DEPT90, DEPT135, COSY.

(E)-1-(3-Hydroxypropyl)-2-(2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-ium Iodid (HOOMe)

$C_{23}H_{23}IN_2O_2$
486.3535 g/mol

In einem Bördelglas wurden 231 mg (1.00 eq, 701 μ mol) 1-(3-Hydroxypropyl)-4-methylchinolin-1-ium Iodid^[6, 9-10] und 246 mg (2.00 eq, 1.40 mmol) **OMe** in 7.0 mL Ethanol (99.6 %) gelöst und 152 μ L (131 mg, 2.20 eq, 1.54 mmol) Piperidin zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 19 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit 10 mL Diethylether verdünnt und der Niederschlag abfiltriert. Der Niederschlag wurde drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 293 mg (602 μ mol) des Reinproduktes erhalten (86 %).

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ = 12.26 (s, 1 H), 8.80 (d, J = 9.2 Hz, 1 H), 8.71 (d, J = 15.2 Hz, 1 H), 8.63 (d, J = 9.2 Hz, 1 H), 8.44 (d, J = 9.0 Hz, 1 H), 8.30 (s, 1 H), 8.25 (d, J = 7.7 Hz, 1 H), 8.08 (m, 1 H), 7.83 (m, 1 H), 7.67 (d, J = 2.5 Hz, 1 H), 7.54 (d, J = 15.3 Hz, 1 H), 7.45 (d, J = 8.8 Hz, 1 H), 6.93 (dd, J = 8.9, 2.4 Hz, 1 H), 5.15 (t, J = 4.7 Hz, 1 H), 5.01 (t, J = 8.0 Hz, 2 H), 3.89 (s, 3 H), 3.72 (q, J = 5.3 Hz, 2 H), 2.16 (p, J = 5.7 Hz, 2 H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO): δ = 31.2, 47.5, 55.5, 57.5, 102.4, 110.0, 113.2, 113.6, 114.7, 118.3, 119.9, 126.2, 126.8, 127.8, 130.0, 132.3, 134.2, 134.4, 138.4, 141.6, 143.6, 155.6, 156.1.

MS (FAB): m/z (%) = 359.2 (100), 360.2 (28).

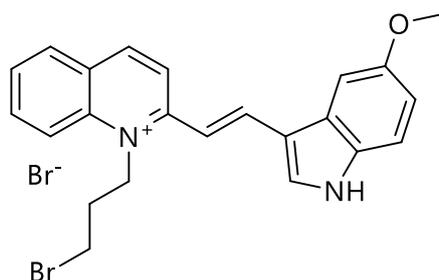
HR-MS (FAB): berechnet für $C_{23}H_{23}O_2N_2^+$ = 359.1754, gefunden = 359.1755.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3138 (w), 1569 (s), 1208 (s).

EA berechnet für $C_{23}H_{23}O_2N_2I$: C, 56.80; H, 4.77; N, 5.76. Gefunden: C, 56.62; H, 4.71; N, 5.74.

Weitere Experimente: COSY, multiplicity-edited HSQC.

(E)-1-(3-Brompropyl)-2-(2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-ium Bromid
(BrOMe)



$C_{23}H_{22}Br_2N_2O$
502.2500 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurden in einem Bördelglas 97.2 mg (1.00 eq, 200 μ mol) HOOMe, 157 mg (3.00 eq, 600 μ mol) Triphenylphosphin und 219 mg (3.30 eq, 660 μ mol) Tetrabrommethan in 2.00 mL Dichlormethan gelöst und 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 2 mL Methanol aufgenommen. Die Suspension wurde 10 min im Ultraschallbad behandelt, abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Anschließend wurden 2 g Natriumbromid zugegeben und das Gemisch zwischen 150 mL Dichlormethan und 50 mL Wasser verteilt. Nach Abtrennen der organischen Phase wurde die wässrige Phase drei Mal mit je 100 mL Dichlormethan nachextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden unter vermindertem Druck bei 40 °C eingengt. Der Rückstand wurde mit 2 mL Methanol versetzt und erneut 10 min im Ultraschallbad behandelt. Das Reinprodukt wurde abschließend durch Filtration und dreimaligem Waschen mit jeweils 5 mL Diethylether isoliert. Nach Trocknen im Hochvakuum konnten 42.9 mg (85.4 μ mol) des Reinproduktes erhalten werden (43 %).

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ = 12.31 (s, 1 H), 8.81 (d, J = 9.2 Hz, 1 H), 8.74 (d, J = 15.1 Hz, 1 H), 8.65 (d, J = 9.3 Hz, 1 H), 8.42 (d, J = 8.9 Hz, 1 H), 8.39 (d, J = 3.2 Hz, 1 H), 8.28 – 8.23 (m, 1 H), 8.13-8.06 (m, 1 H), 7.84 (t, J = 7.5 Hz, 1 H), 7.69 (d, J = 2.4 Hz, 1 H), 7.49 – 7.37 (m, 2 H), 6.93 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1 H), 5.14 – 5.01 (m, 2 H), 3.96 – 3.84 (m, 6 H), 2.50 (unter DMSO signal, 2 H).

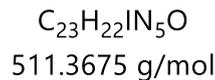
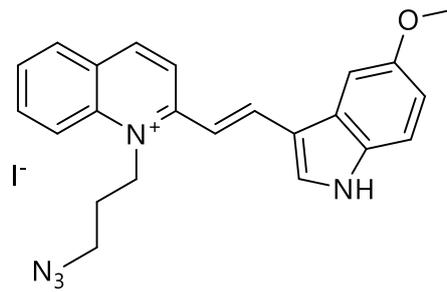
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ = 30.8, 31.0, 48.5, 55.7, 102.6, 109.8, 113.0, 113.7, 114.6, 118.1, 120.1, 126.4, 126.9, 127.9, 130.2, 132.2, 134.3, 138.4, 141.8, 143.8, 155.6, 156.3.

MS (FAB): m/z (%) = 421.1 (100), 424.1 (28).

HR-MS (FAB): berechnet für $C_{23}H_{22}O_1N_2^{79}Br_1^+$ = 421.0915, gefunden = 421.0914.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3044 (w), 1583 (m), 1331 (w), 1254 (m).

Weitere Experimente: COSY, multiplicity-edited HSQC.

(E)-1-(3-Azidopropyl)-2-(2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-ium Iodid (N₃OMe)

Unter Argonatmosphäre wurden 30.1 mg (1.00 eq, 60.0 μmol) BrOMe, 39.0 mg (10.0 eq, 600 μmol) Natriumazid und 29.9 mg (3.33 eq, 200 μmol) Natriumiodid in 1.57 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Die Reaktionsmischung wurde 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 200 mL Diethylether / *n*-Hexan *v* : *v* = 3 : 1 verdünnt und die überstehende Lösung abdekantiert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen und mit 2 g Natriumiodid versetzt. Die Mischung wurde zwischen 50 mL destilliertem Wasser und 150 mL Dichlormethan verteilt und die wässrige Phase drei Mal mit je 100 mL Dichlormethan nachextrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Extrakte wurde unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt und der Rückstand in 2 mL Methanol aufgenommen und 10 min im Ultraschallbad behandelt. Das Produkt wurde abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum konnten 20.1 mg (39.3 μmol) des Reinstoffes isoliert werden (66 %).

¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ = 12.29 (s, 1 H), 8.80 (d, *J* = 9.1 Hz, 1 H), 8.73 (d, *J* = 15.1 Hz, 1 H), 8.63 (d, *J* = 9.2 Hz, 1 H), 8.42 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H), 8.36 (s, 1 H), 8.25 (d, *J* = 7.3 Hz, 1 H), 8.12 - 8.06 (m, 1 H), 7.84 (t, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 7.71 (d, *J* = 2.6 Hz, 1 H), 7.47 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H), 7.41 (d, *J* = 15.2 Hz, 1 H), 6.95 (dd, *J* = 8.9 Hz, 2.3, 1 H), 5.01 (t, *J* = 7.7 Hz, 2 H), 3.89 (s, 3 H), 3.79 (t, *J* = 6.3 Hz, 2 H), 2.20 (p, *J* = 6.7 Hz, 2 H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO): δ = 27.3, 39.5, 47.2, 48.0, 55.6, 103.1, 109.7, 112.5, 113.6, 114.6, 118.2, 119.9, 126.2, 126.8, 127.8, 130.1, 132.4, 134.3, 134.9, 138.3, 141.7, 143.8, 155.6, 156.1.

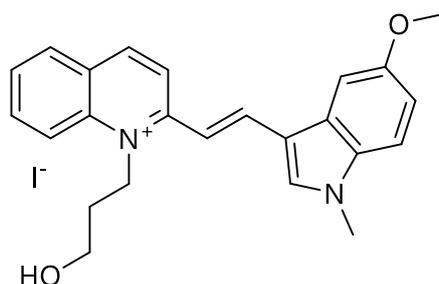
MS (FAB): *m/z* (%) = 384.2 (100), 385.2 (31).

HR-MS (FAB): ber für C₂₃H₂₂O₁N₅⁺ = 384.1819, gefunden = 384.1817.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3148 (w), 2103 (m), 1507 (m), 1223 (w).

Weitere Experimente: DEPT90, DEPT135, COSY, *multiplicity-edited* HSQC.

(*E*)-1-(3-Hydroxypropyl)-2-(2-(5-methoxy-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-ium Iodid (HO**OMe3**)



$C_{24}H_{25}IN_2O_2$
500.3805 g/mol

In einem Bördelglas wurden 158 mg (1.00 eq, 481 μ mol) 1-(3-Hydroxypropyl)-4-methylchinolin-1-ium Iodid^[6, 9-10] und 182 mg (2.00 eq, 961 μ mol) **OMe3** in 4.8 mL Ethanol (99.6 %) gelöst und 105 μ L (90.0 mg, 2.20 eq, 1.06 mmol) Piperidin zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 19 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit 10 mL Diethylether verdünnt und der Niederschlag abfiltriert. Der Niederschlag wurde drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 208 mg (416 μ mol) des Reinproduktes erhalten (87 %).

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ = 8.78 (d, J = 9.2 Hz, 1 H), 8.68 (d, J = 15.2 Hz, 1 H), 8.63 (d, J = 9.1 Hz, 1 H), 8.42 (d, J = 9.0 Hz, 1 H), 8.28 (s, 1 H), 8.24 (d, J = 7.9 Hz, 1 H), 8.02-8.12 (m, 1 H), 7.82 (m, 1 H), 7.69 (m, 1 H), 7.53 (d, J = 9.3 Hz, 1 H), 7.50 (d, J = 15.8 Hz, 1 H), 6.98 (m, 1 H), 5.15 (t, J = 4.6 Hz, 1 H), 4.99 (t, J = 7.6 Hz, 2 H), 3.92 (s, 3 H), 3.90 (s, 3 H), 3.72 (q, J = 5.3 Hz, 2 H), 2.16 (p, J = 6.1 Hz, 2 H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO): δ = 31.1, 33.8, 47.4, 55.6, 57.5, 102.6, 109.8, 112.3, 113.0, 113.6, 118.3, 119.9, 126.7, 126.8, 127.8, 130.0, 133.0, 134.2, 137.4, 138.4, 141.5, 142.9, 155.9, 156.0.

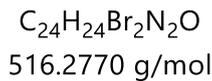
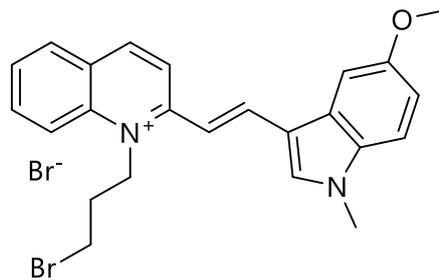
MS (FAB): m/z (%) = 373.2 (100), 374.2 (30).

HR-MS (FAB): berechnet für $C_{24}H_{25}O_2N_2^+$ = 373.1911, gefunden = 373.1909.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3324 (m), 1589 (s), 1221 (m).

EA berechnet für $C_{24}H_{25}O_2N_2I$: C, 57.61; H, 5.04; N, 5.60. Gefunden: C, 57.52; H, 4.99; N, 5.58.

Weitere Experimente: COSY, multiplicity-edited HSQC.

**(E)-1-(3-Brompropyl)-2-(2-(5-methoxy-1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-ium
Bromid (BrOMe3)**

Unter Argonatmosphäre wurden in einem Bördelglas 100.0 mg (1.00 eq, 200 μmol) HOOMe3, 157 mg (3.00 eq, 600 μmol) Triphenylphosphin und 219 mg (3.30 eq, 660 μmol) Tetrabrommethan in 2.00 mL Dichlormethan gelöst und 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 2 mL Methanol aufgenommen. Die Suspension wurde 10 min im Ultraschallbad behandelt, abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Anschließend wurden 2 g Natriumbromid zugegeben und das Gemisch zwischen 150 mL Dichlormethan und 50 mL Wasser verteilt. Nach Abtrennen der organischen Phase wurde die wässrige Phase drei Mal mit je 100 mL Dichlormethan nachextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden unter vermindertem Druck bei 40 °C eingengt. Der Rückstand wurde mit 2 mL Methanol versetzt und erneut 10 min im Ultraschallbad behandelt. Das Reinprodukt wurde abschließend durch Filtration und dreimaligem Waschen mit jeweils 5 mL Diethylether isoliert. Nach Trocknen im Hochvakuum konnten 64.9 mg (126 μmol) des Reinproduktes erhalten werden (63 %).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ = 8.79 (dd, J = 9.2, 3.6 Hz, 1 H), 8.69 (dd, J = 15.1, 8.1 Hz, 1 H), 8.64 (dd, J = 9.3, 6.1 Hz, 1 H), 8.41 (t, J = 8.8 Hz, 1 H), 8.32 (d, J = 27.3 Hz, 1 H), 8.27 – 8.20 (m, 1 H), 8.12 – 8.03 (m, 1 H), 7.88 – 7.78 (m, 1 H), 7.70 (dd, J = 6.3, 2.4 Hz, 1 H), 7.54 (dd, J = 8.9, 2.9 Hz, 1 H), 7.02 – 6.95 (m, 1 H), 5.09 – 4.93 (m, 2 H), 3.92 (d, J = 4.2 Hz, 3 H), 3.90 (s, 3 H), 3.76 – 3.68 (m, 1 H), 2.50 (unter DMSO Signal, 2 H), 2.20 – 2.11 (m, 1 H).

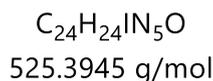
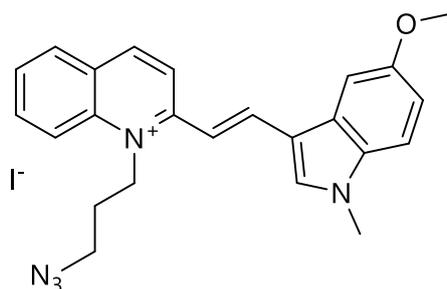
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO) δ = 30.7, 31.1, 33.8, 47.4, 55.6, 102.6, 109.8, 113.1, 113.5, 113.6, 118.3, 120.1, 126.8, 126.8, 127.8, 130.2, 134.2, 138.4, 141.5, 143.1, 156.0.

MS (FAB): m/z (%) = 435.1 (38), 438.1 (11).

HR-MS (FAB): berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{O}_1\text{N}_2^{79}\text{Br}_1^+$ = 435.0172, gefunden = 435.1070.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3349 (w), 1589 (s), 1306 (m), 1217 (s).

(*E*)-1-(3-Azidopropyl)-2-(2-(5-methoxy-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-ium
Iodid (N₃OMe3)



Unter Argonatmosphäre wurden 31.0 mg (1.00 eq, 60.0 μmol) BrOMe3, 39.0 mg (10.0 eq, 600 μmol) Natriumazid und 29.9 mg (3.33 eq, 200 μmol) Natriumiodid in 1.00 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Die Reaktionsmischung wurde 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 200 mL Diethylether / *n*-Hexan v : v = 3 : 1 verdünnt und die überstehende Lösung abdekantiert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen und mit 2 g Natriumiodid versetzt. Die Mischung wurde zwischen 50 mL destilliertem Wasser und 150 mL Dichlormethan verteilt und die wässrige Phase drei Mal mit je 100 mL Dichlormethan nachextrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Extrakte wurde unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt und der Rückstand in 2 mL Methanol aufgenommen und 10 min im Ultraschallbad behandelt. Das Produkt wurde abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum konnten 20.1 mg (38.3 μmol) des Reinstoffes isoliert werden (64 %).

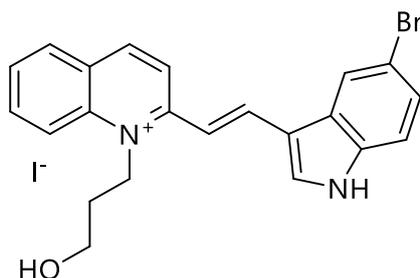
¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ = 8.79 (d, *J* = 9.1 Hz, 1 H), 8.70 (d, *J* = 15.2 Hz, 1 H), 8.63 (d, *J* = 9.2 Hz, 1 H), 8.41 (d, *J* = 9.5 Hz, 1 H), 8.32 (s, 1 H), 8.24 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 8.12-8.07 (m, 1 H), 7.83 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 7.73 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H), 7.56 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H), 7.38 (d, *J* = 15.2 Hz, 1 H), 7.03 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1 H), 5.00 (t, *J* = 7.9 Hz, 2 H), 3.93 (s, 3 H), 3.90 (s, 3 H), 3.78 (t, *J* = 6.3 Hz, 2 H), 2.20 (p, *J* = 7.3 Hz, 2 H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO): δ = 27.3, 33.8, 47.2, 48.0, 55.6, 103.3, 109.6, 112.3, 112.4, 113.5, 118.2, 119.9, 126.7, 126.8, 127.8, 130.1, 133.2, 134.3, 137.9, 138.3, 141.7, 143.2, 156.0, 156.0.

MS (FAB): *m/z* (%) = 398.2 (100), 399.2 (32).

HR-MS (FAB): berechnet für C₂₄H₂₄O₁N₅⁺ = 398.1975, gefunden = 398.1976.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3008 (w), 2096 (m), 1589 (s), 1217 (s).

(E)-2-(2-(5-Brom-1H-indol-3-yl)vinyl)-1-(3-Hydroxypropyl)chinolin-1-ium Iodid (HOBr)

C₂₂H₂₀BrIN₂O
535.2235 g/mol

In einem Bördelglas wurden 247 mg (1.00 eq, 750 µmol) 1-(3-Hydroxypropyl)-4-methylchinolin-1-ium Iodid^[6, 9-10] und 336 mg (2.00 eq, 1.50 mmol) **Br** in 7.5 mL Ethanol (99.6 %) gelöst und 163 µL (141 mg, 2.20 eq, 1.65 mmol) Piperidin zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 19 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit 10 mL Diethylether verdünnt und der Niederschlag abfiltriert. Der Niederschlag wurde drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 346 mg (646 µmol) des Reinproduktes erhalten (86 %).

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ = 12.44 (s, 1 H), 8.84 (d, J = 9.1 Hz, 1 H), 8.69 (d, J = 15.3 Hz, 1 H), 8.66 (d, J = 9.1 Hz, 1 H), 8.46 (d, J = 9.0 Hz, 1 H), 8.44 - 8.37 (m, 2 H), 8.26 (d, J = 7.0 Hz, 1 H), 8.14 - 8.07 (m, 1 H), 7.90 - 7.81 (m, 1 H), 7.61 (d, J = 15.3 Hz, 1 H), 7.52 (d, J = 8.6 Hz, 1 H), 7.40 (dd, J = 8.7, 1.8 Hz, 1 H), 5.04 (t, J = 7.8 Hz, 2 H), 3.73 (t, J = 5.5 Hz, 2 H), 2.16 (p, J = 6.9 Hz, 2 H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO): δ = 31.3, 47.6, 57.6, 111.3, 114.1, 114.6, 114.9, 118.4, 120.1, 122.3, 125.8, 127.0, 127.5, 128.0, 130.1, 134.3, 134.5, 136.4, 138.4, 142.0, 142.2, 155.9.

MS (FAB): m/z (%) = 409.1 (100), 410.1 (29).

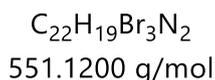
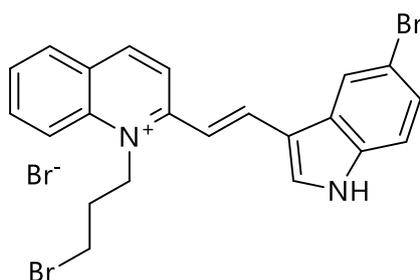
HR-MS (FAB): berechnet für C₂₂H₂₀O₁N₂⁷⁹Br₁⁺ = 407.0754, gefunden = 407.0755.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3380 (w), 3064 (w), 1591 (s), 1312 (m).

EA berechnet für C₂₂H₂₀Br₁O₁N₂I₁: C, 49.37; H, 3.68; N, 5.23. Gefunden: C, 48.90; H, 3.67; N, 5.20.

Weitere Experimente: COSY, multiplicity-edited HSQC.

(E)-2-(2-(5-Brom-1H-indol-3-yl)vinyl)-1-(3-brompropyl)chinolin-1-ium Bromid (BrBr)



Unter Argonatmosphäre wurden in einem Bördelglas 107.0 mg (1.00 eq, 200 μ mol) HOBr, 157 mg (3.00 eq, 600 μ mol) Triphenylphosphin und 219 mg (3.30 eq, 660 μ mol) Tetrabrommethan in 2.00 mL Dichlormethan gelöst und 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 2 mL Methanol aufgenommen. Die Suspension wurde 10 min im Ultraschallbad behandelt, abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Anschließend wurden 2 g Natriumbromid zugegeben und das Gemisch zwischen 150 mL Dichlormethan und 50 mL Wasser verteilt. Nach Abtrennen der organischen Phase wurde die wässrige Phase drei Mal mit je 100 mL Dichlormethan nachextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden unter vermindertem Druck bei 40 °C eingengt. Der Rückstand wurde mit 2 mL Methanol versetzt und erneut 10 min im Ultraschallbad behandelt. Das Reinprodukt wurde abschließend durch Filtration und dreimaligem Waschen mit jeweils 5 mL Diethylether isoliert. Nach Trocknen im Hochvakuum konnten 66.5 mg (120 μ mol) des Reinproduktes erhalten werden (60 %).

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ = 12.52 (s, 1 H), 8.87 (d, J = 9.2 Hz, 1 H), 8.73 (d, J = 15.3 Hz, 1 H), 8.68 (d, J = 9.2 Hz, 1 H), 8.51 (d, J = 3.0 Hz, 1 H), 8.47 (d, J = 9.0 Hz, 1 H), 8.40 (d, J = 1.9 Hz, 1 H), 8.32 – 8.23 (m, 1 H), 8.16 - 8.06 (m, 1 H), 7.86 (t, J = 7.5 Hz, 1 H), 7.56 – 7.43 (m, 2 H), 7.40 (dd, J = 8.8, 1.8 Hz, 1 H), 5.17 – 5.04 (m, 2 H), 3.93 (t, J = 6.2 Hz, 2 H), 2.50 (unter DMSO Signal, 2 H).

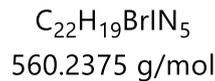
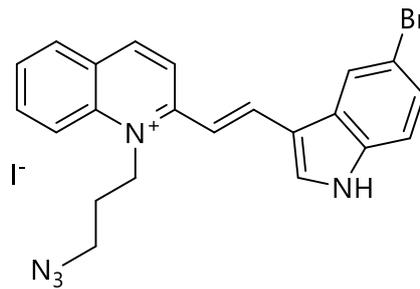
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ = 30.8, 31.2, 48.7, 111.2, 113.9, 114.6, 114.8, 118.3, 120.2, 122.3, 125.9, 127.1, 127.3, 128.1, 130.2, 134.5, 134.7, 136.1, 138.3, 142.4, 142.8, 156.2.

MS (FAB): m/z (%) = 469.0 (51), 470.0 (20), 471.0 (100), 472.0 (30), 473.0 (50), 474.0 (13), 475.0 (2).

HR-MS (FAB): berechnet für $C_{22}H_{19}N_2^{79}Br_2^+$ = 468.9915, gefunden = 468.9918; berechnet für $C_{22}H_{19}N_2^{79}Br_1^{81}Br_1^+$ = 470.9894, gefunden = 470.9893.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3088 (w), 1597 (s), 1320 (s), 1251 (s).

Weitere Experimente: COSY, multiplicity-edited HSQC.

(E)-1-(3-Azidopropyl)-2-(2-(5-brom-1H-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-ium Iodid (N₃Br)

Unter Argonatmosphäre wurden 33.1 mg (1.00 eq, 60.0 μmol) BrBr, 39.0 mg (10.0 eq, 600 μmol) Natriumazid und 29.9 mg (3.33 eq, 200 μmol) Natriumiodid in 1.00 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Die Reaktionsmischung wurde 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 200 mL Diethylether / *n*-Hexan *v* : *v* = 3 : 1 verdünnt und die überstehende Lösung abdekantiert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen und mit 2 g Natriumiodid versetzt. Die Mischung wurde zwischen 50 mL destilliertem Wasser und 150 mL Dichlormethan verteilt und die wässrige Phase drei Mal mit je 100 mL Dichlormethan nachextrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Extrakte wurde unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt und der Rückstand in 2 mL Methanol aufgenommen und 10 min im Ultraschallbad behandelt. Das Produkt wurde abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum konnten 12.0 mg (21.4 μmol) des Reinstoffes isoliert werden (36 %).

¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ = 12.48 (s, 1 H), 8.87 (d, *J* = 9.1 Hz, 1 H), 8.71 (d, *J* = 15.3 Hz, 1 H), 8.66 (d, *J* = 9.1 Hz, 1 H), 8.46 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H), 8.45 (s, 1 H), 8.44 - 8.41 (m, 1 H), 8.30 - 8.25 (m, 1 H), 8.15 - 8.09 (m, 1 H), 7.87 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 7.54 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 7.49 (d, *J* = 15.3 Hz, 1 H), 7.43 (dd, *J* = 8.6, 1.8 Hz, 1 H), 5.06 (t, *J* = 7.8 Hz, 2 H), 3.79 (t, *J* = 6.3 Hz, 2 H), 2.20 (p, *J* = 6.5 Hz, 2 H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO): δ = 27.4, 47.5, 48.0, 111.4, 113.9, 114.6, 114.9, 118.4, 120.1, 122.3, 125.9, 127.1, 127.3, 128.2, 130.2, 134.5, 134.8, 136.2, 138.3, 142.4, 142.7, 156.1.

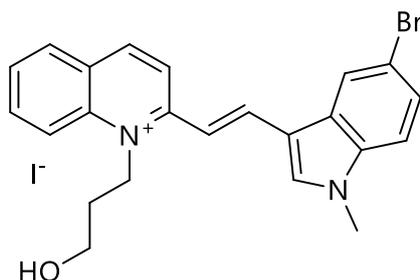
MS (FAB): *m/z* (%) = 432.1 (25), 435.1 (7).

HR-MS (FAB): berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_5^{79}\text{Br}_1^+$ = 432.0818, gefunden = 432.0820.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3163 (w), 2101 (m), 1594 (s), 1315 (s), 1241 (m).

Weitere Experimente: DEPT90, DEPT135.

(E)-2-(2-(5-Brom-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinyl)-1-(3-hydroxypropyl)chinolin-1-ium Iodid (HOBr3)



C₂₃H₂₂BrIN₂O
549.2505 g/mol

In einem Bördelglas wurden 247 mg (1.00 eq, 750 μmol) 1-(3-Hydroxypropyl)-4-methylchinolin-1-ium Iodid^[6, 9-10] und 357 mg (2.00 eq, 1.50 mmol) Br3 in 7.5 mL Ethanol (99.6 %) gelöst und 163 μL (141 mg, 2.20 eq, 1.65 mmol) Piperidin zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 19 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit 10 mL Diethylether verdünnt und der Niederschlag abfiltriert. Der Niederschlag wurde drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 359 mg (653 μmol) des Reinproduktes erhalten (87 %).

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ = 8.86 (d, *J* = 9.1 Hz, 1 H), 8.73 - 8.62 (m, 2 H), 8.51 - 8.42 (m, 2 H), 8.39 (s, 1 H), 8.27 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 8.15 - 8.06 (m, 1 H), 7.91 - 7.81 (m, 1 H), 7.61 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H), 7.60 (d, *J* = 15.4 Hz, 1 H), 7.48 (dd, *J* = 8.7, 1.8 Hz, 1 H), 5.15 (t, *J* = 4.7 Hz, 1 H), 5.03 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 3.95 (s, 3 H), 3.73 (q, *J* = 5.3 Hz, 2 H), 2.15 (p, *J* = 7.5, 6.2 Hz, 2 H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO): δ = 31.3, 33.8, 47.6, 57.5, 111.5, 112.9, 113.4, 115.1, 118.4, 120.1, 122.4, 125.9, 127.1, 127.8, 128.1, 130.1, 134.4, 136.6, 137.1, 138.4, 141.6, 142.1, 155.9.

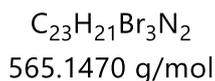
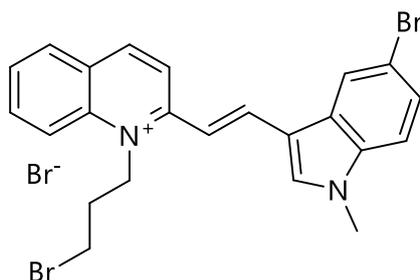
MS (FAB): *m/z* (%) = 421.1 (100), 424.1 (27).

HR-MS (FAB): berechnet für C₂₃H₂₂O₁N₂⁷⁹Br¹⁺ = 421.0910, gefunden = 421.0911.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3315 (m), 1583 (s), 1301 (s), 1224 (m).

EA berechnet für C₂₃H₂₂Br₁O₁N₂I₁: C, 50.30; H, 4.04; N, 5.10. Gefunden: C, 50.26; H, 3.99; N, 5.11.

Weitere Experimente: COSY, multiplicity-edited HSQC.

**(E)-2-(2-(5-Brom-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinyl)-1-(3-brompropyl)quinolin-1-ium
Bromid (BrBr3)**

Unter Argonatmosphäre wurden in einem Bördelglas 110 mg (1.00 eq, 200 μmol) **HOBr3**, 157 mg (3.00 eq, 600 μmol) Triphenylphosphin und 219 mg (3.30 eq, 660 μmol) Tetrabrommethan in 2.00 mL Dichlormethan gelöst und 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 2 mL Methanol aufgenommen. Die Suspension wurde 10 min im Ultraschallbad behandelt, abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Anschließend wurden 2 g Natriumbromid zugegeben und das Gemisch zwischen 150 mL Dichlormethan und 50 mL Wasser verteilt. Nach Abtrennen der organischen Phase wurde die wässrige Phase drei Mal mit je 100 mL Dichlormethan nachextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden unter vermindertem Druck bei 40 °C eingeeengt. Der Rückstand wurde mit 2 mL Methanol versetzt und erneut 10 min im Ultraschallbad behandelt. Das Reinprodukt wurde abschließend durch Filtration und dreimaligem Waschen mit jeweils 5 mL Diethylether isoliert. Nach Trocknen im Hochvakuum konnten 73.0 mg (129 μmol) des Reinproduktes erhalten werden (65 %).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ = 8.86 (d, J = 9.1 Hz, 1 H), 8.69 (d, J = 6.9 Hz, 1 H), 8.66 (s, 1 H), 8.45 (d, J = 9.2 Hz, 1 H), 8.42 (s, 1 H), 8.27 (dd, J = 8.2, 1.6 Hz, 1 H), 8.16 - 8.07 (m, 1 H), 7.87 (t, J = 7.5 Hz, 1 H), 7.62 (d, J = 8.7 Hz, 1 H), 7.53 - 7.40 (m, 2 H), 5.15 - 5.04 (m, 1 H), 3.95 (s, 3 H), 3.91 (t, J = 6.2 Hz, 2 H), 2.50 (unter DMSO Signal, 2 H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO) δ = 30.8, 31.0, 33.8, 48.7, 111.2, 112.8, 113.5, 115.1, 118.3, 120.2, 122.4, 126.0, 127.1, 127.6, 128.2, 130.2, 134.5, 136.7, 137.7, 138.3, 142.1, 142.3, 156.1.

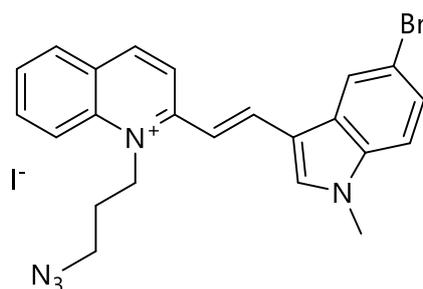
MS (FAB): m/z (%) = 483.0 (53), 484.0 (18), 485.0 (100), 486.0 (30), 487.0 (52), 488.0 (14), 489.0 (3).

HR-MS (FAB): berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_2^{79}\text{Br}_2^+$ = 483.0071, gefunden = 483.0074; berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_2^{79}\text{Br}^{81}\text{Br}^+$ = 485.0051, gefunden = 485.0053.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3007 (w), 1590 (s), 1309 (s), 1231 (m).

Weitere Experimente: COSY, *multiplicity-edited* HSQC.

(*E*)-1-(3-Azidopropyl)-2-(2-(5-bromo-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-ium
Iodid (N₃Br3)



C₂₃H₂₁BrIN₅
574.2645 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurden 33.9 mg (1.00 eq, 60.0 μmol) BrBr3, 39.0 mg (10.0 eq, 600 μmol) Natriumazid und 29.9 mg (3.33 eq, 200 μmol) Natriumiodid in 1.00 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Die Reaktionsmischung wurde 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 200 mL Diethylether / *n*-Hexan *v* : *v* = 3 : 1 verdünnt und die überstehende Lösung abdekantiert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen und mit 2 g Natriumiodid versetzt. Die Mischung wurde zwischen 50 mL destilliertem Wasser und 150 mL Dichlormethan verteilt und die wässrige Phase drei Mal mit je 100 mL Dichlormethan nachextrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Extrakte wurde unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt und der Rückstand in 2 mL Methanol aufgenommen und 10 min im Ultraschallbad behandelt. Das Produkt wurde abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum konnten 19.7 mg (34.3 μmol) des Reinstoffes isoliert werden (57 %).

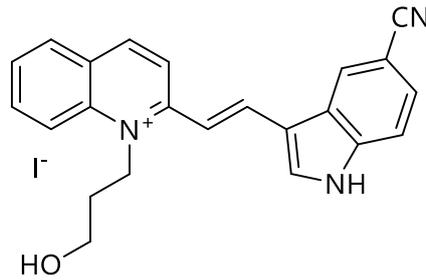
¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ = 8.86 (d, *J* = 9.1 Hz, 1 H), 8.68 (d, *J* = 15.4 Hz, 1 H), 8.66 (d, *J* = 9.1 Hz, 1 H), 8.45 (d, *J* = 9.1 Hz, 1 H), 8.43 (s, 1 H), 8.42 (s, 1 H), 8.27 (d, *J* = 7.3 Hz, 1 H), 8.15 - 8.08 (m, 1 H), 7.86 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 7.62 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H), 7.50 (dd, *J* = 8.9, 1.8 Hz, 1 H), 7.45 (d, *J* = 15.4 Hz, 1 H), 5.04 (t, *J* = 8.0 Hz, 2 H), 3.95 (s, 3 H), 3.79 (t, *J* = 6.4 Hz, 2 H), 2.19 (p, *J* = 6.8 Hz, 2 H).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO): δ = 27.4, 33.8, 47.4, 48.0, 111.3, 112.9, 113.5, 115.1, 118.4, 120.1, 122.4, 125.9, 127.1, 127.6, 128.1, 130.2, 134.5, 136.8, 137.8, 138.3, 142.0, 142.3, 156.0.

MS (FAB): *m/z* (%) = 446.1 (36), 449.1 (10).

HR-MS (FAB): berechnet für C₂₃H₂₁N₅⁷⁹Br¹⁺ = 446.0975, gefunden = 446.0973.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3007 (w), 2091 (m), 1592 (s), 1311 (s), 1230 (m).

(E)-2-(2-(5-Cyano-1H-indol-3-yl)vinyl)-1-(3-hydroxypropyl)chinolin-1-ium Iodid (HOCN)

$C_{23}H_{20}IN_3O$
481.3375 g/mol

In einem Bördelglas wurden 247 mg (1.00 eq, 750 μ mol) 1-(3-Hydroxypropyl)-4-methylchinolin-1-ium Iodid^[6, 9-10] und 255 mg (2.00 eq, 1.50 mmol) CN in 7.5 mL Ethanol (99.6 %) gelöst und 163 μ L (141 mg, 2.20 eq, 1.65 mmol) Piperidin zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 19 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit 10 mL Diethylether verdünnt und der Niederschlag abfiltriert. Der Niederschlag wurde drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 320 mg (665 μ mol) des Reinproduktes erhalten (89 %).

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ = 12.68 (s, 1 H), 8.93 (d, J = 9.1 Hz, 1 H), 8.77 (s, 1 H), 8.70 (d, J = 15.7 Hz, 1 H), 8.66 (d, J = 9.3 Hz, 1 H), 8.52 (d, J = 9.1 Hz, 1 H), 8.51 (s, 1 H), 8.34 - 8.25 (m, 1 H), 8.18 - 8.08 (m, 1 H), 7.93 - 7.84 (m, 1 H), 7.72 (d, J = 8.4 Hz, 1 H), 7.72 (d, J = 15.5 Hz, 1 H), 7.65 (dd, J = 8.5, 1.5 Hz, 1 H), 5.19 (t, J = 4.8 Hz, 1 H), 5.09 (t, J = 7.9 Hz, 2 H), 3.72 (q, J = 5.1 Hz, 2 H), 2.16 (p, J = 6.4, 6.0 Hz, 2 H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO): δ = 31.4, 47.8, 57.5, 103.8, 112.9, 114.1, 114.6, 118.6, 120.2, 120.2, 125.4, 125.5, 126.0, 127.3, 128.3, 130.2, 134.5, 135.0, 138.4, 139.2, 141.4, 142.6, 156.0.

MS (FAB): m/z (%) = 354.2 (100), 355.2 (28).

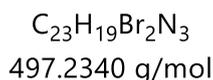
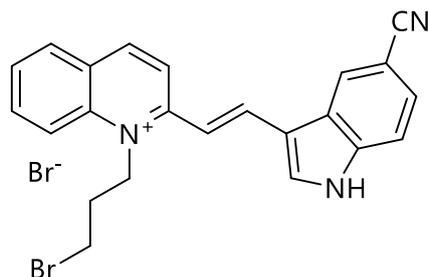
HR-MS (FAB): berechnet für $C_{23}H_{20}O_1N_3^+$ = 354.1601, gefunden = 354.1599.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3104 (w), 2224 (m), 1598 (s), 1231 (m).

EA berechnet für $C_{23}H_{20}O_1N_3I_1$: C, 57.39; H, 4.19; N, 8.73. Gefunden: C, 57.50; H, 4.10; N, 8.72.

Weitere Experimente: COSY, multiplicity-edited HSQC.

(E)-1-(3-Bromopropyl)-2-(2-(5-cyano-1H-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-ium Bromid (BrCN)



Unter Argonatmosphäre wurden in einem Bördelglas 96.3 mg (1.00 eq, 200 μ mol) HOCN, 157 mg (3.00 eq, 600 μ mol) Triphenylphosphin und 219 mg (3.30 eq, 660 μ mol) Tetrabrommethan in 2.00 mL Dichlormethan gelöst und 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 2 mL Methanol aufgenommen. Die Suspension wurde 10 min im Ultraschallbad behandelt, abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Anschließend wurden 2 g Natriumbromid zugegeben und das Gemisch zwischen 150 mL Dichlormethan und 50 mL Wasser verteilt. Nach Abtrennen der organischen Phase wurde die wässrige Phase drei Mal mit je 100 mL Dichlormethan nachextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden unter vermindertem Druck bei 40 °C eingeeengt. Der Rückstand wurde mit 2 mL Methanol versetzt und erneut 10 min im Ultraschallbad behandelt. Das Reinprodukt wurde abschließend durch Filtration und dreimaligem Waschen mit jeweils 5 mL Diethylether isoliert. Nach Trocknen im Hochvakuum konnten 56.2 mg (113 μ mol) des Reinproduktes erhalten werden (57 %).

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ = 12.73 (s, 1 H), 8.95 (d, J = 9.1 Hz, 1 H), 8.80 – 8.58 (m, 4 H), 8.51 (d, J = 9.0 Hz, 1 H), 8.35 – 8.26 (m, 1 H), 8.20 – 8.09 (m, 1 H), 7.89 (t, J = 7.5 Hz, 1 H), 7.73 (d, J = 8.5 Hz, 1 H), 7.68 – 7.56 (m, 2 H), 5.17 (t, J = 8.1 Hz, 2 H), 3.92 (t, J = 6.2 Hz, 2 H), 2.50 (unter DMSO Signal, 2 H).

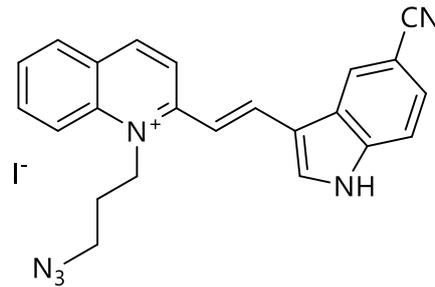
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ = 30.9, 31.2, 48.9, 103.7, 112.7, 114.1, 114.4, 118.4, 120.1, 120.4, 125.3, 125.5, 126.0, 127.4, 128.4, 130.3, 134.7, 135.1, 138.3, 139.0, 141.9, 142.9, 156.2.

MS (FAB): m/z (%) = 418.1 (100), 419.1 (28).

HR-MS (FAB): berechnet für $C_{23}H_{19}N_3^{79}Br_1^+$ = 416.0762, gefunden = 416.0761.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3013 (m), 2220 (w), 1589 (s), 1312 (w), 1252 (m).

Weitere Experimente: COSY, multiplicity-edited HSQC.

(E)-1-(3-Azidopropyl)-2-(2-(5-cyano-1H-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-ium Iodid (N₃CN)

506.3515 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurden 29.8 mg (1.00 eq, 60.0 μmol) BrCN, 39.0 mg (10.0 eq, 600 μmol) Natriumazid und 29.9 mg (3.33 eq, 200 μmol) Natriumiodid in 1.00 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Die Reaktionsmischung wurde 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 200 mL Diethylether / *n*-Hexan *v* : *v* = 3 : 1 verdünnt und die überstehende Lösung abdekantiert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen und mit 2 g Natriumiodid versetzt. Die Mischung wurde zwischen 50 mL destilliertem Wasser und 150 mL Dichlormethan verteilt und die wässrige Phase drei Mal mit je 100 mL Dichlormethan nachextrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Extrakte wurde unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt und der Rückstand in 2 mL Methanol aufgenommen und 10 min im Ultraschallbad behandelt. Das Produkt wurde abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum konnten 15.4 mg (30.4 μmol) des Reinstoffes isoliert werden (51 %).

¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ = 12.71 (s, 1 H), 8.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H), 8.80 - 8.76 (m, 1 H), 8.71 (d, *J* = 15.5 Hz, 1 H), 8.67 (d, *J* = 9.1 Hz, 1 H), 8.57 (s, 1 H), 8.51 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H), 8.34 - 8.28 (m, 1 H), 8.20 - 8.11 (m, 1 H), 7.90 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 7.74 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 7.67 (dd, *J* = 8.5, 1.5 Hz, 1 H), 7.63 (d, *J* = 15.6 Hz, 1 H), 5.13 (t, *J* = 8.1 Hz, 2 H), 3.76 (t, *J* = 6.3 Hz, 2 H), 2.21 (p, *J* = 6.5 Hz, 2 H).

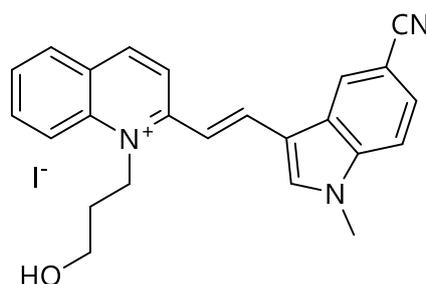
¹³C NMR (150 MHz, DMSO): δ = 27.5, 47.7, 48.0, 103.8, 112.9, 114.2, 114.5, 118.6, 120.1, 120.3, 125.3, 125.4, 126.0, 127.4, 128.4, 130.3, 134.7, 135.2, 138.3, 139.1, 141.7, 142.9, 156.1.

MS (FAB): *m/z* (%) = 379.2 (100), 380.2 (31).

HR-MS (FAB): berechnet für C₂₃H₁₉N₆⁺ = 379.1666, gefunden = 379.1666.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2997 (w), 2217 (w), 2104 (m), 1592 (s), 1229 (m).

(E)-2-(2-(5-Cyano-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinyl)-1-(3-hydroxypropyl)chinolin-1-ium Iodid (**HOCN3**)



$C_{24}H_{22}IN_3O$
495.3645 g/mol

In einem Bördelglas wurden 247 mg (1.00 eq, 750 μ mol) 1-(3-Hydroxypropyl)-4-methylchinolin-1-ium Iodid^[6, 9-10] und 276 mg (2.00 eq, 1.50 mmol) **CN3** in 7.5 mL Ethanol (99.6 %) gelöst und 163 μ L (141 mg, 2.20 eq, 1.65 mmol) Piperidin zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 19 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit 10 mL Diethylether verdünnt und der Niederschlag abfiltriert. Der Niederschlag wurde drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 332 mg (669 μ mol) des Reinproduktes erhalten (89 %).

1H NMR (400 MHz, DMSO): δ = 8.93 (d, J = 9.0 Hz, 1 H), 8.78 (s, 1 H), 8.72-8.62 (m, 2 H), 8.52 (d, J = 9.0 Hz, 1 H), 8.49 (s, 1 H), 8.34 - 8.25 (m, 1 H), 8.18-8.09 (m, 1 H), 7.94 - 7.86 (m, 1 H), 7.84 (d, J = 8.5 Hz, 1 H), 7.78-7.66 (m, 2 H), 5.19 (t, J = 4.8 Hz, 1 H), 5.08 (t, J = 7.6 Hz, 2 H), 4.00 (s, 3 H), 3.72 (q, J = 5.3 Hz, 2 H), 2.16 (p, J = 6.0 Hz, 2 H).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO): δ = 31.4, 33.8, 47.8, 57.5, 104.0, 112.7, 113.0, 113.6, 118.6, 120.0, 120.2, 125.5, 125.7, 126.0, 127.3, 128.3, 130.2, 134.5, 137.9, 138.4, 139.4, 140.8, 142.7, 155.9.

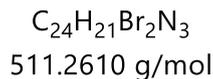
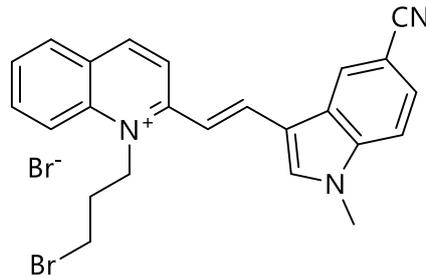
MS (FAB): m/z (%) = 368.2 (100), 369.2 (31).

HR-MS (FAB): berechnet für $C_{24}H_{22}O_1N_3^+$ = 368.1757, gefunden = 368.1756.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3313 (w), 2221 (m), 1586 (s), 1225 (m).

EA berechnet für $C_{24}H_{22}O_1N_3I_1$: C, 58.19; H, 4.48; N, 8.48. Gefunden: C, 58.04; H, 4.39; N, 8.48.

Weitere Experimente: COSY, multiplicity-edited HSQC.

**(E)-1-(3-Brompropyl)-2-(2-(5-cyano-1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)quinolin-1-ium
Bromid (BrCN3)**

Unter Argonatmosphäre wurden in einem Bördelglas 99.1 mg (1.00 eq, 200 μmol) HOCN3, 157 mg (3.00 eq, 600 μmol) Triphenylphosphin und 219 mg (3.30 eq, 660 μmol) Tetrabrommethan in 2.00 mL Dichlormethan gelöst und 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 2 mL Methanol aufgenommen. Die Suspension wurde 10 min im Ultraschallbad behandelt, abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Anschließend wurden 2 g Natriumbromid zugegeben und das Gemisch zwischen 150 mL Dichlormethan und 50 mL Wasser verteilt. Nach Abtrennen der organischen Phase wurde die wässrige Phase drei Mal mit je 100 mL Dichlormethan nachextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden unter vermindertem Druck bei 40 °C eingengt. Der Rückstand wurde mit 2 mL Methanol versetzt und erneut 10 min im Ultraschallbad behandelt. Das Reinprodukt wurde abschließend durch Filtration und dreimaligem Waschen mit jeweils 5 mL Diethylether isoliert. Nach Trocknen im Hochvakuum konnten 61.3 g (120 μmol) des Reinproduktes erhalten werden (60 %).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ = 8.95 (d, J = 9.0 Hz, 1 H), 8.78 (d, J = 1.5 Hz, 1 H), 8.69 (dd, J = 12.4, 3.3 Hz, 2 H), 8.59 – 8.46 (m, 2 H), 8.35 – 8.28 (m, 1 H), 8.20 – 8.11 (m, 1 H), 8.06 – 7.95 (m, 1 H), 7.95 – 7.81 (m, 3 H), 7.78 – 7.71 (m, 1 H), 7.59 (d, J = 15.5 Hz, 1 H), 5.17 (d, J = 16.4 Hz, 2 H), 4.01 (s, 3 H), 3.91 (t, J = 6.3 Hz, 2 H), 2.50 (unter DMSO Signal, 2 H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO) δ = 30.9, 31.0, 33.8, 48.9, 104.0, 112.8, 113.5, 118.4, 120.0, 120.4, 125.5, 125.7, 126.0, 127.4, 128.4, 130.3, 134.7, 138.4, 139.5, 141.2, 143.0, 156.1.

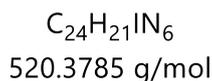
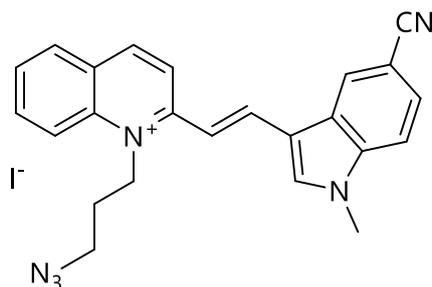
MS (FAB): m/z (%) = 432.1 (100), 433.1 (30).

HR-MS (FAB): berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_3^{79}\text{Br}^+$ = 430.0919, gefunden = 430.0920.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2219 (m), 1585 (s), 1350 (s), 1257 (s).

Weitere Experimente: COSY, multiplicity-edited HSQC.

(*E*)-1-(3-Azidopropyl)-2-(2-(5-cyano-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinyl)chinolin-1-ium
Iodid (N₃CN3)



Unter Argonatmosphäre wurden 30.7 mg (1.00 eq, 60.0 μmol) BrCN3, 39.0 mg (10.0 eq, 600 μmol) Natriumazid und 29.9 mg (3.33 eq, 200 μmol) Natriumiodid in 1.00 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Die Reaktionsmischung wurde 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 200 mL Diethylether / *n*-Hexan v : v = 3 : 1 verdünnt und die überstehende Lösung abdekantiert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen und mit 2 g Natriumiodid versetzt. Die Mischung wurde zwischen 50 mL destilliertem Wasser und 150 mL Dichlormethan verteilt und die wässrige Phase drei Mal mit je 100 mL Dichlormethan nachextrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Extrakte wurde unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt und der Rückstand in 2 mL Methanol aufgenommen und 10 min im Ultraschallbad behandelt. Das Produkt wurde abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum konnten 13.3 mg (25.5 μmol) des Reinstoffes isoliert werden (43 %).

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ = 8.68 (d, *J* = 15.3 Hz, 1 H), 8.66 – 8.62 (m, 1 H), 8.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H), 8.79 (s, 1 H), 8.67 (d, *J* = 9.5 Hz, 2 H), 8.53 (s, 1 H), 8.51 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H), 8.34 - 8.23 (m, 1 H), 8.20 - 8.12 (m, 1 H), 7.90 (t, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 7.86 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H), 7.79 - 7.73 (m, 1 H), 7.60 (d, *J* = 15.6 Hz, 1 H), 5.12 (t, *J* = 7.7 Hz, 2 H), 4.01 (s, 3 H), 3.76 (t, *J* = 6.4 Hz, 2 H), 2.21 (p, *J* = 6.8 Hz, 2 H).

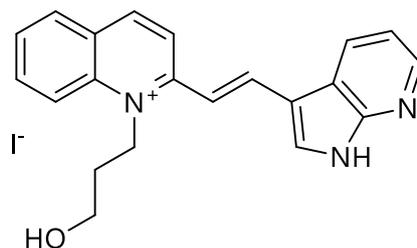
¹³C NMR (100 MHz, DMSO): δ = 27.5, 33.8, 47.6, 48.0, 104.1, 112.8, 112.9, 113.6, 118.5, 112.0, 120.3, 125.5, 125.6, 126.0, 127.4, 128.4, 130.3, 134.7, 138.3, 138.4, 139.5, 141.1, 142.9, 156.0.

MS (FAB): *m/z* (%) = 393.2 (100), 394.2 (32).

HR-MS (FAB): berechnet für C₂₄H₂₁N₆⁺ = 393.1822, gefunden = 393.1820.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3009 (w), 2224 (w), 2094 (m), 1592 (s), 1229 (m).

Weitere Experimente: DEPT90, DEPT135, HSQC.

(E)-2-(2-(1*H*-Pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-3-yl)vinyl)-1-(3-hydroxypropyl)chinolin-1-ium Iodid (HOA)

$C_{21}H_{20}IN_3O$
457.3155 g/mol

In einem Bördelglas wurden 318 mg (1.00 eq, 966 μ mol) 1-(3-Hydroxypropyl)-4-methylchinolin-1-ium Iodid^[6, 9-10] und 282 mg (2.00 eq, 1.93 mmol) **A** in 9.7 mL Ethanol (99.6 %) gelöst und 212 μ L (181 mg, 2.20 eq, 2.13 mmol) Piperidin zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 19 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Niederschlag abfiltriert. Der Niederschlag wurde aus Methanol umkristallisiert und drei Mal mit je 10 mL Methanol / Diethylether (v : v = 1 / 1) gewaschen. Nach dreimaligem Waschen mit je 10 mL Diethylether und trocknen im Hochvakuum wurden 319 mg (694 μ mol) des Reinproduktes erhalten (72 %).

¹H NMR (500 MHz, D₂O/D₂SO₄=10:1) δ = 7.89 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 7.56 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H), 7.40 (d, *J* = 6.0 Hz, 1 H), 7.27 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H), 7.17 (s, 1 H), 7.15 – 7.04 (m, 2 H), 7.04 – 6.97 (m, 1 H), 6.89 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 6.74 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 6.67 (dd, *J* = 8.0, 5.8 Hz, 1 H), 6.48 (d, *J* = 15.8 Hz, 1 H), 3.95 (t, *J* = 7.9 Hz, 2 H), 2.90 (t, *J* = 5.5 Hz, 2 H), 1.33 – 1.16 (m, 2 H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ = 31.3, 47.9, 57.4, 111.9, 113.0, 117.9, 118.6, 120.0, 128.3, 129.1, 130.2, 134.5, 134.8, 138.4, 142.6, 142.9, 144.6, 149.9, 156.0.

MS (FAB): *m/z* (%) = 330.2 (100), 331.2 (28).

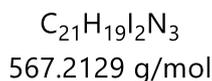
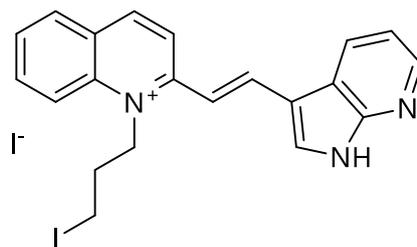
HR-MS (FAB): berechnet für C₂₁H₂₀O₁N₃⁺ = 330.1601, gefunden = 330.1599.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3318 (m), 2864 (w), 1566 (s), 1215 (m).

EA berechnet für C₂₁H₂₀O₁N₃I₁: C, 55.15; H, 4.41; N, 9.19. gefunden: C, 50.28; H, 4.41; N, 9.53.

Weitere Experimente: COSY.

(E)-2-(2-(1H-Pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-yl)vinyl)-1-(3-iodopropyl)chinolin-1-ium iodid (**IA**)



Unter Argonatmosphäre wurden in einem Bördelglas 229 mg (1.00 eq, 500 μ mol) HOA, 144 mg (1.10 eq, 550 μ mol) Triphenylphosphin, 136 mg (4.00 eq, 2 mmol) Imidazol und 140 mg (1.10 eq, 550 μ mol) Iod in 5.00 mL Dichlormethan gelöst und 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 5 mL Methanol zugegeben und das Gemisch 30 min im Ultraschallbad behandelt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, einmal mit 5 mL Methanol und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Nach Trocknen im Hochvakuum konnten 238 mg des Rohproduktes erhalten werden.

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ = 12.89 – 12.76 (m, 1 H), 8.91 (dd, J = 9.2, 5.6 Hz, 1 H), 8.75 – 8.55 (m, 4 H), 8.55 – 8.45 (m, 2 H), 8.45 – 8.35 (m, 1 H), 8.35 – 8.24 (m, 1 H), 8.19 – 8.07 (m, 1 H), 7.95 – 7.82 (m, 1 H), 7.42 – 7.27 (m, 1 H), 5.13 – 5.00 (m, 2 H), 3.74 (t, J = 5.3, 1 H), 3.62 (t, J = 6.7 Hz, 1 H), 2.50 (unter DMSO signal, 1 H), 2.23 – 2.05 (m, 1 H).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ = 31.4, 50.8, 57.4, 111.9, 111.9, 113.0, 117.3, 118.6, 120.3, 127.4, 128.3, 129.1, 134.2, 134.5, 134.6, 138.4, 142.6, 142.8, 144.6, 149.8, 156.2.

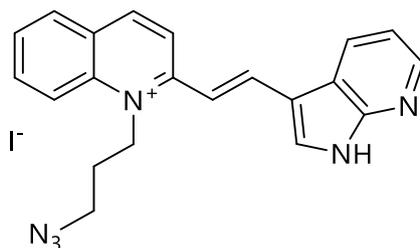
MS (FAB): m/z (%) = 440.1 (100), 441.1 (30).

HR-MS (FAB): berechnet für $C_{21}H_{19}N_3^{127}I_1^+$ = 440.0624, gefunden = 440.0626.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3320 (w), 2717 (w), 1566 (s), 1316 (m), 1273 (m).

Weitere Experimente: COSY, multiplicity-edited HSQC.

Die Umsetzung der Alkoholfunktion zum Iodid nach dieser Methode resultiert in einer schwierigen Aufreinigung des Produktes. An dieser Stelle wird auf die Synthese der Azide über die Bromid-Stufe verwiesen, welche sich im Aspekt der Reinheit und Folgereaktion als vorteilhafter erweist.

(E)-2-(2-(1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-yl)vinyl)-1-(3-azidopropyl)chinolin-1-ium Iodid (N₃A)

C₂₁H₁₉N₆
482.3295 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurden 34.0 mg (1.00 eq, 60.0 μmol) IA, 39.0 mg (10.0 eq, 600 μmol) Natriumazid und 29.9 mg (3.33 eq, 200 μmol) Natriumiodid in 1.00 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Die Reaktionsmischung wurde 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 200 mL Diethylether / *n*-Hexan v : v = 3 : 1 verdünnt und die überstehende Lösung abdekantiert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen und mit 2 g Natriumiodid versetzt. Die Mischung wurde zwischen 50 mL destilliertem Wasser und 150 mL Dichlormethan verteilt und die wässrige Phase drei Mal mit je 100 mL Dichlormethan nachextrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Extrakte wurde unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt und der Rückstand in 2 mL Methanol aufgenommen und 10 min im Ultraschallbad behandelt. Das Produkt wurde abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum konnten 12.0 mg (21.4 μmol) des Reinstoffes isoliert werden (36 % über zwei Stufen).

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ = 12.82 (s, 1 H), 8.91 (d, *J* = 9.1 Hz, 1 H), 8.75-8.68 (m, 1 H), 8.66 – 8.57 (m, 2 H), 8.52 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H), 8.45 - 8.40 (m, 1 H), 8.39 (s, 1 H), 8.33 - 8.25 (m, 1 H), 8.16 - 8.08 (m, 1 H), 7.88 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 7.65 (d, *J* = 15.6 Hz, 1 H), 7.33 (dd, *J* = 7.9, 4.7 Hz, 1 H), 5.07 (t, *J* = 8.1 Hz, 2 H), 3.74 (q, *J* = 5.1 Hz, 2 H), 2.24 – 2.12 (m, 2 H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ = 31.3, 47.9, 57.4, 111.9, 113.0, 117.4, 117.9, 118.7, 120.0, 127.2, 128.3, 129.1, 130.2, 134.5, 135.0, 138.4, 142.6, 142.9, 144.7, 150.0, 156.1.

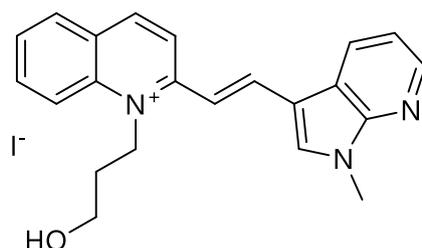
MS (FAB): *m/z* (%) = 355.1 (72), 356.1 (28).

HR-MS (FAB): berechnet für C₂₁H₁₉N₆⁺ = 355.1671, gefunden = 355.1670.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3321 (w), 2099 (m), 1568 (s), 1317 (m), 1275 (m).

Weitere Experimente: COSY, multiplicity-edited HSQC.

(E)-1-(3-Hydroxypropyl)-2-(2-(1-methyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-yl)vinyl)chinolin-1-ium Iodid



$C_{22}H_{22}IN_3O$
471.3425 g/mol

In einem Bördelglas wurden 329 mg (1.00 eq, 1.00 mmol) 1-(3-Hydroxypropyl)-4-methylchinolin-1-ium Iodid^[6, 9-10] und 320 mg (2.00 eq, 2.00 mmol) **A3** in 10.0 mL Ethanol (99.6 %) gelöst und 220 μ L (187 mg, 2.20 eq, 2.20 mmol) Piperidin zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit 10 mL Diethylether verdünnt und der Niederschlag abfiltriert. Der Niederschlag wurde drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 305 mg (648 μ mol) des Reinproduktes erhalten (65 %).

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO) δ = 8.88 (d, J = 9.0 Hz, 1 H), 8.72 (d, J = 7.9 Hz, 1 H), 8.64 - 8.59 (dd, 2 H), 8.51 (d, J = 8.9 Hz, 1 H), 8.45 (d, J = 4.5 Hz, 1 H), 8.41 (s, 1 H), 8.27 (d, J = 8.1 Hz, 1 H), 8.11 (dd, J = 8.8, 7.1 Hz, 1 H), 7.89 - 7.84 (m, 1 H), 7.61 (d, J = 15.3 Hz, 1 H), 7.38 - 7.34 (m, 1 H), 5.32 (t, J = 4.4 Hz, 1 H), 5.05 (d, J = 8.0 Hz, 2 H), 3.95 (s, 3 H), 3.74 (q, J = 5.1 Hz, 2 H), 2.21 - 2.13 (m, 2 H).

$^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, DMSO) δ = 31.3, 31.7, 47.8, 57.4, 111.7, 111.8, 117.6, 118.1, 118.6, 120.0, 127.2, 128.2, 129.4, 130.1, 134.5, 138.4, 142.4, 142.5, 144.4, 148.8, 155.9.

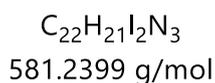
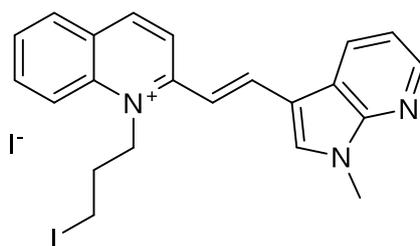
MS (FAB): m/z (%) = 344.2 (100), 345.2 (28).

HR-MS (FAB): berechnet für $C_{22}H_{22}O_1N_3^+$ = 344.1757, gefunden = 344.1759.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3337 (w), 1562 (s), 1315 (m), 1234 (m).

EA berechnet für $C_{22}H_{22}O_1N_3I_1$: C, 56.06; H, 4.70; N, 8.92. Gefunden: C, 54.42; H, 4.56; N, 8.57.

Weitere Experimente: COSY, multiplicity-edited HSQC.

(E)-1-(3-Iodpropyl)-2-(2-(1-methyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-yl)vinyl)chinolin-1-ium Iodid (IA3)

Unter Argonatmosphäre wurden in einem Bördelglas 118 mg (1.00 eq, 250 μmol) IA3, 144 mg (2.20 eq, 550 μmol) Triphenylphosphin, 68.1 mg (4.00 eq, 1.00 mmol) Imidazol und 140 mg (1.10 eq, 550 μmol) Iod in 5.00 mL Dichlormethan gelöst und 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 5 mL Methanol zugegeben und das Gemisch 30 min im Ultraschallbad behandelt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, einmal mit 5 mL Methanol und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Nach Trocknen im Hochvakuum konnten 109 mg des Rohproduktes erhalten werden.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ = 2.50, 3.97, 4.04, 5.16, 7.40, 7.52, 7.88, 8.14, 8.30, 8.47, 8.49, 8.49, 8.63, 8.64, 8.64, 8.91.

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO) δ = 30.6, 31.5, 42.2, 47.6, 117.7, 111.5, 128.0, 134.3, 129.9, 143.9, 118.1, 137.2, 142.2, 128.9, 119.9, 142.5.

MS (FAB): m/z (%) = 454.1 (72), 455.1 (21).

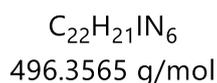
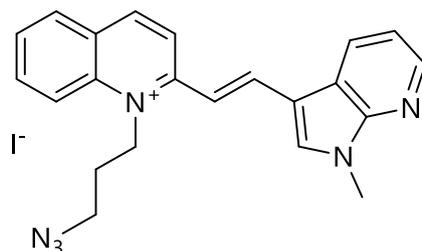
HR-MS (FAB): berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_3^{127}\text{I}_1^+$ = 454.0780, gefunden = 454.0783.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3041 (w), 1588 (s), 1306 (s), 1280 (w).

Weitere Experimente: COSY, multiplicity-edited HSQC.

Die Umsetzung der Alkoholfunktion zum Iodid nach dieser Methode resultiert in einer schwierigen Aufreinigung des Produktes. An dieser Stelle wird auf die Synthese der Azide über die Bromid-Stufe verwiesen, welche sich im Aspekt der Reinheit und Folgereaktion als vorteilhafter erweist.

(*E*)-1-(3-Azidopropyl)-2-(2-(1-methyl-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-3-yl)vinyl)chinolin-1-ium Iodid (N₃**A3**)



Unter Argonatmosphäre wurden 34.9 mg (1.00 eq, 60.0 μmol) **IA3**, 39.0 mg (10.0 eq, 600 μmol) Natriumazid und 29.9 mg (3.33 eq, 200 μmol) Natriumiodid in 1.00 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Die Reaktionsmischung wurde 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 200 mL Diethylether / *n*-Hexan *v* : *v* = 3 : 1 verdünnt und die überstehende Lösung abdekantiert. Der Niederschlag wurde abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen und mit 2 g Natriumiodid versetzt. Die Mischung wurde zwischen 50 mL destilliertem Wasser und 150 mL Dichlormethan verteilt und die wässrige Phase drei Mal mit je 100 mL Dichlormethan nachextrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Extrakte wurde unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt und der Rückstand in 2 mL Methanol aufgenommen und 10 min im Ultraschallbad behandelt. Das Produkt wurde abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum konnten 10.2 mg (20.6 μmol) des Reinstoffes isoliert werden (34 % über zwei Stufen).

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ = 8.91 (d, *J* = 9.3 Hz, 1 H), 8.73 – 8.58 (m, 3 H), 8.53 – 8.43 (m, 3 H), 8.30 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 8.14 (t, *J* = 7.8 Hz, 1 H), 7.89 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 7.52 (d, *J* = 15.4 Hz, 1 H), 7.39 (dd, *J* = 7.3, 4.3 Hz, 1 H), 5.08 (t, *J* = 8.0 Hz, 2 H), 3.97 (s, 3 H), 3.78 (t, *J* = 6.2 Hz, 2 H), 2.27 – 2.17 (m, 2 H).

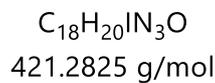
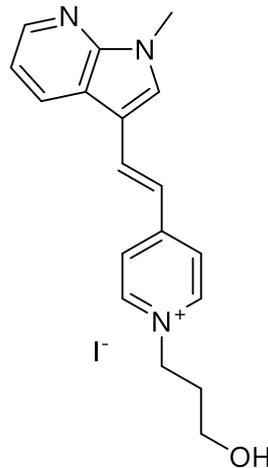
¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ = 27.5, 31.7, 47.6, 48.0, 111.6, 111.9, 117.7, 118.0, 118.5, 120.2, 127.2, 128.3, 129.0, 130.2, 134.6, 137.8, 138.3, 142.5, 142.7, 144.5, 148.8, 156.0.

MS (FAB): *m/z* (%) = 369.1 (100), 370.1 (30).

HR-MS (FAB): berechnet für C₂₂H₂₁N₆⁺ = 369.1828, gefunden = 369.1827.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2099 (s), 1563 (s), 1349 (m), 1282 (m).

Weitere Experimente: COSY, multiplicity-edited HSQC.

(E)-1-(3-Hydroxypropyl)-4-(2-(1-methyl-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-yl)vinyl)pyridin-1-ium Iodid (HOPyA3)

Unter Argonatmosphäre wurden 217 mg (779 μmol , 1.00 eq) 1-(3-Hydroxypropyl)-4-methylpyridin-1-ium Iodid^[7, 9-10, 61] und 250 mg (1.56 mmol, 2.00 eq) **A3** in 8 mL Ethanol vorgelegt und 169 μL (146 mg, 1.71 mmol, 2.20 eq) Piperidin zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 16 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde diese mit 5 mL Diethylether verdünnt und der Niederschlag abfiltriert. Der Niederschlag wurde aus Methanol und Diethylether umkristallisiert, abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum konnten 105 mg (249 μmol) eines gelben Feststoffs isoliert werden (32%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 8.81 (d, J = 6.8 Hz, 2 H), 8.63 (dd, J = 7.9, 1.0 Hz, 1 H), 8.42 (d, J = 3.6 Hz, 1 H), 8.24 – 8.10 (m, 4 H), 7.40 – 7.30 (m, 2 H), 4.76 (t, J = 4.8 Hz, 1 H), 4.51 (t, J = 7.0 Hz, 2 H), 3.90 (s, 3 H), 3.46 (dd, J = 10.8, 5.6 Hz, 2 H), 2.06 (p, 2 H).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO): δ = 154.1, 148.6, 144.0, 143.8, 135.5, 135.2, 129.1, 122.1, 118.0, 117.5, 117.4, 111.0, 57.2, 57.0, 33.1, 31.4.

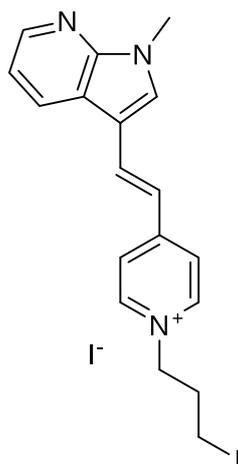
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3316 (w), 2940 (w), 1588 (s), 1531 (m), 1507 (m).

MS (EI) m/z (%): 294.1 (100).

HR-MS (EI) berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}^+$ = 294.1606, gefunden = 294.1606.

EA berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{IIN}_3\text{O}$: C, 51.32; H, 4.79; N, 9.97. Gefunden: C, 50.91; H, 4.74; N, 9.83.

(*E*)-1-(3-Iodpropyl)-4-(2-(1-methyl-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-3-yl)vinyl)pyridin-1-ium
Iodid (**IPyA3**)



$C_{18}H_{19}I_2N_3$
531.1799 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurden 105 mg HOPyA3 (250 μ mol; 1.00 eq) zusammen mit 144 mg (550 μ mol; 2.20 eq) Triphenylphosphin, 68.1 mg Imidazol (1.00 mmol; 4.00 eq) sowie 140 mg I_2 (550 μ mol; 2.20 eq) in 5 mL DCM vorgelegt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur für 27 h gerührt und anschließend unter vermindertem Druck bei 40 °C eingeeengt. Es wurden 2.5 mL Methanol hinzugegeben und die Suspension 30 min im Ultraschallbad behandelt. Danach wurde der Niederschlag abfiltriert und vier Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Nach dem Trocknen im Vakuum wurden 101 mg eines gelben Feststoffs isoliert.

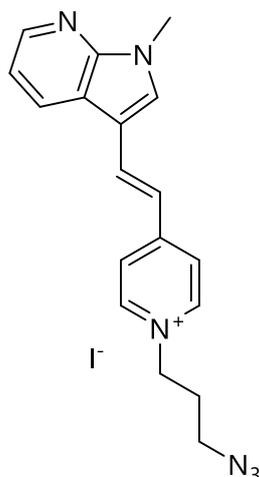
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2917 (vw), 1604 (w), 1589 (w), 1567 (w), 1531(w), 1507 (w).

MS (EI) m/z (%): 404.1 (100).

HR-MS (EI) berechnet für $C_{18}H_{19}I_1N_3^+$ = 404.0623, gefunden = 404.0624.

Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung in der Folgestufe eingesetzt.

(*E*)-1-(3-Azidopropyl)-4-(2-(1-methyl-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-3-yl)vinyl)pyridin-1-ium Iodid (N₃PyA3)



C₁₈H₁₉N₆
446.2965 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurden 53.1 mg (100 µmol, 1.00 eq) IPyA3, 65.0 mg (1.00 mmol, 10.0 eq) Natriumazid und 49.9 mg (333 µmol; 3.33 eq) Natriumiodid in 1.5 mL *N,N*-Dimethylformamid vorgelegt und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Anschließend wurde diese mit 200 mL Diethylether/*n*-Hexan (v : v 3 : 1) verdünnt und die überstehende Lösung nach 20 min vom ausgefallenen Niederschlag abdekantiert. Dieser wurde zwischen 100 mL Dichlormethan und 50 mL dest. H₂O verteilt und die wässrige Phase drei Mal mit je 50 mL DCM rückextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden unter vermindertem Druck bei 40 °C eingeeengt. Der Rückstand wurde aus Methanol und Diethylether umkristallisiert, filtriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Nach dem Trocknen im Vakuum konnten 20.6 mg (46.1 µmol) des gelben Feststoffs isoliert werden (46% über zwei Stufen).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 8.82 (d, *J* = 6.5 Hz, 2 H), 8.63 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 8.42 (d, *J* = 3.8 Hz, 1 H), 8.27 – 8.09 (m, 4 H), 7.42 – 7.29 (m, 2 H), 4.50 (t, *J* = 6.8 Hz, 2 H), 3.90 (s, 3 H), 3.49 (t, *J* = 6.4 Hz, 2 H), 2.18 (p, *J* = 6.9 Hz, 2 H).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO): δ = 29.5, 31.4, 47.6, 56.9, 111.0, 117.4, 117.5, 118.0, 122.2, 129.1, 135.4, 135.6, 143.7, 144.0, 148.6, 154.3.

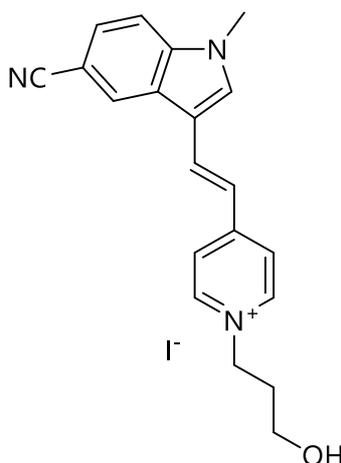
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3483 (w), 3017 (w), 2095 (w), 1608 (m), 1568 (w), 15323 (w), 1508 (m).

MS (EI) *m/z* (%): 319.2 (100).

HR-MS (EI) berechnet für C₁₈H₁₉N₆⁺ = 319.1669, gefunden = 319.1671.

Weitere Experimente: DEPT90, DEPT135, COSY, HSQC.

(*E*)-4-(2-(5-Cyano-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinyl)-1-(3-hydroxypropyl)pyridin-1-ium
Iodid (HOPyCN3)



$C_{20}H_{20}IN_3O$
445.3045 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurden 184 mg (659 μ mol, 1.00 eq) 1-(3-Hydroxypropyl)-4-methylpyridin-1-ium iodid^[7, 9-10, 61] und 243 mg (1.32 mmol, 2.00 eq) CN3 in 8 mL Ethanol vorgelegt und 143 μ L (124 mg, 1.45 mmol, 2.20 eq) Piperidin zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 16 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit 5 mL Diethylether verdünnt und der Niederschlag abfiltriert. Der Niederschlag wurde aus Methanol und Diethylether umkristallisiert, abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum konnten 218 mg (490 μ mol) eines hellbraunen Feststoffs isoliert werden (75%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 8.84 (d, J = 6.6 Hz, 2 H), 8.74 (s, 1 H), 8.24 (d, J = 16.4 Hz, 1 H), 8.19 (d, J = 6.3 Hz, 2 H), 8.14 (s, 1 H), 7.78 (d, J = 8.6 Hz, 1 H), 7.71 – 7.66 (m, 1 H), 7.40 (d, J = 16.6 Hz, 1 H), 4.77 (t, J = 4.8 Hz, 1 H), 4.52 (t, J = 7.0 Hz, 2 H), 3.89 (s, 3 H), 3.47 (q, J = 5.5 Hz, 2 H), 2.07 (p, J = 6.4 Hz, 2 H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ = 33.1, 33.4, 57.1, 57.2, 103.4, 112.4, 113.0, 118.8, 122.3, 125.1, 125.6, 125.7, 134.0, 136.8, 139.4, 143.8, 154.0.

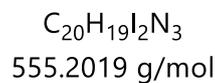
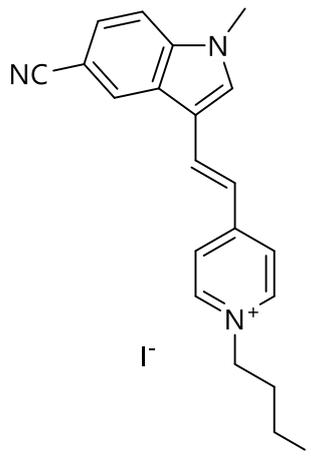
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3317 (w), 2928 (vw), 2222 (w), 1600 (m), 1505 (w).

MS (EI) m/z (%): 318.1 (100).

HR-MS (EI) berechnet für $C_{20}H_{20}N_3O^+$ = 318.1605, gefunden = 318.1606.

EA berechnet für $C_{20}H_{20}I_1N_3O_1$: C, 53.95; H, 4.53; N, 9.44. Gefunden: C, 52.81; H, 4.40; N, 9.19.

Weitere Experimente: COSY, HSQC.

(E)-4-(2-(5-Cyano-1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)-1-(3-iodpropyl)pyridin-1-ium Iodid (IPyCN3)

Unter Argonatmosphäre wurden 111 mg (250 μmol , 1.00 eq) HOPyCN3 zusammen mit 144 mg (550 μmol , 2.20 eq) Triphenylphosphin, 68.1 mg Imidazol (1.00 mmol, 4.00 eq), sowie 140 mg (550 μmol , 2.20 eq) I_2 in 5 mL DCM vorgelegt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur für 22 h gerührt und anschließend unter vermindertem Druck bei 40 °C eingengt. Es wurden 2.5 mL Methanol hinzugegeben und die Suspension 30 min im Ultraschallbad behandelt. Danach wurde der Niederschlag abfiltriert und vier Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum wurden 101 mg eines orange-roten Feststoffs isoliert.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ = 8.87 – 8.81 (m, 2 H), 8.75 (s, 1 H), 8.26 (d, J = 17.0 Hz, 1 H), 8.21 (d, J = 6.8 Hz, 2 H), 8.15 (s, 1 H), 7.83 – 7.76 (m, 1 H), 7.71 (s, 1 H), 7.41 (d, J = 16.6 Hz, 1 H), 4.55 – 4.44 (m, 2 H), 3.94 (s, 3 H), 3.29 – 3.23 (m, 2 H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO) δ = 1.6, 33.4, 33.8, 59.8, 103.4, 112.4, 113.1, 118.7, 120.3, 122.5, 125.7, 126.2, 134.2, 136.9, 138.3, 139.4, 143.8, 154.3.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm $^{-1}$) = 2217 (w), 1594 (m), 1531 (w), 1505 (m).

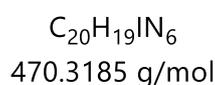
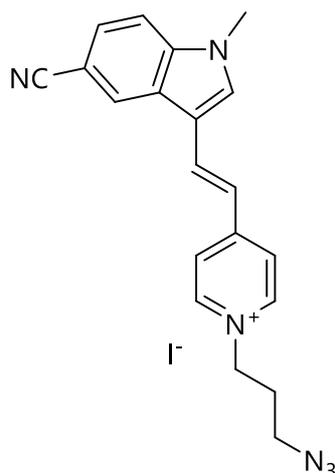
MS (EI) m/z (%): 428.0 (100).

HR-MS (EI) berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{I}_2\text{N}_3^+$ = 428.0624, gefunden = 428.0624.

Weitere Experimente: COSY, HSQC.

Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung in der Folgestufe eingesetzt.

(*E*)-1-(3-Azidopropyl)-4-(2-(5-cyano-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-ium Iodid



Unter Argonatmosphäre wurden 55.5 mg (100 μ mol, 1.00 eq) **IPyCN3**, 65,0 mg (1.00 mmol, 10.0 eq) Natriumazid und 49.9 mg (333 μ mol, 3.33 eq) Natriumiodid in 1.5 mL *N,N*-Dimethylformamid vorgelegt und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur für 16.5 h gerührt. Anschließend wurde diese mit 200 mL Diethylether/*n*-Hexan (*v* : *v* = 3 : 1) verdünnt und die überstehende Lösung nach 20 min vom ausgefallenen Niederschlag abdekantiert. Dieser wurde zwischen 100 mL Dichlormethan und 50 mL dest. Wasser verteilt und die wässrige Phase drei Mal mit je 50 mL Dichlormethan rückextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden unter vermindertem Druck bei 40 °C eingeeengt. Der Rückstand wurde aus Methanol und Diethylether umkristallisiert, filtriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Nach dem Trocknen im Vakuum konnten 20.3 mg (43.2 μ mol) des gelben Feststoffs isoliert werden (43% über zwei Stufen).

1H NMR (400 MHz, DMSO) δ = 8.85 (d, *J* = 6.4 Hz, 2 H), 8.74 (s, 1 H), 8.28 (d, *J* = 16.4 Hz, 1 H), 8.21 (d, *J* = 6.4 Hz, 2 H), 8.14 (s, 1 H), 7.78 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 7.74 – 7.65 (m, 1 H), 7.41 (d, *J* = 16.3 Hz, 1 H), 4.52 (t, *J* = 7.2 Hz, 2 H), 3.94 (s, 3 H), 3.50 (t, *J* = 6.5 Hz, 2 H), 2.19 (p, *J* = 6.8 Hz, 2 H).

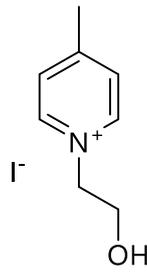
^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO): δ = 154.2, 143.8, 139.4, 136.9, 134.2, 125.7, 125.6, 125.1, 122.4, 120.2, 118.7, 113.0, 112.4, 103.4, 57.0, 47.6, 33.4, 29.5.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm $^{-1}$) = 2943 (w), 2221 (w), 2093 (w), 1602 (m), 1509 (w).

MS (EI) *m/z* (%): 343.2 (100).

HR-MS (EI) berechnet für $C_{20}H_{19}N_6^+$ = 343.1673, gefunden = 343.1671.

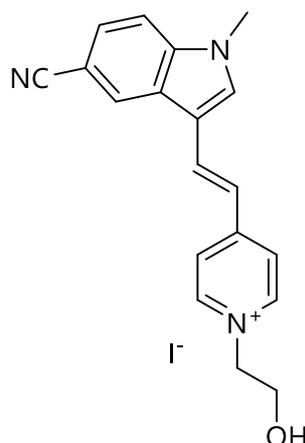
Weitere Experimente: DEPT90, DEPT135, COSY, HSQC.

1-(2-Hydroxyethyl)-4-methylpyridin-1-ium Iodid (**10**)

$C_8H_{12}INO$
265.0945 g/mol

In einem Bördelglas wurden 985 μ L (1.00 eq, 10.0 mmol) 4-Methylpyridin und 1.61 mL 2-Iodethanol in 5 mL Acetonitril gelöst und 19 h bei 82 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit 5 mL Diethylether verdünnt und die überstehende Lösung abgenommen. Der Rückstand wurde drei Mal mit je 10 mL Diethylether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Das Produkt wurde ohne weitere Aufarbeitung in der Folgereaktion eingesetzt.

(E)-4-(2-(5-Cyano-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinyl)-1-(2-hydroxyethyl)pyridin-1-ium
Iodid (HO²PyCN3)



C₁₉H₁₈IN₃O
431.2775 g/mol

199 mg (1.00 eq, 750 μ mol) der Verbindung **10**, 0.207 g (1.50 eq, 1.13 mmol) des Aldehyds **CN3** und 163 μ L (0.141 g, 2.20 eq, 1.65 mmol) Piperidin wurden in 7.5 mL Ethanol gelöst und unter Rühren für 20 h auf 80 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der entstandene Feststoff abfiltriert und drei Mal mit je 10 mL Diethylether gewaschen. Der Feststoff wurde aus Methanol / Diethylether umkristallisiert. Nach Trocknen im Vakuum wurden 0.294 g (0.683 mmol) des orangefarbenen Feststoffs erhalten (91 %).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 8.78 (d, J = 6.9 Hz, 2 H), 8.74 (s, 1 H), 8.24 (d, J = 16.4 Hz, 1 H), 8.20 (d, J = 6.9 Hz, 2 H), 8.14 (s, 1 H), 7.77 (d, J = 8.5 Hz, 1 H), 7.71 – 7.65 (m, 1 H), 7.40 (d, J = 16.4 Hz, 1 H), 5.23 (t, J = 5.2 Hz, 1 H), 4.54 – 4.47 (m, 2 H), 3.93 (s, 3 H), 3.89 – 3.84 (m, 2 H).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 33.4, 60.1, 61.7, 103.3, 112.4, 113.1, 118.8, 120.3, 122.1, 125.1, 125.6, 125.7, 134.0, 136.8, 139.4, 144.1, 154.2.

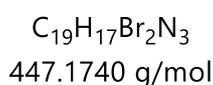
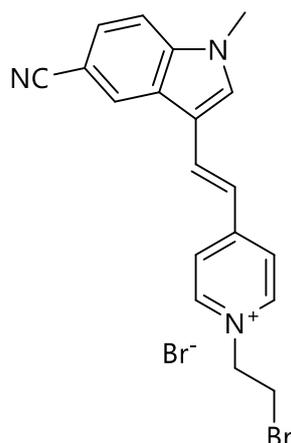
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3330 (w), 2222 (w), 1605 (s).

MS: (FAB): m/z (%): 304.1 (100).

HR-MS: (FAB) berechnet für C₁₉H₁₈O₁N₃⁺ = 304.1450, gefunden = 304.1450.

EA berechnet für C₁₉H₁₈I₁N₃O: C, 52.91; H, 4.21; N, 9.74. Gefunden: C, 52.61; H, 4.57; N, 9.92.

Weitere Experimente: DEPT90, DEPT135, COSY, multiplicity-edited HSQC.

(E)-1-(2-Bromomethyl)-4-(2-(5-cyano-1-methyl-1H-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-ium Bromid (Br²PyCN3)

86.3 mg (1.00 eq, 200 μmol) des Farbstoffes HO²PyCN3, 157 mg (3.00 eq, 600 μmol) Triphenylphosphin und 219 mg (3.30 eq, 660 μmol) Tetrabrommethan wurden in 2 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst und bei Raumtemperatur für 19 h gerührt. Unter vermindertem Druck wurde das Lösungsmittel entfernt und anschließend 2 mL Methanol zugegeben. Das Gemisch wurde für 10 min im Ultraschallbad behandelt. Der Feststoff wurde abfiltriert und dann drei Mal mit 5 mL Diethylether gewaschen. Zu dem Feststoff wurden 2 g Natriumbromid gegeben und die Mischung wurde zwischen 150 mL Dichlormethan und 50 mL destilliertem Wasser verteilt. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit je 100 mL Dichlormethan rückextrahiert. Unter vermindertem Druck wurden die vereinigten organischen Phasen bei 40 °C eingeengt. Der Rückstand wurde erneut mit 2 mL Methanol versetzt, für 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt, abfiltriert und drei Mal mit je 10 mL Diethylether gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum konnten 68.5 mg (153 μmol) des orangefarbenen Feststoffs gewonnen werden (77 %).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 8.89 (d, J = 6.5 Hz, 2 H), 8.76 (s, 1 H), 8.34 (d, J = 16.3 Hz, 1 H), 8.26 (d, J = 6.5 Hz, 2 H), 8.18 (s, 1 H), 7.99 (m, 1 H), 7.69 (d, J = 8.8 Hz, 1 H), 7.42 (d, J = 16.3 Hz, 1 H), 4.91 (t, J = 5.7 Hz, 2 H), 4.11 (t, J = 5.9 Hz, 2 H), 3.94 (s, 3 H).

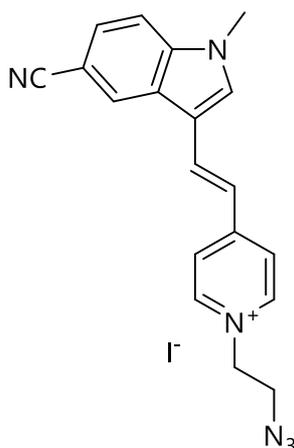
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO): δ = 31.8, 33.4, 40.2, 59.5, 90.3, 112.4, 118.6, 122.1, 125.6, 125.7, 125.9, 134.8, 137.1, 143.8, 144.4.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3547 (w), 3407 (m), 2225 (w).

MS: (FAB): m/z (%): 366.1 (100).

HR-MS: (FAB) berechnet für C₁₉H₁₇N₃⁷⁹Br₁⁺ = 366.0606, gefunden = 366.0604.

(*E*)-1-(2-Azidoethyl)-4-(2-(5-cyano-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-ium Iodid
(N₃²PyCN3)



C₁₉H₁₇N₆
456.2915 g/mol

26.8 mg (1.00 eq, 60.0 μmol) der Verbindung Br²PyCN3, 30.0 mg (3.33 eq, 200 μmol) Natriumiodid und 39.0 mg (10.0 eq, 600 μmol) Natriumazid wurden in 1.6 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst und bei Raumtemperatur für 19 h gerührt. Die Mischung wurde in 150 mL Diethylether / *n*-Hexan (v : v = 2 : 1) gegeben und die überstehende Lösung wurde abdekantiert. Zu dem verbliebenen Rückstand wurden 2 g Natriumiodid gegeben und die Mischung wurde zwischen 150 mL Dichlormethan und 50 mL destilliertem Wasser verteilt. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit je 100 mL DCM nachextrahiert. Unter vermindertem Druck wurden die vereinigten organischen Phasen bei 40 °C eingengt. Der Rückstand wurde mit 2 mL Methanol versetzt, für 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt, abfiltriert und dann drei Mal mit je 10 mL Diethylether gewaschen. Nach dem Trocknen im Vakuum konnten 10.1 mg (22.2 μmol) des orangen Feststoffs gewonnen werden (37 %).

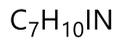
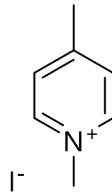
¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ = 8.83 (d, *J* = 6.4 Hz, 2 H), 8.75 (s, 1 H), 8.28 (d, *J* = 16.4 Hz, 1 H), 8.23 (d, *J* = 6.4 Hz, 2 H), 8.17 (s, 1 H), 7.82 – 7.75 (m, 1 H), 7.75 – 7.75 (m, 1 H), 7.42 (d, *J* = 16.4 Hz, 1 H), 4.63 (t, *J* = 5.5 Hz, 2 H), 4.01 (t, *J* = 5.4 Hz, 2 H), 3.94 (s, 3 H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ = 33.4, 50.3, 58.1, 103.5, 112.5, 113.1, 118.7, 120.3, 122.1, 122.3, 125.2, 125.7, 125.7, 134.7, 137.2, 139.5, 140.3, 144.1, 154.7.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3330 (w), 2222 (m).

MS: (FAB): *m/z* (%): 304.1 (100%).

HR-MS: (FAB) berechnet für C₁₉H₁₇N₆⁺ = 329.1515, gefunden = 329.1515.

1,4-Dimethylpyridin-1-ium Iodid (**Py**)

235.0685 g/mol

In einem Bördelglas wurden 995 μL (931 mg, 1.00 eq, 10 mmol) 4-Methylpyridin und 630 μL (1.42 g, 1.00 eq, 75 mmol) Methyljodid in 5 mL Aceton gelöst. Die Reaktionsmischung wurde 19 h bei 56 $^{\circ}\text{C}$ gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit 10 mL Diethylether verdünnt, der Niederschlag abfiltriert und drei Mal mit je 10 mL Diethylether gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum wurden 2.02 g (8.60 mmol) des farblosen Reinproduktes erhalten (86 %).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ = 8.83 (d, J = 6.6 Hz, 2 H), 7.96 (d, J = 6.1 Hz, 2 H), 4.27 (s, 3 H), 2.60 (s, 3 H).

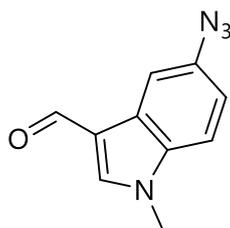
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO) δ = 21.3, 101.1, 128.0, 156.5, 158.2.

MS (ESI): m/z (%) = 108.08088 (100).

HR-MS (ESI): gefunden für $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_1^+$ = 108.08088.

Weitere Experimente: COSY.

5-Azido-1-methyl-1*H*-indole-3-carbaldehyd (**InAN**₃)



C₁₀H₈N₄O
200.2010 g/mol

Es wurden 293 mg (1.50 eq, 4.50 mmol) Natriumazid, 714 mg (1.00 eq, 3.00 μ mol) 5-Brom-1-methyl-1*H*-indol-3-carbaldehyd (**Br3**), 297 mg (0.50 eq, 1.50 mmol) Natriumascorbat, 150 mg (0.20 eq, 600 μ mol) Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat, 69.1 mg (0.20 eq, 600 μ mol) L-Prolin und 63.6 mg (0.20 eq, 600 μ mol) Kaliumcarbonat in 10 mL *N,N*-Dimethylformamid / dest. Wasser (v : v = 2 : 1) gelöst. Die Reaktionsmischung wurde 19 h bei 85 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit 40 mL dest. Wasser verdünnt und 10 mL konz. Ammoniaklösung hinzugegeben. Anschließend wurde fünf Mal mit je 10 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 30 °C entfernt. Nach Trocknen im Vakuum wurden 245 mg (1.22 mmol) des Reinproduktes erhalten (41 %).^[106]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 9.95 (s, 1 H), 8.01 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H), 7.68 (s, 1 H), 7.31 (d, *J* = 8.7 Hz, 2 H), 6.99 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1 H), 3.87 (s, 3 H).

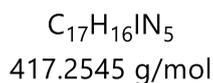
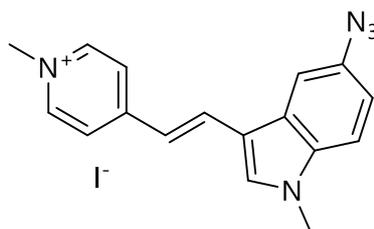
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 50.8, 106.2, 111.2, 111.9, 116.3, 118.7, 135.9, 140.0, 155.7, 184.3.

MS: (ESI): *m/z* (%): 201.07658 (M+H⁺, 100%), 223.05843 (M+Na⁺, 97%).

HR-MS (ESI): gefunden für C₁₀H₉N₄O₁⁺ = 201.07658 und für C₁₀H₉N₄O₁Na⁺ = 223.05843.

Weitere Experimente: COSY.

(*E*)-4-(2-(5-Azido-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinyl)-1-methylpyridin-1-ium Iodid
(N₃PyInA3)



In einem Bördelglas wurden 58.8 mg (1.00 eq, 250 μ mol) **Py** und 75.1 mg (1.50 eq, 75 μ mol) **InA3** in 2.5 mL Ethanol (99.6 %) gelöst und 55 μ L (46.8 mg, 2.20 eq, 550 μ mol) Piperidin zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 4 h bei 80 °C bei Dunkelheit gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit 10 mL Diethylether verdünnt und der Niederschlag abfiltriert. Der Niederschlag wurde aus Methanol / Diethylether umkristallisiert, abfiltriert und drei Mal mit je 5 mL Diethylether gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum wurden 68.7 mg (165 μ mol) des Reinproduktes erhalten (66 %).

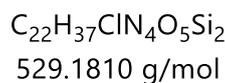
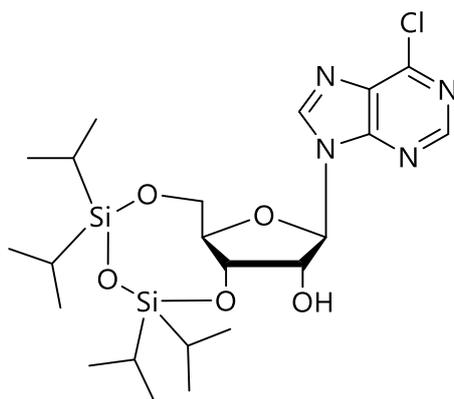
¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ (ppm) = 8.69 (d, J = 6.9 Hz, 2 H), 8.22 (d, J = 16.2 Hz, 1 H), 8.13 (d, J = 6.5 Hz, 2 H), 8.04 (s, 1 H), 7.85 (d, J = 2.2 Hz, 1 H), 7.63 (d, J = 8.7 Hz, 1 H), 7.21 (d, J = 16.3 Hz, 1 H), 7.10 (dd, J = 8.8, 2.1 Hz, 1 H), 4.18 (s, 3 H), 3.89 (s, 3 H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ (ppm) = 33.4, 46.3, 110.2, 112.2, 112.5, 114.3, 114.5, 117.2, 121.8, 125.6, 126.5, 133.2, 134.8, 135.6, 135.6, 144.2, 153.9.

MS: (ESI): m/z (%): 290.13953 (100%).

HR-MS (ESI): gefunden für C₁₇H₁₆N₅⁺ = 290.13953.

(6*aR*,8*R*,9*R*,9*aS*)-8-(6-Chlor-9*H*-purin-9-yl)-2,2,4,4-tetraisopropyltetrahydro-6*H*-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-ol (**2**)



Unter Argon wurden 1.19 g (1.00 eq, 4.10 mmol) (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(6-Chlor-9*H*-purin-9-yl)-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3,4-diol in 10 mL trockenem Pyridin gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurden 1.60 mL (1.55 g, 1.20 eq, 4.92 mmol) 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan tropfenweise (10 min) zugegeben und das Gemisch 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie über Silicagel (Hexan/Ethylacetat, v : v = 2 : 1) aufgereinigt. Es wurden 1.42 g (2.68 mmol) der reinen Verbindung erhalten (65 %).^[107]

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ = 8.73 (s, 1 H), 8.72 (s, 1 H), 6.01 (d, J = 1.2 Hz, 1 H), 5.74 (d, J = 4.6 Hz, 1 H), 4.69 (dd, J = 8.7, 5.0 Hz, 1 H), 4.61 (t, J = 4.9 Hz, 1 H), 4.10 (dd, J = 12.9, 3.2 Hz, 1 H), 4.06 (dt, J = 8.7, 2.9 Hz, 1 H), 3.94 (dd, J = 12.9, 2.7 Hz, 1 H), 1.10 – 0.93 (m, 28 H).

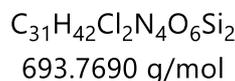
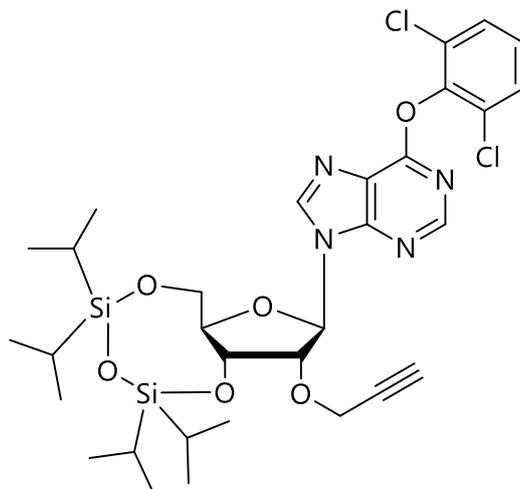
¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ = 12.0, 12.2, 12.4, 12.7, 16.8, 16.9, 16.9, 17.0, 17.1, 17.2, 17.2, 17.3, 60.5, 69.6, 73.4, 81.0, 89.9, 131.7, 145.5, 150.9, 151.5.

MS (FAB): m/z (%) = 529.5 (100), 485.3 (23), 261.1 (28), 155.0 (35).

HR-MS (FAB): berechnet für $C_{22}H_{38}ClN_4O_5Si_2^+$ = 529.2064, gefunden 529.2064.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3355 (w), 2945 (w), 2864 (w), 1594 (w), 1559 (w).

Weitere Experimente: DEPT90, DEPT135, COSY.

6-(2,6-Dichlorphenoxy)-9-((6*R*,8*R*,9*R*,9*aR*)-2,2,4,4-tetraisopropyl-9-(prop-2-yn-1-yloxy)tetrahydro-6*H*-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-8-yl)-9*H*-purin (**3**)

Unter Argon wurden 1.42 g (1.00 eq, 2.68 mmol) (6*R*,8*R*,9*R*,9*aS*)-8-(6-Chlor-9*H*-purin-9-yl)-2,2,4,4,4-Tetraisopropyltetrahydro-6*H*-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-9-ol (**2**) in 10.5 mL Dichlorethan gelöst und eine Lösung aus 437mg (1.00 eq, 2.68 mmol) 2,6-Dichlorphenol, 60.0 mg (0.20 eq, 535 μmol) DABCO, 450 μL (327 mg, 1.20 eq, 3.21 mmol) Triethylamin in 2.60 mL Dichlorethan wurde zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht gerührt und dann zwischen 50 mL Dichlormethan und 50 mL 1 M Natriumhydrogencarbonatlösung verteilt. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt. Verbleibendes Wasser wurde durch Koevaporation mit trockenem Acetonitril entfernt. Für die Alkylierung wurde der trockene Rückstand in 3.30 mL trockenem Acetonitril gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 845 μL (777 mg, 1.20 eq, 3.22 mmol) Phosphazenenbase P_1 -*t*-Bu und 360 μL (478 mg, 1.20 eq, 3.22 mmol) Propargylbromid (80 % in Toluol) wurde die Lösung für weitere 15 min bei 0 °C gehalten. Nach 5 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt. Der Rückstand wurde in 100 mL Ethylacetat gelöst, mit 40 mL 0.5 M Natriumphosphatpuffer (pH 7) und 40 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtrieren wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, das Rohprodukt durch Säulenchromatographie über Silicagel (Hexan/Ethylacetat, v : v = 3 : 1; R_f = 0.45) aufgereinigt und 917 mg (1.32 mmol) der reinen Titelverbindung isoliert (49 % über zwei Stufen).^[107]

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.43 (s, 1 H), 8.32 (s, 1 H), 7.44 (s, 1 H), 7.43 (s, 1 H), 7.22 (dd, J = 8.5, 7.7 Hz, 1 H), 6.11 (s, 1 H), 4.92 (dd, J = 9.4, 4.8 Hz, 1 H), 4.68 – 4.51 (m, 3 H), 4.28 – 4.20 (m, 1 H), 4.17 (dt, J = 9.2, 2.1 Hz, 1 H), 4.03 (dd, J = 13.3, 2.6 Hz, 1 H), 2.42 (t, J = 2.4 Hz, 1 H), 1.16 – 0.96 (m, 28 H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ = 12.7, 13.0, 13.1, 13.6, 17.1, 17.2, 17.2, 17.3, 17.4, 17.5, 17.5, 17.6, 58.7, 59.8, 69.9, 75.5, 79.3, 80.3, 81.6, 89.0, 122.0, 127.3, 129.0, 129.6, 142.3, 145.5, 152.1, 152.5, 158.5.

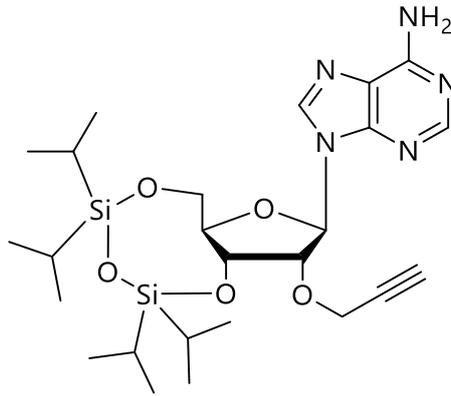
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3305 (w), 2943 (w), 2866 (w).

MS (EI): m/z (%) = 696.2 (37), 695.3 (83), 693.2 (100).

HR-MS (EI) berechnet für $C_{31}H_{43}O_6N_4^{35}Cl_2^{28}Si_2 = 693.2093$, gefunden = 693.2095.

Weitere Experimente: DEPT90, DEPT135.

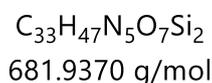
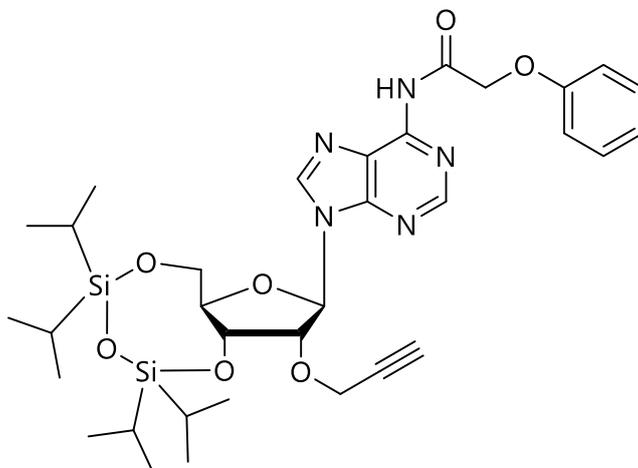
9-((6*aR*,8*R*,9*R*,9*aR*)-2,2,4,4-tetraisopropyl-9-(prop-2-yn-1-yloxy)tetrahydro-6*H*-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilicin-8-yl)-9*H*-purin-6-amin (**4**)



$C_{25}H_{41}N_5O_5Si_2$
547.8030 g/mol

In einem Autoklav wurden 917 mg (1.00 eq, 1.32 mmol) **3** in 10 mL trocken THF gelöst. Die Reaktionsmischung wurde bei 17 bar Ammoniak für 72 h bei 70 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur und Ablassen des Überdrucks wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt. Nach zweimaligem Lyophilisieren mit Pyridin und trocknen im Vakuum wurde das Produkt ohne weitere Aufreinigung in der Folgereaktion umgesetzt.^[107]

2-Phenoxy-*N*-(9-((6*aR*,8*R*,9*R*,9*aR*)-2,2,4,4-tetraisopropyl-9-(prop-2-yn-1-yloxy)tetrahydro-6*H*-furo[3,2-*f*][1,3,5,2,4]trioxadisilocin-8-yl)-9*H*-purin-6-yl)acetamid (**5**)



Unter Argonatmosphäre wurden 723 mg (1.00 eq, 1.32 mmol) **4** in 18.4 mL trockenem Pyridin gelöst und 505 μ L (375 mg, 2.20 eq, 2.90 mmol) DIPEA zugesetzt. Anschließend wurden 205 μ L (248 mg, 1.10 eq, 1.45 mmol) Phenoxyacetylchlorid zugegeben und die Reaktionsmischung 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem kein Umsatz festgestellt werden konnte, wurden 565 μ L (5.30 eq, 7.70 mmol) 1-Methylimidazol und erneut 925 μ L (4.90 eq, 16.5 mmol) Phenoxyacetylchlorid zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 9.40 (s, 1 H), 8.77 (s, 1 H), 8.27 (s, 1 H), 7.40 – 7.32 (m, 2 H), 7.11 – 7.01 (m, 3 H), 6.07 (s, 1 H), 4.92 – 4.81 (m, 3 H), 4.68 – 4.51 (m, 3 H), 4.26 – 4.18 (m, 1 H), 4.16 (dt, J = 9.2, 2.1 Hz, 1 H), 4.02 (dd, J = 13.3, 2.5 Hz, 1 H), 2.41 (t, J = 2.4 Hz, 1 H), 1.15 – 0.96 (m, 28 H).

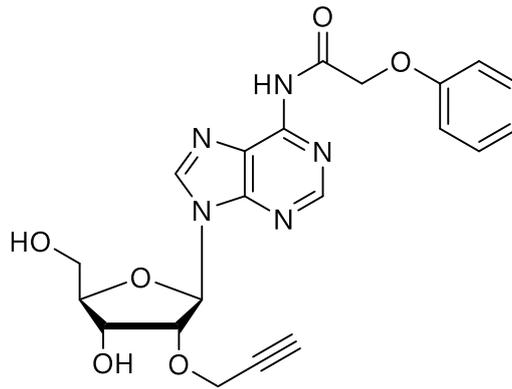
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ = 12.7, 13.0, 13.1, 13.6, 17.0, 17.2, 17.2, 17.3, 17.5, 17.5, 17.5, 17.6, 58.7, 59.9, 68.3, 69.9, 75.6, 75.6, 79.3, 80.1, 81.7, 89.0, 114.9, 115.1, 122.6, 123.5, 130.0, 142.1, 148.4, 151.1, 152.8, 157.2, 166.7.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2942 (w), 2865 (w).

MS (EI): m/z (%) = 684.4 (15), 683.3 (37), 682.3 (72).

HR-MS (EI) berechnet für $C_{33}H_{48}O_7N_5^{28}Si_2$ = 682.3087, gefunden = 682.3089.

N-(9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-4-Hydroxy-5-(hydroxymethyl)-3-(prop-2-yn-1-yloxy)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)-2-phenoxyacetamid (**6**)



$C_{21}H_{21}N_5O_6$
439.4280 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurden 586 mg (1.00 eq, 859 μ mol) **5** in 15.6 mL trockenem THF vorgelegt und 415 μ L Eisessig zugesetzt. Anschließend wurden 3.78 mL 1 M TBAF in THF zugesetzt und die Reaktionsmischung 40 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die komplette Reaktionsmischung per säulenchromatographisch aufgereinigt (Chloroform/Methanol v : v = 10 : 1). Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt. Nach Trocknen im Hochvakuum konnten 370 mg (842 μ mol) des Reinproduktes erhalten werden (64 % über drei Stufen).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ = 9.55 (s, 1 H), 8.80 (s, 1 H), 8.07 (s, 1 H), 7.38 – 7.34 (m, 2 H), 7.11 – 6.98 (m, 3 H), 5.96 (d, J = 7.6 Hz, 1 H), 4.94 (dd, J = 7.6, 4.5 Hz, 1 H), 4.86 (s, 2 H), 4.68 (d, J = 4.6 Hz, 1 H), 4.40 (s, 1 H), 4.21 (dd, J = 16.2, 2.4 Hz, 1 H), 4.09 (dd, J = 16.2, 2.4 Hz, 1 H), 4.00 (dd, J = 13.1, 1.7 Hz, 1 H), 3.84 – 3.74 (m, 1 H), 2.24 (t, J = 2.4 Hz, 1 H), 2.09 (s, 1 H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ = 59.1, 63.4, 68.2, 71.3, 76.1, 78.6, 81.7, 88.2, 89.6, 115.1, 122.7, 124.5, 128.5, 130.0, 143.8, 149.3, 149.7, 150.9, 152.3, 157.1, 166.7.

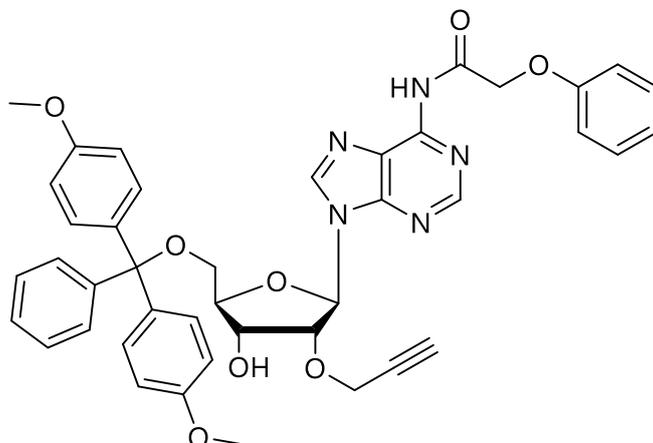
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3273 (w), 2926 (w), 1710 (w), 1611 (m).

MS (EI): m/z (%) = 441.1 (16), 440.1 (54).

HR-MS (EI) berechnet für $C_{21}H_{22}O_6N_5$ = 440.1565, gefunden = 440.1564.

Weitere Experimente: DEPT90, DEPT135, COSY.

N-(9-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-5-((Bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-4-hydroxy-3-(prop-2-yn-1-yloxy)tetrahydrofuran-2-yl)-9*H*-purin-6-yl)-2-phenoxyacetamid
(7)



C₄₂H₃₉N₅O₈
741.8010 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurden 362 mg (1.00 eq; 823 μmol) **6** in 7.00 mL Pyridin gelöst. Dazu wurden 230 μL (2.00 eq; 1.65 mmol) Triethylamin und 293 mg (1.05 eq; 865 μmol) Dimethoxytritylchlorid hinzugegeben. Nach 3 h wurde die Reaktion mit 1 mL Methanol versetzt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 40 °C entfernt. Der Rückstand wurde in EE aufgenommen, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und säulenchromatographisch aufgereinigt (EE / DCM / Et₃N v:v = 1 : 1 : 0.01). Nach Lyophilisieren aus Benzol wurden 208 mg (154 μmol) eines farblosen Feststoffs erhalten (34 %).^[107]

DC (EE/ DCM/ Et₃N v : v : v = 1 : 1 : 0.01) : R_f = 0.29.

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) δ = 9.29 (s, 1 H), 8.65 (s, 1 H), 8.23 (s, 1 H), 7.47 – 7.41 (m, 2 H), 7.39 – 7.20 (m, 9 H), 7.09 – 7.01 (m, 3 H), 6.87 – 6.77 (m, 4 H), 6.21 (d, J = 4.6 Hz, 1 H), 4.95 (s, 2 H), 4.88 (t, J = 4.9 Hz, 1 H), 4.60 (t, J = 4.9 Hz, 1 H), 4.41 (dd, J = 16.1, 2.4 Hz, 1 H), 4.36 (dd, J = 16.1, 2.4 Hz, 1 H), 4.24 (q, J = 4.0 Hz, 1 H), 3.77 (s, 6 H), 3.48 (dd, J = 10.7, 3.3 Hz, 1 H), 3.42 (dd, J = 10.7, 4.3 Hz, 1 H), 2.46 (t, J = 2.4 Hz, 1 H).

¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂) δ = 55.8, 59.2, 63.8, 68.9, 70.7, 76.2, 79.2, 81.7, 84.9, 87.2, 87.5, 113.7, 115.4, 122.7, 123.6, 127.4, 128.4, 128.6, 128.9, 130.3, 130.6, 130.6, 136.1, 136.2, 142.7, 145.3, 149.0, 152.0, 152.9, 157.9, 159.3, 167.3.

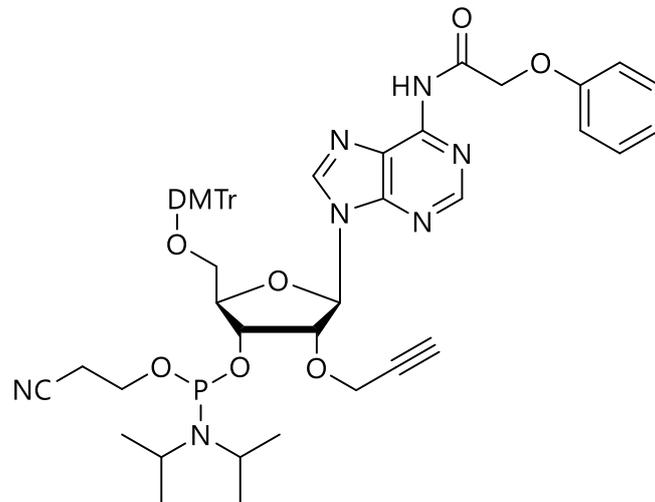
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3281 (w), 2930 (w), 1716 (w).

MS (EI): m/z (%) = 742.4 (11).

HR-MS (EI) berechnet für C₄₂H₄₀O₈N₅ = 742.2871, gefunden = 742.2871.

Weitere Experimente: DEPT90, DEPT135, COSY.

(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-2-((Bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)methyl)-5-(6-(2-phenoxyacetamido)-9*H*-purin-9-yl)-4-(prop-2-yn-1-yloxy)tetrahydrofuran-3-yl (2-cyanoethyl) diisopropylphosphoramidit (**8**)



$C_{51}H_{56}N_7O_9P$
942.0228 g/mol

Unter Argonatmosphäre wurden 74.2 mg (1.00 eq; 100 μ mol) **7** in 770 μ L trockenem 1,2-Dichlorethan gelöst und 44.0 μ L (2.50 eq; 250 μ mol) DIPEA, sowie 56.0 μ L 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (2.20 eq; 240 μ mol) hinzugegeben. Die Reaktion wurde 3 h bei RT gerührt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM / Aceton v:v = 8 : 1). Das Lösungsmittel wurde bei 40 °C unter vermindertem Druck entfernt. Nach Lyophilisieren aus Benzol konnten 89.2 mg (94.7 μ mol) eines farblosen Feststoffs als Gemisch zweier Diastereomere erhalten werden (73 - 95 %).

Da zwei Diastereomere erhalten werden, wird an dieser Stelle von der Auswertung der vorliegenden 1H -, ^{13}C -NMR- und 1H - 1H -NMR-Spektren abgesehen.

DC (DCM/ Aceton v : v = 8 : 1): R_f = 0.42.

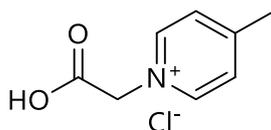
^{31}P NMR (200 MHz, CD_2Cl_2) δ = 150.4, 150.7.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2963 (w), 1716 (w), 1609 (w).

MS (EI): m/z (%) = 942.5 (9).

HR-MS (EI) berechnet für $C_{51}H_{57}O_9N_7P_1$ = 942.3950, gefunden = 942.3946.

1-(Carboxymethyl)-4-methylpyridin-1-ium Chlorid (**9**)



$C_8H_{10}ClNO_2$
187.6230 g/mol

1.00 mL 4-Picolin (941 mg, 1.00 eq, 10.0 mmol) und 1.04 g Chloressigsäure (1.10 eq, 11.0 mmol) wurden für 19 h unter Rühren auf 100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Mischung in Methanol gelöst und mit Diethylether und Hexan gefällt. Der Feststoff wurde abfiltriert und drei Mal mit je 10 mL Diethylether gewaschen. Nach dem Trocknen im Vakuum konnten 1.37 g (7.30 mmol) des farblosen Feststoffs gewonnen werden (73 %).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ = 14.1 (br, 1 H), 8.98 (d, *J* = 6.7, 2 H), 8.04 (d, *J* = 6.4 Hz, 2 H), 5.60 (s, 2 H), 2.63 (s, 3 H).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO): δ (ppm) = 167.6, 159.8, 145.1, 127.9, 59.8, 21.5.

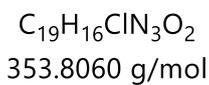
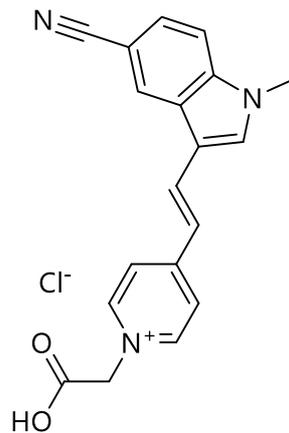
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3023 (w), 2449 (m).

MS: (FAB): *m/z* (%): 108.08099 (15), 152.07036 (100).

HR-MS (ESI) gefunden für C₈H₁₀O₂N⁺ = 152.07036.

Weitere Experimente: COSY, *multiplicity-edited* HSQC.

(*E*)-1-(Carboxymethyl)-4-(2-(5-cyano-1-methyl-1*H*-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-ium
Chlorid (HOOC²PyCN3)



375 mg (1.00 eq, 2.00 mmol) des Picolinium-Salzes **9**, 533 mg (1.50 eq, 3.00 mmol) des Aldehyds CN3 und 652 μ L (562 mg, 3.30 eq, 6.60 mmol) Piperidin wurden in 15 mL Chloroform gelöst und über drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Der Feststoff wurde abfiltriert, zwei Mal mit je 10 mL Aceton und dann drei Mal mit je 10 mL Diethylether gewaschen und anschließend getrocknet. Der Feststoff wurde bei 60°C in destilliertem Wasser wieder angelöst und mit 2 mL konzentrierter Salzsäure erneut gefällt und anschließend abfiltriert. Das Produkt wurde über mehrere Nächte im Exsikkator getrocknet. Es wurden 522 mg (1.48 mmol) des orangefarbenen Feststoffs erhalten (74 %).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.78 (d, J = 7.5 Hz, 2 H), 8.74 (s, 1 H), 8.27 - 7.99 (m, 4 H), 7.78 - 7.67 (m, 2 H), 7.41 - 7.37 (m, 1 H), 5.30 (s, 2 H), 3.93 (s, 3 H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO): δ (ppm) = 167.6, 154.4, 145.6, 144.8, 139.4, 136.9, 134.4, 125.7, 125.6, 125.5, 125.2, 121.8, 120.3, 118.8, 113.1, 112.4, 103.4, 60.0, 33.4.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3361 (w), 2219 (m), 1597 (s).

MS: (EI) m/z (%): 318.1 (100).

HR-MS (EI) berechnet für C₁₉H₁₆O₂N₃⁺ = 318.1243, gefunden = 318.1242.

EA berechnet für C₁₉H₁₆ClN₃O₂ \times 1 H₂O (Kristallwasser): C, 61.38; H, 4.88; N, 11.30. Gefunden: C, 60.26; H, 5.31; N, 11.14.

Weitere Experimente: COSY, multiplicity-edited HSQC.

10.3 Nukleinsäuresynthese

10.3.1 Synthese von einfach postsynthetisch modifizierter DNA

Allgemeines

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte an einem *Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer* System von *Applied Biosystems (ABI)*. Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen *ABI* und *Proligo* bezogen. Die Phosphoramidite der natürlichen Basen wurden als 0.067 M Lösungen in Acetonitril (*amidite diluent* von *ABI*) eingesetzt. Die artifiziiellen Bausteine 2'-*O*-Propargyluridin (cU) und –adenosin (cA) wurden von der Firma *ChemGenes* bezogen und als 0.083 M Lösungen in Acetonitril (*amidite diluent* von *ABI*) eingesetzt. Als feste Phase wurden CPG (*controlled pore glass*) mit einer Belegung von 1 μmol (500 Å) verwendet.

Kupplungsprotokolle für *Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer*

Über das Kupplungsprotokoll werden die einzelnen Schritte der Festphasensynthese reguliert. Die Anzahl der Pulse und die Kupplungsdauern lassen sich hierüber festlegen, wobei je Puls 16 μL Reagenz in die CPG-Säule injiziert werden. Definiert man die Kupplungsdauer t_c als 0 s, so kommt dies dem schnellstmöglichen Reagenziendurchsatz gleich – es wird keine zusätzliche Reaktionszeit gewährt.

Die einzelnen Reagenzien sind nachfolgend aufgelistet:

Tabelle 3: Reagenzien für die DNA-Festphasensynthese.

Reagenz	Zusammensetzung
Dblk	3 % Dichloressigsäure in Dichlormethan
Wsh	Acetonitril
Act	0.45 M Tetrazol in Acetonitril
Cap A	Essigsäureanhydrid in Tetrahydrofuran / Pyridin
Cap B	<i>N</i> -Methylimidazol in Tetrahydrofuran / Pyridin
Ox	Iod in Wasser / Tetrahydrofuran / Pyridin

Folgendes Protokoll wurde für die DNA-Synthese genutzt:

Tabelle 4: Kupplungsprotokoll für Standard-Basen exemplarisch am Einbau eines Thymidin-Phosphoramidites.

Codierung	Funktion	Modus	Pulse	Zeit t_c [s]
	\$Deblocking			
144	Index Fract. Coll	NA	1	0
0	Default	WAIT	0	1.5
141	Trityl Mon. On / Off	PULSE	1	1
16	Dblk	PULSE	10	0
16	Dblk	PULSE	50	49
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0

141	Trityl Mon. On / Off	NA	0	1
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
144	Index Fract. Coll	NA	2	0
\$Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	5	0
21	T + Act	PULSE	5	0
21	T + Act	PULSE	2	16
2	Act	PULSE	3	24
1	Wsh	PULSE	7	56
1	Wsh	PULSE	8	0
\$Capping				
12	Wsh A	PULSE	20	0
13	Caps	PULSE	8	0
12	Wsh A	PULSE	6	15
12	Wsh A	PULSE	14	0
\$Oxidizing				
15	Ox	PULSE	15	0
12	Wsh A	PULSE	15	0
\$Capping				
13	Caps	PULSE	7	0
12	Wsh A	PULSE	30	0

Zur Insertion des cU- oder cA-Bausteins wurde das Kupplungsprotokoll im *Coupling*-Schritt modifiziert:

Tabelle 5: Modifikation des Coupling-Schrittes zum Einbau der artifiziellen Bausteine cU und cA.

Codierung	Funktion	Modus	Pulse	Zeit t_c [s]
\$Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	6	0
24	cU/cA + Act	PULSE	5	0
24	cU/cA + Act	PULSE	2	84
2	Act	PULSE	4	84
1	Wsh	PULSE	7	56
1	Wsh	PULSE	8	0

Abspaltung von der festen Phase und Entschützung

Im Anschluss an die Festphasensynthese wurde die CPG-Säule an einer *Christ Alpha 1-2 LD Plus* Lyophilisierungsanlage über Nacht getrocknet. Nach Öffnen der CPG-Säule wurde das CPG-Granulat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden zur Abspaltung von der Festphase und zur Schutzgruppenabspaltung 700 µL Ammoniumhydroxidlösung (> 25 %, *trace select, Fluka*) zugegeben und über Nacht auf 55 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Ammoniak der Reaktionslösung an einem *Christ Alpha AVC* Vakuumkonzentrator mit angeschlossener *Christ Alpha 1-2 LD Plus* Lyophilisierungsanlage entfernt (60 min, Heizung: 55 min, 34 °C, 100 mbar). Abschließend wurde die überstehende Lösung entnommen und das verbliebene CPG-Granulat drei Mal mit je 200 µL *Millipore*-Wasser gewaschen. Das Lösungsmittel der vereinigten Extrakte wurde am Vakuumkonzentrator entfernt (14 h, 25 °C, 0.1 mbar).

Postsynthetische Click-Konjugation der Farbstoffe an alkinmodifizierte Oligonukleotide

Die gefriergetrockneten DNA-Stränge wurden in 50 µL *Millipore*-Wasser gelöst und 114 µL 10 mM Azidlösung (in DMSO / *tert*-BuOH v : v = 3 : 1), 34 µL 100 mM TBTA-Lösung (in DMSO / *tert*-BuOH v : v = 3 : 1), 25 µL 400 mM Natriumascorbatlösung (in *Millipore*-Wasser) und 17 µL 100 mM Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat (in DMSO / *tert*-BuOH v : v = 3 : 1) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 30 s mit Argon (Schweißargon 4.6, 99.999 % rein) entgast und anschließend für 2 h auf 60 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung mit 150 µL 50 mM Dinatrium-EDTA-Lösung (in *Millipore*-Wasser), 450 µL 0.3 M Natriumacetatlösung (in *Millipore*-Wasser) und etwa 7 mL Ethanol (99.6 %) versetzt. Zur Fällung der DNA wurde das Gemisch über Nacht bei -32 °C inkubiert. Die ausgefallene DNA wurde abzentrifugiert (15 min, 4000 rpm) und die überstehende Lösung abdekantiert. Der Rückstand wurde drei Mal mit je 1 mL 80 % Ethanolösung (in *Millipore*-Wasser) gewaschen und abschließend an einer *Christ Alpha 1-2 LD Plus* Lyophilisierungsanlage getrocknet.

Aufreinigung der einfach postsynthetisch modifizierten DNA

Die semi-präparative Aufreinigung der DNA-Stränge wurden mittels Umkehrphasen-HPLC durchgeführt. Als Puffermedium wurde eine 50 mM Ammoniumacetat-Lösung verwendet. Die Detektionswellenlänge wurde für die DNA-charakteristische Wellenlänge bei $\lambda = 260$ nm und dem Absorptionsmaximum des jeweiligen Farbstoffes aufgezeichnet. Die Gradienten und Detektionswellenlängen sind Kapitel 10.3.5 zu entnehmen.

Die fraktioniert aufgenommenen Proben wurden anschließend mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie charakterisiert. Anschließend wurden die produktreinen Fraktionen vereinigt und das Lösungsmittel an einem *Christ Alpha AVC* Vakuumkonzentrator mit angeschlossener *Christ Alpha 1-2 LD Plus* Lyophilisierungsanlage entfernt (14 h, 25 °C, 0.1 mbar).

Charakterisierung mittels Massenspektrometrie

Zur Überprüfung der Reinheit wurden MALDI-TOF-Massenspektren an einem *Biflex-IV* Spektrometer von *Bruker Daltonics* und an einem *AXIMA Confidence* Spektrometer von *Shimadzu* im linear negativen Modus aufgenommen. Als Matrix wurde unter anderem eine Mischung aus 0.3 M 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (in Ethanol) und Diammoniumcitrat (0.1 M in *Millipore*-Wasser) im Verhältnis 2:1 (v = v) oder eine Mischung einer gesättigten Lösung von 3-Hydroxypicolinsäure (in 50 % Acetonitril in *Millipore*-Wasser) mit Diammoniumcitrat (0.1 M in *Millipore*-Wasser) im Verhältnis 9:1 (v = v) verwendet.

Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung DNA erfolgte analog dem *Beer-Lambert*-Gesetz bei $\lambda = 260$ nm:

$$A_{260\text{ nm}} = \varepsilon_{260\text{ nm}} \cdot c \cdot d \quad (\text{Gl. 10.3-1})$$

$A_{260\text{ nm}}$: Absorbanz bei $\lambda = 260$ nm, einheitslos.

$\varepsilon_{260\text{ nm}}$: Extinktionskoeffizient bei $\lambda = 260$ nm, in [$\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$].

c : Stoffmengenkonzentration der Lösung, in [mol/L].

d : Schichtdicke der durchstrahlten Lösung, in [cm].

Hierzu wurde die Absorbanz A bei $\lambda = 260$ nm an einem *ND-1000 Spectrophotometer* der Firma *NanoDrop* im Nukleinsäure-Modus bestimmt, wobei die Schichtdicke der durchstrahlten Lösung $d = 1$ cm betrug. Hierzu wurde jeweils 1.00 μL der Stammlösung verwendet. Der Extinktionskoeffizient des jeweiligen unmodifizierten Oligonukleotids wurde über folgende Gleichung bestimmt:

$$\varepsilon_{260\text{ nm}} = (dA \cdot \varepsilon_{dA} + dC \cdot \varepsilon_{dC} + dG \cdot \varepsilon_{dG} + dT \cdot \varepsilon_{dT}) \cdot 0.9 \quad (\text{Gl. 10.3-2})$$

$\varepsilon_{260\text{ nm}}$: Extinktionskoeffizient des Oligonukleotids bei $\lambda = 260$ nm, [$\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$].

dA, dC, dG, dT : Anzahl der jeweiligen Base in der Sequenz, einheitslos.

ε_{dA} : Extinktionskoeffizient von A bei $\lambda = 260$ nm, $\varepsilon_{dA} = 15.4$ [$10^4\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$].

ε_{dC} : Extinktionskoeffizient von C bei $\lambda = 260$ nm, $\varepsilon_{dC} = 7.3$ [$10^4\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$].

ε_{dG} : Extinktionskoeffizient von G bei $\lambda = 260$ nm, $\varepsilon_{dG} = 11.7$ [$10^4\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$].

ε_{dT} : Extinktionskoeffizient von T bei $\lambda = 260$ nm, $\varepsilon_{dT} = 8.8$ [$10^4\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$].

Der Faktor 0.9 berücksichtigt die Hypochromizität. Bei der Berechnung des Extinktionskoeffizienten der modifizierten Stränge wurde der Extinktionskoeffizient des jeweiligen Farbstoffes zu der modifizierten Base addiert.

10.3.2 Synthese von mehrfach postsynthetisch modifizierter DNA

Allgemeines

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte an einem *Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer* System von *Applied Biosystems (ABI)*. Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen *ABI* und *Proligo* bezogen. Die ultramild-abspaltbaren Phosphoramidite der natürlichen Basen (phenoxyacetyl-geschütztes A, dA^{Pac} ; 4-isopropyl(phenoxyacetyl)-geschütztes G, dG^{iPrPac} ; acetyl-geschütztes C, dC^{Ac} und ungeschütztes dT) wurden als 0.067 M Lösungen in Acetonitril (*amidite diluent* von *ABI*) eingesetzt. Die artifiziellen Bausteine 2'-O-Propargyluridin (cU) wurde von der Firma *ChemGenes* bezogen und als 0.083 M Lösungen in Acetonitril (*amidite diluent* von *ABI*) eingesetzt. Die selbst synthetisierte ultramild-abspaltbare Variante des 2'-O-Propargyladenosins (cA^{Pac} , **8**) kam analog der kommerziell erhältlichen, artifiziellen Basen zum Einsatz. Um die Umschätzung von dG^{iPrPac} zu dG^{Ac} zu vermeiden wurde als Cap A Phenoxyessigsäureanhydrid (Pac_2O) verwendet. Als feste Phase wurden CPG (*controlled pore glass*) mit einer Belegung von 1 μmol (500 Å) verwendet.

Kupplungsprotokolle für *Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer*

Zur Synthese von mehrfach modifizierter DNA wurde die Kupplungszeit aller Basen erhöht und die Synthese nach Einbau der auf den ersten Click-Baustein folgenden Base unterbrochen. Hierbei wurde die DMT-Schutzgruppe des zuletzt eingebauten Nukleosids nicht abgespalten (DMT-on). Nach der Click-Reaktion an der festen Phase wurde die DNA-Synthese fortgesetzt.

Tabelle 6: Modifikation des Coupling-Schrittes zum Einbau der ultramild-abspaltbaren Bausteine und cA^{Pac} .

Codierung	Funktion	Modus	Pulse	Zeit t_c [s]
		\$Coupling		
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	6	0
24	6 + Act	PULSE	5	0
24	6 + Act	PULSE	3	150
2	Act	PULSE	4	150
1	Wsh	PULSE	7	56
1	Wsh	PULSE	8	0

Click-Reaktion an der festen Phase (on bead)

In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 230 μL 10 mM Azidlösung (in DMSO / *tert*-BuOH v : v = 3 : 1), 50 μL 400 mM Natriumascorbatlösung (in *Millipore*-Wasser), 130 μL Acetonitril und 34 μL 100 mM Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat (in DMSO / *tert*-BuOH v : v = 3 : 1) vorgemischt. Die Festphase wurde mit Hilfe von zwei Spritzen, die an den Enden der CPG-Säulen befestigt waren, mit der Reaktionslösung bei 60 °C für 1.5 h versetzt. Dabei wurde die Festphase im Intervall von 30 min erneut umspült. Anschließend wurde die Reaktionslösung entfernt und die Festphase mit jeweils 3 mL Acetonitril, *Millipore*-Wasser, gesättigter Dinatrium-EDTA-Lösung (in *Millipore*-Wasser), *Millipore*-Wasser, Ethanol und abschließend mit 10 mL Acetonitril gewaschen. Nach Trocknen der CPG-Säule an einer *Christ Alpha 1-2 LD Plus* Lyophilisierungsanlage wurde die Oligonukleotidsynthese fortgesetzt.

Abspaltung von der festen Phase und Entschützung

Die Abspaltung unter milden basischen Bedingungen erfolgte mit 0.05 M Kaliumcarbonat (in Methanol). Hierzu wurde das CPG-Granulat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 mL 0.05 M Kaliumcarbonat (in Methanol) versetzt. Nach 24 h wurde die überstehende Lösung abgenommen und das CPG-Granulat drei Mal mit je 200 μ L *Millipore*-Wasser nachgewaschen. Die vereinigten Phasen wurden durch Zusatz von 6 μ L Eisessig neutralisiert und das Lösungsmittel an einem *Christ Alpha AVC* Vakuumkonzentrator mit angeschlossener *Christ Alpha 1-2 LD Plus* Lyophilisierungsanlage entfernt (60 min, Heizung: 55 min, 40 °C, 100 mbar; dann: 14 h, 25 °C, 0.1 mbar).

*Postsynthetische Click-Konjugation, Aufreinigung, Charakterisierung mittels**MALDI-TOF-Massenenspektrometrie und Konzentrationsbestimmung*

Die postsynthetische Modifikation mit dem zweiten Fluorophor, dessen Aufreinigung, Charakterisierung mittels MALDI-TOF-MS und deren Konzentrationsbestimmung erfolgte analog der Vorschriften in Kapitel 10.3.1.

10.3.3 HPLC-Methoden und Charakterisierung

Zur Aufreinigung der verwendeten Oligodesoxyribonukleotide wurden folgende HPLC-Methoden verwendet:

Tabelle 7: HPLC-Methoden zur Aufreinigung der einfach farbstoffmarkierten DNA-Stränge. G: Laufzeit des Gradienten, I: isokrate Laufzeit.

DNA und Modifikation	Gradient in %	Laufzeit in min	Temperatur in °C	Detektionswellenlänge
ssH	0 – 20	30G/10I	40	260, 498
ssH3	0 – 20	30G/10I	40	260, 498
ssH8	0 – 20	30G/10I	40	260, 498
ssOMeH8	0 – 20	30G/10I	40	260, 498
ssOMe	0 – 20	30G/10I	40	260, 498
ssOMe3	0 – 20	30G/10I	40	260, 498
ssBr	0 – 20	30G/10I	40	260, 498
ssBr3	0 – 20	30G/10I	40	260, 498
ssA	0 – 20	30G/10I	40	260, 498
ssA3	0 – 20	30G/10I	40	260, 498
ssCN	0 – 20	30G/10I	40	260, 498
ssCN3	0 – 20	30G/10I	40	260, 498
ssPyA3	0 – 15	30G/10I	40	260, 350
ssPyCN3	0 – 15	30G/10I	40	260, 350
ss ² PyCN3	0 – 15	30G/10I	40	260, 350
ssPyInA	0 – 15	30G/10I	40	260, 350
ssL2PhIn	0 – 20	30G/10I	40	260, 350

Zur Aufreinigung der verwendeten Oligoribonukleotide wurde das HPLC-System über Nacht mit Ethanol gespült. Die verwendete 50 mM Ammoniumacetat-Puffer wurden mit RNase-freiem *Millipore*-Wasser hergestellt.

10.4 Charakterisierung der Cyanin-Styryl-Farbstoffe

10.4.1 Strukturbezeichnungen

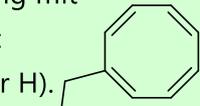
Die synthetisierten Farbstoffe wurden zur besseren Zuordnung von Messwert und Struktur nach folgender Nomenklatur benannt:

Nomenklatur

1. Kovalente Bindung an Oligonukleotid:
Freier Farbstoff / an ssDNA / an dsDNA?
Präfix: Funktion / ss / ds

2. Derivatisierung des Chinoliniumteils:
R¹ wird nur benannt, wenn nicht H.
OMe

3. Derivatisierung der Indolfunktion/
Substitution mit 7-Azaindol:
R² werden immer benannt.
OMe **Br** 7-Azaindol **CN**

4. Methylierung / Alkylierung mit
Tripletzustandslöschern:
R³ immer benannt (außer H).
Indol-N: methyliert, oder
CH₃ **3** .  COT **8** .

Leitstruktur des CyIQ

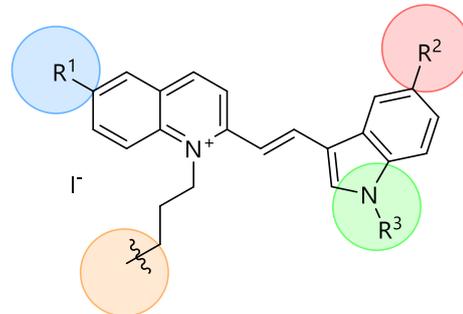


Abbildung 89: Nomenklatorsystem für Cyanin-Styryl-Farbstoffe vom CyIQ-Typ.

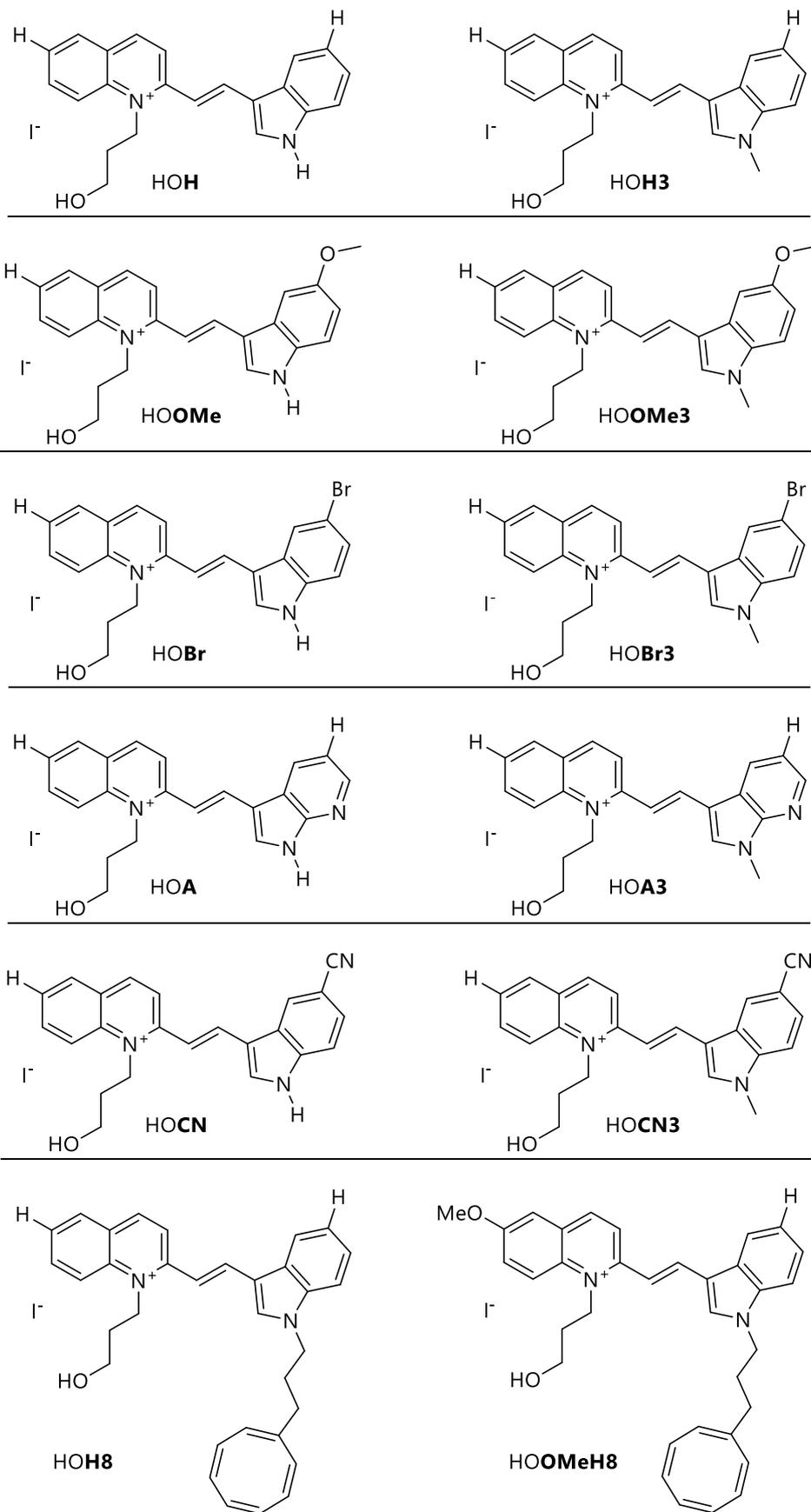


Abbildung 90: Strukturbezeichnungen der CyIQ-Derivate nach der eingeführten Nomenklatur.

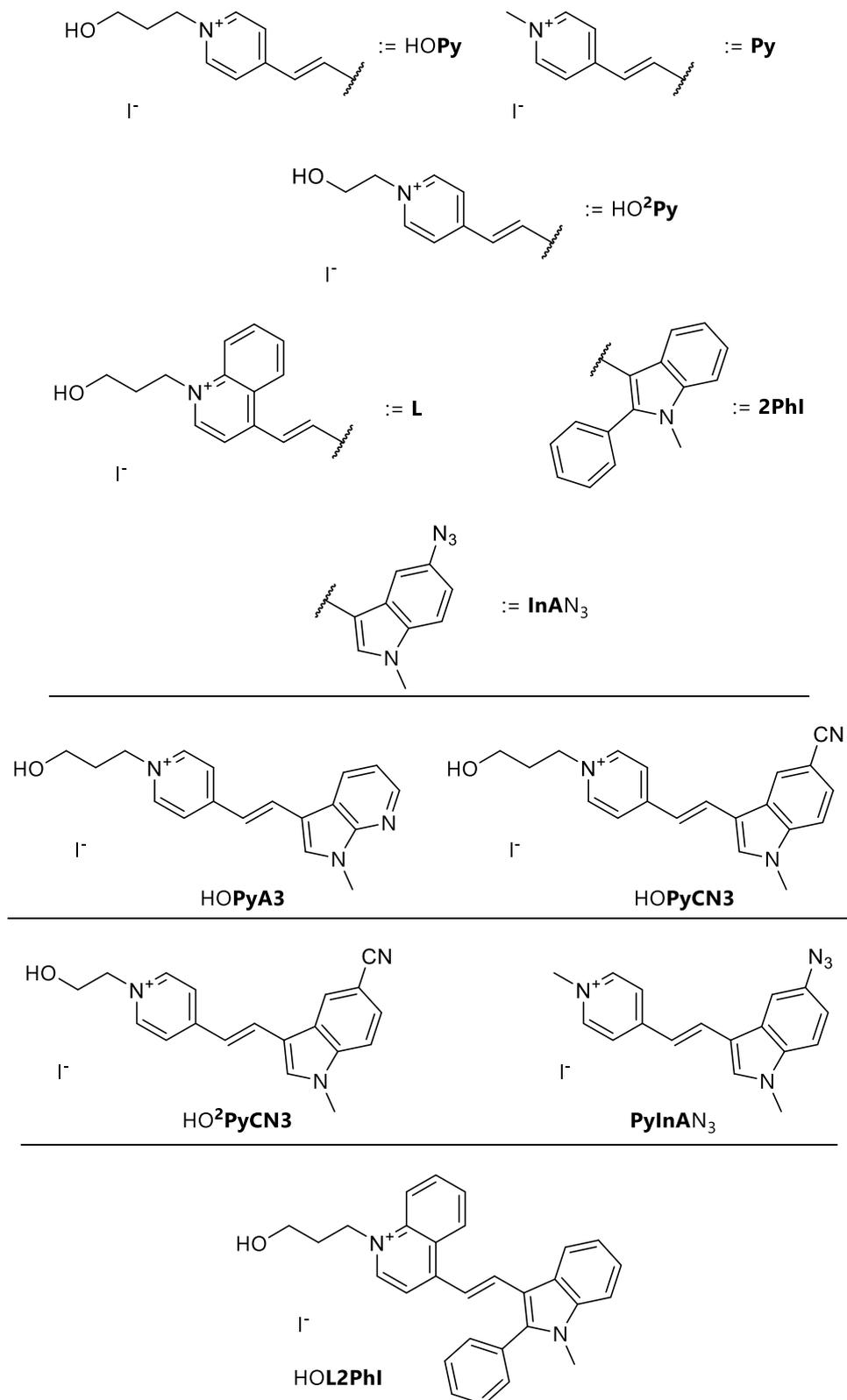


Abbildung 91: Weitere Strukturen und deren Bezeichnungen.

10.4.2 Extinktionskoeffizienten

Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten wurde eine bestimmte Menge des jeweiligen Farbstoffs in 20 % Ethanol (99.6 %) gelöst. Insgesamt wurden fünf Proben pro Farbstoff angesetzt. Zu diesem Zweck wurde der eingewogene Farbstoff zuerst in 10 ml Ethanol (99.6 %) gelöst und im Ultraschallbad für 10 Minuten behandelt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit *Millipore*-Wasser auf 50 mL aufgefüllt. Diese Lösungen (in 20 % Ethanol) wurden mit 20 % Ethanol weiter verdünnt ($v = v, 1 : 1$), um zehn verschiedene Farbstoffkonzentrationen zu erhalten. Aus jeder der erhaltenen Lösungen wurde ein Absorptionsspektrum aufgenommen und die Absorbanz im jeweiligen Maximum (λ_{max}) gegen die Konzentration c der jeweiligen Farbstofflösung aufgetragen. Zu diesem Zweck wurde eine Quarzglasküvette mit einer Schichtdicke $d = 1$ cm verwendet. Die Absorptionsspektren wurden mit einem Lambda 750 UV / VIS-Spektrometer mit Temperaturregler (PTP 6 + 6 Peltier Temperature Programmer) von PerkinElmer aufgenommen. Gemäß dem *Beer-Lambert*-Gesetz werden die Extinktionskoeffizienten als Steigung der Regressionsgeraden erhalten. Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten wurden nur Extinktionswerte kleiner eins verwendet, um die Linearität der Detektorempfindlichkeit zu gewährleisten. Weiterhin wurde der Extinktionskoeffizient bei $\lambda = 260$ nm bestimmt, um die Konzentrationen der modifizierten DNA-Stränge bestimmen zu können.

Tabelle 8: Molare, dekadische Extinktionskoeffizienten der Cyanin-Styryl-Farbstoffe bei langwelligstem Maximum (ϵ_{max}) und 260 nm (ϵ_{260nm}) in 20 % Ethanol.

Farbstoff	λ_{max} in nm	ϵ_{max} in 10^3 L mol ⁻¹ cm ⁻¹	$\Delta\epsilon_{max}$ in 10^3 L mol ⁻¹ cm ⁻¹	ϵ_{260nm} in 10^3 L mol ⁻¹ cm ⁻¹
HOH	465	41.7	0.14	9.2
HOH3 ^[a]	471	43.7	0.49	10.8
HOH8	477	45.1	0.71	9.2
HOOMeH8	475	43.7	1.49	9.9
HOOMe	471	43.7	0.49	10.8
HOOMe3	481	45.9	0.4	8.4
HOBr	459	39.5	0.37	9.7
HOBr3	476	39.5	0.62	10.5
HOA	435	37.2	1.01	11.1
HOA3	444	33.4	0.48	12.6
HOCN	447	33.6	0.44	15.0
HOCN3	456	29.3	0.13	21.0
HOPyA3	422	19.9	0.22	12.5
HOPyCN3	412	18.9	0.26	18.7
HO ² PyCN3 ^[b]	-	-	-	-
PyInAN ₃ ^[c]	438	22.6	0.18	24.2
HOL2PhIn ^[a]	507	31.1	-	13.1

^[a]Dieser Extinktionskoeffizient wurde in 10 % Ethanol in *Millipore*-Wasser von *P. Bohländer* bestimmt.^[9-10]

^[b]Es wurden die gleichen Werte verwendet, wie für HOPyCN3.

^[c]Dieser Extinktionskoeffizient wurde in 20 % Ethanol in *Millipore*-Wasser von *J. Gebhard* bestimmt.

10.4.3 Photostabilität

Der Photoreaktor FRITZ mit eingebautem Temperaturregler und eingebauter Luftkühlung wurde für die Belichtungsexperimente verwendet. Dieser Photoreaktor wurde von M. Weinberger und der Feinmechanischen Werkstatt Chemie/Pharmazie der Universität Regensburg entwickelt und gebaut. LEDs von Nichia mit einer Wellenlänge von $\lambda_{LED} = 468, 520$ und 625 nm wurden für die Belichtungsexperimente verwendet, und die Temperatur wurde konstant bei 20°C gehalten.

Eine Lösung bestehend aus jeweils $2.5\ \mu\text{M}$ Farbstoff-DNA-Bikonjugat, $10\ \text{mM}$ NaP_i -Puffer (pH 7) und $250\ \text{mM}$ NaCl in Millipore-Wasser wurde in einer Quarzglasküvette mit Schichtdicke $d = 1\ \text{cm}$ vorgelegt und in bestimmten Zyklen im Photoreaktor FRITZ belichtet. Zwischen jedem Zyklus wurden Emissionsspektren aufgenommen. Nach insgesamt vier Halbwertszeiten $t_{1/2}$ wurde das Belichtungsexperiment beendet und die Halbwertszeiten in allen Fällen als monoexponentieller Zerfall bestimmt.

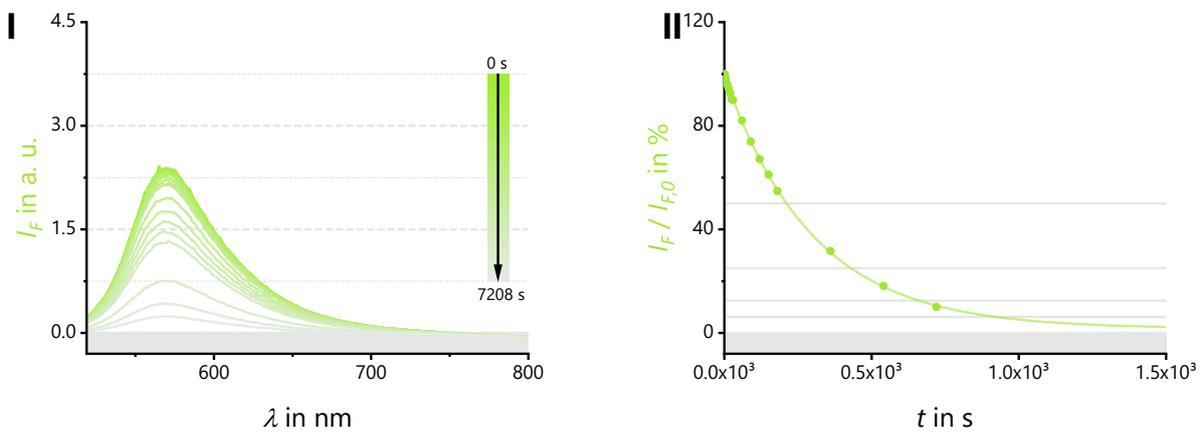


Abbildung 92: Emissionsspektren (I) und prozentuale Fluoreszenzabnahme (II) im zeitlichen Verlauf von ssH bei Belichtung mit einer 468 nm-LED.

ssH3

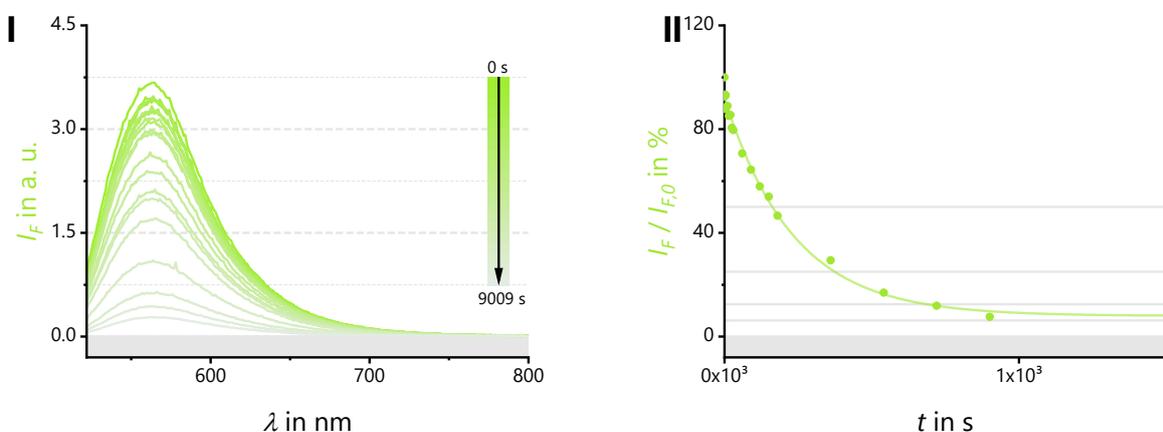


Abbildung 93: Emissionsspektren (I) und prozentuale Fluoreszenzabnahme (II) im zeitlichen Verlauf von ssH3 bei Belichtung mit einer 468 nm-LED.

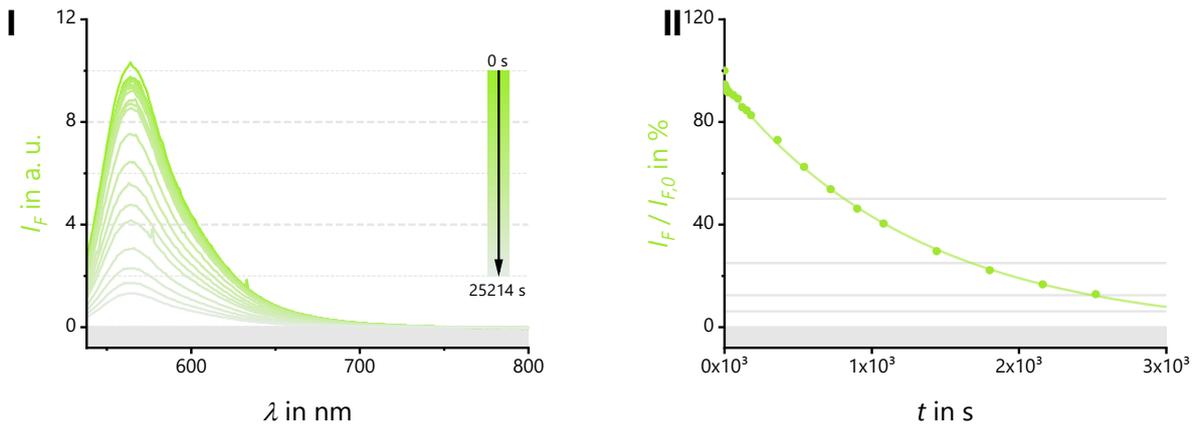


Abbildung 94: Emissionsspektren (I) und prozentuale Fluoreszenzabnahme (II) im zeitlichen Verlauf von ssH8 bei Belichtung mit einer 468 nm-LED.

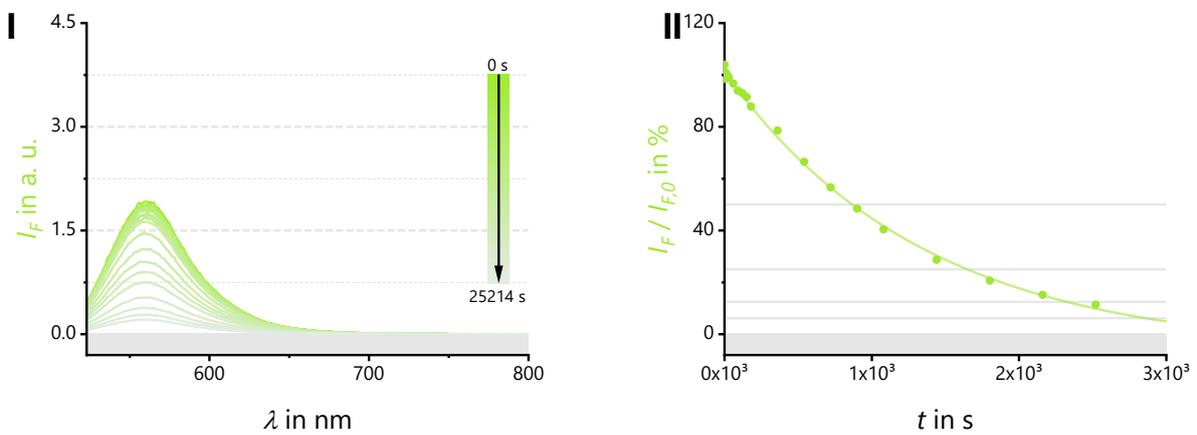


Abbildung 95: Emissionsspektren (I) und prozentuale Fluoreszenzabnahme (II) im zeitlichen Verlauf von ssOMeH8 bei Belichtung mit einer 468 nm-LED.

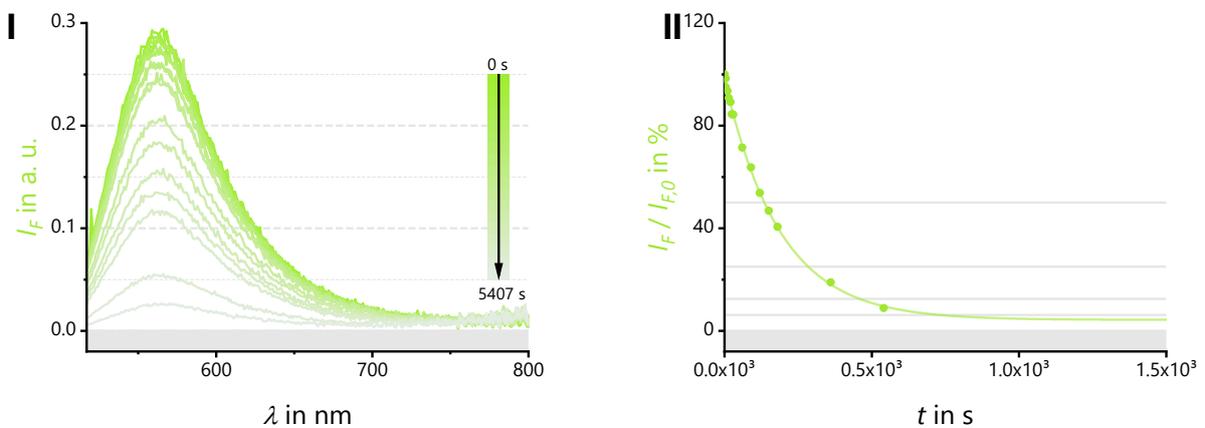


Abbildung 96: Emissionsspektren (I) und prozentuale Fluoreszenzabnahme (II) im zeitlichen Verlauf von ssOMe bei Belichtung mit einer 468 nm-LED.

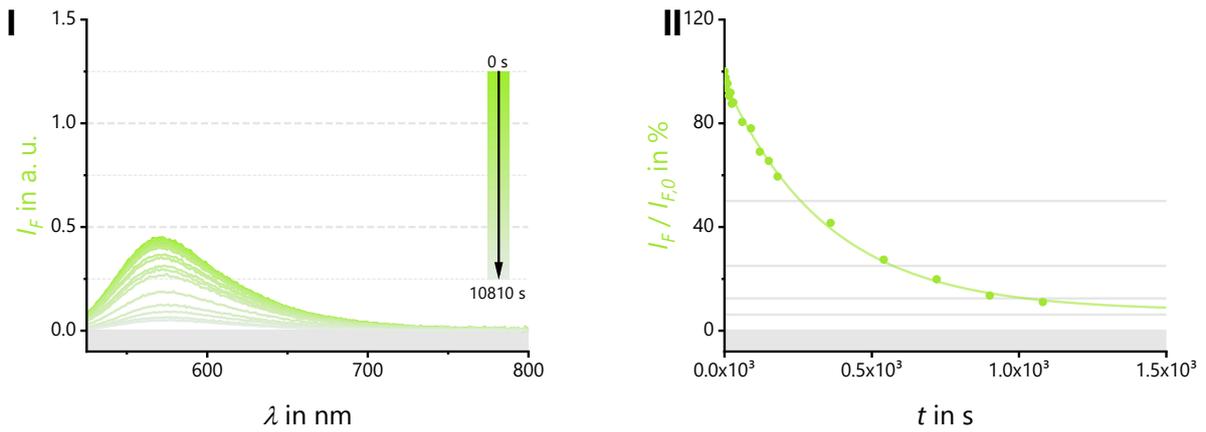


Abbildung 97: Emissionsspektren (I) und prozentuale Fluoreszenzabnahme (II) im zeitlichen Verlauf von ssOMe3 bei Belichtung mit einer 468 nm-LED.

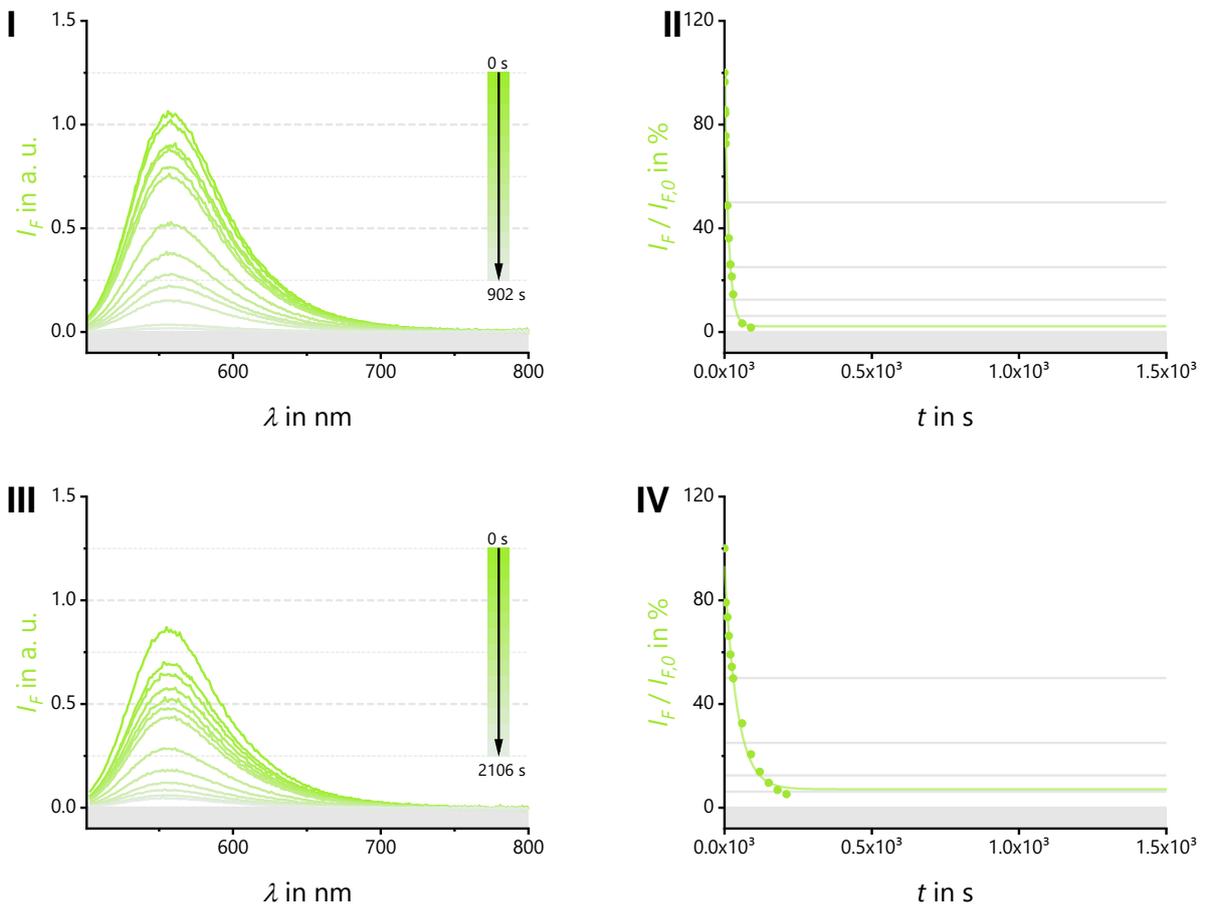


Abbildung 98: Emissionsspektren (I) und prozentuale Fluoreszenzabnahme (II) im zeitlichen Verlauf von ssBr bei Belichtung mit einer 468 nm-LED (I, II) und 520 nm-LED (III, IV).

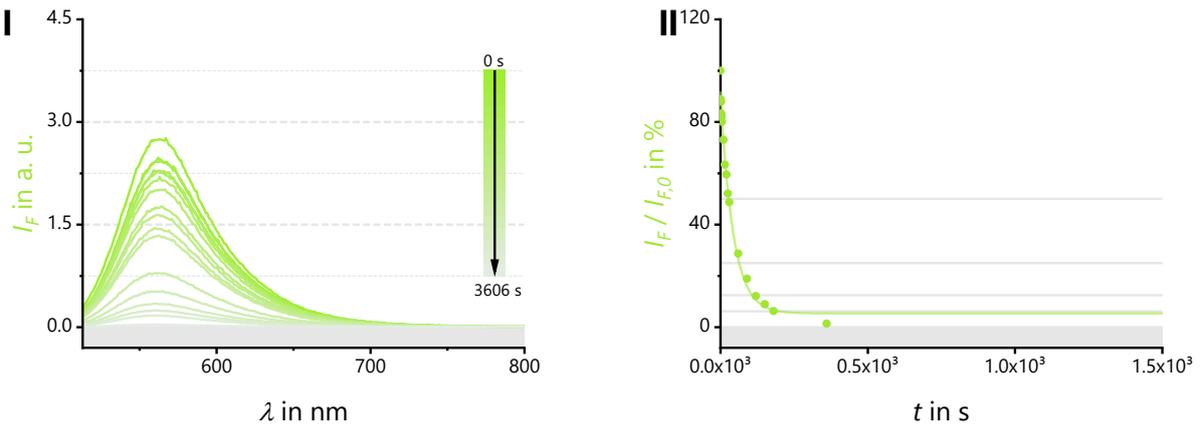


Abbildung 99: Emissionsspektren (I) und prozentuale Fluoreszenzabnahme (II) im zeitlichen Verlauf von ssBr3 bei Belichtung mit einer 468 nm-LED.

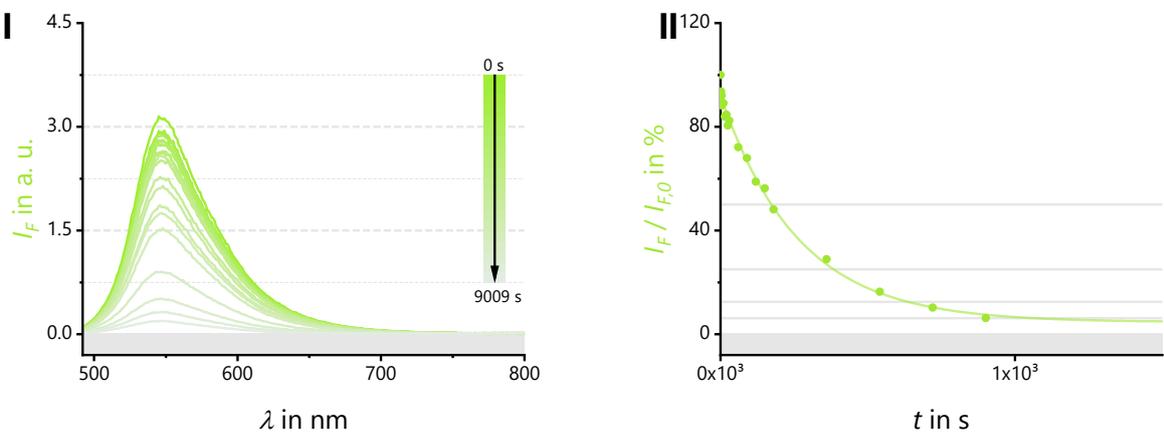


Abbildung 100: Emissionsspektren (I) und prozentuale Fluoreszenzabnahme (II) im zeitlichen Verlauf von ssA bei Belichtung mit einer 468 nm-LED.

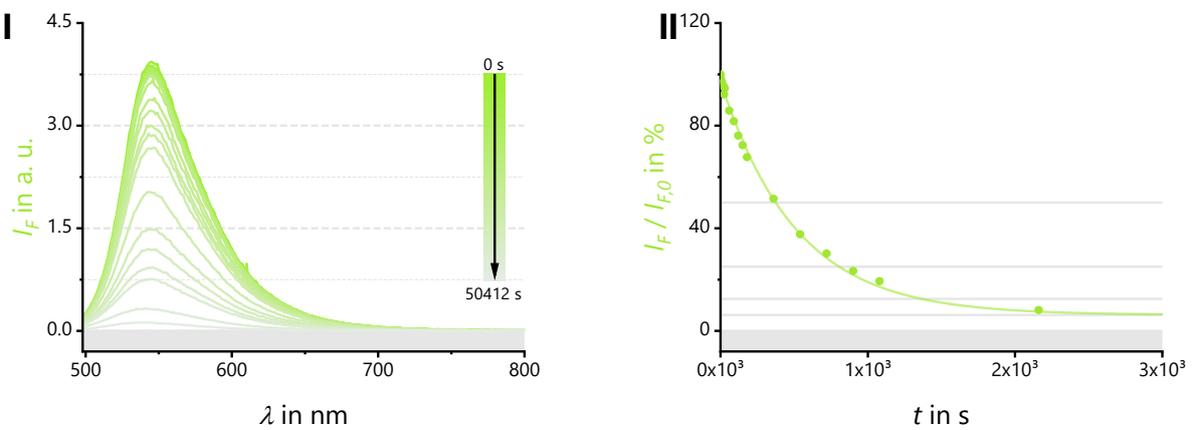


Abbildung 101: Emissionsspektren (I) und prozentuale Fluoreszenzabnahme (II) im zeitlichen Verlauf von ssA3 bei Belichtung mit einer 468 nm-LED.

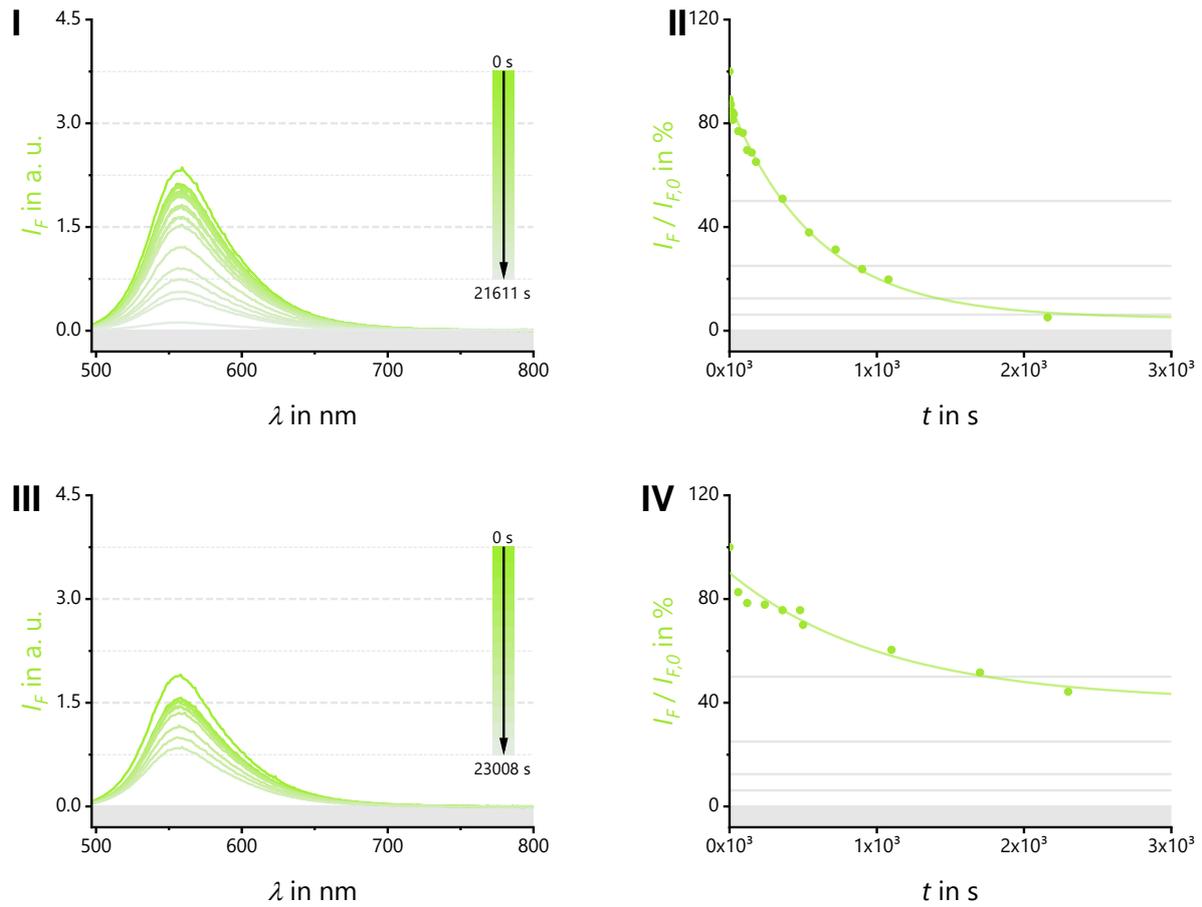


Abbildung 102: Emissionsspektren (I) und prozentuale Fluoreszenzabnahme (II) im zeitlichen Verlauf von ssCN bei Belichtung mit einer 468 nm-LED (I, II) und 520 nm-LED (III, IV).

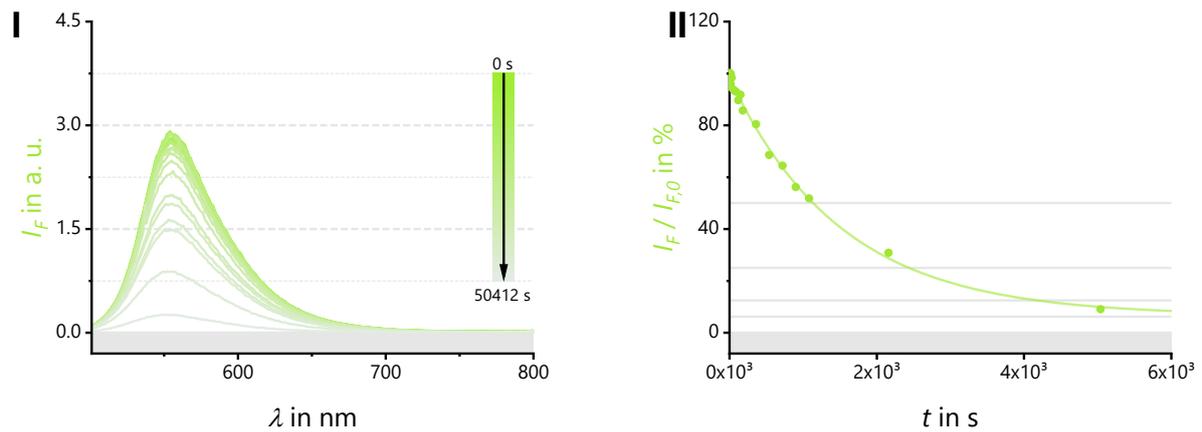


Abbildung 103: Emissionsspektren (I) und prozentuale Fluoreszenzabnahme (II) im zeitlichen Verlauf von ssCN3 bei Belichtung mit einer 468 nm-LED.

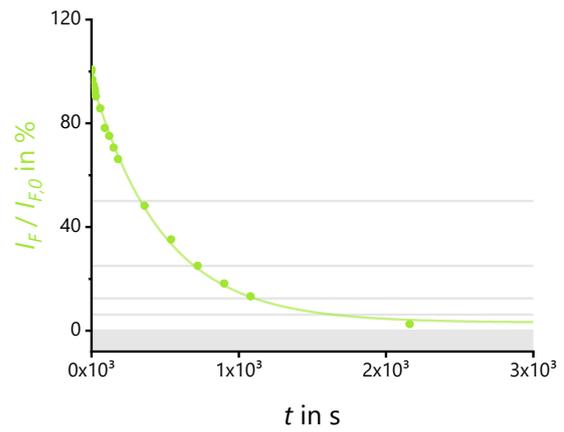
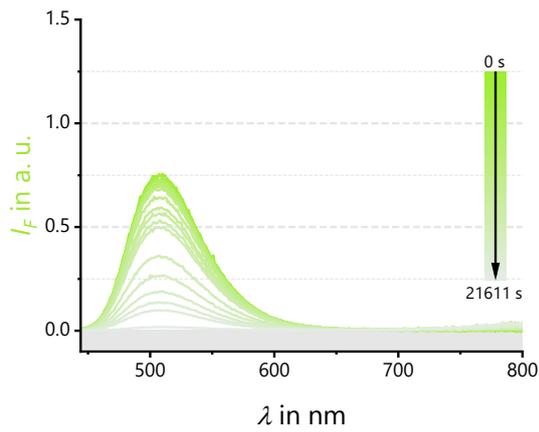


Abbildung 104: Emissionsspektren (I) und prozentuale Fluoreszenzabnahme (II) im zeitlichen Verlauf von ssPyA3 bei Belichtung mit einer 408 nm-LED.

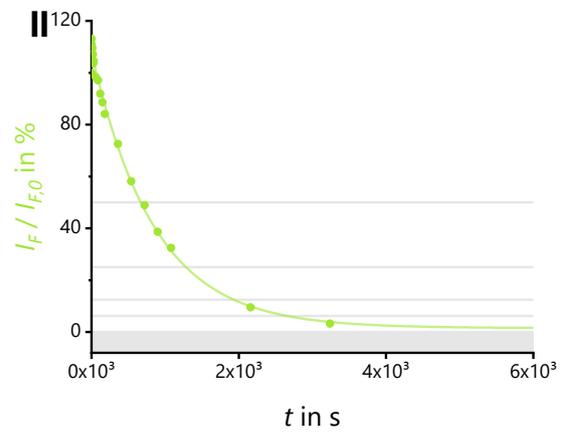
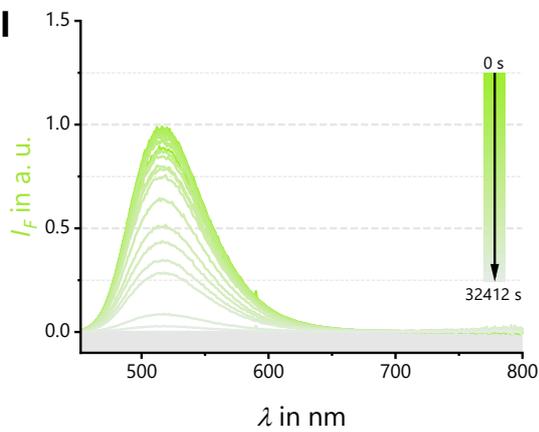


Abbildung 105: Emissionsspektren (I) und prozentuale Fluoreszenzabnahme (II) im zeitlichen Verlauf von ssPyCN3 bei Belichtung mit einer 408 nm-LED.

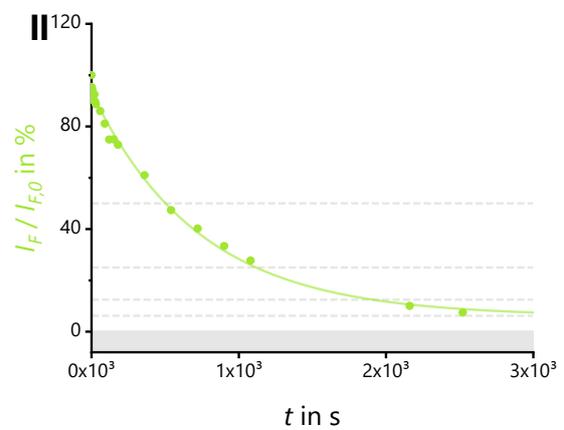
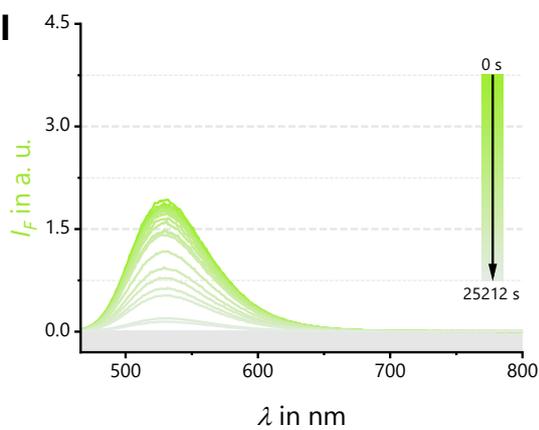


Abbildung 106: Emissionsspektren (I) und prozentuale Fluoreszenzabnahme (II) im zeitlichen Verlauf von ss²PyCN3 bei Belichtung mit einer 408 nm-LED.

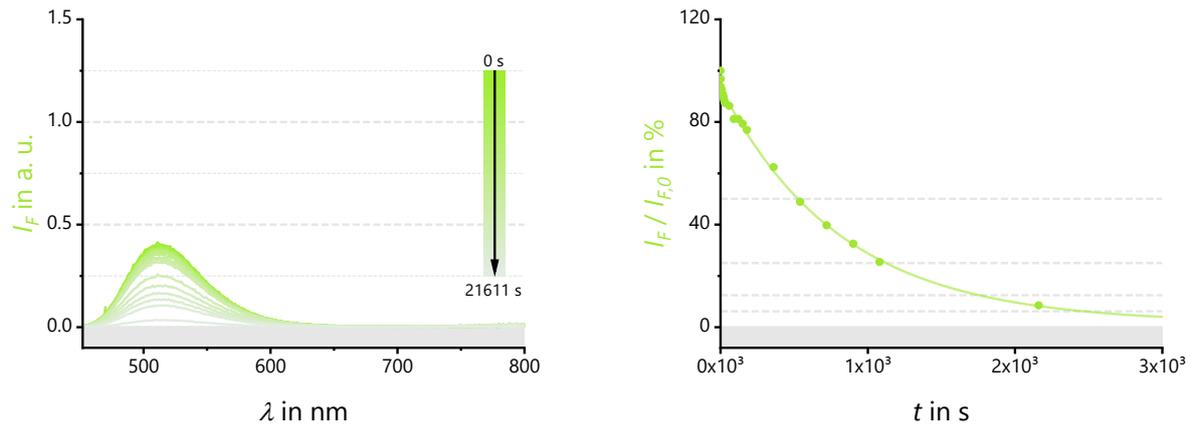


Abbildung 107: Emissionsspektren (I) und prozentuale Fluoreszenzabnahme (II) im zeitlichen Verlauf von ssPyInA bei Belichtung mit einer 408 nm-LED.

Tabelle 9: Zerfallskonstante k und Halbwertszeit $t_{1/2}$ bei Belichtung.

DNA und Modifikation	λ_{LED} in nm	k in 10^{-4} s^{-1}	Δk in 10^{-4} s^{-1}	$t_{1/2}$ in s	$\Delta t_{1/2}$ in s
ssH	468	3.32	0.07	2087	41
ssH3	468	4.26	0.32	1626	124
ssH8	468	0.76	0.04	9126	486
ssOMeH8	468	0.74	0.03	9329	414
ssOMe	468	5.31	0.19	1305	47
ssOMe3	468	2.85	0.15	2435	130
ssBr	468	70.4	2.76	98	4
ssBr3	520	23.1	2.19	300	29
ssA	468	23.2	1.69	299	22
ssA3	468	3.79	0.29	1828	139
ssA3	468	1.96	0.07	3538	133
ssCN	468	1.67	0.17	4138	430
ssCN	520	0.94	0.44	7388	3462
ssCN3	468	0.66	0.03	10523	534
ssPyA3	408	2.09	0.08	3321	132
ssPyCN3	408	1.18	0.07	5887	357
ss ² PyCN3	408	1.37	0.08	5076	329
ssPyInA	408	1.22	0.08	5691	416

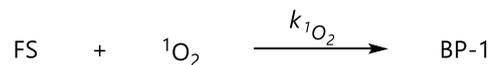
10.4.4 Stabilität gegenüber Singulett-Sauerstoff

Ohne externe Strahlungsquelle wurde Singulett-Sauerstoff über eine molybdatkatalysierte Spaltung von Wasserstoffperoxid generiert. Hierbei wurde eine Lösung bestehend aus

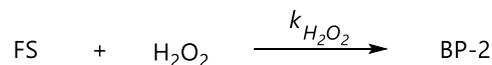
- 16 μl 500 μM Lösung des jeweiligen Farbstoffes (FS) in Ethanol (99.6 %)
- 16 μl 50 mM Natriummolybdat in *Millipore*-Wasser
- 80 μl 100 mM NaPi (pH 9)
- und 672 μl *Millipore*-Wasser

15 Minuten bei 20 °C in einer geschlossenen Küvette äquilibriert. Anschließend wurden 16 μL 2.5 M Wasserstoffperoxid zugegeben und die verschlossene Küvette zur optimalen Durchmischung wiederholt umgedreht. Eine Minute nach Zugabe wurde mit der zeitabhängigen Aufnahme von Absorptionsspektren begonnen. Die Absorbanz im jeweiligen Absorptionsmaximum wurde dann gegen die Zeit aufgetragen. Aufgrund der Hintergrundreaktion mit Wasserstoffperoxid wurde das gleiche Experiment ohne Zusatz von Natriummolybdat durchgeführt. Aus beiden, der molybdatkatalysierten Reaktion (Bleichprodukt 1 und 2; BP-1 und BP-2) und der Reaktion mit Wasserstoffperoxid (Bleichprodukt 2; BP-2), wurde die jeweilige Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung bestimmt. Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion mit Singulett-Sauerstoff ($k_{^1\text{O}_2}$) wurde anschließend durch Subtraktion der Gesamtgeschwindigkeitskonstante ($k_{^1\text{O}_2} + k_{\text{H}_2\text{O}_2}$) mit der Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{H}_2\text{O}_2}$, welche aus dem Kontrollexperiment ohne Natriummolybdat ermittelt wurde, bestimmt. Zusätzlich wurde ein Kontrollversuch mit Natriummolybdat allein durchgeführt, um eine weitere Nebenreaktion auszuschließen. Hierbei wurde Wasserstoffperoxid durch *Millipore*-Wasser ersetzt.

Reaktionen des Farbstoffes bei molybdatkatalysierter Generierung von Singulett-Sauerstoff:



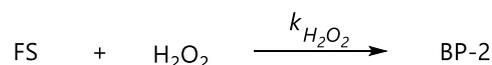
mit der Parallelreaktion



$$-\frac{d[\text{FS}]}{dt} = k_{^1\text{O}_2}[\text{FS}] + k_{\text{H}_2\text{O}_2}[\text{FS}] \Rightarrow \ln\left(\frac{[\text{FS}]_0}{[\text{FS}]}\right) = (k_{^1\text{O}_2} + k_{\text{H}_2\text{O}_2})t$$

$$\frac{d}{dt}\left[\ln\left(\frac{[\text{FS}]_0}{[\text{FS}]}\right)\right] = k_{^1\text{O}_2} + k_{\text{H}_2\text{O}_2} \Rightarrow k_{\text{TBP1}} = \frac{d}{dt}\left[\ln\left(\frac{[\text{FS}]_0}{[\text{FS}]}\right)\right] - k_{\text{H}_2\text{O}_2}$$

Reaktion mit Wasserstoffperoxid:



$$\frac{d[\text{FS}]}{dt} = k_{\text{H}_2\text{O}_2}[\text{FS}] \Rightarrow k_{\text{H}_2\text{O}_2} = \frac{d}{dt}\left[\ln\left(\frac{[\text{FS}]_0}{[\text{FS}]}\right)\right]$$

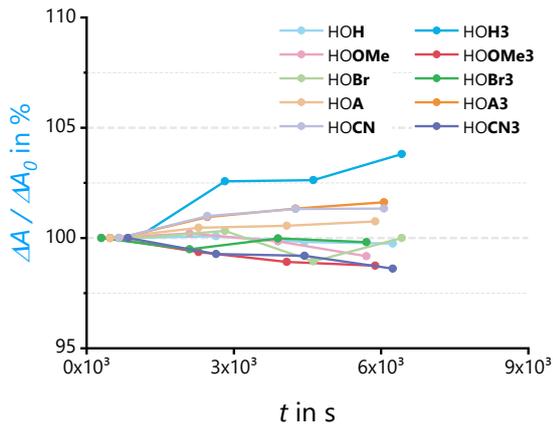


Abbildung 108: Untergrundreaktion mit Natriummolybdat anhand ausgewählter Chromophore.

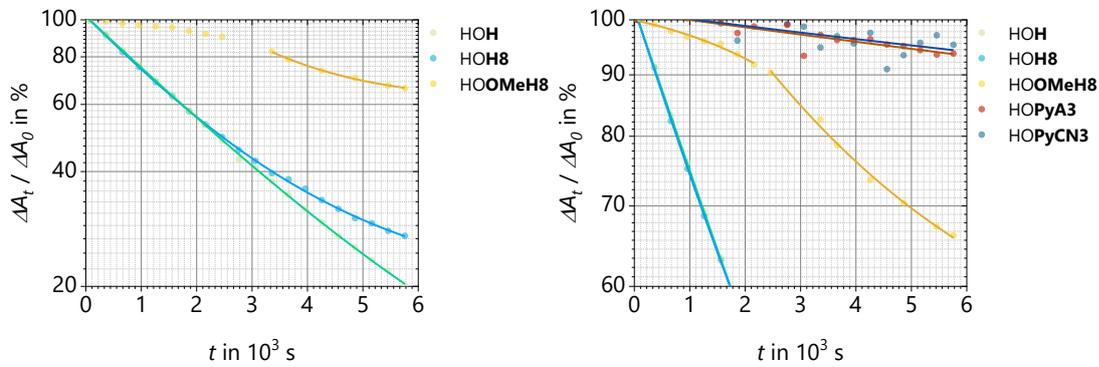


Abbildung 109: Reaktivität von HOH, HOH8, HOOMeH8, HOPyA3 und HOCN3 mit Singulett-Sauerstoff.

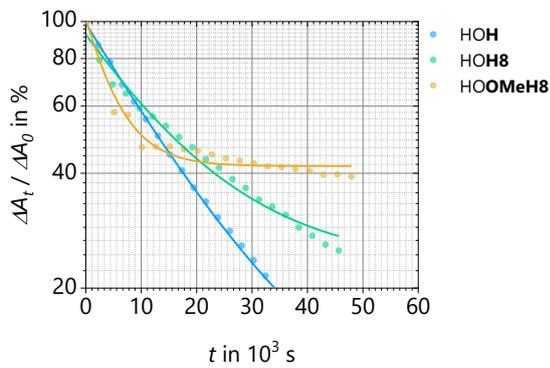


Abbildung 110: Reaktivität von HOH, HOH8 und HOOMeH8 mit Wasserstoffperoxid.

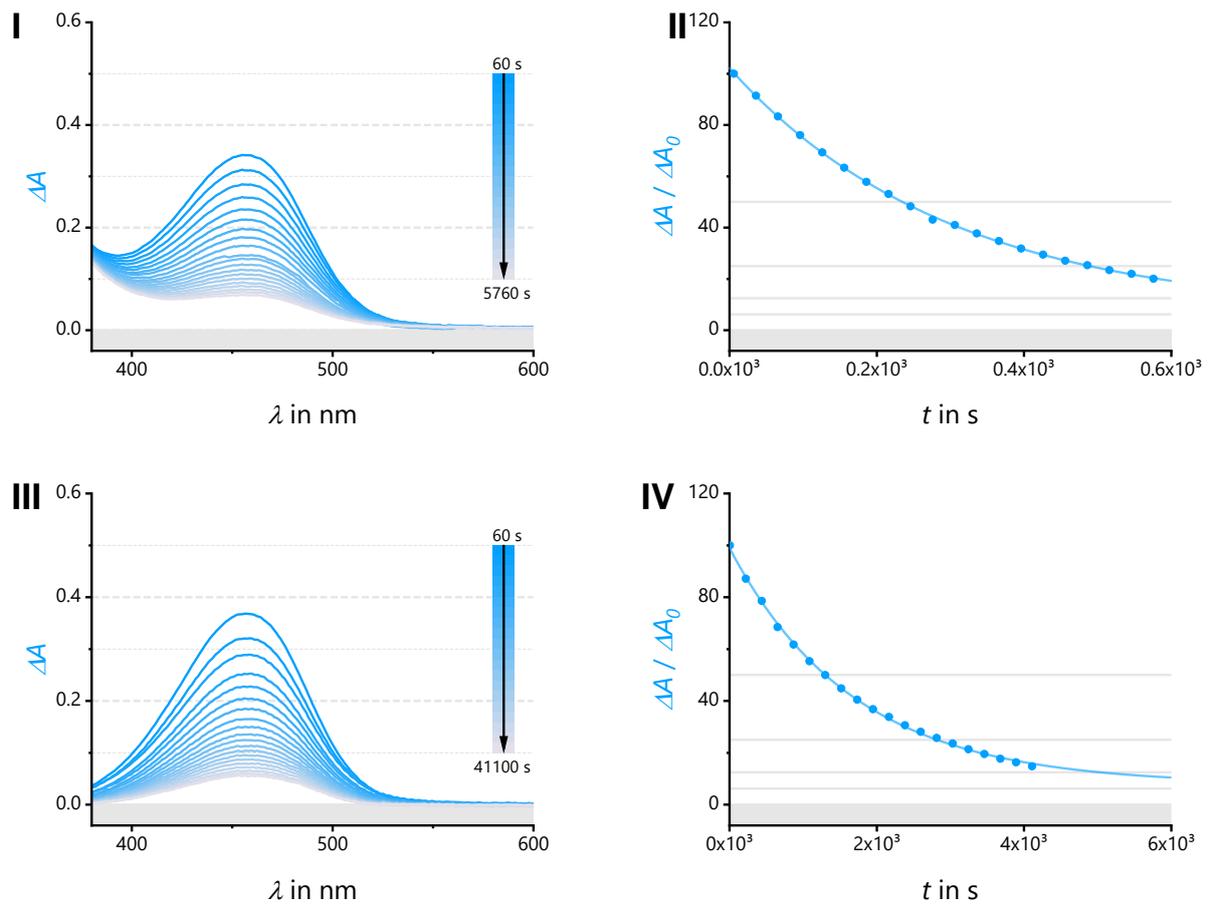


Abbildung 111: Absorptionsspektren (I, III) und prozentuale Abnahme der Absorbanz (II, IV) der Chromophorbände von HOH im zeitlichen Verlauf der Reaktionen mit Singulett-Sauerstoff (I, II) und Wasserstoffperoxid (III, IV).

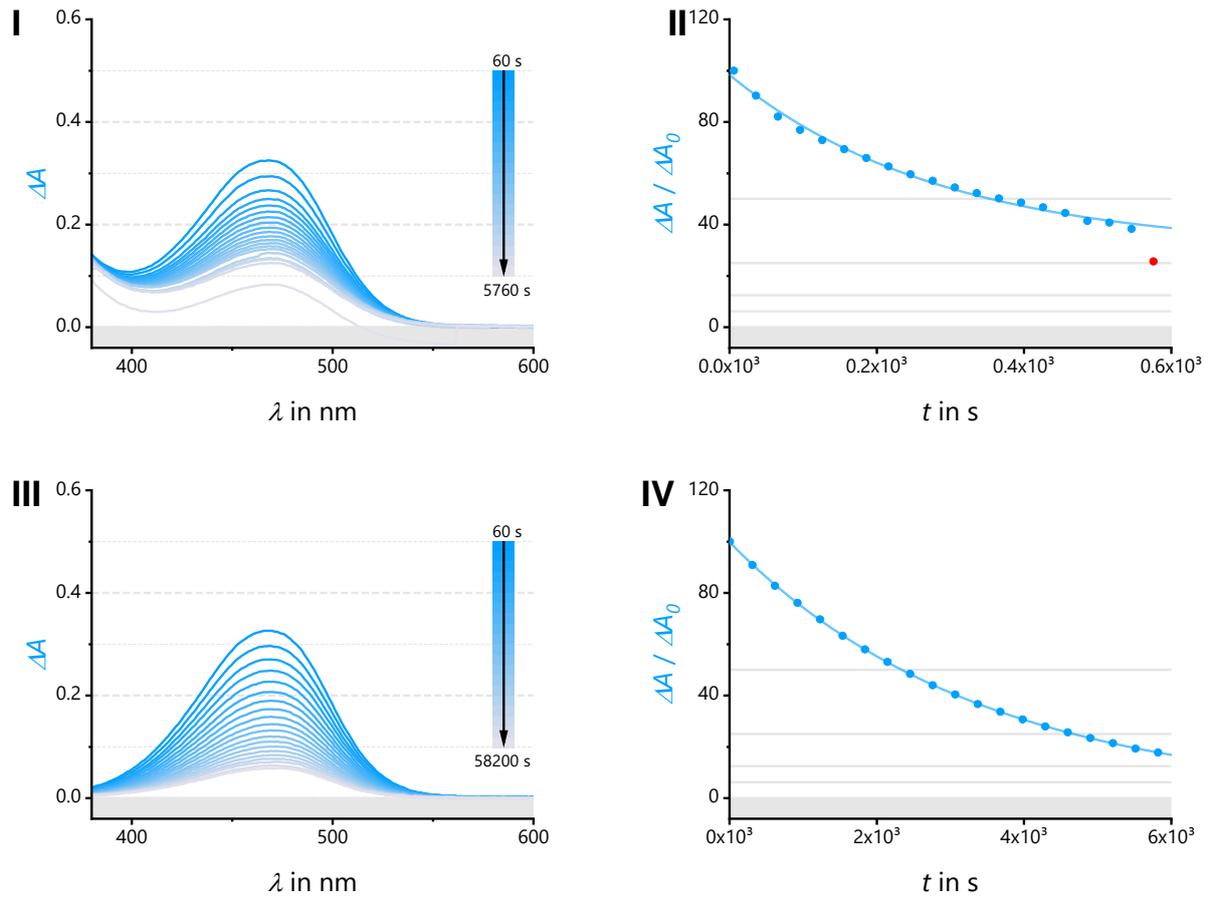


Abbildung 112: Absorptionsspektren (I, III) und prozentuale Abnahme der Absorbanz (II, IV) der Chromophorbande von HOH3 im zeitlichen Verlauf der Reaktionen mit Singulett Sauerstoff (I, II) und Wasserstoffperoxid (III, IV).

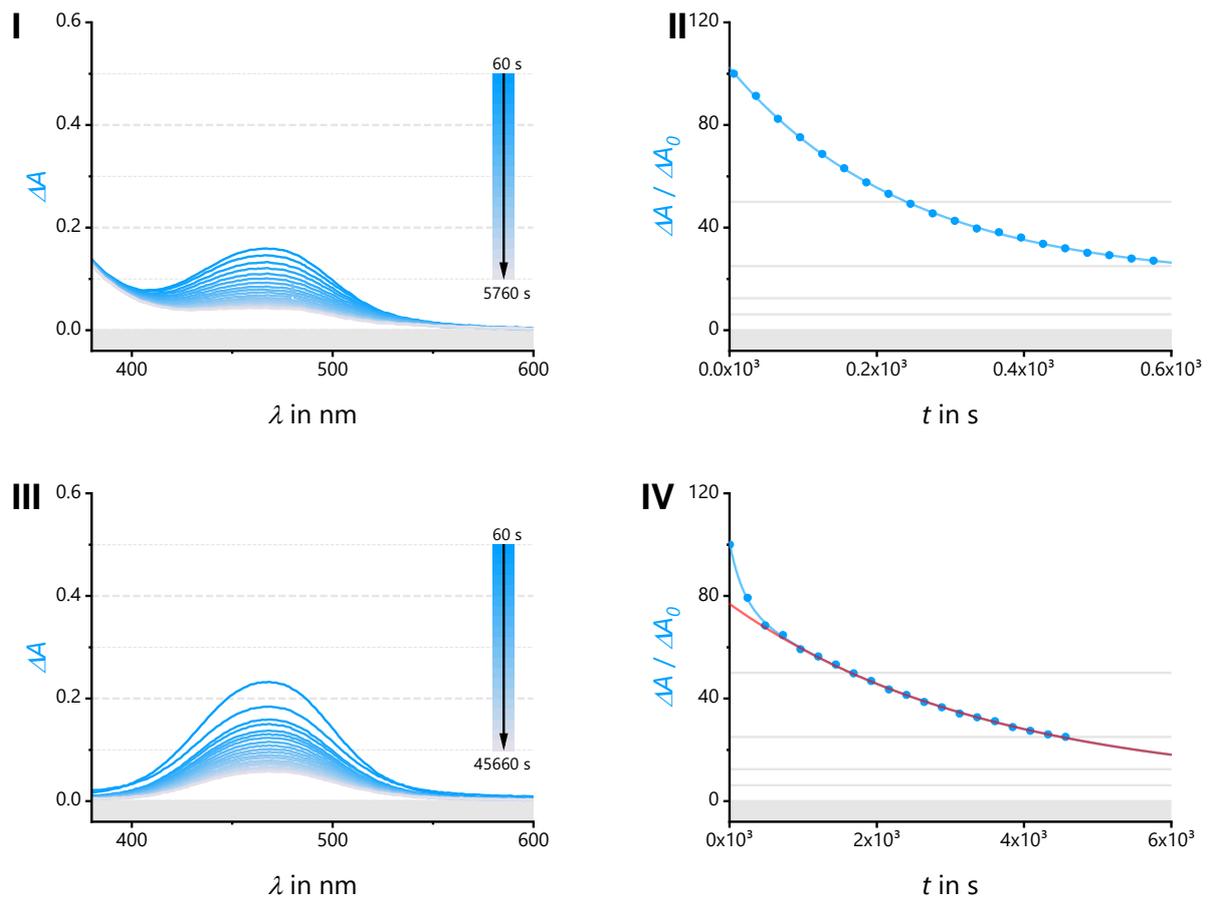


Abbildung 113: Absorptionsspektren (I, III) und prozentuale Abnahme der Absorbanz (II, IV) der Chromophorbande von HOH8 im zeitlichen Verlauf der Reaktionen mit Singulett Sauerstoff (I, II) und Wasserstoffperoxid (III, IV).

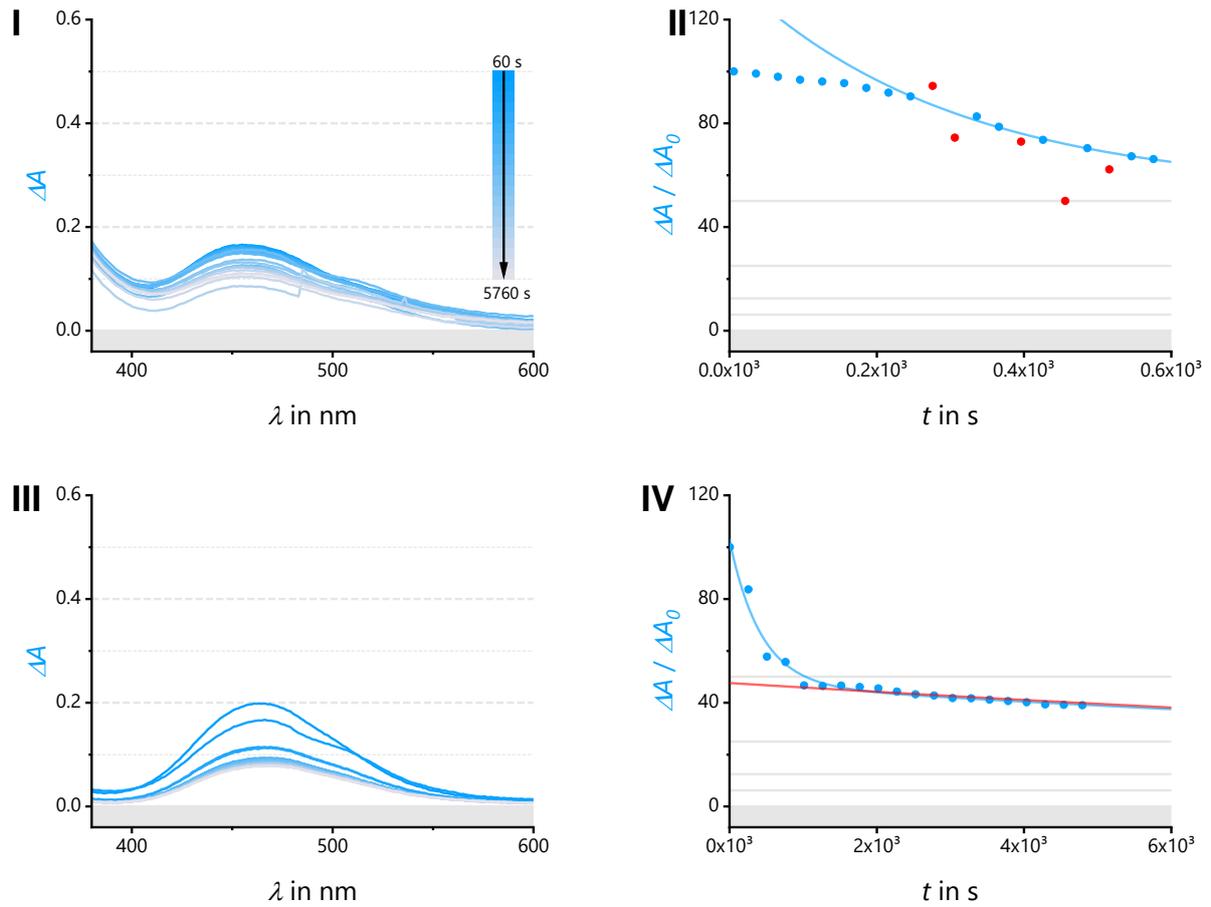


Abbildung 114: Absorptionsspektren (I, III) und prozentuale Abnahme der Absorbanz (II, IV) der Chromophorbande von HOOMeH8 im zeitlichen Verlauf der Reaktionen mit Singulett Sauerstoff (I, II) und Wasserstoffperoxid (III, IV).

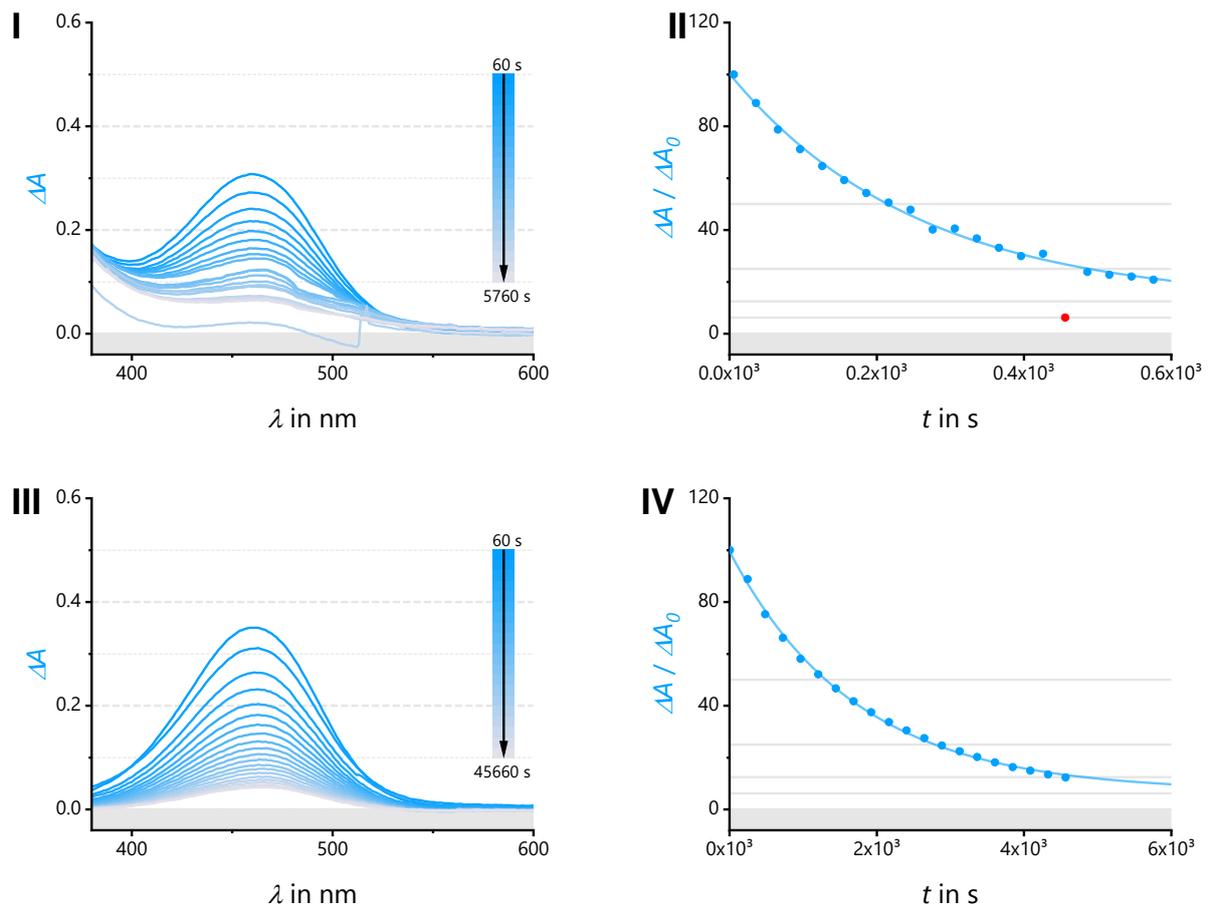


Abbildung 115: Absorptionsspektren (I, III) und prozentuale Abnahme der Absorbanz (II, IV) der Chromophorbande von HOOMe im zeitlichen Verlauf der Reaktionen mit Singulett Sauerstoff (I, II) und Wasserstoffperoxid (III, IV).

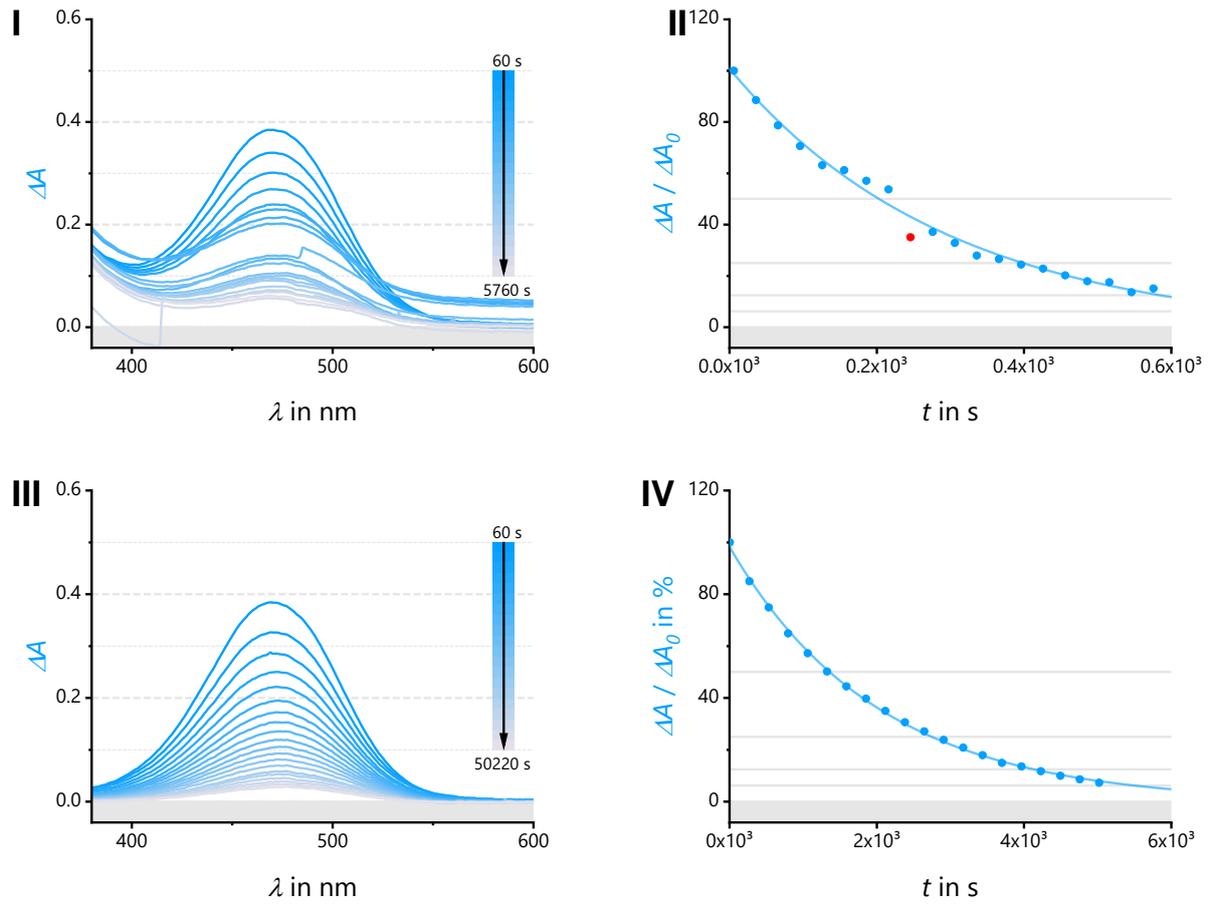


Abbildung 116: Absorptionsspektren (I, III) und prozentuale Abnahme der Absorbanz (II, IV) der Chromophorbände von HOOMe3 im zeitlichen Verlauf der Reaktionen mit Singulett Sauerstoff (I, II) und Wasserstoffperoxid (III, IV).

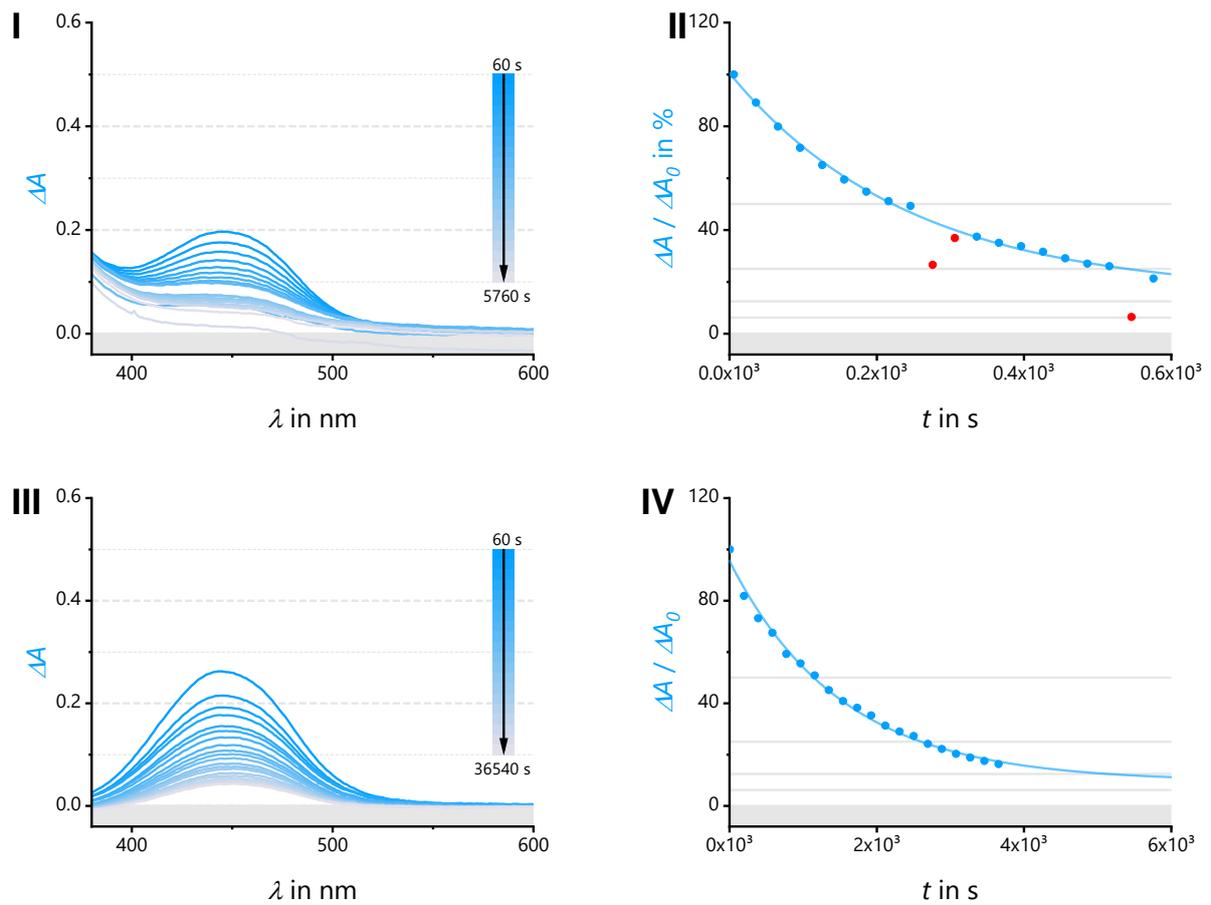


Abbildung 117: Absorptionsspektren (I, III) und prozentuale Abnahme der Absorbanz (II, IV) der Chromophorbände von HOBr im zeitlichen Verlauf der Reaktionen mit Singulett Sauerstoff (I, II) und Wasserstoffperoxid (III, IV).

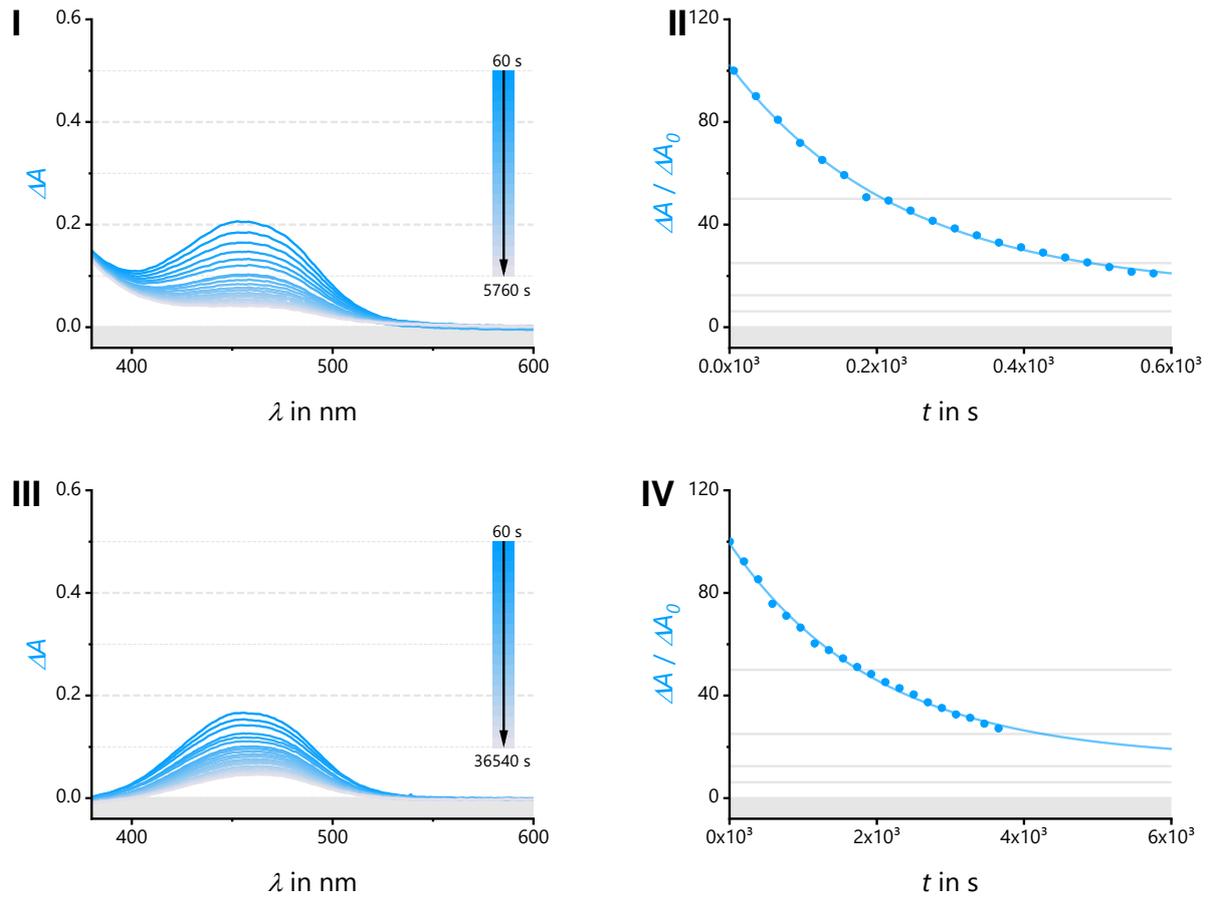


Abbildung 118: Absorptionsspektren (I, III) und prozentuale Abnahme der Absorbanz (II, IV) der Chromophorbande von HOBBr₃ im zeitlichen Verlauf der Reaktionen mit Singulett Sauerstoff (I, II) und Wasserstoffperoxid (III, IV).

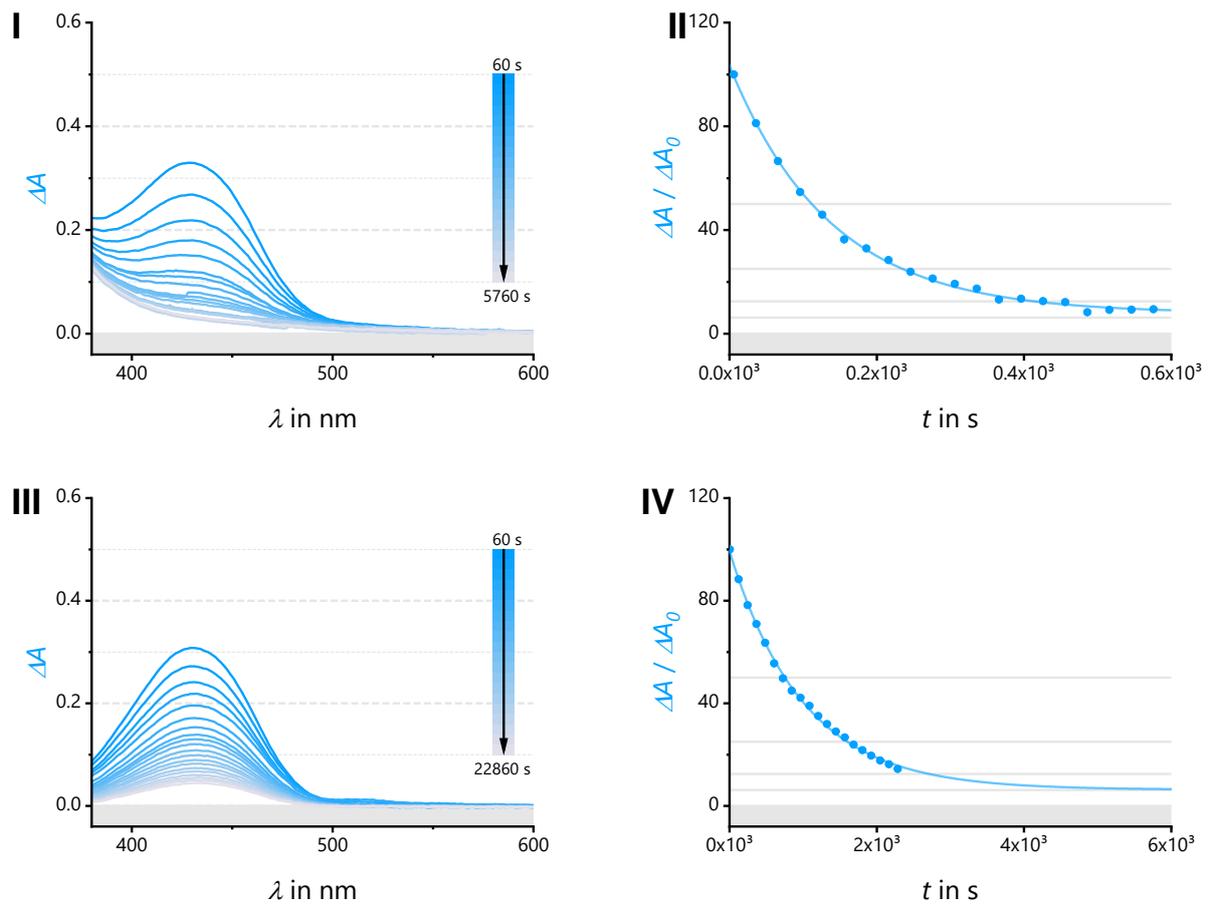


Abbildung 119: Absorptionsspektren (I, III) und prozentuale Abnahme der Absorbanz (II, IV) der Chromophorbände von HOA im zeitlichen Verlauf der Reaktionen mit Singulett Sauerstoff (I, II) und Wasserstoffperoxid (III, IV).

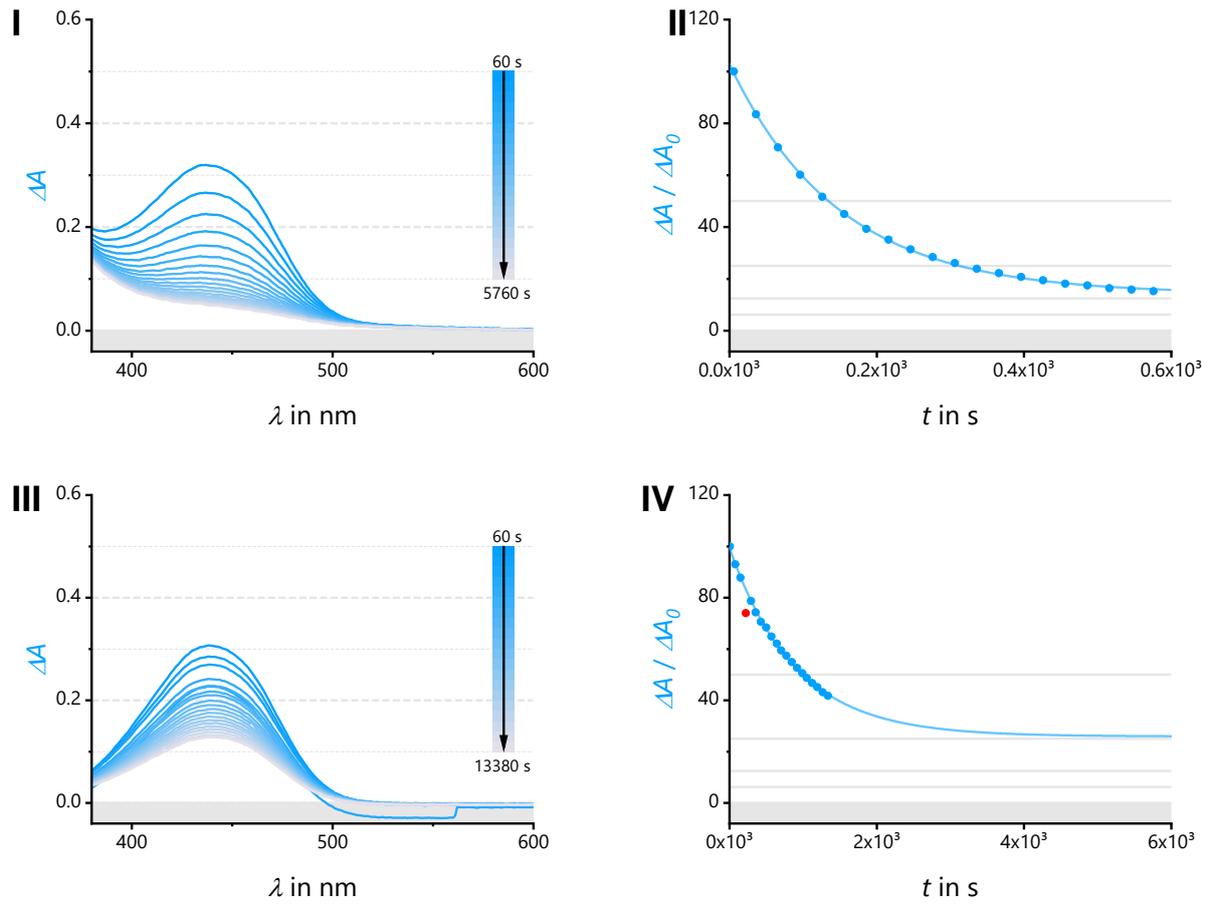


Abbildung 120: Absorptionsspektren (I,III) und prozentuale Abnahme der Absorbanz (II, IV) der Chromophorbände von HOA3 im zeitlichen Verlauf der Reaktionen mit Singulett Sauerstoff (I, II) und Wasserstoffperoxid (III, IV).

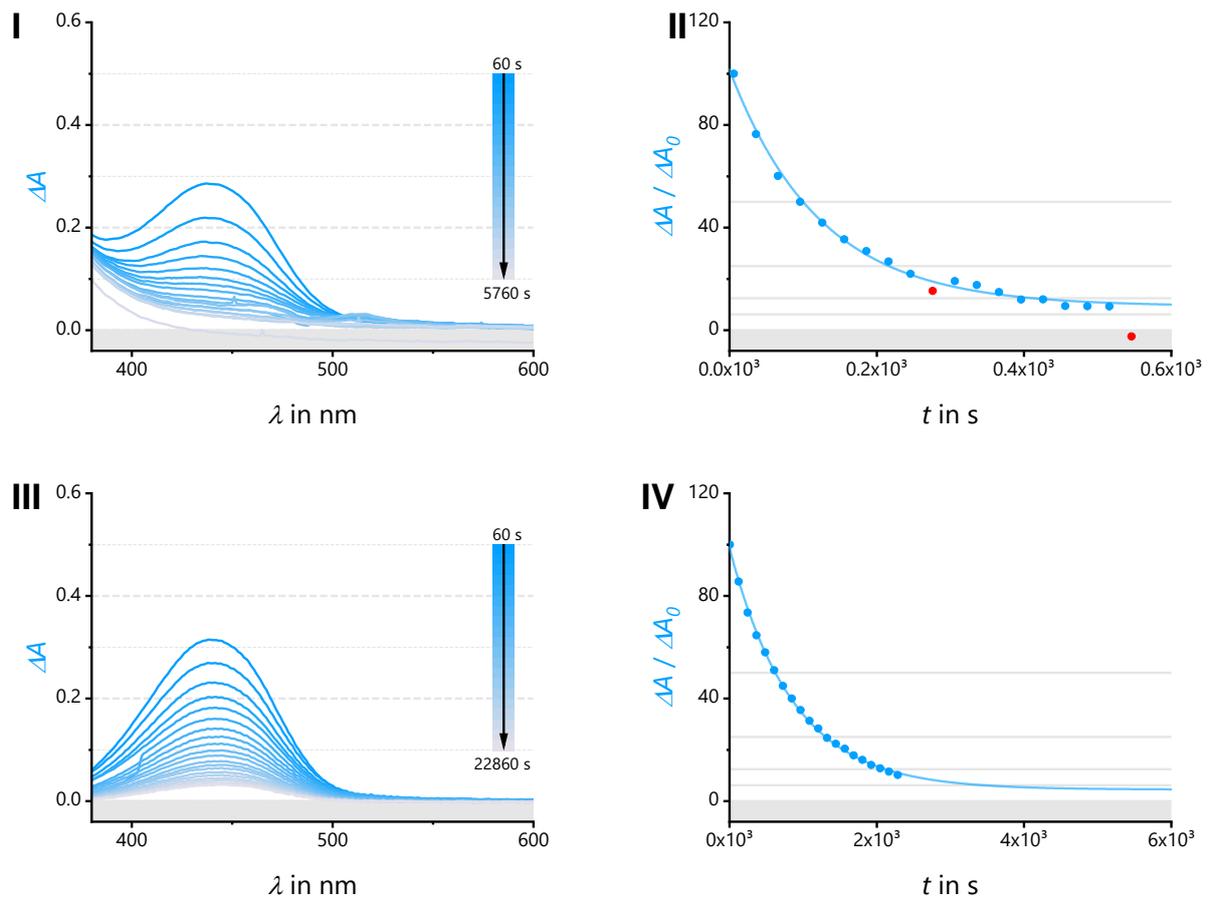


Abbildung 121: Absorptionsspektren (I, III) und prozentuale Abnahme der Absorbanz (II, IV) der Chromophorbande von HOCN im zeitlichen Verlauf der Reaktionen mit Singulett Sauerstoff (I, II) und Wasserstoffperoxid (III, IV).

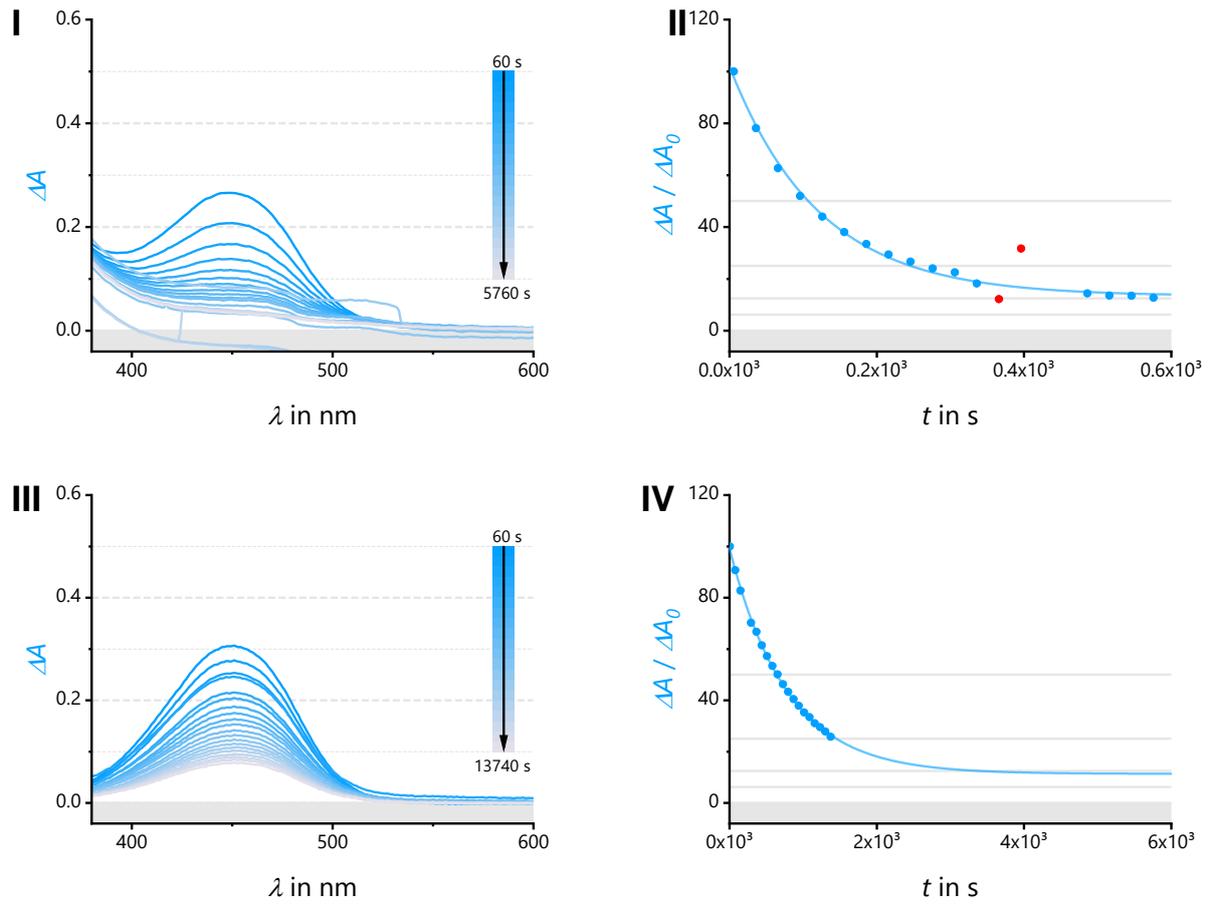


Abbildung 122: Absorptionsspektren (I, III) und prozentuale Abnahme der Absorbanz (II, IV) der Chromophorbände von HOCN3 im zeitlichen Verlauf der Reaktionen mit Singulett Sauerstoff (I, II) und Wasserstoffperoxid (III, IV).

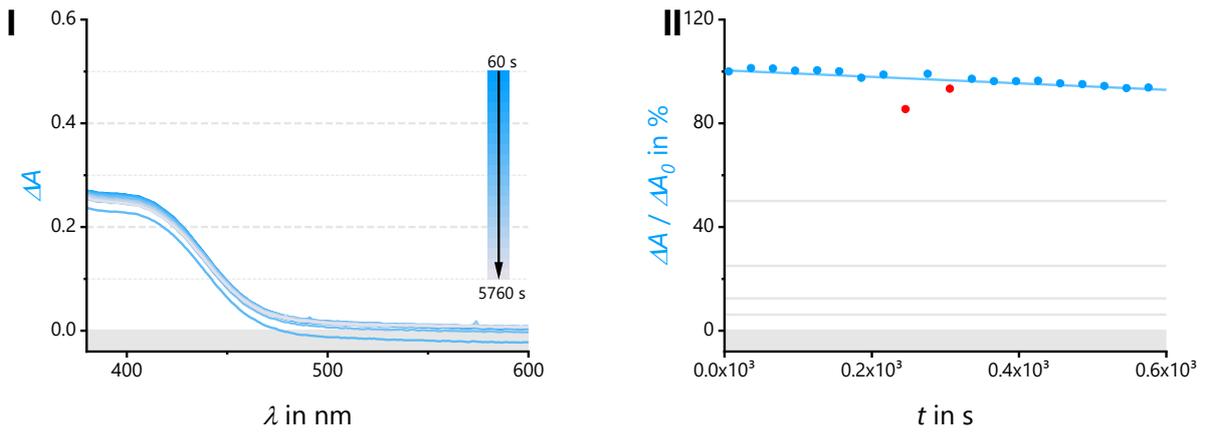


Abbildung 123: Absorptionsspektren (I) und prozentuale Abnahme der Absorbanz (II) der Chromophorbande von HOPyA3 im zeitlichen Verlauf der Reaktionen mit Singulett-Sauerstoff.

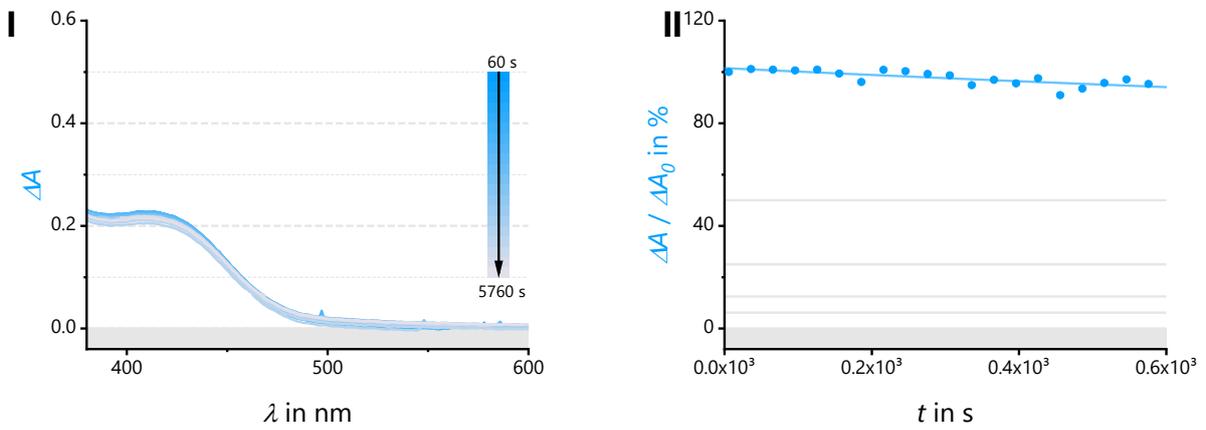


Abbildung 124: Absorptionsspektren (I) und prozentuale Abnahme der Absorbanz (II) der Chromophorbande von HOPyCN3 im zeitlichen Verlauf der Reaktionen mit Singulett Sauerstoff.

Tabelle 10: Geschwindigkeitskonstanten k und Halbwertszeiten $t_{1/2}$ der Reaktionen von Cyanin-Styryl-Farbstoffen und Singulett-Sauerstoff.

DNA und Modifikation	k in 10^{-4} s^{-1}	Δk in 10^{-4} s^{-1}	$t_{1/2}$ in s	$\Delta t_{1/2}$ in s
HOH	3.35	0.05	2072	31
HOH3	3.49	0.29	1985	166
HOH8	-	-	-	-
HOOMeH8	-	-	-	-
HOOMe	3.93	0.2	1764	91
HOOMe3	3.35	0.32	2067	197
HOBr	4.08	0.21	1699	88
HOBr3	4.3	0.14	1613	53
HOA	7.31	0.17	948	22
HOA3	6.73	0.08	1030	12
HOCN	8.18	0.37	847	38
HOCN3	8.24	0.3	841	31
HOPyA3	-	-	-	-
HOPyCN3	-	-	-	-

Tabelle 11: Geschwindigkeitskonstanten k und Halbwertszeiten $t_{1/2}$ der Reaktionen von Cyanin-Styryl-Farbstoffen und Wasserstoffperoxid.

DNA und Modifikation	k in 10^{-4} s^{-1}	Δk in 10^{-4} s^{-1}	$t_{1/2}$ in s	$\Delta t_{1/2}$ in s
HOH	0.59	0.01	11702	262
HOH3	0.29	0.00	23548	181
HOH8	-	-	-	-
HOOMeH8	-	-	-	-
HOOMe	0.59	0.02	11834	321
HOOMe3	0.50	0.01	13998	338
HOBr	0.66	0.04	10532	657
HOBr3	0.50	0.03	13852	757
HOA	1.00	0.03	6909	229
HOA3	1.12	0.04	6185	242
HOCN	1.17	0.03	5933	141
HOCN3	1.28	0.04	5415	171
HOPyA3	-	-	-	-
HOPyCN3	-	-	-	-

10.5 Charakterisierung der fluorophormarkierten Nucleinsäuren

10.5.1 Einfach fluorophormarkierte DNA

Sequenzen und analytische Daten

Nachfolgend sind die synthetisierten Oligonukleotide mit Farbstoffmodifikation aufgeführt, die dem Strukturmotiv des CyIQ entsprechen:

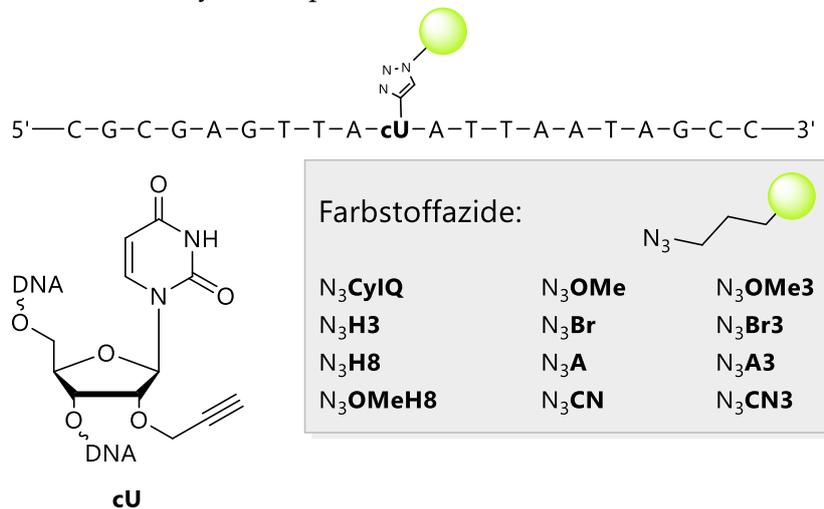


Abbildung 125: Synthetisierte DNA mit "klick"-konjugierten CyIQ-Derivaten (Kasten). cU: 2'-O-Propargyluridin.

Zur Charakterisierung werden die berechneten und gefundenen MALDI-TOF-MS-Massen, sowie deren Extinktionskoeffizienten bei 260 nm aufgeführt. Des Weiteren erfolgte die Charakterisierung anhand der Retentionszeit t_R der DNA über eine analytische Supercosil™ LC 318 Umkehrphasen-Säule (250 x 4,6 mm, 5 µm). Als Puffermedium wurde 50 mM Ammoniumacetat verwendet und innerhalb von 30 min ein Gradient von 0-20 % Acetonitril, gefolgt von einem 10-minütigen isokratischen Verlauf, eingestellt. Die Detektionswellenlänge wurde für die DNA charakteristische Wellenlänge bei $\lambda = 260$ nm aufgezeichnet.

Tabelle 12: Berechnetes und gefundenes Masse-zu-Ladungsverhältnis, Retentionszeit t_R (0-20 % in Acetonitril in 50 mM Ammoniumacetat-Puffer über 30 min, 10 min isokrat) und molarer dekadischer Extinktionskoeffizient bei 260 nm, ϵ_{260nm} , der synthetisierten einfach-modifizierten DNA-Stränge.

DNA und Modifikation	M_{ber} in m/z	M_{gef} in m/z	t_R in min	ϵ_{260nm} in $10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
ssH	6507	6502	18.8	209
ssH3	6521	6518	19.4	209
ssH8	6651	6637	23.7	209
ssOMeH8	6681	6677	24.7	210
ssOMe	6537	6533	19.2	212
ssOMe3	6551	6548	19.5	210
ssBr	6585	6583	19.8	211
ssBr3	6599	6600	19.7	217
ssA	6508	6502	18.5	211
ssA3	6522	6520	18.5	213
ssCN	6532	6534	19.3	216
ssCN3	6546	6538	19.6	222

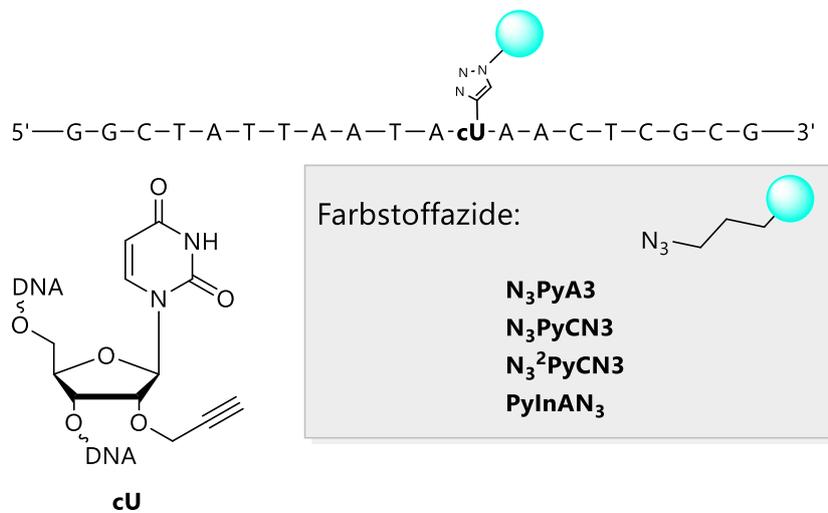


Abbildung 126: Synthetisierte DNA mit "klick"-konjugierten CyIP-Derivaten (Kasten). **cU**: 2'-O-Propargyluridin.

DNA und Modifikation	M_{ber} in m/z	M_{gef} in m/z	t_R in min	ϵ_{260nm} in $10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
ssPyA3	6472	6475	-	214
ssPyCN3	6496	6499	-	220
ss2PyCN3	6482	6484	22.6	220
ssPyInA	6443	6447	23.0	225

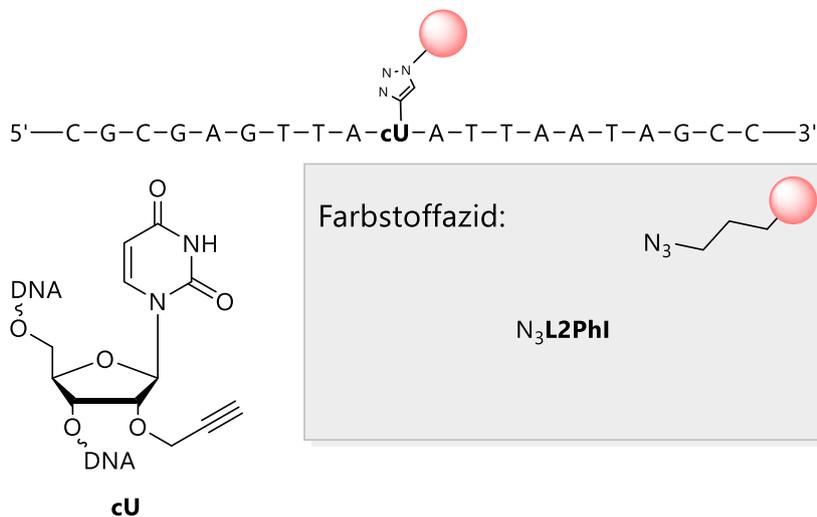


Abbildung 127: DNA-Strang mit rotemittierendem Fluorophor L2PhI.

DNA und Modifikation	M_{ber} in m/z	M_{gef} in m/z	t_R in min	ϵ_{260nm} in $10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
ssL2PhI	6597	6602	27.2	214

Optische Spektroskopie

Die optische Charakterisierung der einzel- und doppelsträngigen einfach-modifizierten Stränge sind hier dargestellt. Diese beinhalten Absorptions- und Emissionsmessungen.

Alle Messungen erfolgten, sofern nicht anders angegeben, in 10 mM NaPi-Puffer (pH 7) und 250 mM NaCl in *Millipore*-Wasser bei 20 °C. Die DNA-Konzentration der modifizierten Stränge betrug 2.5 μ M. Die Absorptionsspektren wurden gegen die Absorbanz des Lösungsmittels basislinienkorrigiert. Folgende Messparameter wurden verwendet:

- *Spectral band width*: 2.0 nm
- *Average time*: 0.1 s
- *Data interval*: 1.0
- *Light source change over*: 350 nm.

Die Messungen erfolgten, soweit nicht anders angegeben, in 10 mM NaPi-Puffer (pH 7) und 250 mM NaCl in *Millipore*-Wasser und bei einer Temperatur von 20 ± 0.001 °C. Die Hintergrundkorrektur der Spektren erfolgte gegen die Ramanstreuung des reinen Lösungsmittels.

Folgende Einstellungen wurden verwendet:

- *Increment*: 1.0 nm,
- *Integration time*: 0.1 s,
- *Entrance & exit slits*: 3 nm & 3 nm.

Einfach modifizierte doppelsträngige DNA wurde am vorherigen Tag für 10 min auf 90 °C erhitzt und über Nacht im ausgeschalteten Heizblock belassen.

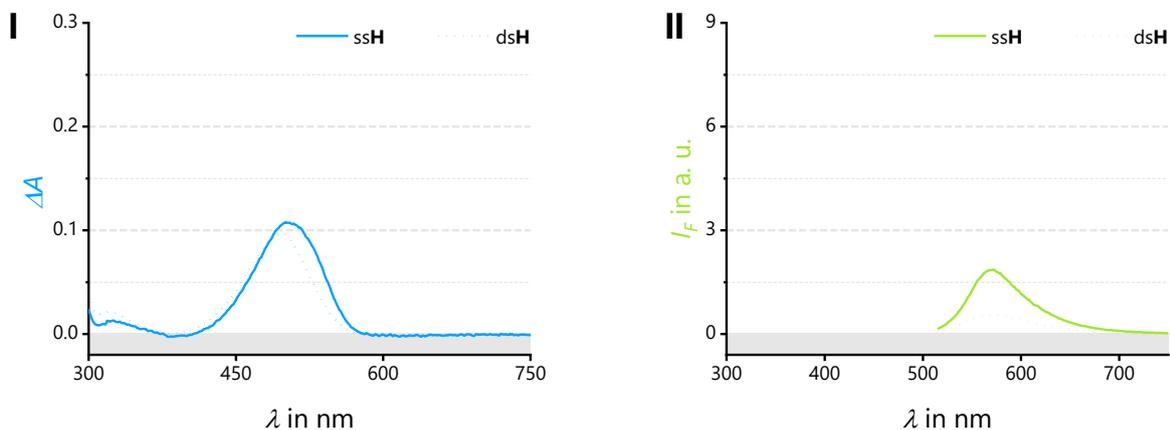


Abbildung 128: Absorptions- (I) und Emissionsspektrum (II) von ssH (—) und dsH (...).

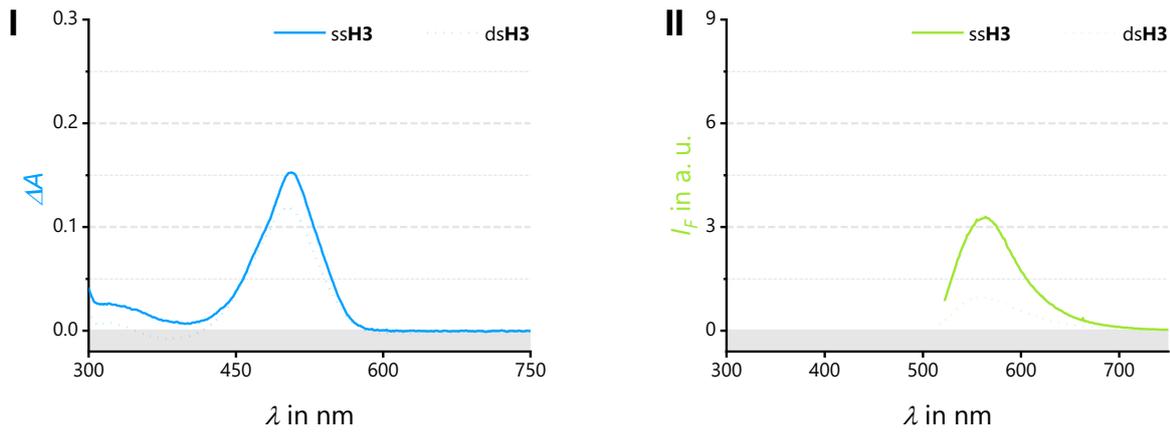


Abbildung 129: Absorptions- (I) und Emissionsspektrum (II) von ssH3 (—) und dsH3 (...).

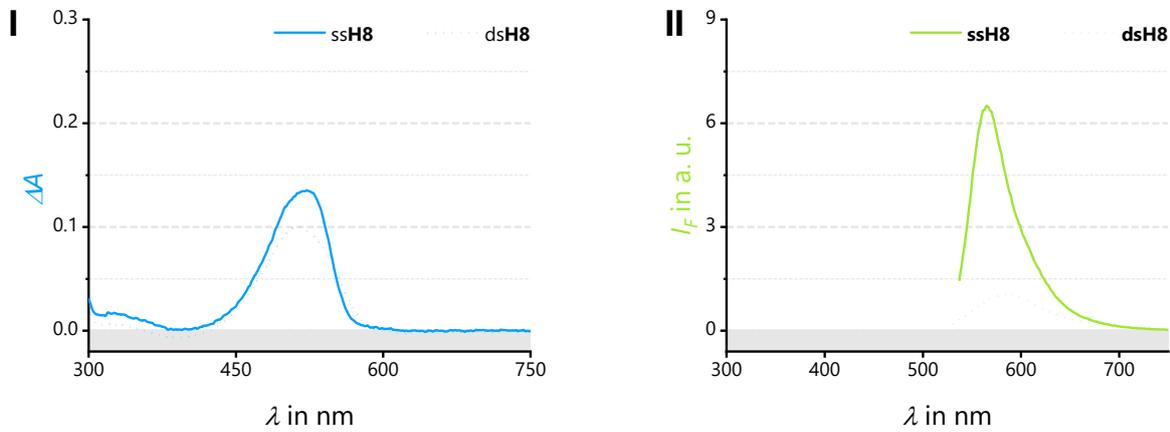


Abbildung 130: Absorptions- (I) und Emissionsspektrum (II) von ssH8 (—) und dsH8 (...).

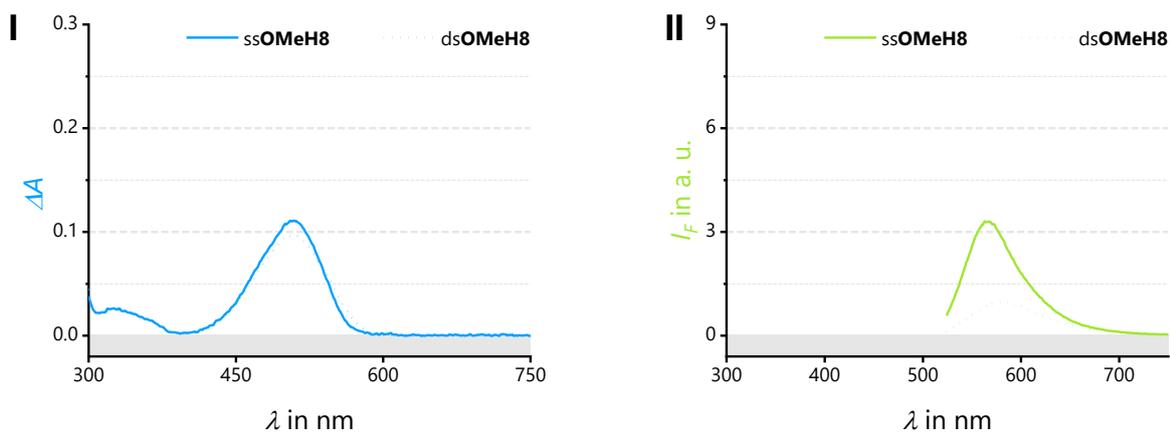


Abbildung 131: Absorptions- (I) und Emissionsspektrum (II) von ssOMeH8 (—) und dsOMeH8 (...).

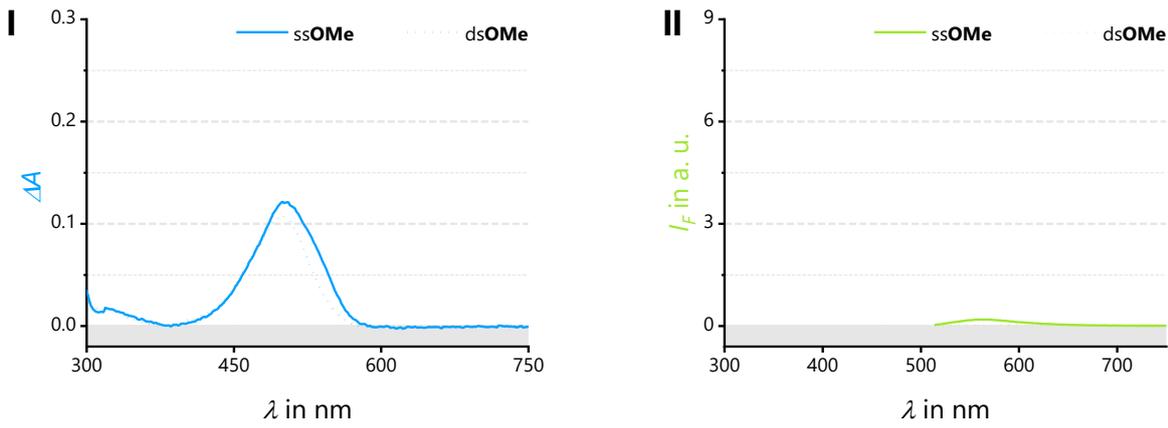


Abbildung 132: Absorptions- (I) und Emissionsspektrum (II) von ssOMe (—) und dsOMe (...).

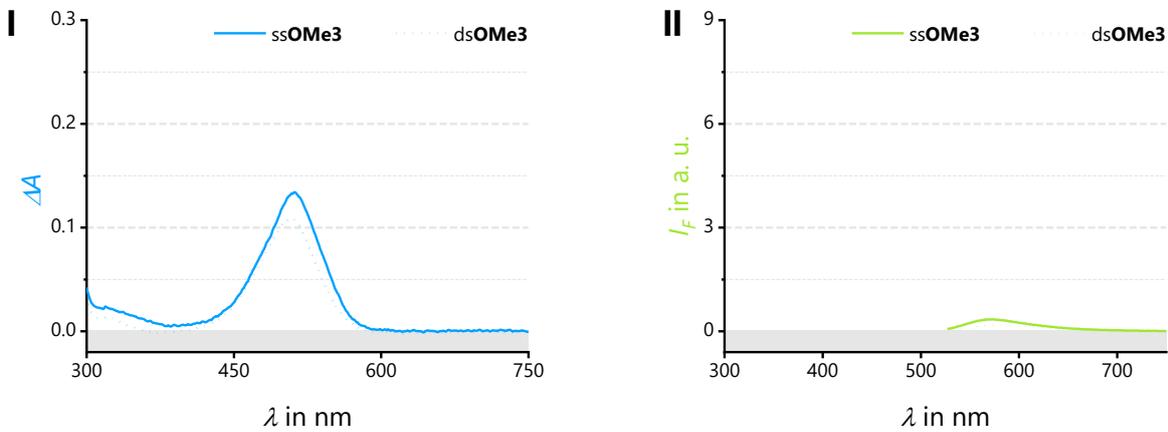


Abbildung 133: Absorptions- (I) und Emissionsspektrum (II) von ssOMe3 (—) und dsOMe3 (...).

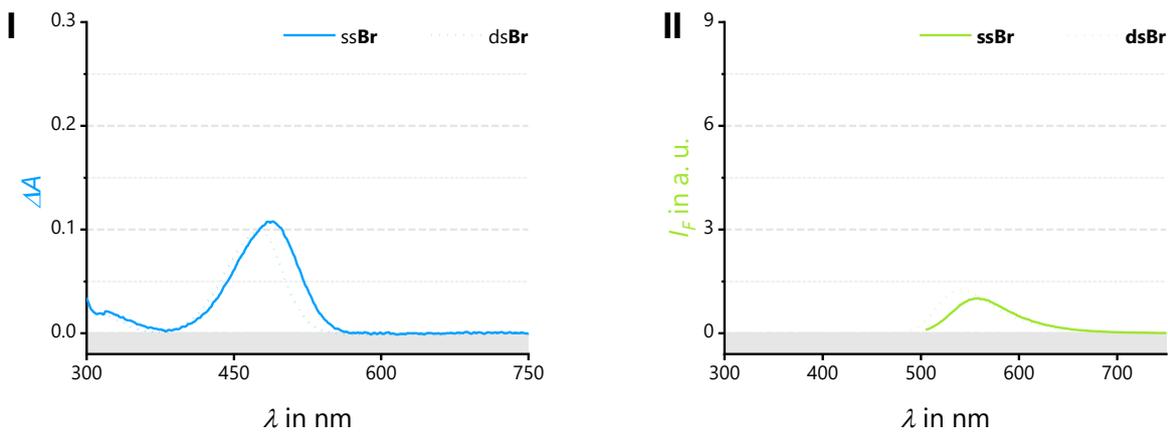


Abbildung 134: Absorptions- (I) und Emissionsspektrum (II) von ssBr (—) und dsBr (...).

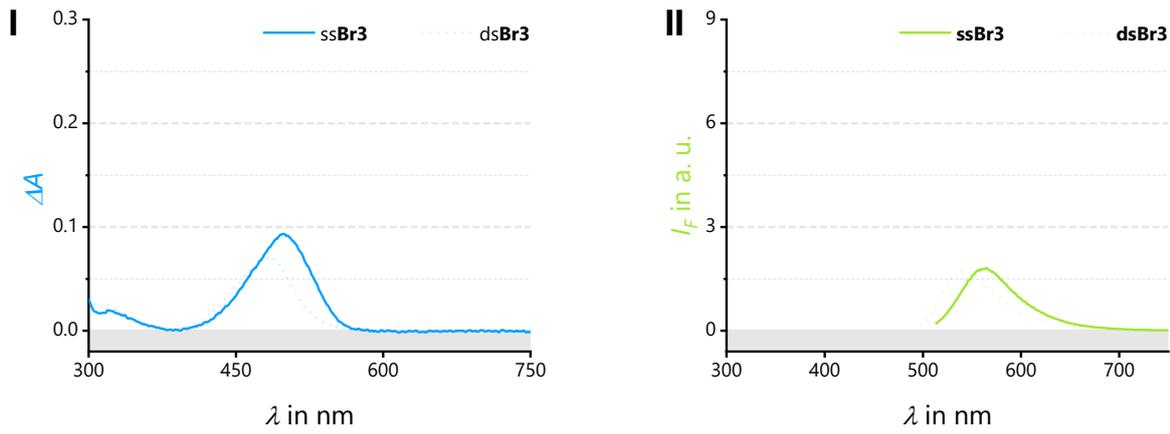


Abbildung 135: Absorptions- (I) und Emissionsspektrum (II) von ssBr3 (—) und dsBr3 (...).

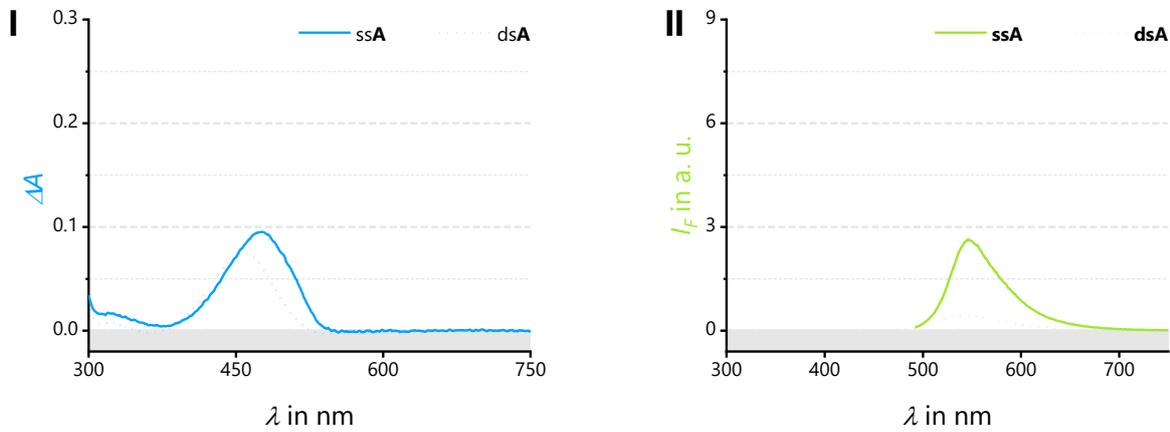


Abbildung 136: Absorptions- (I) und Emissionsspektrum (II) von ssA (—) und dsA (...).

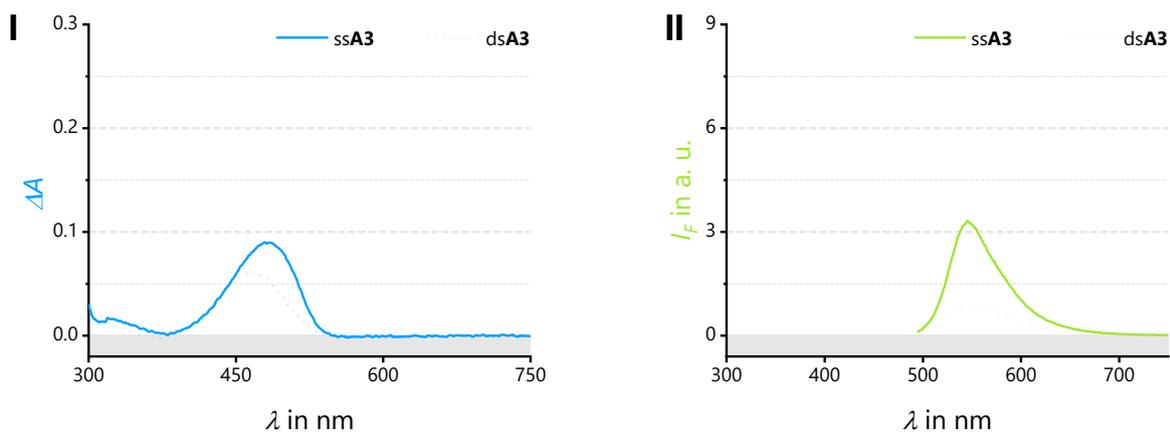


Abbildung 137: Absorptions- (I) und Emissionsspektrum (II) von ssA3 (—) und dsA3 (...).

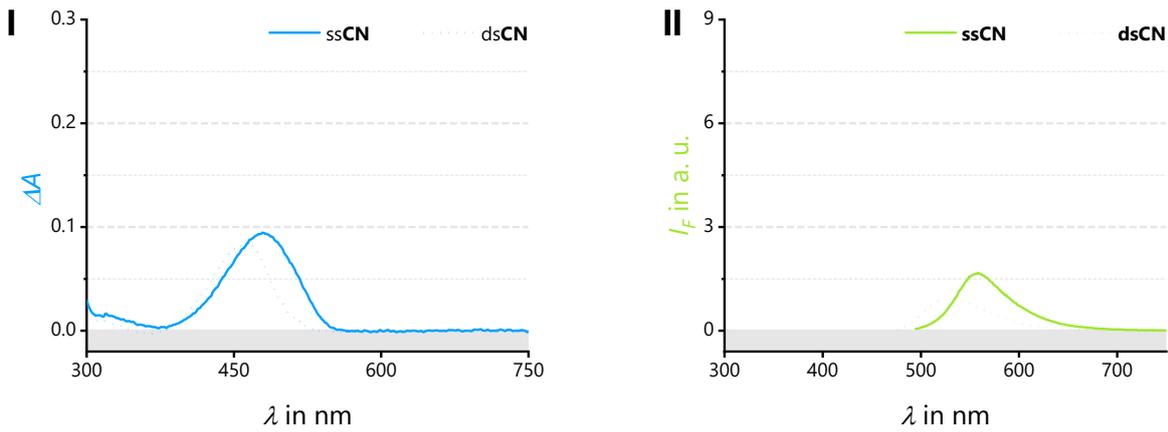


Abbildung 138: Absorptions- (I) und Emissionsspektrum (II) von ssCN (—) und dsCN (...).

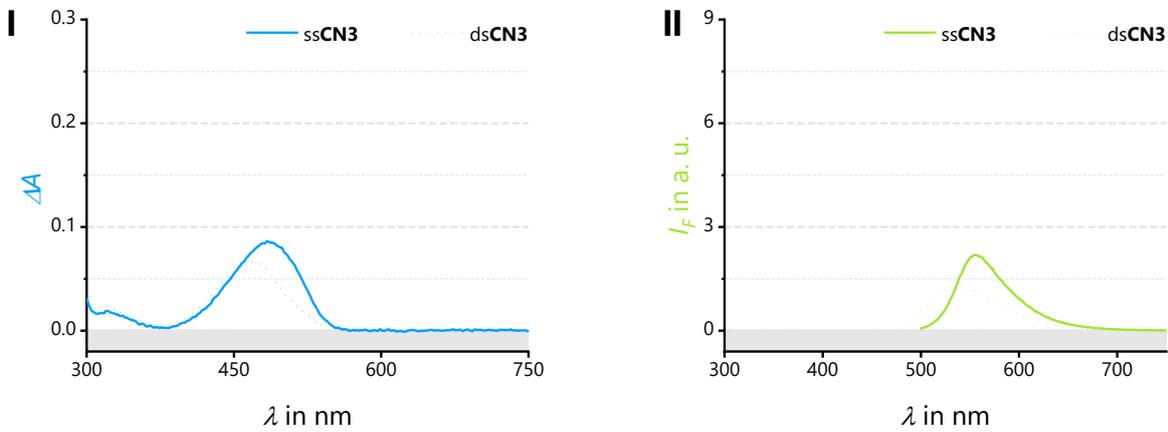


Abbildung 139: Absorptions- (I) und Emissionsspektrum (II) von ssCN3 (—) und dsCN3 (...).

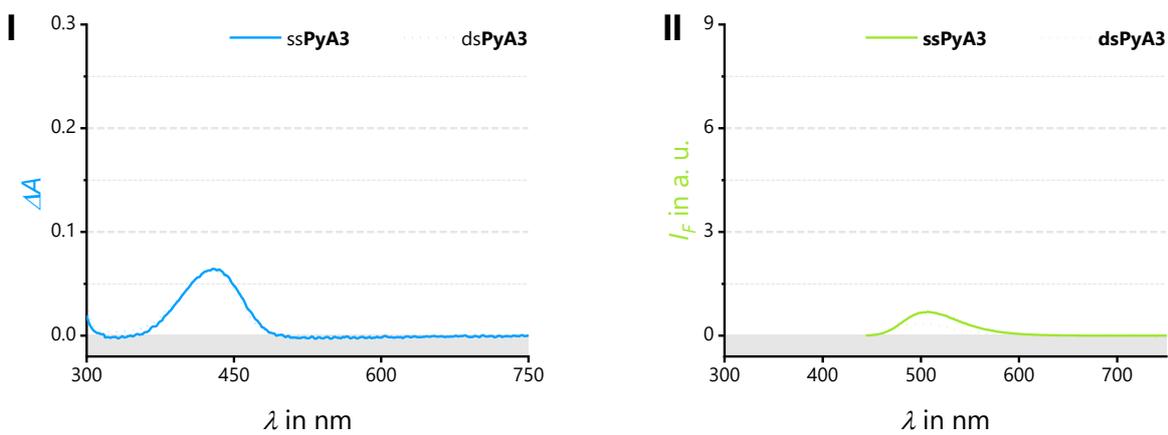


Abbildung 140: Absorptions- (I) und Emissionsspektrum (II) von ssPyA3 (—) und dsPyA3 (...).

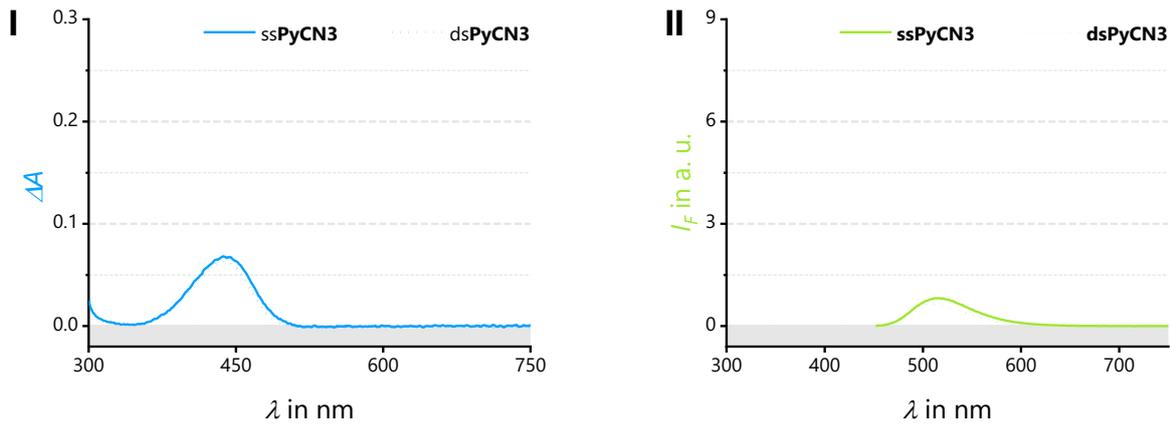


Abbildung 141: Absorptions- (I) und Emissionsspektrum (II) von ssPyCN3 (—) und dsPyCN3 (...).

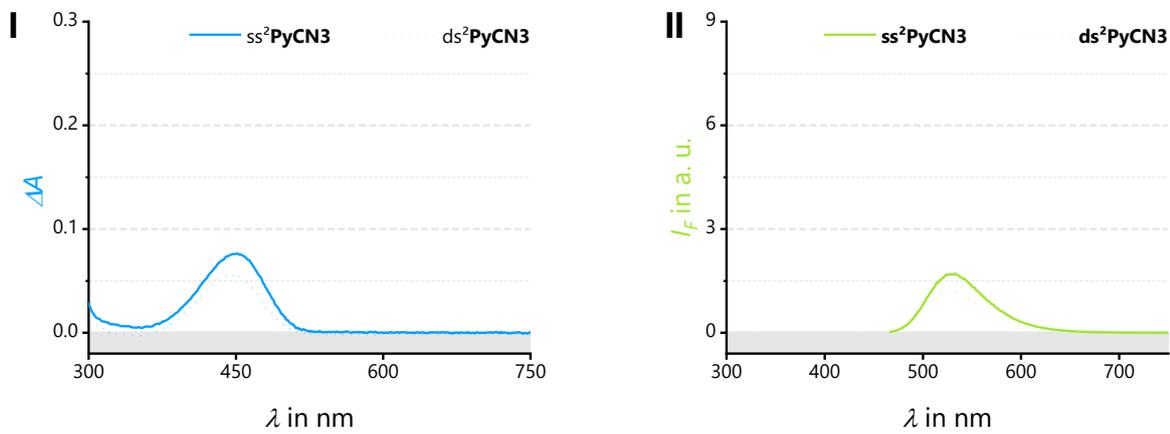


Abbildung 142: Absorptions- (I) und Emissionsspektrum (II) von ss²PyCN3 (—) und ds²PyCN3 (...).

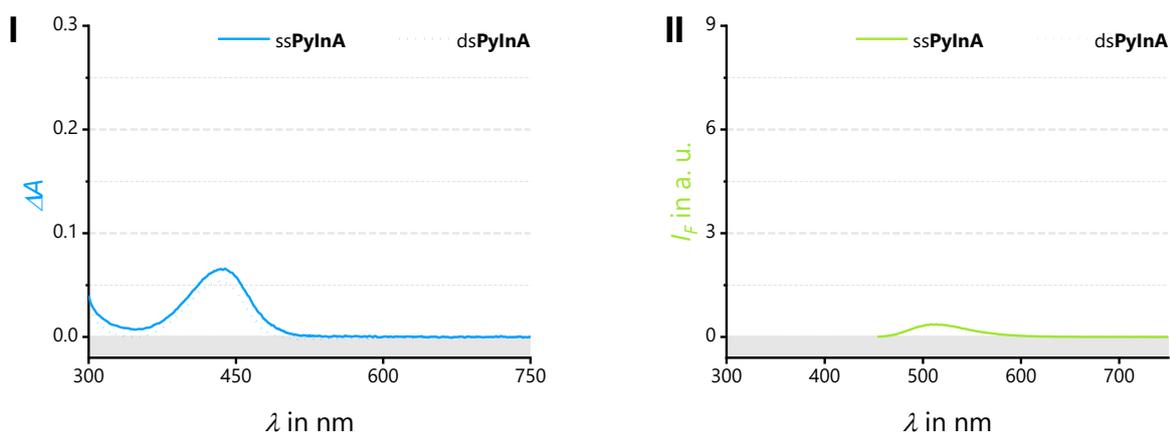


Abbildung 143: Absorptions- (I) und Emissionsspektrum (II) von ssPyInA (—) und dsPyInA (...).

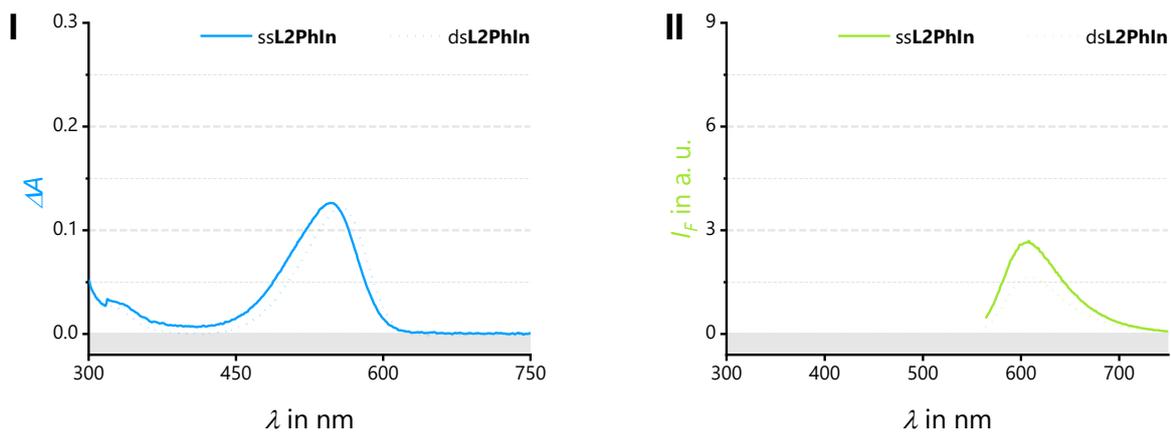


Abbildung 144: Absorptions- (I) und Emissionsspektrum (II) von ssL2PhIn (—) und dsL2PhIn (...).

Tabelle 13: Absorptions- und Emissionsmaxima, Stokes-Verschiebung und prozentuale Fluoreszenzänderung durch Hybridisierung aller "klick"-konjugierten Cyanin-Styryl-Farbstoffe.

DNA und Modifikation	λ_{max} in nm	λ_{em} in nm	λ_{Stokes} in cm^{-1} (nm)	$\Delta\lambda_{Stokes}$ in cm^{-1} (nm)	$I_{F,ds}$ in % $I_{F,ss}$
ssH	500	572	2517 (72)	71 (2)	-
ssH3	507	564	1993 (57)	70 (2)	-
ssH8	522	565	1458 (43)	68 (2)	-
ssOMeH8	509	563	1884 (54)	70 (2)	-
ssOMe	499	565	2341 (66)	71 (2)	-
ssOMe3	512	574	2110 (62)	68 (2)	-
ssBr	490	559	2519 (69)	74 (2)	-
ssBr3	498	565	2381 (67)	72 (2)	-
ssA	476	546	2693 (70)	78 (2)	-
ssA3	479	545	2528 (66)	77 (2)	-
ssCN	479	558	2956 (79)	76 (2)	-
ssCN3	484	556	2676 (72)	75 (2)	-
ssPyA3	429	507	3586 (78)	93 (2)	-
ssPyCN3	437	512	3352 (75)	91 (2)	-
ss ² PyCN3	451	533	3411 (82)	84 (2)	-
ssPyInA	439	508	3094 (69)	91 (2)	-
dsH	498	571	2567 (73)	71 (2)	35.0
dsH3	502	556	1935 (54)	72 (2)	33.0
dsH8	515	587	2382 (72)	67 (2)	25.4
dsOMeH8	509	580	2405 (71)	68 (2)	37.6
dsOMe	499	570	2496 (71)	71 (2)	25.0
dsOMe3	509	578	2345 (69)	69 (2)	61.4
dsBr	475	543	2636 (68)	78 (2)	121
dsBr3	483	540	2185 (57)	77 (2)	93.2
dsA	459	541	3302 (82)	82 (2)	22.1
dsA3	466	551	3310 (85)	79 (2)	35.7
dsCN	461	532	2895 (71)	82 (2)	63.6
dsCN3	467	541	2929 (74)	80 (2)	75.7
dsPyA3	430	497	3135 (67)	95 (2)	51.1
dsPyCN3	437	513	3390 (76)	90 (2)	77.4
ds ² PyCN3	446	523	3301 (77)	87 (2)	73.3
dsPyInA	438	509	3185 (71)	91 (2)	63.1

Quantenausbeuten und Fluoreszenzlebensdauer

Absolute Quantenausbeuten wurden am *Quantaurus QY C11347* in 5 mL Quarzglasküvetten von *Hamamatsu* bestimmt. Eine Lösung bestehend aus 10 mM NaPi-Puffer (pH 7) und 250 mM NaCl in *Millipore*-Wasser wurde für die Grundlinienkorrektur verwendet. Anschließend wurden die Quantenausbeuten der Einzel- und Doppelstränge aus einer Lösung von 2.5 μM DNA, 10 mM NaPi Puffer (pH 7) und 250 mM NaCl in *Millipore*-Wasser bestimmt.

Die Fluoreszenzlebensdauer der jeweiligen Farbstoffe wurde per zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung (*time correlated single photon counting*, TCSPC) an einem *Fluoromax-4 Spectrofluorometer* ausgerüstet mit einem *DeltaTime-NL* von *HORIBA Scientific* gemessen. Letzteres diente zur zeitlichen Abstimmung des jeweiligen Photonsignals. Als Anregungslichtquelle wurde eine *NanoLED* mit *NL-C2* gepulstem Diodencontroller von *HORIBA Scientific* verwendet. Alle Messungen wurden mit einer Wiederholungsrate von 1 MHz bei 20 °C durchgeführt. Die Aufnahme der instrumentspezifischen Antwortfunktion (*instrument response function*, IRF) erfolgte mit einer Verdünnung einer LUDOX® (kolloides Siliziumdioxid in Wasser, 30 %) von *Sigma Aldrich*. Die zeitlich aufgelöste Entvölkerung des angeregten Zustandes wurde mit einer Lösung bestehend aus 2.5 μM der jeweiligen DNA, 10 mM NaPi-Puffer (pH 7), 250 mM NaCl in *Millipore*-Wasser aufgenommen. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit dem Programm *DAS6 v 6.8* von *HORIBA Scientific* und erfolgte als biexponentieller Zerfall. Hierbei wurde ein Chi-Quadrat-Wert von 1.2, sowie eine Gleichverteilung der Residuen angestrebt. Die Fluoreszenzlebensdauer ist amplitudengemittelt angegeben.

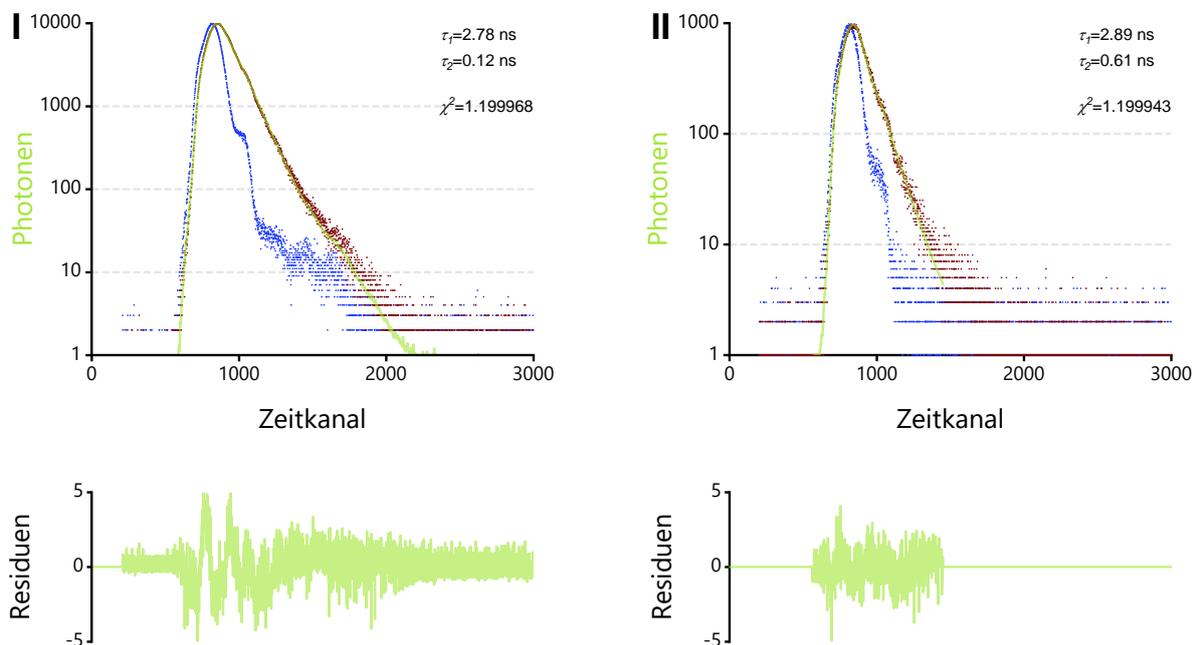


Abbildung 145: Fluoreszenzabklingkurve und Residuen von ssH und dsH.

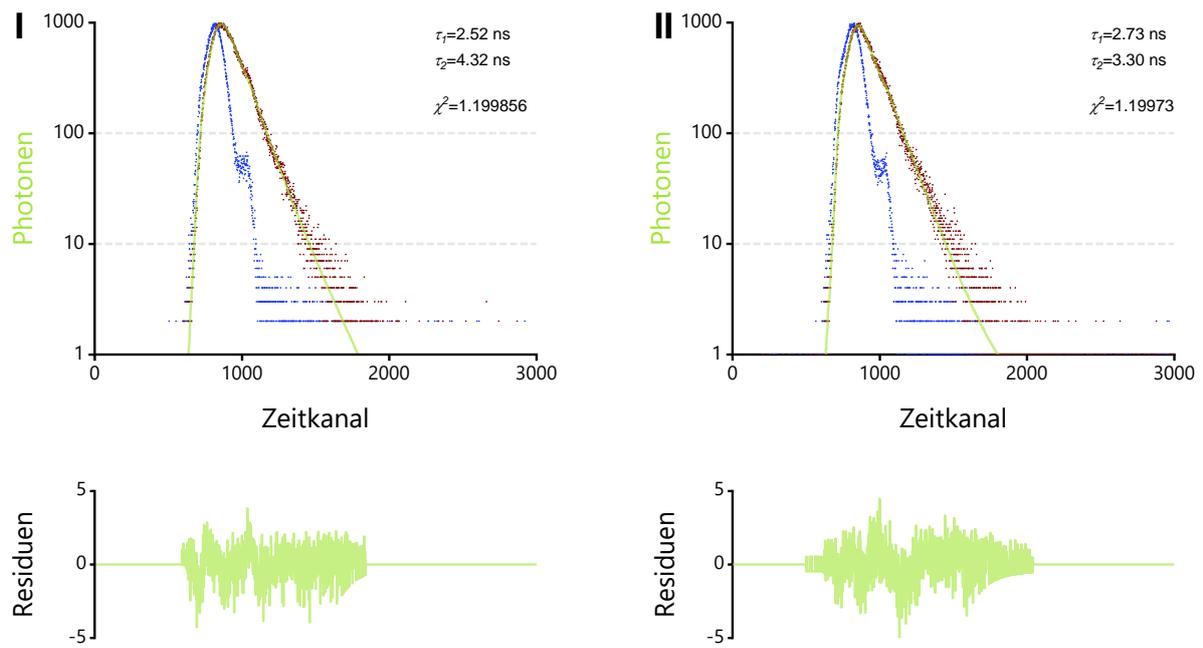


Abbildung 146: Fluoreszenzabklingkurve und Residuen von ssH3 und dsH3.

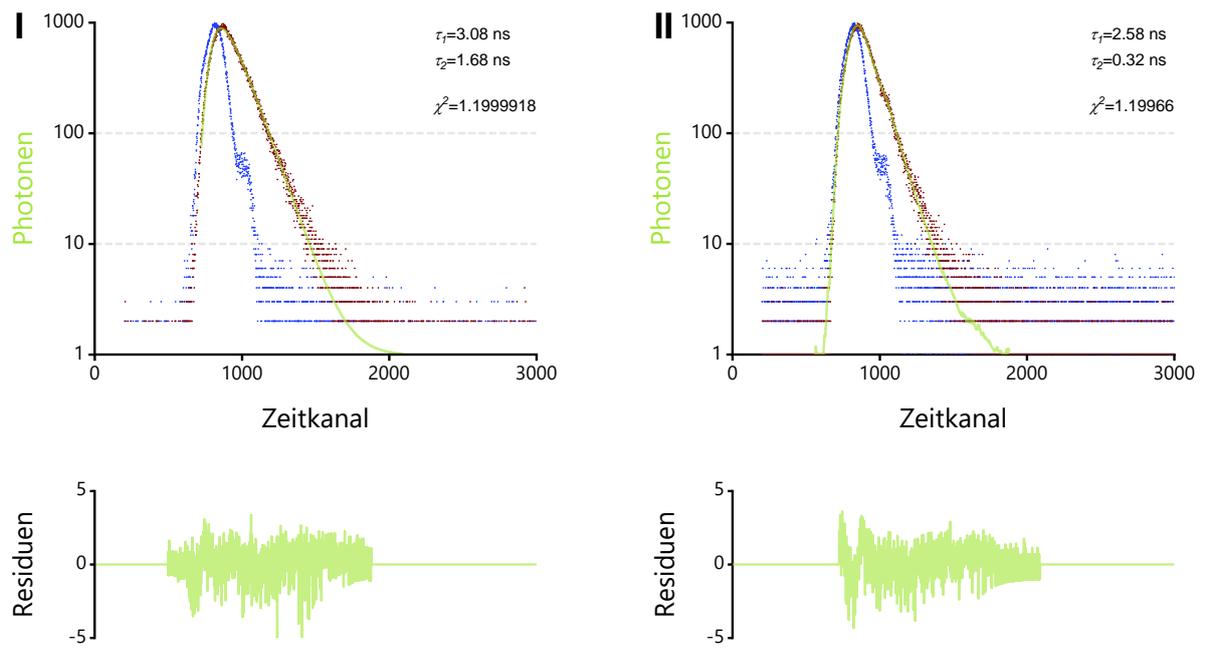


Abbildung 147: Fluoreszenzabklingkurve und Residuen von ssH8 und dsH8.

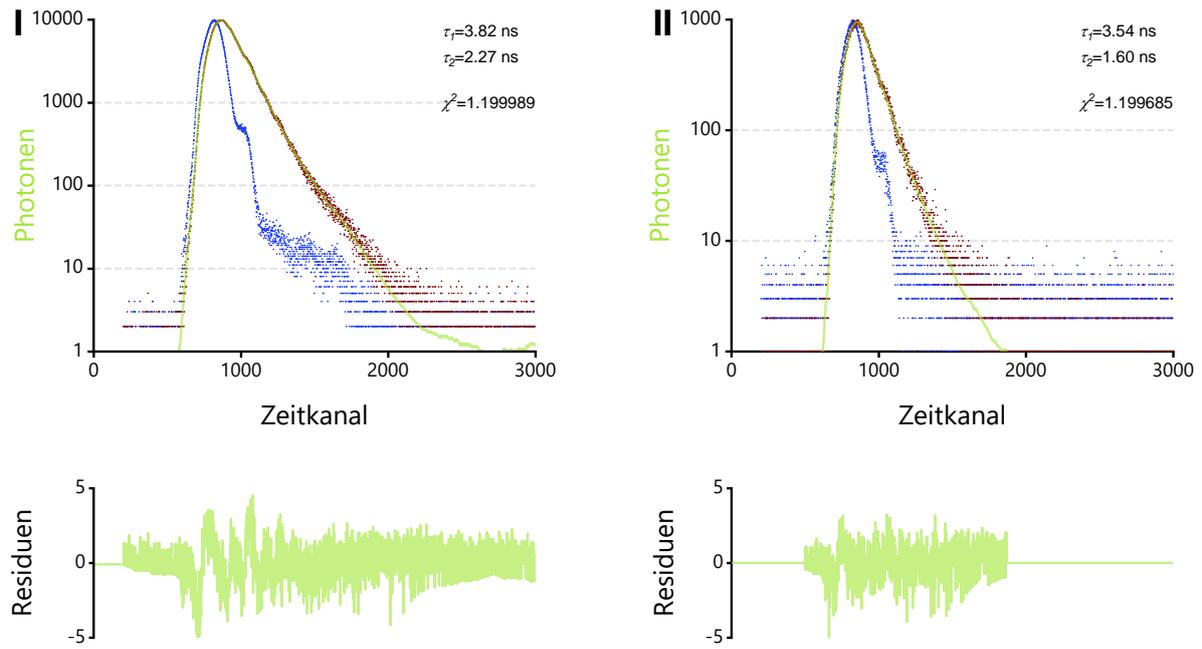


Abbildung 148: Fluoreszenzabklingkurve und Residuen von ssOMeH8 und dsOMeH8.

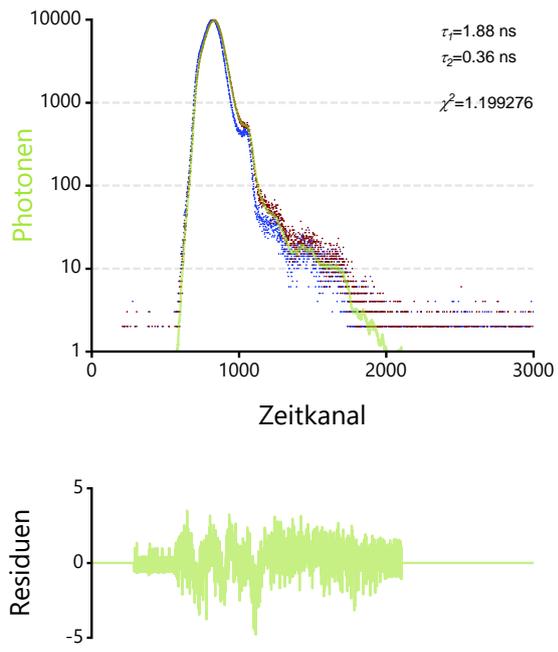


Abbildung 149: Fluoreszenzabklingkurve und Residuen von ssOMe.

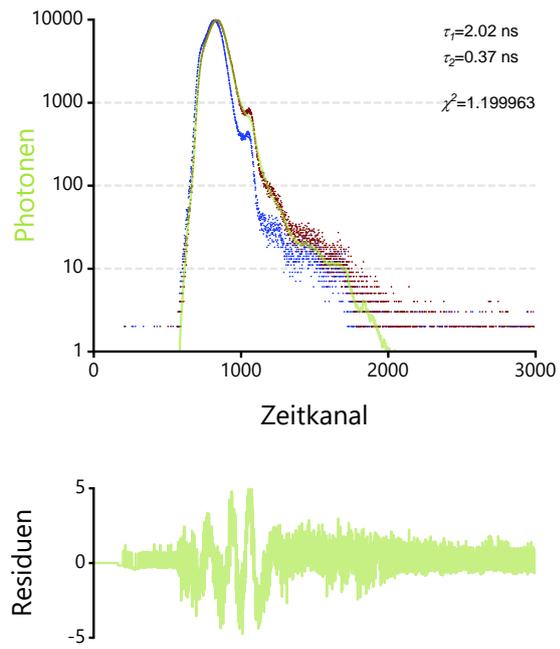


Abbildung 150: Fluoreszenzabklingkurve und Residuen von ssOMe3.

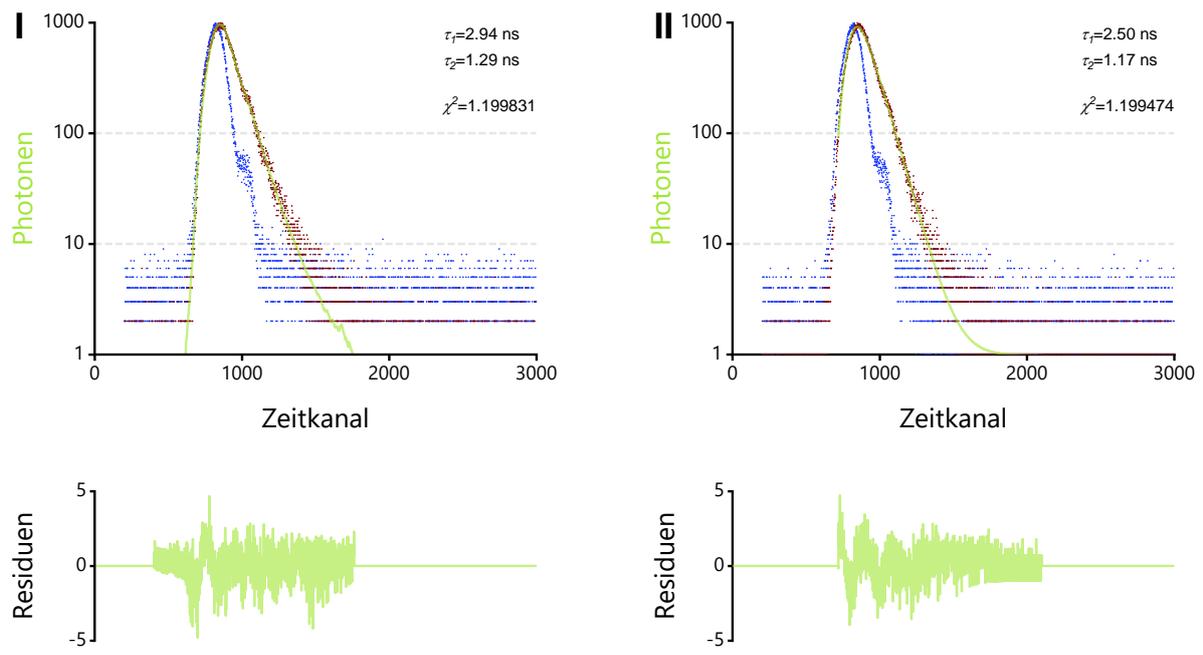


Abbildung 151: Fluoreszenzabklingkurve und Residuen von ssBr und dsBr.

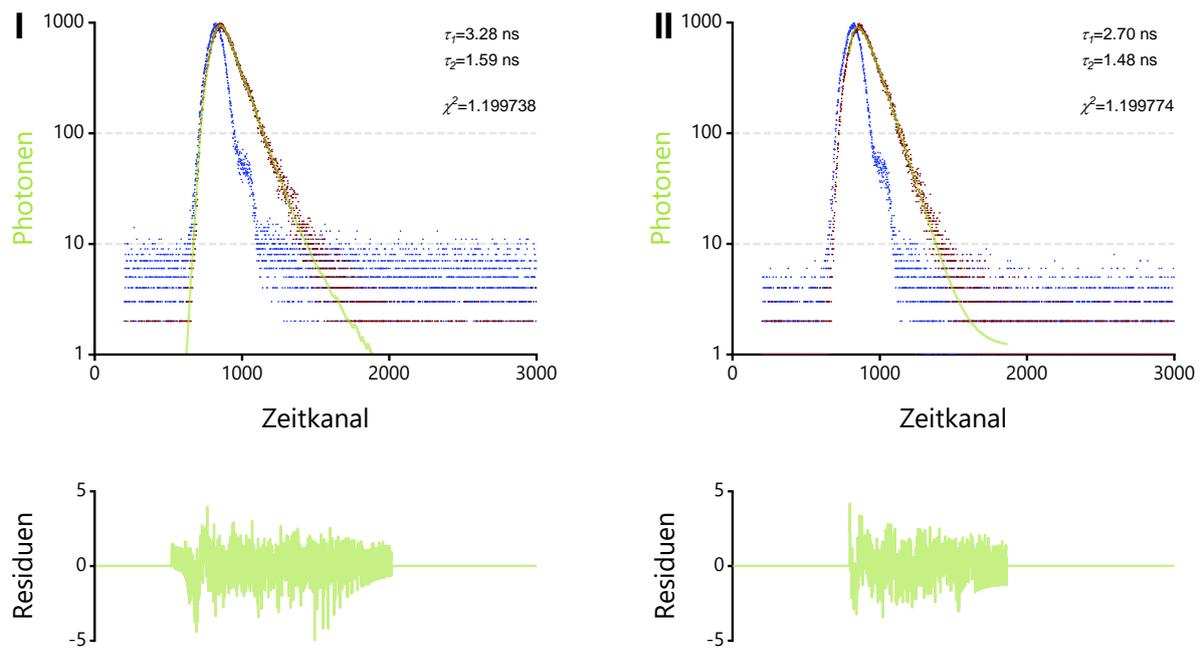


Abbildung 152: Fluoreszenzabklingkurve und Residuen von ssBr3 und dsBr3.

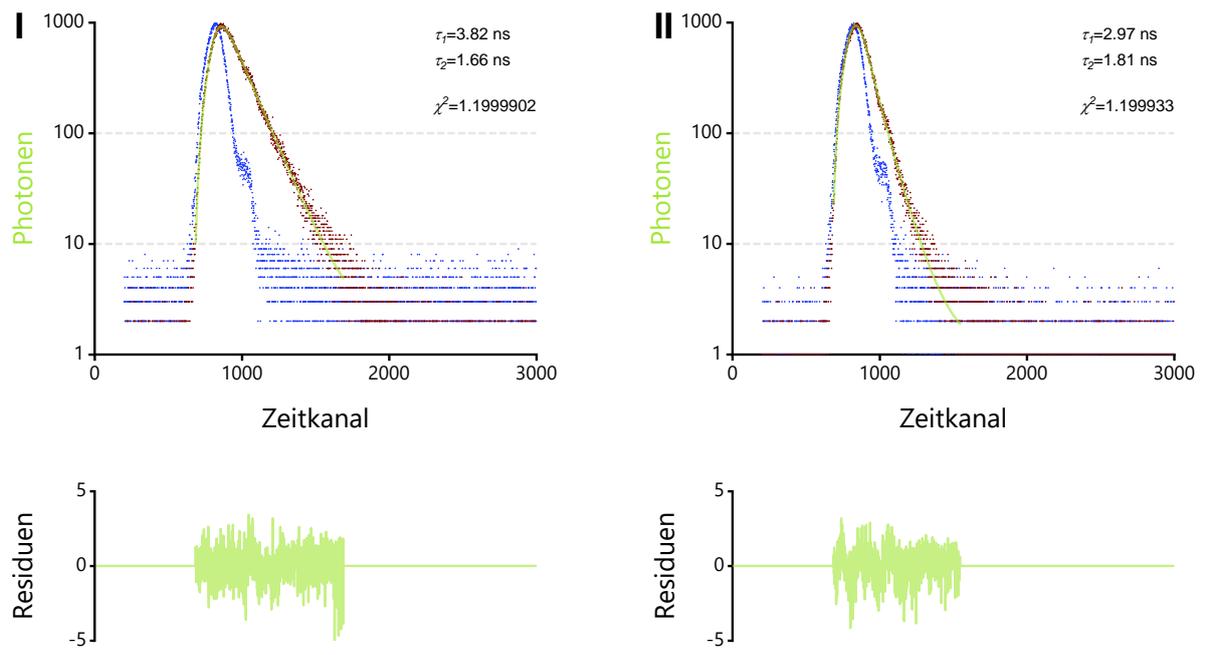


Abbildung 153: Fluoreszenzabklingkurve und Residuen von ssA und dsA.

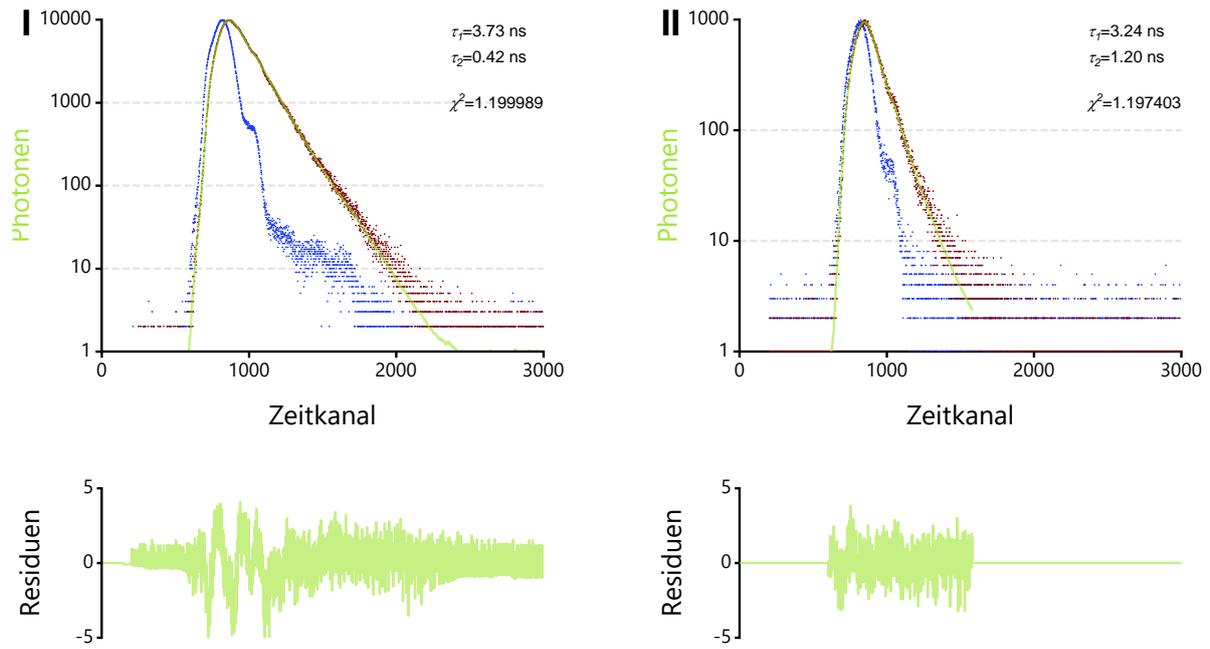


Abbildung 154: Fluoreszenzabklingkurve und Residuen von ssA3 und dsA3.

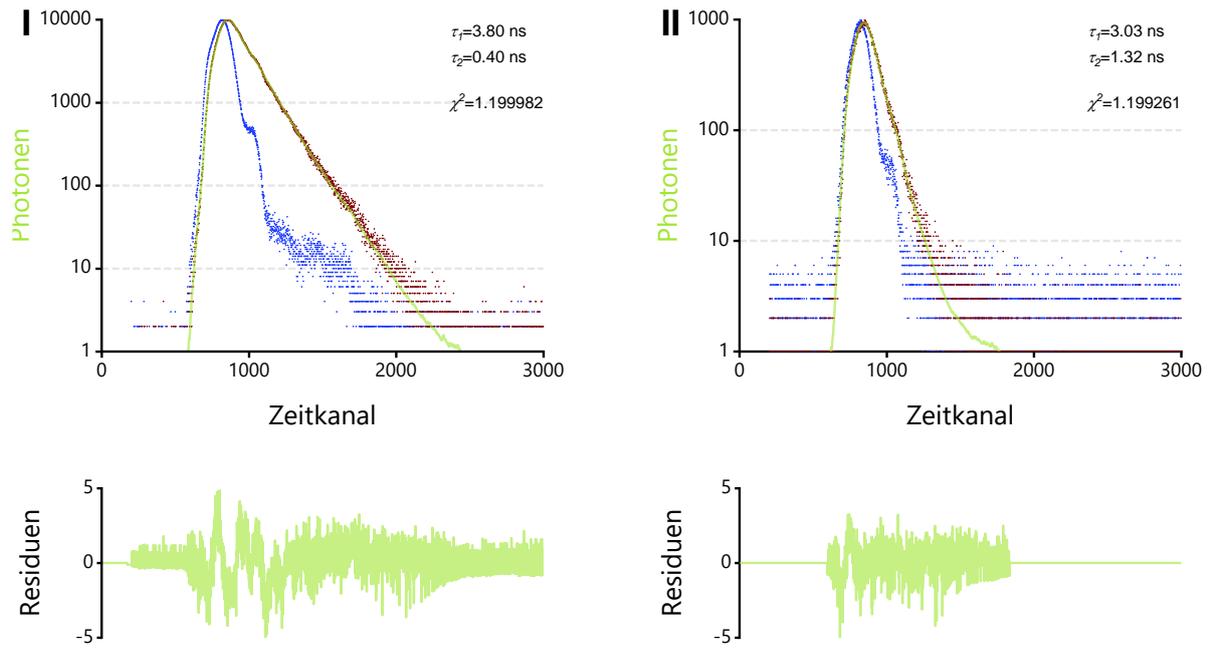


Abbildung 155: Fluoreszenzabklingkurve und Residuen von ssCN und dsCN.

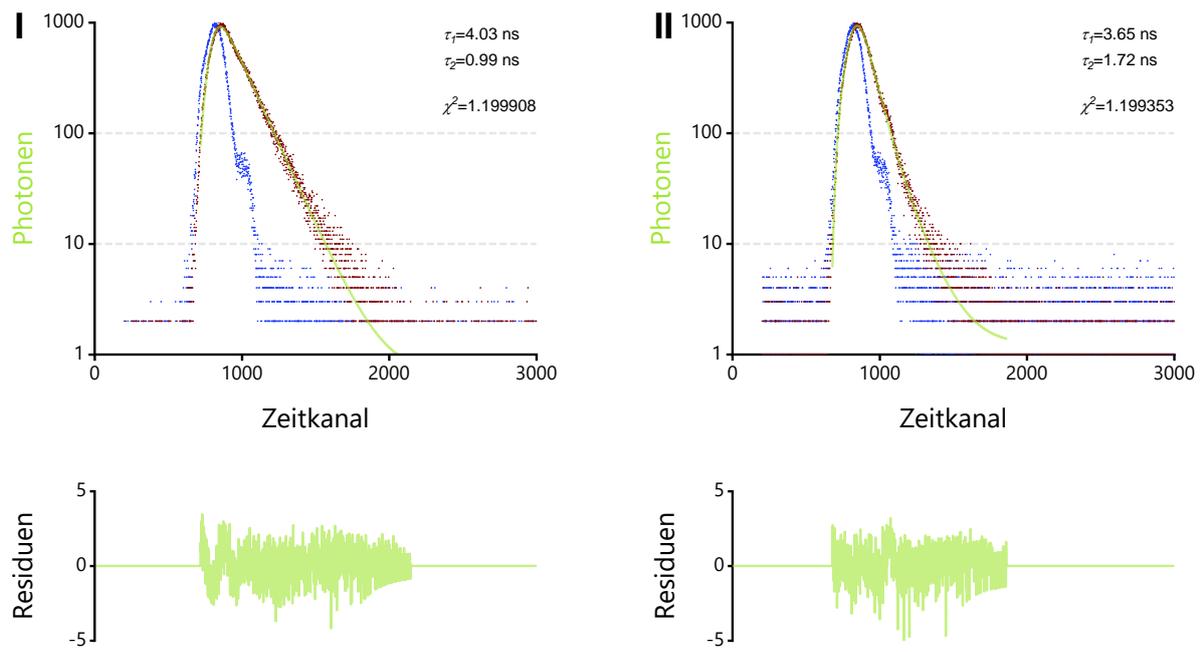


Abbildung 156: Fluoreszenzabklingkurve und Residuen von ssCN3 und dsCN3.

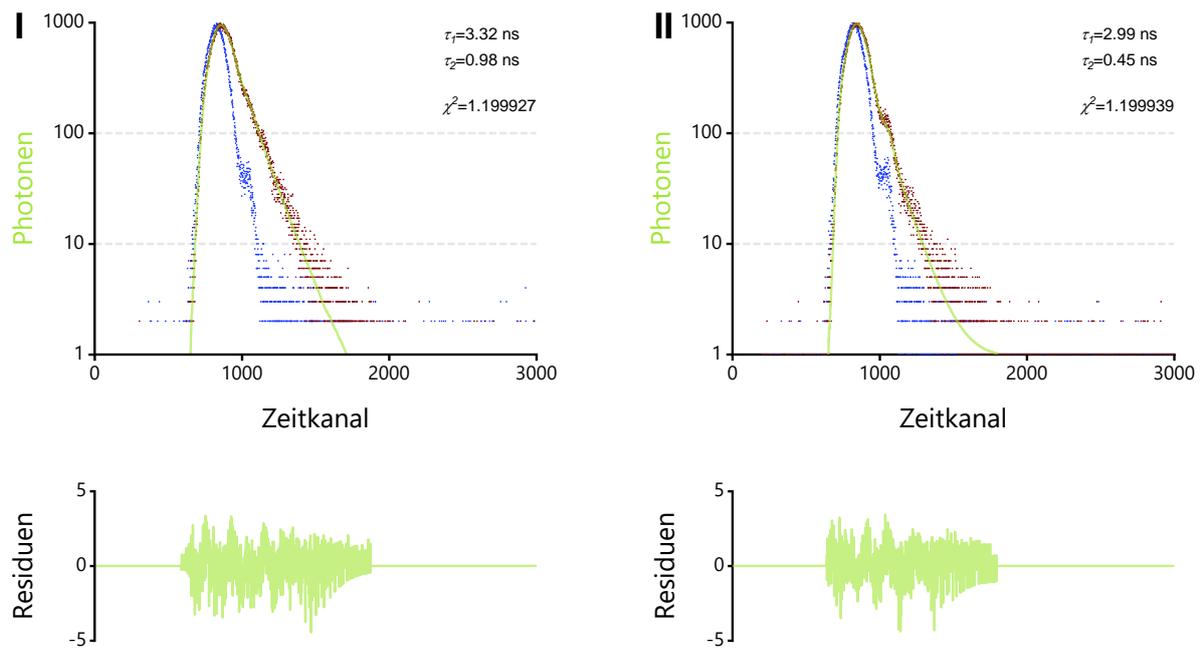


Abbildung 157: Fluoreszenzabklingkurve und Residuen von ssPyA3 und dsPyA3.

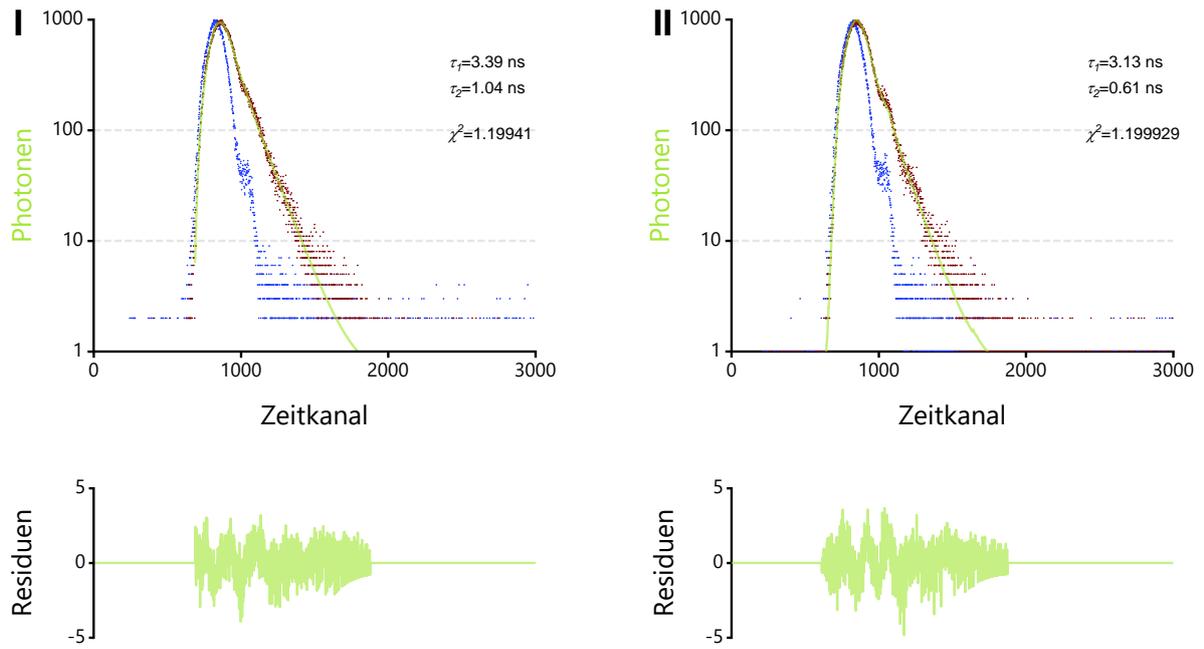


Abbildung 158: Fluoreszenzabklingkurve und Residuen von ssPyCN3 und dsPyCN3.

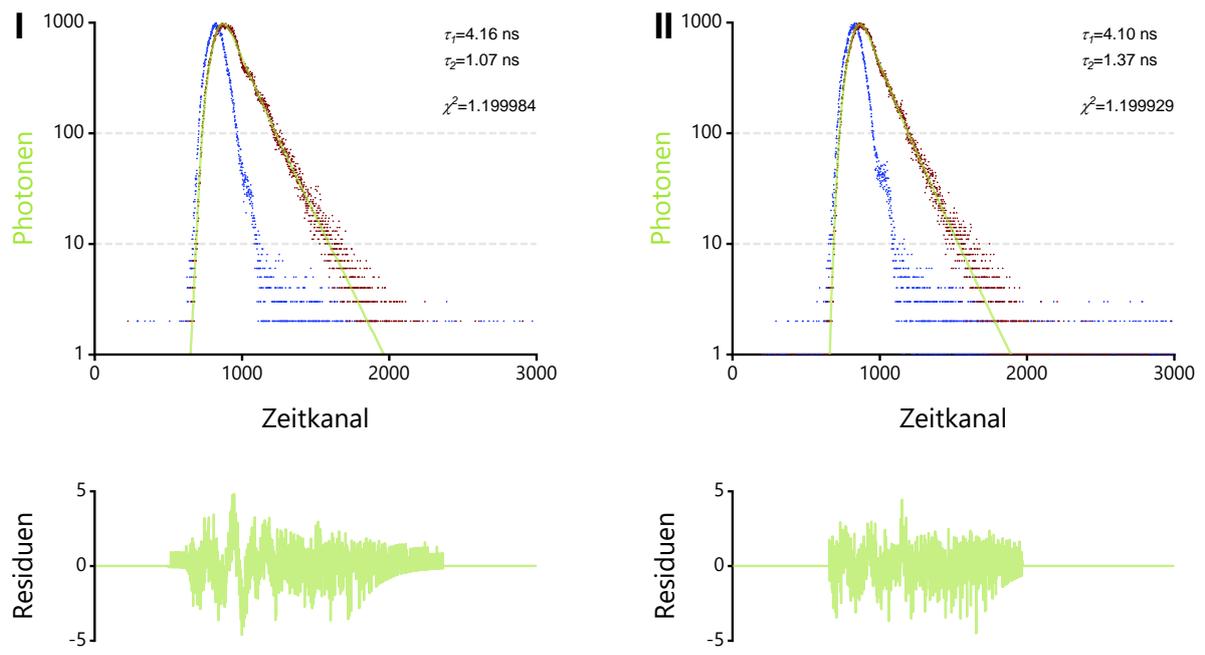


Abbildung 159: Fluoreszenzabklingkurve und Residuen von ss²PyCN3 und ds²PyCN3.

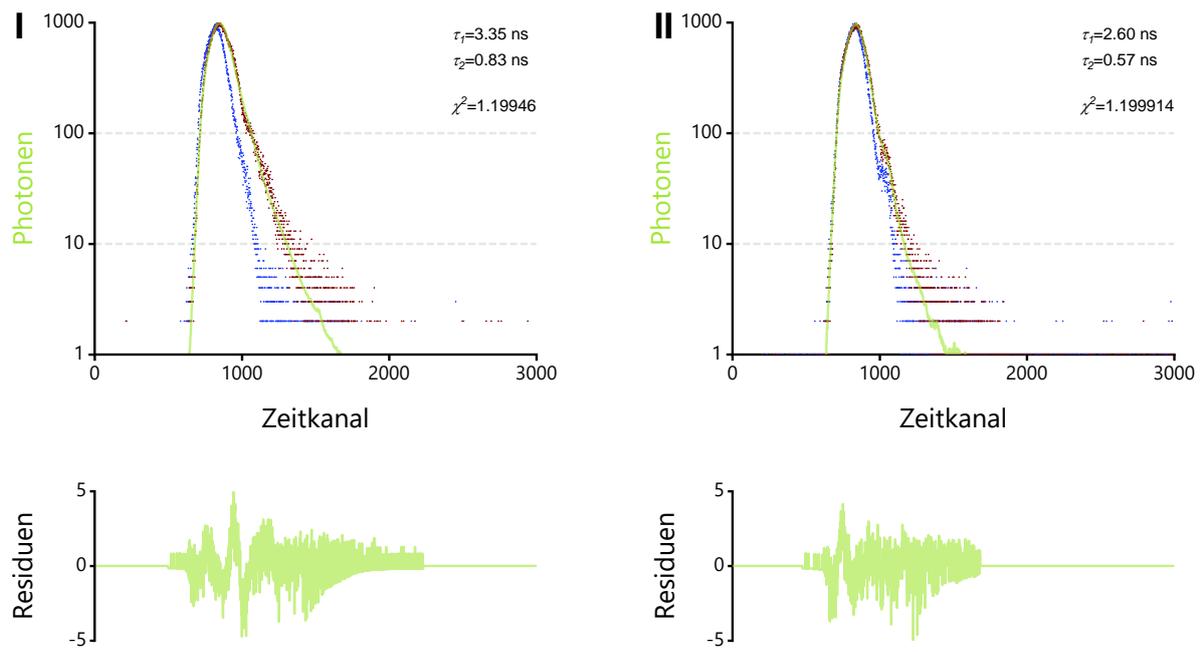


Abbildung 160: Fluoreszenzabklingkurve und Residuen von ssPyInA und dsPyInA.

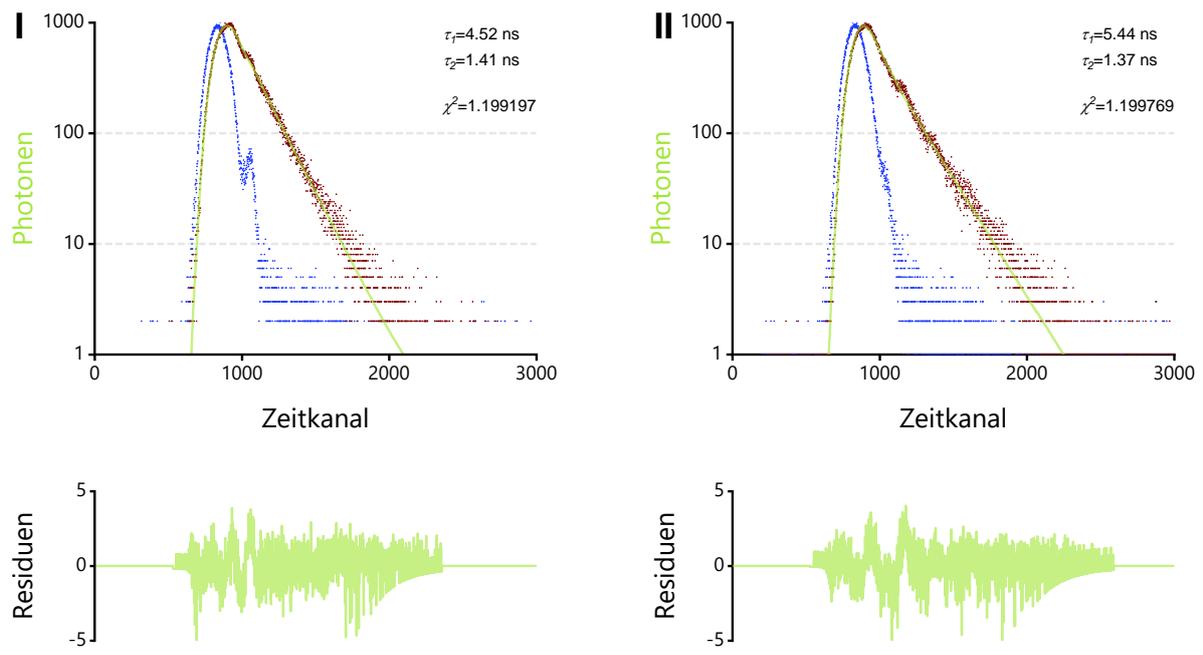


Abbildung 161: Fluoreszenzabklingkurve und Residuen von ssL2PhIn und dsL2PhIn.

Die Fluoreszenzquantenausbeuten und amplitudengemittelten Fluoreszenzlebensdauer der synthetisierten DNA-Konjugate sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 14: Quantenausbeuten und amplitudengemittelte Fluoreszenzlebensdauer aller "klick"-konjugierten Cyanin-Styryl-Farbstoffe im Einzel- und Doppelstrang.

DNA und Modifikation	Φ_F	$\Delta\Phi_F$	τ in ns	$\Delta\tau$ in ns	DNA und Modifikation	Φ_F	$\Delta\Phi_F$	τ in ns	$\Delta\tau$ in ns
ssH	0.21	0.006	2.08	0.005	dsH	0.11	0.002	1.92	0.030
ssH3	0.35	0.002	2.99	0.113	dsH3	0.20	0.002	2.47	0.019
ssH8	0.46	0.002	4.76	0.032	dsH8	0.20	0.002	2.02	0.017
ssOMeH8	0.39	0.077	3.03	0.040	dsOMeH8	0.17	0.002	2.42	0.085
ssOMe	0.03	0.002	0.48	0.014	dsOMe	0.01	0.004	-	-
ssOMe3	0.05	0.002	0.71	0.009	dsOMe3	0.04	0.002	-	-
ssBr	0.22	0.003	2.17	0.055	dsBr	0.32	0.010	3.68	0.030
ssBr3	0.30	0.005	2.70	0.067	dsBr3	0.30	0.005	4.18	0.045
ssA	0.49	0.011	3.82	0.035	dsA	0.20	0.005	2.27	0.085
ssA3	0.51	0.011	3.17	0.009	dsA3	0.22	0.013	2.16	0.049
ssCN	0.26	0.006	2.98	0.009	dsCN	0.32	0.012	1.67	0.049
ssCN3	0.28	0.004	5.04	0.019	dsCN3	0.19	0.005	1.67	0.049
ssPyA3	0.13	0.004	2.14	0.029	dsPyA3	0.07	0.003	1.23	0.022
ssPyCN3	0.16	0.003	2.24	0.032	dsPyCN3	0.12	0.003	1.80	0.024
ss ² PyCN3	0.25	0.005	3.33	0.024	ds ² PyCN3	0.33	0.005	3.24	0.031
ssPyInA	0.09	0.003	1.41	0.022	dsPyInA	0.06	0.002	0.77	0.025
ssL2PhIn	0.35	0.003	4.00	0.042	dsL2PhIn	0.29	0.002	4.24	0.027

Weiter wurden aus den erhaltenen Fluoreszenzquantenausbeuten und –lebensdauern die Geschwindigkeitskonstanten für strahlende und nicht-strahlende Prozesse berechnet.

Tabelle 16: Berechnete strahlende und nicht-strahlende Geschwindigkeitskonstanten für alle Cyanin Styryl Farbstoffe im Einzel- und Doppelstrang.

DNA und Modifikation	k_F in 10^7 s^{-1}	Δk_F in 10^7 s^{-1}	k_{NR} in 10^7 s^{-1}	Δk_{NR} in 10^7 s^{-1}	DNA und Modifikation	k_F in 10^7 s^{-1}	Δk_F in 10^7 s^{-1}	k_{NR} in 10^7 s^{-1}	Δk_{NR} in 10^7 s^{-1}
ssH	10.1	0.29	38.0	0.31	dsH	5.72	0.14	46.3	0.81
ssH3	11.7	0.45	21.7	1.34	dsH3	8.10	0.10	32.4	0.32
ssH8	9.66	0.08	11.3	0.16	dsH8	9.92	0.13	39.7	0.44
ssOMeH8	12.9	2.4	20.1	2.46	dsOMeH8	7.03	0.26	34.3	1.49
ssOMe	6.29	0.46	203	6.18	dsOMe	-	-	-	-
ssOMe3	7.08	0.30	134	1.81	dsOMe3	-	-	-	-
ssBr	10.1	0.29	35.9	1.20	dsBr	8.71	0.28	18.5	0.36
ssBr3	11.1	0.33	26.0	0.98	dsBr3	7.18	0.14	16.7	0.30
ssA	12.8	0.31	13.3	0.39	dsA	8.83	0.40	35.3	1.70
ssA3	16.1	0.35	15.4	0.36	dsA3	10.2	0.64	36.0	1.24
ssCN	8.73	0.20	24.8	0.22	dsCN	19.1	0.91	40.6	1.98
ssCN3	5.56	0.08	14.3	0.11	dsCN3	11.3	0.45	48.4	1.82
ssPyA3	7.14	0.17	37.5	0.67	dsPyA3	5.67	0.26	75.3	1.44
ssPyCN3	7.56	0.15	22.5	0.26	dsPyCN3	6.67	0.19	48.9	0.76
ss ² PyCN3	7.56	0.15	22.5	0.26	ds ² PyCN3	10.3	0.17	20.6	0.34
ssPyInA	6.56	0.26	64.3	1.13	dsPyInA	7.57	0.39	122	4.19
ssL2PhIn	8.81	0.11	16.2	0.29	dsL2PhIn	6.78	0.06	16.8	0.16

10.5.2 Hybridisierungsresponsive Sonden

Sequenzen und analytische Daten

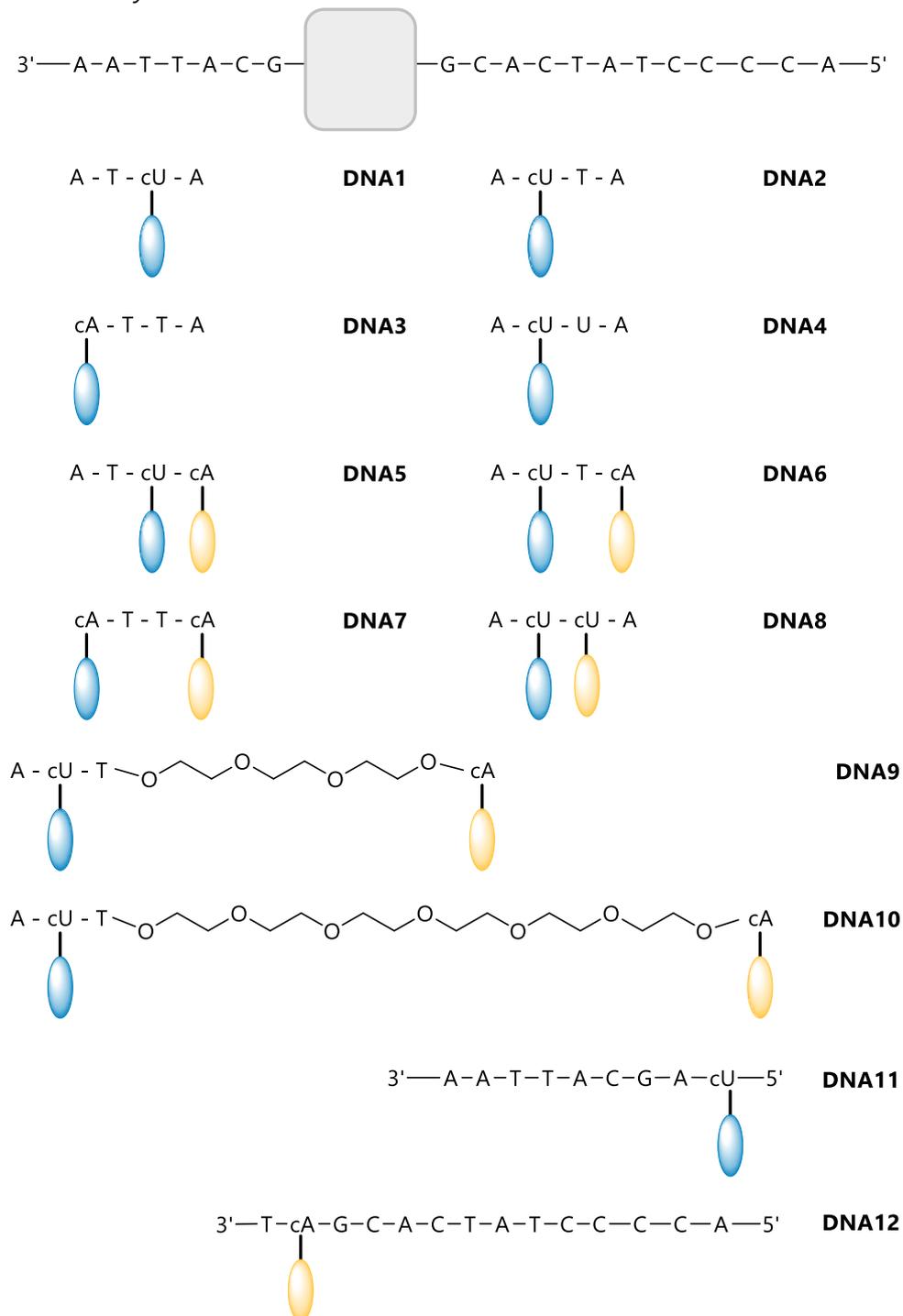


Abbildung 163: Sequenzen der synthetisierten DNA.

Zur Aufreinigung wurde die Umkerkphasen-HPLC verwendet. Als Elutionsmittel A wurde 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 6.5) und als Elutionsmittel B wurde Acetonitril verwendet. Dabei wurde ein Gradient von 8.5 – 17.5% B **DNA5-10** und **DNA12** gewählt. Für **DNA1-4** wurde ein Gradient von 0 – 8.5 % B gewählt. Die Detektionswellenlängen waren $\lambda = 260, 394$ und 513 nm.

Tabelle 17: Analytik der Stränge DNA1-DNA12.

DNA	M_{ber} in m/z	M_{gef} in m/z	ϵ_{260nm} in $10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	t_R in min
ssDNA1	7281	7281	237	20.0
ssDNA2	7281	7284	237	19.9
ssDNA3	7295	7296	234	20.0
ssDNA4	7267	7269	238	19.6
ssDNA5	7834	7832	246	30.3
ssDNA6	7834	7832	246	30.3
ssDNA7	7848	7844	244	30.8
ssDNA8	7820	7818	248	31.3
ssDNA9	7680	8046	246	38.0
ssDNA10	8178	8178	246	35.7
ssDNA11	3054	3051	108	-
ssDNA12	4718	4716	137	-

Optische Spektroskopie

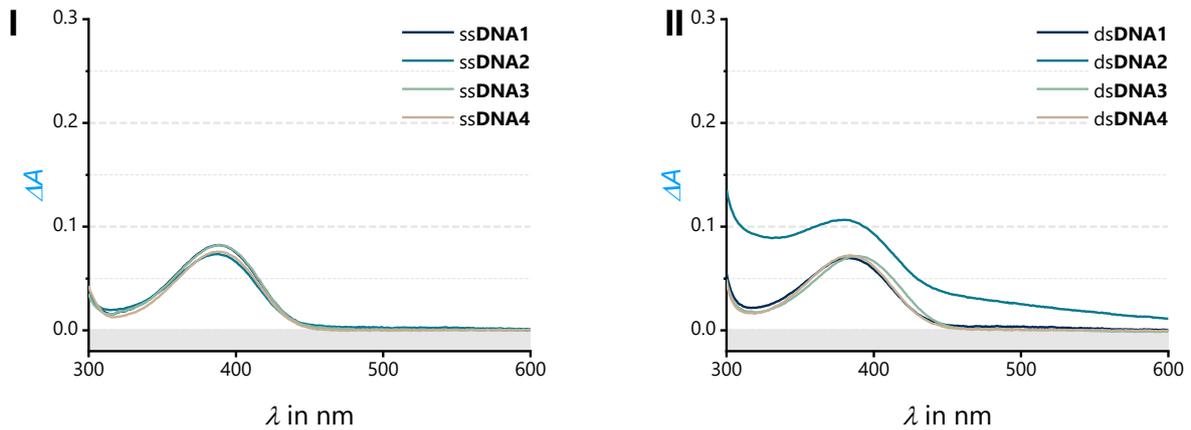


Abbildung 164: Absorptionsspektren der Einzelstränge ssDNA1-4 (I) und Heteroduplices dsDNA1-4 (II).

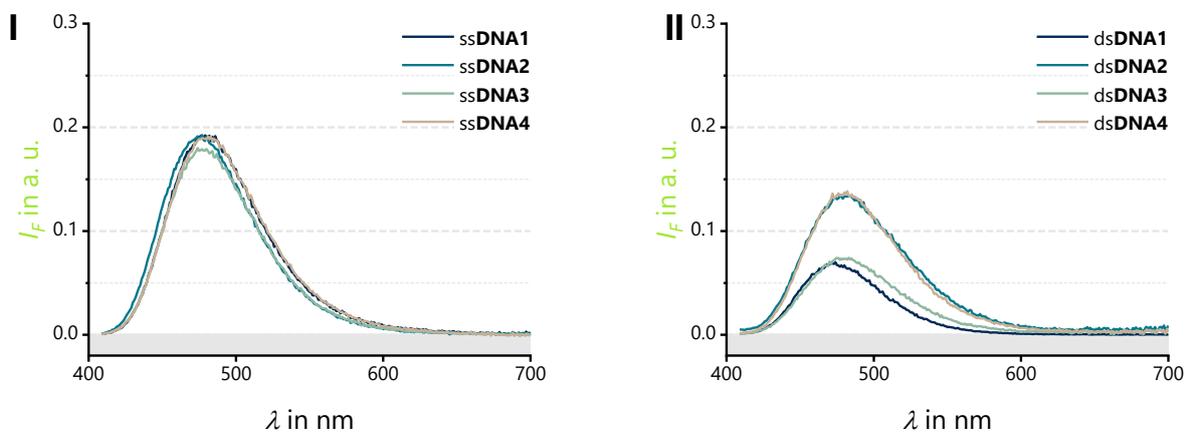


Abbildung 165: Emissionsspektren der donormodifizierten Einzel- (I) und Doppelstränge (II).

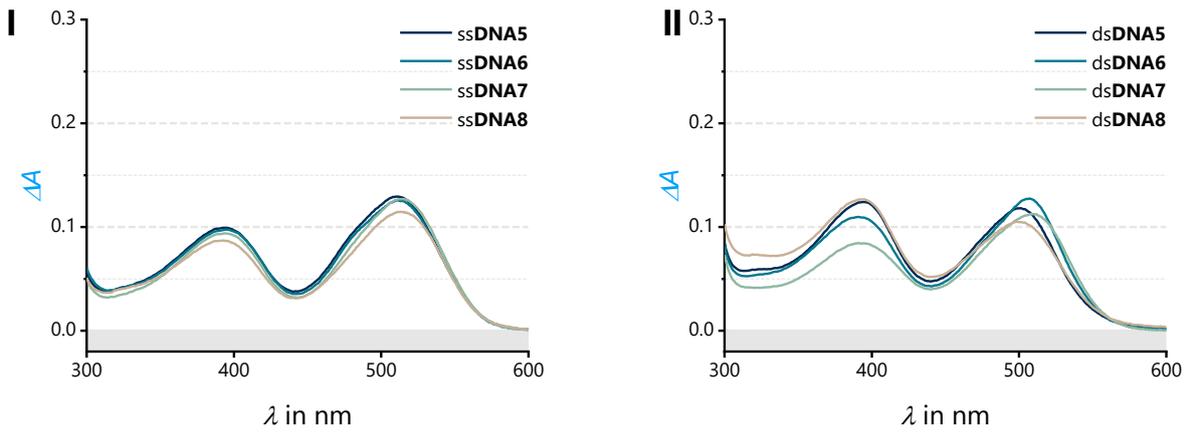


Abbildung 166: Absorptionsspektren der Einzelstränge ssDNA5-8 (I) und Heteroduplices dsDNA5-8 (II).

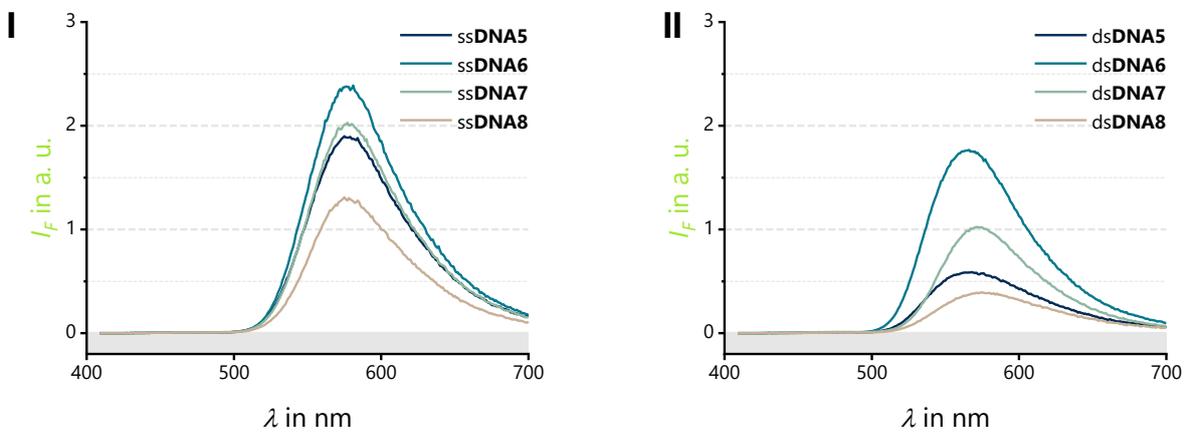


Abbildung 167: Emissionsspektren der doppelmodifizierten Einzel- (I) und Doppelstränge (II).

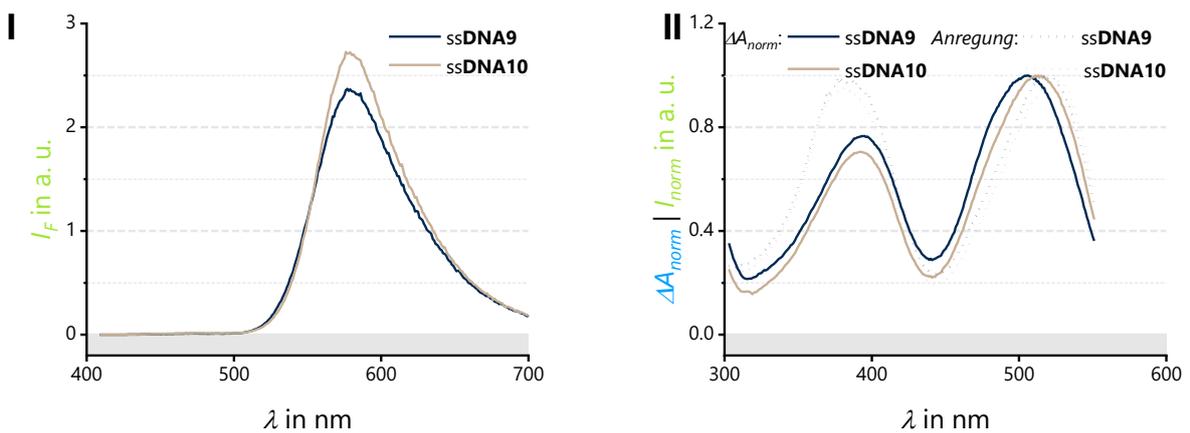


Abbildung 168: Emissions- (I), Absorptions- und Anregungsspektren (II) der doppelmodifizierten Einzel- (—) und Doppelstränge (...) mit PEG-Spacer.

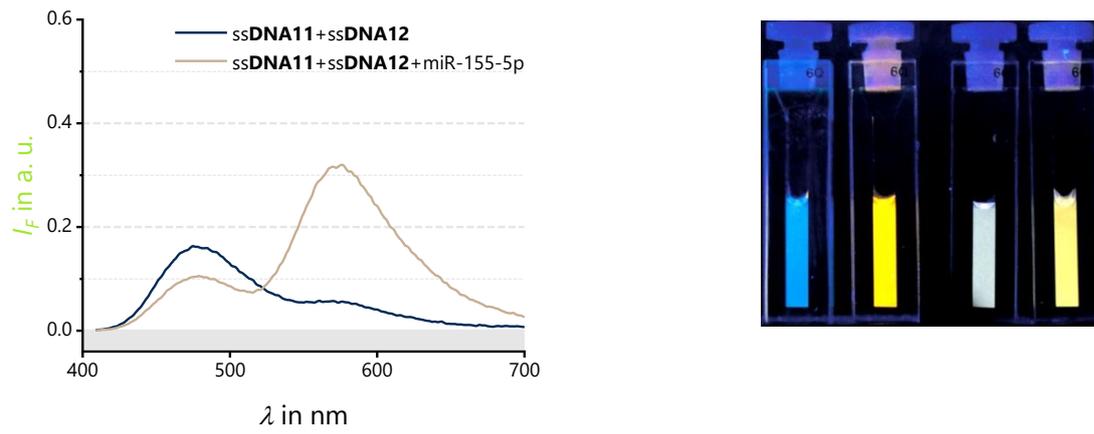


Abbildung 169:Hybridisierungsresponsiver Energietransfer der binären Nukleinsäuresonden DNA10 und DNA11 (links) und Bilder der Küvetten (rechts; v. l. n. r.: ssDNA10, ssDNA11,ssDNA10&11, ssDNA10&11+miR-155-5p).

10.6 Nucleophilie und Stabilität von Cyanin-Styryl-Farbstoffen

10.6.1 Nucleophilieparameter N

Der Nucleophilieparameter N von sechs verschiedenen substituierten Indolderivaten wurde stellvertretend für Cyanin-Styryl-Farbstoffen mit demselben Substituenten angenommen. Die Nucleophilieparameter N der Indolderivate wurde hierbei durch *Mayr et al.* bestimmt. Die Korrelation des molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten mit den literaturbekannten Nucleophilieparametern N lieferte hierbei einen perfekten, positiven Zusammenhang. Für die verbleibenden Chromophore dieser Zusammenhang genutzt, um fehlende Nucleophilieparameter zu berechnen (N_{calc}).

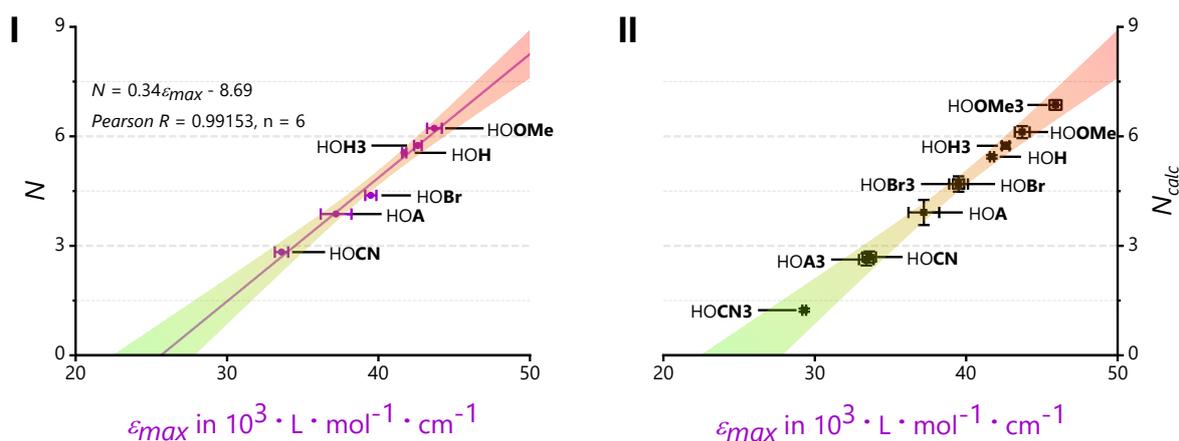


Abbildung 170: Korrelation des Nucleophilieparameters N und des molaren, dekadischen Extinktionskoeffizienten. I: Korrelation und lineare Regression für bekannte Indole, II: berechnete Nucleophilie-Parameter N_{calc} .

Folgende berechneten Nucleophilieparameter wurden hierbei erhalten:

Tabelle 18: Mit Hilfe der Korrelation berechnete Nucleophilieparameter N_{calc} und deren Standardfehler ΔN_{calc} .

Farbstoff	N_{calc}	ΔN_{calc}
HOH	5.44	0.14
HOH3	5.74	0.25
HOOMe	6.12	0.49
HOOMe3	6.86	0.40
HOCN	2.69	0.44
HOCN3	1.24	0.13
HOBBr	4.69	0.37
HOBBr3	4.69	0.62
HOA	3.91	1.01
HOA3	2.63	0.48

10.6.2 Nukleophilie und Photostabilität

Durch Korrelation des dekadischen Logarithmus der Geschwindigkeitskonstante k (erhalten aus den Photostabilitätsuntersuchungen) und den berechneten Nukleophilieparametern konnte ebenso ein linearer Zusammenhang gefunden werden.

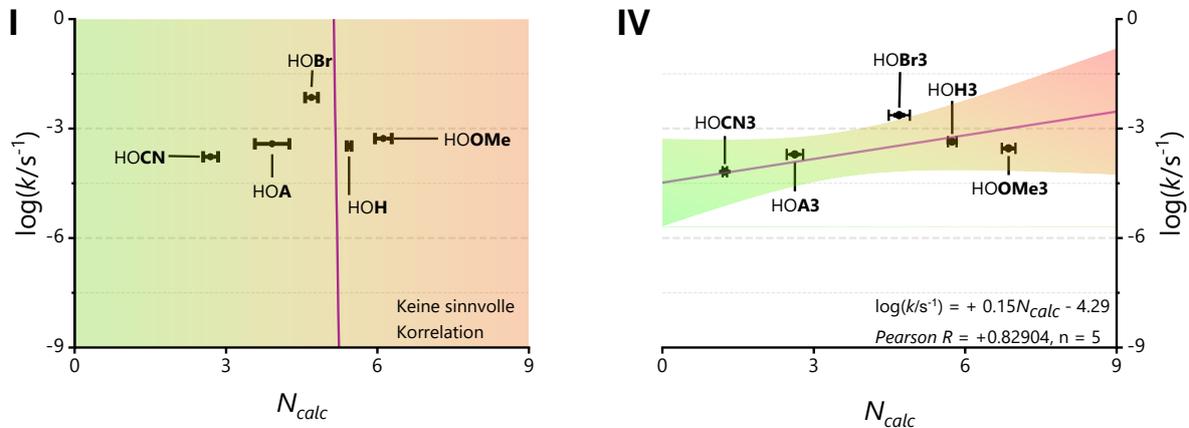


Abbildung 171: Korrelationsanalyse zum Zusammenhang von Nukleophilie und der Reaktivität von nicht-methylierten (I) und methylierten Cyanin-Styryl-Farbstoffen (II) beim Photobleichen.

Dieser Zusammenhang gewinnt an Stärke (*Pearson R*) durch Betrachtung des Gesamtsystems an synthetisierten Cyanin-Styryl-Farbstoffen ohne die 5-bromsubstituierten Farbstoffe HOBr und HOBr3. Letztere besitzen einen entscheidend unterschiedlichen Photoabbaumechanismus.

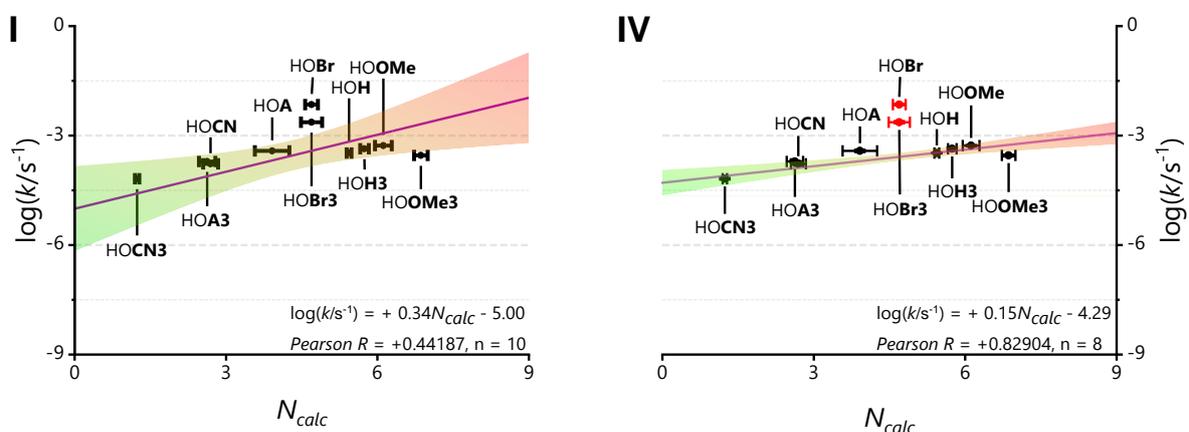


Abbildung 172: Gemeinsame Korrelationsanalyse von methylierten und nicht-methylierten Farbstoffen unter Einbeziehung vom HOBr und HOBr3 (I) und unter Ausschluss der Farbstoffe HOBr und HOBr3 (II).

In den willkürlich ausgewählten Grenzfällen $N_{calc} = 0$ und $N_{calc} = 10$ erhält man korrespondierende Halbwertzeiten von 427 s (starke Nukleophile) bis 13515 s (schwache Nukleophile).

10.6.3 Nukleophilie und Stabilität gegenüber Singulett-Sauerstoff

Der Zusammenhang zwischen Nukleophilie und der Reaktivität von Cyanin-Styryl-Farbstoffen mit Singulett-Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid ist stärker (Betrag des *Pearson R*) im Vergleich zur Photostabilität-Nukleophilie-Korrelation.

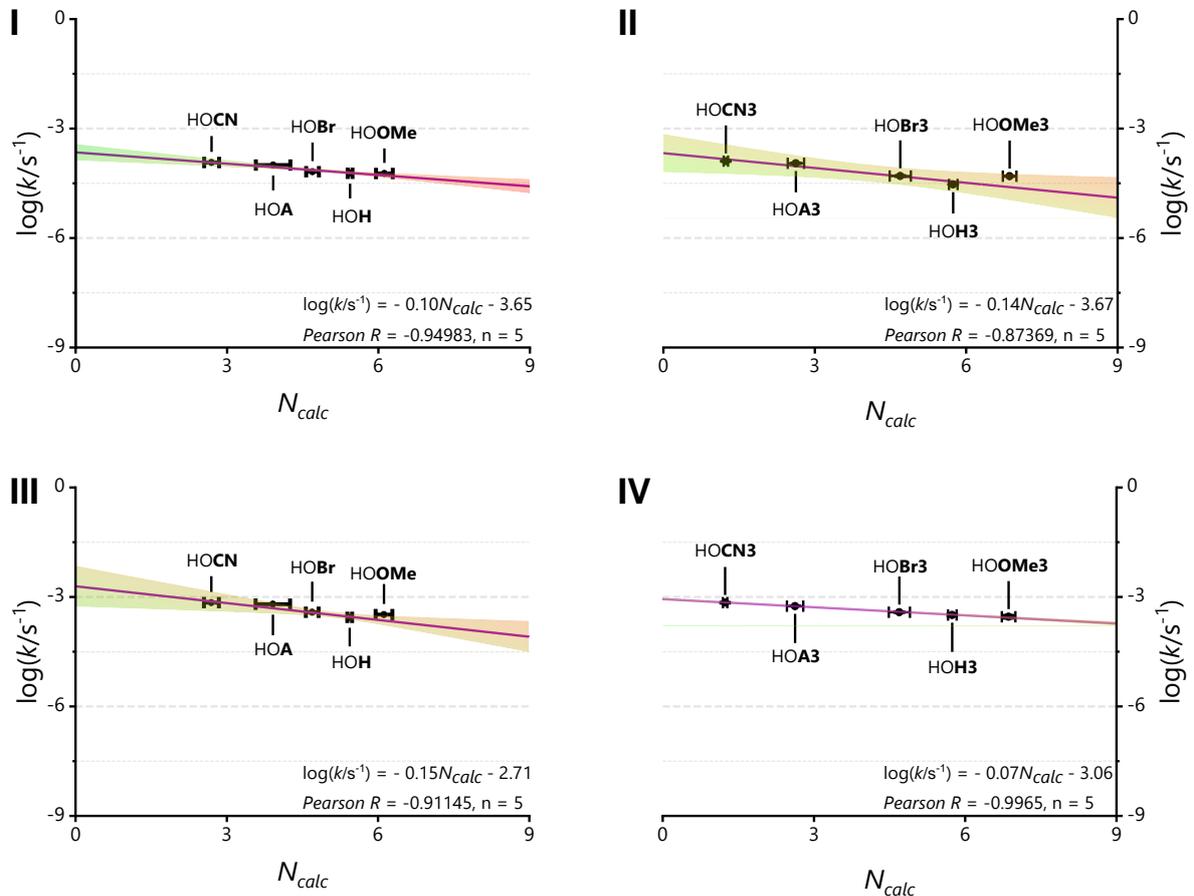


Abbildung 173: Korrelationsanalyse zum Zusammenhang von Nukleophilie und der Reaktivität von Cyanin-Styryl-Farbstoffen mit Wasserstoffperoxid (I, II) und thermisch synthetisiertem Singulett-Sauerstoff (III, IV).

Die Nukleophilie zeigt in Bezug auf die Reaktivität der Cyanin-Styryl-Farbstoffe gegenüber Singulett-Sauerstoff einen nur geringen Effekt.

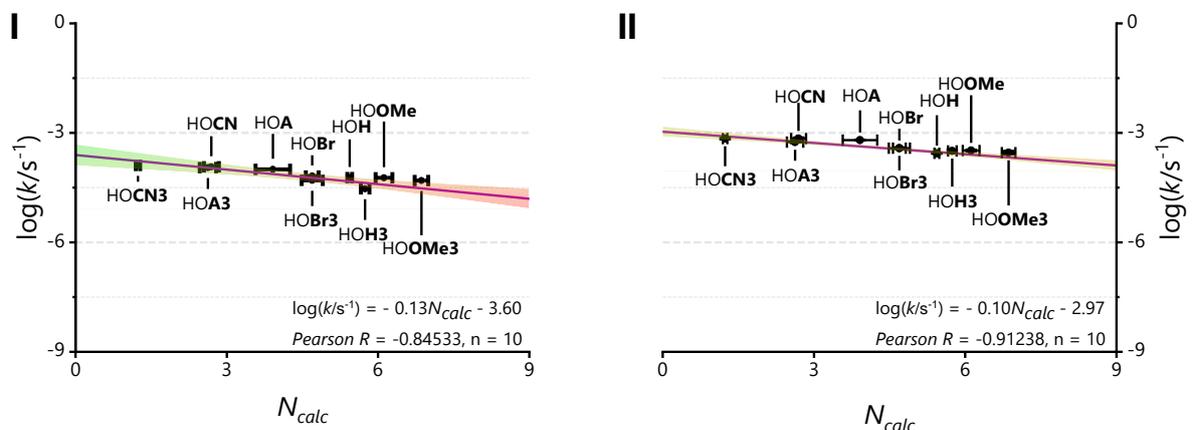


Abbildung 174: Korrelationsanalyse zum Zusammenhang von Nukleophilie und der Reaktivität von Cyanin-Styryl-Farbstoffen mit Wasserstoffperoxid (I) und thermisch synthetisiertem Singulett-Sauerstoff (II).

Dagegen zeigt sich in der Reaktivität gegenüber Wasserstoffperoxid ein ausgeprägter Effekt. Ebenso verhält es sich in der systemischen Betrachtung von methylierten und nicht-methylierten Farbstoffen. Während die Elektronendichte der Indolfunktion einen großen Einfluss bezüglich der Reaktivität gegenüber Wasserstoffperoxid besitzt, ist die Reaktion mit Singulett-Sauerstoff zwar schneller, aber ohne herausragendem Zusammenhang mit der Nukleophilie.

10.7 Fluoreszenzmikroskopische Lebendzell-Untersuchungen

10.7.1 Zelllokalisierung der Cyanin-Styryl-Farbstoffe

2×10^4 HeLa-Zellen (humanes Zervixkarzinom) wurden in jede Vertiefung eines 8-Well μ -Objektträgers (μ Slide 8-well ibiTreat, IBIDI) ausgesät und 24 h in 200 μ l *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, high glucose, *Invitrogen*) mit 60 μ g/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin und 10 % fetalem Kälberserum (FCS, *Sigma-Aldrich*) unter sterilen Bedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Anschließend wurden die Zellen bei einer Endkonzentration von 10 μ M des jeweiligen Farbstoffes (2 mM Stammlösung in Ethanol), verdünnt mit *Dulbecco's Modified Eagle-Medium*, und einem Inkubationsvolumen von 200 μ L inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen dreimal mit PBS (*Phosphate-Buffered Saline*, *Gibco*) gewaschen, bevor die zelluläre Aufnahme der Farbstoffe durch konfokale Lebendzellen-Fluoreszenzmikroskopie gemessen wurde.

Die Visualisierung der intrazellulären Lokalisation der Farbstoffe wurde durch konfokale Mikroskopie mit einem *Leica TCS-SP8*, ausgestattet mit einem Leica DMI8-CS Mikroskop mit inverser Bauweise und einem HC PL APO CS2 40x / 1.10 WATER Objektiv, durchgeführt. Die Farbstoffe wurden mit einem Argonionenlaser ($\lambda_{exc} = 488$ nm) angeregt und die Fluoreszenzemission bei $\lambda_{em} = 500$ -530 nm detektiert. Ebenso wurden Hellfeldbildaufnahmen aufgenommen. Die Bilderfassung wurde mit einer lateralen Auflösung von 1024 \times 1024 Pixel und einer Bittiefe von 8 Bit unter Verwendung der *LAS-AF 1.1.0.12420* Software durchgeführt.

F. Rönicke führte die Versuche zur nicht-kovalenten und *I. Wehl* zur kovalenten Fluoreszenzmarkierung durch in der Arbeitsgruppe *Schepers* durch.

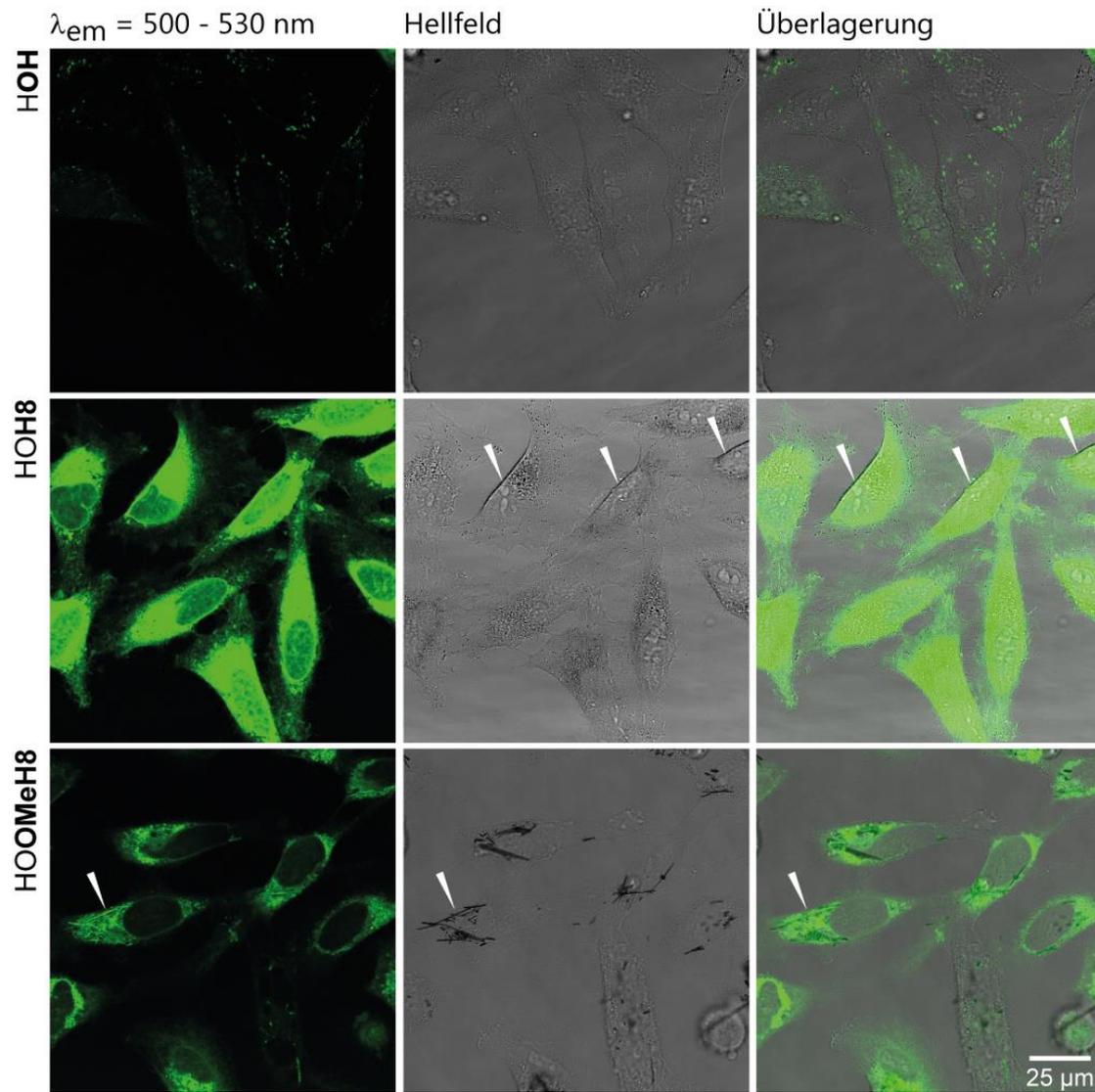


Abbildung 175: Fluoreszenzmikroskopie lebender HeLa-Zellen nach Inkubation mit den Farbstoffen HOH, HOH8 und HOOMeH8. HOH8: Pfeile zeigen beginnende Ablösung der HeLa-Zellen, HOOMeH8: Pfeile zeigen Kristallisation des Farbstoffes.

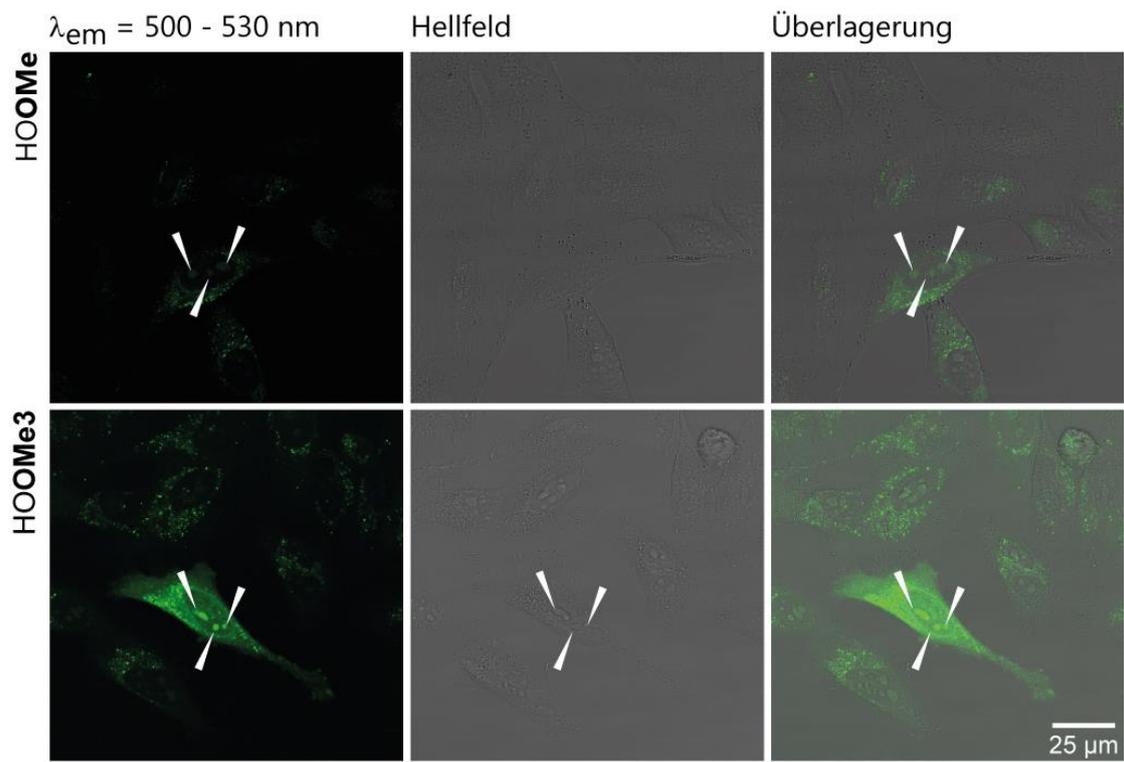


Abbildung 176: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen lebender HeLa-Zellen nach Inkubation mit den Farbstoffen HOOMe und HOOMe3. Pfeile: fluorophormarkierte Strukturen im Zellkern. ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$)

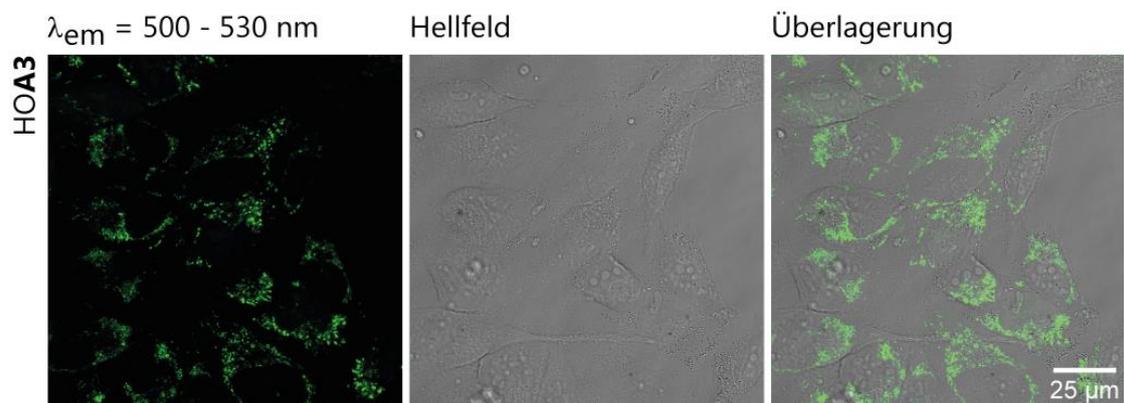


Abbildung 177: Fluoreszente Bildgebung von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation von HOA3. ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$)

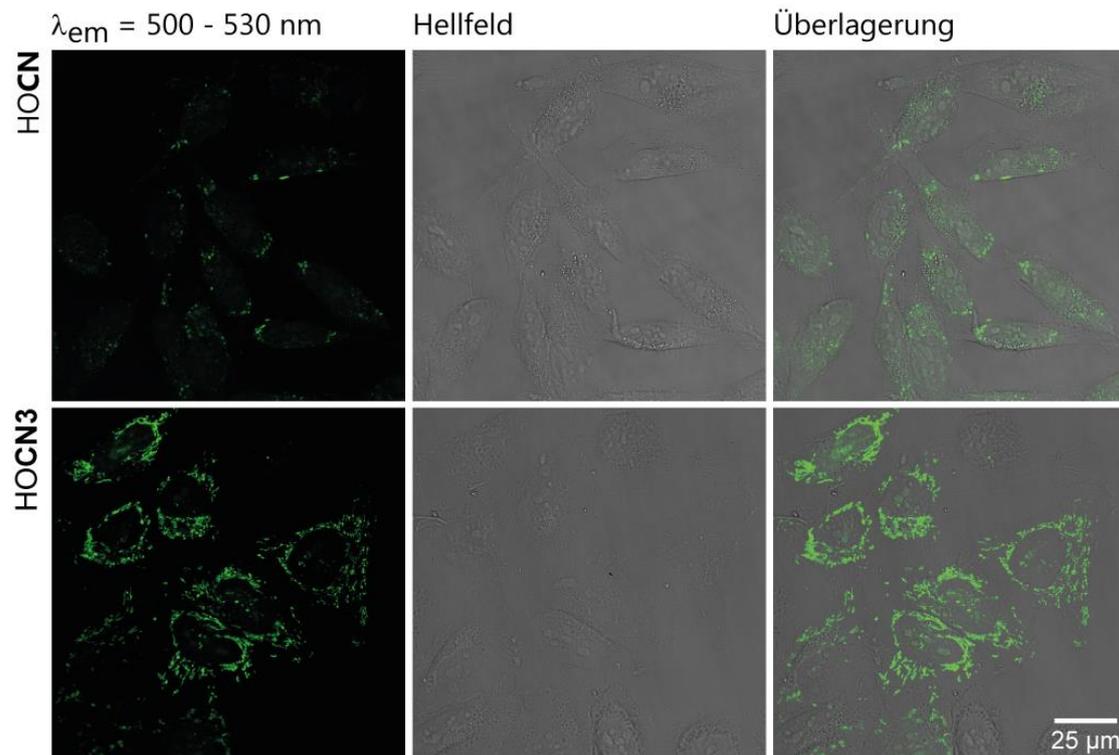


Abbildung 178: Fluoreszente Bildgebung von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation von 10 μM HOCN bzw. HOCN3. ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$)

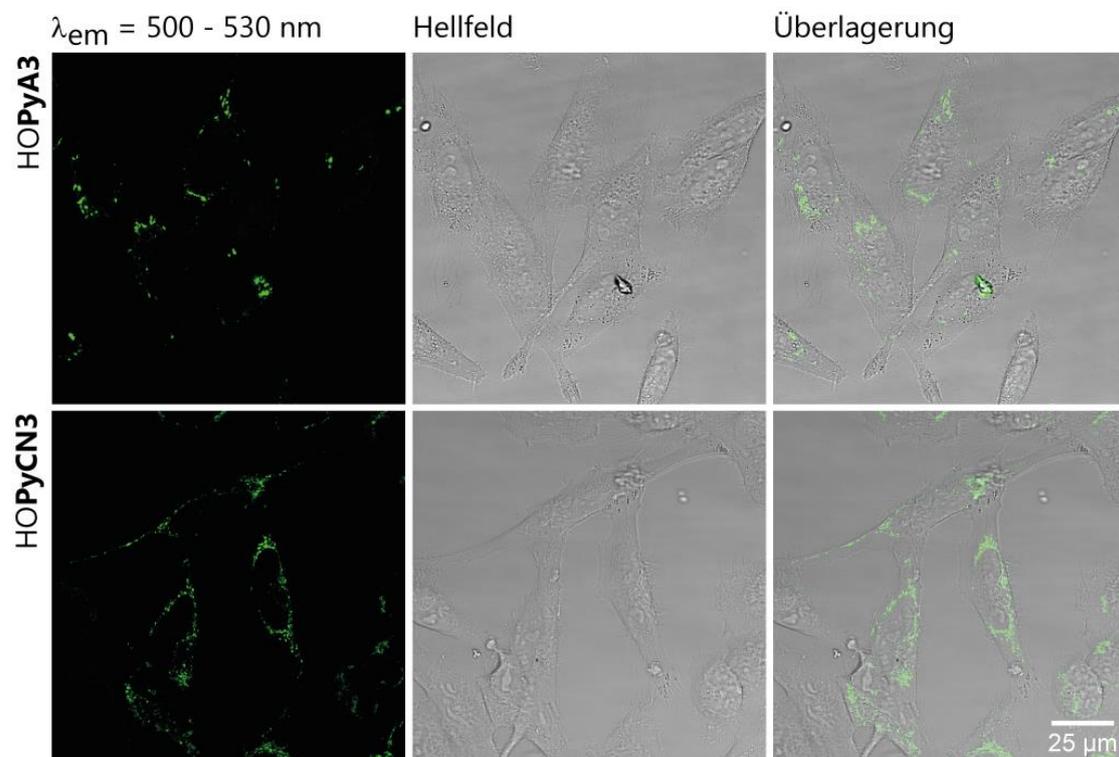


Abbildung 179: Fluoreszenzmikroskopische Eigenschaften von HOPyA3 und HOPyCN3 in lebenden HeLa-Zellen. ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$)

10.7.2 Spezifische Fluoreszenzmarkierung von Mitochondrien

Dies Versuche wurden in der Arbeitsgruppe *Nienhaus* durch X. Ge durchgeführt.

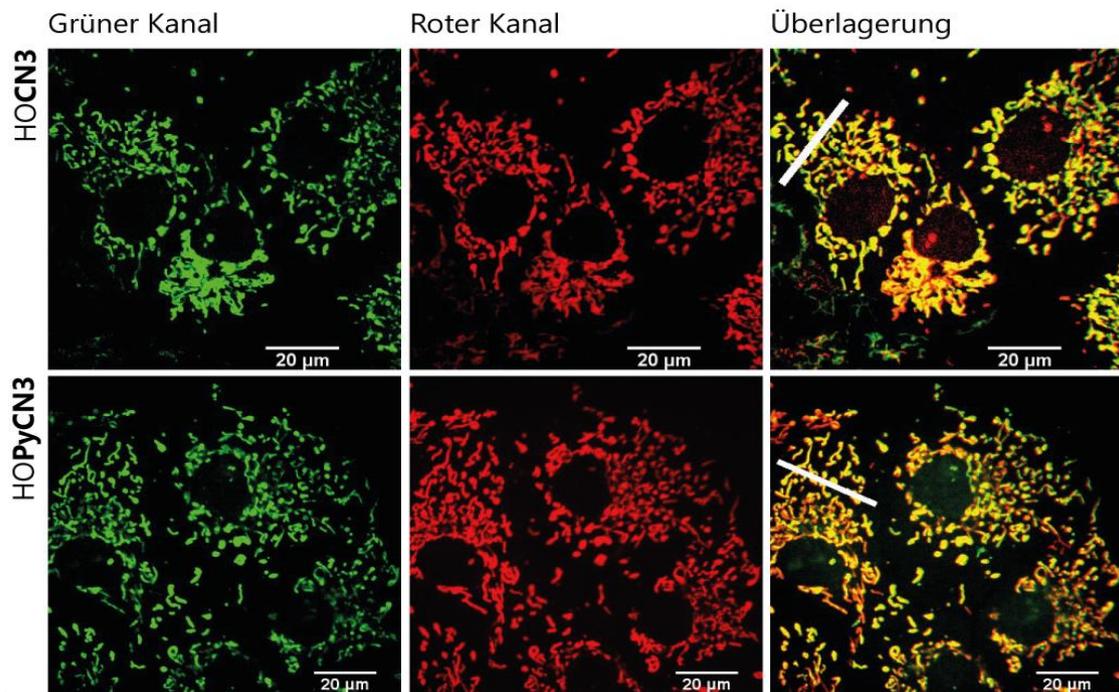


Abbildung 180: Fluoreszenzmikroskopie lebender COS-7-Zellen nach 30 min Inkubation mit HOCN3 oder HOPyCN3 und gleichzeitiger Färbung mit MitoTracker™ Deep Red FM. Querschnitt: Kolokalisationsanalyse.

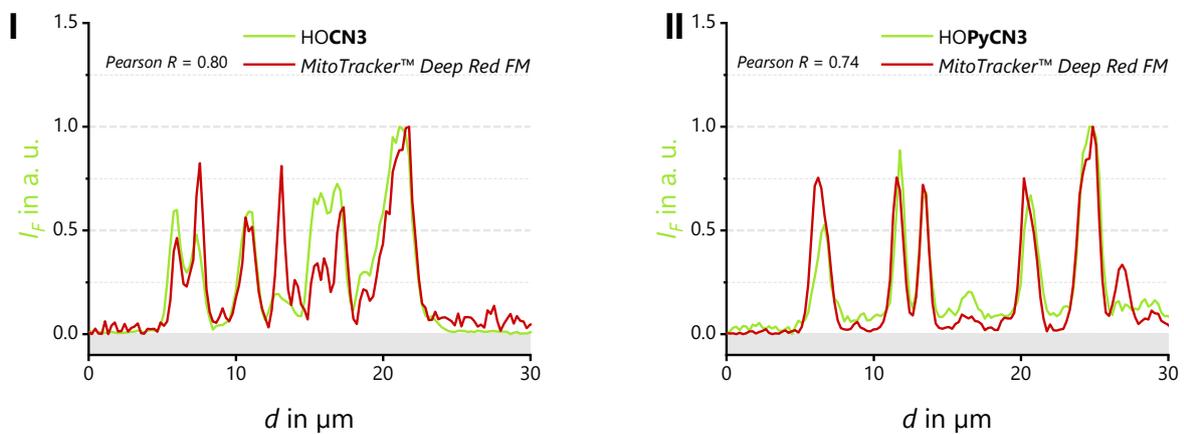


Abbildung 181: Intensitätsnormierte Fluoreszenzemission im Querschnitt der Fluoreszenzmikroskopieaufnahme.

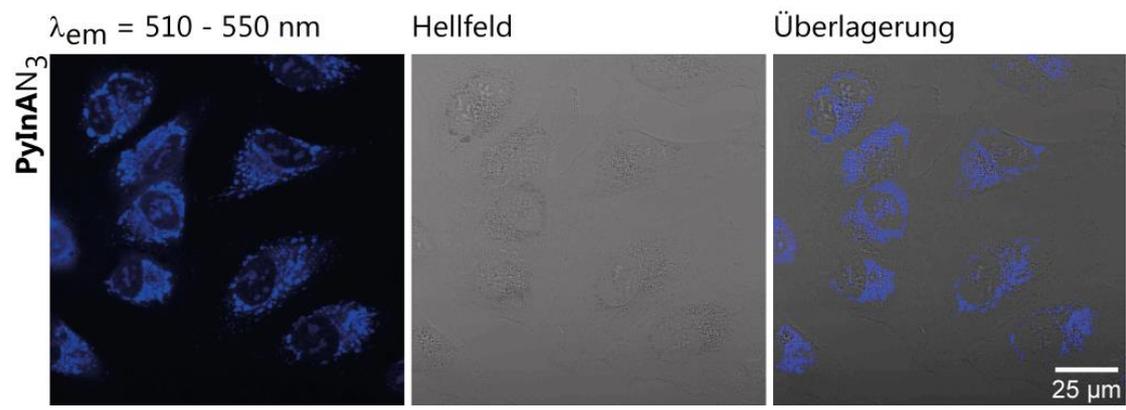


Abbildung 182: Fluoreszenzmikroskopie von PhInAN₃ in lebenden HeLa-Zellen.

10.8 Zytotoxizität der Cyanin-Styryl-Farbstoffe

Um den Einfluss der Farbstoffe auf die metabolische Aktivität gegenüber HeLa-Zellen zu untersuchen, wurde der CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (*Promega*) eingesetzt. Dieser Test basiert auf dem intrazellulären Farbumschlag durch die Reduktion eines Tetrazoliumsalses (gelb) zu einem Formazanprodukt (blau), der nur in metabolisch aktiven Zellen stattfindet. Bei Wellenlängen zwischen 630-750 nm kann die Absorption des Formazan-Produkts nachgewiesen und als direktes Maß für die Viabilität der Zellen verwendet werden. Die Kultivierung der HeLa-Zellen erfolgte analog zu Kapitel 10.7.1.

Für den Versuchsaufbau wurde eine 96-Well-Platte (*Cstar 3596, 96 Well Cell Culture Cluster, steril*) mit 1 x 10⁴ HeLa-Zellen / Well in 100 µl *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, high glucose, Gibco)*, ergänzt durch 10% fetales Kälberserum (FKS, *PAA*), und 1 U / mL Penicillin / Streptomycin bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit besät. Nach 24 h wurden jeweils 8 Wells mit einer Endkonzentration von 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM und 50 µM jedes Farbstoffs (2 mM Stammlösungen in Ethanol) behandelt und 72 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein Zellensatz unbehandelt gehalten, während mit 5 µl 20 % Triton X behandelte Zellen als Positivkontrolle dienten. Anschließend wurden 15 µl der Tetrazoliumfarbstofflösung in jeden Well gegeben und 4 h inkubiert, bevor die Reaktion gestoppt und das erzeugte Formazan gemäß Herstellerhandbuch mit 100 µl *Solubilization Solution / Stop Mix* gelöst wurde. Nach 24 h Inkubation wurde die Absorption bei 595 nm mit einem 96-Well-Plattenleser (*SpectraMax M2 Microplate Reader, Molecular Devices*) aufgenommen. Die Daten wurden gemittelt und die Mehrfachbestimmung jeder Substanz und Konzentration ermöglichte es, die Standardabweichung zu berechnen.

F. Rönicke führte diese Versuche in der Arbeitsgruppe *Schepers* durch.

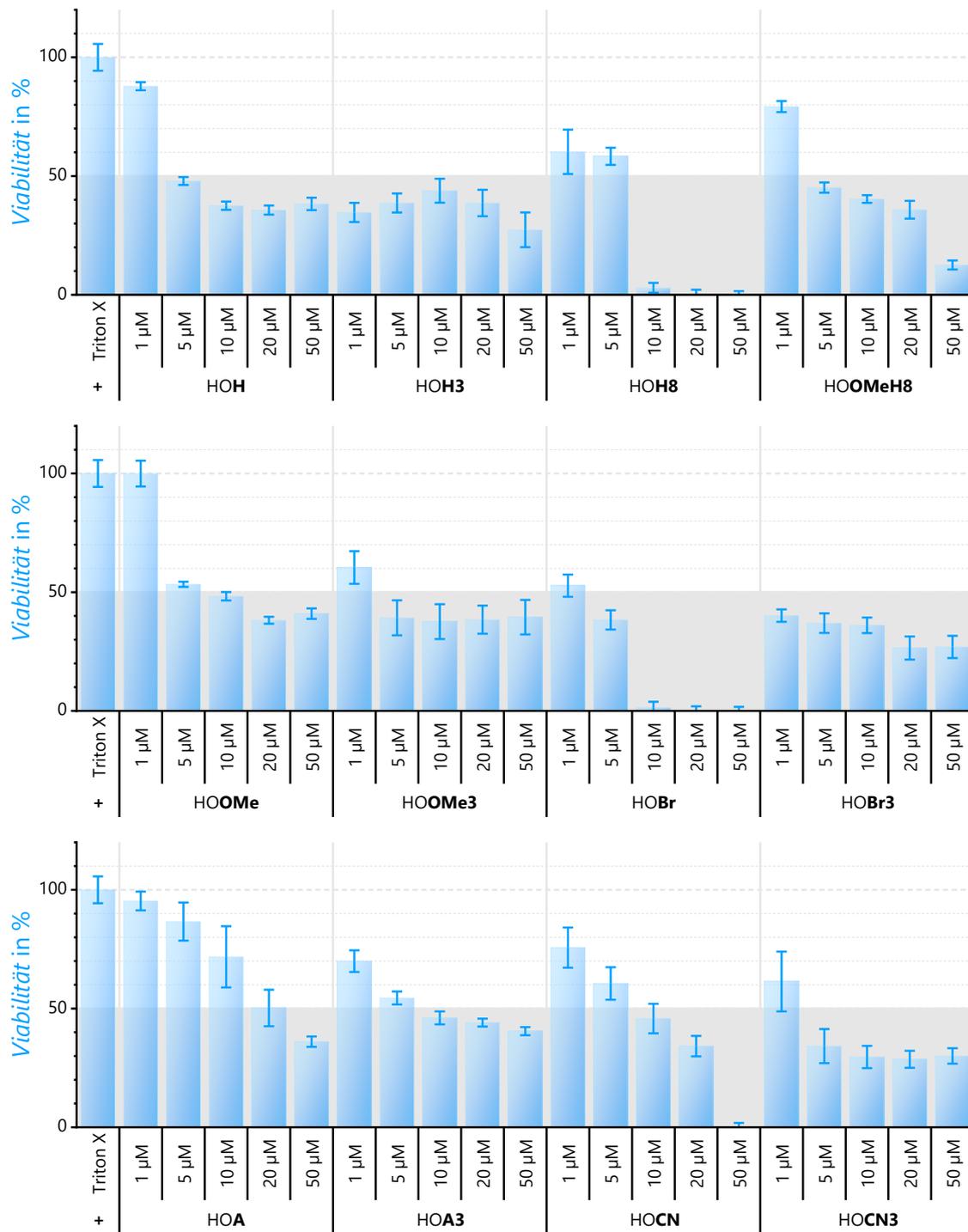


Abbildung 183: Viabilität von HeLa-Zellen nach 72 h Inkubation der synthetisierten Cyanin-Styryl-Farbstoffe.

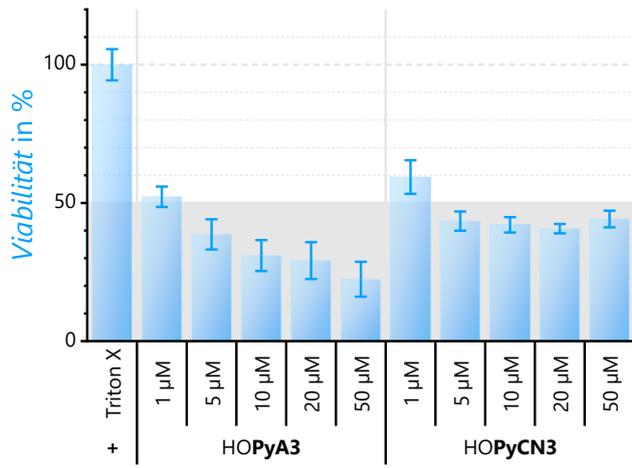


Abbildung 184: Zellviabilität von HeLa-Zellen in Abhängigkeit der Konzentration von HOPyA3 und HOPyCN3.

Abkürzungsverzeichnis und Glossar

%	Prozent
(+/-)-I-Effekt	positiver/negativer induktiver Effekt
(+/-)-M-Effekt	positiver/negativer mesomerer Effekt
°C	Grad Celsius
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
μm	Mikrometer
μ_{mn}	Übergangs-Matrixelement des Übergangs zwischen den Zuständen n und m
μmol	Mikromol
¹³ C	Kohlenstoff-13, NMR-aktiv (NMR)
¹ H	Protium, NMR-aktiv (NMR)
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
³ O ₂	Triplet-Sauerstoff
A	Absorbanz
a	mittlere Abstand zwischen den Fluorophormolekülen
Å	Ångström, 1 Å = 1.0 · 10 ⁻¹⁰ m
A, T, C, G, U	Nukleobasen
A_{260nm}	Absorbanz bei der Wellenlänge $\lambda = 260$ nm
ABI	<i>Applied Biosystems</i>
Act	0.45 M Tetrazol in Acetonitril (<i>Activator</i>)
Ak	Akzeptorfarbstoff
ATR	<i>attenuated total reflection</i> (IR)
ATTO 488	Xanthenfarbstoff
ATTO 647N	Carbopyronin-Farbstoff
ATTO 655	Oxazin-Farbstoff
B	Helligkeit (brightness)
B ⁻	Base
BP	Binary Probe
BP-1, BP-2	Bleichprodukt

bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
c_0	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum
cA	2'-O-Propargyladenosin
Cap A	Essigsäureanhydrid in Tetrahydrofuran / Pyridin (<i>Capping Reagent A</i>)
Cap B	N-Methylimidazol in Tetrahydrofuran / Pyridin (<i>Capping Reagent B</i>)
cA ^{Pac}	phenoxyacetylgeschützten 2'-O-Propargyladenosin
CD ₂ Cl ₂	deutertes Dichlormethan (Dichlormethan-d ₂)
CDCl ₃	deutertes Trichlormethan (Chloroform-d)
cm	Zentimeter
cm ⁻¹	inverse Zentimeter
COS-7	immortalisierte Fibroblasten-Zelllinie aus dem Nierengewebe von Grünen Meerkatzen
COSY	¹ H- ¹ H-NMR (<i>correlated spectroscopy</i>)
COT	Cyclooctatetraen
CPG	<i>Controlled Pore Glass</i>
cU	2'-O-Propargyluridin
CuAAC	kupfer(I)-katalysierte Huisgen-Alkin-Azid-Zykloaddition (<i>copper(I)-catalyzed azide alkyne cycloaddition</i>)
Cy3, Cy5, Cy7	Cyaninfarbstoffe
CyIP	<i>Cyanine Indole Pyridine</i>
CyIQ	<i>Cyanine Indole Quinoline</i>
D	mittlerer Diffusionskoeffizient
d	Dublett (NMR)
DBCO, COMBO	Cyclooctin-Derivate
Dblk	3 % Dichloressigsäure in Dichlormethan (<i>Deblock</i>)
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DIR	Cyaninfarbstoff (<i>Dimethylindole Red</i>)
DMC	Dimethylcarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>

DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- d_6	deutერიertes Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Do	Donorfarbstoff
DPBF	1,3-Diphenylisobenzofuran
dt	Dublett vom Triplett (NMR)
<i>E</i>	Elektrophilie
<i>E</i>	Energietransfer-Effizienz
<i>e</i>	Elementarladung des Elektrons
E^+	Elektrophil
$E^0(X/X^-)$	Standardelektrodenpotential
EA	Elementaranalyse
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Essigsäureethylester
EI	Elektronenstoß-Ionisation
Eosin Y	Xanthenfarbstoff
eq	Äquivalent
ESI	Elektronenspray-Ionisation
ET	Energietransfer
<i>f</i>	Oszillatorstärke
<i>f</i>	Kontrastverhältnis
FAB	<i>Fast Atom Bombardement</i>
FC	<i>Flash</i> -Chromatographie
FKS	fetales Kälberserum
f_{mn}	theoretische Oszillatorstärke des Übergangs zwischen den Zuständen n und m
FRET	<i>Förster</i> -Resonanzenergietransfer
FS	Farbstoff
FT	<i>fourier transform</i> , Fouriertransformation
<i>h</i>	Plancksche Wirkungsquantum
HB	Protonierte Base

HeLa	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (<i>Henrietta Lacks</i>)
hex	<i>n</i> -Hexan
HO \cdot	Hydroxyl-Radikal
HO $_2\cdot$	Hydroperoxyl-Radikal
HOMO	höchstes besetztes Molekülorbital (<i>highest occupied molecular orbital</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR-MS	hochauflösende Massenspektrometrie
HSQC	^1H - ^{13}C -NMR (<i>heteronuclear single quantum coherence</i>)
Hz	Hertz (NMR)
I_0	Ausgangsintensität
I_{Ak}	Fluoreszenzintensität des Akzeptors
IC	innere Umwandlung (<i>internal conversion</i>)
I_{Do}	Fluoreszenzintensität des Donors
I_F	Fluoreszenzintensität
$I_{F,norm}$	intensitätsnormierte Emission
I_{LED}	Emissionsspektrum der LED
INDO	semi-empirische, quantenchemische Methode (<i>Intermediate Neglect of Differential Overlap</i>)
I_{norm}	intensitätsnormiertes Anregungsspektrum
IR	Infrarotspektroskopie
ISC	Interkombination (<i>intersystem crossing</i>)
J	Kopplungskonstanten
$J(\lambda)$	spektrales Überlappungsintegral
k	<i>Boltzmann</i> -Konstante
$k_{20\text{ °C}}$	Geschwindigkeitskonstante bei 20 °C
k_F, k_{NR}	Geschwindigkeitskonstanten der Fluoreszenzemission und nicht-strahlender Prozesse
L	Liter
LC $_{50}$	mittlere letale Konzentration
LC-MS	Flüssigchromatographie mit massenspektrometrischer Gerätekopplung
LED	<i>light emitting diod</i>
LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital (<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>)

m	Multiplett (NMR)
m	<i>middle</i> (IR)
M	Molar
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionization</i>
MB	Molecular Beacon
mbar	Millibar
M_{ber}	berechnetes Masse-zu-Ladungsverhältnis
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney Zellen
m_e	Elektronenmasse
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
M_{gef}	gefundenes Masse-zu-Ladungsverhältnis
MHz	Megahertz (NMR)
min	Minute(n)
miR, miRNA	microRNA
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mol	Mol
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazol-3-ium Bromid
n	nicht-bindendes Molekülorbital
N	Nukleophilie-Parameter
n	Anzahl der in der Korrelation verwendeten, verschiedenen Fluorophore
N_A	Avogadrokonstante
NaAsc	Natriumascorbat
NaP _i	Natriumphosphat-Puffer
NBA	Nitrobenzylalkohol

N_{calc}	Bestimmter Nukleophilie-Parameter für Cyanin-Styryl-Farbstoffe
N_i	Anzahl der Fluorophormoleküle
nm	Nanometer
NMR	Kernspinsresonanzpektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
o.	oder
O_2^-	Superoxid-Radikalanion
Ox	Iod in Wasser / Tetrahydrofuran / Pyridin (<i>Oxidizer</i>)
p	Quintett (NMR)
p. A.	Qualitätsstufe: <i>pro analysii</i>
<i>Pearson R</i>	Korrelationskoeffizient
PEG	Polyethylenglykol
pET	photoinduzierter Elektronentransfer
pH	<i>pondus hydrogenii</i>
pK _s	Säurekonstante
P_{mn}^{vib}	Übergangswahrscheinlichkeit zwischen den Zuständen n und m
PNA	Peptidnukleinsäure
PPh ₃	Triphenylphosphin
ppm	<i>parts per million</i>
q	Quartett (NMR)
QSRR	quantitative Struktur-Reaktivitätsbeziehung (<i>quantitative structure reactivity relationship</i>)
quant.	quantitativ
r	Abstand der Ladungsschwerpunkte
r	Abstand zwischen Donor- und Akzeptorfluorophors
R^-	Fluorophor-Radikalanion
R^+	Fluorophor-Radikalkation
R_0	<i>Förster</i> -Radius
RB	Bengalrosa
R_f	Retentionsfaktor (DC)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)

rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	nukleophilie-spezifischer Parameter
s	Singulett (NMR)
s	<i>strong</i> (IR)
S ₀	Singulettgrundzustand
S ₁	erste angeregte Singulettzustand
S ₂	zweiter angeregte Singulettzustand
SBW	Signalbandbreite
SDS	Natriumdodecylsulfat
S _{mn^{vib}}	Überlappungsintegral des Schwingungsübergangs zwischen den Zuständen n und m
S _{N2}	nukleophile Substitution zweiter Ordnung
SPAAC	spannungsvermittelten Azid-Alkin-Zykloaddition (<i>strain-promoted azide-alkyne cycloaddition</i>)
T	Transmission
T	Temperatur
t	Zeit
t	Triplett (NMR)
T ₁	erste angeregte Triplettzustand
t _{1/2}	Halbwertszeit
t _{1/2^{ref}}	referenzierte Halbwertszeit
TBAF	<i>n</i> -Tetrabutylammoniumfluorid
TBTA	Tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
tBuOH	<i>tert</i> -Butanol
t _c	Kupplungsdauer
TCSPC	zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung (<i>time correlated single photon counting</i>)
THF	Tetrahydrofuran
T _m	Schmelztemperatur
TMS	Tetramethylsilan
TO	Thiazolorange
TOF	<i>time of flight</i>

TR	Thiazolrot
t_R	Retentionszeit
Triton X	nicht-ionisches Tensid
Trolox, TX	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
TSQ	Triplettzustandslöcher (<i>triplet state quencher</i>)
TTA	Triplett Triplett Löschung (<i>triplet-triplet annihilation</i>)
UV	ultraviolett
v	Volumenanteil
<i>vial</i>	Bördelglas
VIS	Sichtbarer Bereich des elektromagnetischen Spektrums
$V_n(\mathbf{R}_i)$	Energieeigenwerte
w	<i>weak</i> (IR)
Wsh	Acetonitril (<i>Wash</i>)
x	Schichtdicke
Z_i	Kernladungszahl
α	Absorptionsgrad
$\alpha(\lambda)$	Absorptionskoeffizient
ΔA	untergrundkorrigierte Absorbanz
ΔA_{norm}	intensitätsnormierte, untergrundkorrigierte Absorbanz
Δk	Standardfehler der Zerfallskonstante k bei Belichtung
δ_{mn}	<i>Kronecker-Delta</i>
$\Delta t_{1/2}$	Standardfehler der Halbwertszeit $t_{1/2}$ bei Belichtung
$\varepsilon(\lambda)$	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient
ε_0	Permittivität des Vakuums
ε_{max}	Extinktionskoeffizient im Absorptionsmaximum der Chromophorbände
η	Brechungsindex des Mediums
κ^2	Orientierungsfaktor
λ	Wellenlänge
λ_{em}	Emissionsmaximum
λ_{exc}	Anregungswellenlänge
λ_{max}	Absorptionsmaximum

λ_{Stokes}	Stokes-Verschiebung
$\hat{\mu}$	Dipolmomentoperator
μ_{mn}^{el}	Übergangs-Matrixelement für den elektronischen Übergang zwischen den Zuständen n und m
μ_{mn}^{el+vib}	Übergangs-Matrixelement für den elektronisch-vibronischen Übergang zwischen den Zuständen n und m
$\nu_{0,0}$	Null-Null-Übergangsfrequenz (Nulllinie)
ν_{mn}	Resonanzfrequenz des Übergangs zwischen den Zuständen n und m
π	bindendes π -Molekülorbital
π^*	antibindendes π -Molekülorbital
σ	bindendes σ -Molekülorbital
σ^*	antibindendes σ -Molekülorbital
τ_D	Fluoreszenzlebensdauer des Donorfarbstoffes in Anwesenheit des Akzeptors
τ_F	Fluoreszenzlebensdauer
ϕ_{Do}	Donor-Fluoreszenzquantenausbeute
ϕ_F	Fluoreszenzquantenausbeute
χ^2	Chi-Quadrat-Wert
ψ_n, ψ_m	Wellenfunktionen der Zustände n und m
ψ_n^{el}, ψ_m^{el}	elektronische Wellenfunktionen der Zustände n und m
$\psi_n^{vib}, \psi_m^{vib}$	vibronische Wellenfunktionen der Zustände n und m

Literaturverzeichnis

- [1] S. Olsen, R. H. McKenzie, *J. Chem. Phys.* **2009**, *131*, 234306.
- [2] S. Kummer, A. Knoll, E. Socher, L. Bethge, A. Herrmann, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1972-1975.
- [3] R. B. Altman, Q. Zheng, Z. Zhou, D. S. Terry, J. D. Warren, S. C. Blanchard, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 428-429.
- [4] Q. Zheng, M. F. Juette, S. Jockusch, M. R. Wasserman, Z. Zhou, R. B. Altman, S. C. Blanchard, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1044-1056.
- [5] C. Joo, H. Balci, Y. Ishitsuka, C. Buranachai, T. Ha, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 51-76.
- [6] M. M. Rubner, C. Holzhauser, P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1299-1302.
- [7] P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 7547-7551.
- [8] R. W. Sinkeldam, N. J. Greco, Y. Tor, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2579-2619.
- [9] P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7458-7462.
- [10] P. R. Bohländer, Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, **2015**.
- [11] M. Berrios, K. A. Conlon, D. E. Colflesh, *Methods Enzymol.* **1999**, *307*, 55-79.
- [12] T. Cordes, I. H. Stein, C. Forthmann, C. Steinhauer, M. Walz, W. Summerer, B. Person, J. Vogelsang, P. Tinnefeld, *Proc. SPIE* **2009**, *7367*, 1-9.
- [13] R. Dave, D. S. Terry, J. B. Munro, S. C. Blanchard, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 2371-2381.
- [14] A. K. Gaigalas, L. Wang, K. D. Cole, E. Humphries, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 4378-4384.
- [15] H. Giloh, J. W. Sedat, *Science* **1982**, *217*, 1252-1255.
- [16] J. Widengren, A. Chmyrov, C. Eggeling, P.-Å. Löfdahl, C. A. M. Seidel, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 429-440.
- [17] R. B. Altman, D. S. Terry, Z. Zhou, Q. Zheng, P. Geggier, R. A. Kolster, Y. Zhao, J. A. Javitch, J. D. Warren, S. C. Blanchard, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 68-71.
- [18] H. Haken, H. C. Wolf, *Molekülphysik und Quantenchemie : Einführung in die experimentellen und theoretischen Grundlagen*, Fünfte, völlig neubearbeitete und erweiterte Auflage. Ed., Springer, Berlin ; Heidelberg, **2006**.
- [19] P. W. Atkins, J. De Paula, *Physikalische Chemie* Wiley-VCH, Weinheim, **2013**.
- [20] M. F. Juette, D. S. Terry, M. R. Wasserman, Z. Zhou, R. B. Altman, Q. Zheng, S. C. Blanchard, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *20*, 103-111.
- [21] R. Bonnett, G. Martínez, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9513-9547.
- [22] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2. Ed., Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, **1999**.
- [23] B. Valeur, M. N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH, **2001**.
- [24] T. Förster, *Ann. Phys.* **1948**, *437*, 55-75.
- [25] S. Laib, S. Seeger, *Journal of Fluorescence* **2004**, *14*, 187-191.
- [26] C. Holzhauser, R. Liebl, A. Goepferich, H.-A. Wagenknecht, M. Breunig, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 890-894.
- [27] C. Holzhauser, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1136-1138.
- [28] C. Holzhauser, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 7373-7379.
- [29] P. G. Wu, L. Brand, *Anal. Biochem.* **1994**, *218*, 1-13.

- [30] K. P. Huber, G. Herzberg, in *Molecular Spectra and Molecular Structure: IV. Constants of Diatomic Molecules*, Springer US, Boston, MA, **1979**, 8-689.
- [31] R. Schmidt, *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 1161-1177.
- [32] P. Wardman, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1989**, *18*, 1637-1755.
- [33] W. H. Koppenol, *Nature* **1976**, *262*, 420-421.
- [34] B. H. J. Bielski, *Photochem. Photobiol.* **1978**, *28*, 645-649.
- [35] B. H. J. Bielski, D. E. Cabelli, R. L. Arudi, A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1985**, *14*, 1041-1100.
- [36] W. H. Koppenol, J. Butler, *Adv. Free Radical Biol. Med.* **1985**, *1*, 91-131.
- [37] P. M. Wood, *Biochem. J.* **1988**, *253*, 287-289.
- [38] S. Y. Egorov, V. F. Kamalov, N. I. Koroteev, A. A. Krasnovsky, B. N. Toleutaev, S. V. Zinukov, *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *163*, 421-424.
- [39] I. Fridovich, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1983**, *23*, 239-257.
- [40] M. Tsushima, K. Tokuda, T. Ohsaka, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 4551-4556.
- [41] A. Einstein, *Ann. Phys.* **1905**, *322*, 549-560.
- [42] F. Haber, R. Willstätter, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1931**, *64*, 2844-2856.
- [43] H. Wieland, W. Franke, *Justus Liebig's Ann. Chem.* **1927**, *457*, 1-70.
- [44] H. J. H. Fenton, *J. Chem. Soc., Trans.* **1894**, *65*, 899-910.
- [45] Y. Nosaka, A. Y. Nosaka, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 11302-11336.
- [46] Q. Zheng, S. Jockusch, Z. Zhou, S. C. Blanchard, *Photochem. Photobiol.* **2014**, *90*, 448-454.
- [47] Q. Zheng, S. Jockusch, G. G. Rodríguez-Calero, Z. Zhou, H. Zhao, R. B. Altman, H. D. Abbruña, S. C. Blanchard, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 196-203.
- [48] J. H. M. v. d. Velde, Dissertation, Rijksuniversiteit Groningen, **2016**.
- [49] Q. Zheng, S. Jockusch, Z. Zhou, R. B. Altman, H. Zhao, W. Asher, M. Holsey, S. Mathiasen, P. Geggier, J. A. Javitch, S. C. Blanchard, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 755-762.
- [50] M. Bregnhøj, M. Westberg, F. Jensen, P. R. Ogilby, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 22946-22961.
- [51] S. A. El-Daly, M. Okamoto, S. Hirayama, *J. Photochem. Photobiol. A* **1995**, *91*, 105-110.
- [52] A. Toutchkine, D.-V. Nguyen, K. M. Hahn, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2775-2777.
- [53] B. R. Renikuntla, H. C. Rose, J. Eldo, A. S. Waggoner, B. A. Armitage, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 909-912.
- [54] V. R. Batistela, D. S. Pellosi, F. D. de Souza, W. F. da Costa, S. M. de Oliveira Santin, V. R. de Souza, W. Caetano, H. P. M. de Oliveira, I. S. Scarminio, N. Hioka, *Spectrochim. Acta, Part A* **2011**, *79*, 889-897.
- [55] C. Schwechheimer, F. Rönicke, U. Schepers, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 6557-6563.
- [56] G. L. Silva, V. Ediz, D. Yaron, B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5710-5718.
- [57] M. Mohammad, A. Y. Khan, M. S. Subhani, N. Bibi, S. Ahmad, S. Saleemi, *Res. Chem. Intermed.* **2001**, *27*, 259-267.
- [58] N. I. Shank, K. J. Zanotti, F. Lanni, P. B. Berget, B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12960-12969.
- [59] N. I. Shank, H. H. Pham, A. S. Waggoner, B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 242-251.
- [60] C. Schwechheimer, M. Merkel, P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, in *Modified Nucleic Acids* (Eds.: K. Nakatani, Y. Tor), Springer International Publishing, Cham, **2016**, 83-100.
- [61] H.-K. Walter, P. R. Bohländer, H.-A. Wagenknecht, *ChemistryOpen* **2015**, *4*, 92-96.
- [62] J.-S. Lee, Y. K. Kim, M. Vendrell, Y.-T. Chang, *Mol. Biosyst.* **2009**, *5*, 411-421.

- [63] J. W. Lee, M. Jung, G. R. Rosania, Y.-T. Chang, *Chem. Commun.* **2003**, 1852-1853.
- [64] Q. Li, Y.-T. Chang, *Nat. Protoc.* **2007**, *1*, 2922.
- [65] Q. Li, Y. Kim, J. Namm, A. Kulkarni, G. R. Rosania, Y.-H. Ahn, Y.-T. Chang, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 615-623.
- [66] R. Huisgen, *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 604-637.
- [67] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056-2075.
- [68] D. Kunz, *Chem. Unserer Zeit* **2009**, *43*, 224-230.
- [69] M. Das, A. Manvar, M. Jacolot, M. Blangetti, R. C. Jones, D. F. O'Shea, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 8737-8740.
- [70] A. E. Siegrist, *Helv. Chim. Acta* **1967**, *50*, 906-957.
- [71] H. Ott, U. Pieper, D. Leusser, U. Flierler, J. Henn, D. Stalke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2978-2982.
- [72] E. R. El-Sawy, A. B. Abdelwahab, G. Kirsch, *Synthesis* **2018**, *50*, 4525-4538.
- [73] J. M. Aubry, B. Cazin, *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 2013-2014.
- [74] J. M. Aubry, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5844-5849.
- [75] M. C. DeRosa, R. J. Crutchley, *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 233-234, 351-371.
- [76] E. L. Clennan, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9151-9179.
- [77] S. Lakhdar, M. Westermaier, F. Terrier, R. Goumont, T. Boubaker, A. R. Ofial, H. Mayr, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9088-9095.
- [78] C. Holzhauser, S. Berndl, F. Menacher, M. Breunig, A. Göpferich, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 1239-1248.
- [79] C. Holzhauser, M. M. Rubner, H.-A. Wagenknecht, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, *12*, 722-724.
- [80] C. Holzhauser, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7268-7272.
- [81] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303.
- [82] H. F. Lodish, A. Berk, C. A. Kaiser, M. Krieger, A. Bretscher, H. Ploegh, A. Amon, K. C. Martin, *Molecular Cell Biology*, **2016**.
- [83] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55-63.
- [84] T. F. Slater, B. Sawyer, U. Sträuli, *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, *77*, 383-393.
- [85] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman Publishing, New York, **2002**.
- [86] A. T. Blomquist, L. H. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 2153-2154.
- [87] G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260-3275.
- [88] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [89] C. G. Gordon, J. L. Mackey, J. C. Jewett, E. M. Sletten, K. N. Houk, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9199-9208.
- [90] B. Gold, N. E. Shevchenko, N. Bonus, G. B. Dudley, I. V. Alabugin, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 75-89.
- [91] M. F. Debets, C. W. J. van der Doelen, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1168-1184.
- [92] B. R. Varga, M. Kállay, K. Hegyi, S. Béni, P. Kele, *Chemistry – A European Journal* **2012**, *18*, 822-828.
- [93] D. M. Kolpashchikov, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 4709-4723.
- [94] A. Tsourkas, M. A. Behlke, S. D. Rose, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 1319-1330.
- [95] J. Kapuscinski, *Biotech. Histochem.* **1995**, *70*, 220-233.
- [96] J. R. Taylor, M. M. Fang, S. Nie, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1979-1986.
- [97] I. Faraoni, F. R. Antonetti, J. Cardone, E. Bonmassar, *BBA-Mol. Basis Dis.* **2009**, *1792*, 497-505.

- [98] A. J. Pratt, I. J. MacRae, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 17897-17901.
- [99] J. Krol, I. Loedige, W. Filipowicz, *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 597.
- [100] P. Landgraf, M. Rusu, R. Sheridan, A. Sewer, N. Iovino, A. Aravin, S. Pfeffer, A. Rice, A. O. Kamphorst, M. Landthaler, C. Lin, N. D. Socci, L. Hermida, V. Fulci, S. Chiaretti, R. Foà, J. Schliwka, U. Fuchs, A. Novosel, R.-U. Müller, B. Schermer, U. Bissels, J. Inman, Q. Phan, M. Chien, D. B. Weir, R. Choksi, G. De Vita, D. Frezzetti, H.-I. Trompeter, V. Hornung, G. Teng, G. Hartmann, M. Palkovits, R. Di Lauro, P. Wernet, G. Macino, C. E. Rogler, J. W. Nagle, J. Ju, F. N. Papavasiliou, T. Benzing, P. Lichter, W. Tam, M. J. Brownstein, A. Bosio, A. Borkhardt, J. J. Russo, C. Sander, M. Zavolan, T. Tuschl, *Cell* **2007**, *129*, 1401-1414.
- [101] A. Rodriguez, E. Vigorito, S. Clare, M. V. Warren, P. Couttet, D. R. Soond, S. van Dongen, R. J. Grocock, P. P. Das, E. A. Miska, D. Vetrie, K. Okkenhaug, A. J. Enright, G. Dougan, M. Turner, A. Bradley, *Science* **2007**, *316*, 608-611.
- [102] T.-H. Thai, D. P. Calado, S. Casola, K. M. Ansel, C. Xiao, Y. Xue, A. Murphy, D. Friendewey, D. Valenzuela, J. L. Kutok, M. Schmidt-Supprian, N. Rajewsky, G. Yancopoulos, A. Rao, K. Rajewsky, *Science* **2007**, *316*, 604-608.
- [103] S. Paydas, A. Acikalin, M. Ergin, H. Celik, B. Yavuz, K. Tanriverdi, *Med. Oncol.* **2016**, *33*, 34.
- [104] M. Kasha, *Radiat. Res.* **1963**, *20*, 55-70.
- [105] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176-2179.
- [106] Y. Liu, Q. Xiao, Y. Liu, Z. Li, Y. Qiu, G.-B. Zhou, Z.-J. Yao, S. Jiang, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *78*, 248-258.
- [107] M. Grötli, M. Douglas, R. Eritja, B. S. Sproat, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 5899-5914.

Appendix

Vorträge, Weiterbildungen & Auszeichnungen

- 16.02.2016 GRK2039, Seminartag „Fluorescence and Single Molecule Spectroscopy“, Annweiler am Trifels
Vortrag: „Synthesis of Novel Cyanine-Styryl-Dyes for Nucleic Acid Labelling“
- 08.-09.03.2016 Karlsruher Institut für Technologie, Dr. Wolfgang Runge, Tabea Send, Karlsruhe
Weiterbildung: „Special Communication and Presentation Skills Exemplified for Entrepreneurship“
- 03.-08.07.2016 23rd IUPAC Conference on Physical Organic Chemistry, Sydney
Finanzierung durch das Graduiertenkolleg 2039 und dem GDCh-Reisekostenstipendium
Posterpreis: „Synthesis, Spectroscopic Studies and Application of Novel Cyanine-Styryl Dyes“
- 19.-20.09.2016 mediomix GmbH, Dr. Tina Koch, Karlsruhe
Weiterbildung: „Image Processing for Scientists: Adobe Photoshop“
- 24.-25.07.2017 Knigge-Reich, Vera Reich, Reichenau
Weiterbildung: „Benimm im Business“
- 04.-06.10.2017 GRK2039, Symposium on Molecular Architectures for Fluorescent Imaging of Cells, Karlsruhe
Vortrag: „Nucleophilicity-dependent Photostability of Cyanine-DNA-Bioconjugates for Live Cell Imaging“
- 24.-25.07.2017 BASF / Karlsruher Institut für Technologie, Melanie Fliedner, Dr. Christian Holze, Dr. Barbara Jessel, Ludwigshafen / Karlsruhe
Weiterbildung: „Führungstraining“

Publikationsliste

- Schwechheimer, C., Merkel, M., Bohländer, P. R., & Wagenknecht, H.-A. (2016).
Synthetic Wavelength-Shifting Fluorescent Probes of Nucleic Acids.
In K. Nakatani & Y. Tor (Eds.), *Modified Nucleic Acids* (pp. 83-100).
Cham: Springer International Publishing.

- Reisacher, U., Antusch, L., Hofstätter, R., Schwechheimer, C., Lehmann, B., &
Wagenknecht, H.-A. (2017).
Light-induced functions in DNA.
Curr. Opin. Chem. Biol., 40, 119-126.

- Schwechheimer, C., Doll, L., & Wagenknecht, H.-A. (2018).
Synthesis of Dye-Modified Oligonucleotides via Copper(I)-Catalyzed Alkyne Azide
Cycloaddition Using On- and Off-Bead Approaches.
Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem., 72(1), 4.80.1-4.80.13.

- Schwechheimer, C., Röncke, F., Schepers, U., & Wagenknecht, H.-A. (2018).
A new structure–activity relationship for cyanine dyes to improve photostability and
fluorescence properties for live cell imaging.
Chem. Sci., 9(31), 6557-6563.

Lehre

WS 2015 – 2016	Organisch-Chemisches Fortgeschrittenenpraktikum (für Studierende der Chemie, Studiengang A, sowie für Studierende der Chemischen Biologie) Organisch-Chemisches Fortgeschrittenenpraktikum (für Studierende der Chemie, Studiengang B) Kombiniertes Fortgeschrittenenpraktikum Lehramt Chemie
02.2016 – 05.2016	Betreuung der Bachelorarbeit von <i>Zeynep Yilmaz</i>
08.2016 – 11.2016	Betreuung der Bachelorarbeit von <i>Rafael Sterzik</i>
WS 2016 – 2017	Organisch-Chemisches Fortgeschrittenenpraktikum (für Studierende der Chemie, Studiengang A, sowie für Studierende der Chemischen Biologie) Organisch-Chemisches Fortgeschrittenenpraktikum (für Studierende der Chemie, Studiengang B) Kombiniertes Fortgeschrittenenpraktikum Lehramt Chemie
02.03.2016	Organisch-chemisches Grundpraktikum (für Studierende der Chemie) Organisch-chemisches Grundpraktikum (für Studierende der Chemischen Biologie und der Lebensmittelchemie)
03.2017 – 12.2017	Betreuung der Vertieferarbeit von <i>Dennis Harijan</i>
04.2018 – 07.2018	Betreuung der Bachelorarbeit von <i>Daniel Seufert</i>
SS 2018	Organisch-Chemisches Fortgeschrittenenpraktikum (für Studierende der Chemie, Studiengang A, sowie für Studierende der Chemischen Biologie) Organisch-Chemisches Fortgeschrittenenpraktikum (für Studierende der Chemie, Studiengang B) Kombiniertes Fortgeschrittenenpraktikum Lehramt Chemie

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe, die elektronische Version mit der schriftlichen übereinstimmt und ich die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet habe. Außerdem versichere ich, dass die Abgabe und Archivierung der Primärdaten gemäß Abs. A (6) der Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des KIT beim Institut gesichert ist.

Karlsruhe,

Christian Schwechheimer