

Synthese, Modifikation und biologische Anwendung  
fluoreszierender Xanthenfarbstoffe

Inaugural-Dissertation

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Chemiker  
Radoslaw Marian Kierat  
aus  
Tarnowitz, Polen

**2008**



## Kurzzusammenfassung

Xanthenfarbstoffe, die sich vom Rhodamin- und Fluorescein-Grundgerüst ableiten, zeichnen sich durch eine intensive Fluoreszenz aus und sind daher als molekulare Sonden für bioanalytische Anwendungen und das zelluläre Imaging von großer Relevanz.

In dieser Arbeit wurden Derivate von Xanthenfarbstoffen synthetisiert, die auf biologisch wichtige Metallionen ansprechen, ungewöhnliche Akkumulation und subzelluläre Verteilungen in lebenden Zellen zeigen oder Fluoreszenzsensoren für Redoxpotentiale sind.

Die wichtigsten neu entwickelten Sonden und ihre Anwendungen sind hier zusammengefasst:

- Fluorogene Sonde für  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen

Während literaturbeschriebene  $\text{Cu}^{2+}$  Fluoreszenzsensoren durch Fluoreszenzlöschung auf  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen ansprechen, ist das dargestellte Dipicolinoylfluorescein ein seltenes Beispiel für eine fluorogene  $\text{Cu}^{2+}$ -Sonde. Durch  $\text{Cu}^{2+}$  vermittelte Esterhydrolyse wird Fluorescein gebildet. Das Detektionslimit liegt bei 100 nM  $\text{Cu}^{2+}$ .

Die literaturbekannte fluorogene Sonde Diacetylfluorescein wurde für ein Screening der Esteraseaktivität von Rinderserumalbumin eingesetzt. Durch Dotierung mit  $\text{Cu}^{2+}$  und anderen Metallionen konnte die sehr schwache Aktivität geringfügig gesteigert werden, jedoch nicht in einem für präparative Anwendungen ausreichenden Maß.

- Metallbindende Sonde

Terpyridinfunktionalisierte Rhodamine reichern sich ungewöhnlich stark in lebenden Zellen an. Dies könnte auf die intrazelluläre Assoziation der Terpyridin-Einheit mit  $\text{Zn}^{2+}$ , das proteingebunden ist, aber noch über freie Koordinationsstellen verfügt, zurückzuführen sein. Extrazelluläres  $\text{Zn}^{2+}$  verhindert durch die Komplexbildung die Aufnahme von terpyridinfunktionalisiertem Rhodamin in die Zelle. Die zelluläre Aufnahme kann folglich durch extrazelluläres  $\text{Zn}^{2+}$  gesteuert werden.

- Redoxsensor

Während es fluoreszierende molekulare Sonden für intrazelluläre pH-Wert Messungen bereits in zahlreichen Varianten gibt, besteht ein Bedarf an Fluoreszenzsensoren für biologische Redoxpotentiale. Ein Sensor für Redoxpotentiale wurde dargestellt, indem ein Hydrochinon an einen Rhodamin-Farbstoff gekoppelt wurde. Dem Design des Redoxsensors liegt zugrunde, dass Chinone oft gute Fluoreszenzlöscher sind, während die reduzierte Hydrochinonform die Fluoreszenz meist wenig beeinflusst. Die Fluoreszenz des Redoxsensors wird reversibel gelöscht, wenn die Hydrochinonkomponente durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  zur

Chinonform oxidiert wird. Mit Thiolen kann die Hydrochinonform und die Fluoreszenz regeneriert werden.

## Short summary

Xanthene dyes, based on a fluorescein- and rhodamine-like backbone, are known to have a intensive fluorescence and therefore a great relevance as molecular probes for bioanalytical applications and for cellular imaging.

Various xanthene dye derivatives were synthesised. Dyes reporting on biorelevant metal ions, dyes useful as a fluorescent sensor for redox potentials and dyes showing unusual accumulation and subcellular distribution in live cells are reported in this thesis.

The most important newly developed probes and their applications are discussed below:

- Fluorogenic probe for  $\text{Cu}^{2+}$  ions

While most  $\text{Cu}^{2+}$  signalling fluorescent sensors described in literature detect copper by fluorescence quenching, synthesised dipicolinoyl fluorescein is a rare example for a fluorogenic probe. Fluorescein is formed by  $\text{Cu}^{2+}$  induced ester hydrolysis. Detection limit for  $\text{Cu}^{2+}$  is 100 nM.

Literature described diacetyl fluorescein was used in a screening of bovine serum albumin esterase activity. By doping with  $\text{Cu}^{2+}$  and other metal ions the very weak esterase activity was increased, although not sufficient for the synthetic application of the protein.

- Metal binding probe

Terpyridine functionalised rhodamines accumulate strongly in live cells. This may be due to intracellular association of the terpyridine moiety to protein bound, but coordinatively unsaturated  $\text{Zn}^{2+}$ . Extracellular zinc associates to terpyridine and prevents cellular uptake of terpyridine functionalised dye. Cellular uptake of the dye can thus be controlled by extracellular zinc<sup>2+</sup>.

- Redox sensor

While fluorescing molecular probes for intracellular pH measurements are available in many versions, there is a demand for fluorescent sensors to determine biological redox potentials. A sensor for redox potentials was synthesised by attaching a hydroquinone to a rhodamine dye. The concept is based on quinones often being good fluorescence quenchers, while the reduced hydroquinone forms usually have a small influence on fluorescence. The fluorescence of the redox sensor is quenched reversibly when the hydroquinone component is oxidised to the quinone form by  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The hydroquinone form and therefore the fluorescence can be regenerated by thiols.



Synthese, Modifikation und biologische Anwendung  
fluoreszierender Xanthenfarbstoffe

Inaugural-Dissertation

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Chemiker  
Radoslaw Marian Kierat  
aus  
Tarnowitz, Polen

**2008**





# Synthese, Modifikation und biologische Anwendung fluoreszierender Xanthenfarbstoffe

Gutachter: Prof. Dr. Roland Krämer  
Prof. Dr. Lutz H. Gade

Tag der mündlichen Prüfung: 08.02.08



*Für meine Familie*



Ohne Spekulation gibt es keine neue Beobachtung.

Charles Darwin

Fortschritt ist die Verwirklichung von Utopien.

Oscar Wilde

Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft,  
etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.

Albert Einstein



Die experimentellen Untersuchungen zu dieser Arbeit wurden in der Zeit von April 2004 bis Oktober 2007 am Anorganisch-Chemischen Institut der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Roland Krämer, unter dessen Anleitung diese Arbeit angefertigt wurde, danke ich recht herzlich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, zahlreiche Anregungen, Diskussionen, sein stetes Interesse an meiner Arbeit und die großzügige materielle Unterstützung.

Meinen jetzigen und ehemaligen Laborkollegen Dr. Andriy Mokhir, Dr. Iris Boll, Jasmin Barth, Dr. Andreas Füßl, Annemarie Schwarz und Birgit Thaler danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die lustige Zeit.

Ich danke auch dem gesamten Arbeitskreis Krämer für die gute Zusammenarbeit, die vielen anregenden Diskussionen und die gute Zeit. Besonders danken möchte ich den „ehemaligen“ Dr. Malgorzata Jagoda, Dr. Mareike Göritz, Dr. Andriy Mokhir, Dr. Nora Graf, Dr. Jens Brunner, Dr. Patrick Plitt, Dr. Stefan Wörl und Dr. Andreas Füßl, sowie den „aktuellen“ Elmar Jentzsch, Dr. Tobias Graf, Zuhail Kaya, Annemarie Schwarz und Birgit Thaler.

Bei Claudia Dienemann, Karin Gabel, Ute Wildenberg, Heike Vongerichten bedanke ich mich für die Bereitstellung der Arbeitsbedingungen, für die zügige Bearbeitung der vielen ESI-Proben und für die Bereitstellung der Zellen.

Für die Aufnahme von zahlreichen NMR-Spektren möchte ich mich bei Beate Termin bedanken.

Bei Volker Seifried möchte ich mich für die abwechslungsreichen und motivierenden Gespräche bedanken, die einen Blick über den Tellerrand der Chemie boten.

Dr. Tobias Graf möchte ich für die schnelle und kompetente Hilfe bei meinen vielen Problemen mit Computern, Druckern und Netzwerken danken.

Für die Erstellung der optischen Schnitte am CLSM möchte ich mich bei Dr. Andreas Meyer und Simon Schulz bedanken.

Bei meinen Forschungspraktikanten Kerstin Gräbe, Elmar Jentzsch, Myriam Trausch, Matthias Kruck, Susanne Martens, Jörg Steindl, Annett Halbhuber, Annemarie Schwarz, Emma Backhouse, Jean-Paul Bertemes, Rene Döpp, Barbara Wucher, Thomas Rapps, Sascha Urbaczek, Christian Monsler, Jenny Ziriakus, Martha Rull Bravo und David Fellhauer bedanke ich mich für die engagierte Zusammenarbeit.



Ein besonderer Dank gilt meiner Azubine Jasmin Barth, die mich immer tatkräftig und engagiert unterstützt hat und mir eine unersetzbare Hilfe war.

Sven Reinhardt möchte ich für die vielen anregenden Diskussionen und ein stets offenes Ohr danken.

Elmar Jentsch möchte ich für die gute Zeit inner- und außerhalb der Uni danken.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich mich bei Dr. Tobias Graf, Alma Husedzinovic, Annemarie Schwarz, Birgit Thaler, Alexander Weber und Tobias Wiß bedanken.

Beim Promotionskolleg "Molecular machines: mechanisms and functional interconnections" möchte ich mich für die zahlreichen Einblicke in die Welt der Molekularbiologie und Mikroskopie und nicht zuletzt die für Finanzierung bedanken.

Ich möchte mich bei allen Studienkollegen und Freunden bedanken die mich während des Studiums und der Promotion begleitet haben und dafür gesorgt haben, dass das es eine unvergessliche Zeit war, darunter auch Aga, Alex, Alma, Anne, Axel, Barzi, Bella, Bühler, Christian, Dosch, Erhard, Frank, Helmut, Jhemp, Jörn, Kai, Katsche, Kim, Klaus, Kristl, Krauß, Nadine, Nine, Robert, Siggi, Stufan, Susi, Tobi, Thomas, Urbi und Zuhai.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meiner Familie. Meinen Eltern und meinem Bruder Jaroslaw danke ich herzlich für die ständigen Ermutigungen und großzügige Unterstützung.



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis .....	IX
Abkürzungsverzeichnis .....	X
1. Einleitung .....	1
1.1. Fluoreszenz .....	1
1.1.1. Grundlagen .....	1
1.1.2. Fluoreszenzlöschung .....	3
1.1.3. UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie .....	4
1.1.4. Fluoreszenzmikroskopie .....	6
1.2. Farbstoffe .....	9
1.2.1. Geschichtliches .....	9
1.2.2. Veränderliche Farbstoffe .....	10
1.2.3. Triphenylmethanfarbstoffe .....	11
1.2.3.1. Triphenylmethylcarbeniumion .....	11
1.2.3.2. Aminotriphenylmethanfarbstoffe .....	12
1.2.3.3. Phthaleine .....	13
1.2.4. Xanthenfarbstoffe .....	13
1.2.4.1. Fluorescein .....	14
1.2.4.2. Rhodamin B .....	14
1.2.4.3. Weitere Xanthen Farbstoffvarianten .....	15
1.3. Liganden .....	17
1.3.1. Terpyridin .....	17
1.3.1.1. Allgemein .....	17
1.3.1.2. Terpyridinsynthesen .....	17
1.3.1.3. Funktionalisierung von Terpyridin .....	20
1.3.2. Cyclam .....	22
1.3.2.1. Allgemeines .....	22

---

1.3.2.2.	Synthese von Cyclam.....	23
1.3.2.3.	Synthesen von Cyclamderivaten.....	23
1.4.	Kopplung.....	25
1.4.1.	Funktionalisierung von Proteinen.....	25
1.4.1.1.	Molekularbiologische Methoden.....	25
1.4.1.2.	Chemische Methoden.....	27
1.4.2.	Amidsynthesen.....	29
1.5.	Zellen.....	32
1.6.	Enzymscreening.....	36
1.6.1.	Enzyme und Proteine mit enzymähnlicher Funktion.....	36
1.6.2.	Albumin.....	37
1.6.3.	Automatisierung durch Roboter.....	38
2.	Zielsetzung.....	39
3.	Dipicolinoylfluorescein als fluorogene Sonde für Cu <sup>2+</sup> -Ionen.....	40
3.1.	Allgemeines.....	40
3.2.	Synthese.....	41
3.3.	Screening der Reaktionsbedingungen für die DPF-Synthese.....	41
3.4.	Hydrolyse.....	43
4.	Screening von Esteraseaktivitäten mit Diacetylfluorescein.....	48
4.1.	Automatisierte Messungen.....	48
4.2.	Esteraseaktivität von BSA.....	49
4.3.	Einflüsse auf die Aktivität.....	50
5.	Synthese und Eigenschaften modifizierter Xanthenfarbstoffe.....	53
5.1.	Synthese von Rhodamin B Piperazinamid.....	53
5.2.	N-Acylierung von Rhodamin B-Piperazinamid.....	55
5.3.	Synthese Carboxy- und Aminofunktionalisierter Liganden.....	57
5.3.1.	Terpyridin-Derivate.....	57
5.3.1.1.	4'-Phenylterpyridin.....	57

---

5.3.1.2.	4'-O-Alkylterpyridin.....	58
5.3.2.	Cyclam-Derivate .....	59
5.4.	Funktionalisierung von Rhodamin B .....	61
5.4.1.	Funktionalisierung mit niedermolekularen Resten .....	61
5.4.2.	Funktionalisierung mit lipophilen Resten .....	63
5.4.3.	Funktionalisierung mit Chelatliganden .....	64
5.4.4.	Fluoreszenzlöschung der chelatfunktionalisierten Rhodamine durch Metallionen.....	65
5.4.5.	Funktionalisierung mit redoxaktiven Gruppen .....	68
5.4.6.	Fluoresceinsynthesen .....	70
6.	Anfärbung und fluoreszenzmikroskopische Beobachtung lebender Zellen mit funktionalisierten Xanthenfarbstoffen .....	73
6.1.	Fluoreszenzmikroskopie.....	73
6.1.1.	HeLa Zellen.....	74
6.1.2.	LNCaP-Zellen .....	81
6.1.3.	Hydrolysierbare Farbstoffe .....	82
6.1.4.	Farbstoffe mit Metallionen-abhängiger Membran-permeabilität.....	82
6.2.	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie.....	85
7.	Zusammenfassung .....	89
8.	Präparativer Teil .....	91
8.1.	Chemikalien und Geräte.....	91
8.2.	Synthesen .....	93
9.	Literatur .....	144

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Jablonski Diagramm .....	1
Abbildung 2: Übergänge nach dem Franck-Condon Prinzip .....	2
Abbildung 3: Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops .....	6
Abbildung 4: Strahlengang in einem CLSM .....	7
Abbildung 5: CLSM-Aufnahme von Nierenzellen (CV-1-Linie) der gelbgrünen Meerkatze, angefärbt sind: der Zellkerns (grün, Sytox Green), die Actinfilamente (blau, Phalloidin gekoppelt mit Alexa Fluor 350), sowie die Mitochondrien (rot, Mito Tracker Red CMXRos) .....	8
Abbildung 6: CLSM-Aufnahme menschlicher Gebärmutterhalskrebszellen (HeLa-Linie), angefärbt sind: Tubulin (Alexa Fluor 568 markierter Tubulinantikörper, rot), sowie der Zellkern (TO-PRO-3, gelb) .....	8
Abbildung 7: Strukturen der Karminsäure (links) und des Purpurs (6,6-Dibromindigo) (rechts) .....	9
Abbildung 8: Struktur von Chinin .....	9
Abbildung 9: Farbstoffe mit veränderbaren Absorptions- und Emissionseigenschaften .....	10
Abbildung 10: Einfache Triphenylmethane .....	11
Abbildung 11: Aminotriphenylmethanfarbstoffe .....	12
Abbildung 12: Phenolphthalein .....	13
Abbildung 13: Grundgerüst der Xanthere .....	13
Abbildung 14: Fluorescein .....	14
Abbildung 15: Rhodamin B .....	15
Abbildung 16: Halogenderivate des Fluoresceins .....	15
Abbildung 17: Verschiedenfarbige Rhodamin Derivate .....	16
Abbildung 18: Spezielle Rhodamin Derivate .....	16
Abbildung 19: 2,2':6',2"-Terpyridin mit Komplexbindungskonstanten für einige Metalle .....	17
Abbildung 20: Terpyridinsynthese nach Kröhnke .....	18
Abbildung 21: Terpyridinsynthese nach Potts(a) und Jameson(b) .....	18
Abbildung 22: Terpyridinsynthese nach Hanan .....	18
Abbildung 23: Terpyridinsynthese nach Constable .....	19
Abbildung 24: Synthese verschiedener Terpyridinderivate via Stille Kupplung .....	20
Abbildung 25: Synthese von Terpyridinylethern .....	20
Abbildung 26: Synthese von Terpyridinderivaten über das Pyridon .....	21

---

Abbildung 27: Mitsunobu-Reaktion.....	21
Abbildung 28: Cyclam und offenkettiger tetradentater Ligand .....	22
Abbildung 29: Templatsynthese von Cyclam .....	23
Abbildung 30: Synthese von vierfach substituiertem Cyclam nach Ronnie.....	23
Abbildung 31: Synthese von dreifach TFA geschütztem Cyclam nach Yang.....	24
Abbildung 32: Syntheseroute, die zu C-funktionalisiertem Cyclam führt.....	24
Abbildung 33: Fluoreszierende Quallen (links) und Kristallstruktur von GFP (rechts) .....	25
Abbildung 34: Der HaloTag <sup>TM</sup> TMR Ligand, bestehend aus Linker (zur Bindungsknüpfung an das Protein) sowie Farbstoff.....	26
Abbildung 35: Benzylguanosin-modifiziertes Diacetylfluorescein als SNAP-tag-Ligand.....	27
Abbildung 36: Kopplung einer Aminfunktion an die Thiolgruppe einer Cysteinfunktion mittels Iodessigsäure .....	28
Abbildung 37: Kopplung einer Aminfunktion an die Thiolgruppe einer Cysteinfunktion mittels SMCC .....	28
Abbildung 38: Aktivester .....	29
Abbildung 39: Carbodiimide.....	30
Abbildung 40: <i>N</i> -Hydroxyaminderivate.....	30
Abbildung 41: Uronium-Reagenzien .....	30
Abbildung 42: Amidsynthese durch die Imidazolmethode nach Staab .....	31
Abbildung 43: Amidsynthese mit Dimethylaluminiumamid nach Weinreb.....	31
Abbildung 44: Aufbau einer tierischen Zelle.....	32
Abbildung 45: Pipettierroboter Genesis Workstation 150 der Firma Tecan.....	38
Abbildung 46: Dipicolinoylfluorescein.....	40
Abbildung 47: Hydrolyse von Dipicolinoylfluorescein durch Kupfer.....	41
Abbildung 48: Hydrolyse von <b>2</b> (10 $\mu$ M in H <sub>2</sub> O), Zunahme der Absorption bei 489 nm in Abhängigkeit von der CuSO <sub>4</sub> Konzentration, T = 25 °C, pH = 7,0 (Puffer: 10 mM MOPS).....	44
Abbildung 49: Hydrolyse von <b>2</b> (1 $\mu$ M in H <sub>2</sub> O), Zunahme der Fluoreszenzintensität in An- oder Abwesenheit von CuSO <sub>4</sub> , Anregung bei 489 nm, Emission bei 513 nm, T = 25 °C, pH = 7,0 (Puffer: 10 mM MOPS). .....	45
Abbildung 50: Hydrolyse von <b>2</b> (10 $\mu$ M in H <sub>2</sub> O), Vergleich der Esteraseaktivität von freien Cu <sup>2+</sup> Ionen und verschiedenen Cu <sup>2+</sup> Komplexen mit einem 1:1 und 1:2 Metall zu Ligand Verhältnis, [Cu <sup>2+</sup> ] = 10 $\mu$ M, T = 25 °C, pH = 7,0 (Puffer: 10 mM MOPS).....	46

Abbildung 51: Hydrolyse von <b>2</b> (10 $\mu\text{M}$ in $\text{H}_2\text{O}$ ) durch verschiedene bivalente Metall-Ionen, $[\text{M}^{2+}] = 10 \mu\text{M}$ , $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ , $\text{pH} = 7,0$ (Puffer: 10 mM MOPS).....	47
Abbildung 52: Diacetylfluorescein <b>3</b> (DAF).....	49
Abbildung 53: Hydrolyse von <b>3</b> [10 $\mu\text{M}$ ] durch BSA [10 $\mu\text{M}$ ] (blau), Kontrollwert DAF ohne BSA (rot), $\text{pH} = 7$ , Puffer = 10 mM MOPS .....	49
Abbildung 54: Hydrolysegeschwindigkeit von <b>3</b> [10 $\mu\text{M}$ ] in Abhängigkeit der BSA Konzentration, Zusatz von 10 $\mu\text{M}$ $\text{Cu}^{2+}$ (blau) und kupferfreier Verlauf (rot), $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ , $\text{pH} = 7,0$ (Puffer: 10 mM MOPS).....	50
Abbildung 55: Veränderung der Hydrolysegeschwindigkeiten von <b>3</b> durch BSA in Abhängigkeit von chemischen Additiven, prozentuale Angabe im Vergleich zur Reaktion ohne Additive.....	51
Abbildung 56: Reaktive Rhodamin B Derivate .....	53
Abbildung 57: Rhodamin B NHS-Ester in 5 und 6 Stellung .....	54
Abbildung 58: Rhodamin B Piperazinamid .....	54
Abbildung 59: Synthese von Terpyridin nach Hanan .....	57
Abbildung 60: Synthese von 4'-Chlorterpyridin .....	58
Abbildung 61: Synthese carboxyfunktionalisierter Terpyridine.....	58
Abbildung 62: Synthese von Cyclam.....	59
Abbildung 63: Synthese von 1,4,8-Tris-(trifluoracetyl)-cyclam.....	59
Abbildung 64: Funktionalisierung von Cyclam.....	60
Abbildung 65: Bernsteinsäure und Glutarsäurederivate des Rhodamin B Piperazinamids.....	61
Abbildung 66: Acetyl- und Pivalinoylderivate des Rhodamin B Piperazinamids.....	62
Abbildung 67: Methylacetat und 4-Carboxybenzaldehydmodifiziertes Rhodamin B Piperazinamid.....	62
Abbildung 68: Mit Fettsäuren funktionalisiertes Rhodamin B Piperazinamid.....	63
Abbildung 69: Rhodamin B Piperazinamid funktionalisiert mit Fettsäurederivaten.....	63
Abbildung 70: Aliphatisch verbrückte Terpyridin-Rhodamin B Derivate.....	64
Abbildung 71: Aromatisch verbrücktes Terpyridin-Rhodamin B Derivat.....	64
Abbildung 72: Änderung der Fluoreszenz von <b>33</b> [10 $\mu\text{M}$ ] in Abhängigkeit der Konzentration von zugegebenen Metallsalzen, Anregung bei 565 nm, Emission bei 590 nm, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ , $\text{pH} = 7,0$ (Puffer: 10 mM MOPS) .....	65
Abbildung 73: Änderung der Fluoreszenz von <b>34</b> [10 $\mu\text{M}$ ] in Abhängigkeit der Konzentration von zugegebenen Metallsalzen, Anregung bei 565 nm, Emission bei 590 nm, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ , $\text{pH} = 7,0$ (Puffer: 10 mM MOPS) .....	66



---

Abbildung 74: Änderung der Fluoreszenz von <b>35</b> [10 $\mu$ M] in Abhängigkeit der Konzentration von zugegebenen Metallsalzen, Anregung bei 565 nm, Emission bei 590 nm, T = 25 °C, pH = 7,0 (Puffer: 10 mM MOPS) .....	66
Abbildung 75: Referenzmessung der Fluoreszenz des Farbstoffes <b>5</b> [10 $\mu$ M] in Abhängigkeit der Konzentration von zugegebenen Metallsalzen, Anregung bei 565 nm, Emission bei 590 nm, T = 25 °C, pH = 7,0 (Puffer: 10 mM, MOPS) .....	67
Abbildung 76: Rhodamin B Derivate mit Chinongruppen .....	68
Abbildung 77: Abnahme der Fluoreszenz von <b>36</b> [10 $\mu$ M] in Abhängigkeit von der Zeit (rot), Zugabe von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1eq) und HRP (0,1eq) nach 18 s, Zugabe von Cystein (10eq) nach 124 s, Rhodamin B Piperazinamid als Referenz (blau), Anregung bei 565 nm, Emission bei 590 nm, T = 25 °C, pH = 7,0 (Puffer: 10 mM MOPS) .....	69
Abbildung 78: Fluorescein und Rhodamin Grün .....	70
Abbildung 79: Fluoresceinderivate .....	70
Abbildung 80: Für Kopplungen verwendete Aminkomponente Rhodamin B Piperazinamid <b>5</b> .....	71
Abbildung 81: Im Mikromaßstab synthetisierte funktionalisierte Fluorophore.....	72
Abbildung 82: HeLa-Zellen nach Inkubation mit <b>3</b> : Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL) .....	74
Abbildung 83: HeLa-Zellen nach Inkubation mit <b>8</b> : Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL) .....	75
Abbildung 84 HeLa-Zellen nach Inkubation mit Rhodamin B: Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL) .....	75
Abbildung 85: HeLa-Zellen nach Inkubation mit <b>5</b> : Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL) .....	76
Abbildung 86: HeLa-Zellen nach Inkubation mit <b>23</b> : Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL) .....	76
Abbildung 87: HeLa-Zellen nach Inkubation mit <b>24</b> : Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL) .....	77
Abbildung 88: HeLa-Zellen nach Inkubation mit <b>26</b> : Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL) .....	77
Abbildung 89: HeLa-Zellen nach Inkubation mit <b>36</b> : Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL) .....	78
Abbildung 90: HeLa-Zellen nach Inkubation mit <b>37</b> : Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL) .....	78

---

Abbildung 91: HeLa-Zellen nach Inkubation mit <b>30</b> :	
Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL) .....	79
Abbildung 92: HeLa-Zellen nach Inkubation mit <b>31</b> :	
Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL) .....	79
Abbildung 93: HeLa-Zellen nach Inkubation mit <b>34</b> :	
Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL) .....	80
Abbildung 94: LNCaP-Zellen nach Inkubation mit <b>31</b> :	
Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL) .....	81
Abbildung 95: HeLa-Zellen Phasenkontrast und Fluoreszenzaufnahmen von	
Dicetylfluorecein <b>3</b> (links) und Dipicolinoylfluorescein <b>2</b> (rechts) .....	82
Abbildung 96: HeLa: <b>33</b> [10 µM], Phasenkontrast (PK) Aufnahme, sowie	
Fluoreszenzaufnahmen mit verschiedenen Belichtungsdauern.....	83
Abbildung 97: HeLa: <b>33</b> -Zink-Komplex [10 µM], Phasenkontrast (PK) Aufnahme, sowie	
Fluoreszenzaufnahmen mit verschiedenen Belichtungsdauern.....	84
Abbildung 98: CLSM-Aufnahme von HeLa Zellen inkubiert mit 1 µM Farbstoff <b>24</b> :	
Durchlichtkanal (links), Fluoreszenzkanal (Mitte), Fluoreszenz und Durchlichtkanal	
überlagert (rechts) .....	85
Abbildung 99: CLSM-Aufnahme von HeLa Zellen inkubiert mit 10 µM Farbstoff <b>30</b> :	
Durchlichtkanal (links), Fluoreszenzkanal (Mitte), Fluoreszenz und Durchlichtkanal	
überlagert (rechts) .....	86
Abbildung 100: Drei CLSM-Aufnahmen von HeLa Zellen inkubiert mit 1 µM Farbstoff <b>30</b> :	
Schnitt aus dem oberen Bereich der Zelle (links), aus dem mittleren Bereich der Zelle	
mit ausgespartem Zellkern (Mitte) und aus dem unteren Bereich der Zelle (rechts).....	86
Abbildung 101: CLSM-Aufnahmen von HeLa Zellen inkubiert mit 1µM Farbstoff <b>33</b> :	
Durchlichtkanal (links), Fluoreszenzkanal (Mitte), Fluoreszenz und Durchlichtkanal	
überlagert (rechts) .....	87
Abbildung 102: CLSM-Aufnahme einer Wurzelspitze von Arabidopsis Thaliana nach	
Inkubation mit 10 µM Farbstoff <b>24</b> .....	87
Abbildung 103: Optischer Schnitt durch Zellen aus der Wurzelspitze von Arabidopsis	
Thaliana nach Inkubation mit 10 µM Farbstoff <b>24</b> .....	88
Abbildung 104: CLSM-Aufnahme einer Wurzelspitze von Arabidopsis Thaliana nach	
Inkubation mit 10 µM Farbstoff <b>35</b> .....	88
Abbildung 105: Dipicolinoylfluorescein.....	89
Abbildung 106: 6-(2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy)hexansäure Rhodamin B Piperazinamid	90

---

Abbildung 107: 2,5-Dihydroxybenzoesäure Rhodamin B Piperazinamid.....	90
---	----

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Komplexbildungskonstanten lgK für einige Metall-Cyclam-Komplexe	22
Tabelle 2: Vergleich der Komplexbildungskonstanten des Makrocyclus Cyclam mit dem vergleichbaren offenkettigen System 2,3,2-tet	22
Tabelle 3: Stammlösungen für das Synthese-Screening	42
Tabelle 4: ESI-MS-Analyse des Synthesescreenings zur DPF-Synthese, Angabe der relative Intensitäten und Hervorhebung von Edukt (grün), Intermediat (rot) und Produkt (blau)	43
Tabelle 5: Amidkopplungsscreening 1	55
Tabelle 6: Amidkopplungsscreening 2	56
Tabelle 7: Massen der in Mikroansätzen dargestellten Farbstoffe	72

# Abkürzungsverzeichnis

eq	Äquivalent
ATP	Adenosintriphosphat
bipy	Bipyridin
boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Bovine Serum Albumin
CDI	Carbonyldiimidazol
CFP	Cyan fluorescing protein
CLSM	Confocal laser scanning microscopy
DAF	Diacetylfluorescein
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	Desoxy ribonucleic acid
DPF	Dipicolinoylfluorescein
EDAC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid
EDTA	<i>N,N,N',N'</i> -Ethyldiamintetraacetat
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
gER	Glattes Endoplasmatisches Retikulum
GFP	Green fluorescing protein
HATU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)-uronium hexafluorophosphat
HBTU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)-uronium hexafluorophosphat
His	Histidin
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High performance liquid chromatography
HR-ESI-MS	High resolution-electrospray ionisation-mass spectrometry
HRP	Horse radish peroxidase

---

HSA	Human Serum Albumin
IC	Internal conversion
ISC	Intersystem crossing
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
NAD	Nicotinadenosindinucleotid
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMN	Nicotinmononucleotid
NTA	Nitrilotriacetat
PBS	Phosphate buffered saline solution
pic	Picolinsäure
rER	Raues Endoplasmatisches Retikulum
RFP	Red fluorescing protein
RNA	Ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
SMCC	Succinimidyl-4-( <i>N</i> -maleinimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat
tacn	1,4,7-Triazacyclononan
TBTU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)-uronium tetrafluoroborat
TFA	Trifluoracetat
THF	Tetrahydrofuran
TMR	Tetramethylrhodamin
tren	Tris-(2-aminoethyl)-amin
UV	Ultraviolett
VUV	Vakuum-Ultraviolett
YFP	Yellow fluorescing protein



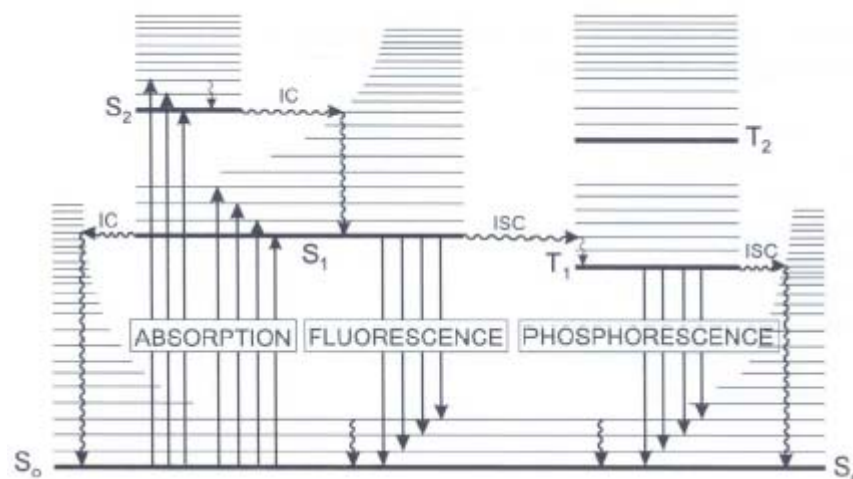
# 1. Einleitung

## 1.1. Fluoreszenz

### 1.1.1. Grundlagen<sup>[1,2,3]</sup>

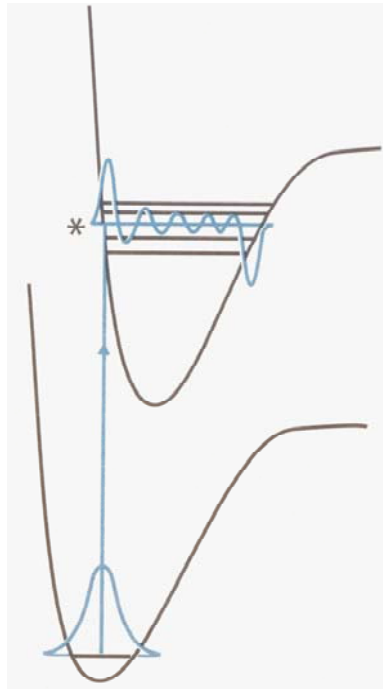
Der Name „Fluoreszenz“ leitet sich von dem Mineral Fluorit ( $\text{CaF}_2$ , Flussspat) ab. Bei der Beleuchtung von Flussspatkristallen mit UV-Licht ist eine Emission von Licht zu beobachten. 1852 hat Sir Gabriel Stokes das Phänomen der Lichtemission untersucht und in Anlehnung an Flussspat Fluoreszenz genannt.

Das Phänomen der Fluoreszenz und auch der eng verwandten Phosphoreszenz lässt sich anhand eines Jablonski Diagramms (Abbildung 1) erklären.



**Abbildung 1:** Jablonski Diagramm

Während des ca.  $10^{-15}$  s dauernden Absorptionsprozesses A ( $S_0 \rightarrow S_1$ ) ändern sich die relativen Kernabstände im Molekül nicht wesentlich (Franck-Condon-Prinzip). Dies bedeutet, dass eine Gerade, welche die Anfangs- und Endpunkte der Kernzustände verbindet, zum Zeitpunkt des Überganges vertikal verlaufen muss. Weiterhin werden solche Übergänge bevorzugt, die eine schnelle Anpassung der Kernbewegung an das neue Potential ermöglichen. Quantenmechanisch bedeutet dies, dass der wahrscheinlichste Übergang die Schwingungswellenfunktion am wenigsten verändert. (Abbildung 2)



**Abbildung 2:** Übergänge nach dem Franck-Condon Prinzip

Die Kerne spüren nach der Elektronenanregung ein vom Grundzustand abweichendes Kraftfeld, sie befinden sich daher im schwingungsangeregten Zustand des elektronisch angeregten Niveaus. Angeregte Niveaus sind jedoch nicht stabil und streben eine Rückkehr in den Grundzustand an. Im schwingungsangeregten  $S_1$ -Zustand relaxiert das Molekül zunächst auf den Schwingungsgrundzustand des  $S_1$ -Niveaus. Dies kann auf verschiedenen Wegen erfolgen:

### **Strahlungslose Relaxation**

Die elektronische Energie des Moleküls wird zunächst durch innere Umwandlung (internal conversion, IC) in Schwingungsenergie des elektronischen Grundzustandes umgewandelt. Die Schwingungsenergie wird in Vibrations-, Rotations- und Translationsenergie der umgebenden Moleküle umgewandelt, also letztlich in Wärme (Abbildung 1 links).

### **Fluoreszenz**

Da aufgrund der großen Energiedifferenz zwischen elektronisch angeregtem und Grundzustand eine vollständige Desaktivierung durch die Umgebung nicht immer möglich ist, existiert der elektronisch angeregte Zustand oft lange genug (ca.  $10^{-9}$  s), um die Restenergie durch spontane Emission eines Photons abzugeben. Das dabei abgegebene Lichtquant kann die gleiche Energie wie das Anregungsquant innehaben (Resonanz), ist aber meistens energieärmer (Stokes-Shift). Eine Wellenlängenverschiebung in den längerwelligen Bereich (Rotverschiebung) entsteht, wenn ein Teil der absorbierten Energie in Form von



Stößen abgegeben wird bevor die restliche Energie als Fluoreszenz abgestrahlt wird (Abbildung 1 Mitte).

### **Phosphoreszenz**

Neben dem oben beschriebenen Phänomen der internal conversion ist auch ein Spinübergang in einen Triplettzustand  $T_1$  möglich (intersystem crossing, ISC). Der Übergang vom Triplettzustand zum elektronischen Grundzustand ist verboten. Damit besitzt  $T_1$  eine relativ lange Lebensdauer. Die Rückkehr des angeregten Moleküls von  $T_1$  in den Grundzustand kann strahlungslos oder unter Emission eines Phosphoreszenz-Lichtquants erfolgen (Abbildung 1 rechts). Ein neuerliches ISC zurück in einen Singulettzustand ist ebenfalls möglich. Die Lebensdauer der angeregten Zustände ist sehr unterschiedlich: Typische Werte für  $S_1$  sind ca.  $10^{-10}$  bis  $10^{-7}$  s und für  $T_1 \geq 10^{-3}$  s.

### **Quantenausbeute**

Die Effektivität der Fluoreszenz wird mittels der Quantenausbeute ( $\Phi$ ) ausgedrückt. Sie ist allgemein als der Quotient aus der Anzahl definierter Ereignisse bei photophysikalischen oder photochemischen Prozessen und der Zahl der absorbierten Lichtquanten (Photonen) definiert. Bei der Fluoreszenz ergibt sich die Quantenausbeute aus der Zahl der emittierten geteilt durch die der absorbierten Photonen. Sie stellt damit ein wichtiges Maß für die Leistungsfähigkeit eines Fluoreszenzfarbstoffs dar.

Die Quantenausbeute ist im Idealfall gleich 1, wenn jedes einfallende Photon genau einen Reaktionsprozess auslöst. Im Allgemeinen ist sie jedoch kleiner 1.

## **1.1.2. Fluoreszenzlöschung**

Die Fluoreszenzemission reagiert gegenüber Änderungen des pH-Wertes, der Temperatur, der Lösungsmittelzusammensetzung und der Anwesenheit von fluoreszenzlöschenden Molekülen sehr empfindlich. So können Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel oder Lösungsmittelbestandteilen zum strahlungslosen Abbau der Anregungsenergie führen. Die Gegenwart von Triplett-Sauerstoff oder von paramagnetischen Metallkomplexen erhöht die Wahrscheinlichkeit eines ISC und verringert dadurch die Fluoreszenz. Die verstärkte Spin-Bahn-Kopplung schwerer Atome erhöht ebenfalls die Wahrscheinlichkeit eines ISC. Daher können Zusätze von Schwermetallsalzen oder Substituenten wie Iod ebenfalls die Fluoreszenz schwächen<sup>[1]</sup>.

Es existieren verschiedene Arten der Fluoreszenzlöschung:

Bei der *dynamischen Löschung* relaxiert das elektronisch angeregte Farbstoffmolekül strahlungslos durch Stöße mit dem Löschmolekül. Die Anregungsenergie wird dabei in Wärmeenergie umgewandelt. Insgesamt wird die Lebensdauer des elektronisch angeregten Zustandes im Farbstoffmolekül verringert und so die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Emission (Fluoreszenz) erniedrigt. Das Löschmolekül kann auch ein zweiter Farbstoff sein.

Eine andere Art der Fluoreszenzlöschung ist die *statistische Löschung*, bei der der Farbstoff und das Löschmolekül einen Grundzustandskomplex bilden, der schwächer bzw. überhaupt nicht mehr fluoresziert. Es wird also die Anzahl der fluoreszenzfähigen Moleküle verringert. Die Löschwirkung durch Komplexbildung ist meist stärker als durch Stoßlöschung. In der Regel tritt keine der beiden vorgestellten Prozesse isoliert auf. Vielmehr findet meist eine kombinierte Löschung statt, bei der Art und Konzentration von Farbstoff- bzw. Löschmolekül das Verhältnis von dynamischer zu statistischer Löschung bestimmen.

Bei der *Dimerisierung* zweier Farbstoffmoleküle kann es ebenso zu einer Fluoreszenzlöschung kommen. Sie ist ein Beispiel dafür, dass Moleküle die eigene Fluoreszenz beeinträchtigen.

Bei *FRET* (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer) ist ein Dipol-Dipol-Mechanismus Ursache für die Fluoreszenzlöschung, wobei eine vom Abstand abhängige Überlappung zwischen dem Fluoreszenzspektrum des Donor-Moleküls (Farbstoff) mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptor-Moleküls (Löschmolekül) einen effizienten Energie-Transfer ohne Emission eines Photons ermöglicht.

### 1.1.3. UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie

Unter UV/Vis-Spektroskopie versteht man Absorptionsspektroskopie mit Messwellenlängen im ultravioletten (ca. 200 bis 400 nm) und sichtbaren (ca. 400 bis 800 nm) Spektralbereich. Die Messung mit Strahlung kürzerer Wellenlänge ist zwar möglich, aber nur in Einzelfällen unter erheblichem apparativem Aufwand sinnvoll, da bei Wellenlängen unter 200 nm die Absorption der Luft (besonders die von Sauerstoff) stark zunimmt und daher der gesamte Strahlengang im Vakuum verlaufen muss (Vakuultraviolet-, VUV-Spektroskopie).

Das Messverfahren bei der UV/Vis-Spektroskopie beruht auf der Anregung äußerer Elektronen. Dabei wird durch Energieaufnahme bei geeigneter Wellenlänge ein Molekül aus dem elektronischen Grundzustand  $M$  in einen angeregten Zustand  $M^*$  überführt. Die hierbei

aufgenommene Energie wird im Anschluss in Form von Stößen (Wärme) oder Strahlung (Fluoreszenz/Phosphoreszenz) wieder an die Umgebung abgegeben.

Eine quantitative Betrachtung der UV/Vis-Spektroskopie ist mittels des Lambert-Beerschen Gesetz möglich:

$$E_{\lambda} = -\ln \left( \frac{\Phi_{ex}}{\Phi_{in}} \right) = c \cdot \varepsilon \cdot d$$

$E_{\lambda}$  = Extinktion

$\Phi_{ex}$  = austretender Strahlungsfluss,

$\Phi_{in}$  = einfallender Strahlungsfluss

$c$  = Konzentration

$\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient

$d$  = Schichtdicke

Deutlich empfindlicher als reine UV/Vis-Absorptionsspektroskopie ist die Fluoreszenzspektroskopie. Mit Fluorimetern wird bei verschiedenen Anregungswellenlängen das Emissionsspektrum aufgezeichnet, welches bei Fluoreszenzfarbstoffen natürlich von besonderem Interesse ist. Bei der Messung können mehrere Messprinzipien angewendet werden. Im einfachsten Fall wird die Probe bei einer festen Wellenlänge angeregt und die Intensität der Fluoreszenz bei einer festen Wellenlänge gemessen. Die Selektion der Wellenlänge(n) erfolgt mit Hilfe von Filtern (Filterfluorimeter). Werden statt dieser Filter Monochromatoren eingesetzt, so können Emissionsspektren (Messung der Fluoreszenzintensität als Funktion der Emissionswellenlänge bei fester Anregungswellenlänge) oder Anregungsspektren (Messung der Fluoreszenzintensität als Funktion der Anregungswellenlänge bei fester Fluoreszenzwellenlänge) aufgenommen werden<sup>[1]</sup>.

## 1.1.4. Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzfarbstoffe können für die Untersuchung von Zellen verwendet werden. Mit verschiedenen Farbstoffen lassen sich diverse Zellkompartimente oder auch Proteine gezielt anfärben. Dabei ist es möglich, Farbstoffe zu verwenden, die aufgrund besonderer funktioneller Gruppen in bestimmten Bereichen der Zelle akkumulieren, bzw. die nur dort Fluoreszenz zeigen. Ebenso ist es möglich fixierte Zellen mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern anzufärben. Eine molekularbiologische Methode stellt die Expressierung von fluoreszierenden Proteinen wie z.B. GFP dar (siehe Kapitel 1.4.1.1.). Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops lässt sich die Lokalisation des Farbstoffs innerhalb der Zelle mittels Messung der Fluoreszenzintensität bestimmen. Das Fluoreszenzmikroskop sendet hierzu einen monochromatischen Lichtstrahl auf das Objekt (Zelle mit Fluoreszenzfarbstoff) aus. Der Farbstoff absorbiert dieses und emittiert anschließend Licht größerer Wellenlänge, welches im Objektiv zu einem Abbild gebündelt wird. Der Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops ist aus Abbildung 3<sup>[4]</sup> ersichtlich.

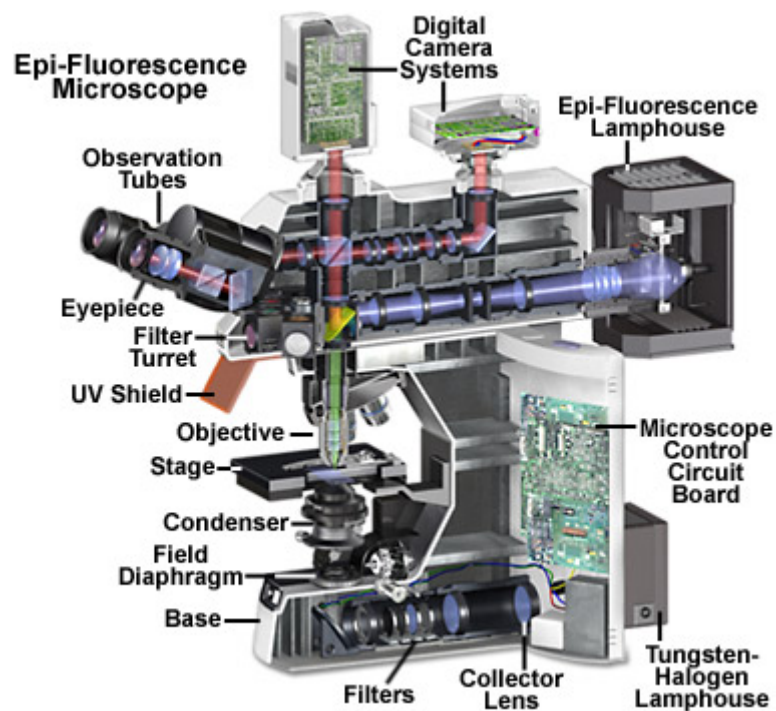
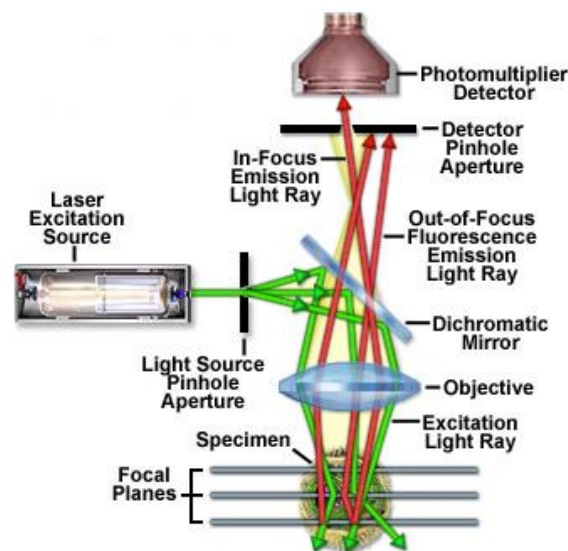


Abbildung 3: Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops

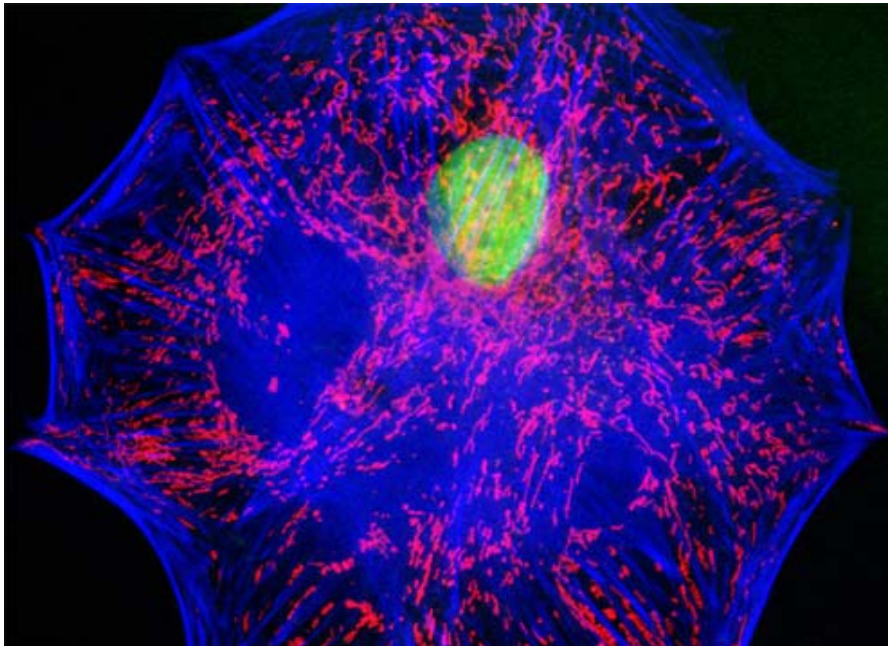
Das konfokale Laser-Rastermikroskop (confocal laser scanning microscope, CLSM, Abbildung 4<sup>[5]</sup>) ist ein Spezialtyp des Fluoreszenzmikroskops. Hiermit wird ein Objekt in der Fokusebene mit einem Laserstrahl punktwise abgerastert, wobei die Fluoreszenzfarbstoffe der Probe (Objekt) angeregt werden. Auf diese Weise ist die Aufnahme zweidimensionaler Schnittbilder von Zellen möglich, die dann dreidimensional rekonstruiert werden können.



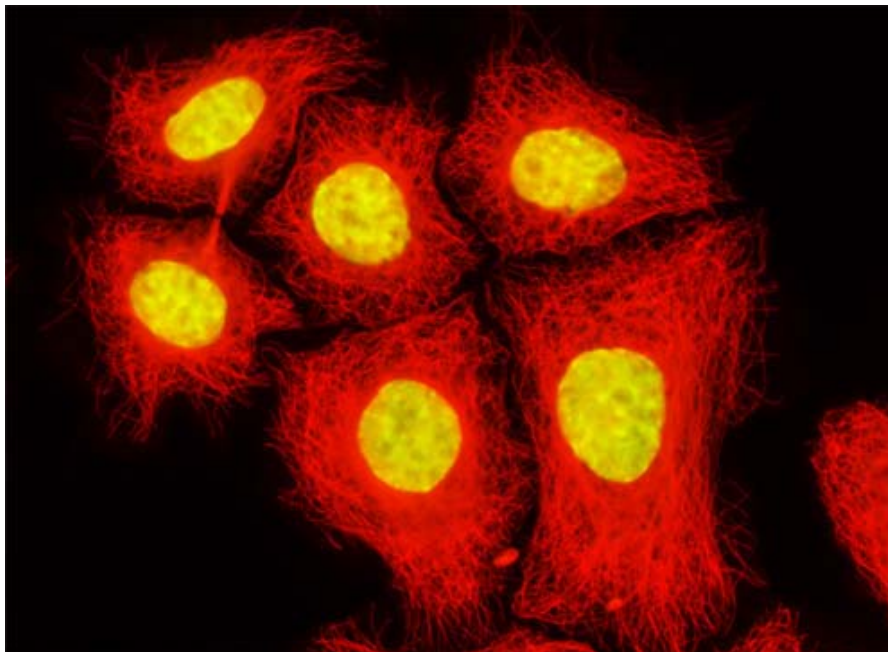
**Abbildung 4:** Strahlengang in einem CLSM

In einem CLSM wird das Anregungslicht in die Probe hineinfokussiert. Licht aus diesem Fokus wird nun in der Regel durch das gleiche Objektiv auf eine Lochblende abgebildet und gelangt von dort auf einen Detektor. Anregungs- und Detektionsfokus liegen dabei konfokal, also übereinander. Optische Informationen, die nicht aus der Fokalebene kommen, werden somit zweifach unterdrückt. Die Auflösung in lateraler Richtung liegt bei 200 nm, in axialer Richtung bei 500 bis 700 nm.

Abbildung 5<sup>[6]</sup> und Abbildung 6<sup>[7]</sup> sind zwei beispielhafte Fluoreszenzaufnahmen, die mit einem CLSM erzeugt wurden.



**Abbildung 5:** CLSM-Aufnahme von Nierenzellen (CV-1-Linie) der gelbgrünen Meerkatze, angefärbt sind: der Zellkern (grün, Sytox Green), die Actinfilamente (blau, Phalloidin gekoppelt mit Alexa Fluor 350), sowie die Mitochondrien (rot, Mito Tracker Red CMXRos)

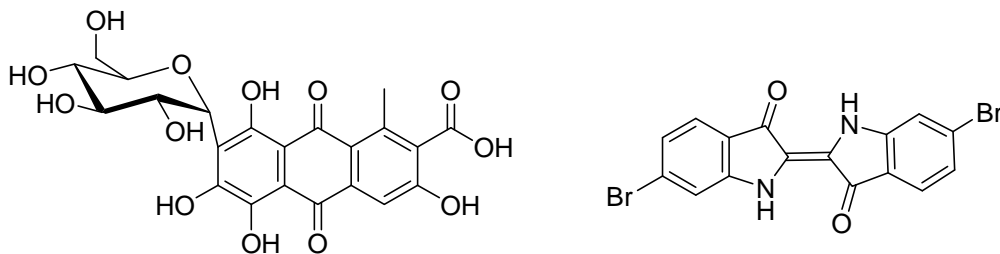


**Abbildung 6:** CLSM-Aufnahme menschlicher Gebärmutterhalskrebszellen (HeLa-Linie), angefärbt sind: Tubulin (Alexa Fluor 568 markierter Tubulinantikörper, rot), sowie der Zellkern (TO-PRO-3, gelb)

## 1.2. Farbstoffe

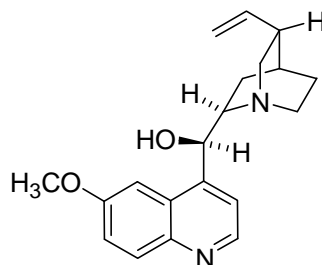
### 1.2.1. Geschichtliches

Schon seit Urzeiten spielen Farbstoffe für den Menschen eine wichtige Rolle. Das aus der Kermeslaus (*Coccus ilicis*) gewonnene Karmin wurde bereits in der Eisenzeit zum Färben von Stoffen und zum Malen verwendet. Ebenso ist das aus der im Mittelmeer lebenden Purpurschnecke (*Murex trunculus*) gewonnene Purpur ein Beispiel. Es war bereits den alten Griechen bekannt und wegen seiner aufwendigen Herstellung ein begehrtes Statussymbol (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Strukturen der Karminsäure (links) und des Purpurs (6,6-Dibromindigo) (rechts)

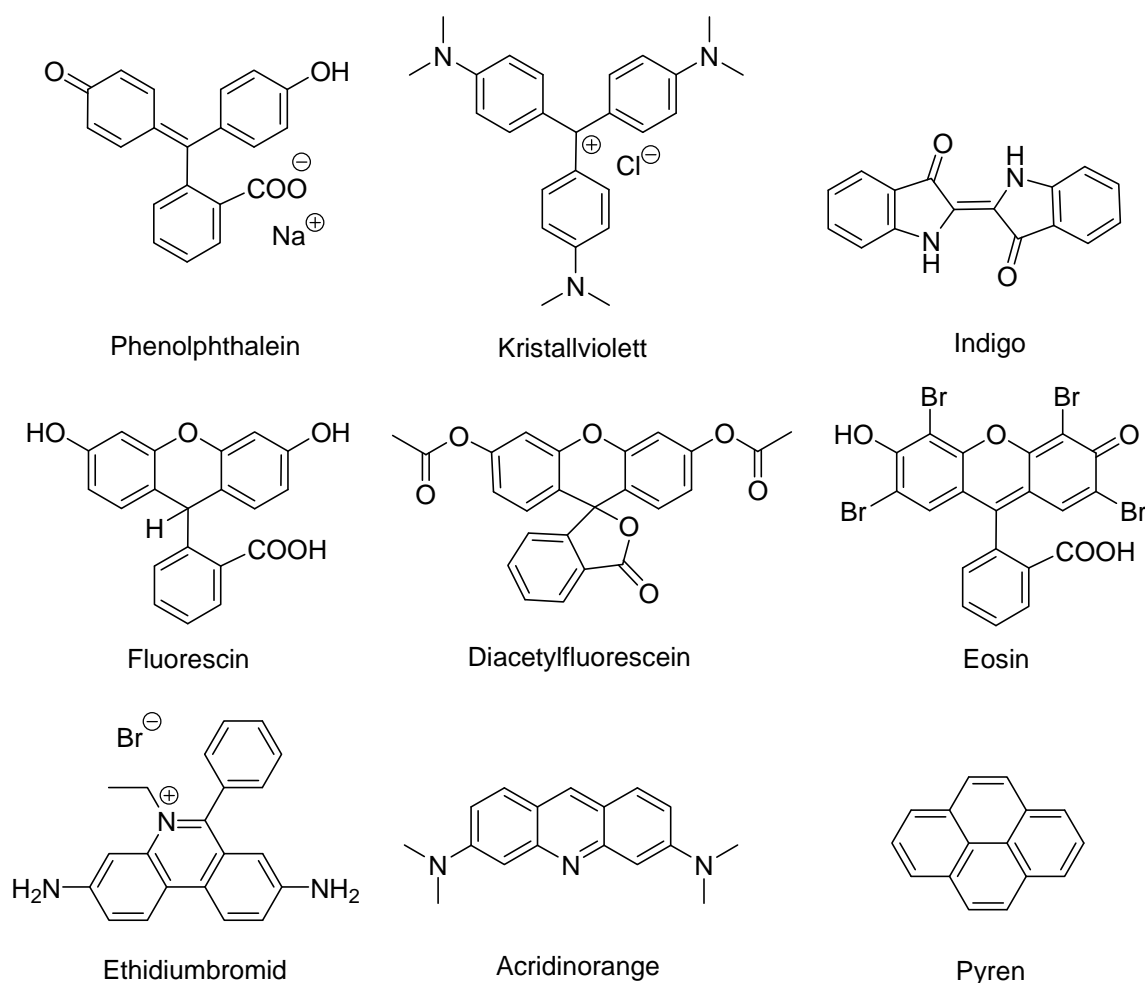
Chinin (Abbildung 8) wurde 1820 von Pierre Joseph Pelletier aus dem Chinarindenbaum (*Cinchona*) isoliert. Es war eine der ersten Substanzen, an denen Fluoreszenz untersucht worden ist (Herschel, 1845). Chinin wurde hierzu durch UV-Licht angeregt und erzeugte eine schwache, bläuliche Fluoreszenz. Verwendung findet es als Aromastoff in „Tonic Water“ und als Malariaphylaxe<sup>[8,9,10]</sup>.



**Abbildung 8:** Struktur von Chinin

## 1.2.2. Veränderliche Farbstoffe

Die Absorptions- und Emissionseigenschaften von Farbstoffen werden durch das aromatische  $\pi$ -System der jeweiligen Verbindung bestimmt. Durch äußere Einflüsse auf das  $\pi$ -System des Chromophors können Wellenlängen und Intensitäten der Absorption sowie auch der Emission verändert werden. Äußere Einflüsse stellen z.B. der pH-Wert, die Polarität und die Viskosität des Lösungsmittels, der Oxidationszustand des Farbstoffs und die Wechselwirkung des Farbstoffs mit anderen Molekülen dar. In Abbildung 9 sind einige veränderliche Farbstoffe aufgeführt.



**Abbildung 9:** Farbstoffe mit veränderbaren Absorptions- und Emissionseigenschaften

Phenolphthalein, Eosin und Kristallviolett ändern je nach pH-Wert die Wellenlänge der Absorption<sup>[10]</sup> und können deshalb als pH-Indikatoren verwendet werden. Bei Indigo und Fluorescein verändert sich die Absorptionswellenlängen in Abhängigkeit vom Oxidationszustand des Farbstoffs, wobei die reduzierte Form jeweils farblos (Leukoindigo bzw. Fluorescein) und die oxidierte Form bei Indigo blau<sup>[10]</sup> bzw. bei Fluorescein gelb mit grüner



Fluoreszenz ist<sup>[11,12]</sup>. Ein weiteres Beispiel stellt das Diacetylfluorescein dar<sup>[13,14]</sup>. Es ist weiß und nicht fluoreszierend und wird durch enzymatische oder basische Hydrolyse in das grün fluoreszierende Fluorescein umgewandelt. Eosin verwendet man bei der Halogenid-Titration nach Fajans<sup>[15]</sup> als Adsorptionsindikator. Ethidiumbromid und Acridinorange<sup>[16]</sup> sind DNA-Farbstoffe. Ethidiumbromid<sup>[17]</sup> zeigt nach Interkalation in den DNA-Doppelstrang eine starke Fluoreszenzzunahme, während sich bei Acridinorange bei DNA-Interkalation die Emissionswellenlänge ändert. Kristallviolett besitzt eine viskositätsabhängige Fluoreszenz. Zeigt es in niedrig viskosen Lösungsmittel keine Fluoreszenz, nimmt diese mit steigender Viskosität zu<sup>[18]</sup>. Auch Pyren ist ein Fluorophor, dessen Fluoreszenz sehr stark vom Lösungsmittel abhängt. Hier ist die Quantenausbeute in organischen Lösungsmitteln viel höher als in Wasser<sup>[1]</sup>.

### 1.2.3. Triphenylmethanfarbstoffe

Triphenylmethanfarbstoffe<sup>[9,10]</sup> sind eine sehr bedeutende Farbstoffklasse. Aufgrund ihrer leichten Zugänglichkeit und der großen Variationsmöglichkeiten gibt es eine Vielzahl verschiedener Farbstoffe, mit einer beachtlichen Palette an Farben und Farbstoffeigenschaften. Die Farbstoffe werden in verschiedene Klassen unterteilt, die sich bestimmte Strukturmerkmale teilen. Es gibt u.a. Aminotriphenylmethanfarbstoffe, die Aminogruppen als Auxochrome tragen, aus Phthalsäure dargestellte Phthaleinate und Xanthenfarbstoffe die eine Etherbrücke zwischen zwei Phenylringen tragen.

#### 1.2.3.1. Triphenylmethylcarbeniumion

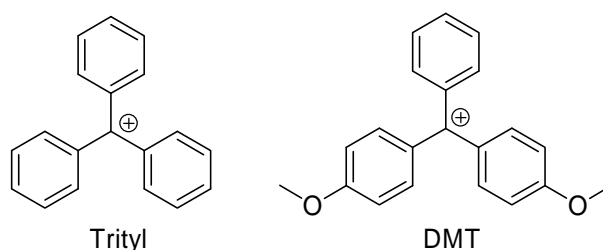
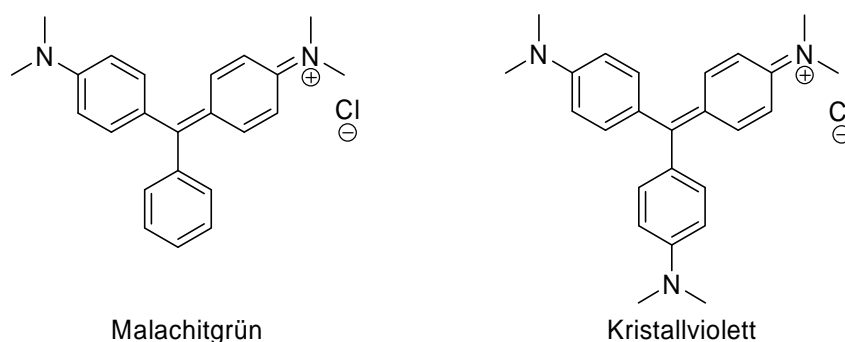


Abbildung 10: Einfache Triphenylmethane

Als Chromophor der Triphenylmethanfarbstoffe besitzt das Triphenylmethylcarbeniumion (Tritylion) auch ohne auxochrome Gruppen eine blasse Farbe ( $\lambda_{\text{max}} = 428 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 30000$ ). Es dient als Schutzgruppe für Alkohole, welche durch Zugabe von Säure leicht wieder entschützt

werden können, wobei das farbige Triphenylmethylcarbeniumion freigesetzt wird. Das Dimethoxytriphenylcarbenium-Ion wird als Schutzgruppe in der DNA Festphasen-synthese verwendet. Sie ist säurelabiler als die Trityl-Schutzgruppe, wodurch besonders milde Abspaltbedingungen möglich sind. So lässt sich die saure Abspaltung der Purinbasen unterdrücken. Durch die intensive orange Färbung ( $\lambda_{\text{max}} = 498 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 74000$ )<sup>[19]</sup> der DMT-Schutzgruppe nach der Abspaltung kann die DNA-Kopplungsausbeute durch Photometrie bestimmt werden.

### 1.2.3.2. Aminotriphenylmethanfarbstoffe



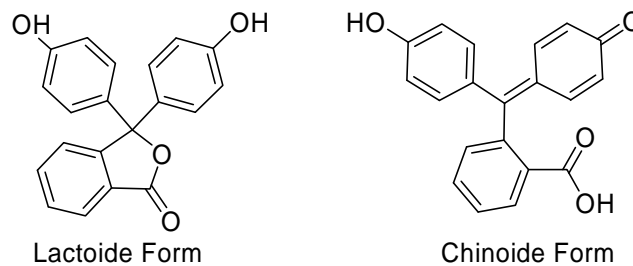
**Abbildung 11:** Aminotriphenylmethanfarbstoffe

In Abbildung 11 sind zwei aminosubstituierte Triphenylmethanfarbstoffe aufgeführt. Malachitgrün bildet tiefgrüne, metallisch glänzende Kristalle, die sich in Wasser und Ethanol gut lösen. Es wurde erstmals von Fischer<sup>[20]</sup> aus Benzaldehyd und *N,N*-Dimethylanilin in Gegenwart von Zinkchlorid dargestellt. Das gebildete Triphenylmethin wurde mit Bleidioxid zu Malachitgrün oxidiert. Malachitgrün wurde früher als Papier- und Textilfarbstoff verwendet, wird aber aufgrund seiner schlechten Photostabilität nicht mehr eingesetzt. Der Einsatz als Lebensmittelfarbstoff wurde aus Toxizitätsgründen ebenfalls eingeschränkt. Malachitgrün zeigt zwei Absorptionsmaxima bei 420 nm und bei 620 nm.

Kristallviolett liegt als Hydrochlorid in Form feiner, metallisch-gold glänzender Nadeln vor<sup>[21]</sup>. Es löst sich in Wasser und anderen polaren Lösungsmitteln mit intensiv violetter Farbe. Kristallviolett wird aus Michler's Keton (4,4'-Bis-(dimethylamino)-benzophenon) und *N,N*-Dimethylanilin unter Zugabe von Phosphorylchlorid synthetisiert. Kristallviolett findet Verwendung als Farbstoff in Farbbändern oder Kopierstiften, aber auch in der mikroskopischen Färbetechnik. Hier bildet es den Hauptbestandteil der sogenannten Gram-Färbung, mit deren Hilfe sich Bakterien grob klassifizieren lassen. Kristallviolett wird auch als Viskositätsindikator verwendet, da dessen Fluoreszenz von der Viskosität des Lösungsmittels abhängig ist.

### 1.2.3.3. Phthaleine

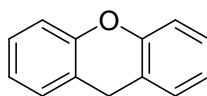
Phthaleine sind Kondensationsprodukte von Phthalsäure und Phenolen<sup>[22]</sup>. Im Gegensatz zu anderen Triphenylmethanfarbstoffen können Phthaleine in einer Lactonform vorliegen, deren Eigenschaften sich deutlich von der offenkettigen (chinoiden) Form unterscheiden. (Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Phenolphthalein

Phenolphthalein ist ein weißes, kristallines Pulver, das 1871 erstmalig von Baeyer aus Phthalsäure und Resorcin dargestellt wurde<sup>[23]</sup>. Es ist in Ethanol gut, in Wasser schwerlöslich. In neutralem oder saurem pH-Wert liegt Phenolphthalein in der farblosen Lactonform vor. Zwischen pH 8 und 10 geht es in die rote Chinonform über, weswegen es als pH-Indikator verwendet werden kann. Eine weitere Anwendung fand Phenolphthalein, bevor es als potentiell carcinogen klassifiziert wurde, als Abführmittel<sup>[8]</sup>.

### 1.2.4. Xanthenfarbstoffe

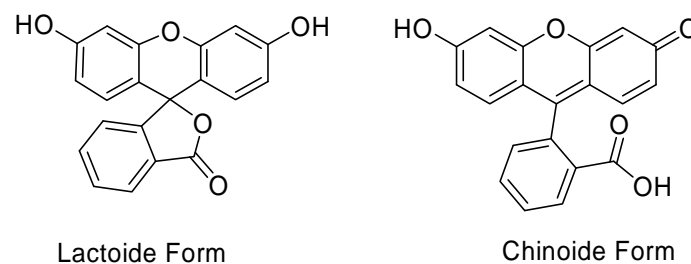


**Abbildung 13:** Grundgerüst der Xantheme

Unter Xanthenfarbstoffen fasst man diejenige Klasse von Farbstoffen zusammen, die ein Xanthengrundgerüst (Abbildung 13) aufweisen. Xantheme zeigen leuchtende, sehr klare Farbtöne, und besitzen alle mehr oder weniger stark ausgeprägte Fluoreszenz. Ihre Lichtechtheit ist jedoch meist nur gering. Strukturell leiten sie sich von den Di- und Triphenylmethanfarbstoffen ab. Durch geeignete Wahl der Substituenten können die Absorptionswellenlängen und damit die Farbigkeit, sowie die chemischen und physikalischen Eigenschaften in einem weiten Bereich variiert werden. Durch diese große Flexibilität werden

die Xanthenfarbstoffe für die unterschiedlichsten Anwendungen in Technik und Forschung genutzt. Ihre Verwendung reicht von der Anfärbung von Gewässern, zur Erforschung unterirdischer Strömungen, über Diffusionsversuche, Kosmetik- und Lebensmittelfarbstoffe, bis hin zur Markierung von einzelnen Molekülen zur Verfolgung von Stoffwechselfvorgängen oder als Indikatoren bei der quantitativen Analyse.

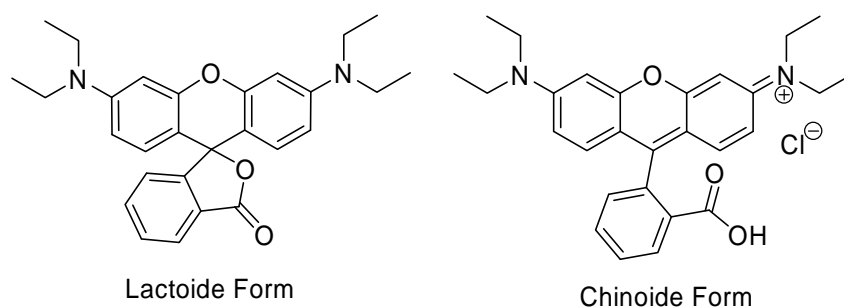
### 1.2.4.1. Fluorescein



**Abbildung 14:** Fluorescein

Fluorescein ist ein braunrotes Kristallpulver, das sich in Ethanol mit gelbgrüner Farbe ( $\lambda_{\text{abs}} = 490 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 73000$ ) löst. In verdünnt alkalischer Lösung rufen schon Spuren von Fluorescein eine intensive grüngelbe ( $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$ ) Fluoreszenz hervor<sup>[22]</sup>. 1871 von Adolf von Baeyer dargestellt, entwickelte es sich zu einem der bekanntesten Fluoreszenzfarbstoffe. Fluorescein wird in der analytischen Chemie als Indikator verwendet, und da es auch noch in geringsten Mengen nachweisbar ist, wird es in der Hydrogeologie zum Studium von Wasserläufen eingesetzt. Dank seiner Ungiftigkeit wird Fluorescein in der Medizin zur Diagnose von Hornhautschäden, Durchblutungsstörungen und bei Gallenblasen- und Darmoperationen eingesetzt, aber auch zur Färbung von Seifen und Badeextrakten/-salzen verwendet<sup>[8]</sup>.

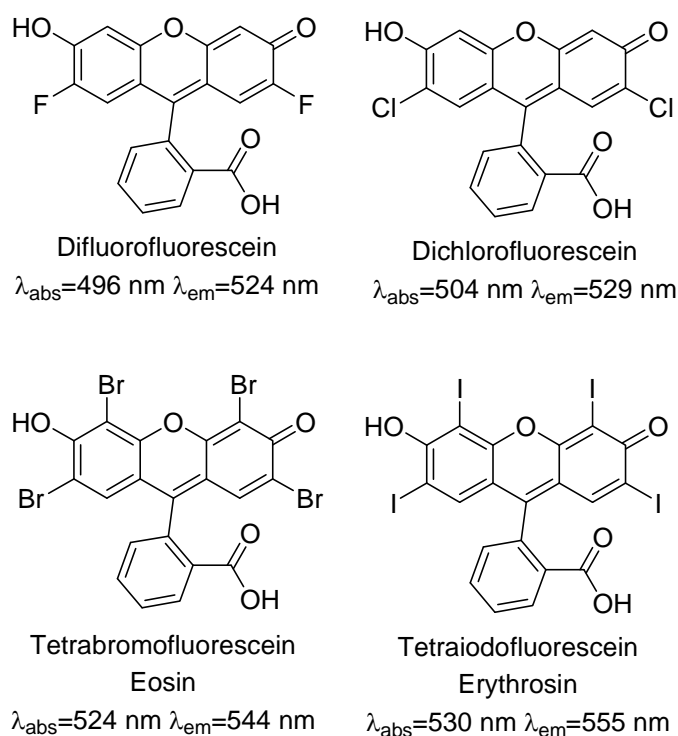
### 1.2.4.2. Rhodamin B



**Abbildung 15:** Rhodamin B

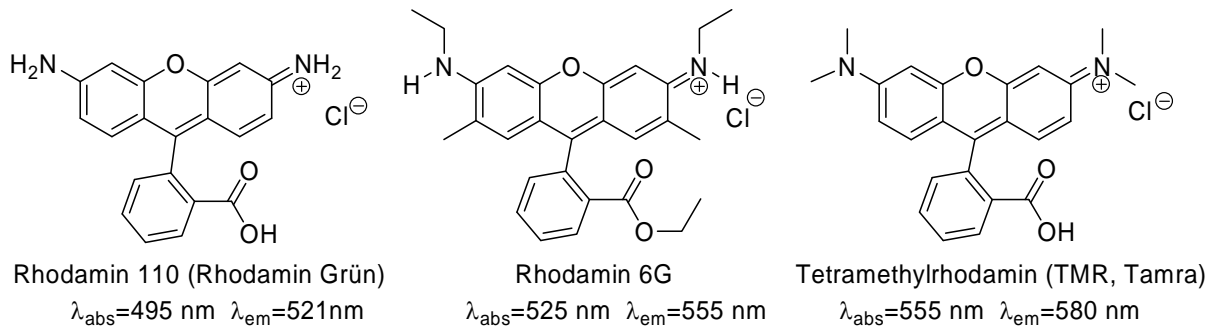
Rhodamin B bildet metallisch-grüne Kristalle, die sich in Wasser und Ethanol mit rötlich-violetter Farbe und starker orangefarbener Fluoreszenz lösen. Rhodamin B wurde 1887 von der BASF<sup>®</sup> entwickelt. Dargestellt wird es aus Phthalsäure und 3-(Diethylamino)-phenol. Rhodamin B wird als Fluoreszenzmarker für Bioanwendungen und als Laserfarbstoff verwendet.

### 1.2.4.3. Weitere Xanthen-Farbstoffvarianten<sup>[24]</sup>

**Abbildung 16:** Halogenderivate des Fluoresceins

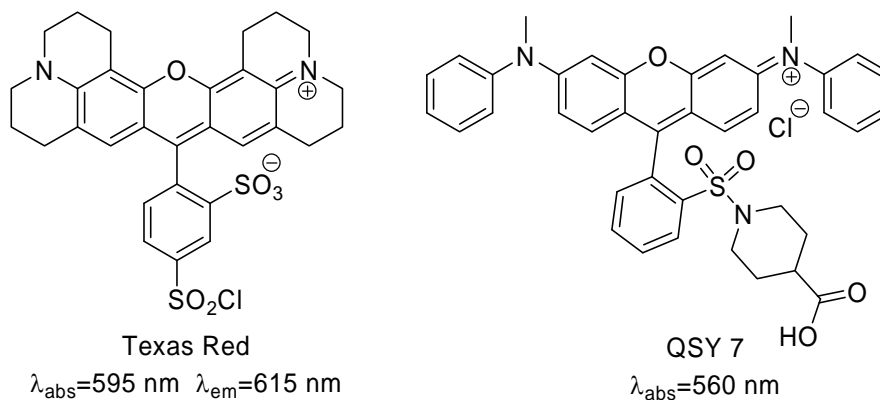
Bei Dichloro- und Difluorofluorescein wurden, im Unterschied zu Fluorescein, Substituenten in 2' und 7'-Stellung eingefügt. Diese verändern die optischen Eigenschaften geringfügig, geben dem Farbstoff aber eine deutlich höhere Photostabilität gegenüber unsubstituiertem Fluorescein. Bei Eosin ist aufgrund der schweren Bromatome in der Nähe des Chromophors die Spin-Bahn Kopplung besonders stark ausgeprägt. Die Fluoreszenzquantenausbeute von Eosin ist gering, während es eine wesentlich höhere Triplettquantenausbeute als Fluorescein hat. Es wird daher als Photosensitizer verwendet. Aufgrund der hohen Quantenausbeute für die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff dient Eosin auch als Sauerstoffaktivator. Hauptanwendungsgebiet von Eosin ist die Medizin und die Biologie, wo es zum Färben von Zellen

dient. Die Triplettausbeute von Erythrosin ist ebenfalls hoch, weshalb es eine dem Eosin analoge Verwendung findet.



**Abbildung 17:** Verschiedenfarbige Rhodamin Derivate

Rhodamin Grün ist ein grünes Rhodaminderivat mit fluoresceinähnlicher Emission. Im Vergleich zu Fluorescein sind aber Wasserlöslichkeit und Photostabilität deutlich erhöht. Rhodamin 6G ist ein gelber Rhodaminfarbstoff der häufig als Laserfarbstoff verwendet wird. Tetramethylrhodamin ist wiederum Rhodamin B ähnlich.



**Abbildung 18:** Spezielle Rhodamin Derivate

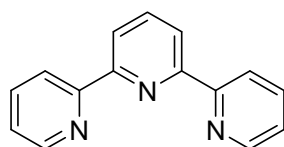
Ein Rhodamin Derivat mit einer Julolidingruppe ist Texas Red. Es findet aufgrund seiner stark rotverschobenen Farbe breite Anwendung in der Zellbiologie. QSY 7 ist ein „Black Hole Quencher“, ein Farbstoff der eine breite Absorptionsbande besitzt, keine eigene Fluoreszenz zeigt, aber die Fluoreszenz vieler Farbstoffe zu löschen vermag.

## 1.3. Liganden

### 1.3.1. Terpyridin

#### 1.3.1.1. Allgemein

2,2':6',2''-Terpyridin (Abbildung 19) und seine Derivate stellen besonders effektive Chelatliganden für eine große Zahl von Übergangsmetallionen dar. Diese Komplexe finden in weiten Bereichen der Chemie Anwendung, was zu einem großen Teil auf ihre photo-physikalischen und Redox Eigenschaften zurückzuführen ist. So werden sie zur Ausbildung geordneter Strukturen auf Oberflächen, zur kolorimetrischen Detektion von Metallen und als Bausteine für die Supramolekulare Chemie verwendet. 2,2':6',2''-Terpyridin ist eine schwache Base die zwei Protonen aufnehmen kann. Die Säurebildungskonstante sind:  $pK_1 = 4,66$  und  $pK_2 = 3,28$ . Der dritte Stickstoff ist deaktiviert und wird erst in konzentrierter Schwefelsäure protoniert<sup>[25,26,27,28]</sup>.



Ni <sup>2+</sup> :	K <sub>1</sub> = 10,7	K <sub>2</sub> = 11,1	log β = 21,8
Cu <sup>2+</sup> :	K <sub>1</sub> = 9,1	K <sub>2</sub> = 8,0	log β = 17,1
Fe <sup>2+</sup> :	K <sub>1</sub> = 7,1	K <sub>2</sub> = 13,8	log β = 20,9
Co <sup>3+</sup> :	K <sub>1</sub> = 8,4	K <sub>2</sub> = 9,9	log β = 18,3
Zn <sup>2+</sup> :	K <sub>1</sub> = 6,0		

Abbildung 19: 2,2':6',2''-Terpyridin mit Komplexbindungskonstanten für einige Metalle<sup>[29]</sup>

#### 1.3.1.2. Terpyridinsynthesen

Durch die enorme Zahl potentieller und faktischer Anwendungen sind zahlreiche Methoden zur Synthese unterschiedlich substituierter Terpyridine entwickelt worden. Dabei lassen sich prinzipiell zwei Synthesestrategien unterscheiden: Zum einen die eher klassischen Synthesen mit einem Ringschluss, zum anderen die modernen Synthesen mit Übergangsmetall-katalysierten Kopplungen.

Die bekannteste klassische Methode stellt die Kröhnke-Kondensation dar<sup>[30]</sup>, welche in Abbildung 20 dargestellt ist. Dabei wird ein *N*-Pyridiniumsalz mit einem Enon unter Anwesenheit von Ammoniumacetat kondensiert.

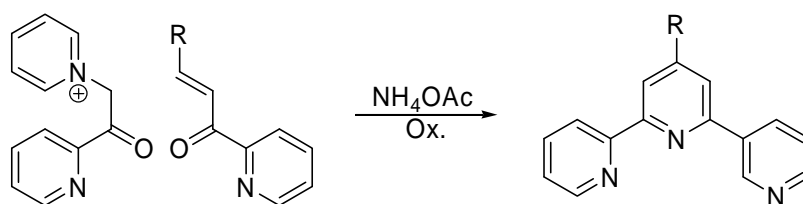


Abbildung 20: Terpyridinsynthese nach Kröhnke

Alternative Synthesemöglichkeiten sind die Methode nach Potts<sup>[31]</sup> (Abbildung 21-a) und die Methode nach Jameson<sup>[32]</sup> (Abbildung 21-b). Sie beinhalten die Kondensation des entsprechenden Enons mit der Enolatform des 2-Acetylpyridins.

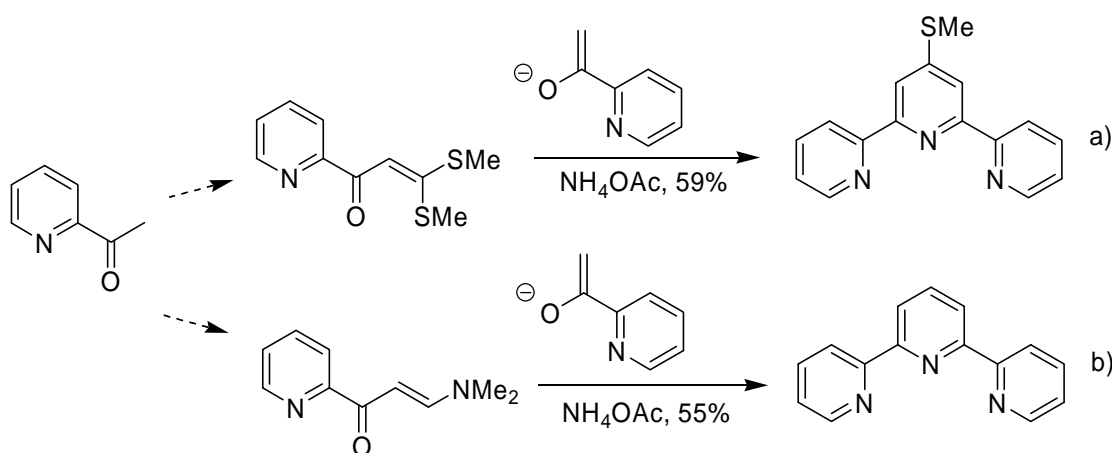
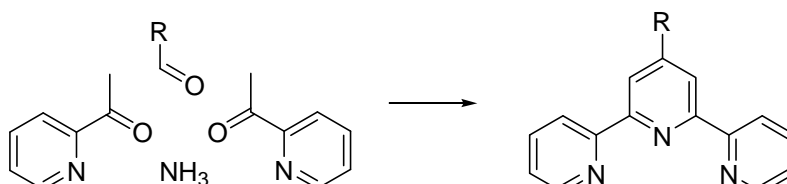


Abbildung 21: Terpyridinsynthese nach Potts(a) und Jameson(b)

Bei der Terpyridinsynthese nach Hanan<sup>[33]</sup> (Abbildung 22) wird der mittlere Pyridinring aus 2-Acetylpyridin, einem Aldehyd und Ammoniak unter basischen Bedingungen über eine Hantzsch-Pyridin-Synthese aufgebaut. Auf diese Weise sind zahlreiche 4'-Arylsubstituierte Terpyridinderivate in einer einstufigen Synthese zugänglich. Die Synthese nach Hanan ist in Kapitel 5.3.1.1 näher beschrieben.



R = Aryl

Abbildung 22: Terpyridinsynthese nach Hanan



Bei der Terpyridinsynthese nach Constable (Abbildung 23) lässt man 2 Äquivalente Ethylpicolinat mit Aceton mittels doppelter Claisen-Esterkondensation zu einem 1,3,5-Trion reagieren. Der anschließende Ringschluss in Gegenwart von Ammoniumacetat führt zum Dihydropyridon, welches mit  $\text{PCl}_5$  und  $\text{POCl}_3$  zum Chlorterpyridin weiter umgesetzt werden kann<sup>[34,35]</sup>. Diese Synthese ist in Kapitel 5.3.1.2 näher erläutert.

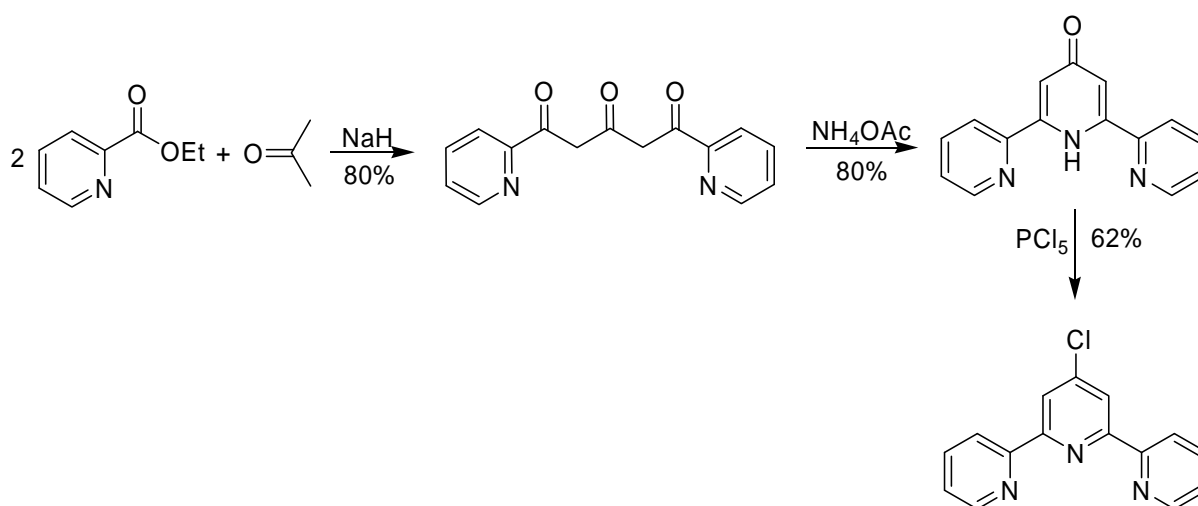


Abbildung 23: Terpyridinsynthese<sup>[35]</sup>

Terpyridine sind auch über Palladiumkreuzkopplungen darstellbar. Dabei geht man meist von substituierten Halogenpyridinen aus, die mittels Suzuki-, die Stille- und die Negishi-Kopplung mit Metallorganen verknüpft werden. Durch Verwendung dieser Methodik ist es möglich, Terpyridine mit beliebigem, vor allem auch unsymmetrischem Substitutionsmuster herzustellen<sup>[36]</sup>.

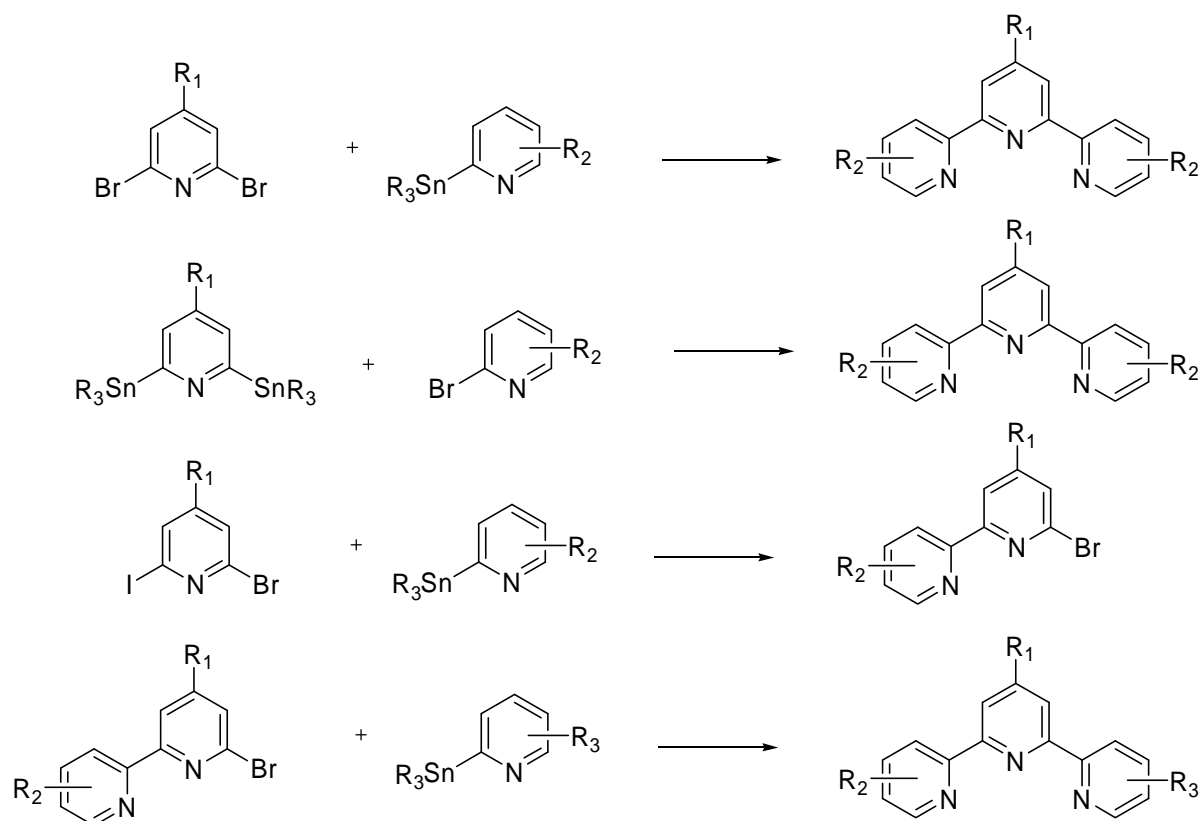


Abbildung 24: Synthese verschiedener Terpyridinderivate<sup>[36]</sup> via Stille Kupplung

### 1.3.1.3. Funktionalisierung von Terpyridin

Weiterhin sind auch zahlreiche Synthesen von funktionalisierten Terpyridinen bekannt. Neben der direkten Synthese aus einzelnen Bausteinen können natürlich auch an den Terpyridinsystemen selbst Modifikationen vorgenommen werden. Beispielsweise ist es möglich aus Halogenterpyridinen mittels nucleophiler aromatischer Substitution Terpyridinylether herzustellen. Neben Alkoholen können auch Lactone und Aminoalkohole als Reagenzien eingesetzt werden<sup>[37]</sup>.

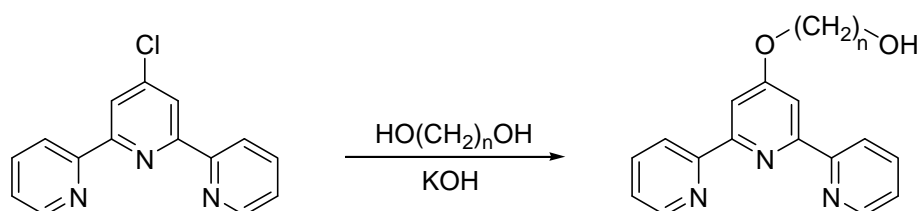


Abbildung 25: Synthese von Terpyridinylethern

Auch Pyridone können zur Synthese von Terpyridinderivaten herangezogen werden, da diese unter basischen Bedingungen als Nucleophile reagieren. Dies erlaubt die Synthese unterschiedlich funktionalisierter Terpyridinylether<sup>[38]</sup> (Abbildung 25).

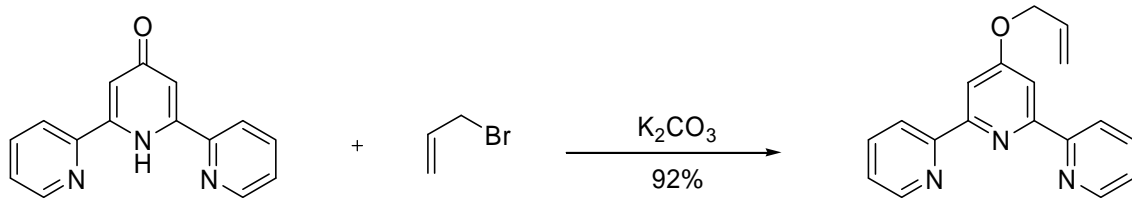


Abbildung 26: Synthese von Terpyridinderivaten über das Pyridon<sup>[38]</sup>

Eine besonders schonende Methode mit der auch kostbare Alkohole in guten Ausbeuten an das Terpyridinsystem gekoppelt werden können, stellt die Mitsunobu-Reaktion dar. Dies ist in Abbildung 27 beispielhaft dargestellt<sup>[39]</sup>.

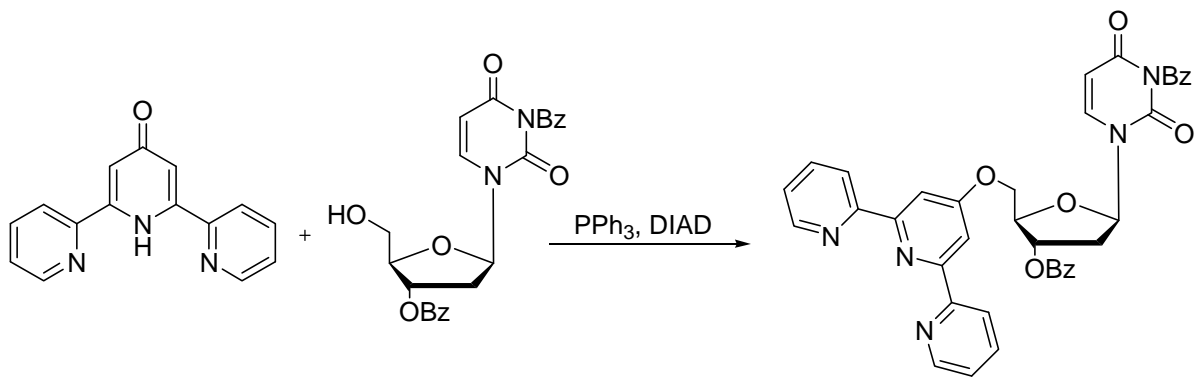


Abbildung 27: Mitsunobu-Reaktion

## 1.3.2. Cyclam

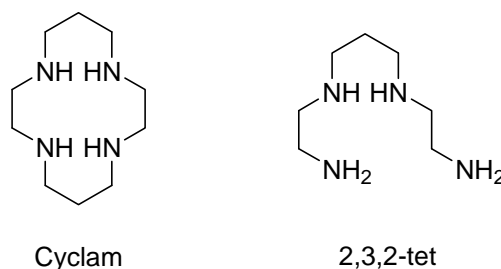
### 1.3.2.1. Allgemeines

Cyclam (systematischer Name 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecan) wurde 1937 von van Alphen<sup>[40]</sup> dargestellt. Metall-Cyclam-Komplexe besitzen hohe Komplexbildungskonstanten  $K$  (Tabelle 1)<sup>[41]</sup>, die sich mit dem makrocyclischen Effekt erklären lassen<sup>[42]</sup>.

	$\text{Cu}^{2+}$	$\text{Ni}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$	$\text{Co}^{2+}$	$\text{Cd}^{2+}$	$\text{Hg}^{2+}$	$\text{Pb}^{2+}$
lg K (Cyclam)	28,1	22,2	15,5	12,7	11,7	23,0	10,8

**Tabelle 1:** Komplexbildungskonstanten lgK für einige Metall-Cyclam-Komplexe

Dieser beschreibt die zusätzliche Stabilisierung eines makrocyclischen Komplexes gegenüber einem vergleichbaren offenkettigen Chelatkomplex. Diese Stabilisierung hat ihre Ursache vor allem in der unterschiedlichen Präorganisation, Solvation sowie Dipol-Dipol-Abstoßung der Donorfunktionen der beiden Systeme. In Tabelle 2 sind die Komplexbildungskonstanten für einige Metallkomplexe von Cyclam (1,4,8,12-Tetraazacyclotetradecan, Makrocyclus) und 2,3,2-tet (1,4,8,12-Tetraazadodecan, offenkettiger Ligand) angegeben<sup>[41]</sup>.



**Abbildung 28:** Cyclam und offenkettiger tetradentater Ligand

	$\text{Cu}^{2+}$	$\text{Ni}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$
lg K (Cyclam)	28,1	22,2	15,5
lg K (2,3,2-tet)	23,1	16,1	12,4

**Tabelle 2:** Vergleich der Komplexbildungskonstanten des Makrocyclus Cyclam mit dem vergleichbaren offenkettigen System 2,3,2-tet

Anwendung findet Cyclam als vielseitiger Ligand für Übergangsmetallkationen in der Medizin und Koordinationschemie. Zum Beispiel können schon geringe Dosen Cyclam die tödliche Wirkung von Nickel herabsetzen<sup>[43]</sup>. Dabei ist es deutlich effektiver als EDTA, welches eine niedrigere Komplexbildungskonstante zeigt:  $\lg K(\text{Ni-cyclam}) = 22,2$ ,  $\lg K(\text{Ni-EDTA}) = 18,6$ .

### 1.3.2.2. Synthese von Cyclam

Cyclam kann an einem Nickeltemplat aus 1,5,8,12-Tetraazadodecan und Glyoxal hergestellt werden<sup>[44]</sup> (Abbildung 29). Das primäre Kondensationsprodukt wird durch  $\text{NaBH}_4$  reduziert und koordiniertes  $\text{Ni}^{2+}$  durch „Extraktion“ mit Cyankali entfernt. Diese Synthese ist in Kapitel 5.3.2 näher erläutert. Die Gesamtausbeute der Literatur belief sich auf 20%<sup>[44]</sup>.

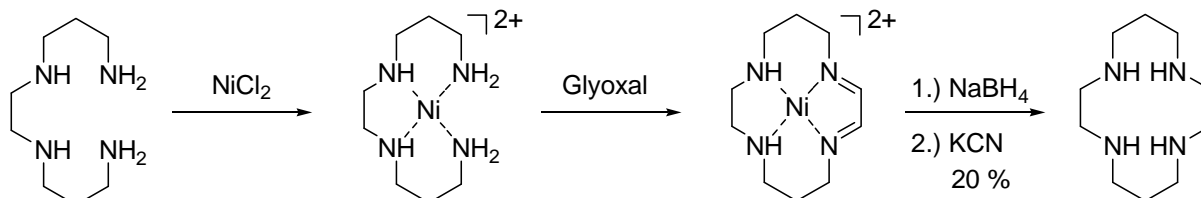


Abbildung 29: Templatsynthese von Cyclam

### 1.3.2.3. Synthesen von Cyclamderivaten

Cyclamderivate besitzen interessante Anwendungsmöglichkeiten. Zu ihrer Darstellung sind je nach Substitutionsgrad am Cyclam unterschiedliche Reaktionswege notwendig. Die vier Stickstoffatome des Cyclams reagieren als nucleophile Zentren bereitwillig mit den meisten Elektrophilen. Setzt man das Elektrophil im Überschuss ein, erhält man auf diese Weise in der Regel das tetrasubstituierte Cyclam<sup>[45]</sup>. Von Nachteil ist, dass alle vier Substituenten gleich sind. Ein Beispiel ist in Abbildung 30 gegeben.

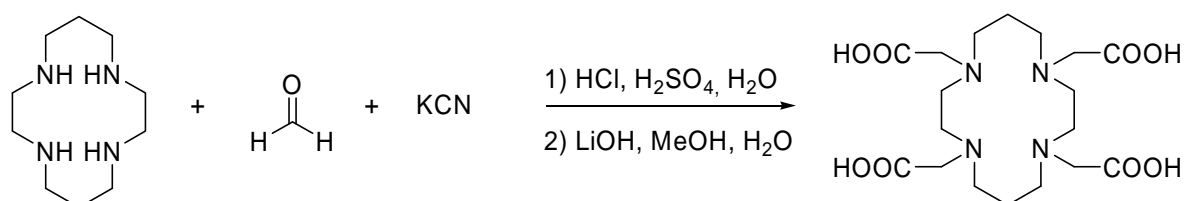
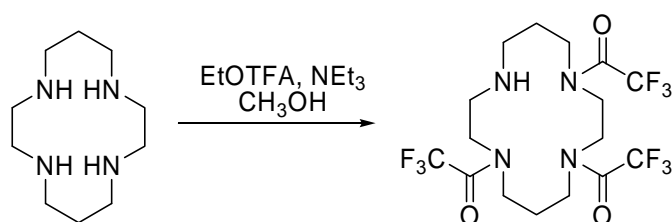


Abbildung 30: Synthese von vierfach substituiertem Cyclam nach Ronnie

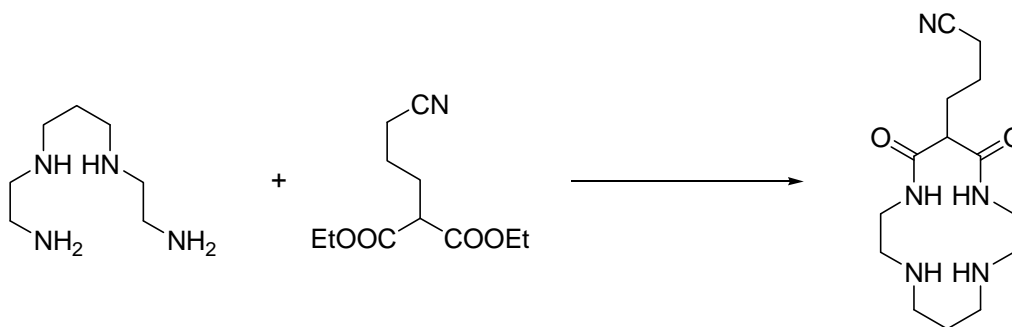
Schwieriger gestaltet sich die Synthese monofunktionalisierter Cyclame. Setzt man Cyclam mit einem Äquivalent Elektrophil um, wird man in der Regel ein Gemisch aus einfach und mehrfach substituierten Produkten erhalten. Eine alternative Reaktionsführung besteht in der selektiven Schützung dreier Aminfunktionen mit Trifluoressigsäureethylester. Die vierte Aminfunktion bleibt dabei auch bei einem Überschuss Trifluoressigsäureethylester unbesetzt, was an einer sukzessiven Passivierung des Cyclamrings mit steigender Zahl der Schutzgruppen liegt (Abbildung 31)<sup>[46]</sup> Diese Synthese ist in Kapitel 5.3.2 näher erläutert.



**Abbildung 31:** Synthese von dreifach TFA geschütztem Cyclam nach Yang

Die ungeschützte Aminogruppe ist nun grundsätzlich für eine Funktionalisierung zugänglich, doch eignen sich hierfür nur wenige, reaktive Reagenzien wie z.B. Benzylbromide, Säurechloride und Anhydride.

Die bisher besprochenen Funktionalisierungen des Cyclamgerüsts beziehen sich durchweg auf die Aminogruppen. Modifizierungen an den Methylengruppen besitzen ebenfalls große Bedeutung. An eine nachträgliche Funktionalisierung der Methylengruppen eines bereits bestehenden Cyclamgerüsts ist aufgrund der Passivität jedoch sehr schwierig. Eine mögliche Syntheseroute ist die Umsetzung geeigneter Cyclamvorstufen, wie in Abbildung 32 gezeigt. Die Reaktion von 1,4,8,11-Tetraazaundecan mit einem Malonester führt zur Bildung eines Diamids, welches nach Reduktion ein C-funktionalisiertes Cyclam liefert<sup>[47]</sup>.



**Abbildung 32:** Syntheseroute, die zu C-funktionalisiertem Cyclam führt

## 1.4. Kopplung

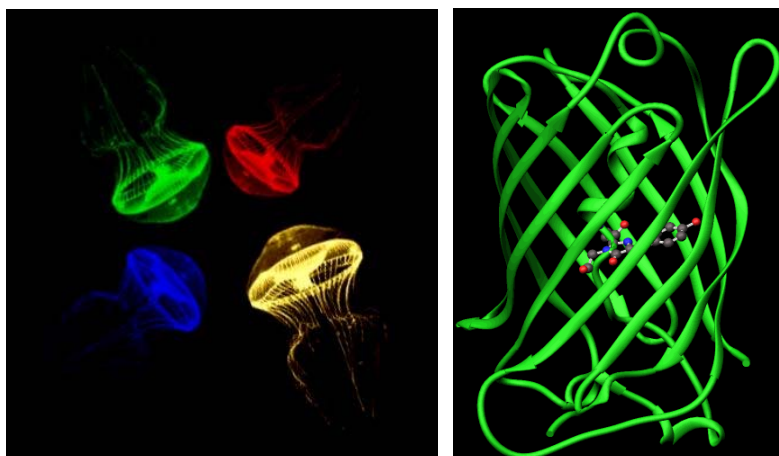
### 1.4.1. Funktionalisierung von Proteinen

#### 1.4.1.1. Molekularbiologische Methoden

In der Zellbiologie spielt die Untersuchung von Proteinen (Wechselwirkungen, räumliche und zeitliche Verteilung in lebenden Zellen, Geweben oder Organismen) eine sehr große Rolle. Um einen leichten und spezifischen Nachweis dieser zellularen Strukturen zu gewährleisten, werden sie mit einem Marker funktionalisiert. Hierbei handelt es sich zum Beispiel um eine kleine Aminosäurekette oder auch ein ganzes Protein, welches den charakteristischen Nachweis des ursprünglichen Proteins leicht zulässt.

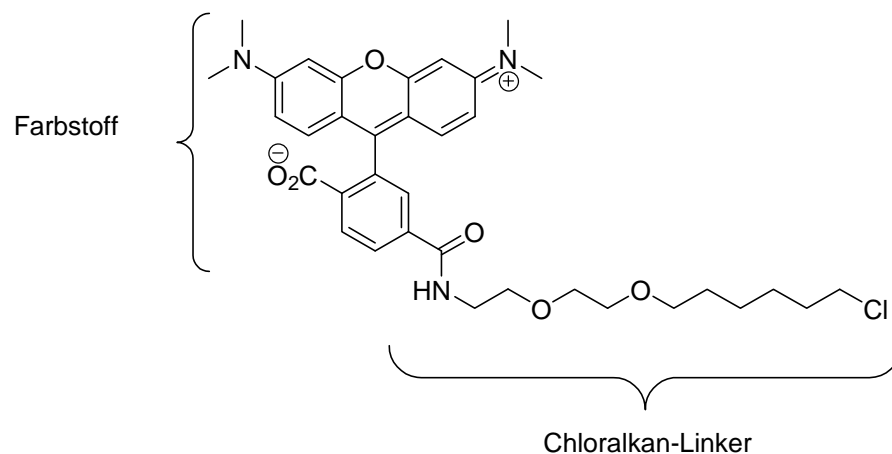
Einen möglichen Weg, Proteine zu funktionalisieren, liefert die Gentechnik. Dabei wird das Genom bestimmter Mikroorganismen (Bakterien, oft *E. Coli*) durch Klonierung derart verändert (in der Regel werden zwei verschiedene Genanteile fusioniert), dass diese das so genannte rekombinante Protein (auch Fusionsprotein) herstellen können<sup>[48]</sup>. Aber auch Eukaryonten und höhere Lebewesen wie z.B. Mäuse können gentechnisch verändert werden. Im Folgenden werden einige Fusionsproteine vorgestellt:

- *GFP* (green fluorescent protein)<sup>[49,50,51,52]</sup> ist ein aus 238 Aminosäuren bestehendes Protein aus der Qualle *Aequorea Victoria*, welches bei Anregung mit UV-Licht grün leuchtet. Ein zu untersuchendes Protein, das mit GFP fusioniert wurde, lässt sich also durch dessen Fluoreszenzlicht nachweisen. Mutationen des ursprünglichen Proteins GFP weisen andere Emissionsmaxima auf und heißen entsprechend *YFP* (yellow fluorescent protein), *RFP* (red fluorescent protein) und *CFP* (cyan fluorescent protein).



**Abbildung 33:** Fluoreszierende Quallen (links) und Kristallstruktur von GFP (rechts)

- Auch *His-Tags*<sup>[53,54]</sup> können an den C- oder N-Terminus von Proteinen geknüpft werden. Es handelt sich um Oligo-Histidine, bestehend aus 4 bis 12 Histidinmolekülen. Sie werden zur chromatographischen Aufreinigung von Proteinen verwendet. An einem Agaroseträgermaterial ist Nickel(II) über einen Nitrilotriacetat (NTA) Chelatliganden immobilisiert. Das His-Tag Protein koordiniert an der Ni-NTA Festphase und wird anschließend durch Spülen mit Imidazol, Histidin oder EDTA erhalten. Die Verwendung von Nickel für diese Reinigungsmethode beruht auf der großen Komplexbindungskonstante für Nickel-Histidin Komplexe (His<sup>[55]</sup>:  $K_1 = 8,7$ ;  $K_2 = 6,9$ ;  $\lg \beta = 15,6$ ; NTA<sup>[29]</sup>:  $K_1 = 11,5$ ). Ein His-Tag kann auch verwendet werden, um ein Protein mit einem Farbstoff zu funktionalisieren. Dazu wird der Farbstoff mit einem Ligandsystem, wie NTA, Terpyridin oder Cyclam funktionalisiert, an welches ein Metall koordinieren kann. Dieser Farbstoffmetallkomplex kann dann an das His-Tag Protein binden.
- *HaloTag*<sup>TM</sup> ist ein von der Firma PROMEGA<sup>®</sup> vorgestelltes Konzept, das eine alternative Proteinmarkierung ermöglicht<sup>[56]</sup>. Dazu wird ein spezielles Fusionsprotein, das 33 kDa schwere HaloTag<sup>TM</sup> Protein, in einer Zelle, die zuvor mit einem entsprechenden Plasmid transfiziert wurde, in vivo exprimiert. Die Zelle wird mit einem Farbstoff (Ligand) inkubiert, der nach Passieren der Membran kovalent über einen Linker (Chloralkan-Linker) an ein Aspartat des HaloTag-Fusionsproteins bindet. Nach Auswaschen von ungebundenem Ligand kann die Fluoreszenzuntersuchung beginnen. In Abbildung 34 ist der HaloTag<sup>TM</sup> TMR Ligand gezeigt, dessen signalgebende Einheit Tetramethylrhodamin ist.



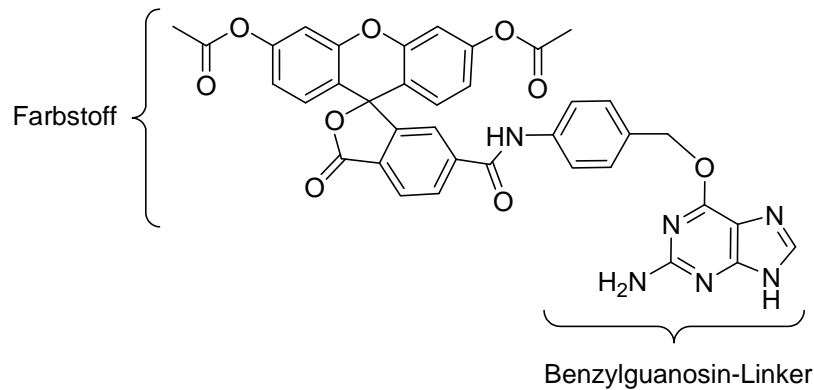
**Abbildung 34:** Der HaloTag<sup>TM</sup> TMR Ligand, bestehend aus Linker (zur Bindungsknüpfung an das Protein) sowie Farbstoff

- *-SNAP-tag* ist ein Tag-Fusionsprotein der Firma COVALYS<sup>®</sup> <sup>[57]</sup>. Das Verfahren ähnelt dem o.g. HaloTag Verfahren der Firma PROMEGA<sup>®</sup>. Das verwendete Fusionsprotein ist



22 kDa schwer und wird mit Hilfe eines Benzylguanosin-Linkers funktionalisiert. Der Farbstoff wird damit kovalent an einem Cystein verankert.

In Abbildung 35 ist der SNAP-tag DAF Ligand gezeigt, dessen signalgebende Einheit ein Diacetylfluorescein ist, das intrazellulär zu Fluorescein umgesetzt wird.



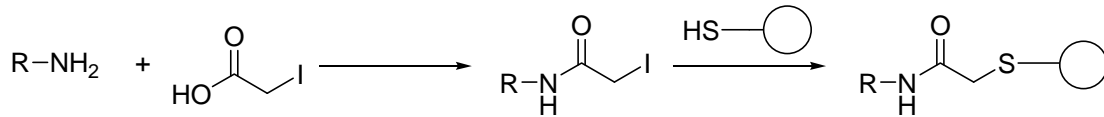
**Abbildung 35:** Benzylguanosin-modifiziertes Diacetylfluorescein als SNAP-tag-Ligand

#### 1.4.1.2. Chemische Methoden

Proteine lassen sich auch auf einem anderen, als dem gentechnischen Weg funktionalisieren. Dazu werden einzelne Aminosäuren des Proteins kovalent an einen Kopplungspartner gebunden. Eine übliche, aber nicht sehr selektive Methode ist die Verwendung von Isothiocyanaten, die an Amine und Alkohole addieren können und stabile Harnstoffe und Urethane bilden können.

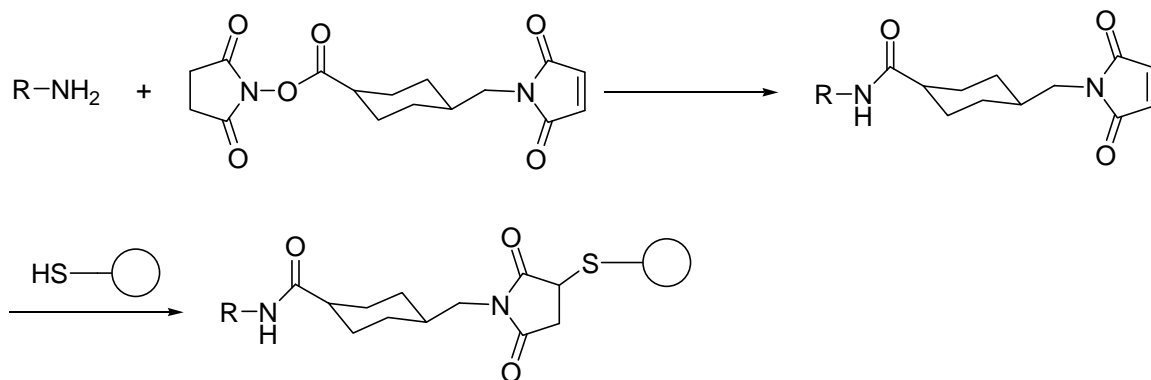
Um eine selektivere Kopplung am Protein durchzuführen, ist Cystein aus mehreren Gründen ein geeigneter Kopplungspartner. Die Thiolgruppe besitzt zum einen eine hohe nucleophile Reaktivität. Zum anderen ist eine freie, d.h. nicht über Disulfid-Brücken gebundene, Thiolgruppe in einer Vielzahl von Proteinen nur einmal vorhanden, so dass die Kopplung regioselektiv durchgeführt werden kann.

Eine weitere Methode ist die Kopplung einer Aminofunktion (z.B. von Lysin in einem Protein oder einer Aminofunktion an einem Farbstoff) an die freie Thiolgruppe des Cysteins mittels Iodessigsäure. Aus Amin und Iodessigsäure bildet sich ein Amid, das in einem zweiten Schritt mit der Thiolgruppe reagiert (Abbildung 36). Auf diese Weise lassen sich beispielsweise zwei Proteine aneinander oder ein Protein an eine Oberfläche koppeln.



**Abbildung 36:** Kopplung einer Aminfunktion an die Thiolgruppe einer Cysteinfunktion mittels Iodessigsäure

Eine Aminfunktion lässt sich auch über eine Maleinimidgruppe an die Thiofunktion binden. Als Standardcrosslinker hat sich wegen seiner hohen Stabilität und der langsamen Hydrolyse Succinimidyl-4-(*N*-maleinimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat (SMCC) durchgesetzt<sup>[58]</sup> (Abbildung 37).

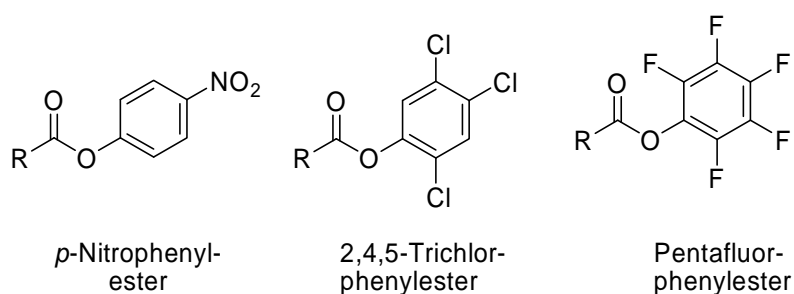


**Abbildung 37:** Kopplung einer Aminfunktion an die Thiolgruppe einer Cysteinfunktion mittels SMCC

## 1.4.2. Amidsynthesen

Für die Bildung von Amidbindungen stehen in der modernen organischen Synthese, wegen der enormen Bedeutung der Peptidsynthese in Chemie und Biochemie, zahlreiche Methoden zur Verfügung<sup>[59,60]</sup>. Über die Zeit wurden zahlreiche Reagenzien und Standardprozeduren entwickelt, welche die Knüpfung dieser Bindung erleichtern. Meist wird in einem ersten Schritt die Carbonsäure in eine reaktive Zwischenstufe überführt und anschließend mit dem Amin verknüpft. Dabei kann die Zwischenstufe isoliert oder *in situ* in der Reaktionslösung mit dem Amin umgesetzt werden.

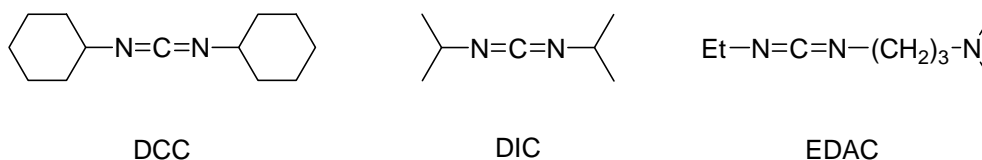
Zur Carbonsäureaktivierung wurden mehrere Typen von Reagenzien entwickelt. Eine Reaktionsmöglichkeit besteht in der Überführung der Carbonsäure in aktivierte Ester, deren Reaktivität für die Bildung von Amiden ausreicht (Abbildung 38).



**Abbildung 38:** Aktivester

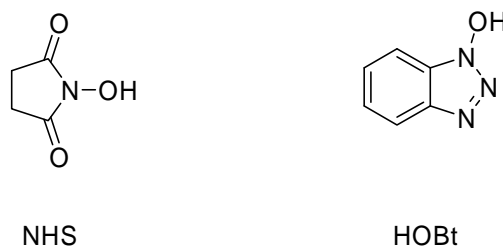
Ein häufig verwendetes Reagenz, welches unterstützend bei Aminkopplungen eingesetzt wird, ist 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP). Es bildet mit Carbonsäuren *N*-Acylpyridine, die sich mit Aminen direkt zu Amiden umsetzen lassen.

Sehr häufig werden Carbodiimide verwendet, die eine schonende Aktivierung der Carbonsäure erlauben und sich meist leicht aus der Reaktionslösung abtrennen lassen<sup>[61,62,63]</sup>. Hierbei wird die Carbonsäure *in situ* aktiviert und gleich mit dem Amin umgesetzt. Gängige Reagenzien sind *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und *N,N*-Diisopropylcarbodiimid (DIC). *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid (EDAC) ist eine wasserlösliche Variante der Carbodiimide, die Amidkopplungen in Wasser ermöglicht.



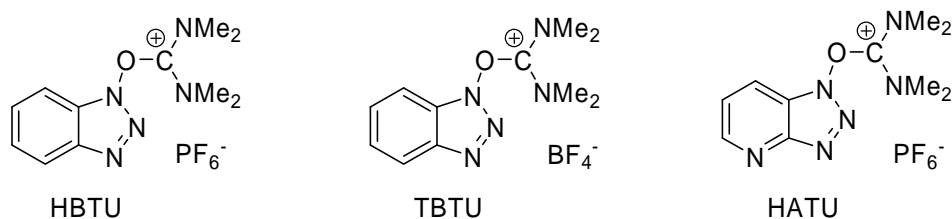
**Abbildung 39:** Carbodiimide

Ein großes Problem bei der Verwendung der äußerst reaktiven Carbodiimide zur Aktivierung von funktionalisierten Carbonsäuren, wie Aminosäuren, stellt ihre starke Neigung zu Nebenreaktionen dar. Dies beschränkt ihren Einsatz auf Reaktionspartner, die innerhalb weniger Minuten zum gewünschten Produkt reagieren. Dauert eine Kopplung jedoch einige Stunden oder gar Tage, so führt die Bildung unreaktiver Nebenprodukte zu einer äußerst schlechten Ausbeute<sup>[64]</sup>. Deshalb werden die Reaktanten nach der Aktivierung meist in einen für Nebenreaktionen weniger anfälligen Aktivester überführt. Dabei haben sich zwei *N*-Hydroxyaminderivate als besonders günstig erwiesen, *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT)<sup>[65]</sup>.



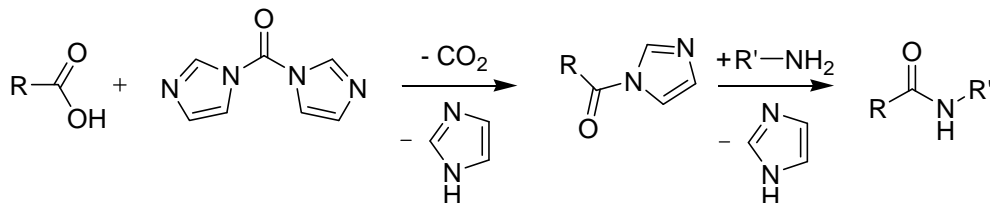
**Abbildung 40:** *N*-Hydroxyaminderivate

Die wohl besten Reagenzien zur Bildung von Amidien stellen jedoch die Uronium-Salze<sup>[66]</sup> dar. Sie ermöglichen eine sehr rasche und schonende Aktivierung der Carbonsäure und eine leichte Aufarbeitung des Reaktionsgemisches. Sie haben sich schnell zu den Standardreagenzien für die Peptidsynthese entwickelt, da sie alle Vorteile der bis heute entwickelten Reagenzien in sich vereinen.



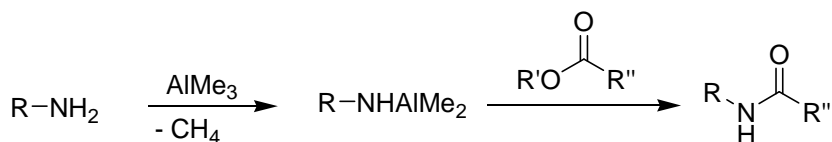
**Abbildung 41:** Uronium-Reagenzien

Zur Herstellung von Amiden nach der Imidazol-Methode<sup>[67]</sup> setzt man eine Carbonsäure bei RT mit *N,N*-Carbonyldiimidazol (CDI) zum Imidazolid um und gibt nach Beendigung der CO<sub>2</sub>-Entwicklung das Amin zu (Abbildung 42).



**Abbildung 42:** Amidsynthese durch die Imidazolmethode nach Staab

Eine vielfältige Methode Amide darzustellen ist die von Weinreb<sup>[68]</sup> entwickelte Überführung eines Amins in sein Dimethylaluminiumamid durch Umsetzung mit AlMe<sub>3</sub>, welches anschließend direkt mit einem Ester zum Amid reagieren kann (Abbildung 43).



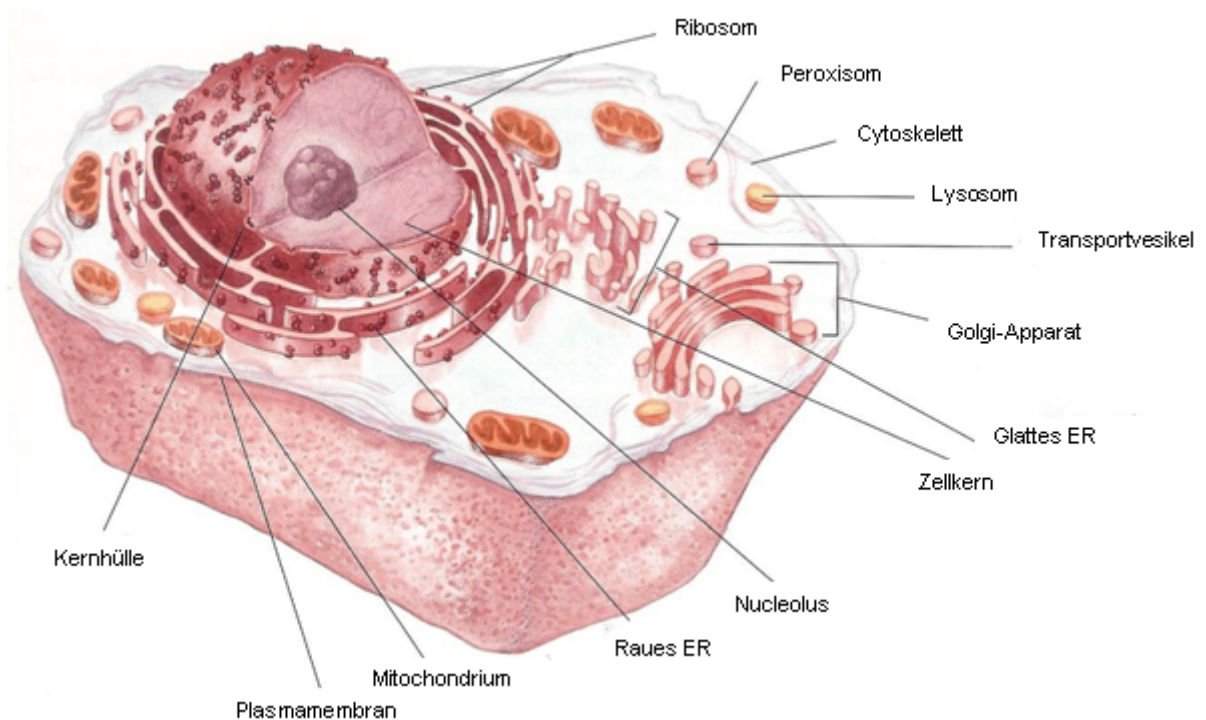
**Abbildung 43:** Amidsynthese mit Dimethylaluminiumamid nach Weinreb

## 1.5. Zellen

Zellen sind definiert als die kleinste Einheit der Struktur, der Vermehrung und der Funktion. Sie stellen die elementare Einheit dar, an der sich alle Grundfunktionen des Lebens nachweisen lassen. In der Natur existieren zwei grundsätzlich verschiedene Zelltypen, die Procyten und die Eucyten. Procyten kommen nur bei einfachen Organismen (Prokaryoten) wie Bakterien und Blaualgen vor. Alle übrigen Organismen sind aus den größeren und komplexeren Eucyten aufgebaut, welche hier weiter erläutert werden<sup>[69,70]</sup>:

Die gesamte lebende Substanz einer Zelle wird als Protoplasma bezeichnet. Sie ist von der Zell- oder Plasmamembran umgeben. Das Protoplasma wiederum gliedert sich in Nucleoplasma und Cytoplasma. Das Cytoplasma besteht aus Cytosol mit dem Cytoskelett und den verschiedenen Zellorganellen. Eucyten sind in starkem Maß in physiologisch-biochemische Reaktionsräume gegliedert, zwischen denen vielfältige funktionelle und strukturelle Beziehungen bestehen. Die Reaktionsräume werden als Kompartimente bezeichnet, sie sind durch Membranen voneinander getrennt und ermöglichen den geordneten Ablauf der zellulären Prozesse.

Die meisten Zellen sind mit bloßem Auge nicht sichtbar. Die typische Größenordnung liegt im Bereich von 5 bis 30  $\mu\text{m}$  für tierische Zellen und 10 bis 100  $\mu\text{m}$  für pflanzliche Zellen. In Abbildung 44 ist eine typische, tierische Zelle abgebildet<sup>[69]</sup>.



**Abbildung 44:** Aufbau einer tierischen Zelle

**Cytoplasma:** Das Cytoplasma ist die innerhalb der Zellmembran befindliche Grundsubstanz der Zelle. Es setzt sich aus dem wasserreichen Cytosol (Cytoplasma im engeren Sinn), welches unter anderem Proteine, Kohlenhydrate, Lipide, niedermolekulare Verbindungen des intermediären Stoffwechsels und Salze enthält, sowie aus membranumschlossenen Zeileinschlüssen, den Zellorganellen zusammen. Insgesamt besteht das Cytoplasma zu etwa 75 bis 95 % aus Wasser. Niedermolekulare Bestandteile, Proteine, die Komponenten des Cytoskeletts und die Ribosomen bilden zusammen das cytoplasmatische Kompartiment (im Unterschied zu den Zellorganellen, die jeweils eigene Kompartimente bilden), in dem wichtige Reaktionen des Intermediärstoffwechsels (Protein- und Kohlenhydratstoffwechsel, sowie Lipidsynthese) ablaufen.

**Zellkern (Nucleus):** Der Zellkern ist der Hauptträger der genetischen Information. Er enthält die Chromosomen und ist durch die Kernhülle vom Cytoplasma getrennt, um einen eigenen, auf die Chromosomen abgestimmten Stoffhaushalt aufrechterhalten zu können. Die Kernmembran ist in regelmäßigen Abständen von Kernporen durchzogen und mit dem endoplasmatischen Retikulum verbunden. Bei der Mitose löst sich die Kernmembran auf.

**Kernkörperchen (Nucleolus):** Nucleoli sind die größten und bekanntesten Kernkörperchen. In Nucleoli wird ribosomale RNA transkribiert. Eine weitere Funktion der Nucleoli ist die NAD (Nicotinadenosindinucleotid) Synthese aus NMN (Nicotinmononucleotid).

**Mitochondrien:** Mitochondrien sind meist ovale bis stäbchenförmige Organellen innerhalb der eukaryotischen Zelle. Die Hauptfunktion der Mitochondrien ist die Energieversorgung der Zellen, weshalb sie auch oft als zelluläre „Kraftwerke“ bezeichnet werden. Sie entsprechen in ihren Ausmaßen etwa einer Bakterienzelle (Länge 0,5 bis 10  $\mu\text{m}$ ) und sind von einer Membran umhüllt. Die daran anliegende innere Membran besitzt zur Oberflächenvergrößerung kammförmige Einfaltungen (Cristaetyp) oder röhrenförmige Einfaltungen (Tubulustyp). Innerhalb der inneren Membran liegt die Grundsubstanz der Mitochondrien, die Matrix. Die innere Membran enthält in erster Linie die Enzyme der Atmungskette. Über die Atmungskette entsteht in der Zelle der Energieträger Adenosintriphosphat (ATP), der bei nahezu allen biochemischen Prozessen als Energielieferant fungiert. Daneben finden in den Mitochondrien weitere Abbaureaktionen statt, darunter der Citratzyklus sowie der Abbau von Fettsäuren ( $\beta$ -Oxidation). Mitochondrien vermehren sich durch Teilung, enthalten eigenes genetisches Material (mitochondriale DNA) und sind in der Lage, selbst Proteine zu synthetisieren. Man nimmt an, dass Mitochondrien im Laufe der Evolution aus in die Zelle eingewanderten, aeroben Bakterien entstanden sind (Endosymbiontenhypothese).

**Raues Endoplasmatisches Retikulum (rER):** Das raue ER ist ein stark gegliedertes Membransystem, welches ein verschlungenes Röhrensystem darstellt, das mit der äußeren Kernmembran verbunden ist. In erster Linie wird durch das rER der Stofftransport gesteuert und die ersten posttranslationalen Modifikationen an exprimierten Proteinen vorgenommen. Das rER ist stark von Ribosomen besetzt und dadurch Ort der Proteinbiosynthese.

**Glattes Endoplasmatisches Retikulum (gER):** Das glatte ER ist dem rER ähnlich, allerdings frei von Ribosomen und in der Zelle nur in relativ geringem Maße vorhanden. Es ist Ort der Lipidsynthese und von Entgiftungsreaktionen. In Leberzellen wird im gER Glycogen abgebaut. Es dient auch als Calciumspeicher für die Signaltransduktion.

**Golgi-Apparat:** Der Golgi-Apparat ist ein submikroskopisches Membransystem im Zellplasma, welches mit dem ER in Verbindung steht. Neben dem Stofftransport ist der Golgi-Apparat auch für posttranslationalen Funktionalisierung von Proteinen mit Kohlenhydraten, Lipiden oder Sulfaten zuständig.

**Ribosomen:** Die Ribosomen sind ovale, aus ribosomaler RNA und Proteinen bestehende Partikel, die vor allem am rauen endoplasmatischen Retikulum zu finden sind, aber auch frei in der Zelle vorkommen. Die Ribosomen sind der Ort der Proteinbiosynthese.

**Lysosomen:** Lysosomen sind von einer einfachen Membran umgebene bläschenartige Organellen, mit einem Durchmesser von etwa 1  $\mu\text{m}$ , in Zellen von Tieren. Lysosomen enthalten Enzyme, die Proteine, Polysaccharide, Nucleinsäuren und Lipide abbauen. Lysosomen dienen der Zelle ebenfalls als Wiederverwertungsanlagen für komplexe fremde Moleküle oder Zellbruchstücke, die durch Endocytose in die Zelle aufgenommen worden sind. Im Inneren der Lysosomen herrschen durch  $\text{H}^+$ -ATPase aufrechterhaltene saure Verhältnisse ( $\text{pH} < 5$ ).

**Peroxisomen:** Peroxisomen sind rundliche, von einer Membran umschlossene Zellorganellen mit einem Durchmesser von 0,2 bis 1,5  $\mu\text{m}$ . Sie sind besonders reich an Katalase und Peroxidasen, die an Entgiftungsreaktionen beteiligt sind.

**Cytoskelett:** Drei verschiedene Arten von ineinander greifenden Proteinfilamenten bilden ein Netzwerk, das Cytoskelett: Actinfilamente, Mikrotubuli und intermediäre Filamente. Sie unterscheiden sich in Dicke, ihrer Zusammensetzung und ihrer Funktion. Actinfilamente organisieren die Bewegung von Organellen. Mikrotubuli sind bei der Mitose für die Trennung der Chromosomen unentbehrlich und intermediäre Filamente geben der Zelle ihre Struktur.



**Pflanzenzellen:** Pflanzenzellen unterscheiden sich in einigen Merkmalen von tierischen Zellen. Sie haben zusätzlich zur Zellmembran eine feste Zellwand die aus Cellulose und anderen Kohlenhydratpolymeren besteht. Die Zellwand ist starr, aber für Wasser und kleine Moleküle permeabel. In pflanzlichen Zellen gibt es keine Lysosomen. Ihre Funktion wird von den Vakuolen übernommen. Vakuolen können einen großen Teil der Zelle einnehmen (bis zu 90 %) und halten zusätzlich den osmotischen Druck der Zelle aufrecht. Pflanzenzellen besitzen mit Plastiden, neben Mitochondrien, einen zweiten Organelltyp der eine eigene DNA besitzt. Es gibt verschiedene Arten von Plastiden. Die bekanntesten sind Chloroplasten, die mit ca. 5 µm Durchmesser größer als Mitochondrien sind und der Photosynthese dienen. Da sie Chlorophyll in großen Mengen enthalten, sind sie üblicherweise grün. Andere Varianten von Plastiden sind die Chromoplasten, die die Pflanzenfarbstoffe enthalten und die Leukoplasten, die für die Speicherung von Nährstoffen verantwortlich sind. Zu den Leukoplasten gehören die Amyloplasten, die Stärke einlagern, Elaioplasten für die Speicherung von Lipiden sowie Proteinoplasten die Proteine enthalten. Eine besondere Variante der Amyloplasten sind die Statolithen. Sie sind Schwerkraftsensoren und daher für das senkrechte Wachstum von Pflanzen verantwortlich. Von Plastiden wird ebenso wie von Mitochondrien angenommen, dass sie schon früh mit eukaryotischen Zellen eine Symbiose eingegangen sind.

**HeLa-Zellen:** Hierbei handelt es sich um menschliche Epithelzellen eines Cervixcarcinoms (Gebärmutterhalskrebs). Es sind die ersten menschlichen Zellen aus denen eine permanente Zelllinie etabliert wurde. Im Jahr 1951 entfernte ein Chirurg bei der Patientin Henrietta Lacks einige dieser Zellen von einem Carcinom am Muttermund, um sie auf ihre Malignität zu untersuchen. Die Patientin verstarb 8 Monate später an ihrer Tumorerkrankung. Die entfernten Zellen waren vom humanen Papillomavirus 18 (HPV18) befallen und dadurch zu Tumorzellen entartet. Die Zellen ließen sich kultivieren und vermehrten sich in Zellkultur so gut, dass sie seitdem vielfach in der Forschung eingesetzt werden<sup>[8]</sup>.

***Arabidopsis Thaliana* (Acker-Schmalwand):** *Arabidopsis Thaliana* ist eine niedrige, einjährige krautige Pflanze aus der Familie der Kreuzblütler. Sie ist eine Pflanze die sehr häufig in Laborexperimenten eingesetzt wird. Aufgrund der schnellen Generationenfolge von 8 Wochen, des kleinen Genoms (5 Chromosomenpaare, 125 Millionen DNA Basen) und der leichten Kultivierbarkeit der Pflanze ist sie zur wichtigsten Modellverbindung in der Pflanzenphysiologie aufgestiegen<sup>[71]</sup>.

## 1.6. Enzymscreening

### 1.6.1. Enzyme und Proteine mit enzymähnlicher Funktion

Enzyme beschleunigen als Biokatalysatoren chemische Reaktionen durch Herabsetzen der Aktivierungsenergie, die zu einer möglichen Stoffumsetzung benötigt wird. Theoretisch ist eine enzymatische Umsetzung reversibel, d.h. die Produkte können wieder in die Ausgangsstoffe zurückreagieren. Die Substrate einer Enzymreaktion werden im aktiven Zentrum zu einem Enzym-Substrat-Komplex gebunden. Dies ermöglicht die vereinfachte Umwandlung der Substrate in die Reaktionsprodukte, welche anschließend aus dem Komplex wieder freigesetzt werden. Wie alle Katalysatoren liegt das Enzym nach der Reaktion unverändert, in der Ausgangsform vor. Enzymatische Katalysen verlaufen immer enantioselektiv und sind daher für die asymmetrische Synthese interessant.

Einige Proteine können auch eine enzymatische Funktion zeigen, für die sie nicht vorgesehen sind<sup>[72,73]</sup>. Diese „Promiskuitiven Enzyme“ zeigen einen katalytischen Effekt für eine Vielzahl von Reaktionen. Ein Beispiel dafür ist die Esterasefunktion von Serum Albumin<sup>[74]</sup>. Da im Falle des Albumins die Turnover-Rate der Esterhydrolyse sehr gering ist, spricht man von einer nur esteraseähnlichen Aktivität.

## 1.6.2. Albumin

Albumin stellt mit 60 Gewichtsprozenten neben Globulin das wichtigste Protein im Blutplasma dar. Es zählt zur Gruppe der Globulär- oder Sphäroproteine, welche eine kugelförmige oder ellipsoide Tertiärstruktur aufweisen. Eine hohe Wasserlöslichkeit ist darin begründet, dass bei ausgebildeter Tertiärstruktur polare Seitenketten nach außen und unpolare Seitenketten nach innen gerichtet sind. Im Blut eines erwachsenen Menschen findet man pro Liter 35-55 g Albumin (Humanes Serum Albumin, HSA)<sup>[75]</sup>.

Die Funktion des Albumins besteht in der Aufrechterhaltung des kolloid-osmotischen Drucks im Blutplasma durch Bindung von Wasser in der Blutbahn. Das Protein ist aufgrund seiner Größe nicht in der Lage die Kapillarwände zu passieren, sodass der Anteil an Makromolekülen hier höher ist als in angrenzendem Gewebe oder in Zellzwischenräumen. Als Folge wird ein unkontrolliertes Durchtreten von Wasser durch Membranen verhindert. Durch die ampholyte Eigenschaft, sowohl Anionen wie auch Kationen reversibel zu binden, wirkt Albumin als Puffer des pH-Wertes im Blut. Darüber hinaus ermöglicht es den Transport von hydrophoben Stoffen wie Fettsäuren, Hormonen, Vitaminen oder auch Pharmaka im Kreislauf und ist somit maßgeblich an deren Wirkung beteiligt.

Da sich die Albumine von verschiedenen Säugetierspezies nicht stark unterscheiden verwendet man für Experimente üblicherweise das als Nebenprodukt der Rindfleischindustrie anfallende Bovine Serum Albumin. BSA wird aus einer Kette von 607 Aminosäuren mit 17 Disulfidbrücken aufgebaut und besitzt eine molare Masse von 69323 g/mol. Die Gewinnung erfolgt in einer fünfstufigen fraktionierten Trennung des Blutplasmas nach Cohn<sup>[76]</sup>. Dabei werden unterschiedliche physikalische und chemische Eigenschaften ausgenutzt um die einzelnen Bestandteile des Plasmas voneinander zu trennen u.a. pH-Wert, Salzkonzentration, Temperatur und Proteinkonzentration. In Fraktion I wird zum Großteil Fibrinogen vom Serum abgetrennt, in Fraktion II  $\gamma$ -Globulin, in Fraktion III  $\beta$ -Globulin, in Fraktion IV  $\alpha$ -Globulin und in Fraktion V Albumin. Nach dieser Fraktionierungsmethode wird Albumin auch als Fraktion V bezeichnet.

### 1.6.3. Automatisierung durch Roboter

Kinetische Untersuchungen verlangen ein hohes Maß an Präzision gepaart mit einer hohen Geschwindigkeit der Probenvorbereitung. Eine Möglichkeit für die Durchführung einer großen Zahl an kinetischen Untersuchungen mit mehreren Komponenten ist die Verwendung eines Roboters. Dieser bereitet Proben mit einer höheren Geschwindigkeit und Zuverlässigkeit vor, als ein menschlicher Experimentator.

Die Ansprüche an Untersuchungen von Enzymaktivitäten in unterschiedlichen chemischen Umgebungen bestehen vor allem in vielen simultanen Messungen, die auch im Mikromaßstab reproduzierbare Ergebnisse liefern müssen. Auch hier bietet sich die Verwendung eines Roboters zur Probenvorbereitung und zur Reaktionskontrolle an. Ein geeignetes Modell ist der Pipettierroboter Tecan Genesis Workstation 150 (Abbildung 45), der aus Stammlösungen verschieden gewünschte Mischungen nach vorgegebenem Protokoll erstellt. Der Reaktionsverlauf wird mit einem Tecan SpectraFluor UV und Fluoreszenzmessgerät kontrolliert, welches gleichzeitig 96 Kinetiken verfolgen kann.



**Abbildung 45:** Pipettierroboter Genesis Workstation 150 der Firma Tecan

## 2. Zielsetzung

Ziel der Arbeit war die Synthese von Derivaten der Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescein und Rhodamin und deren Anwendung als Molekulare Sonden für bioanalytische oder biologische Fragestellungen, einschließlich des zellulären Imagings. Es sollte eine Art „Baukastensystem“ entwickelt werden, das über einfache einstufige Verknüpfungsreaktionen die Kopplung funktioneller Bausteine an Farbstoffe mit geeigneten photophysikalischen Eigenschaften ermöglicht. Von Interesse waren u.a. Systeme, die auf biologische Spurenmetalle wie  $\text{Cu}^{2+}$  ansprechen, biologische Redoxpotentiale anzeigen oder ungewöhnliche Verteilungsmuster und starke Anreicherungen in lebenden Zellen zeigen.

### 3. Dipicolinoylfluorescein als fluorogene Sonde für $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen

Kupfer ist ein bedeutendes Spurenelement, das im menschlichen Körper in aktiven Zentren vieler Proteine zu finden ist. Ein fehlerhafter Kupferstoffwechsel wird daher mit vielen Krankheiten assoziiert. Neben Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson werden auch prioneninduzierte Krankheiten (wie Spongiforme Enzephalitis) oft mit einer Störung des Kupferstoffwechsels in Verbindung gebracht<sup>[77,78]</sup>. Eine Überwachung der Kupferhomöostase könnte sich als hilfreich für das Verständnis und die Diagnose dieser Krankheiten erweisen.

#### 3.1. Allgemeines

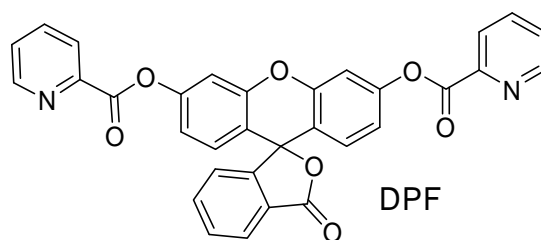


Abbildung 46: Dipicolinoylfluorescein

Dipicolinoylfluorescein (DPF) ist eine weiße kristalline Substanz, welche in Lösung farblos und nicht fluoreszierend ist. Nach kupferkatalysierter Hydrolyse nehmen die Absorption bei 489 nm und die Emission bei 513 nm zu. Während einfache Fluoresceinester wie Diacetylfluorescein bereits seit langem zum fluorometrischen Nachweis einer Esteraseaktivität verwendet werden<sup>[14]</sup>, sind sie nicht in der Lage die Hydrolyseaktivität von Metallionen nachzuweisen, da die Affinität dieser Verbindung für Metalle zu gering ist. Die Eigenschaft von  $\text{Cu}^{2+}$ , Ester mit Ankergruppen wie Pyridin zu hydrolysieren war schon länger bekannt<sup>[79]</sup>, es konnte davon ausgegangen werden, dass ein Picolinsäureester des Fluoresceins empfindlich auf die Anwesenheit von Kupfer reagiert.

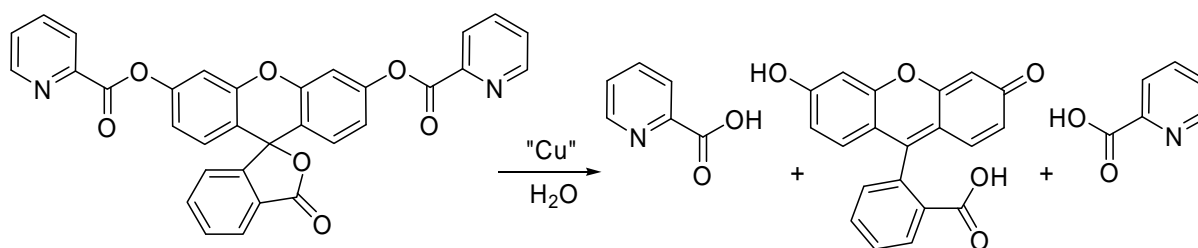


Abbildung 47: Hydrolyse von Dipicolinoylfluorescein durch Kupfer

## 3.2. Synthese

Die Synthese wurde mit Hilfe eines Synthesescreenings auf verschiedene Reaktionsbedingungen wie Temperatur, Lösungsmittel, verwendete Base und Eduktverhältnis getestet (siehe Kapitel 3.3.).

Als ideal erwiesen sich, nach der literaturbekannten Synthese des Picolinoylchlorids **1**<sup>[80]</sup>, die Verhältnisse 10:1 Picolinoylchlorid zu Fluorescein. Dabei wurden Picolinoylchlorid in absolutem DMF und Fluorescein in absolutem Pyridin gelöst, und beide Lösungen wurden vereinigt. Nach beendeter Reaktion ist darauf zu achten, die Reaktionsmischung nicht mit Wasser zu vermischen, um eine vorzeitige Esterspaltung zu vermeiden. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingedunstet und anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt. Nach Umkristallisieren mit Aceton und Hexan erhielt man Dipicolinoylfluorescein **2** (DPF) als weißen kristallinen Feststoff.

## 3.3. Screening der Reaktionsbedingungen für die DPF-Synthese

Da die Synthese des Dipicolinoylfluoresceins nicht nach Standardveresterungsverfahren gelang, mussten geeignete Reaktionsbedingungen gefunden werden, mit denen die Synthese durchführbar war. Dazu wurden verschiedene Screenings durchgeführt. Das letztlich Erfolgreiche wird im folgenden Abschnitt näher beschrieben. Die Synthesen wurden in 1,5 ml Plastikreaktionsgefäßen der Firma Eppendorf durchgeführt. Dazu wurde zu Beginn 8 Stammlösungen der Edukte in verschiedenen Lösungsmitteln und Konzentrationen hergestellt und mit römischen Ziffern nummeriert (Tabelle 3):

Nummer	Konzentration	Substanz	Lösungsmittel
I	0,01 M	Fluorescein	in absolutem DMF
II	0,01 M	Fluorescein	in absolutem Pyridin
III	0,01 M	Fluorescein	in absolutem THF
IV	0,04 M	Fluorescein	in absolutem DMF
V	0,04 M	Fluorescein	in absolutem Pyridin
VI	0,04 M	Fluorescein	in absolutem THF
VII	0,1 M	Picolinoylchlorid	in absolutem Pyridin
VIII	0,1 M	Picolinoylchlorid	in absolutem DMF

**Tabelle 3:** Stammlösungen für das Synthese-Screening

Aus diesen wurden nun jeweils 12 Reaktionslösungen hergestellt. Diese wurden aus je einem Teil Fluoresceinlösung und einem Teil Picolinoylchloridlösung zusammen pipettiert.

Die Lösungen wurden mit den Nummern 1 bis 12 und 1+ bis 12+ gekennzeichnet und bei RT bzw. bei 60 °C gerührt. Die Reaktionslösungen setzten sich wie folgt zusammen:

1 I+VII    3 II+VII    5 III+VII    7 IV+VII    9 V+VII    11 VI+VII  
 2 I+VIII    4 II+VIII    6 III+VIII    8 IV+VIII    10 V+VIII    12 VI+VIII

Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden Proben entnommen und mittels ESI-MS analysiert.

In Tabelle 4 sind die ESI-Massenpeaks nach 48 Stunden zusammengefasst. Mit  $m/z$  sind die jeweiligen Massen-Ladungsverhältnisse und mit I die relative Intensität im Vergleich zu den anderen Peaks dieses Spektrums angegeben, wobei 10 die höchste Intensität markiert. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde das Edukt mit grün ( $m/z = 333$ ), das monofunktionalisierte mit rot ( $m/z = 438$ ) und das difunktionalisierte und gesuchte Produkt mit blau ( $m/z = 543$ ) hervorgehoben.



1		1+		2		2+		3		3+		4		4+		5		5+		6		6+	
m/z	I	m/z	I	m/z	I	m/z	I	m/z	I	m/z	I	m/z	I	m/z	I	m/z	I	m/z	I	m/z	I	m/z	I
333	10	333	10	438	10	394	10	333	10	333	10	543	10	543	10	333	10	333	10	333	10	333	10
262	8	173	2	394	3	438	3	173	2,5	173	2,5	173	0,5	173	1,5	173	2	173	2	438	4,5	394	8
173	2,5	157	0,5	543	min	499	2	157	0,5	157	1	438	0	438	0,2	151	0,5	157	1			632	2
250	1	438	0,1			151	1	438	0									415	0,3			438	0,2
157	0,5					543	min											438	0,2				
438	0,5																						

7		7+		8		8+		9		9+		10		10+		11		11+		12		12+	
m/z	I	m/z	I	m/z	I	m/z	I	m/z	I	m/z	I	m/z	I	m/z	I	m/z	I	m/z	I	m/z	I	m/z	I
333	10	333	10	438	10	333	10	333	10	333	10	438	10	438	10	333	10	394	10	333	10	333	10
173	0,5	173	1,5	394	5,5	173	1	173	0,5	173	1	543	6,5	543	7	173	0,2	438	3	438	5,5	394	9
438	0,1	438	0,5	875	5	157	0,5	438	0,1	157	0,5	875	6	875	5,5	438	0	440	1,5	770	1,5	438	1
		157	0,5	333	3	438	0,5			438	0,1	394	3	394	5,5			333	0,5				
												333	2	333	4,5			831	0,5				
												980	2	980	0,5			543	min				

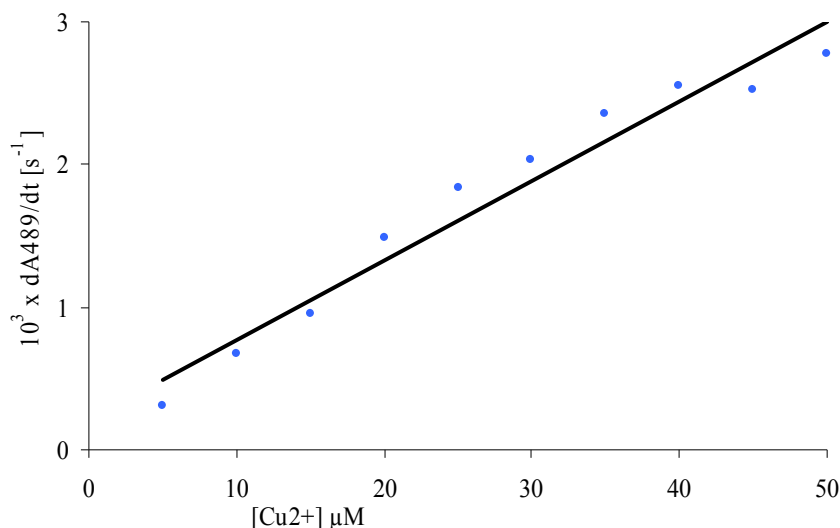
**Tabelle 4:** ESI-MS-Analyse des Synthescreenings zur DPF-Synthese, Angabe der relative Intensitäten und Hervorhebung von Edukt (grün), Intermediat (rot) und Produkt (blau)

Mit Hilfe dieses Screenings wurden die optimalen Bedingungen für die DPF-Synthese gefunden. Ideal ist eine Mischung ein Verhältnis von Picolinoylchlorid:Fluorescein von 10:1, wobei das Picolinoylchlorid in absolutem DMF und das Fluorescein in absolutem Pyridin gelöst ist. Die Temperatur hat keinen Einfluss auf das Produkt/Eduktverhältnis.

### 3.4. Hydrolyse

Für die Hydrolyseexperimente wurde eine 10 mM Lösung des Farbstoffs in DMSO hergestellt und anschließend mit Wasser auf 10  $\mu$ M verdünnt. Als Puffer diente 10 mM MOPS bei pH 7. Die Zunahme der Absorption wurde bei 489 nm bzw. der Emission bei 513 nm gemessen.

Um die intensive Absorption und Fluoreszenz von Fluorescein zu beobachten, müssen beide Esterbindungen von **2** gespalten werden. In enzymatischen Assays wird der Einfluss des monosubstituierten Intermediates oftmals vernachlässigt. Eine genauere Untersuchung der zweistufigen Hydrolyse<sup>[81]</sup> hat ergeben, dass bei der Hydrolyse eine signifikante Konzentration von Monoacetylfluorescein entsteht, welche jedoch aufgrund der niedrigen Absorption und Fluoreszenz einen sehr geringen Einfluss auf die zeitlichen Absorptions- und Fluoreszenzänderung hat. Aus diesem Grunde wurde die Analyse der Kinetiken dahingehend vereinfacht, dass man die Bildung des Monoacetylfluoresceins vernachlässigt, zumal in erster Linie die Hydrolysegeschwindigkeiten der Umsetzung interessierten.

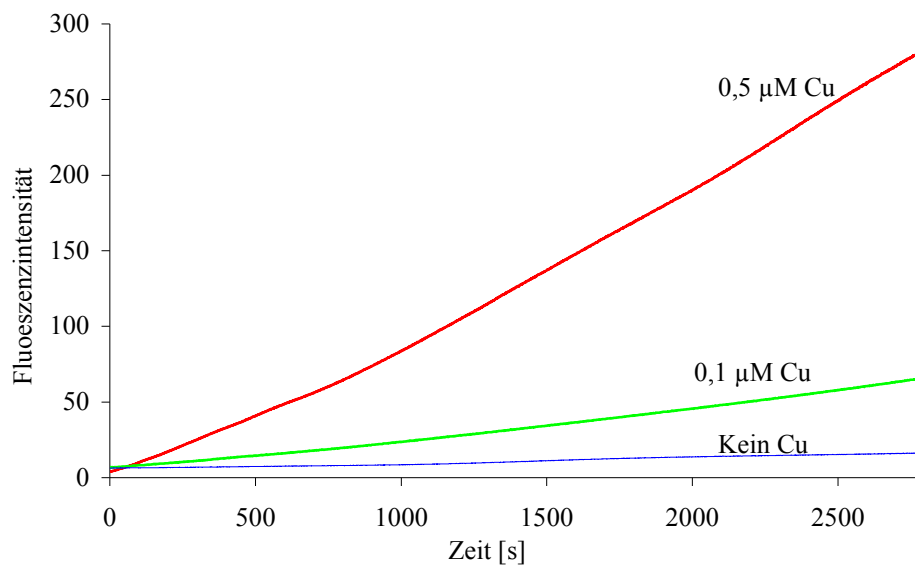


**Abbildung 48:** Hydrolyse von **2** (10 μM in H<sub>2</sub>O), Zunahme der Absorption bei 489 nm in Abhängigkeit von der CuSO<sub>4</sub> Konzentration, T = 25 °C, pH = 7,0 (Puffer: 10 mM MOPS).

Durch Zugabe von Kupfer wird die Hydrolyse von **2** stark beschleunigt. In Abbildung 48 sind die Hydrolysegeschwindigkeiten in Abhängigkeit der Kupferkonzentrationen dargestellt. Man sieht einen linearen Anstieg der Hydrolysegeschwindigkeit. Bei höheren Temperaturen nimmt sowohl die Hydrolyse- als auch die Hintergrundgeschwindigkeit zu (Faktor 2 pro 10 °C).

Bei Cu<sup>2+</sup>-Konzentrationen über 50 μM ist die Hydrolyse zu schnell, um durch Standard-Photometrie bestimmt zu werden. Die lineare Zunahme der Geschwindigkeit indiziert, dass die Koordinationsstellen von DPF nicht gesättigt sind und dass die Wechselwirkung mit dem Metall eher schwach ist. Die Bildungskonstanten des 1:1 Komplexes von **2** mit Cu werden im Bereich von lgK = 2 bis 3 erwartet. (Bildungskonstante des 1:1 Komplexes von Kupfer mit 2-Acetylpyridin: lgK = 2,9<sup>[82]</sup>, von 2-Pyridincarboxamid: lgK = 2,9<sup>[83]</sup> und von 2-Pyridincarboxaldehyd: lgK = 2,7<sup>[84]</sup>).

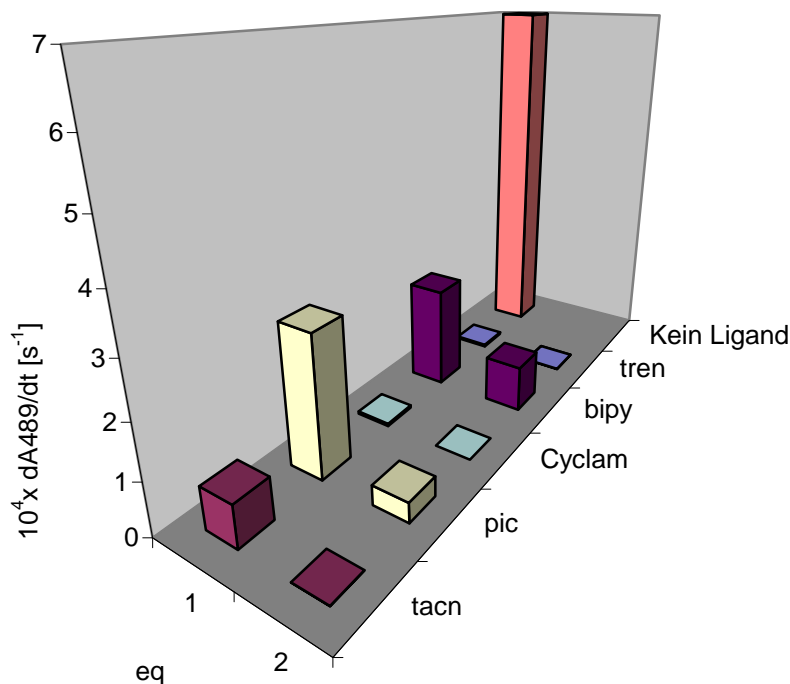
Bei Cu<sup>2+</sup>-Konzentrationen kleiner als 1 μM wird die Hydrolyse langsamer und schwerer detektierbar. Um die Hydrolyse trotzdem messen zu können senkt man die DPF Konzentration ebenfalls auf einen niedrigeren Wert, minimiert dadurch die Hintergrundhydrolyse-reaktion und misst die Kinetik über die Zunahme der Fluoreszenz.



**Abbildung 49:** Hydrolyse von **2** (1 μM in H<sub>2</sub>O), Zunahme der Fluoreszenzintensität in An- oder Abwesenheit von CuSO<sub>4</sub>, Anregung bei 489 nm, Emission bei 513 nm, T = 25 °C, pH = 7,0 (Puffer: 10 mM MOPS).

Abbildung 49 stellt die Zunahme der Fluoreszenz durch Kupfer in niedrigeren Konzentrationen dar. Die drei Kurven zeigen die Veränderung der Fluoreszenz bei Zugabe von 0,5 μM Kupfer, 0,1 μM Kupfer und bei Abwesenheit von Kupfer.

Die Esteraseaktivität von Kupferkomplexen wurde ebenfalls untersucht. Verwendet wurden bidentate Liganden wie 2,2'-Bipyridin (bipy) und Picolinsäure (pic), tridentate wie 1,4,7-Triazacyclononan (tacn), tetradentate wie 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecane (Cyclam) und Tris(-aminoethyl)-amin (tren) Liganden.

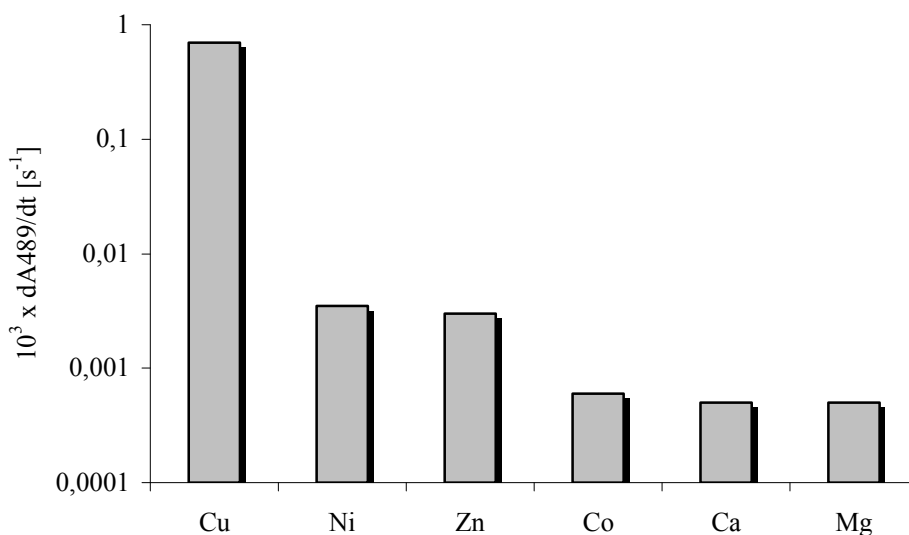


**Abbildung 50:** Hydrolyse von **2** (10  $\mu\text{M}$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ), Vergleich der Esteraseaktivität von freien  $\text{Cu}^{2+}$  Ionen und verschiedenen  $\text{Cu}^{2+}$  Komplexen mit einem 1:1 und 1:2 Metall zu Ligand Verhältnis,  $[\text{Cu}^{2+}] = 10 \mu\text{M}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7,0$  (Puffer: 10 mM MOPS).

Aus Kristallstrukturen von 1:1 Kupferkomplexen<sup>[85]</sup> von bipy, pic und tacn geht hervor, dass zwei der äquatorialen Koordinationsstellen besetzt sind und die zwei verbliebenen, cis-orientierten äquatorialen Koordinationsstellen für das Binden von Coliganden frei sind. Die 1:1 Komplexe dieser Liganden zeigen eine signifikante Esteraseaktivität, die jedoch etwas niedriger ist als die der freien Kupferionen. Die Bildungskonstanten  $\lg K$  aller 1:1 Komplexe sind bei  $\text{pH} = 7$  größer als 8, was bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  auf eine quantitative Komplexbildung hinweist. Bei Zugabe des Liganden im Überschuss werden die 2:1 Komplexe gebildet und alle vier äquatorialen Positionen blockiert, wodurch es zu einer Verringerung der Esteraseaktivität kommt. Im Falle von tacn ist die zweite Bildungskonstante drei Größenordnungen kleiner als die erste, reicht aber immer noch zu einer quantitativen Bildung des 2:1 Komplexes<sup>[86]</sup>. Im Falle von bipy und pic ist die Bildung des 2:1 Komplexes bei 10  $\mu\text{M}$  Konzentration aufgrund der niedrigen Bildungskonstanten ( $\lg K = 5,3$  für  $\text{Cu}(\text{bipy})$  und  $\text{bipy}$ <sup>[87]</sup> und  $\lg K = 6,9$  für  $\text{Cu}(\text{pic})$  und  $\text{pic}$ <sup>[88]</sup>) nicht vollständig. Wenn die Konzentration von pic bzw. von bipy weiter erhöht wird, wird das Gleichgewicht in Richtung des inaktiven 2:1 Komplexes verschoben und die Esteraseaktivität sinkt auf den Hintergrundwert ab. Bei der Verwendung hoch effizienter Chelatoren wie Cyclam und tren sind die 1:1 Komplexe inaktiv. Der tetradentate Makrocyclus Cyclam blockiert alle vier äquatorialen Positionen am

Kupfer, tetradentates tren blockiert drei äquatoriale und eine axiale Stelle des Kupfers<sup>[89]</sup>. Da Cu(tren) inaktiv ist, reicht eine freie äquatoriale Koordinationsstelle anscheinend nicht aus, um hydrolytische Wirkung zu zeigen.

Um die Kupferselektivität von DPF neben anderen Metallen zu testen wurde die Hydrolyseaktivität von Cu<sup>2+</sup> mit Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> verglichen. Die Hydrolysegeschwindigkeit ist bei vergleichbaren Bedingungen bei Ni<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup> um den Faktor 200 und bei Co<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> um mehr als den Faktor 500 niedriger als bei Cu<sup>2+</sup>(Abbildung 51). Die hohe Selektivität von DPF ist vermutlich auf eine doppelte Diskriminierung<sup>[90]</sup> zurückzuführen, d.h. Kupfer hat von den untersuchten Metallen sowohl die höchste Bindungsaffinität zum Picolinsäureester als auch die höchste Lewis-Säure Acidität.



**Abbildung 51:** Hydrolyse von **2** (10  $\mu$ M in H<sub>2</sub>O) durch verschiedene bivalente Metall-Ionen, [M<sup>2+</sup>] = 10  $\mu$ M, T = 25 °C, pH = 7,0 (Puffer: 10 mM MOPS).

## 4. Screening von Esteraseaktivitäten mit Diacetylfluorescein

Viele Enzyme, aber auch Proteine ohne Enzymfunktion zeigen katalytische Aktivitäten, die nicht ihrer natürlichen „Bestimmung“ entsprechen. Möglicherweise bergen viele Proteine ein bisher nicht erschlossenes Potential als Katalysatoren für chemische Reaktionen. Beispielsweise wurde für das kommerziell erhältliche Rinderserumalbumin eine - wenn auch schwache - Esteraseaktivität nachgewiesen. Durch den Einsatz chemischer Additive ist die Esteraseaktivität modulierbar. Die durch das Protein geschaffene chirale Umgebung könnten enantioselektive Hydrolysen durchgeführt werden.

### 4.1. Automatisierte Messungen

Die Vielzahl an Messungen erforderte den Einsatz eines Roboters, hier den Pipettierroboter Tecan Genesis Workstation 150, zur Vorbereitung der Messungen. Der Pipettierroboter hat acht einzeln ansprechbare Pipettenspitzen mit einem Volumen von jeweils 990 $\mu$ l. Die Stammlösungen für die Experimente werden in 100 ml Vorratsgefäße (für alle acht Pipettenspitzen) oder in 10 ml Reagenzgläsern (für eine Spitze) vorgelegt. Der Roboter kann im Regelbetrieb bis zu 9 Tröge und 96 Reagenzgläser verwalten. Als Vorlage dienen drei 96-well-Mikrotiterplatten.

Die Überprüfung des Reaktionsverlaufs erfolgt mit einem Tecan SpectraFluor UV und Fluoreszenzmessgerät, welches 96 Kinetiken gleichzeitig verfolgen kann.

## 4.2. Esteraseaktivität von BSA

Ziel der im Folgenden beschriebenen Untersuchung war, die Esteraseaktivität durch potentielle katalytische Cofaktoren wie Metallionen zu steigern, so dass an einen praktischen Einsatz als Katalysator z.B. für enantioselektive Esterhydrolysen gedacht werden kann.

BSA katalysiert die hydrolytische Spaltung von Nicotinsäureestern<sup>[74]</sup>. Diese Esteraseaktivität kann auch bei diversen anderen Substraten beobachtet werden. Um die Parameter der Esteraseaktivität zu untersuchen wurde das literaturbekannte Diacetylfluorescein **3** (DAF) dargestellt<sup>[13,14]</sup>, um einen Chromatographieschritt ergänzt und als Substrat eingesetzt. Die Experimente wurden immer in Wasser durchgeführt.

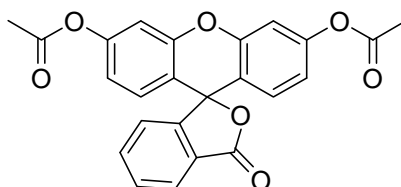


Abbildung 52: Diacetylfluorescein **3** (DAF)

**3** bildet farblose Lösungen, die bei pH 7 stabil sind. Im Gegensatz zu Dipicolinoylfluorescein wird es nicht durch lewissaure Metalle gespalten und verursacht daher in Metallsalzlösungen wenig Hintergrund. Nach Hydrolyse des Esters durch BSA zeigt die Lösung die für die Fluorescein typische Färbung und Fluoreszenz (Abbildung 53).

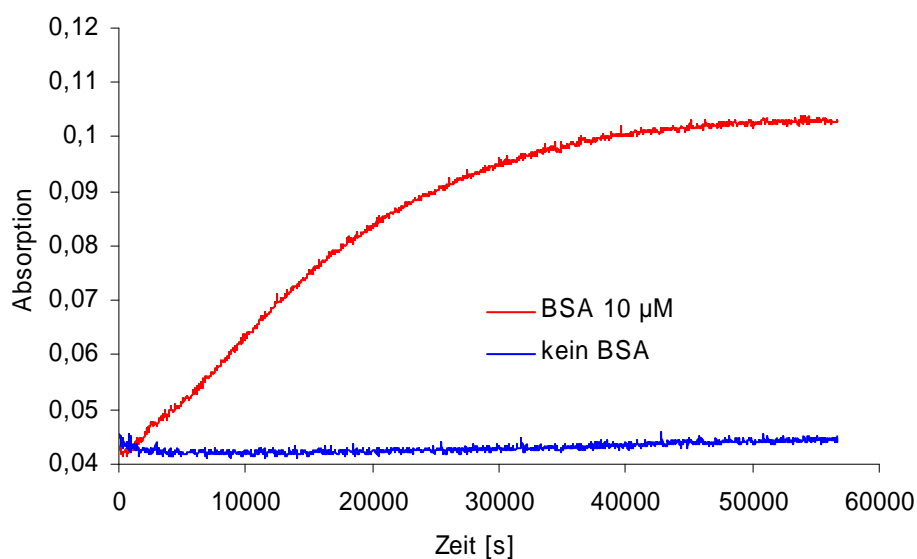
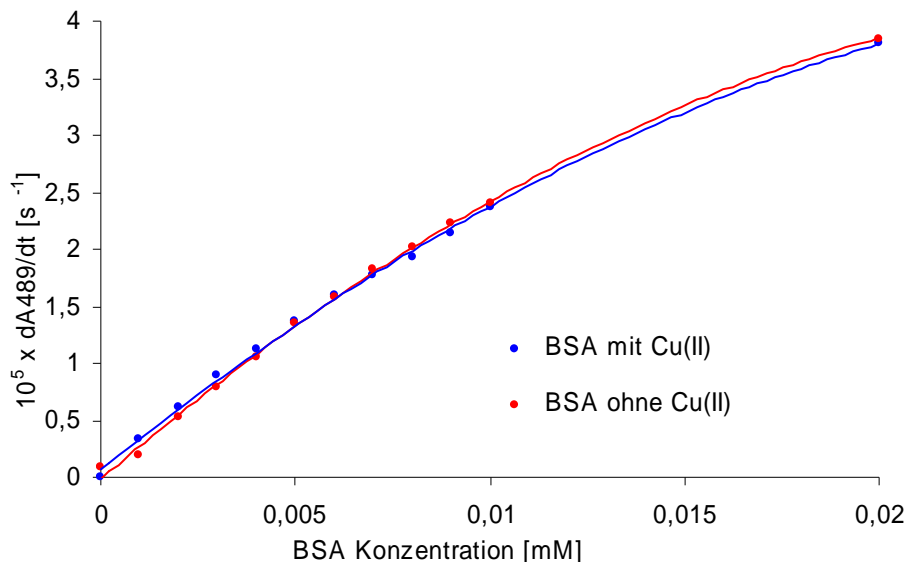


Abbildung 53: Hydrolyse von **3** [10 µM] durch BSA [10 µM] (blau), Kontrollwert DAF ohne BSA (rot), pH = 7, Puffer = 10 mM MOPS

In Abbildung 53 ist die Hydrolyse von DAF durch BSA beschrieben (blau). Als Referenz wurde eine Farbstofflösung ohne BSA untersucht (rot). Um das DAF in Lösung zu halten, wurde Natriumdodecylsulfat als Lösungsvermittler dazugegeben. Da BSA selbst auch als Lösungsvermittler fungiert ist die Zugabe von NDS nur erforderlich, wenn kein BSA zugegeben wird.



**Abbildung 54:** Hydrolysegeschwindigkeit von **3** [ $10 \mu\text{M}$ ] in Abhängigkeit der BSA Konzentration, Zusatz von  $10 \mu\text{M Cu}^{2+}$  (blau) und kupferfreier Verlauf (rot),  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7,0$  (Puffer:  $10 \text{ mM MOPS}$ ).

In Abbildung 54 wird die Hydrolysegeschwindigkeit in Abhängigkeit der BSA Konzentration untersucht. Dabei wurden von 0,1 bis 2 Äquivalente BSA (im Verhältnis zur DAF Konzentration) verwendet. Die Hydrolysegeschwindigkeiten wurden in An- und Abwesenheit von einem Äquivalent Kupfer durchgeführt.

### 4.3. Einflüsse auf die Aktivität

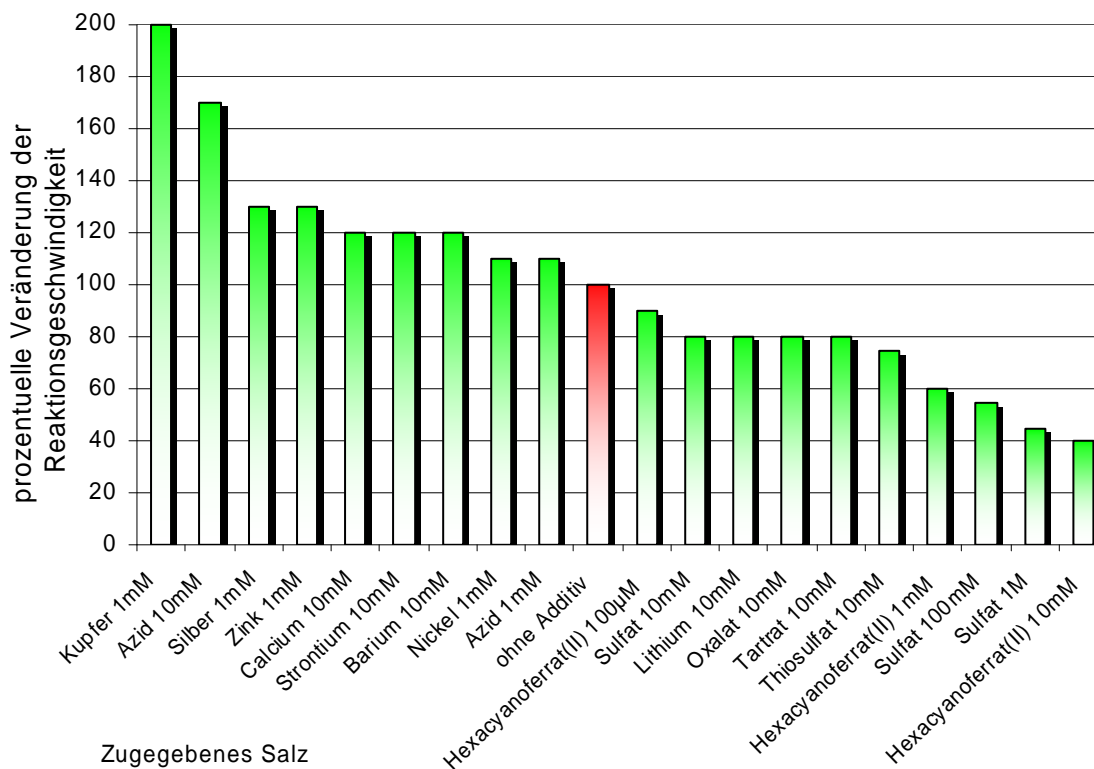
Um die Esteraseaktivität von BSA zu modulieren, wurde der Einfluss einer Vielzahl chemischer Additive auf die Hydrolyseaktivität untersucht. Die BSA Konzentration wurde für alle Messungen auf  $10 \mu\text{M}$  eingestellt. Als Puffer wurde  $10 \text{ mM MOPS}$  verwendet.

Die angegebenen Werte sind ein Mittel aus 4 Messungen. Der Fehler lag bei unter 10 % der Abweichung. Die verwendeten Additive wurden in den Konzentrationen  $10 \mu\text{M}$  (1 Äquivalent),  $100 \mu\text{M}$  (10 Äquivalente),  $1 \text{ mM}$  (100 Äquivalente) und  $10 \text{ mM}$  (1000 Äquivalente) zugegeben.



Als Additive wurden verwendet:

1. Alkalimetalle: Lithiumsulfat, Natriumsulfat, Kaliumsulfat
2. Erdalkalimetalle: Calciumchlorid, Strontiumchlorid, Bariumchlorid
3. Hauptgruppenmetall: Aluminiumsulfat, Bleichlorid
4. Übergangsmetalle: Kupfersulfat, Nickelchlorid, Silbernitrat, Zinksulfat
5. Anionen: Natriumazid, Kaliumnatriumtartrat, Natriumnitrat, Natriumoxalat, Natriumthiocyanat, Natriumthiosulfat, Natriumchlorid
6. Komplexe: Kaliumhexacyanoferrat(II), Kaliumhexacyanoferrat(III)



**Abbildung 55:** Veränderung der Hydrolysegeschwindigkeiten von **3** durch BSA in Abhängigkeit von chemischen Additiven, prozentuale Angabe im Vergleich zur Reaktion ohne Additive

Aus der Gruppe der Alkalimetalle wurde erst beim Einsatz von 1000 eq Additiv in allen 3 Fällen eine deutliche Inhibierung (auf ca. 80 %) der Hydrolysegeschwindigkeit festgestellt. Gegenkontrollen mit Lithium-, Natrium-, und Kaliumchlorid zeigten bei den gleichen Bedingungen keine Inhibierung. Die Inhibierung wurde demzufolge auf das Sulfat zurückgeführt. Aus diesem Grund wurde die Inhibierung der Esterhydrolyse durch Natriumsulfat zusätzlich in 100mM und 1M Sulfat Konzentration untersucht.

Bei den Erdalkalimetallen sah man bei Zugabe von 1000 eq Calcium, Strontium und Barium eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit um 20 %. Bei der Zugabe der Übergangsmetalle sah man bei allen untersuchten eine Zunahme der Hydrolyseaktivität. Am stärksten ausgeprägt war diese Eigenschaft bei Kupfer. Bei Zugabe von 100 eq Kupfersalz war die Hydrolysegeschwindigkeit doppelt so hoch. Silbernitrat und Zinksulfat zeigten beide eine Beschleunigung im Bereich von 30 %. 100 eq Nickelchlorid zeigten eine nur geringe Beschleunigung von ca. 10 %. Der Einsatz von 1000 eq ergab bei den Übergangsmetallen ebenfalls einen Niederschlag.

Bei der Verwendung von Anionen als Additive erwies sich das Azid als das Potenteste. Eine Zugabe von 100 eq Azid erhöhte die Hydrolysegeschwindigkeit um 10 %, bei 1000 eq sogar um 70 %. Eine leichte inhibitorische Wirkung zeigte, wie bereits erwähnt, das Sulfat. Bei Zugabe von 1000 eq Sulfat sank die Hydrolysegeschwindigkeit um 20 %. Einen Effekt in der gleichen Größenordnung zeigten auch die Anionen Oxalat und Tartrat.

Einen sehr deutlichen Effekt zeigten das rote und das gelbe Blutlaugensalz. 10 eq Komplex inhibierten die Hydrolyse bereits um 10 %. Die Zugabe von 100 und 1000 eq senkten die Hydrolysegeschwindigkeit um 40 % bzw. 60 %.

Keinen Einfluss auf die Hydrolysegeschwindigkeit zeigten:

- Alkalimetallsalze in Konzentrationen von 10 $\mu$ M bis 10mM.
- Erdalkalimetallsalze in Konzentrationen von 10 $\mu$ M bis 1mM.
- Aluminium und Bleisalze in Konzentrationen bis 10 $\mu$ M bis 1mM (10mM Lösungen zeigten einen Niederschlag).
- Kupfer-, Nickel-, Silber- und Zinksalze in Konzentrationen von 10 $\mu$ M bis 100 $\mu$ M (10mM Lösungen zeigten einen Niederschlag).
- Natriumazid in Konzentrationen von 10 $\mu$ M bis 100 $\mu$ M.
- Kaliumnatriumtartrat, Natriumthiosulfat und Natriumoxalat in Konzentrationen von 10 $\mu$ M bis 1mM.
- Natriumnitrat, Natriumthiocyanat und Natriumchlorid in Konzentrationen von 10 $\mu$ M bis 10mM.

Fazit: Metallionen als Cofaktoren können die Esteraseaktivität von BSA zwar um Faktor zwei, aber nicht dramatisch steigern.

## 5. Synthese und Eigenschaften modifizierter Xanthenfarbstoffe

Rhodamine zeigen ein breites Spektrum von Anwendungen. Durch hohe Extinktionskoeffizienten, hohe Quantenausbeuten und gute Photostabilitäten sind sie als Laserfarbstoffe oder für die Fluoreszenzmikroskopie besonders geeignet. Rhodamin B ist ein violetter Farbstoff mit einer starken orangefarbenen Fluoreszenz. Sein günstiger Preis und die guten optischen Eigenschaften machen Rhodamin B zu einem idealen Baustein für chemische Funktionalisierungen. Rhodamin B ist zwar zellpermeabel, wird aber in der Zelle nicht akkumuliert und zeigt auch keine charakteristische Verteilung in der Zelle. Die Derivatisierung von Rhodamin B verändert die Akkumulation und Distribution. Funktionelle Gruppen können in der Zelle verändert werden, dadurch die Membranpermeabilität verändern und so den Farbstoff in der Zelle oder in bestimmten Bereichen der Zelle festhalten. Durch das Einfügen von reaktiven Gruppen kann der Farbstoff auch kovalent an Proteine oder auch niedermolekulare Verbindungen gekoppelt werden, um Untersuchungen von zellulären und physiologischen Vorgängen durchzuführen.

### 5.1. Synthese von Rhodamin B Piperazinamid

Für die Kopplung der Farbstoffe werden meist aktivierte Ester (siehe 1.4.2.), Maleinimide oder Isothiocyanate (siehe 1.4.1.2.) verwendet.

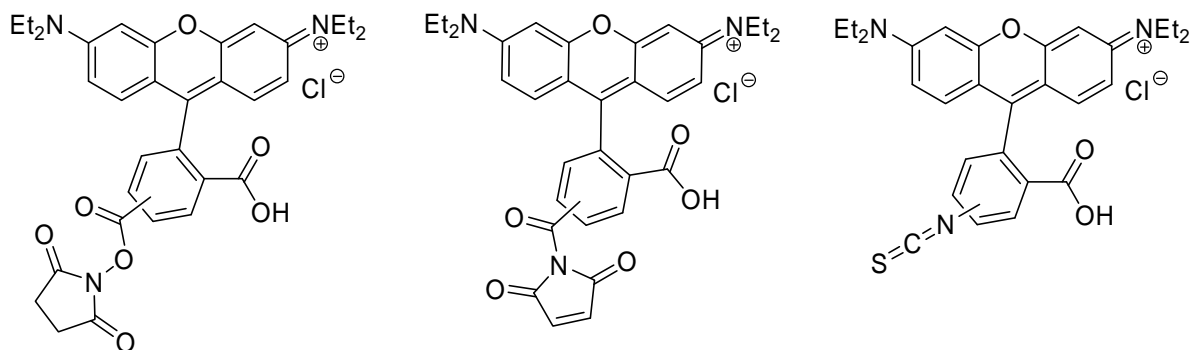


Abbildung 56: Reaktive Rhodamin B Derivate

Diese Substituenten sitzen normalerweise in 5- oder 6- Stellung am Rhodamin. Meist wird eine Mischung der beiden Isomere verwendet.

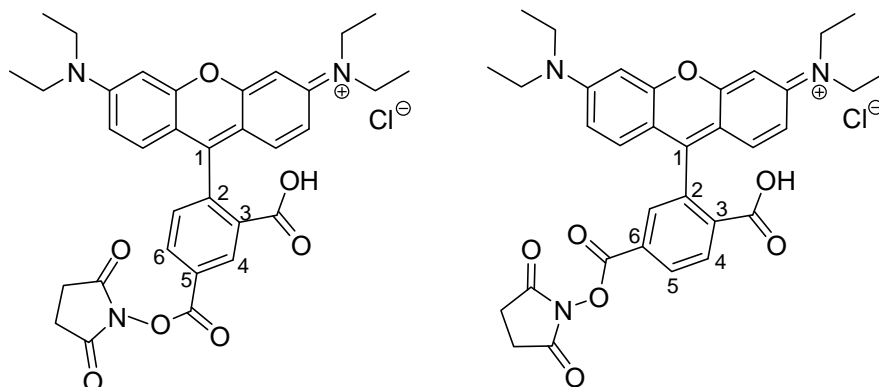


Abbildung 57: Rhodamin B NHS-Ester in 5 und 6 Stellung

Der Substituent in 5- bzw. 6-Stellung muss bereits während der Farbstoffsynthese eingeführt werden. Dabei ist keine Stereoinduktion möglich und es entstehen folglich beide Produkte etwa zu 50 %. Eine Trennung der beiden Isomere ist aufwendig, weswegen oft die Mischungen eingesetzt werden. Eine andere Möglichkeit ist die Funktionalisierung der Carbonsäurefunktion in 3-Stellung. Hierzu wird beispielsweise die Kopplung nach Weinreb durchgeführt<sup>[68]</sup>. Verwendet man für die Amidkopplung primäre Amine, kann das Produkt allerdings cyclisieren, und solche Rhodamin B Lactame zeigen keine Fluoreszenz<sup>[91]</sup>. Aus diesem Grund ist Piperazin ein geeignetes Substrat, da es ein sekundäres Amid bildet, welches nicht cyclisieren kann<sup>[92]</sup>. Die optischen Eigenschaften des Farbstoffs verändern sich durch diese Substitution nur geringfügig, der Extinktionskoeffizient bleibt gleich, aber die Absorption und die Emission erfahren eine Rotverschiebung von ca. 10 nm und die Quantenausbeute sinkt auf ca. 70 % des Wertes für Rhodamin B ab<sup>[92]</sup>. Aus Rhodamin B wurde im ersten Schritt Rhodamin B Base **4** dargestellt<sup>[92]</sup>. Anschließend wurde daraus Rhodamin B Piperazinamid **5** im Multigramm Maßstab hergestellt<sup>[92]</sup> und für weitere Kopplungen verwendet.

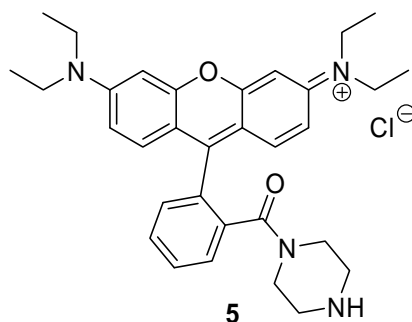


Abbildung 58: Rhodamin B Piperazinamid

## 5.2. N-Acylierung von Rhodamin B-Piperazinamid

Literaturbeschrieben<sup>[92]</sup> war bisher nur die N-Acylierung von Rhodamin B-Piperazinamid mit Anhydriden und Säurechloriden. In einem Synthesescreening wurden verschiedene Methoden getestet, um auch nicht aktivierte Carbonsäuren zu koppeln (siehe Kapitel 1.4.).

Zunächst wurde Rhodamin B Piperazinamid **5** (A) mit Stearinsäure (B) umgesetzt. In Tabelle 5 sind die Äquivalente der eingesetzten Edukte aufgeführt. Die Reaktionen wurden im Milliliter Maßstab in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einem Thermomixer durchgeführt. Die Reaktion erfolgte in 6 Stunden bei Raumtemperatur mit 1 mM Substratkonzentration in absolutem DMF. Als Kopplungsreagenzien wurden Mischungen von DIC (*N,N*-Diisopropylcarbodiimid) oder DCC (*N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid) und DMAP (4-(Di-methylamino)-pyridin) bzw. HOBt (1-Hydroxybenzotriazol) eingesetzt. Als Base wurden 1,5 Äquivalente DIEA (Diisopropylethylamin) zugegeben. Der Verlauf der Reaktion wurde mit ESI-MS verfolgt und die Menge des gebildeten Produktes über das Verhältnis von Edukt- zu Produktpeak geschätzt.

A	B	DIC	DCC	DMAP	HOBt	DIEA	m/z	Produkt %
1	1	1,5		1,5		1,5	778	0
1	1		1,5		1,5	1,5	778	0
1	1		1,5	1,5		1,5	778	0
1	1	2		1,5		1,5	778	0
1	1	2			1,5	1,5	778	2%

**Tabelle 5:** Amidkopplungsscreening 1

Unter diesen Reaktionsbedingungen konnte nur bei einer der Kombinationen eine Spur des Produkts erhalten werden.

In einem zweiten Screening wurden daher die Bedingungen abgewandelt. Die Reaktionsdauer wurde auf 24 h verlängert und es wurden 3 Carbonsäure-Edukte getestet, die Kopplungsreagenzien wurden variiert und die Menge an Carbonsäure wurde von 1 auf 1,1 Äquivalente erhöht (A = Rhodamin B Piperazinamid **5**, B = Stearin-säure, C = Essigsäure, D = Cholsäure).

B	A	DIC	CDI	HBTU	HOBt	DIEA	m/z	Produkt %
1,1	1	1			1	1,2	778	30
1,1	1		1				778	60
1,1	1			1		1,2	778	80
C	A	DIC	CDI	HBTU	HOBt	DIEA	m/z	Produkt %
1,1	1	1			1	1,2	553	42
1,1	1		1				553	75
1,1	1			1		1,2	553	90
D	A	DIC	CDI	HBTU	HOBt	DIEA	m/z	Produkt %
1,1	1	1			1	1,2	901	0,5
1,1	1		1				901	2
1,1	1			1		1,2	901	72

**Tabelle 6:** Amidkopplungsscreening 2

Nach 24 h zeigten sich bei der Kopplung der Essigsäure bereits beachtliche Mengen Produkt, wobei die Kombination von DIC (*N,N*-Diisopropylcarbodiimid) / HOBt (1-Hydroxybenzotriazol) / DIEA (Diisopropylethylamin) sich als vergleichsweise schlecht erwies. Die Kopplung mit CDI (Carbonyldimidazol) verlief besser. Als beste Bedingung erwies sich die Kopplung mit HBTU (*N,N,N',N'*-Tetramethyl-*O*-(Benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphat) / DIEA. Die Kopplung der Stearinsäure verlief im Vergleich zur Essigsäure mit deutlich schlechter Ausbeute. Die Kopplung mit Cholsäure zeigt nur bei der Verwendung von HBTU Produktbildung.

Eine Verbesserung der Reaktivität wurde durch säulenchromatographische Aufreinigung von Rhodamin B Piperazinamid erreicht.

## 5.3. Synthese carboxy- und aminofunktionalisierter Liganden

Zur Synthese metallbindender Farbstoffe musste Rhodamin B Piperazinamid mit z.B. carboxyfunktionalisierten Chelatliganden gekoppelt werden. Untersucht wurden: Terpyridin und Cyclam-Derivate.

### 5.3.1. Terpyridin-Derivate

Die zur Kopplung verwendeten Terpyridine wurden nach zwei verschiedenen Synthesewegen dargestellt, der Synthese nach Hanan<sup>[33]</sup> und der nach Constable<sup>[35]</sup>.

#### 5.3.1.1. 4'-Phenylterpyridin

Bei der Synthese des 4'-(4-Carboxyphenyl)-2,2':6',2''-terpyridin **8** wurde zuerst 4'-(4-Methylphenyl)-2,2':6',2''-terpyridin **6** nach Hanan synthetisiert<sup>[33]</sup>. Die Oxidation der Methylgruppe mit  $\text{KMnO}_4$  blieb allerdings ohne Erfolg. Als Alternativroute wurde nach der gleichen Vorschrift 4'-(4-Cyanophenyl)-2,2':6',2''-terpyridin **7** dargestellt. Die Synthesen der Vorstufen sind nochmals in Kapitel 8.2 erwähnt. Bei der anschließenden Hydrolyse konnte jedoch ebenfalls kein Produkt isoliert werden. Als dritten und letztlich erfolgreichen Syntheseweg wurde eine der obigen Vorschrift analoge direkte Synthese von **8** mit 4-Carboxybenzaldehyd gewählt.

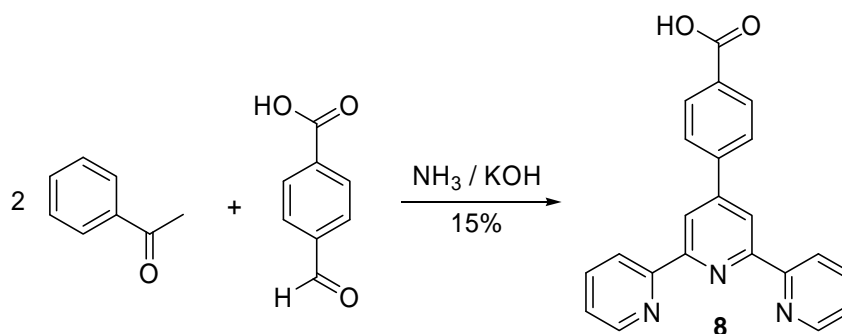


Abbildung 59: Synthese von Terpyridin nach Hanan<sup>[33]</sup>

### 5.3.1.2. 4'-O-Alkylterpyridin

Um die Verbindung zwischen Terpyridin und Farbstoff flexibler zu gestalten, wurde ein aliphatischer Linker verwendet. Die Synthese des hierzu benötigten 4'-Chlor-2,2':6',2''-terpyridin **12** nach Constable<sup>[35]</sup> wurde optimiert. Picolinsäure wurde, wie aus Abbildung 60 ersichtlich, in Ethanol säurekatalytisch zu Ethylpicolinat **9**<sup>[93]</sup> umgesetzt. Dieses wurde mit Aceton und Natriumhydrid in absolutem THF durch eine doppelte Claisen-Esterkondensation zu 1,3-Dipicolinoylacetone **10**<sup>[35]</sup> umgesetzt, welches anschließend in einer Paal-Knorr-Synthese mit Ammoniumacetat cyclisiert wurde. Es bildete sich ein 2,6-Di-(pyridin-2'-yl)-pyridin-4-(1*H*)-on **11**<sup>[35]</sup>. Dieses Pyridon wurde mit Phosphorpentachlorid in Phosphorylchlorid zum 4'-Chlorterpyridin **12**<sup>[35]</sup> umgesetzt. Die Literaturvorschriften lieferten nicht die angegebenen Ausbeuten. Die hier angegebenen Ausbeuten sind die der abgewandelten Vorschriften, die in Kapitel 8.2 beschrieben sind.

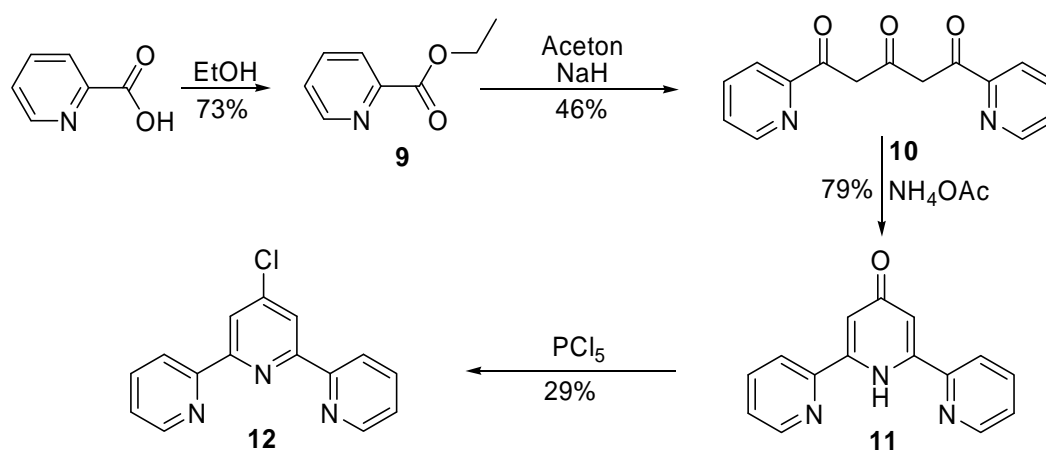


Abbildung 60: Synthese von 4'-Chlorterpyridin<sup>[35]</sup>

Chlorterpyridin wurde anschließend mit  $\epsilon$ -Caprolacton bzw.  $\gamma$ -Butyrolacton in DMSO basenkatalytisch zum Terpyridin-4-yl- $\omega$ -hydroxycarbonsäureether umgesetzt<sup>[37]</sup> (Abbildung 61).

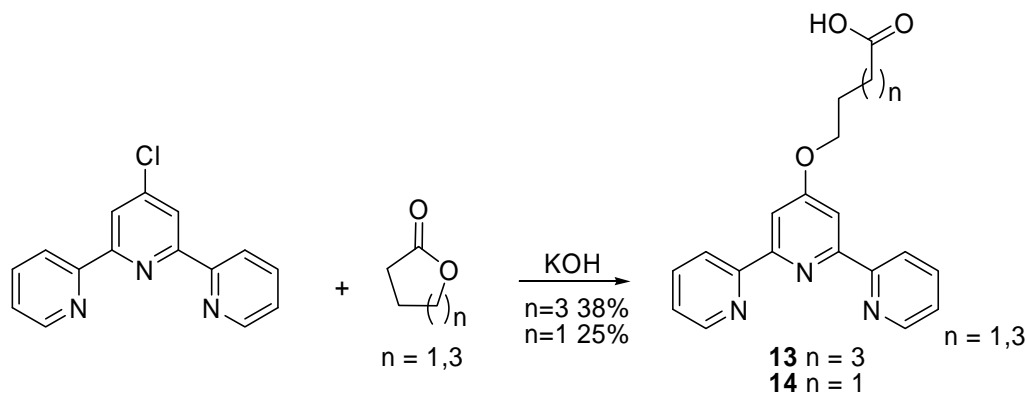


Abbildung 61: Synthese carboxyfunktionalisierter Terpyridine nach der Schubert<sup>[37]</sup>



### 5.3.2. Cyclam-Derivate

Mit dem Ziel der Kopplung an Rhodamin wurde ein amino- und ein carboxyfunctionalisiertes Cyclam dargestellt. Die Herausforderung stellte dabei die Monofunktionalisierung des Cyclams dar, wobei gleichzeitig die Aminogruppen geschützt werden müssen.

Zur Cyclamsynthese wurde zunächst aus 1,2-Dibromethan und aus 1,3-Diaminopropan das 1,5,8,12-Tetraazadodecan **15**<sup>[94]</sup> dargestellt. Dieses wurde mit Hilfe von Nickel in einer Templatreaktion mittels Glyoxal cyclisiert, die gebildeten Iminogruppen mit NaBH<sub>4</sub> reduziert und anschließend das Nickel mit Hilfe von Cyankali wieder entfernt<sup>[44]</sup> (Abbildung 62).

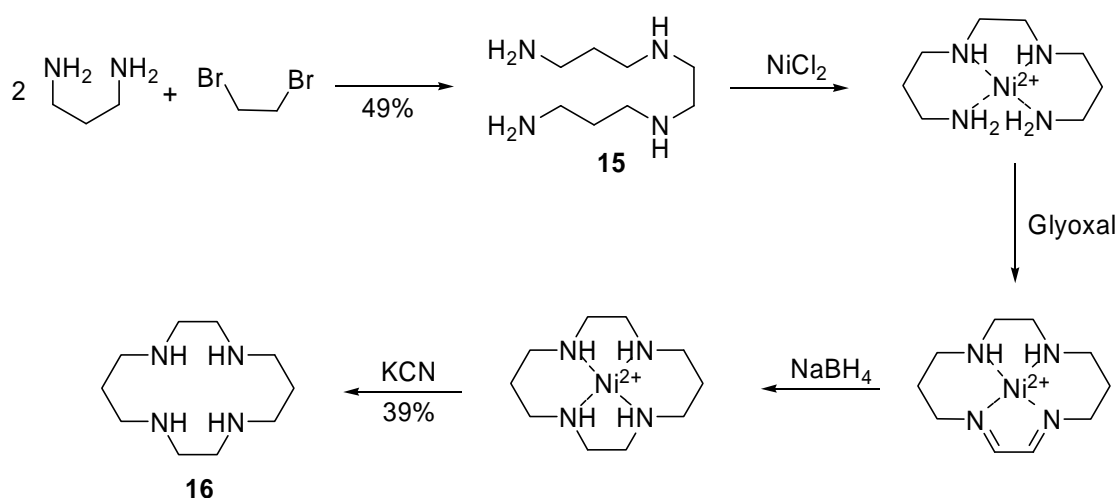


Abbildung 62: Synthese von Cyclam<sup>[44]</sup>

Durch eine Umsetzung mit Trifluoressigsäuremethylester kann Cyclam selektiv an drei Stickstoffen geschützt werden<sup>[46]</sup> (Abbildung 63).

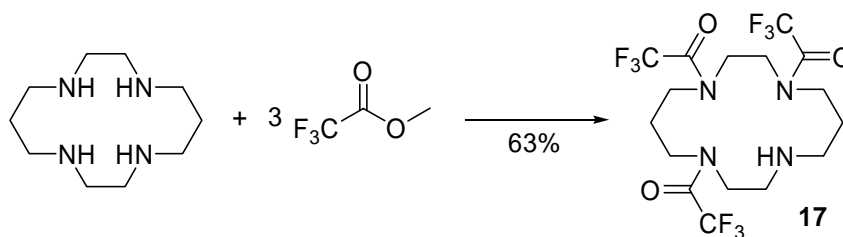
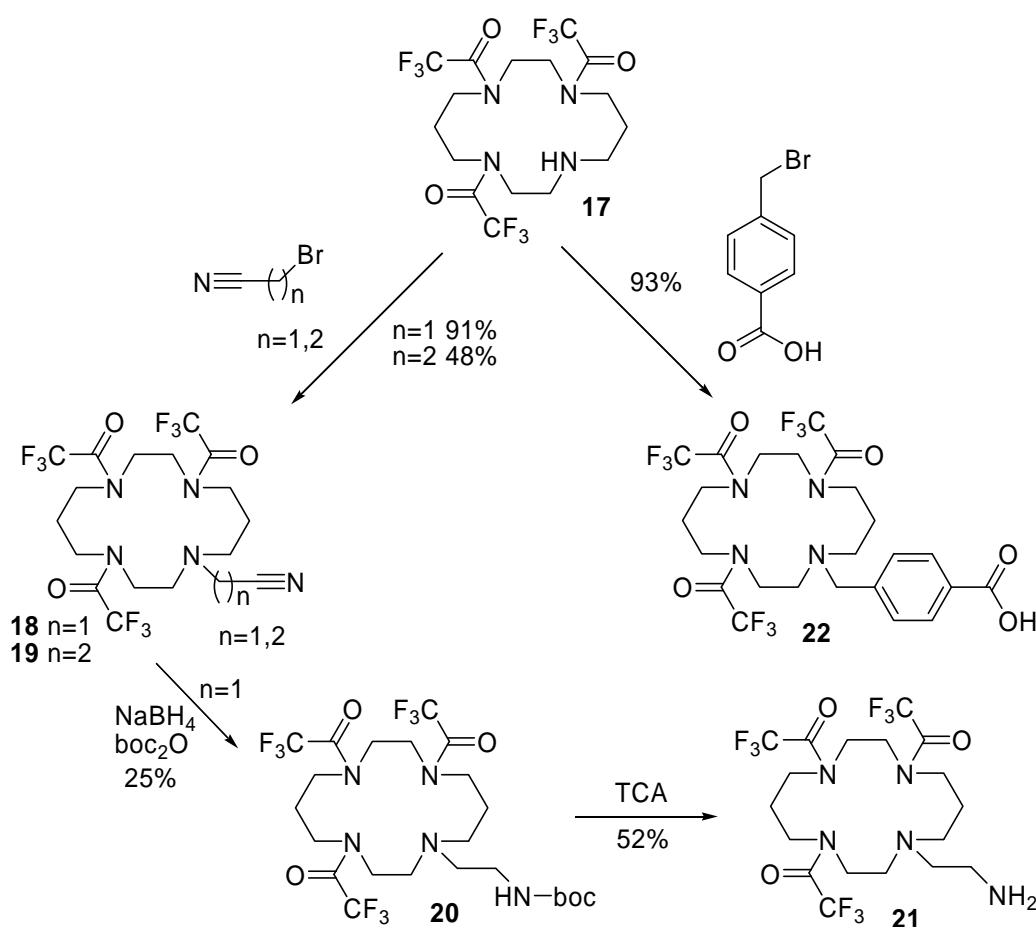


Abbildung 63: Synthese von 1,4,8-Tris-(trifluoroacetyl)-cyclam<sup>[46]</sup>

Eine Acylierung der verbleibenden Aminogruppe ist nur mit reaktiven Carbonsäurederivaten, wie Säurehalogeniden und Säureanhydriden möglich. Als Alternative wurde die Funktionalisierung durch nucleophile Substitution untersucht. Dazu wurde Cyclam mit  $\alpha$ -Brom-4-tolylsäure umgesetzt und die literaturbekannte carboxyfunctionalisierte Verbindung

**22**<sup>[95,96]</sup> erhalten, um ein Cyclam mit Carboxyfunktion darzustellen (Abbildung 64 a). Eine Literatursuche der Synthese von **22** ist nicht bekannt.

Um ein aminofunktionalisiertes Cyclam zu erhalten wurde das tris-TFA geschützte Cyclam mit Bromacetonitril bzw. Brompropionitril umgesetzt. Das Nitril wurde mit NaBH<sub>4</sub> reduziert und dabei mit Di-tert-butylcarbonat boc-geschützt, um eine Dimerisierung zu verhindern. Bei der Reduktion ohne Einführung der Schutzgruppe wurde festgestellt, dass zum Imin partiell reduziertes Nitril mit bereits zum Amin reduzierten Nitril, eine Kondensationsreaktion eingeht. Nach Abspaltung der boc-Schutzgruppe erhielt man das mit einer primären Aminogruppe funktionalisierte Cyclam **21** (Abbildung 64 b).



**Abbildung 64:** Funktionalisierung von Cyclam

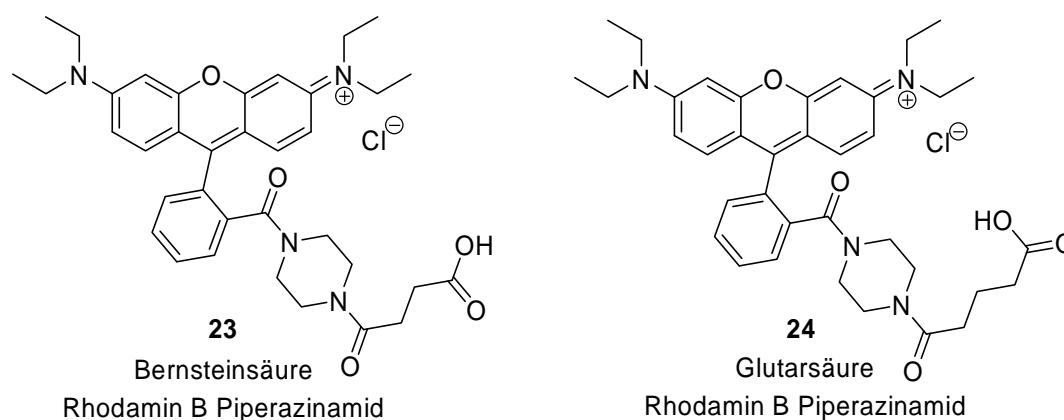
Das aminofunktionalisierte Cyclam **21** konnte jedoch nicht mit Carbonsäuren zu Amiden umgesetzt werden. Weder Rhodamin B Derivate noch 5(6)-Carboxyfluorescein erwiesen sich als reaktiv. Auch einfache Säure wie Essigsäure oder Stearinsäure konnten nicht zur Reaktion gebracht werden. Im Mikroansatz konnte die erfolgreiche Kopplung von Cyclam-Derivat **22** an Rhodamin B Piperazinamid durch hochauflösende Massenspektrometrie (HR-ESI) nachgewiesen werden (siehe Kapitel 5.5).

## 5.4. Funktionalisierung von Rhodamin B

Rhodamin B Piperazinamid wurde mit niedermolekularen Resten, lipophilen Resten, Chelatoren und redoxaktiven Gruppen funktionalisiert.

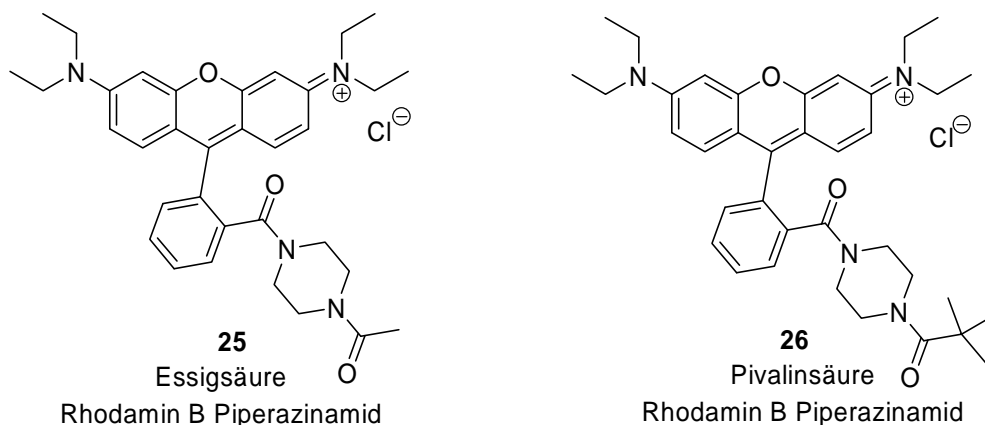
### 5.4.1. Funktionalisierung mit niedermolekularen Resten

Zunächst wurden Carbonsäuren wie Bernsteinsäure, Glutarsäure und Pivalinsäure als intra- oder intermolekulare Anhydride eingesetzt. Essigsäure und 4-Carboxybenzaldehyd wurden als einfache Säuren eingesetzt und mit HBTU gekoppelt. Durch Reaktion von Rhodamin B Piperazinamid mit Bromessigsäuremethylester gelang auch die Einführung einer Carboxyfunktion durch nucleophile Substitution.



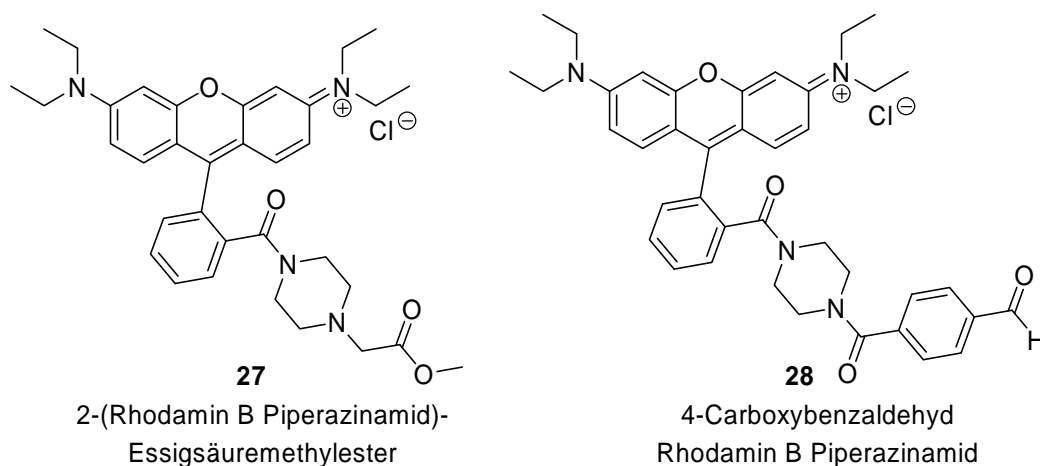
**Abbildung 65:** Bernsteinsäure und Glutarsäurederivate des Rhodamin B Piperazinamids

Die Synthese von **23** erfolgte nach der Vorschrift von Francis<sup>[92]</sup>. Die Synthese von **24** wurde entsprechend durchgeführt. Aufgrund des zwitterionischen Charakters von **23** und **24** konnte eine säulenchromatographische Aufreinigung nicht erfolgreich durchgeführt werden. Die Farbstoffe wurden nach der o.g. Vorschrift durch Extraktion gereinigt.



**Abbildung 66:** Acetyl- und Pivalinoylderivate des Rhodamin B Piperazinamids

**A** wurde durch eine HBTU vermittelte Kopplung von Essigsäure an **5** synthetisiert. **26** wurde durch eine Umsetzung von **5** mit Pivalinsäureanhydrid dargestellt.

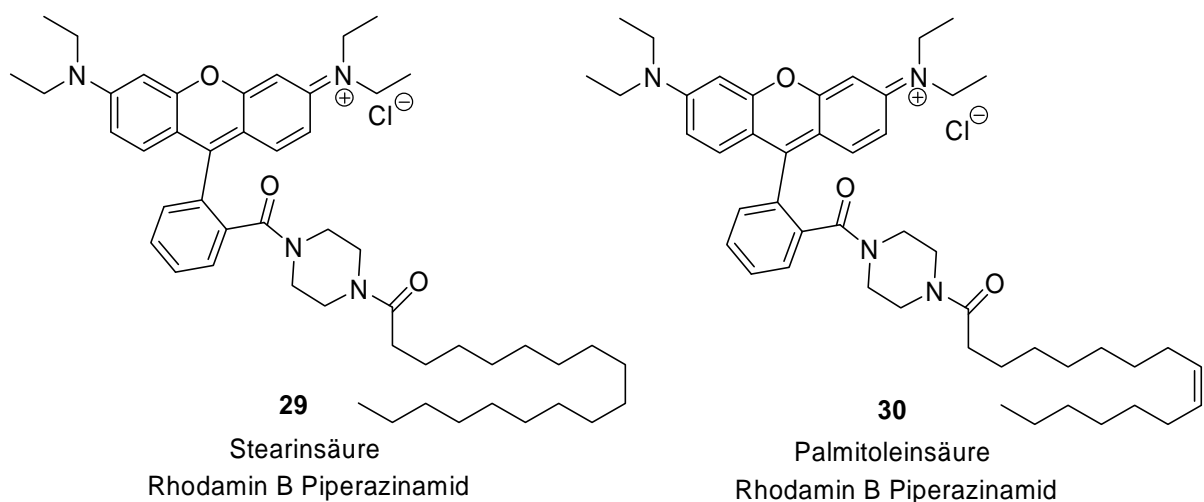


**Abbildung 67:** Methylacetat und 4-Carboxybenzaldehyd-modifiziertes Rhodamin B Piperazinamid

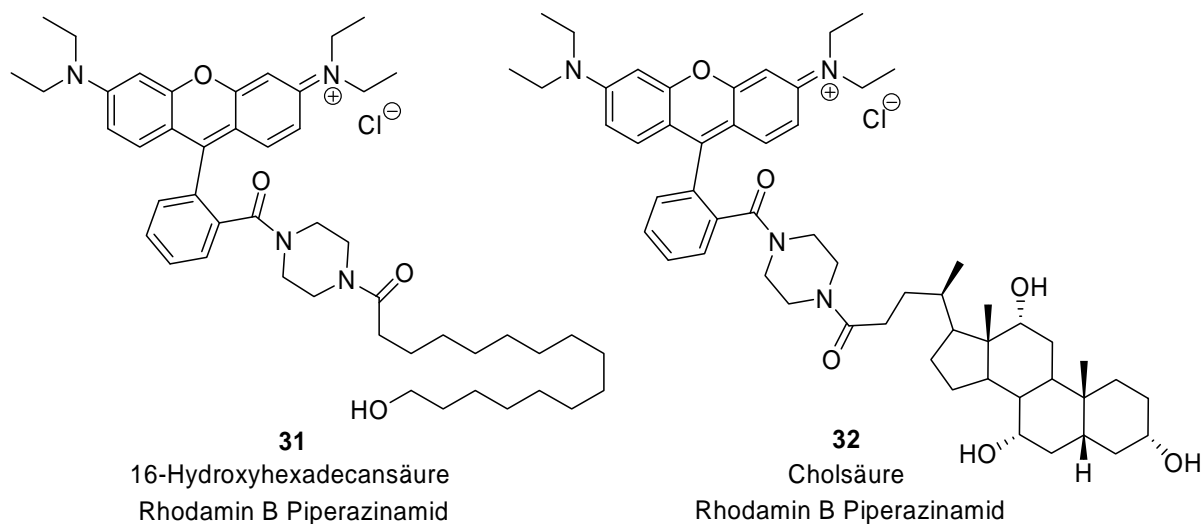
Alternativ kann man Rhodamin B Piperazinamid über eine nucleophile Substitution funktionalisieren. **27** ist durch die Umsetzung von **5** mit Bromessigsäuremethylester zugänglich. Die nucleophile Substitution öffnet ein breites Spektrum an Möglichkeiten für die Funktionalisierung. Das Einführen einer Aldehydgruppe **28** öffnet ein weiteres Spektrum an Funktionalisierungsmöglichkeiten.

## 5.4.2. Funktionalisierung mit lipophilen Resten

Die Kopplung der Fettsäuren Palmitoleinsäure und Stearinsäure erfolgte mit Hilfe von HBTU, ebenso wie die Kopplung von 16-Hydroxydecansäure als Derivat von Palmitinsäure und Cholsäure als Cholesterinderivat.



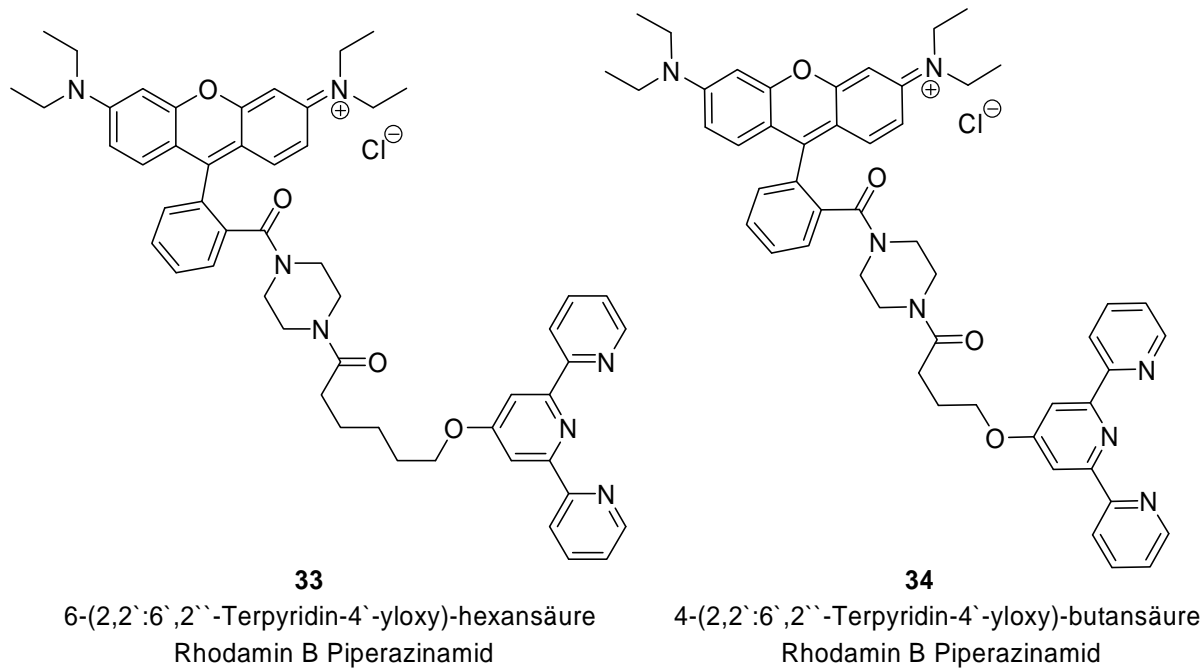
**Abbildung 68:** Mit Fettsäuren funktionalisiertes Rhodamin B Piperazinamid



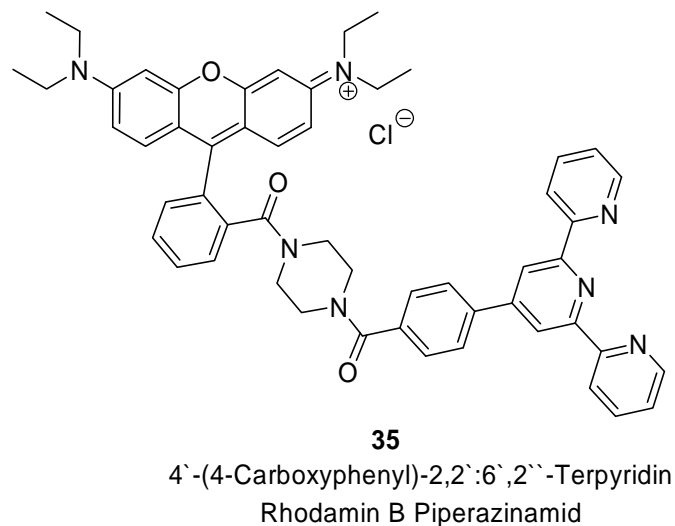
**Abbildung 69:** Rhodamin B Piperazinamid funktionalisiert mit Fettsäurederivaten

### 5.4.3. Funktionalisierung mit Chelatliganden

Die Kopplung der funktionalisierten Terpyridine wurde mit Hilfe von HBTU durchgeführt.



**Abbildung 70:** Aliphatisch verbrückte Terpyridin-Rhodamin B Derivate

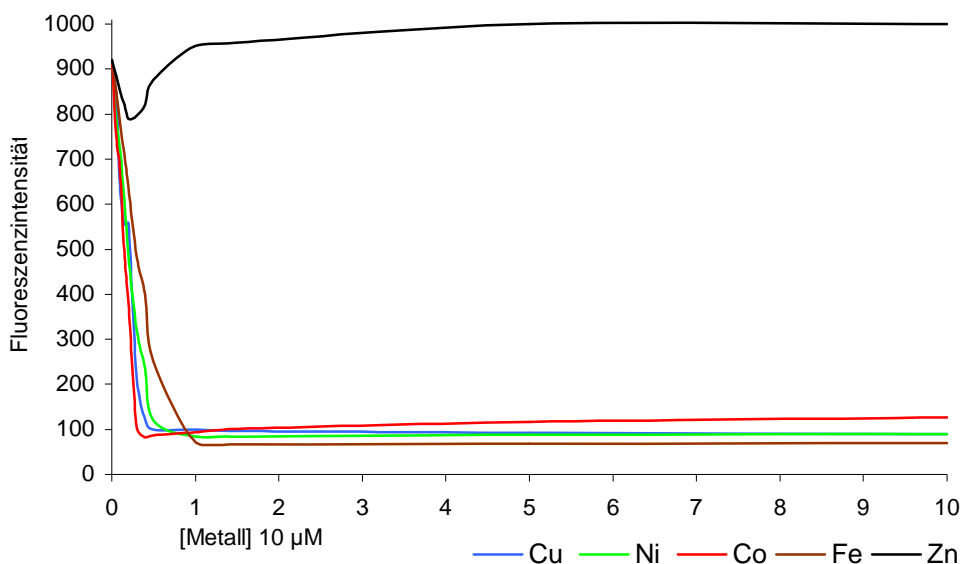


**Abbildung 71:** Aromatisch verbrücktes Terpyridin-Rhodamin B Derivat

#### 5.4.4. Fluoreszenzlöschung der chelatfunktionalisierten Rhodamine durch Metallionen

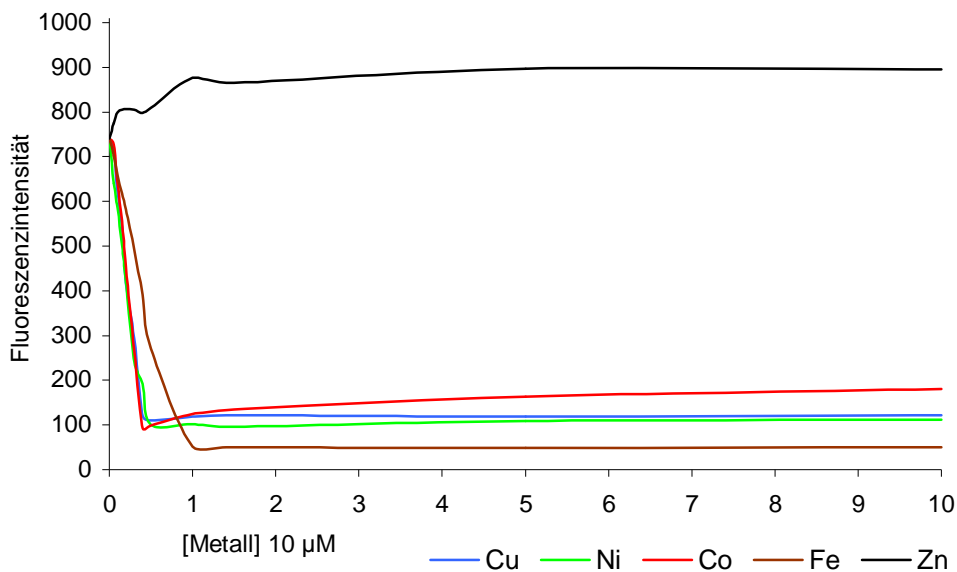
Die optischen Eigenschaften der metallbindenden Derivate **33**, **34** und **35** waren denen des Ausgangsfarbstoffes **5** sehr ähnlich. Die Absorption der Metallkomplexe unterschied sich nicht von der von **5**.

Die Fluoreszenz wurde dagegen durch die Koordination von Metallen beeinflusst. Während bereits 0,5 Äquivalente  $\text{Fe}^{2+}$ -,  $\text{Cu}^{2+}$ -,  $\text{Ni}^{2+}$ - und  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen die Fluoreszenz auf ein Minimum reduzierten, blieb die Fluoreszenz bei Zugabe von  $\text{Zn}^{2+}$  etwa konstant (Abbildung 72).



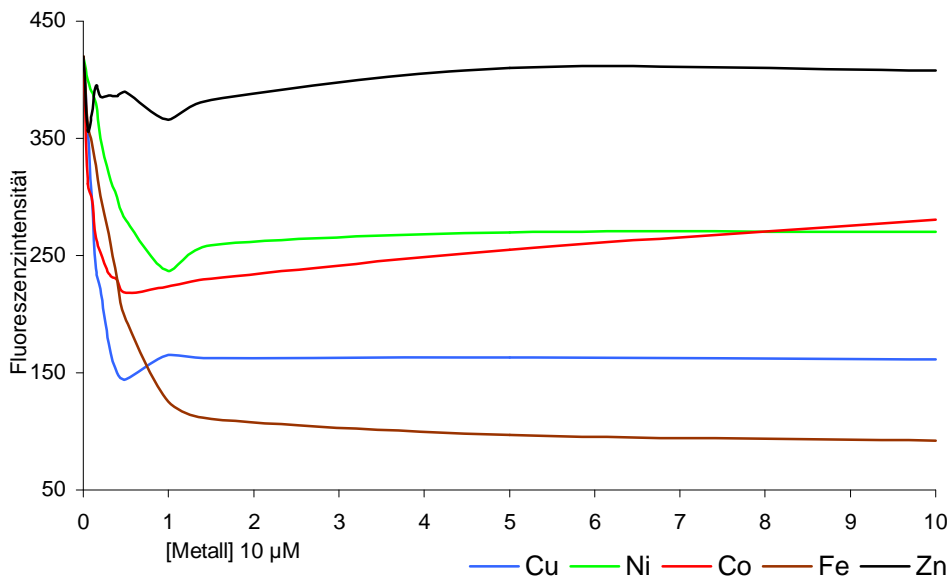
**Abbildung 72:** Änderung der Fluoreszenz von **33** [10 µM] in Abhängigkeit der Konzentration von zugegebenen Metallsalzen, Anregung bei 565 nm, Emission bei 590 nm, T = 25 °C, pH = 7,0 (Puffer: 10 mM ,MOPS)

Die Terpyridin-Farbstoffe mit flexiblem aliphatischen Linker **34** und **33** zeigten bei Zugabe von Metallsalzen eine deutliche Löschung der Fluoreszenz. Cobalt(II), Kupfer(II), Eisen(II) und Nickel(II) löschten die Fluoreszenz ähnlich stark. Die Fluoreszenzlöschung war bei Zugabe von EDTA reversibel.



**Abbildung 73:** Änderung der Fluoreszenz von **34** [10 µM] in Abhängigkeit der Konzentration von zugegebenen Metallsalzen, Anregung bei 565 nm, Emission bei 590 nm, T = 25 °C, pH = 7,0 (Puffer: 10 mM MOPS)

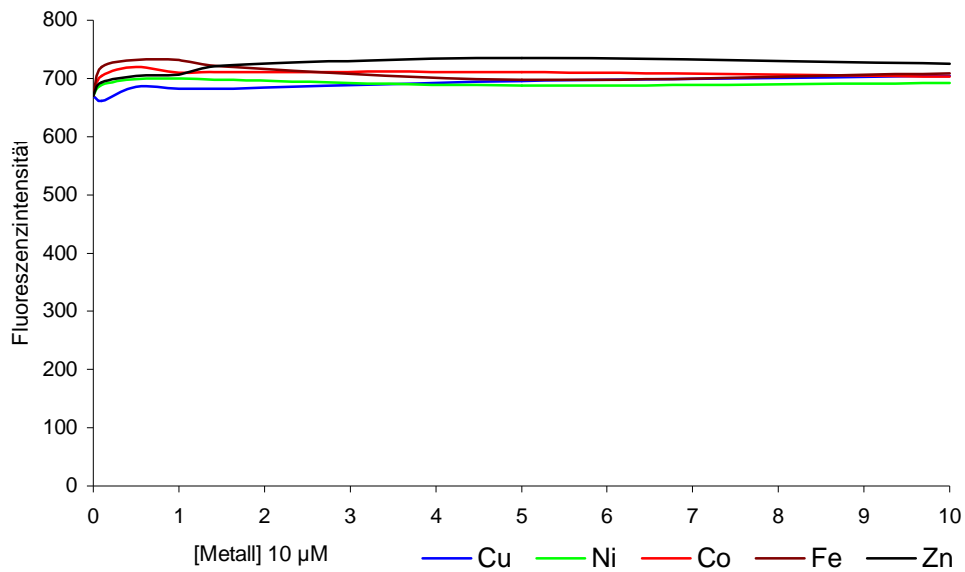
**35** zeigte ähnliche Eigenschaften wie die Farbstoffe **33** und **34**. Die Fluoreszenz von **35** wurde von Metallen jedoch in wesentlich geringerem Maße gelöscht (Abbildung 74). Ohne metallbindende Gruppen zeigten Farbstoffe wie **5** keine Fluoreszenzlöschung bei Zugabe von Metallsalzen (Abbildung 75).



**Abbildung 74:** Änderung der Fluoreszenz von **35** [10 µM] in Abhängigkeit der Konzentration von zugegebenen Metallsalzen, Anregung bei 565 nm, Emission bei 590 nm, T = 25 °C, pH = 7,0 (Puffer: 10 mM MOPS)



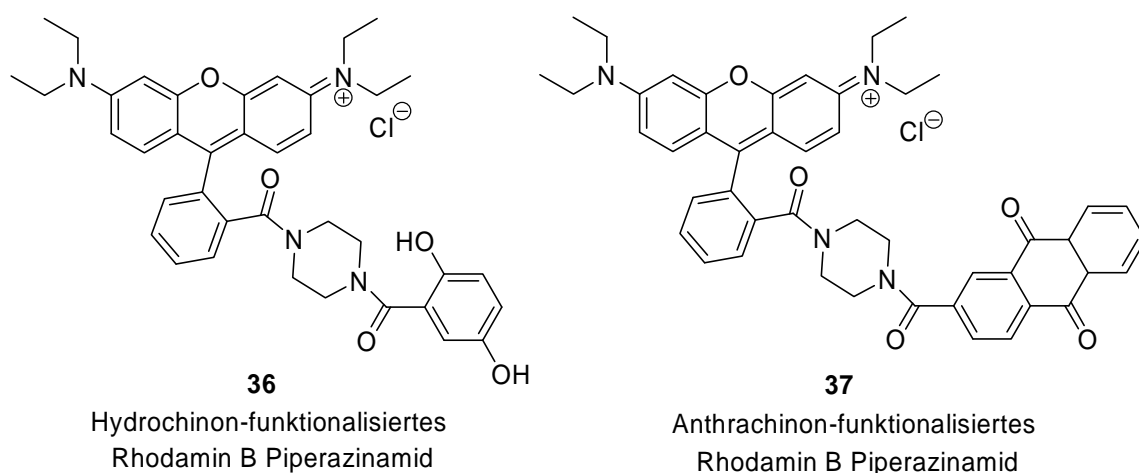
Die verringerte Fluoreszenzlöschung ist bei **35** vermutlich auf den starren Linker zurückzuführen, der eine Kontaktlöschung des Fluorophors durch den Komplex verhindert,



**Abbildung 75:** Referenzmessung der Fluoreszenz des Farbstoffes **5** [10 μM] in Abhängigkeit der Konzentration von zugegebenen Metallsalzen, Anregung bei 565 nm, Emission bei 590 nm, T = 25 °C, pH = 7,0 (Puffer: 10 mM, MOPS)

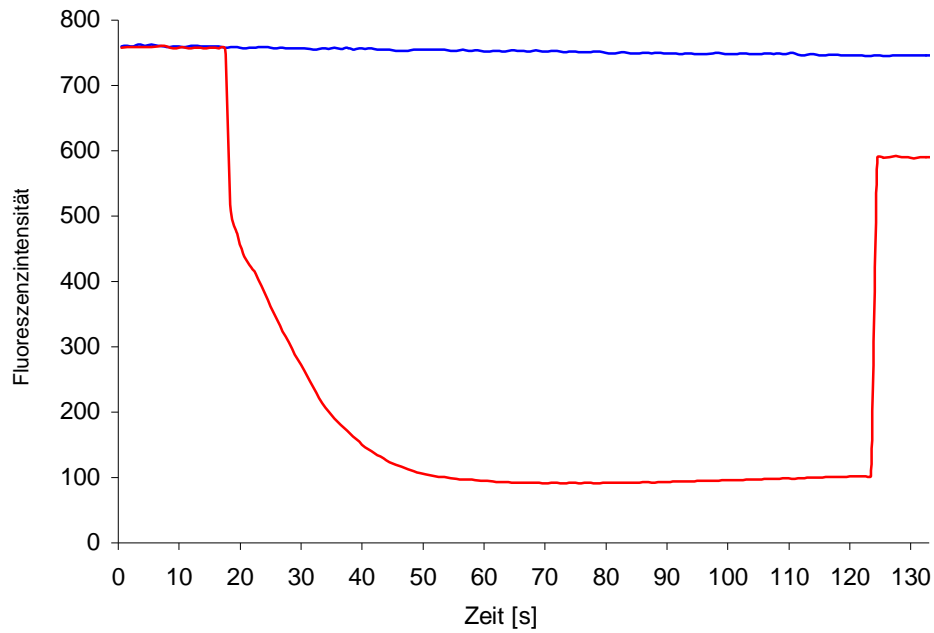
### 5.4.5. Funktionalisierung mit redoxaktiven Gruppen

Derivate von Fluorophoren mit redoxaktiven Gruppen, deren oxidierte und reduzierte Form die Fluoreszenz unterschiedlich stark beeinflussen sind als Redoxsensoren interessant. Chinone sind als gute Fluoreszenzquencher bekannt <sup>[97]</sup>. Deren reduzierte Formen, die Hydrochinone, nehmen keinen Einfluss auf die Fluoreszenzen. Die Synthese eines Rhodamin B Derivats erfolgte durch Kopplung von 2,5-Dihydroxybenzoesäure in Gegenwart von HBTU. Analog wurde Anthrachinon-2-carbonsäure an Rhodamin B Piperazinamid gekoppelt.



**Abbildung 76:** Rhodamin B Derivate mit Chinongruppen

Die Fluoreszenz von Farbstoff **36** ist relativ hoch. Durch Oxidation des Hydrochinons zu Chinon mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  unter Katalyse durch Meerrettich Peroxidase (HRP) kann die Fluoreszenz auf 10 % des Ursprungswerts reduziert werden. **5** ist durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  nicht oxidierbar, verändert daher auch seine Fluoreszenz bei Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  nicht. Die Oxidation ist reversibel. In Abbildung 77 sieht man die Fluoreszenzlöschung nach der Zugabe des Oxidationsmittels ( $t = 18$  s, 1 Äquivalent  $\text{H}_2\text{O}_2$  und 0,1 Äquivalente HRP). Die Zunahme der Fluoreszenz ist nach Zugabe von Reduktionsmittel sichtbar ( $t = 124$  s, 10 Äquivalente Cystein). Verwendet man statt 0,1 Äquivalente HRP, 0,01 Äquivalente oder weniger, wird die Reaktion deutlich langsamer, verläuft aber analog.

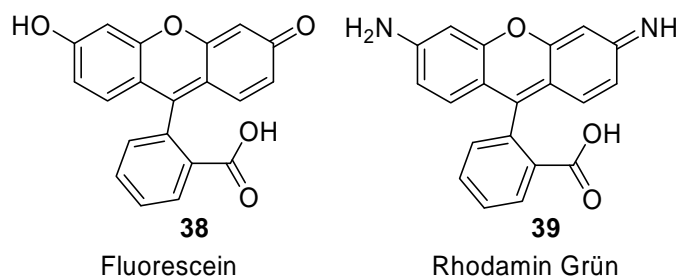


**Abbildung 77:** Abnahme der Fluoreszenz von **36** [10  $\mu\text{M}$ ] in Abhängigkeit von der Zeit (rot), Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1eq) und HRP (0,1eq) nach 18 s, Zugabe von Cystein (10eq) nach 124 s, Rhodamin B Piperazinamid als Referenz (blau), Anregung bei 565 nm, Emission bei 590 nm,  $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7,0$  (Puffer: 10 mM MOPS)

**37** zeigt in der Anthrachinon-Form nur schwache Fluoreszenz, lässt sich aber mit Cystein nicht zur fluoreszierenden Anthrahydrochinon-Form reduzieren.

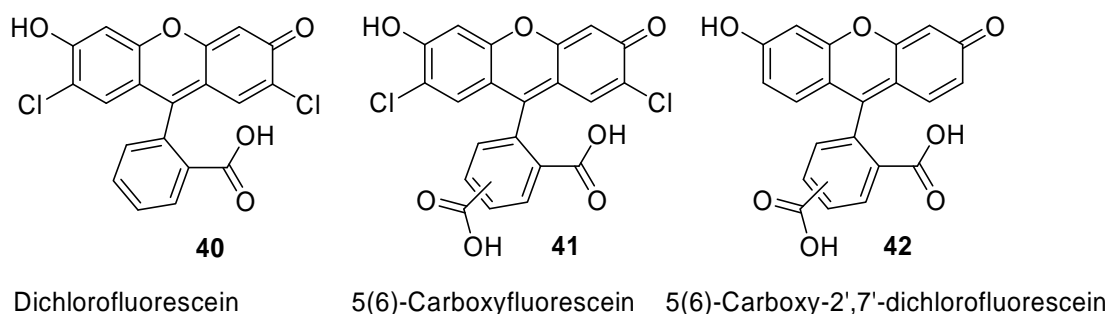
## 5.4.6. Fluoresceinsynthesen

Für Kopplungen in Mikroansätzen und für Experimente mit Zellen wurden literaturbekannte Fluorescein-Derivate synthetisiert und folgend beschrieben. Die Synthese von Fluorescein erfolgte nach der klassischen Synthese von Baeyer<sup>[22]</sup>, die Synthese der anderen Fluoresceinderivate nach einer neueren Vorschrift von Haughland<sup>[98]</sup>. Eine farbähnliche Variante ist Rhodamin Grün, welches nach der Vorschrift von Meyer<sup>[99]</sup> dargestellt wurde.



**Abbildung 78:** Fluorescein und Rhodamin Grün

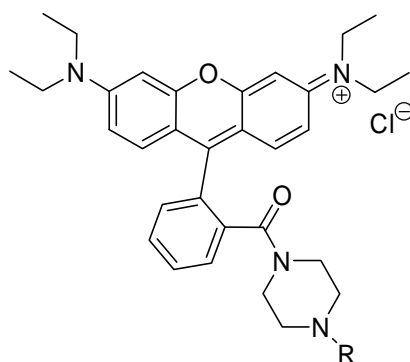
Neben Fluorescein **38**<sup>[22]</sup> und Rhodamin Grün **39**<sup>[99]</sup> wurden auch 2',7'-Dichlorofluorescein **40**<sup>[98]</sup>, 5(6)-Carboxyfluorescein **41**<sup>[98]</sup> und 5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein **42**<sup>[98]</sup> synthetisiert und für Zelleexperimente verwendet. Die durchgeführten Synthesen sind in Kapitel 8.2 beschrieben.



**Abbildung 79:** Fluoresceinderivate

## 5.5. Mikroansätze

Eine Reihe von funktionalisierten Rhodaminen und Fluoresceinen wurde erfolgreich, aber lediglich in Mikroansätzen ohne vollständige Produktcharakterisierung synthetisiert. Für Amidkopplungen wurden jeweils 10  $\mu\text{M}$  Stammlösungen in absolutem DMF hergestellt. Darunter befanden sich: Rhodamin B Piperazinamid **5** (als Aminokomponente), HBTU und DIEA (als Kopplungsreagenzien), sowie als Carbonsäuren: Picolinsäure (für **PI**C), Bernsteinsäure Rhodamin B Piperazinamid **23** (für **RB**), 1,4-Dihydroxynaphtalin-2-carbonsäure (für **NC**), 5(6)-Carboxyfluorescein (für **FL**), Biotin (für **BI**), 4-(1,10-Phenanthrolin-5-ylamino)-4-oxobutansäure (für **PHC**) und 1,4,8-Tris(trifluoracetyl)-11- $\alpha$ -yl-4'-tolylsäurecyclam (für **TTC**). Die Reaktionen wurden in 1,5 ml Plastikreaktionsgefäßen durchgeführt. Die Reaktionslösungen wurden aus Stammlösungen zusammenpipettiert und in einem Thermomixer geschüttelt. Es wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  Carbonsäurekomponente mit 100  $\mu\text{l}$  HBTU und 200  $\mu\text{l}$  DIEA vermischt und mit absolutem DMF auf 900  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Nachdem die Proben 20 min geschüttelt wurden um die Carbonsäure zu aktivieren, wurde 100  $\mu\text{l}$  **5** zugegeben. Die Konzentration der Kopplungsprodukte wurde auf 1 mM eingestellt.



**Abbildung 80:** Für Kopplungen verwendete Aminkomponente Rhodamin B Piperazinamid **5**

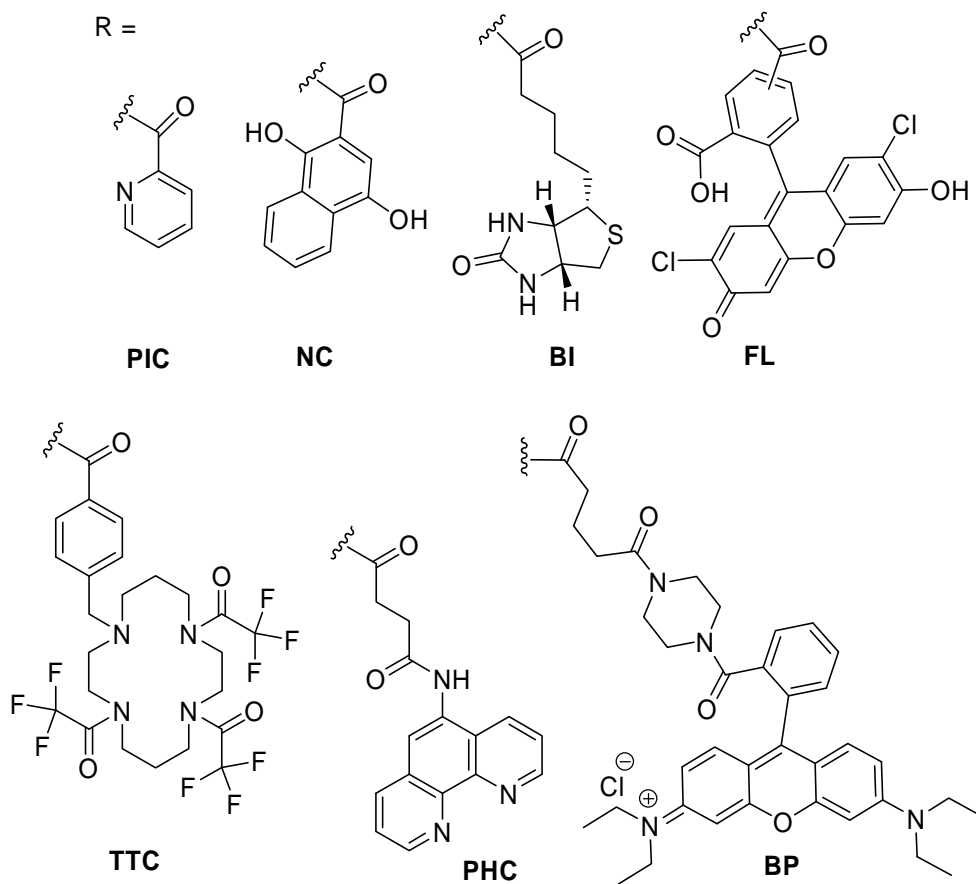


Abbildung 81: Im Mikromaßstab synthetisierte funktionalisierte Fluorophore

Die Farbstoffe **PIC**, **NC** und **BP**, wurden über Standard ESI-MS nachgewiesen. Von **FL**, **BI**, **PHC** und **TTC** wurden HR-ESI Massen bestimmt (Tabelle 7).

Farbstoff	gefundenes m/z	berechnetes m/z
<b>PIC</b>	616	
<b>NC</b>	697	
<b>BP</b>	1118	
<b>FL</b>	HR 937,2773	937,2765
<b>BI</b>	HR 737,3839	737,3849
<b>PHC</b>	HR 788,3921	788,3919
<b>TTC</b>	HR 1115,4800	1115,4805

Tabelle 7: Massen der in Mikroansätzen dargestellten Farbstoffe

## 6. Anfärbung und fluoreszenzmikroskopische Beobachtung lebender Zellen mit funktionalisierten Xanthenfarbstoffen

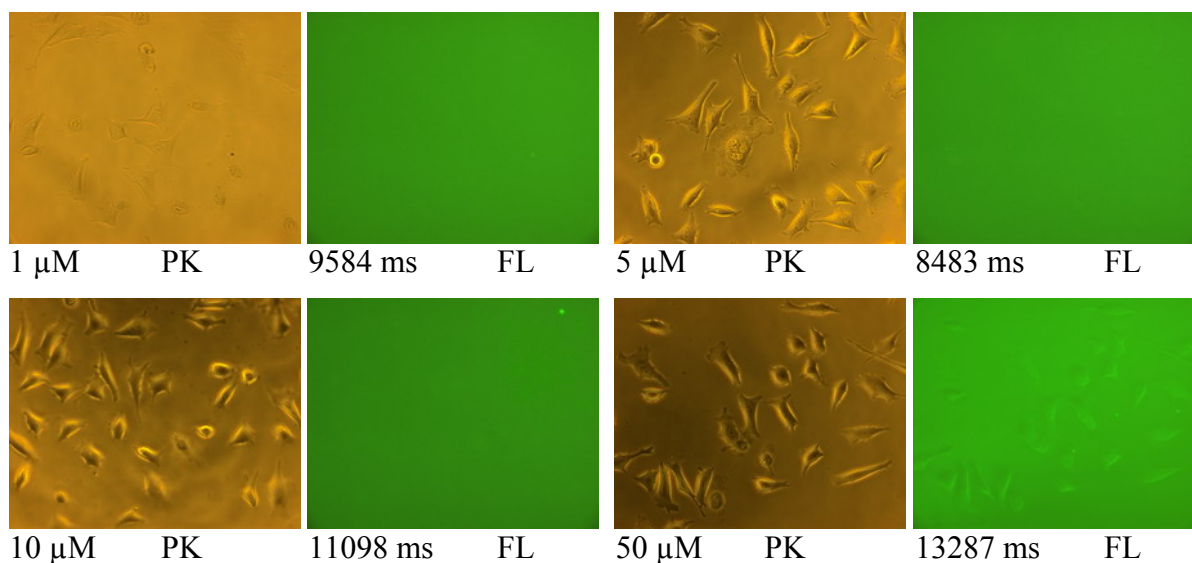
Von besonderem Interesse war der Zusammenhang zwischen chemischer Struktur bzw. Funktionalisierung der Farbstoffe einerseits und zellulärer Akkumulation sowie subzellulärer Verteilung andererseits.

### 6.1. Fluoreszenzmikroskopie

Zur Abschätzung der Akkumulation eines Farbstoffs in einer Zelle werden die optimalen Belichtungsdauern für die Aufnahme von Fluoreszenzbildern bestimmt. Je nach Fluoreszenzintensität kann man die relativen Farbstoffmengen in der Zelle abschätzen. Für die Experimente wurde eine Lösung des Farbstoffs in verschiedenen Konzentrationen zubereitet (1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$ ). Die Zellen wurden 1 Stunde mit dem Farbstoff inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt, zweimal mit PBS-Puffer gewaschen, und danach wurde phenolrotfreies Medium wieder auf die Zellen ausgebracht. Der Abstand zwischen letztem Waschvorgang und eigentlicher Aufnahme eines Fluoreszenzbildes beträgt ca. 15 bis 20 min. Bei Farbstoffen, die nur schlechte Zellmembranpermeabilität aufweisen, wird nahezu der gesamte Farbstoff beim Waschvorgang entfernt. Daher ist eine sehr hohe Belichtungsdauer nötig, um noch einen Rest an Fluoreszenz nachzuweisen. Meist ist die Fluoreszenz über das ganze Bild verteilt und nicht in der Zelle lokalisiert. Farbstoffe, die eine gute Membranpermeabilität aufweisen, aber schnell aus der Zelle eliminiert werden, zeigen bei der Aufnahme einen sehr hohen Fluoreszenzhintergrund. Nur Farbstoffen, die in die Zellen wandern und dort verbleiben, liefern eine starke zelluläre Fluoreszenz.

### 6.1.1. HeLa Zellen

In ersten Versuchen wurden die in Kapitel 5.4.6. erwähnten Fluoresceinderivate verwendet. Für die Experimente wurden HeLa-Zellen auf 96-well Mikrotiterplatten kultiviert. Nach Inkubation und Waschvorgang zeigen die Carboxyfluoresceinderivate keine Akkumulation in den Zellen (Abbildung 82).

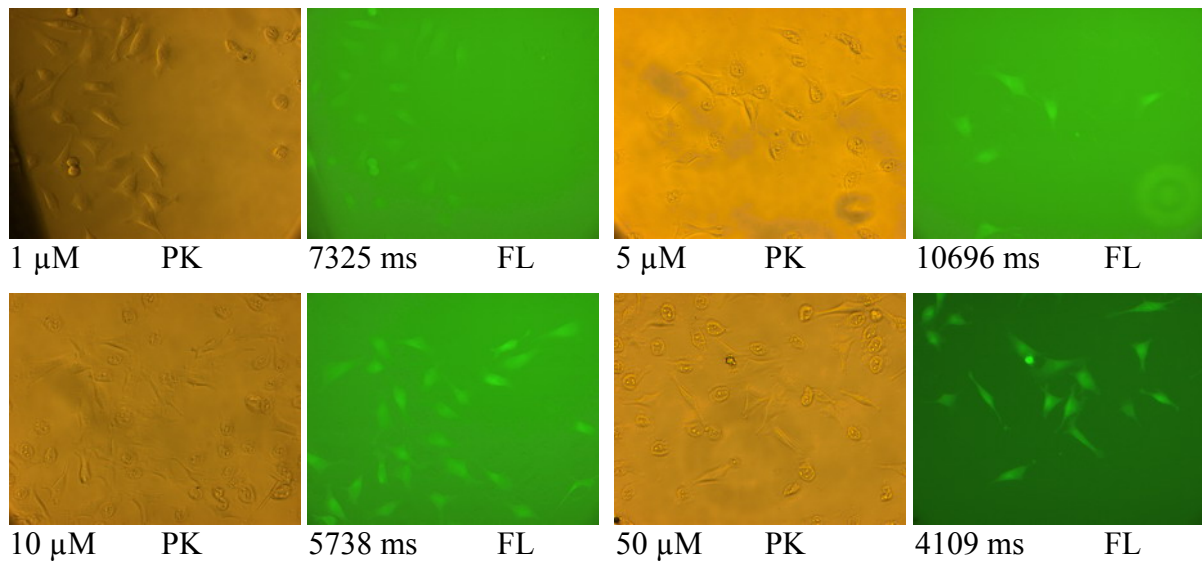


**Abbildung 82:** HeLa-Zellen nach Inkubation mit **3**: Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL)

Der Farbstoff wurde in vier verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Die Konzentration ist jeweils unter dem Phasenkontrastbild angegeben. Unter der Fluoreszenzaufnahme ist die Belichtungsdauer der Kamera angegeben. Die Belichtungsdauer ist durch die das Fluoreszenzmikroskop steuernde Software „Carl Zeiss Axiovision“ als optimal für die Aufnahme bestimmt worden.

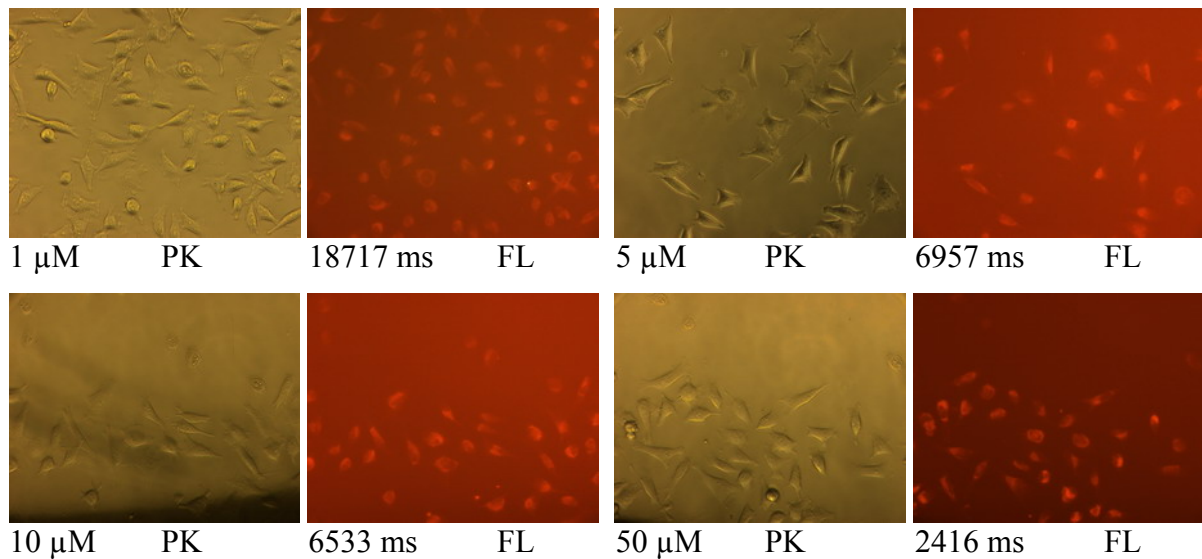
Die Aufnahmen von Fluorescein **38**, Rhodamin Grün **39** und 2',7'-Dichlorofluorescein **40** zeigen eine etwas höhere Anreicherung in Zellen als die Carboxyfluoresceine. Der Hintergrundwert nimmt während der Messung stark zu, das bedeutet, dass der Farbstoff aus der Zelle in das Medium wandert. Exemplarisch ist eine Zellanfärbung mit Rhodamin Grün gezeigt (Abbildung 83):





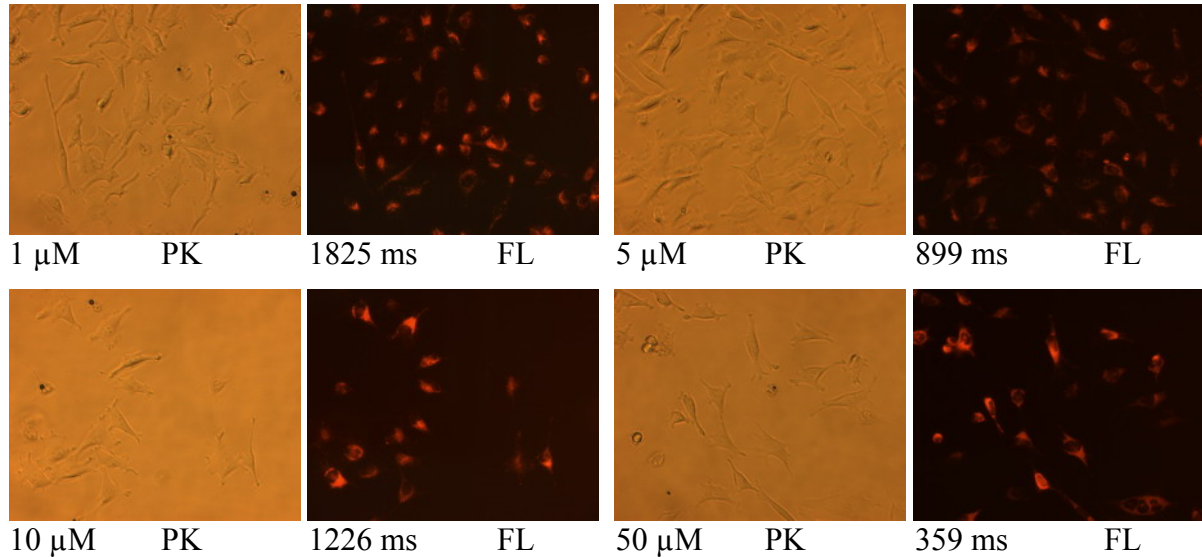
**Abbildung 83:** HeLa-Zellen nach Inkubation mit **8**: Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL)

Bei der Verwendung von Rhodamin B (Abbildung 84) sieht man eine Verteilung des Farbstoffs im Cytosol. Rhodamin B wird nur schwach in der Zelle angereichert. Eine hohe Hintergrundfluoreszenz zeugt außerdem von einer Eliminierung des Farbstoffes aus der Zelle.



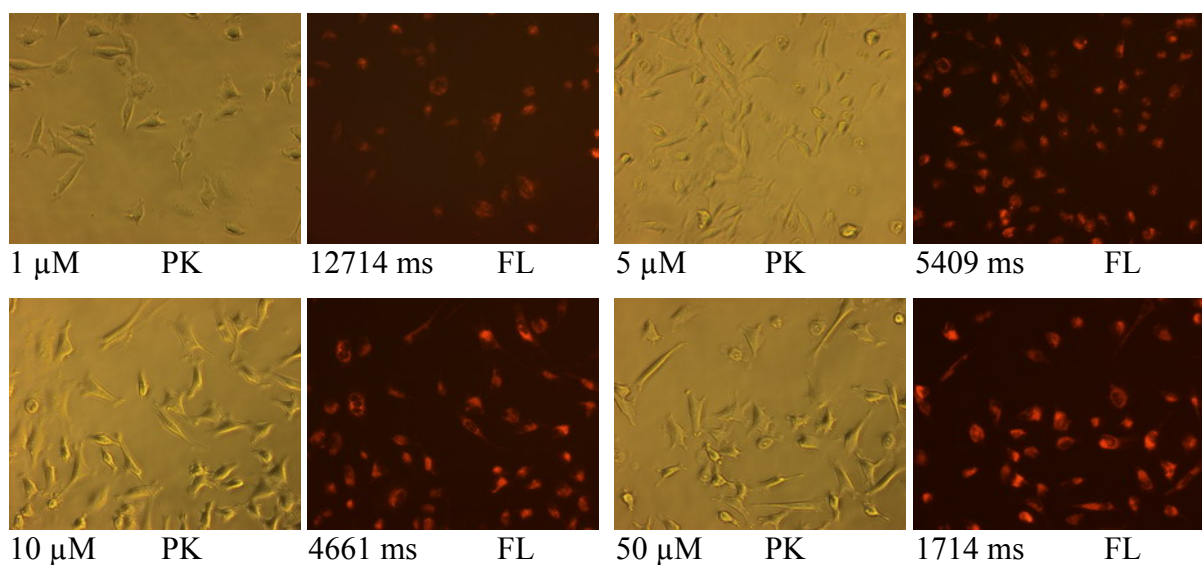
**Abbildung 84** HeLa-Zellen nach Inkubation mit Rhodamin B:  
Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL)

Funktionalisiert man das Rhodamin B, verändern sich die Anfärbereigenschaften. Das Rhodamin B Piperazinamid zeigt eine deutlich größere Anreicherung in der Zelle (Abbildung 85).

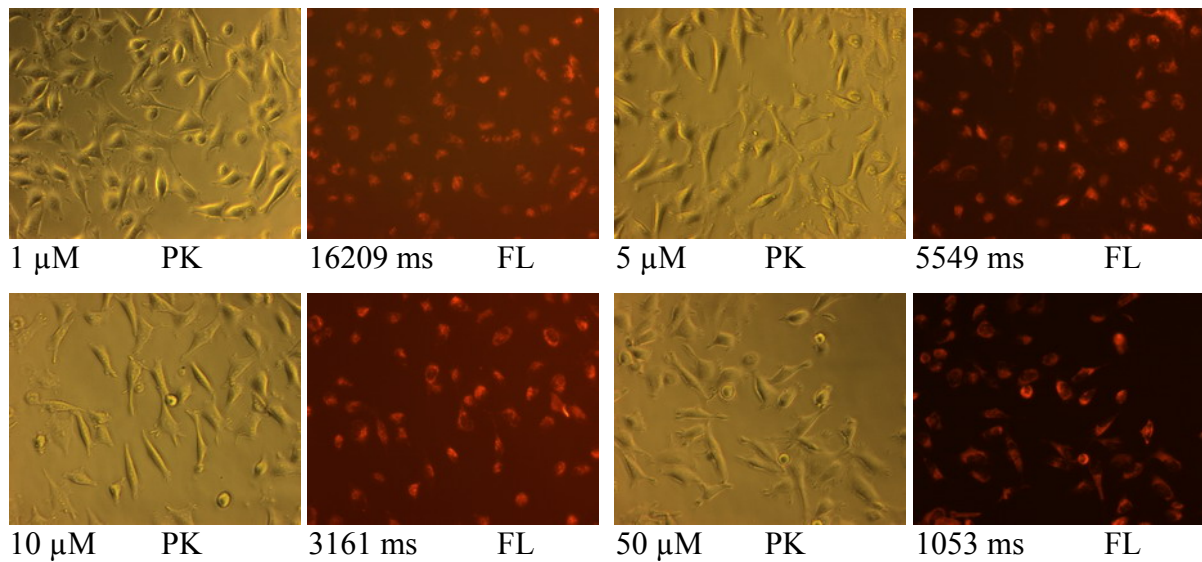


**Abbildung 85:** HeLa-Zellen nach Inkubation mit **5**: Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL)

Bernsteinsäure Rhodamin B Piperazinamid **23** (Abbildung 86) und Glutarsäure Rhodamin B Piperazinamid **24** (Abbildung 87) zeigen beide eine schwächere Zellaufnahme als **5**. Die Distribution in der Zelle ist aber abweichend, **23** und **24** werden in Organellen der Zelle angereichert (siehe Kapitel 6.2. Konfokale).

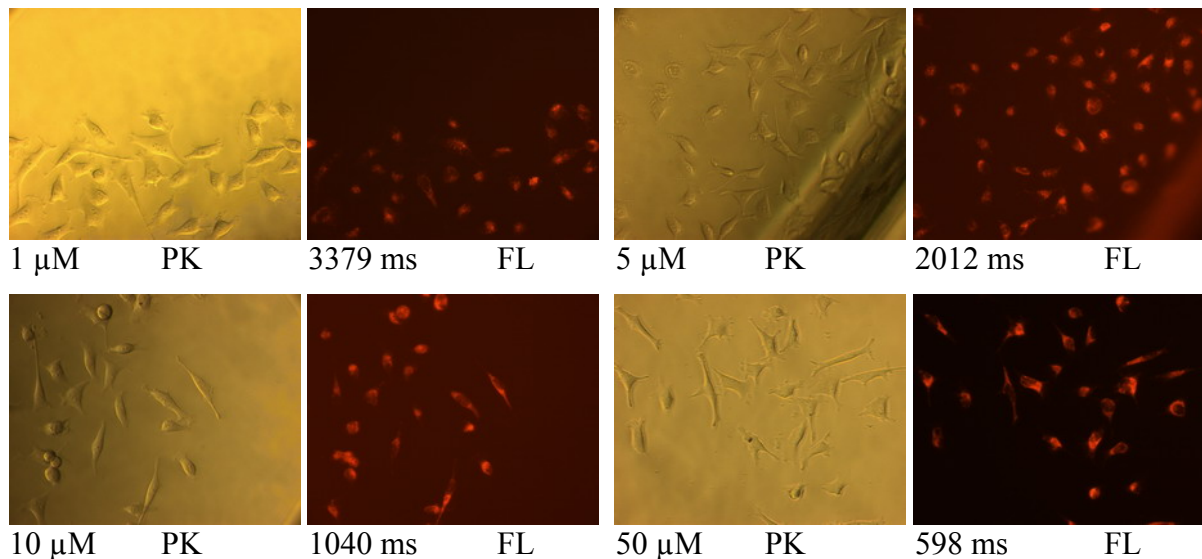


**Abbildung 86:** HeLa-Zellen nach Inkubation mit **23**: Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL)



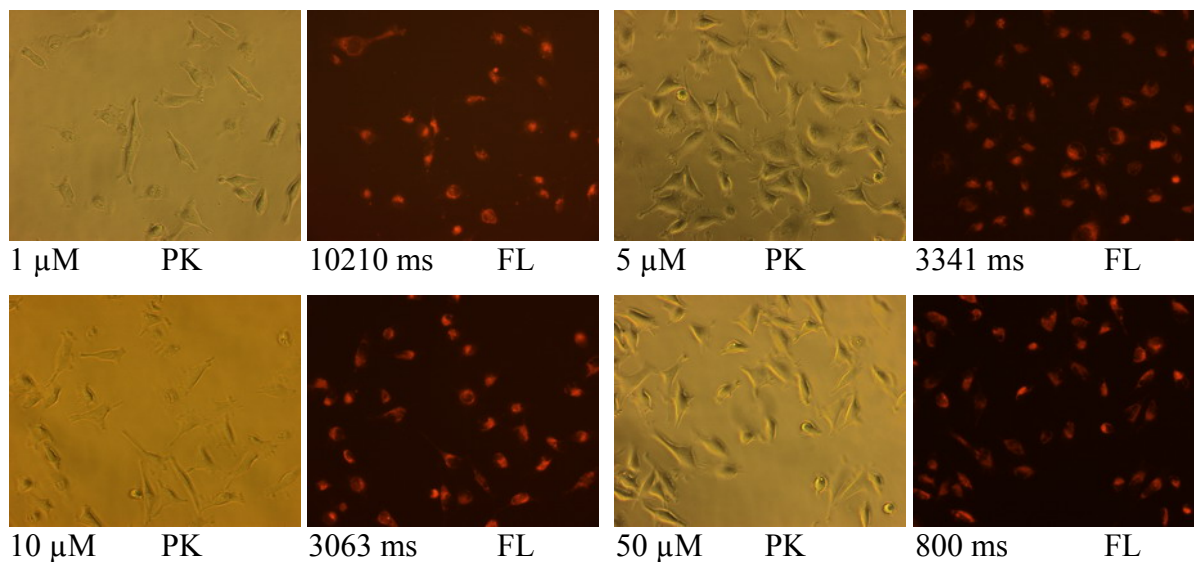
**Abbildung 87:** HeLa-Zellen nach Inkubation mit **24**: Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL)

Essigsäure Rhodamin B Piperazinamid **25**, Pivalinsäure Rhodamin B Piperazinamid **26** und 4-Carboxybenzaldehyd Rhodamin B Piperazinamid **28** zeigen Anfärbereigenschaften die denen von **5** ähneln. Exemplarisch ist hier die Aufnahmeserie von **26** gezeigt (Abbildung 88).



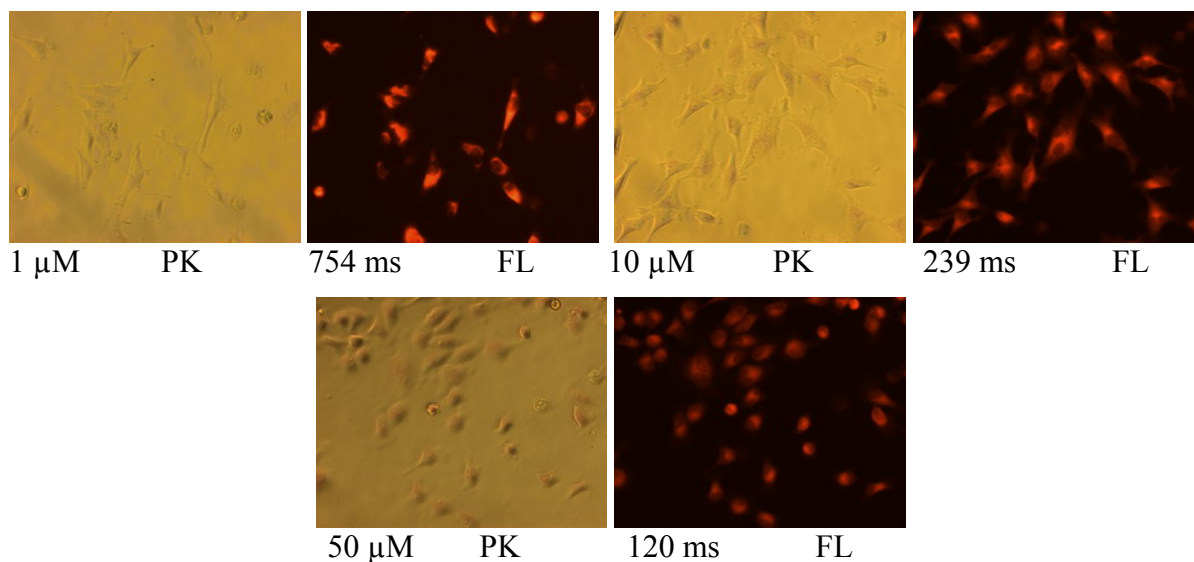
**Abbildung 88:** HeLa-Zellen nach Inkubation mit **26**: Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL)

Hydrochinonfunktionalisiertes Rhodamin B reichert sich mäßig effizient in Zellen an, wie aus Abbildung 89 ersichtlich.



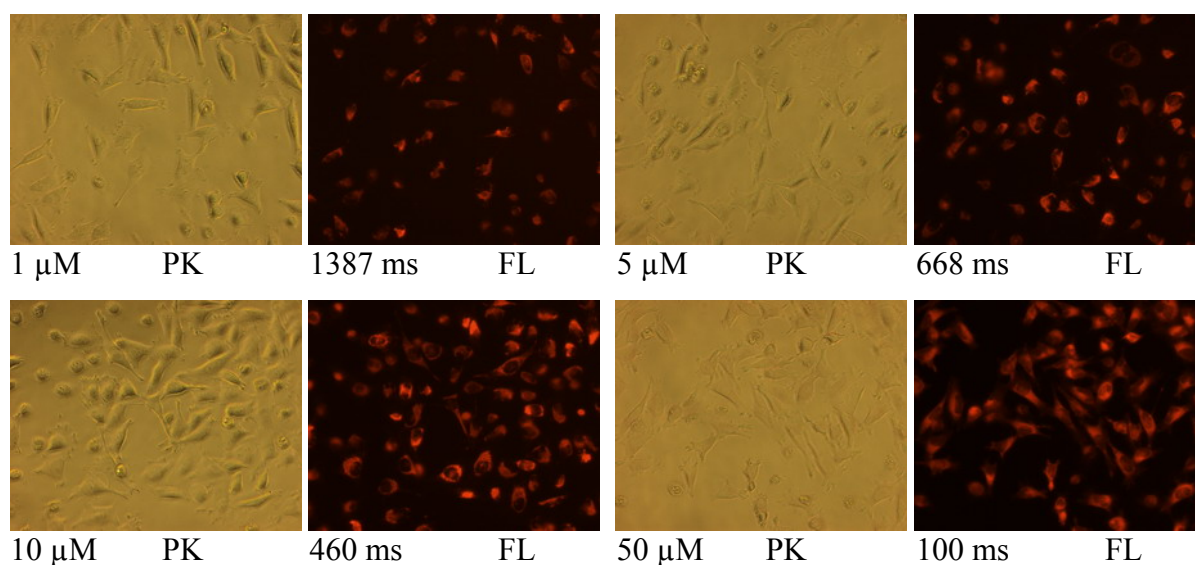
**Abbildung 89:** HeLa-Zellen nach Inkubation mit **36**: Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL)

Eine sehr starke Anfärbung der Zellen zeigt Anthrachinon-2-carbonsäure Rhodamin B Piperazinamid **37**. Da der Farbstoff nur eine schwache Fluoreszenz zeigt, muss er sehr stark eingelagert werden, um ein derart deutlich Signal zu zeigen. Die hohe Einlagerung ist aber auch mit einer Toxizität verbunden. Bei einer 50  $\mu\text{M}$  Konzentration des Farbstoffes sieht man, dass die Zellen bereits zu einem Teil kugelförmig sind, was auf einen baldigen Zelltod schließen lässt.

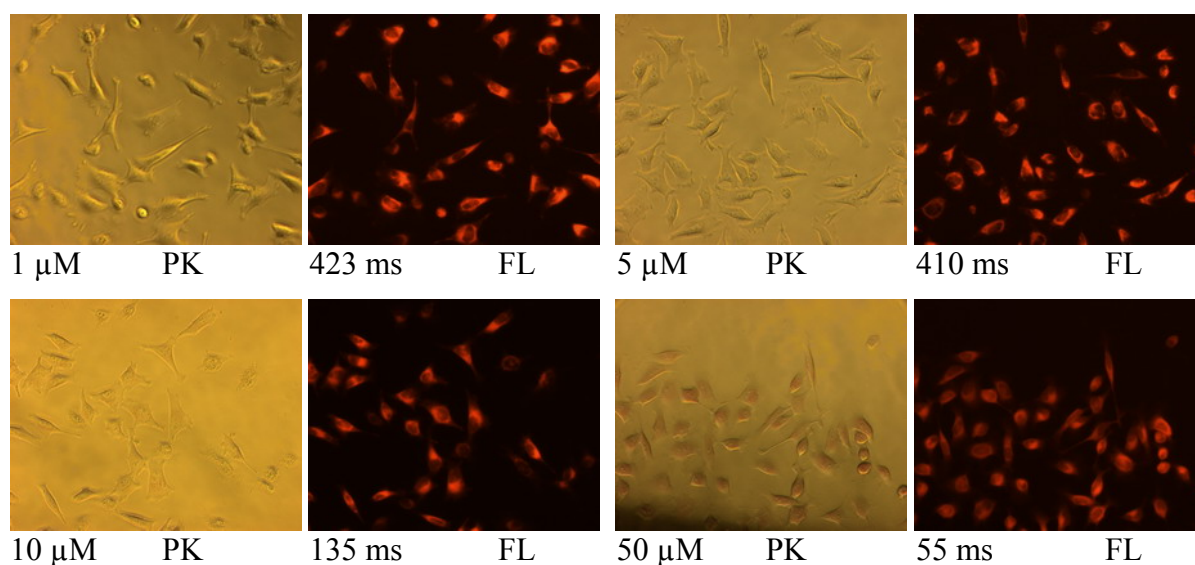


**Abbildung 90:** HeLa-Zellen nach Inkubation mit **37**: Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL)

Alle Fettsäurederivate zeigen eine hohe Akkumulation in den Zellen. Der Farbstoff akkumuliert vor allem im Bereich des endoplasmatischen Retikulums. In Abbildung 91 ist eine Bilderreihe Palmitoleinsäure Rhodamin B Piperazinamid **30** gezeigt, die bei Stearinsäure Rhodamin B Piperazinamid **29** und Cholsäure Rhodamin B Piperazinamid **32** ähnlich aussieht. 16-Hydroxyhexadecansäure Rhodamin B Piperazinamid **31** wird am stärksten in der Zelle eingelagert. Eine Bilderreihe von **31** ist in Abbildung 92 gezeigt. Die besonders starke Akkumulation von **31** in HeLa Zellen äußert sich auch in der Rotfärbung der Zellen in der Phasenkontrastaufnahme bei der Inkubation von 50  $\mu\text{M}$  **31**.

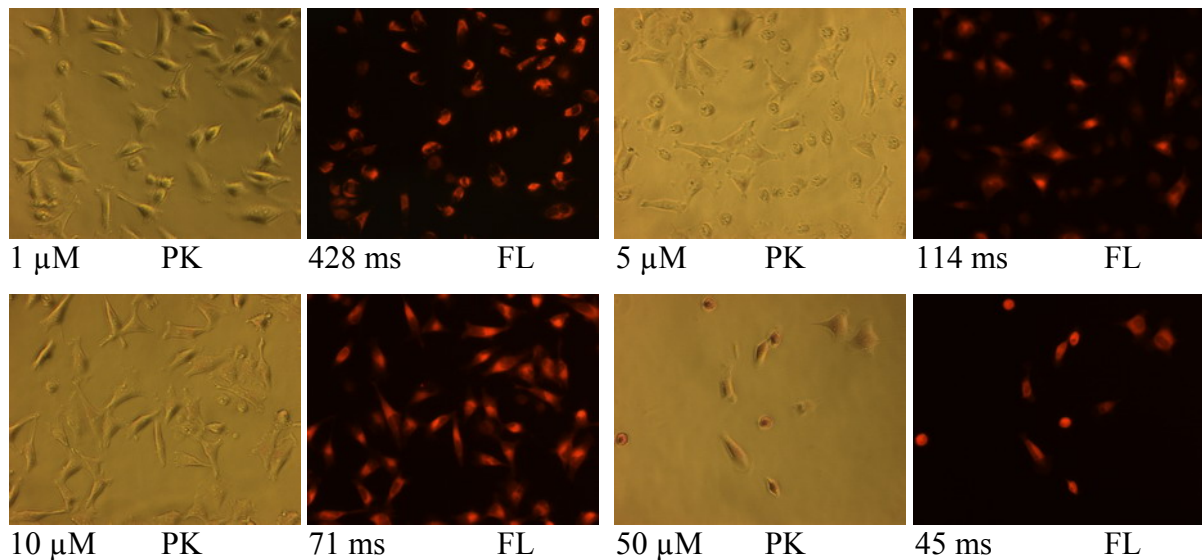


**Abbildung 91:** HeLa-Zellen nach Inkubation mit **30**: Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL)



**Abbildung 92:** HeLa-Zellen nach Inkubation mit **31**: Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL)

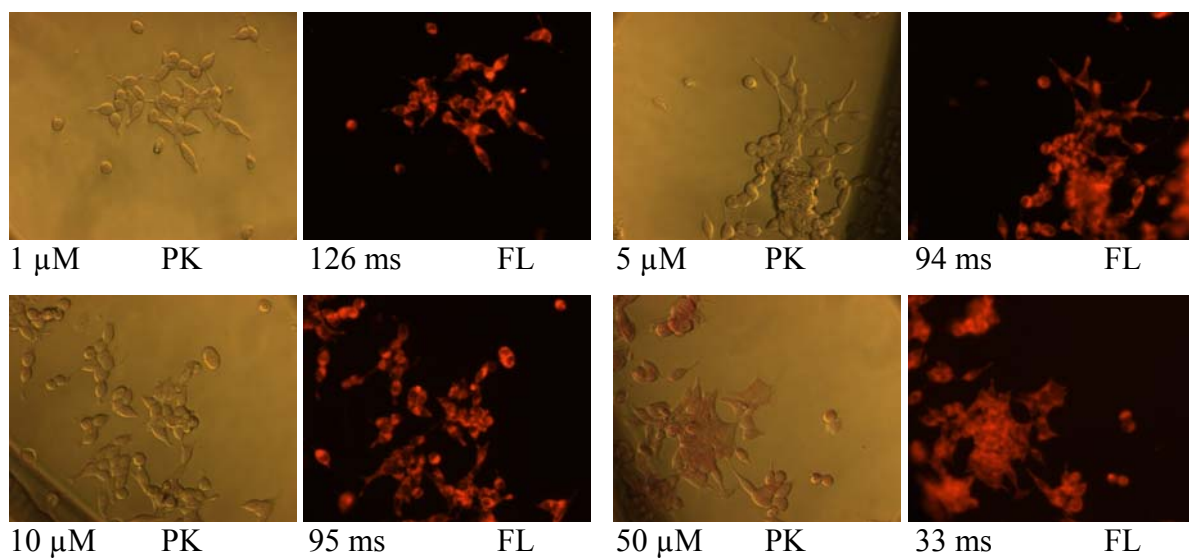
Die terpyridinfunktionalisierten Rhodamine zeigen, neben **31**, in der Zelle die höchste Akkumulation. 6-(2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy)hexansäure Rhodamin B Piperazinamid **33**, 4-(2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy)butansäure Rhodamin B Piperazinamid **34** und 4'-(4-Carboxyphenyl)-2,2':6',2''-Terpyridin Rhodamin B Piperazinamid **35** werden in der Zelle vor allem im Bereich des endoplasmatischen Retikulums angereichert. In hohen Konzentrationen, ab 50  $\mu\text{M}$ , erweisen sie sich als toxisch für die Zelle. In Abbildung 93 ist exemplarisch eine Bilderreihe der Anfärbung mit **34** gezeigt. In der Abbildung sieht man in der Aufnahme nach Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Farbstofflösung nur noch sehr wenige Zellen, die zum großen Teil schon in eine Kugelform übergegangen sind. Die starke Akkumulation des Farbstoffes sieht man auch als Rotfärbung der Zelle im Phasenkontrastbild.



**Abbildung 93:** HeLa-Zellen nach Inkubation mit **34**: Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL)

## 6.1.2. LNCaP-Zellen

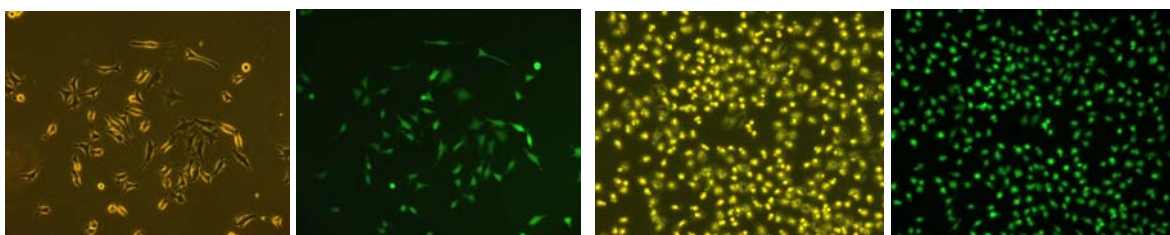
Neben HeLa Zellen wurde auch eine zweite Zelllinie untersucht: LNCaP-Zellen (Zellen eines menschlichen Prostatacarcinoms). Die Farbstoffe reichern sich in LNCaP-Zellen ähnlich wie in HeLa-Zellen an. In Abbildung 94 ist die Anfärbung von LNCaP-Zellen mit **31** gezeigt. Die hohe Akkumulation in der Zelle erkennt man an der niedrigen Belichtungsdauer. Bei 50 $\mu$ M-Inkubationslösung erkennt man im Phasenkontrastbild eine starke Rotfärbung der Zellen, die ebenfalls eine hohe Akkumulation des Farbstoffs in der Zelle andeutet.



**Abbildung 94:** LNCaP-Zellen nach Inkubation mit **31**: Phasenkontrast (PK) und Fluoreszenzaufnahmen (FL)

### 6.1.3. Hydrolysierbare Farbstoffe

Fluorescein ist kaum zellpermeabel. Verwendet man jedoch acylierte Fluoresceine, wie Diacetylfluorescein **3** oder Dipicolinoylfluorescein **2**, werden diese leicht von Zellen aufgenommen, hydrolysiert und beginnen zu fluoreszieren. In Abbildung 95 sieht man links HeLa-Zellen in 20facher Vergrößerung, die mit **3** angefärbt wurden. Rechts sieht man HeLa-Zellen in 10facher Vergrößerung, die mit **2** angefärbt wurden.



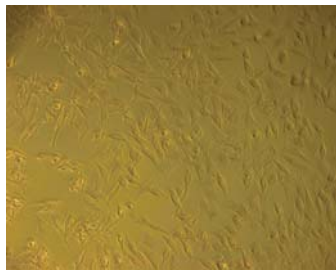
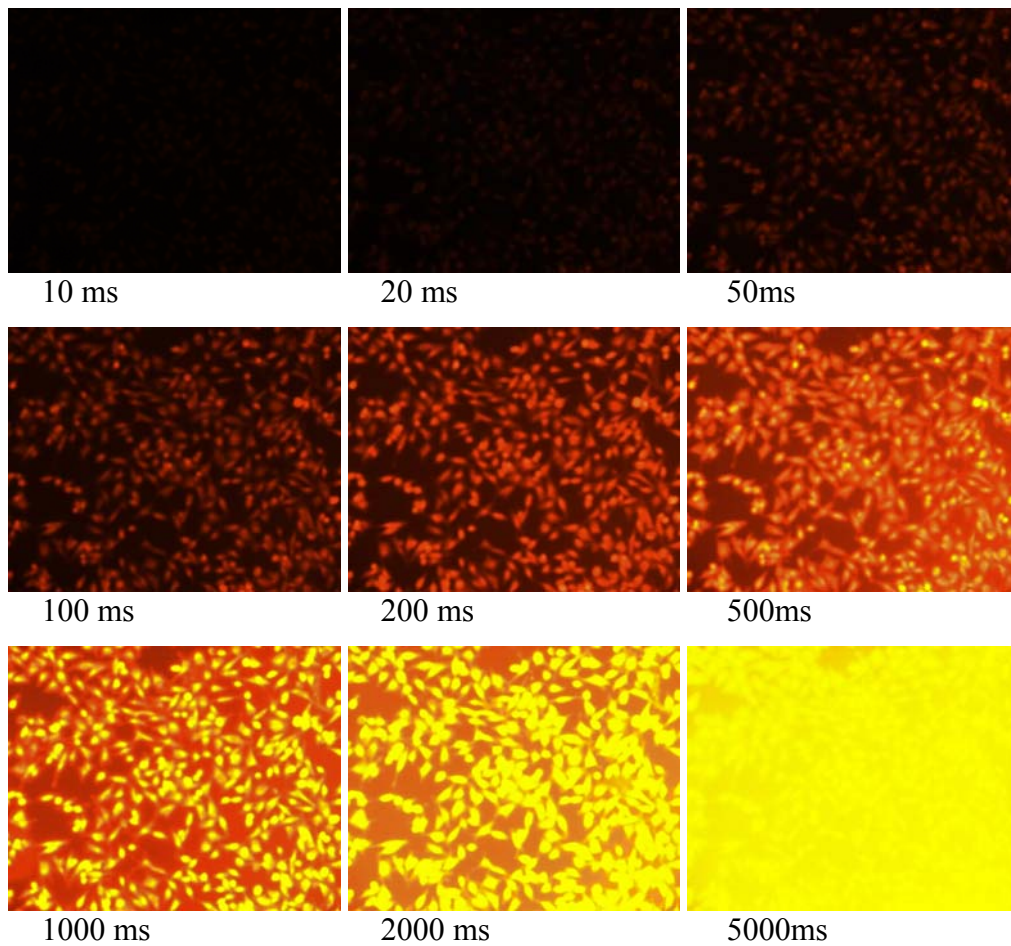
**Abbildung 95:** HeLa-Zellen Phasenkontrast und Fluoreszenzaufnahmen von Diacetylfluorescein **3** (links) und Dipicolinoylfluorescein **2** (rechts)

Nach der Hydrolyse wird der Farbstoff langsam aus der Zelle ausgeschieden. Die Hintergrundfluoreszenz nimmt dann stetig zu. Verwendet man als Substrat einen Diester von 5(6)-Carboxyfluorescein, ist die Verweildauer in der Zelle länger, da Carboxyfluoresceine eine schlechtere Membranpermeabilität als Fluorescein aufweisen.

### 6.1.4. Farbstoffe mit Metallionen-abhängiger Membranpermeabilität

Die Zellpermeabilität der terpyridinfunktionalisierten Farbstoffe ist durch Metallionen „schaltbar“. Der Farbstoff selbst reichert sich stark in der Zelle an, während ein Farbstoff-Metallkomplex die Zelle nicht anzufärben vermag. Für Zellgängigkeitsexperimente wurden HeLa Zellen jeweils eine Stunde mit 10  $\mu\text{M}$  **33** und 10  $\mu\text{M}$  des entsprechenden  $\text{Zn}^{2+}$ -Komplexes inkubiert. Anschließend wurden von jeder Probe neun Fluoreszenzbilder mit verschiedenen Belichtungsdauern (10 ms, 20 ms, 50 ms, 100 ms, 200 ms, 500 ms, 1000 ms, 2000 ms, 5000 ms) aufgenommen.

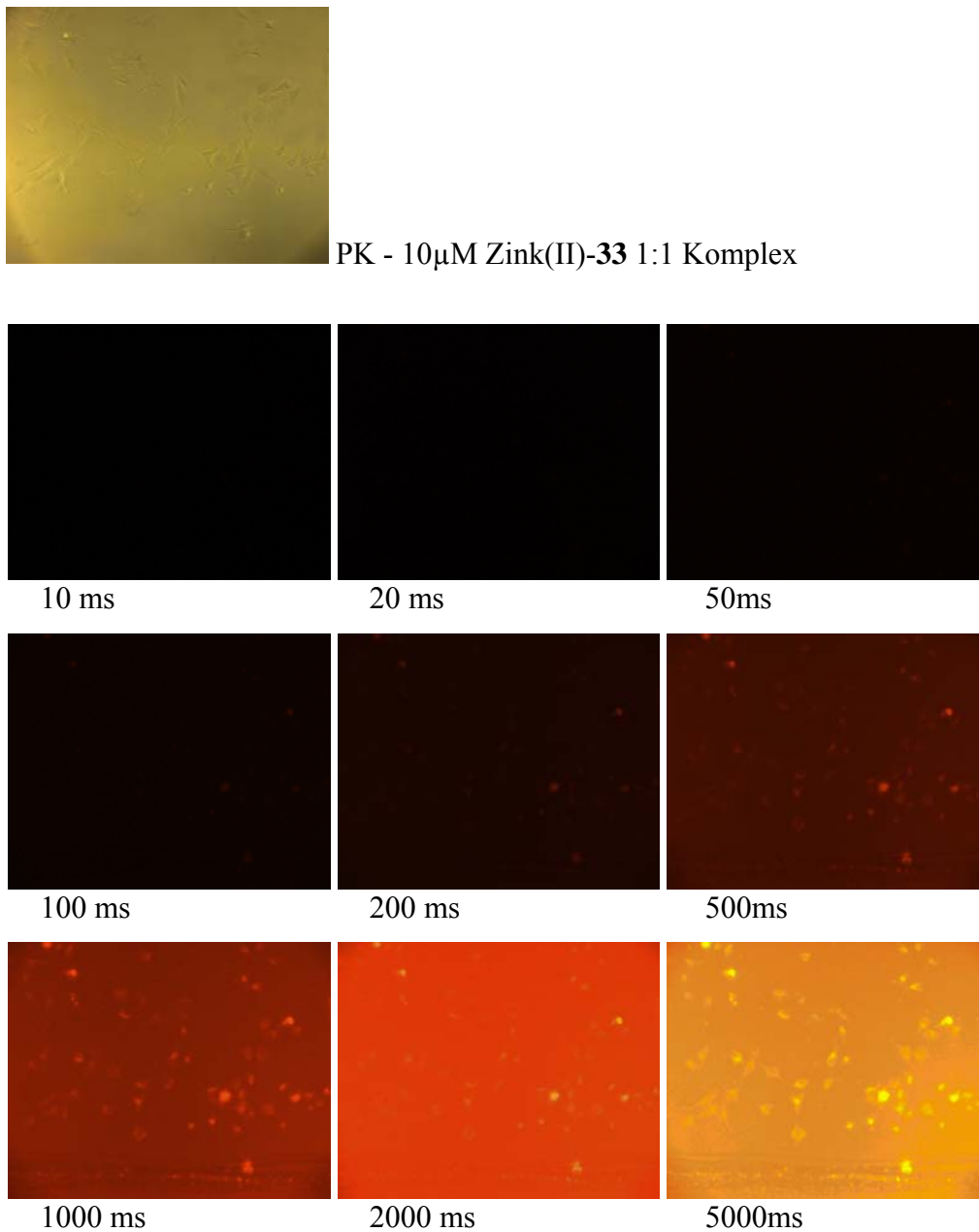


PK – **33** 10 $\mu$ M ohne Metallzusatz

**Abbildung 96:** HeLa: **33** [10  $\mu$ M], Phasenkontrast (PK) Aufnahme, sowie Fluoreszenzaufnahmen mit verschiedenen Belichtungsdauern

Bei der Verwendung des freien Farbstoffs sieht man eine starke Anreicherung in der Zelle. Bereits bei Belichtungsdauern von 50 ms ist der Farbstoff deutlich zu erkennen (Abbildung 96).

Bei der Inkubation mit dem **33**-Zinkkomplex sieht man kaum Akkumulation des Farbstoffes in der Zelle (Abbildung 97).



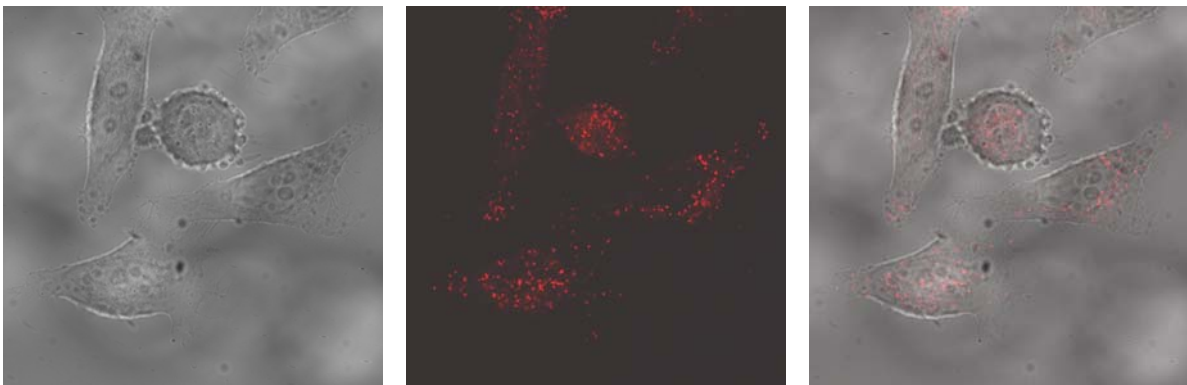
**Abbildung 97:** HeLa: **33**-Zink-Komplex [10  $\mu$ M], Phasenkontrast (PK) Aufnahme, sowie Fluoreszenzaufnahmen mit verschiedenen Belichtungsdauern

Die Experimente mit Nickel(II)- und Kupfer(II)-**33** Komplexen verlaufen analog. Auch da wird keine Fluoreszenz in den Zellen beobachtet. Offenbar sind die Metallkomplexer von **33** viel weniger membranpermeabel als freies **33**.

## 6.2. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

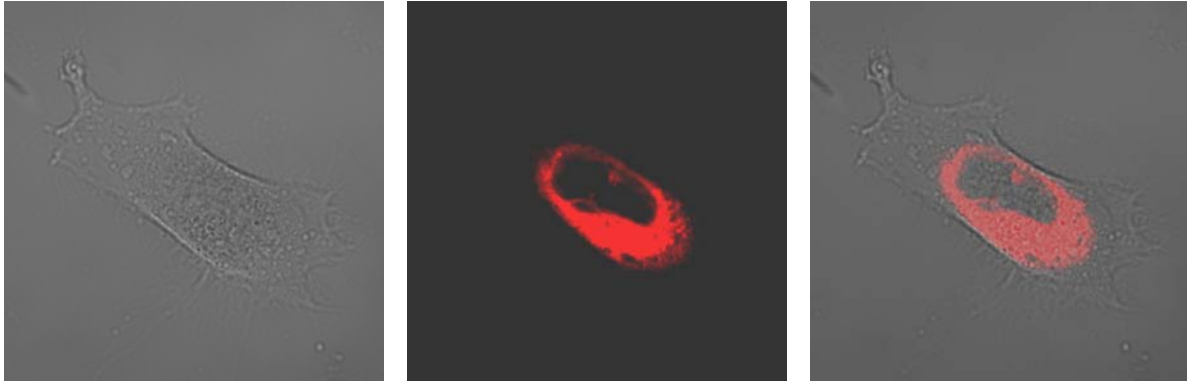
Bei Aufnahmen von Zellen mit einem Standard-Fluoreszenzmikroskop gehen durch Streulicht aus verschiedenen Ebenen viele Details verloren. Besser aufgelöste Aufnahmen erhält man bei Verwendung eines konfokalen Laser Raster Mikroskops (Confocal Laser Scan Microscope, CLSM, Kapitel 1.1.4.). Das CLSM ist in der Lage optische Schnitte der Proben aufzunehmen und dadurch das Streulicht aus den anderen Ebenen zu eliminieren. Proben für CLSM wurden analog den Proben für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet.

In Abbildung 98 sieht man die Anfärbung von HeLa Zellen durch den Farbstoff Glutarsäure Rhodamin B Piperazinamid **24**.



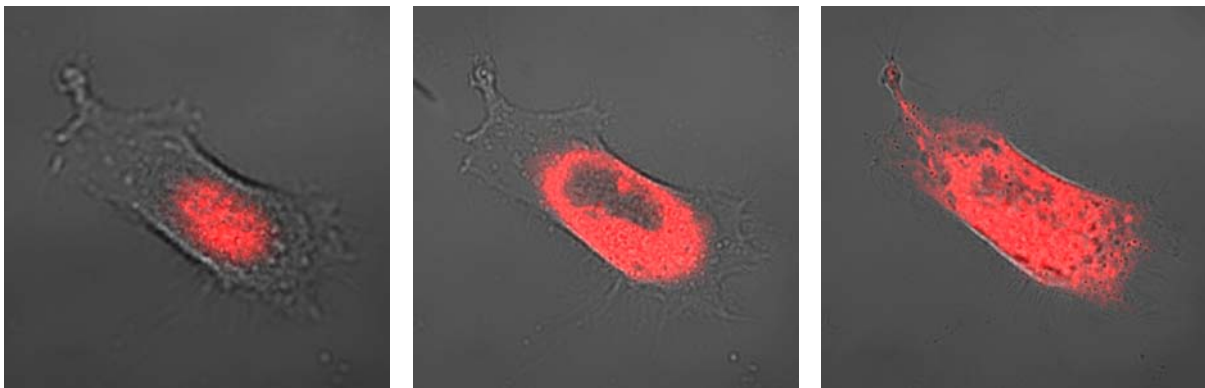
**Abbildung 98:** CLSM-Aufnahme von HeLa Zellen inkubiert mit 1  $\mu\text{M}$  Farbstoff **24**: Durchlichtkanal (links), Fluoreszenzkanal (Mitte), Fluoreszenz und Durchlichtkanal überlagert (rechts)

Palmitoleinsäure Rhodamin B Piperazinamid **30** reichert sich in den Zellen im Bereich des endoplasmatischen Retikulums an. Der Bereich des Zellkerns wird ausgelassen (Abbildung 99).



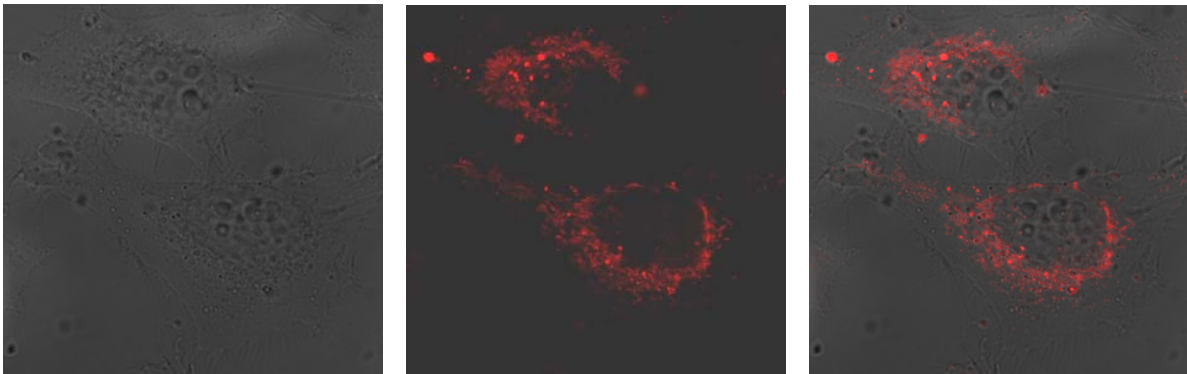
**Abbildung 99:** CLSM-Aufnahme von HeLa Zellen inkubiert mit 10  $\mu\text{M}$  Farbstoff **30**: Durchlichtkanal (links), Fluoreszenzkanal (Mitte), Fluoreszenz und Durchlichtkanal überlagert (rechts)

Nimmt man mehrere optische Schnitte auf, kann man mit diesem Stapel eine dreidimensionale Rekonstruktion durchführen oder auch sich die gewünschten optischen Schnitte aus diesem Stapel aussuchen. Abbildung 100 zeigt drei optische Schnitte aus einem Stapel von 42 aufgenommenen Bildern.



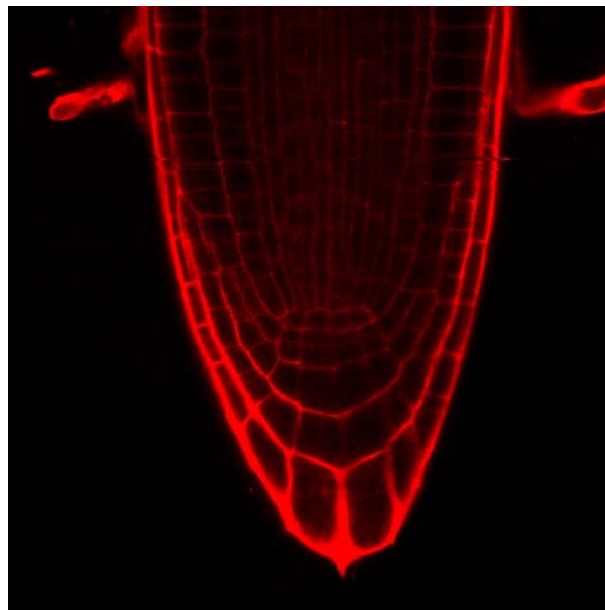
**Abbildung 100:** Drei CLSM-Aufnahmen von HeLa Zellen inkubiert mit 1  $\mu\text{M}$  Farbstoff **30**: Schnitt aus dem oberen Bereich der Zelle (links), aus dem mittleren Bereich der Zelle mit ausgespartem Zellkern (Mitte) und aus dem unteren Bereich der Zelle (rechts)

Die Verteilung des Farbstoffes **33** in der Zelle ist in Abbildung 101 gezeigt.



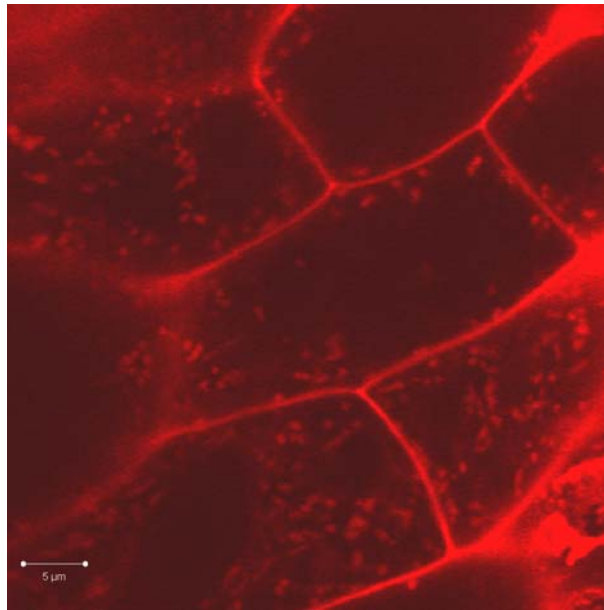
**Abbildung 101:** CLSM-Aufnahmen von HeLa Zellen inkubiert mit 1  $\mu$ M Farbstoff **33**: Durchlichtkanal (links), Fluoreszenzkanal (Mitte), Fluoreszenz und Durchlichtkanal überlagert (rechts)

Neben HeLa Zellen wurden auch Pflanzenwurzeln von *Arabidopsis Thaliana* angefärbt. Für das Experiment wurde ein Keimling für 30 min in eine 10  $\mu$ M Farbstofflösung getaucht. Anschließend wurde mit Wasser gewaschen und der Keimling mit CLSM untersucht. Die Farbstoffe reichern sich stark in den Zellwänden an (Abbildung 102).



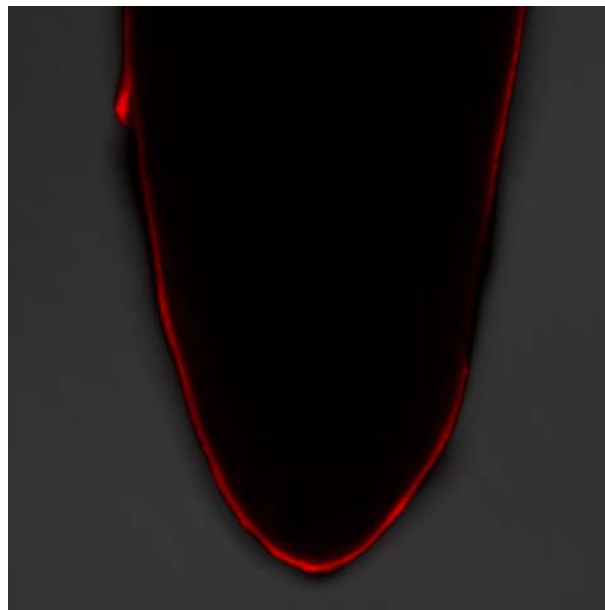
**Abbildung 102:** CLSM-Aufnahme einer Wurzelspitze von *Arabidopsis Thaliana* nach Inkubation mit 10  $\mu$ M Farbstoff **24**

In einer stärkeren Vergrößerung sieht man, dass Farbstoff **24** in *Arabidopsis Thaliana* Substrukturen im Cytosol anfärbt.



**Abbildung 103:** Optischer Schnitt durch Zellen aus der Wurzelspitze von *Arabidopsis Thaliana* nach Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Farbstoff **24**

Im Gegensatz zu HeLa Zellen zeigen die getesteten Pflanzenzellen eine starke Anfärbung durch **24**, aber kaum Anfärbung durch terpyridinfunktionalisierte Rhodamine (Abbildung 104).



**Abbildung 104:** CLSM-Aufnahme einer Wurzelspitze von *Arabidopsis Thaliana* nach Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Farbstoff **35**

## 7. Zusammenfassung

Xanthenfarbstoffe, die sich vom Rhodamin- und Fluorescein-Grundgerüst ableiten, zeichnen sich durch eine intensive Fluoreszenz im sichtbaren Bereich aus und sind daher als molekulare Sonden für bioanalytische Anwendungen und zelluläres Imaging von großer Relevanz.

In dieser Arbeit wurden Derivate von Xanthenfarbstoffen synthetisiert, die auf biologisch wichtige Metallionen ansprechen, ungewöhnliche Akkumulation und subzelluläre Verteilungen in lebenden Zellen zeigen oder Fluoreszenzsensoren für Redoxpotentiale sind.

Die wichtigsten neu entwickelten Sonden und ihre Anwendungen sind hier zusammengefasst:

- Fluorogene Sonde für  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen

Während literaturbeschriebene  $\text{Cu}^{2+}$ -Fluoreszenzsensoren durch Fluoreszenzlöschung auf  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen ansprechen ist Dipicolinoylfluorescein (**DPF**) **2** ein seltenes Beispiel für eine fluorogene  $\text{Cu}^{2+}$ -Sonde.

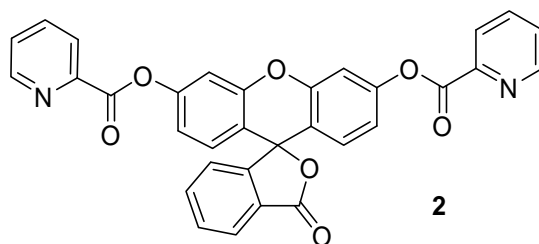
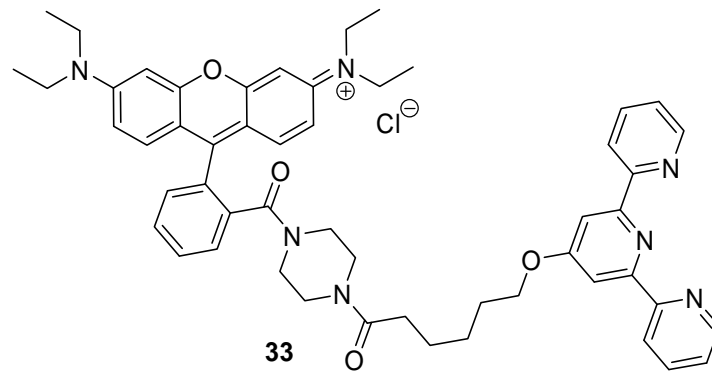


Abbildung 105: Dipicolinoylfluorescein

Durch  $\text{Cu}^{2+}$  vermittelte Esterhydrolyse wird Fluorescein gebildet. Das Detektionslimit liegt bei 100 nM  $\text{Cu}^{2+}$ . Die literaturbekannte fluorogene Sonde Diacetylfluorescein (**DAF**) **3** wurde für ein Screening der Esteraseaktivität von Rinderserumalbumin eingesetzt. Durch Dotierung mit  $\text{Cu}^{2+}$  und anderen Metallionen konnte die sehr schwache Aktivität geringfügig gesteigert werden, jedoch nicht in einem für präparative Anwendungen ausreichenden Maß.

- Metallbindende Sonde

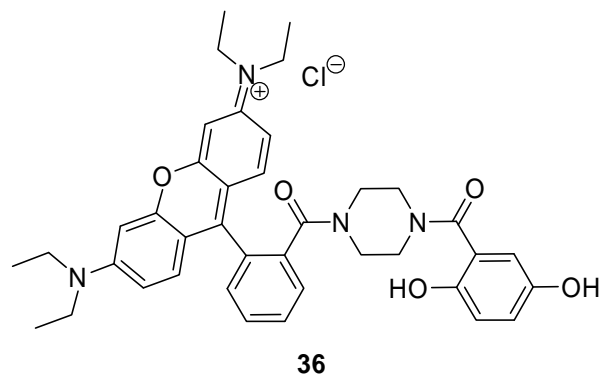
Das Terpyridin-Derivat **33** reichert sich ungewöhnlich stark in lebenden Zellen an. Dies könnte auf die intrazelluläre Assoziation der Terpyridin-Einheit mit  $\text{Zn}^{2+}$ , das proteingebunden ist, aber noch über freie Koordinationsstellen verfügt, zurückzuführen sein. Extrazelluläres  $\text{Zn}^{2+}$  verhindert durch die Komplexbildung die Aufnahme von **33** in die Zelle. Die zelluläre Aufnahme kann also durch extrazelluläres  $\text{Zn}^{2+}$  gesteuert werden. Dies ist interessant hinsichtlich der Entwicklung gewebsspezifischer Sonden und Wirkstoffe, da die extrazelluläre  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentration stark von Zelltyp und Gewebe abhängig ist.



**Abbildung 106:** 6-(2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy)hexansäure Rhodamin B Piperazinamid

- Redoxsensor

Während es fluoreszierende molekulare Sonden für intrazelluläre pH-Wert Messungen bereits in zahlreichen Varianten gibt, besteht ein Bedarf an Fluoreszenzsensoren für biologische Redoxpotentiale.



**Abbildung 107:** 2,5-Dihydroxybenzoessäure Rhodamin B Piperazinamid

Dem Design des Redoxsensors **36** liegt zugrunde, dass Chinone oft gute Fluoreszenzlöcher sind, während die reduzierte Hydrochinonform die Fluoreszenz meist wenig beeinflusst. Die Fluoreszenz von **36** wird reversibel gelöscht, wenn die Hydrochinonkomponente durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  zur Chinonform oxidiert wird. Mit Thiolen kann die Hydrochinonform und die Fluoreszenz regeneriert werden.

Allerdings liegt das Potential dieses Prototyps eines Redox-Fluoreszenzsensors auf Chinonbasis etwas außerhalb physiologischer Redoxpotentiale. Durch Funktionalisierung des Hydrochinons sollte es möglich sein ein passendes Potential einzustellen.



## 8. Präparativer Teil

Im präparativen Teil sind Arbeitsvorschriften und Analytikdaten der dargestellten Verbindungen aufgeführt. Die Synthesevorschriften der literaturbekannten sind verwendete größtenteils optimierte Protokolle. Alle nicht literaturbekannten Präparate sind mit einem „\*“ markiert. Alle Rhodamin B Piperazinamid-Farbstoffe und die Fluoresceinester sind außerdem mit Buchstabenkürzeln versehen

### 8.1. Chemikalien und Geräte

Lösungsmittel und Chemikalien wurden von den Firmen Acros Organics (Geel, Belgien), Sigma-Aldrich (München, Deutschland) oder dem Chemikalienlager des Theoretikums der Universität Heidelberg bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Wasserfreie Lösungsmittel wurden unter Argonatmosphäre über Molekularsieb aufbewahrt. Es wurde ausschließlich Wasser von HPLC-Qualität der Firma VWR International (Darmstadt) verwendet.

NMR-Spektren wurden auf einem AVANCE DPX 200 und einem AVANCE II 400 von Bruker (Rheinstetten, Deutschland) aufgenommen.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden mit  $^1\text{H}$ -Breitbandentkopplung erstellt. Deuterierte Lösungsmittel wurden von der Firma Deutero (Kastellaun, Deutschland) bezogen.

ESI-Massenspektren wurden auf einem Q-Tof Ultima API Massenspektrometer von Micromass/Waters (Milford Massachusetts, USA) aufgenommen. Als Referenz für HR-Massenspektren diente PEG-Mix oder Phosphorsäure.

Die UV/VIS-Spektren wurden mit einem Varian Cary 100 Bio UV/VIS-Spektrophotometer durchgeführt. Die Fluoreszenzspektren wurden mit einem Varian Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer aufgenommen. Alle Fluoreszenz und UV/Vis-Spektren wurden mit Wasser als Lösungsmittel gemessen.

Die HPLC-Trennungen wurden bei 22 °C an einem Shimadzu Flüssigkeitschromatographen durchgeführt, der mit einem UV/VIS-Detektor und einem Säulenofen ausgerüstet war. Als Säule wurde eine Nucleosil Phenyl-Säule (250 x 4,6 mm) der Firma Macherey-Nagel eingesetzt. Für die HPLC-Reinigung wurde eine 500 µl-Injektionsschleife verwendet. Für die Trennung wurde ein Lösungsmittelgradient von Acetonitril (Lösungsmittel B) und 0,1 M

Triethylammoniumacetat in Wasser (Lösungsmittel A) eingesetzt: in 35 min 0-25% B, in 10 min 25-90% B, 10 min 90% B.

Für Zelleexperimente wurden HeLa- $tc^{-}$ -Zellen (Cervixcarcinom) und LNCaP-Zellen (Prostatacarcinom) verwendet. Die Zellen wurden auf Deckgläsern in Petrischalen oder in 96-well Mikrotiterplatten kultiviert. Als Medium wurde phenolrothaltiges DMEM und zum Waschen PBS-Puffer verwendet. Experimente an Pflanzen wurden mit wild-type Arabidopsis Thaliana Keimlingen durchgeführt, die von A. Meyer, HIP, Universität Heidelberg kultiviert wurden.

Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop wurden an einem AXIOVERT 200 durchgeführt. Als Objektiv wurde entweder ein Zeiss 10x A-Plan 0,25NA oder ein Zeiss A-Plan 0,3NA verwendet. Die Durchlichtaufnahmen wurden im Phasenkontrastmodus aufgenommen. Die Fluoreszenzaufnahmen der Fluoresceinderivate wurden mit dem Fluoresceinfilter, die der Rhodamin Derivate mit einem Texas Red Filter durchgeführt. Bearbeitet wurden die Aufnahmen mit dem Programm Zeiss AxioVs 40 V 4.6.3.0.

Aufnahmen der HeLa-Zellen am CLSM wurden an einem Zeiss AXIOVERT 200M mit einem LSM 5 Pascal System der Arbeitsgruppe Spatz am PCI, Universität Heidelberg durchgeführt. Zur Anregung wurde ein HeNe-Laser mit einer Emissionsbande bei 543 nm verwendet. Als Objektiv für die 40fache Vergrößerung wurde ein Zeiss 40x C-Apochromat 1,20NA mit Wasserimmersion eingesetzt.

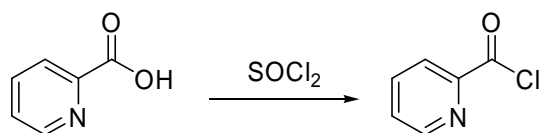
Aufnahmen der Arabidopsis Thaliana Keimlinge am CLSM wurden an einem Zeiss AXIOVERT 200M mit einem LSM 510 META System des Heidelberger Institutes für Pflanzenwissenschaften durchgeführt. Zur Anregung wurde ein HeNe-Laser mit einer Emissionsbande bei 543 nm verwendet. Als Objektiv wurde entweder ein Zeiss 25x Plan-Neofluar 0,8NA oder ein 63x C-Apochromat 1,2NA verwendet. Die Aufnahmen wurden mit dem Programm Zeiss LSM Image Browser Version 4,0,0,157 bearbeitet.

Enzymkinetikexperimente wurden in 96-well Mikrotiterplatten vom Fabrikat Cellstar der Firma Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich) an einer Genesis Workstation 150 der Firma Tecan (Crailsheim, Deutschland) vorbereitet. Die Reaktionskontrolle erfolgte mit einem Spectra-Fluor-Plus (für Absorptionsmessungen und Emissionsmessungen bei diskreten Wellenlängen v.a.  $\lambda_{\text{abs}} = 490 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 513 \text{ nm}$ ) und ArrayScan (für die Aufnahme ganzer Spektren 200–800 nm) der Firma Tecan (Crailsheim, Deutschland).

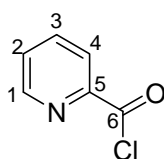
Für Mikroansätze wurden low retention Reaktionsgefäße (0,6 und 1,7 ml) der Firma Kisker (Steinfurt, Deutschland) bzw. Safe Lock Reaktionsgefäße (1,7 ml) der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) benutzt. Die Reaktionen wurden mit einem Thermomixer comfort für 1,5 ml Reaktionsgefäße der Firma Eppendorf temperiert und durchmischt.

## 8.2. Synthesen

### Picolinoylchlorid **1** <sup>[80]</sup>



12,3 g (0,1 mol) Picolinsäure wurden in einem Rundkolben vorgelegt und 30 ml Thionylchlorid hinzugesetzt. Die Reaktionsmischung verfärbte sich grün. Es wurde 30 min bei RT gerührt, bis sich alles gelöst hat. Anschließend wurde das Thionylchlorid abdestilliert und der Rückstand mit 100 ml Ether versetzt. Das Produkt wurde abgesaugt und im Exsikkator getrocknet. Man erhielt 13,8 g (97,8 mmol, 98 %) eines blaugrauen Feststoffes.



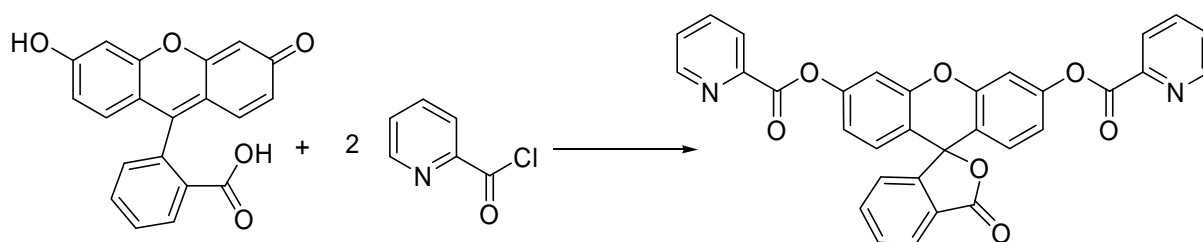
<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz)

$\delta = 7,70-7,89$  (m, 1 H, H-2), 8,08- 8,31 (m, 2 H, H-3 u. H-4), 8,79 (d, <sup>3</sup>J = 4,73 Hz, 1 H, H-1)

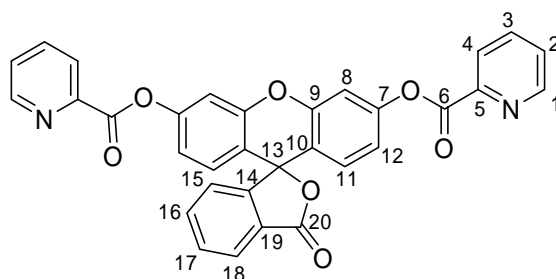
<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 50 MHz)

$\delta = 126,1$  (C-4), 128,7 (C-2), 141,5 (C-3), 146,2 (C-1), 147,8 (C-5), 164,7 (C-6)

### Dipicolinoylfluorescein **2\*** [DPF]



4,2 g (30 mmol) Picolinoylchlorid wurden in 50 ml absolutem DMF gelöst. 1,0 g (3 mmol) Fluorescein wurde in 30 ml absolutem Pyridin gelöst. Die beiden Lösungen wurden vereint und über Nacht bei RT gerührt. Die Lösungsmittel wurden destillativ abgetrennt. Der Rückstand, ein dunkelgrünes Öl, wurde in DMF aufgenommen und mittels Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat:Hexan 8:1) gereinigt. Dabei erhielt man einen hellgelben Feststoff. Nach Umkristallisieren des Produkts aus Aceton und Hexan erhielt man 0,37 g (0,68 mmol, 23% Ausbeute) weißen Feststoff.



**<sup>1</sup>H-NMR** (Aceton-d<sub>6</sub>, 200 MHz)

$\delta$  = 7,07 (d, <sup>3</sup>J = 8,68 Hz, 2 H, H-11), 7,18 (dd, <sup>3</sup>J = 8,68 Hz, <sup>4</sup>J = 2,25 Hz, 2 H, H-12), 7,47 (d, <sup>4</sup>J = 2,19 Hz, 2 H, H-8), 7,51 (d, <sup>3</sup>J = 7,12 Hz, 1 H, H-15), 7,72 (ddd, <sup>3</sup>J = 7,6 Hz, J = 4,68 Hz, <sup>4</sup>J = 1,18 Hz, 2 H, H-16 u. H-17), 7,85 (m, 2 H, H-2), 8,07 (d, <sup>3</sup>J = 7,5 Hz, 1 H, H-18), 8,08 (dt, <sup>3</sup>J = 7,75 Hz, <sup>4</sup>J = 1,74 Hz, 2 H, H-3), 8,29 (d, <sup>3</sup>J = 7,83 Hz, 2 H, H-4), 8,87 (ddd, <sup>3</sup>J = 7,6 Hz, <sup>4</sup>J = 1,59 Hz, <sup>5</sup>J = 0,84 Hz, 2 H, H-1)

**<sup>13</sup>C- NMR** (Chloroform-d<sub>1</sub>, 50 MHz)

$\delta$  = 90,9 (C-13), 110,7 (C-8), 116,9 (C-12), 117,9 (C-10), 125,3 (C-4), 126,1 (C-17), 126,2 (C-19), 127,7 (C-2), 129,1 (C-15), 130,0 (C-11), 130,1 (C-18), 135,4 (C-16), 137,3 (C-3), 147,0 (C-5), 150,2 (C-1), 151,7 (C-7), 152,3 (C-9), 152,8 (C-14), 163,3 (C-6), 170,8 (C-20)

**ESI<sup>+</sup>-HR-MS** m/z C<sub>32</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup>

berechnet: 543,1192

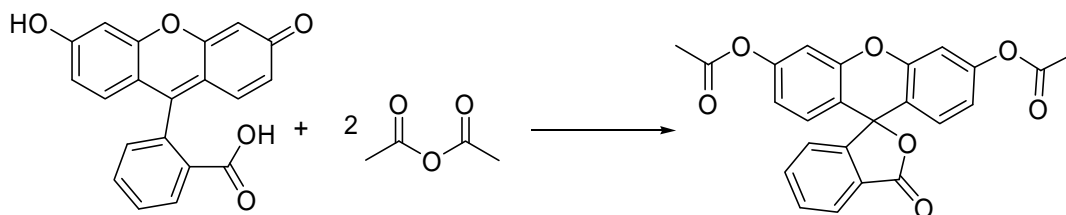
gefunden: 543,1167

**Elementaranalyse** [Verbindung+H<sub>2</sub>O] C<sub>32</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>

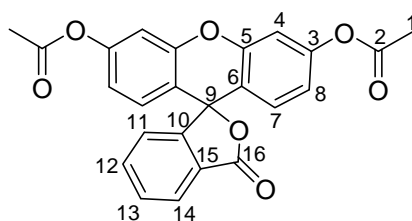
berechnet: C 68,57 H 3,6 N 5,0

gefunden: C 68,79 H 3,56 N 5,12

## Diacetylfluorescein 3 [DAF] <sup>[13]</sup>



0,5 g (1,5 mmol) Fluorescein wurde in 25 ml Acetanhydrid suspendiert und 10 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wurde unter Eiskühlung 100 ml Ethanol zugegeben. Das Lösungsmittel wurde abrotiert: Man erhielt 382 mg eines gelblichen Feststoffs. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO<sub>2</sub>, Chloroform:Methanol 8:1) erhielt man 305 mg (0,73 mmol, 49 %) eines weißen Feststoffes.

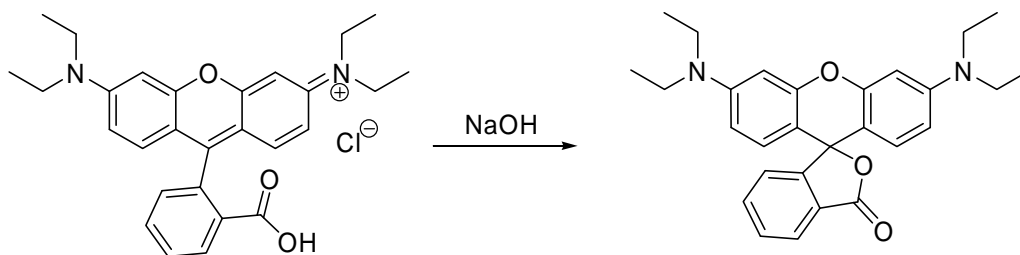


<sup>1</sup>H-NMR (Methanol-d<sub>4</sub>, 200 MHz)

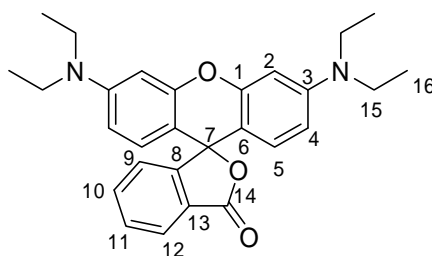
$\delta$  = 2,31 (s, 6 H, H-1), 6,9 (m, 4 H, H-7 u. H-8), 7,21 (dd, <sup>4</sup>J = 1,80 Hz, 2 H, H-4), 7,28 (d, <sup>3</sup>J = 7,58 Hz, 1 H, H-11), 7,78 (m, 2 H, H-12 u. H-13), 8,07 (d, <sup>3</sup>J = 7,74 Hz, 1 H, H-14)

<b>ESI<sup>+</sup>-HR-MS</b>	m/z	C <sub>24</sub> H <sub>17</sub> O <sub>7</sub> <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	berechnet:	417,0974
				gefunden:	417,0971

**R<sub>f</sub>** 0,51 (SiO<sub>2</sub>, Essigester:Methanol 5:1)

Rhodamin B Base 4 <sup>[92]</sup>

42,1 g Kaliumhydroxid (0,75 mol) wurden in 500 ml Wasser gelöst und mit 20,0 g (41,8 mmol) Rhodamin B versetzt. Nach Zugabe von 500 ml Essigester wurde das Reaktionsgemisch 2 Tage bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit Essigester extrahiert. Die organische Phase wurde mit wässriger Kalilauge und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Als Produkt wurden 17,9 g (40,4 mmol, 97 %) eines violetten Schaums erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (Chloroform-d<sub>1</sub>, 400 MHz)

$\delta = 1,17$  (t,  $^3J = 7,06$  Hz, 12 H, H-16),  $3,36$  (q,  $^3J = 7,06$  Hz, 8 H, H-15),  $6,33$  (dd,  $^3J = 8,92$  Hz,  $^4J = 2,57$  Hz, 2 H, H-4),  $6,44$  (d,  $^4J = 2,53$  Hz, 2 H, H-2),  $6,56$  (d,  $^3J = 8,89$  Hz, 2 H, H-5),  $7,21$  (d,  $^3J = 7,55$  Hz, 1 H, H-9),  $7,57$  (dt,  $^3J = 7,35$  Hz,  $^4J = 0,75$  Hz, 1 H, H-11),  $7,63$  (dt,  $^3J = 7,45$  Hz,  $^4J = 1,04$  Hz, 1 H, H-10),  $8,0$  (d,  $^3J = 7,47$  Hz, 1 H, H-12)

**<sup>13</sup>C NMR** (Chloroform-d<sub>1</sub>, 100 MHz)

$\delta = 12,5$  (C-16),  $44,5$  (C-15),  $97,6$  (C-2),  $106$  (C-6),  $108$  (C-4),  $124,2$  (C-11),  $124,8$  (C-9),  $128$  (C-13),  $129$  (C-5),  $129,1$  (C-12),  $134,3$  (C-10),  $149,5$  (C-3),  $152,8$  (C-8),  $153,4$  (C-1),  $169,9$  (C-14)

<b>ESI<sup>+</sup>-HR-MS</b> m/z	$C_{28}H_{31}N_2O_3^+$	$[M+H]^+$	berechnet:	443,2335
			gefunden:	443,2314

**UV/Vis**  $\lambda = 554 \text{ nm}$   $\epsilon = 97\,000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

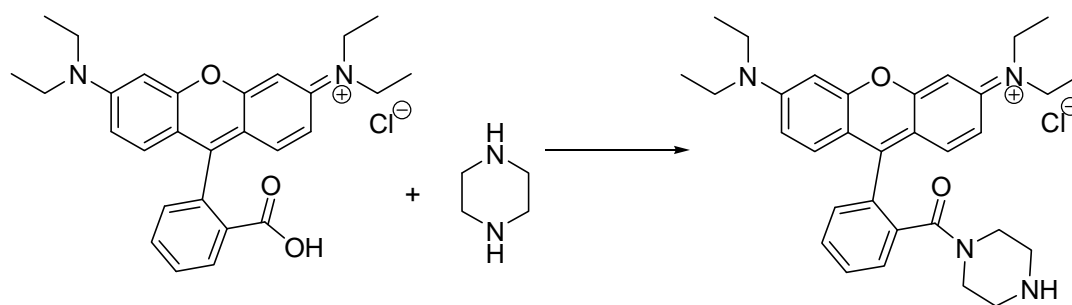
**Fluoreszenz**  $\lambda_{\text{abs}} = 556 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{em}} = 582 \text{ nm}$

**R<sub>f</sub>** 0,2 (SiO<sub>2</sub>, Essigester:Methanol 5:1)

0,7 (SiO<sub>2</sub>, Chloroform:Methanol 5:1)

**HPLC** Retentionszeit 47,7 min

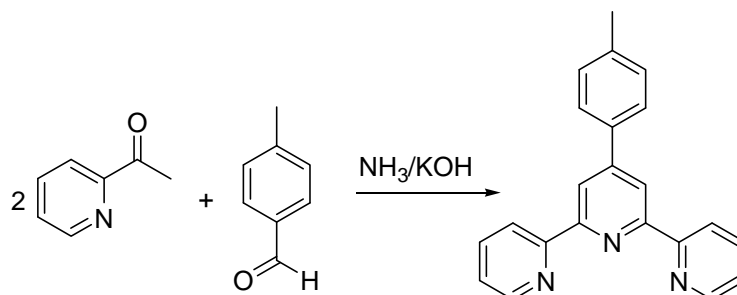
## Rhodamin B Piperazinamid **5** [P] <sup>[92]</sup>



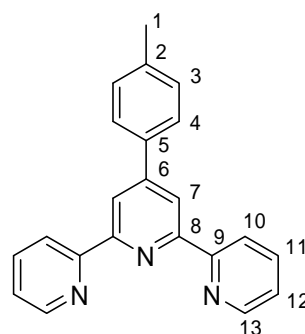
5,6 g (65,1mmol) Piperazin wurden unter Argon in 63 ml absolutem Methylenchlorid gelöst und bei RT tropfenweise mit 16,3 ml (32,6 mmol) Trimethylaluminium (2 M in Toluol) versetzt. Die Suspension wurde 1 h bei RT gerührt. 7,2 g (16,3 mmol) Rhodamin B Base wurden unter Argon in 30 ml absolutem Methylenchlorid gelöst und bei RT zum Reaktionsgemisch getropft. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h unter Rückfluss erhitzt. Nach beendeter Reaktion wurde 0,1 M Salzsäure zugetropft bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war. Durch Filtration wurde der Feststoff abgetrennt und mehrmals mit Methylenchlorid und Methylenchlorid:Methanol 4:1 gewaschen. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit, wobei ein violetter Feststoff zurückblieb. Dieser wurde erneut in wenig Methylenchlorid gelöst und durch Filtration von unlöslichem Rückstand getrennt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der violett glänzende Schaum in 300 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gelöst. Die Lösung wurde mit Essigester gewaschen und die organischen Phasen verworfen. Die wässrige Phase wurde mit Natriumchlorid gesättigt und mit 1 M Salzsäure angesäuert. Es wurde mit





4'-(p-Tolyl)-2,2':6',2''-terpyridin **6** [33]

1,17 ml (10 mmol) 4-Tolylaldehyd und 2,24 ml (20 mmol) 2-Acetylpyridin wurden in 50 ml Ethanol gelöst und mit 1,54 g (27,5 mmol) Kaliumhydroxid sowie 29 ml (390,0 mmol) 25 %iger wässriger Ammoniaklösung versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 3 Tage bei RT gerührt und nach erfolgter Umsetzung filtriert. Der graue Rückstand wurde mit Ethanol gewaschen und in sehr wenig Chloroform gelöst. Mit Methanol wurden aus dieser Lösung 0,90g (2,8 mmol, 28 %) reines Produkt als weißer Feststoff ausgefällt.

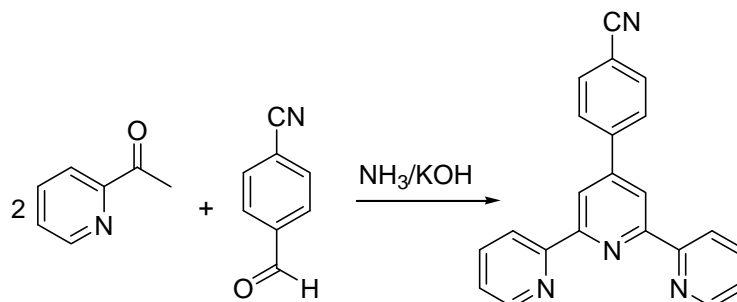
 **$^1\text{H-NMR}$**  (Chloroform- $d_1$ , 200 MHz)

$\delta = 2,43$  (s, 3 H, H-1), 7,32 (d,  $^3\text{J} = 8,16$  Hz, 2 H, H-3), 7,37 (m, 2 H, H-12), 7,84 (d,  $^3\text{J} = 8,11$  Hz, 2 H, H-4), 7,91 (dt,  $^3\text{J} = 7,58$  Hz,  $^4\text{J} = 1,77$  Hz, 2 H, H-11), 8,69 (d,  $^3\text{J} = 7,97$  Hz, 2 H, H-3), 8,74 (ddd,  $^3\text{J} = 4,67$  Hz,  $^3\text{J} = 1,72$  Hz,  $^3\text{J} = 0,84$  Hz, 2 H, H-13), 8,76 (s, 2 H, H-7)

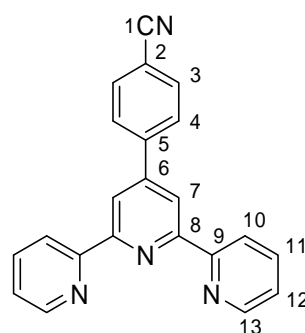
 **$^{13}\text{C-NMR}$**  (Chloroform- $d_1$ , 50 MHz)

$\delta = 21,3$  (C-1), 118,9 (C-7), 121,6 (C-12), 123,9 (C-10), 127,2 (C-4), 129,7 (C-3), 135,3 (C-5), 137,3 (C-11), 139,2 (C-2), 148,8 (C-13), 150,3 (C-6), 155,5 (C-9), 156,0 (C-8)

**ESI<sup>+</sup>-MS** m/z      324  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 346  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

4'-(4-Cyanophenyl)-2,2':6',2''-terpyridin **7** <sup>[33]</sup>

2,25 g (15 mmol) 4-Cyanobenzaldehyd und 3,36 ml (30 mmol) 2-Acetylpyridin wurden in 75 ml Ethanol gelöst und mit 1,68 g (30 mmol) Kaliumhydroxid sowie 58 ml (780,0 mmol) 25 %iger wässriger Ammoniaklösung versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 3 Tage bei RT gerührt und nach erfolgter Umsetzung filtriert. Der graue Rückstand wurde dreimal mit je 20 ml Ethanol gewaschen und in sehr wenig Chloroform gelöst. Mit Methanol wurden aus dieser Lösung 2,80 g (8,34 mmol, 56 %) reines Produkt als weißer Feststoff ausgefällt.



**<sup>1</sup>H-NMR** (Chloroform-d<sub>1</sub>, 400 MHz,)

$\delta = 7,37$  (ddd,  $^3J = 7,43$  Hz,  $^3J = 4,76$  Hz,  $^3J = 1,09$  Hz, 2 H, H-12),  $7,79$  (d,  $^3J = 8,47$  Hz, 2 H, H-3 o. H-4),  $7,89$  (dt,  $^3J = 7,85$  Hz,  $^4J = 1,78$  Hz, 2 H, H-11),  $7,97$  (d,  $^3J = 8,42$  Hz, 2 H, H-3 o. H-4),  $8,66$  (d,  $^3J = 7,95$  Hz, 2 H, H-10),  $8,70$  (s, 2 H, H-7),  $8,71$  (m, 2 H, H-13)

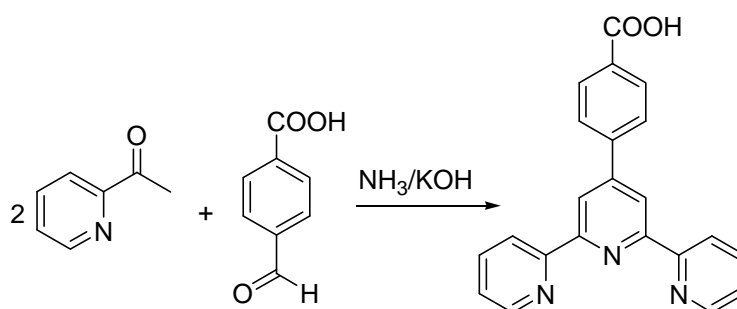
**<sup>13</sup>C-NMR** (Chloroform-d<sub>1</sub>, 100 MHz,)

$\delta = 112,6$  (C-2),  $118,6$  (C-1),  $118,7$  (C-7),  $121,4$  (C-12),  $124,1$  (C-10),  $128,0$  (C-4),  $132,7$  (C-3),  $127,0$  (C-11),  $143,0$  (C-5),  $148,2$  (C-6),  $149,1$  (C-13),  $155,7$  (C-9),  $156,3$  (C-8)

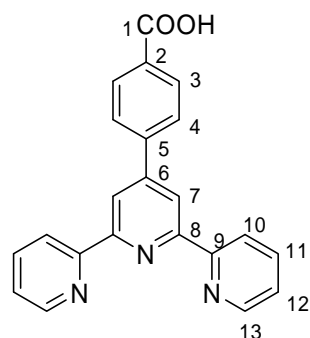
**ESI<sup>+</sup>-HR-MS** m/z C<sub>22</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> berechnet: 335,1297  
 gefunden: 335,1307

**R<sub>f</sub>** 0,4 (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat)

### 4'-(4-Carboxyphenyl)-2,2':6',2''-terpyridin **8** [33]

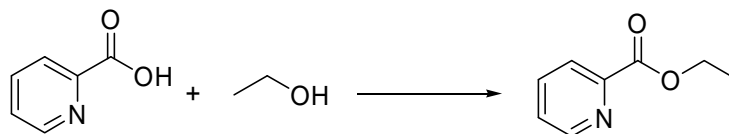


0,8 g (5,3 mmol) 4-Carboxybenzaldehyd und 1,2 ml (10,7 mmol) 2-Acetylpyridin wurden in 100 ml Ethanol gelöst und mit 0,9 g (16,0 mmol) Kaliumhydroxid, sowie 10 ml (134,0 mmol) 25 %iger wässriger Ammoniaklösung versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 3 Tage bei RT gerührt und nach erfolgter Umsetzung filtriert. Der grünliche Rückstand wurde mit Ethanol gewaschen und in sehr wenig Wasser gelöst. Mit Aceton wurden aus dieser Lösung 280 mg (0,8 mmol, 15 %) Produkt als weißer Feststoff ausgefällt.

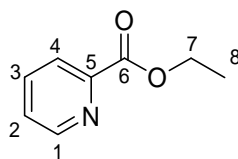


**<sup>1</sup>H-NMR** (Chloroform-d<sub>1</sub>, 200 MHz,)

δ = 7,53 (dd, <sup>3</sup>J = 7,08 Hz, <sup>3</sup>J = 5,2 Hz, 2 H, H-12), 7,80 (d, <sup>3</sup>J = 8,34 Hz, 2 H, H-4), 8,02 (m, 4 H, H-3 u. H-11), 8,68 (d, <sup>3</sup>J = 7,76 Hz, 2 H, H-10), 8,73 (s, 2 H, H-7), 8,77 (d, <sup>3</sup>J = 4,05 Hz, 2 H, H-13)

Ethylpicolinat **9** <sup>[93]</sup>

15 g (122 mmol) Picolinsäure wurden in 600 ml Ethanol gelöst. Anschließend wurden 15 ml konz. Salzsäure zugegeben. Die Lösung wurde 12 h zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Lösungsmittel so lange am Vakuum abgezogen, bis ein Niederschlag beobachtet werden konnte. Daraufhin wurden 300 ml Wasser zugesetzt und die Lösung anschließend mit festem Natriumhydrogencarbonat versetzt, bis ein pH-Wert von 8 erreicht wurde. Dann wurde mit Methylenchlorid extrahiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das erhaltene gelbe Öl wurde destilliert (0,4 mbar, 75 °C). Es wurden 13,4 g (73 %) Ethylpicolinat als farblose Flüssigkeit erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (Chloroform-d<sub>1</sub>, 200 MHz)

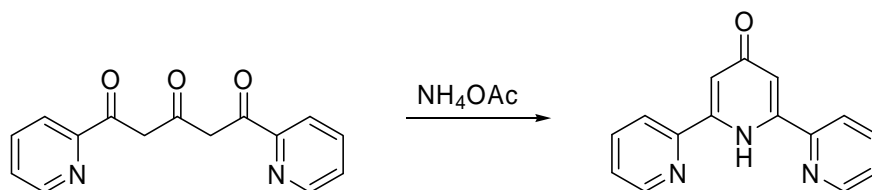
$\delta$  = 1,43 (t, <sup>3</sup>J = 7,13 Hz, 3 H, H-8), 4,47 (q, <sup>3</sup>J = 7,13 Hz, 2 H, H-7), 7,46 (ddd, <sup>3</sup>J = 7,61 Hz, <sup>3</sup>J = 4,75 Hz, <sup>4</sup>J = 1,23 Hz, 1 H, H-2), 7,83 (dt, <sup>3</sup>J = 7,76 Hz, <sup>4</sup>J = 1,76 Hz, 1 H, H-3), 8,13 (dd, <sup>3</sup>J = 7,80 Hz, <sup>4</sup>J = 1,14 Hz, 1 H, H-4), 8,75 (d, <sup>3</sup>J = 4,73 Hz, 1 H, H-1).

**<sup>13</sup>C-NMR** (Chloroform-d<sub>1</sub>, 50 MHz)

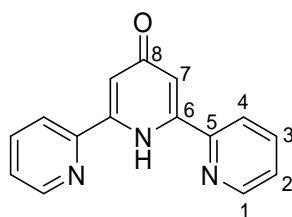
$\delta$  = 14,3 (C-8), 62,0 (C-7), 125,1 (d, C-4), 126,8 (d, C-2), 137,0 (C-3), 148,2 (C-5), 149,8 (C-1), 165,3 (C-6).

**ESI<sup>+</sup>-MS** m/z      152 [M+H]<sup>+</sup>, 174 [M+Na]<sup>+</sup>



2,6-Di(pyridin-2'-yl)pyridin-4(1*H*)-on **11** <sup>[35]</sup>

1,2 g (4.6 mmol) 1,3-Dipicolinoylacetone und 2,5 g Ammoniumacetat (32,4 mmol) wurden in 30 ml Ethanol gelöst und anschließend 6 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die braune Reaktionslösung im Vakuum auf die Hälfte ihres Volumens eingengt. Der über Nacht im Kühlschrank ausgefallene Feststoff wurde abgesaugt und mit Diethylether gewaschen. Es wurden 0,9 g (79 %) Produkt als leicht bräunliche Nadeln erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (Chloroform-*d*<sub>1</sub>, 200 MHz)

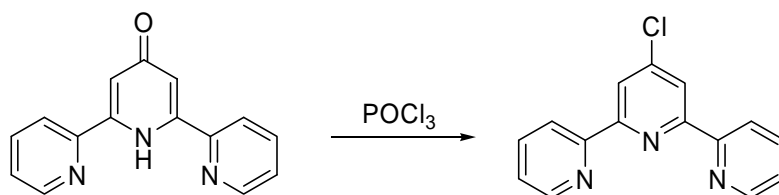
$\delta$  = 7,07 (s, 2 H, H-7), 7,44 (ddd, <sup>3</sup>J = 6,78 Hz, <sup>3</sup>J = 4,81 Hz, <sup>4</sup>J = 1,79 Hz, 2 H, H-2), 7,88 (dt, <sup>3</sup>J = 8,04 Hz, <sup>4</sup>J = 1,60 Hz, 2 H, H-3), 7,95 (m, 2 H, H-4), 8,78 (td, <sup>3</sup>J = 4,81 Hz, <sup>4</sup>J = 1,25 Hz, 2 H, H-1), 11,95 (s, 1 H, NH).

**<sup>13</sup>C-NMR** (Chloroform-*d*<sub>1</sub>, 50 MHz)

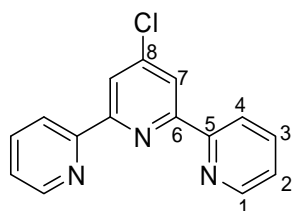
$\delta$  = 113,8 (C-7), 120,3 (C-4), 125,0 (C-2), 137,6 (C-3), 144,1(C-1), 148,8 (C-5), 149,4 (C-6), 181,0 (C-8)

<b>ESI<sup>+</sup>-HR-MS</b> m/z	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	berechnet:	250,0980
			gefunden:	250,0995

**R<sub>f</sub>** 0,4 (SiO<sub>2</sub>, Chloroform:Methanol 5:1)

4'-Chlorterpyridin **12** <sup>[35]</sup>

Eine Mischung aus 1,10g (4,40 mmol) 2,6-Di(pyridin-2'-yl)pyridin-4(1*H*)-on und 2,00 g  $\text{PCl}_5$  (30,10 mmol) in 55 ml  $\text{POCl}_3$  wurde 12 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde destillativ (1,3 mbar, 84 °C) entfernt. Der Rückstand wurde in 50 ml Wasser aufgenommen und die stark saure Lösung mit wässriger KOH-Lösung alkalisch gemacht. Die so entstehende weiße Suspension wurde mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der hellbraune Feststoff wurde aus Methanol umkristallisiert. Es wurden 0,34 g (1,27 mmol, 29 %) Produkt als bräunliche Nadeln erhalten.



<sup>1</sup>**H-NMR** (Chloroform-*d*<sub>1</sub>, 200 MHz)

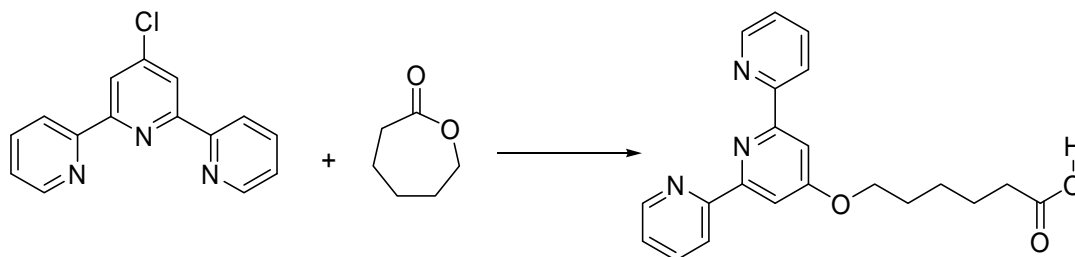
$\delta = 7,37$  (ddd, <sup>3</sup>*J* = 7,50 Hz, <sup>3</sup>*J* = 4,80 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1,20 Hz, 2 H, H-2), 7,88 (dt, <sup>3</sup>*J* = 7,86 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1,79 Hz, 2 H, H-3), 8,50 (s, 2 H, H-7), 8,61 (td, <sup>3</sup>*J* = 7,97 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1,00 Hz, 2 H, H-4), 8,72 (ddd, <sup>3</sup>*J* = 4,81 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1,75 Hz, <sup>5</sup>*J* = 0,88 Hz, 2 H, H-1)

<sup>13</sup>**C-NMR** (Chloroform-*d*<sub>1</sub>, 50 MHz)

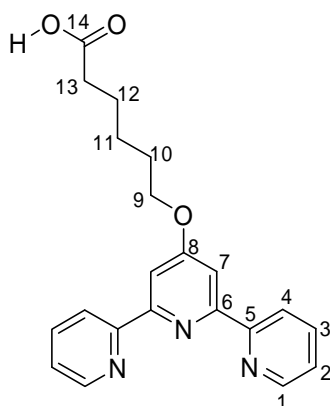
$\delta = 121,2$  (C-7), 121,4 (C-5), 124,3 (C-2), 137,0 (C-6), 146,4 (C-3), 149,2 (C-8), 155,0 (C-1), 156,8 (C-4)

<b>ESI<sup>+</sup>-HR-MS</b> m/z	$\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{Cl}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	berechnet:	268,0642
			gefunden:	268,0669

**R<sub>f</sub>** 0,2 (SiO<sub>2</sub>, Chloroform:Methanol 5:1)

6-(2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy)hexansäure **13** [37]

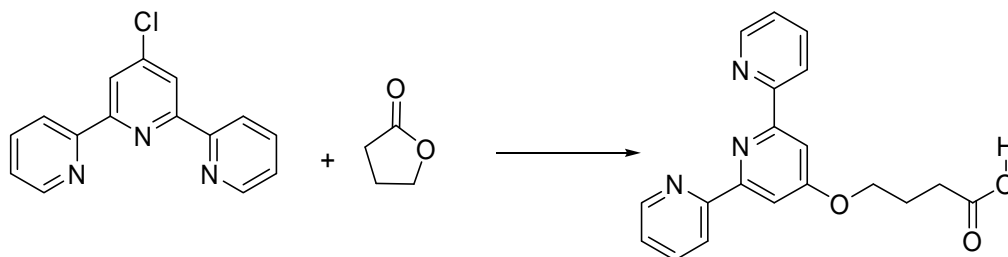
121  $\mu\text{l}$  (1,12 mmol, 124,7 mg)  $\epsilon$ -Caprolacton wurde langsam zu einer Suspension von 125 mg (2,24 mmol) KOH in 5 ml DMSO zugetropft. Nachdem 30 min bei 60 °C erhitzt wurde, wurden 200 mg (0,75 mmol) 4'-Chlorterpyridin zugegeben. Anschließend wurde 3 Tage bei 60 °C erhitzt. Nach beendeter Reaktion wurde ca. 50 ml Wasser zu der Reaktionsmischung gegeben und mit 3-4 Tropfen konz. HCl schwach angesäuert. Der ausgefallene weiße Feststoff wurde abgesaugt und in wenig THF umkristallisiert. Man erhielt 138 mg (0,43 mmol, 38 %) eines weißen Feststoffes.

 **$^1\text{H-NMR}$**  (Chloroform- $d_1$ , 200 MHz)

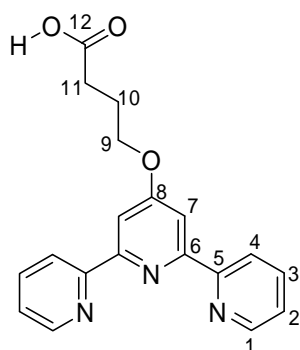
$\delta$  = 1,30-1,70 (m, 6 H, H-10 u. H-11 u. H-12), 2,34 (t,  $^3\text{J}$  = 7,48 Hz, 2 H, H-13), 4,08 (t,  $^3\text{J}$  = 6,40 Hz, 2 H, H-9), 7,35 (ddd,  $^3\text{J}$  = 4,80 Hz,  $^3\text{J}$  = 3,50 Hz,  $^4\text{J}$  = 1,10 Hz, 2 H, H-2), 7,9 (ddd,  $^3\text{J}$  = 7,50 Hz,  $^3\text{J}$  = 5,80 Hz,  $^4\text{J}$  = 1,60 Hz, 2 H, H-3), 8,00 (s, 2 H, H-7), 8,6 (d,  $^3\text{J}$  = 8,00 Hz, 2 H, H-4), 8,70 (d,  $^3\text{J}$  = 4,90 Hz, 2H, H-1)

**ESI<sup>+</sup>-MS** m/z      364 [M+H]<sup>+</sup>



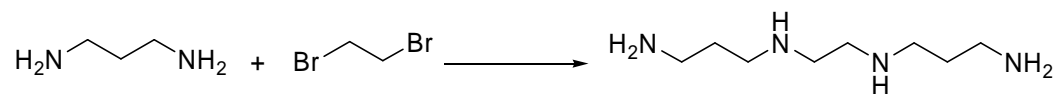
4-([2,2':6',2''-Terpyridin]-4'-yloxy)butansäure **14** <sup>[37]</sup>

119  $\mu\text{l}$  (1,12 mmol, 97 mg)  $\gamma$ -Butyrolacton wurde langsam zu einer Suspension von 125 mg (2,24 mmol) KOH in 5 ml DMSO zugetropft. Nachdem 30 min bei 60 °C erhitzt wurde, wurden 200 mg (0,75 mmol) 4'-Chlorterpyridin zugegeben. Anschließend wurde 3 Tage bei 60 °C erhitzt. Nach beendeter Reaktion wurde ca. 50 ml Wasser zu der Reaktionsmischung gegeben und mit 3-4 Tropfen konz. HCl schwach angesäuert. Der ausgefallene weiße Feststoff wurde abgesaugt und in wenig THF umkristallisiert. Man erhielt 102 mg (0,28 mmol, 25 %) eines weißen Feststoffes.

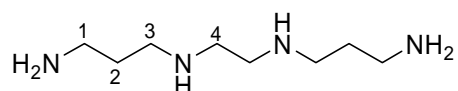
**<sup>1</sup>H-NMR** (Chloroform-d<sub>1</sub>, 200 MHz)

$\delta$  = 1,85 (t, <sup>3</sup>J = 7,10 Hz, 2 H, H-10), 2,22 (t, <sup>3</sup>J = 6,34 Hz, 2 H, H-11), 4,31 (t, <sup>3</sup>J = 6,03 Hz, 2 H, H-9), 7,31 (m, 2 H, H-2), 7,85 (dt, <sup>3</sup>J = 7,54 Hz, <sup>4</sup>J = 1,85 Hz, 2 H, H-3), 7,98 (s, 2 H, H-7) 8,70 (ddd, <sup>3</sup>J = 4,77 Hz, <sup>4</sup>J = 1,71 Hz, <sup>5</sup>J = 0,88 Hz, 2 H, H-4), 8,79 (d, <sup>3</sup>J = 5,09 Hz, 2 H, H-1)

**ESI<sup>+</sup>-MS** m/z      336 [M-Cl]<sup>+</sup>

1,5,8,12 Tetraazadodecan **15** <sup>[94]</sup>

75 ml (902 mmol) Diaminopropan wurden unter Argon vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. 9 ml (105 mmol) Ethylendibromid wurden langsam unter Rühren zugetropft, wobei sich die Reaktionslösung stark erwärmte. Nach beendeter Zugabe wurde für 4 h auf 110 °C erhitzt. Es wurden 15 g (268 mmol) Kaliumhydroxid zugegeben und für weitere 2 h auf 110 °C erhitzt. Nach Filtration wurde das Produkt durch Destillation (160 °C, 3,4 mbar) erhalten, wobei zunächst unverbrauchtes Diaminopropan bei RT und 3,4 mbar entfernt werden musste. Es wurden 8,9 g (52 mmol, 49 %) eines farblosen Öls als Produkt erhalten.

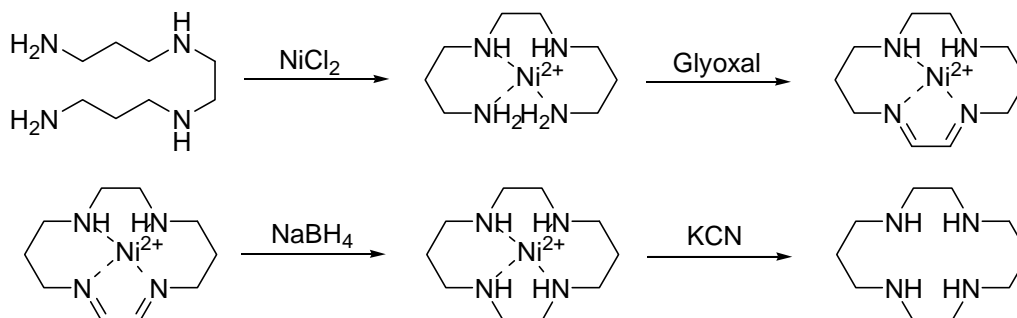


<sup>1</sup>H-NMR (Chloroform-d1, 200 MHz)

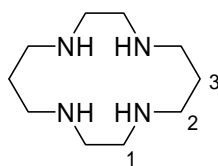
$\delta = 1,11$  (s, 6 H, NH u. NH<sub>2</sub>), 1,47 (q, <sup>3</sup>J = 6,90 Hz, 4 H, H-2), 2,48-2,64 (m, 12 H, H-1 u. H-3 u. H-4)

<sup>13</sup>C-NMR (Chloroform-d1, 50 MHz)

$\delta = 34,2$  (C-2), 40,8 (C-1), 48,1 (C-3), 49,9 (C-4)

Cyclam **16** <sup>[44]</sup>

8,76 g (49,8 mmol) 1,5,8,12-Tetraazadodecan wurden in 250 ml Wasser bei 0 °C vorgelegt, mit 11,90 g (49,8 mmol) Nickel(II)chlorid Hexahydrat versetzt und 15 min gerührt. Nach Zugabe von 7,30 ml (49,8 mmol) 40 %-iger Glyoxallösung wurde auf RT erwärmt und für weitere 2,5 h gerührt. Die braune Reaktionslösung wurde erneut auf 0 °C gekühlt und portioniert mit 3,68 g (97 mmol) Natriumborhydrid versetzt. Danach wurde für 20 min auf 90 °C erhitzt. Die abgekühlte Reaktionslösung wurde filtriert. Zum erhaltenen Filtrat wurden 13,00 g (200 mmol) Kaliumcyanid zugegeben und für 2 h bei 100 °C gerührt. Nach Abkühlen wird die Lösung mit 22,4 g (400,0 mmol) Kaliumhydroxid in 200 ml Wasser versetzt und mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer auf ca. 40 ml eingengt. Das Produkt wurde aus der konzentrierten Lösung mit DMSO bei -20 °C ausgefällt. Es wurden 3,83 g (19,2 mmol, 39 %) Cyclam als faseriger, kristalliner, weißer Feststoff erhalten.



**<sup>1</sup>H-NMR** (Chloroform-d<sub>1</sub>, 200 MHz)

$\delta = 1,72$  (q,  $^3J = 5,2$  Hz, 4 H, H-3),  $2,32$  (s, 4 H, **NH**),  $2,68$  (s, 8 H, H-1),  $2,74$  (t,  $^3J = 5,20$  Hz, 8 H, H-2)

**<sup>13</sup>C-NMR** (Chloroform-d<sub>1</sub>, 50 MHz)

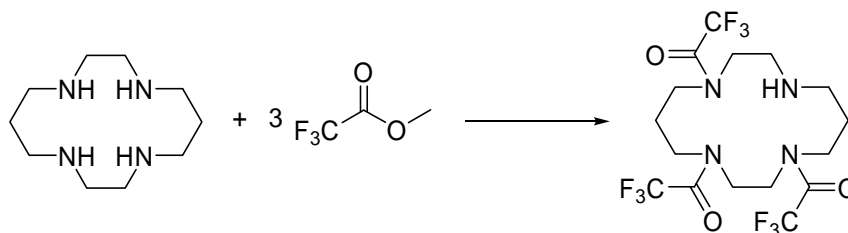
$\delta = 29,4$  (C-3),  $49,4$  (C-1),  $50,8$  (C-2)

**ESI<sup>+</sup>-HR-MS** m/z C<sub>10</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>

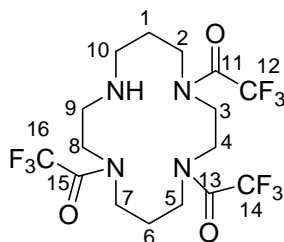
[M+H]<sup>+</sup>

berechnet: 201,2079

gefunden: 201,2085

1,4,8-Tris-(trifluoracetyl)-cyclam **17** <sup>[46]</sup>

3,02 g (15,2 mmol) Cyclam und 2,2 ml (15,2 mmol) Triethylamin wurden bei 0 °C unter Argonatmosphäre in 11 ml Methanol vorgelegt. Nach Zugabe von 7,3 ml (67,1 mmol) Trifluoressigsäureethylester wurde die Reaktionslösung für 19 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat:Hexan 10:1) erhielt man 4,57 g (9,4 mmol, 63 %) eines porösen, weißen Feststoffes.



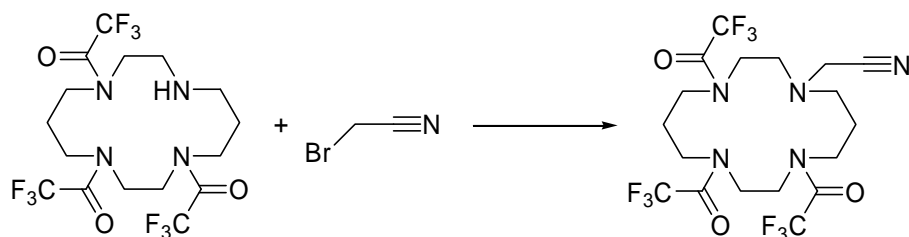
**<sup>1</sup>H-NMR** (Chloroform-d<sub>1</sub>, 400 MHz)

$\delta$  = 1,83 (m, 2 H, H-1), 1,90-2,30 (m, 3 H, H-6, NH), 2,67 (m, 2 H, H-10), 2,91 (m, 2 H, H-9), 3,4-3,8 (m, 12 H, H-2 u. H-3 u. H-4 u. H-5 u. H-7 u. H-8).

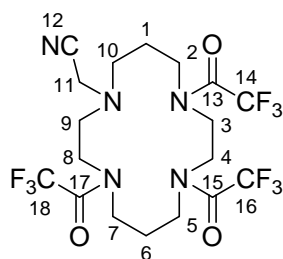
**ESI-MS** m/z 489 [M+H<sup>+</sup>], 511 [M+Na<sup>+</sup>], 977 [2M+H<sup>+</sup>], 999 [2M+Na<sup>+</sup>]

<b>ESI<sup>+</sup>-HR-MS</b> m/z	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> F <sub>9</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	berechnet:	489,1548
			gefunden:	489,1549

**R<sub>f</sub>** 0,6 (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat:Hexan 10:1)

1,4,8-Tris(trifluoracetyl)-11-acetonitrilcyclam **18\***

1,64 g (3,38 mmol) 1,4,8-Tris-(trifluoracetyl)cyclam, 2,30 ml (13,40 mmol) DIEA und 164 mg (1,09 mmol) Natriumiodid wurden in 10 ml DMF gelöst und dann 0,82 g (6,80 mmol) Bromacetonitril zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde zunächst für 2,5 h bei 100 °C und anschließend über Nacht bei 80 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die dunkle Lösung mit 20 ml Wasser versetzt, die wässrige Phase abgetrennt und mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt (braune viskose Flüssigkeit) wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat:Hexan 5:1) aufgereinigt. Es wurden 1,62 g (3,00 mmol, 91 %) eines porösen, bräunlichen Feststoffes erhalten.



**<sup>1</sup>H-NMR** (Chloroform-d<sub>1</sub>, 400 MHz)

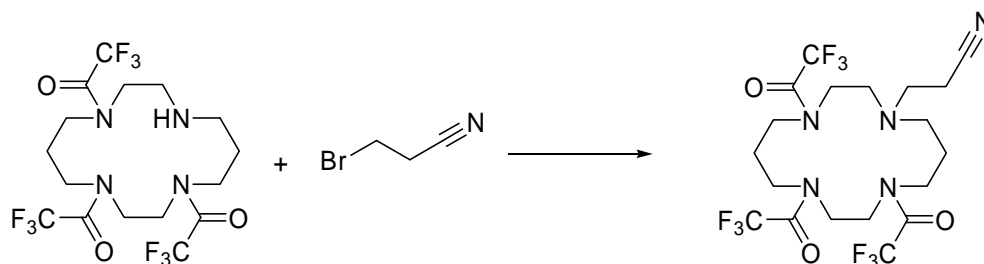
δ = 1,85 (m, 2 H, H-1), 2,08 (m, 2 H, H-6), 2,63 (m, 2 H, H-10), 2,86 (m, 2 H, H-9), 3,5-3,8 (m, 14 H, H-2 u. H-3 u. H-4 u. H-5 u. H-7 u. H-8 u. H-11)

**ESI-MS** m/z            528 [M+H]<sup>+</sup>, 550 [M+Na]<sup>+</sup>

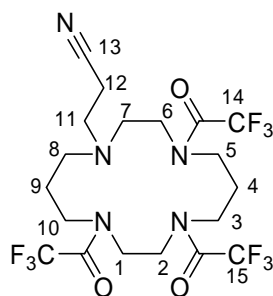
<b>ESI<sup>+</sup>-HR-MS</b> m/z	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> F <sub>9</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	berechnet:	528,1657
			gefunden:	528,1629

**R<sub>f</sub>**                    0,26 (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat:Hexan 5:1)

## 1,4,8-Tris(trifluoracetyl)-11-propionitrilcyclam **19\***



4,04 g (8,26 mmol) 1,4,8-Tris-(trifluoracetyl)-cyclam, 5,7 ml (33,00 mmol, 4,30 g) DIEA und 370 mg (2,47 mmol) Natriumiodid wurden in 24 ml DMF vorgelegt. Nach der Zugabe von 3,30 g (24,80 mmol) Bromacetonitril wurde für 18 h unter Rühren auf 120 °C erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das viskose Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Essigester:Hexan 5:1) aufgereinigt. Man erhielt 2,10 g (3,90 mmol, 48 %) eines porösen, weißen Feststoffs.

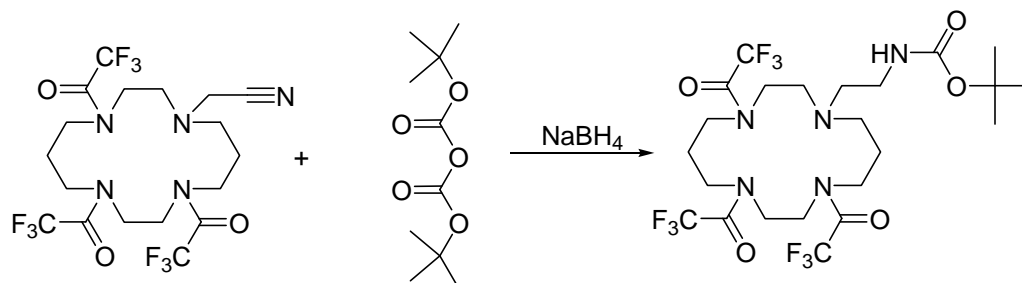


**<sup>1</sup>H-NMR** (Chloroform-d<sub>1</sub>, 200 MHz)

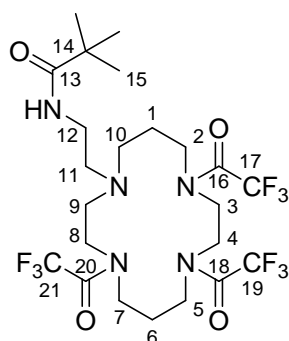
δ = 1,75 (m, 2 H, H-9), 2,08 (m, 2 H, H-4), 2,47 (m, 4 H, H-8 u. H-12), 2,67 (m, 2 H, H-7), 3,07 (m, 2 H, H-11), 3,38-3,68 (m, 12 H, H-1 u. H-2 u. H-3 u. H-5 u. H-6 u. H-10)

**ESI<sup>+</sup>-MS** m/z      542 [M+H]<sup>+</sup>, 564 [M+Na]<sup>+</sup>

## 1,4,8-Tris-(trifluoracetyl)-11-(N-boc-2-aminoethyl)-cyclam

**20\***

0,46 g (0,87 mmol) 1,4,8-Tris-(trifluoracetyl)-11-methylacetonitrilcyclam, 0,40 g (1,80 mmol) Boc-Anhydrid und 0,22 g (0,93 mmol) Nickel(II)chlorid Hexahydrat wurden in 15 ml absolutem Methanol bei 0 °C vorgelegt. In kleinen Portionen wurde anschließend 0,51 g (13,50 mmol) Natriumborhydrid zugegeben und auf RT erwärmt. Nach 100 min wurden 120 µl (1,70 µmol) Diethylentriamin zugetropft und für weitere 20 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in 50 ml Essigester aufgenommen und mit gesättigter wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und mit Essigester extrahiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Essigester:Hexan 1:1) aufgereinigt. Es wurden 140 mg (0,22 mmol, 25 %) einer stark viskosen, gelblichen Flüssigkeit erhalten.



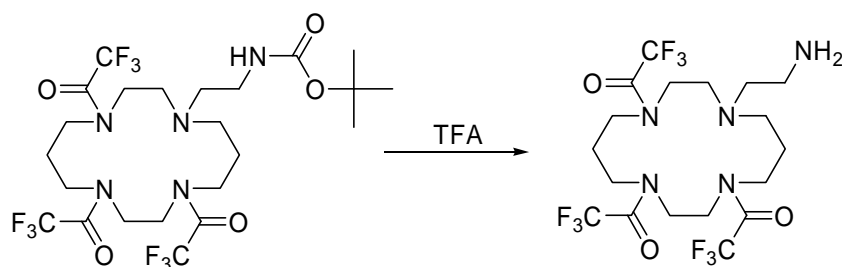
**<sup>1</sup>H-NMR** (Chloroform-d<sub>1</sub>, 400 MHz)

δ = 1,45 (s, 9 H, H-15), 1,81 (m, 2 H, H-1), 2,05-2,25 (m, 2 H, H-6), 2,45-2,60 (m, 4 H, H-10 u. H-11), 2,71 (m, 2 H, H-9), 3,15 (m, 2 H, H-12), 3,3-3,8 (m, 12 H, H-2 u. H-3 u. H-4 u. H-5 u. H-7 u. H-8)

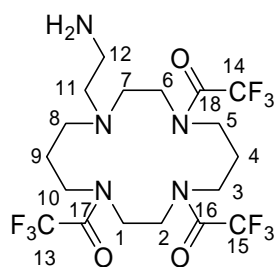
ESI-MS m/z 632 [M+H]<sup>+</sup>

R<sub>f</sub> 0,27 (SiO<sub>2</sub>, Essigester:Hexan 1:1)

### 1,4,8-Tris-(trifluoracetyl)-11-(2-aminoethyl)-cyclam **21\***



120 mg (0,19 mmol) 1,4,8-Tris-(trifluoracetyl)-11-(N-boc-2-aminoethyl)-cyclam wurden in 10 ml Methylenchlorid vorgelegt und mit 1 ml (13,20 mmol) Trifluoressigsäure versetzt. Nach 6 Tagen wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der erhaltene Rückstand in 20 ml Essigester aufgenommen und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wurden 53 mg (0,10 mmol, 52 %) eines viskosen gelben Öls erhalten.

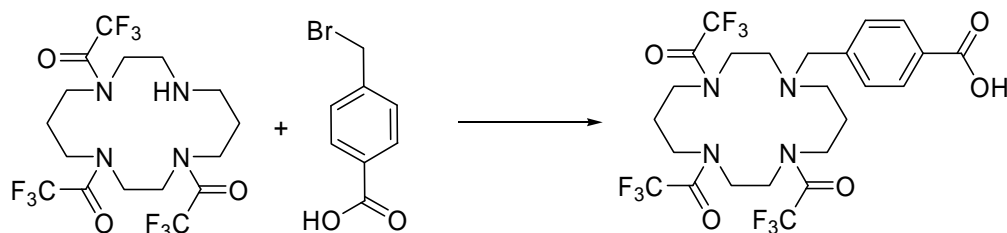


<sup>1</sup>H-NMR (Chloroform-d<sub>1</sub>, 400 MHz)

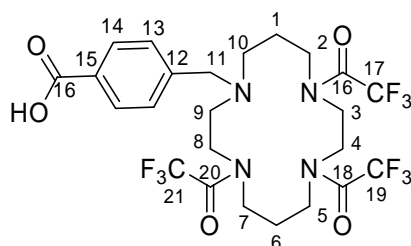
δ = 1,7-2,2 (m, 4 H, H-4, H-9), 2,5-3,0 (m, 10 H, H-7 u. H-8 u. H-11 u. H-12), 3,2-3,8 (m, 12 H, H-1 u. H-2 u. H-3 u. H-5 u. H-6 u. H-10)

ESI-MS m/z 532 [M+H]<sup>+</sup>



1,4,8-Tris(trifluoracetyl)-11- $\alpha$ -yl-4'-tolylsäurecyclam **22** <sup>[95,96]</sup>

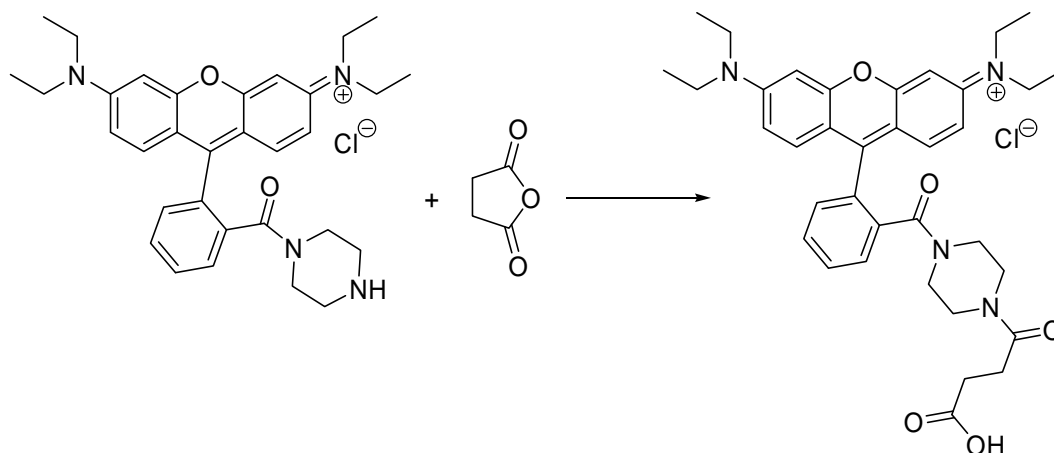
488 mg (1,0 mmol) 1,4,8-Tris-(trifluoracetyl)-cyclam, 215 mg (1,0 mmol)  $\alpha$ -Brom-4-tolylsaeure, 16,6 mg (0,1 mmol) Kaliumiodid, 138 mg (1 mmol) Kaliumcarbonat wurden in 50 ml Acetonitril vorgelegt und 5 Tage bei 50 °C gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 50 ml Wasser versetzt und mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat) erhielt man 580 mg (0,9 mmol, 93 %) Produkt als weißen Feststoff.

**<sup>1</sup>H-NMR** (Chloroform-d<sub>1</sub>, 200 MHz)

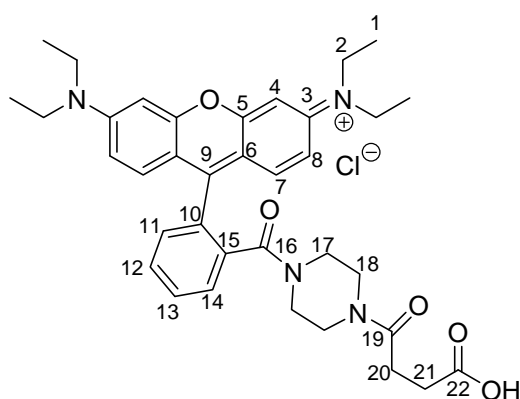
$\delta$  = 1,81 (m, 2 H, H-1 o. H-6), 2,18 (m, 2 H, H-1 o. H-6), 2,51 (m, 2 H, H-9 o. H-10), 2,82 (m, 2 H, H-9 o. H-10), 3,50-4,00 (m, 14 H, H-2 u. H-3 u. H-4 u. H-5 u. H-7 u. H-8 u. H-11), 7,47 (m, 2 H, H-13), 8,01 (m, 2 H, H-14)

<b>ESI<sup>+</sup>-HR-MS</b>	m/z	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> F <sub>9</sub> <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	berechnet:	623,1911
				gefunden:	623,1916

**R<sub>f</sub>** 0,57 (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat)

Bernsteinsäure Rhodamin B Piperazinamid **23 [B]** <sup>[92]</sup>

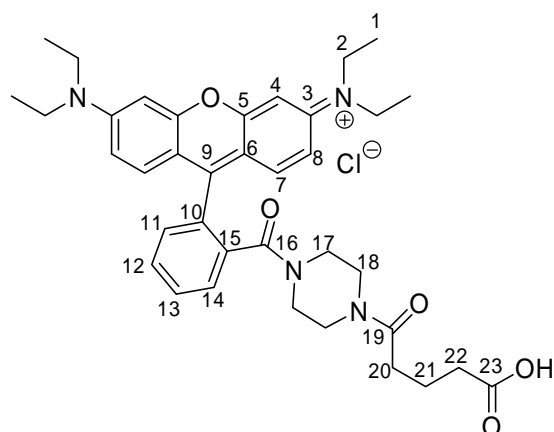
1,09 g (2,0 mmol) Rhodamin B Piperazinamid, 276 mg (2,7 mmol) Bernsteinsäureanhydrid, 0,38 ml (2,7 mmol) Triethylamin und 330 mg DMAP wurden in 8 ml Methylenchlorid gelöst und 72 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die violette Lösung mit 200 ml 1 M Kaliumcarbonat-Lösung aufgenommen und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde verworfen. Die wässrige Phase wurde mit NaCl gesättigt und mehrmals mit Isopropanol:Methylenchlorid 2:1 extrahiert, bis die wässrige Phase nur noch schwach rosa war. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der violette Rückstand wurde in Chloroform gelöst und durch Filtrieren von unlöslichem Rückstand befreit. Das Filtrat wurde bis zur Trockene eingengt. Man erhielt einen rot-violett glänzenden Feststoff in einer Ausbeute von 945 mg (1,5 mmol, 75 %).



<sup>1</sup>H NMR (Methanol-d<sub>4</sub>, 200 MHz)

$\delta$  = 1,26 (t, <sup>3</sup>J = 6,91 Hz, 12 H, H-1), 2,37 (t, <sup>3</sup>J = 7,08 Hz, 2 H, H-20), 2,52 (t, <sup>3</sup>J = 6,35 Hz, 2 H, H-21), 3,36 (s, 8 H, H-17 u. H-18), 3,65 (q, <sup>3</sup>J = 6,94 Hz, 8 H, H-2), 6,92 (d, <sup>4</sup>J =





**<sup>1</sup>H NMR** (Chloroform-d<sub>1</sub>, 400 MHz)

$\delta$  = 1,28 (t, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, 12 H, H-1), 1,75 (m, 2 H, H-21), 2,30 (m, 4 H, H-20 u. H-22), 3,34 (s, 8 H, H-17 u. H-18), 3,62 (q, <sup>3</sup>J = 6,98 Hz, 8 H, H-2), 6,73 (m, 2 H, H-4), 7,00 (m, 2 H, H-7), 7,25 (m, 2 H, H-8), 7,28 (m, 1 H, H-11), 7,61 (m, 3 H, H-12 u. H-13 u. H-14)

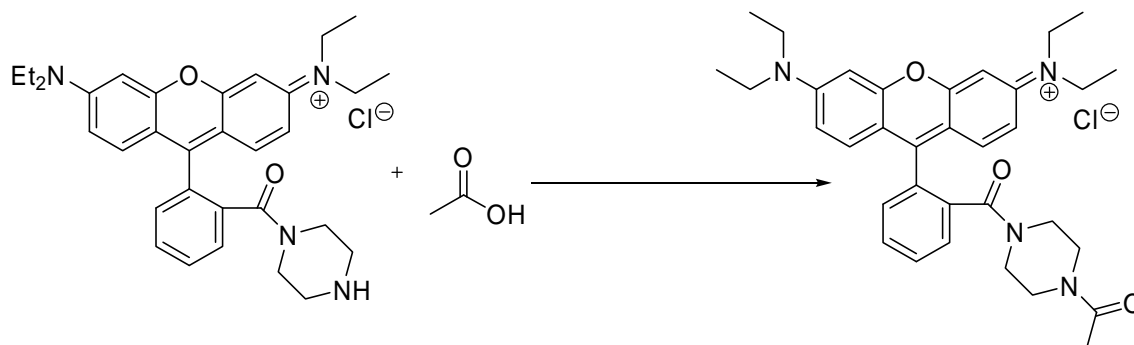
<b>ESI<sup>+</sup>-HR-MS</b>	C <sub>37</sub> H <sub>45</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> <sup>+</sup>	[M-Cl] <sup>+</sup>	berechnet:	625,3390
			gefunden:	625,3428

<b>UV/Vis</b>	$\lambda$ = 563 nm	$\epsilon$ = 49 000 l mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
---------------	--------------------	--

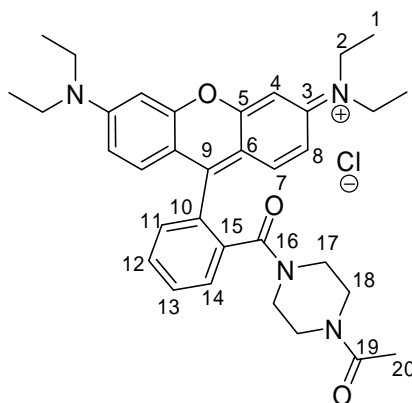
<b>Fluoreszenz</b>	$\lambda_{\text{abs}}$ = 564 nm	$\lambda_{\text{em}}$ = 589 nm
--------------------	---------------------------------	--------------------------------

<b>R<sub>f</sub></b>	0,4 (SiO <sub>2</sub> , Chloroform:Methanol 3:1)
----------------------	--

<b>HPLC</b>	Retentionszeit	49,3 min
-------------	----------------	----------

Essigsäure Rhodamin B Piperazinamid **25\*** [A]

52  $\mu\text{l}$  (0,91 mmol, 54,6 mg) Essigsäure, 364 mg (0,91 mmol) HBTU und 186  $\mu\text{l}$  DIEA (1,14 mmol) wurden unter Argonatmosphäre in 50 ml absolutem DMF vorgelegt und 20 min bei RT gerührt. Dann wurden 500 mg (0,91 mmol) Rhodamin B Piperazinamid zugesetzt und 3 Tage bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 50 ml Wasser versetzt und mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der violett gefärbte Rückstand wurde durch Säulenchromatographie ( $\text{SiO}_2$ , Chloroform:Methanol 5:1) gereinigt. Es wurden 434 mg (0,74 mmol, 81 %) Produkt als violetter Feststoff erhalten.

 **$^1\text{H-NMR}$**  (Methanol- $d_4$ , 200 MHz)

$\delta = 1,32$  (t,  $^3\text{J} = 7,08$  Hz, 12 H, H-1), 2,00 (s, 3 H, H-20), 3,40 (s, 8 H, H-17 u. H-18), 3,70 (q,  $^3\text{J} = 7,06$  Hz, 8 H, H-2), 6,97 (d,  $^3\text{J} = 2,37$  Hz, 2 H, H-4), 7,08 (d,  $^3\text{J} = 9,58$ ,  $^4\text{J} = 2,31$  Hz, 2 H, H-8), 7,26 (d,  $^3\text{J} = 7,63$  Hz, 2 H, H-7). 7,53 (m, 1 H, H-11). 7,76 (m, 3 H, H-12 u. H-13 u. H-14)

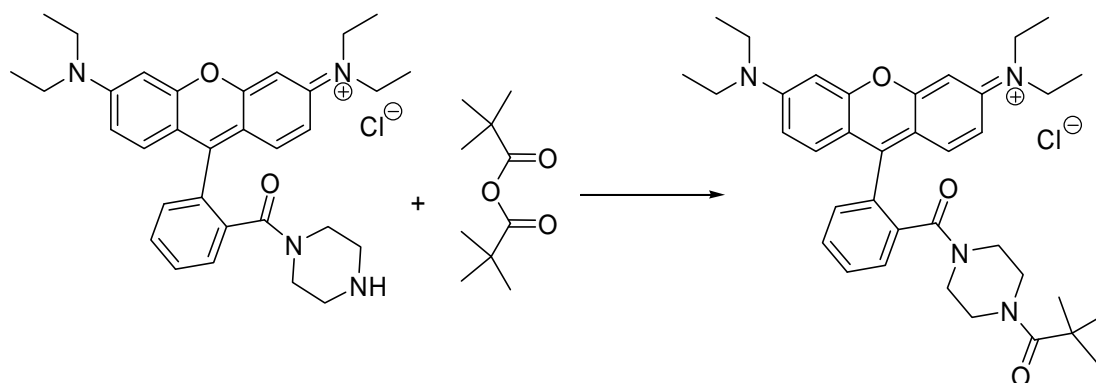
**ESI<sup>+</sup>-HR-MS** m/z C<sub>34</sub>H<sub>41</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> [M-Cl]<sup>+</sup> berechnet: 553,3173

gefunden: 553,3165

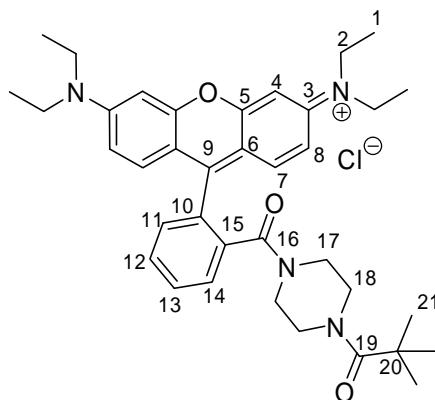
**UV/Vis** λ = 565 nm

**Fluoreszenz** λ<sub>abs</sub> = 566 nm λ<sub>em</sub> = 591 nm

## Pivalinsäure Rhodamin B Piperazinamid **26\*** [PIV]



200 mg (0,36 mmol) Rhodamin B Piperazinamid und 124 µl (0,72 mmol) DIEA wurden unter Argonatmosphäre in 20 ml absolutem DMF vorgelegt. Anschließend wurden 149 µl (0,72 mmol) Pivalinsäureanhydrid zugegeben und 2 Tage bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 50 ml Wasser versetzt und mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der violette Rückstand wurde durch Säulenchromatographie (Chloroform:Methanol 4:1) gereinigt. Es wurden 225 mg (0,36 mmol, 94 %) Produkt als violetter Feststoff erhalten.



**<sup>1</sup>H-NMR** (Methanol-d<sub>4</sub>, 200 MHz)

$\delta = 1,32$  (t,  $^3J = 7,06$  Hz, 12 H, 1-H),  $2,07$  (s, 9 H, H-21),  $3,40$  (s, 8 H, H-17 u. H-18),  $3,58$  (q,  $^3J = 7,09$  Hz, 8 H, H-2),  $6,99$  (d,  $^4J = 2,42$  Hz, 2 H, H-4),  $7,09$  (dd,  $^3J = 9,56$  Hz,  $^4J = 2,47$  Hz, 2 H, H-8),  $7,30$  (d,  $^3J = 9,51$  Hz, 2 H, H-7),  $7,54$  (m, 2 H, H-11),  $7,77$  (m, 3 H, H-12 u. H-13 u. H-14)

**ESI-MS** m/z            630 [M-Cl]<sup>+</sup>

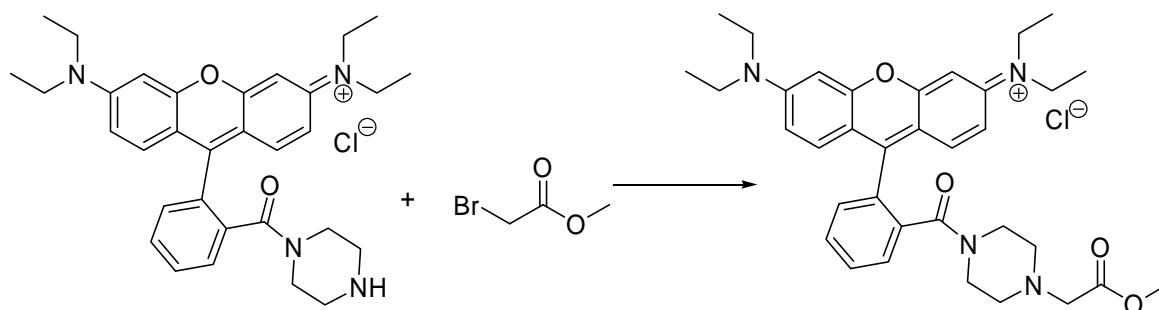
**UV/Vis**                 $\lambda = 565$  nm                 $\epsilon = 69\,000$  l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

**Fluoreszenz**         $\lambda_{\text{abs}} = 567$  nm             $\lambda_{\text{em}} = 592$  nm

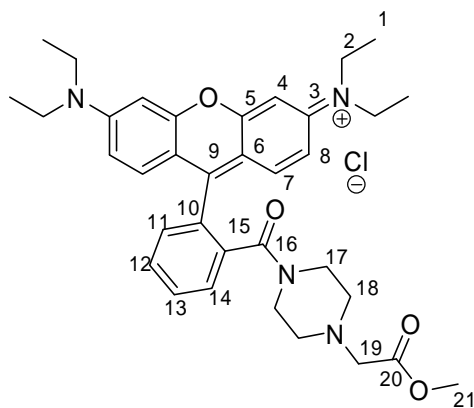
**R<sub>f</sub>**                      0,39 (SiO<sub>2</sub>, Chloroform:Methanol 4:1)

## 2-(Rhodamin B Piperazinamid)-Essigsäuremethylester **27\***

### [EM]



500 mg (0,9 mmol) Rhodamin B Piperazinamid, 138 mg (0,9 mmol) Bromessigsäuremethylester, 91 mg DIEA (0,9 mmol, 125  $\mu$ l) wurden in 50 ml DMF und über Nacht auf 80 °C erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit 50 ml Wasser versetzt und mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO<sub>2</sub>, Chloroform:Methanol 3:1) erhielt man 415 mg (0,64 mmol, 71,3 %) Produkt als violetten Feststoff.

**<sup>1</sup>H NMR** (Methanol-d<sub>4</sub>, 200 MHz)

$\delta = 1,33$  (t,  $^3J = 7,08$  Hz, 12 H, 1-H),  $2,42$  (m, 4 H, H-18),  $3,24$  (s, 2 H, H-19),  $3,43$  (m, 4 H, H-17),  $3,69$  (s, 3 H, H-21),  $3,72$  (q,  $^3J = 6,94$  Hz, 8 H, H-2),  $7,00$  (d,  $^4J = 2,40$  Hz, 2 H, H-4),  $7,09$  (dd,  $^3J = 9,55$  Hz,  $^4J = 2,47$  Hz, 2 H, H-8),  $7,29$  (d,  $^3J = 9,49$  Hz, 2 H, H-7),  $7,54$  (m, 1 H, H-11),  $7,67$  (m, 1 H, H-13),  $7,78$  (m, 2 H, H-12 u. H-14)

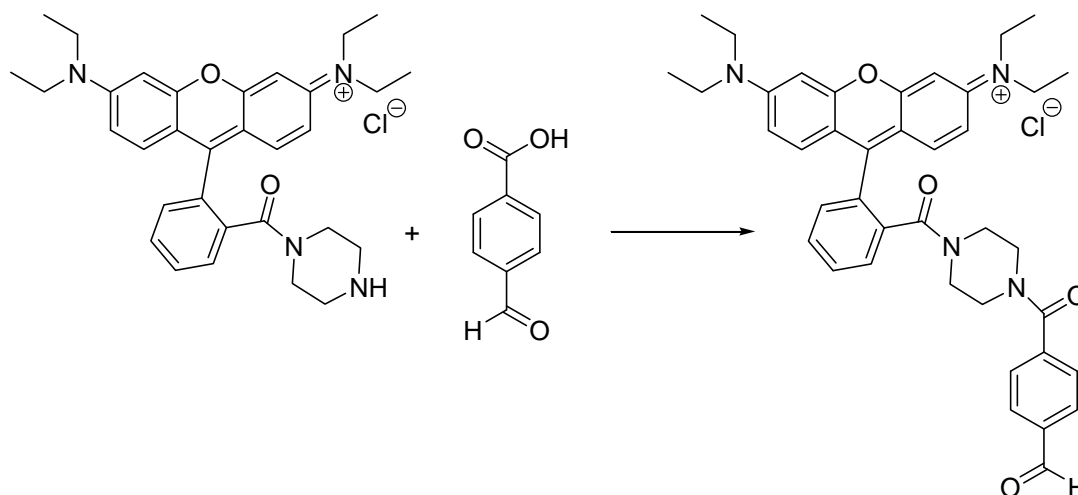
<b>ESI<sup>+</sup>-HR-MS</b> m/z	C <sub>36</sub> H <sub>43</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> <sup>+</sup>	[M-Cl] <sup>+</sup>	berechnet:	583,3279
			gefunden:	583,3232

**UV/Vis**                     $\lambda = 565$  nm                     $\epsilon = 75\,000$  l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

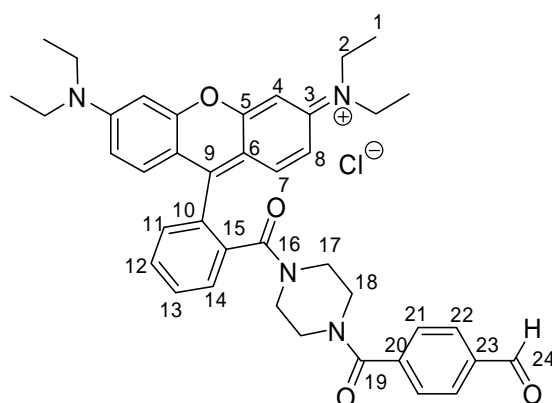
**Fluoreszenz**                 $\lambda_{\text{abs}} = 566$  nm                 $\lambda_{\text{em}} = 591$  nm

**R<sub>f</sub>**                            0,75 (SiO<sub>2</sub>, Chloroform:Methanol 3:1)



4-Carboxybenzaldehyd Rhodamin B Piperazinamid **28\*** [BA]

78 mg (0,52 mmol) 4-Carboxybenzaldehyd wurden unter Argonatmosphäre in 50 ml absolutem DMF vorgelegt. Anschließend wurden 200 mg (0,52 mmol) HBTU und 90  $\mu$ l DIEA (0,52 mmol) zugegeben und 10 min bei RT gerührt. Dann wurden 288 mg (0,52 mmol) Rhodamin B Piperazinamid zugesetzt und die Lösung über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 50 ml Wasser versetzt und mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der violette Rückstand wurde durch Säulenchromatographie (Chloroform:Methanol 4:1) gereinigt. Es wurden 210 mg (0,30 mmol, 58 %) Produkt als violetter Feststoff erhalten.



**$^1\text{H NMR}$**  (Chloroform- $d_1$ , 200 MHz)

$\delta$  = 1,30 (t,  $^3J$  = 7,10 Hz, 12 H, 1-H), 3,40 (s, 8 H, H-17 u. H-18), 3,58 (q,  $^3J$  = 7,01 Hz, 8 H, H-2), 6,68 (m, 2 H, H-4), 7,07 (m, 2 H, H-7), 7,38 (m, 2 H, H-8), 7,5 (m, 1 H, H-11), 7,66 (m,

2 H, H-12 u. H-13), 7,80 (m, 1 H, H-14), 8,00 (d,  $^3J = 6,08$  Hz, 2 H, H-22), 8,22 (d,  $^3J = 8,01$  Hz, 2 H, H-21), 10,10 (s, 1 H, H-24)

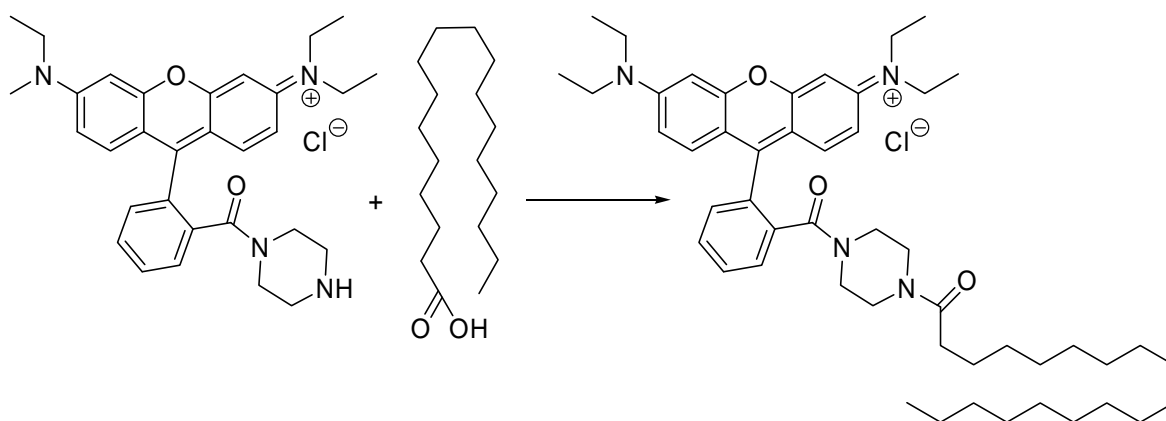
**ESI-MS** m/z            643 [M-Cl]<sup>+</sup>

**UV/Vis**                 $\lambda = 565$  nm                 $\epsilon = 44\,000$  l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

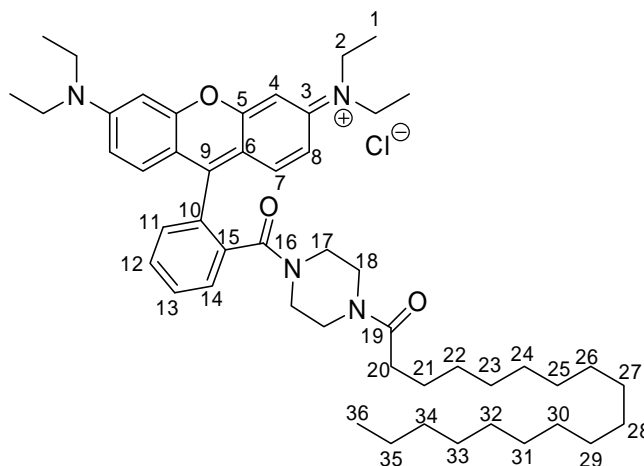
**Fluoreszenz**             $\lambda_{\text{abs}} = 566$  nm             $\lambda_{\text{em}} = 590$  nm

**R<sub>f</sub>**                        0,56 (SiO<sub>2</sub>, Chloroform:Methanol 4:1)

## Stearinsäure Rhodamin B Piperazinamid **29\*** [ST]



147 mg (0,52 mmol) Stearinsäure wurden unter Argonatmosphäre in 50 ml absolutem DMF vorgelegt. Anschließend wurden 200 mg (0,52 mmol) HBTU und 90  $\mu$ l DIEA (0,52 mmol) zugegeben und 10 min bei RT gerührt. Dann wurden 288 mg (0,52 mmol) Rhodamin B Piperazinamid zugesetzt und die Lösung über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 50 ml Wasser versetzt und mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der violette Rückstand wurde durch Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, Chloroform:Methanol 4:1) gereinigt. Es wurden 390 mg (0,48 mmol, 92 %) Stearinsäure Rhodamin B Piperazinamid als violetter Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H NMR** (Methanol-d<sub>4</sub>, 200 MHz)

$\delta = 0,91$  (t,  $^3J = 6,5$  Hz, 3 H, H-36), 1,30 (m, 40 H, H-1 u. H-22 u. H-23 u. H-24 u. H-25 u. H-26 u. H-27 u. H-28 u. H-29 u. H-30 u. H-31 u. H-32 u. H-33 u. H-34 u. H-35 u.), 1,60 (m, 2 H, H-21), 2,29 (dt,  $^3J = 7,48$  Hz,  $^4J = 1,58$  Hz, 2 H, H-20), 3,41 (s, 8 H, H-17 u. H-18), 3,70 (q,  $^3J = 7,09$  Hz, 8H, H-2), 6,98 (d,  $^4J = 2,44$  Hz, 2 H, H-4), 7,09 (dd,  $^3J = 9,52$  Hz,  $^4J = 2,37$  Hz, 2 H, H-8), 7,29 (d,  $^3J = 9,46$  Hz, 2 H, H-7), 7,53 (m, 1 H, H-11), 7,78 (m, 3 H, H-12 u. H-13 u. H-14)

<b>ESI<sup>+</sup>-HR-MS m/z</b>	C <sub>50</sub> H <sub>73</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>	[M-Cl] <sup>+</sup>	berechnet: 777,5677
			gefunden: 777,5673

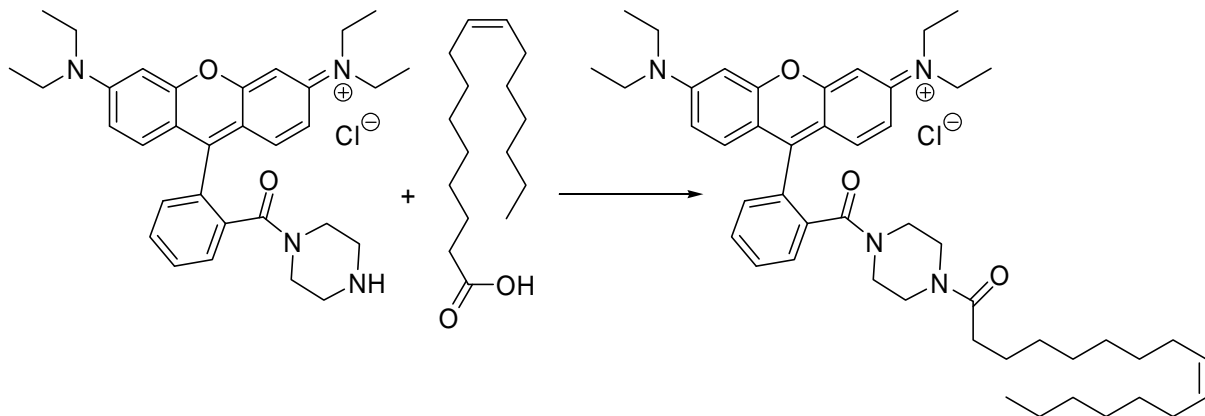
<b>UV/Vis</b>	$\lambda = 565$ nm	$\epsilon = 62\,000$ l mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
---------------	--------------------	---

<b>Fluoreszenz</b>	$\lambda_{\text{abs}} = 566$ nm	$\lambda_{\text{em}} = 592$ nm
--------------------	---------------------------------	--------------------------------

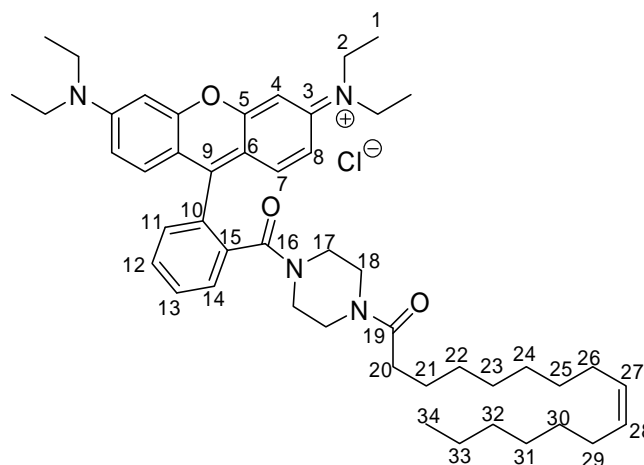
<b>R<sub>f</sub></b>	0,58 (SiO <sub>2</sub> , Chloroform:Methanol 4:1)
----------------------	---

<b>HPLC</b>	Retentionszeit	49,6 min
-------------	----------------	----------

## Palmitoleinsäure Rhodamin B Piperazinamid **30\*** [PO]



118  $\mu\text{l}$  (0,52 mmol) Palmitoleinsäure wurden unter Argonatmosphäre in 50 ml absolutem DMF vorgelegt. Anschließend wurden 200 mg (0,52 mmol) HBTU und 90  $\mu\text{l}$  DIEA (0,52 mmol) zugegeben und 10 min bei RT gerührt. Dann wurden 288 mg (0,52 mmol) Rhodamin B Piperazinamid zugesetzt und die Lösung über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 50 ml Wasser versetzt und mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der violette Rückstand wurde durch Säulenchromatographie ( $\text{SiO}_2$ , Chloroform:Methanol 4:1) gereinigt. Es wurden 290 mg (0,38 mmol, 74%) Palmitoleinsäure Rhodamin B Piperazinamid als violetter Feststoff erhalten.



**$^1\text{H}$  NMR** (Methanol- $d_4$ , 200 MHz)

$\delta = 0,92$  (t,  $^3J = 6,55$  Hz, 3 H, H-34), 1,32 (m, 28 H, H-1 u. H-22 u. H-23 u. H-24 u. H-25 u. H-30 u. H-31 u. H-32 u. H-33), 1,61 (t,  $^3J = 6,9$  Hz, 2 H, H-21), 2,03 (m, 4 H, H-26 u. H-29),

2,29 (t,  $^3J = 7,36$  Hz, 2 H, H-20), 3,40 (s, 8 H, H-17 u. H-18), 3,70 (q,  $^3J = 7,36$  Hz, 8 H, H-2), 5,36 (dt,  $^3J = 5,57$  Hz,  $J = 0,94$  Hz, 2 H, H-27 u. H-28), 6,97 (d,  $^4J = 2,42$  Hz, 2 H, H-4), 7,09 (dd,  $^3J = 9,62$  Hz,  $^4J = 2,23$  Hz, 2 H, H-8), 7,29 (d,  $^3J = 9,57$  Hz, 2 H, H-7), 7,51 (m, 1 H, H-11), 7,76 (m, 3 H, H-12 u. H-13 u. H-14)

**ESI<sup>+</sup>-HR-MS** m/z  $C_{48}H_{67}N_4O_3^+$   $[M-Cl]^+$  berechnet: 747,5208  
 gefunden: 747,5176

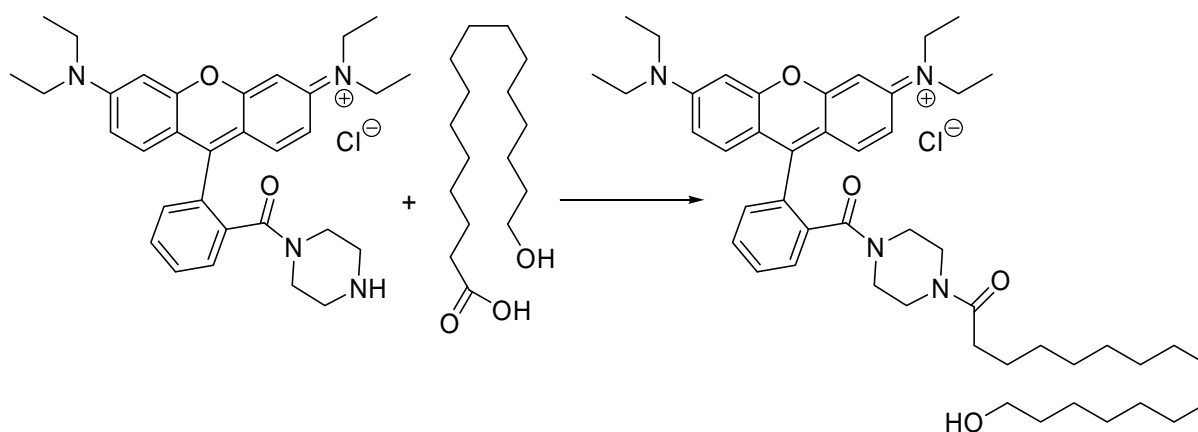
**UV/Vis**  $\lambda = 565$  nm  $\epsilon = 79\,000$  l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

**Fluoreszenz**  $\lambda_{abs} = 566$  nm  $\lambda_{em} = 593$  nm

**R<sub>f</sub>** 0,57 (SiO<sub>2</sub>, Chloroform:Methanol 4:1)

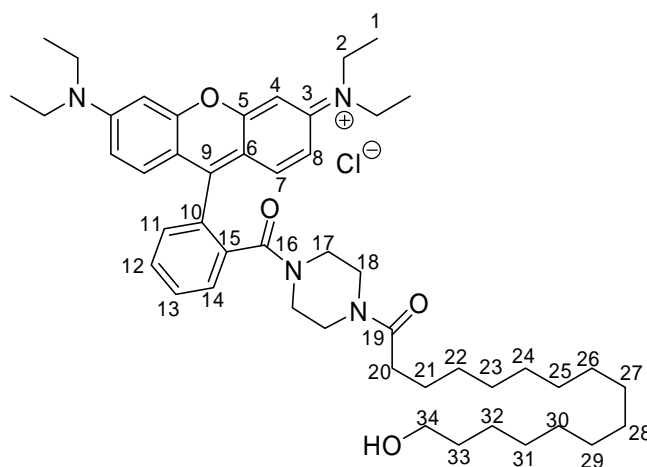
## 16-Hydroxyhexadecansäure Rhodamin B Piperazinamid **31**\*

### [HHD]



100 mg (0,36 mmol) 16-Hydroxyhexadecansäure wurden unter Argonatmosphäre in 50 ml absolutem DMF vorgelegt. Anschließend wurden 139 mg (0,36 mmol) HBTU und 126  $\mu$ l DIEA (0,72 mmol) zugegeben und 20 min bei RT gerührt. Dann wurden 200 mg (0,36 mmol) Rhodamin B Piperazinamid zugegeben und die Lösung über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 50 ml Wasser versetzt und mit Methylenchlorid extrahiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der violette Rückstand wurde durch Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>,

Methylenchlorid:Methanol 3:1) gereinigt. Es wurden 210 mg (0,27 mmol, 73 %) 16-Hydroxyhexadecansäure Rhodamin B Piperazinamid als violetter Feststoff erhalten.



**<sup>1</sup>H NMR** (Methanol-d<sub>4</sub>, 200 MHz)

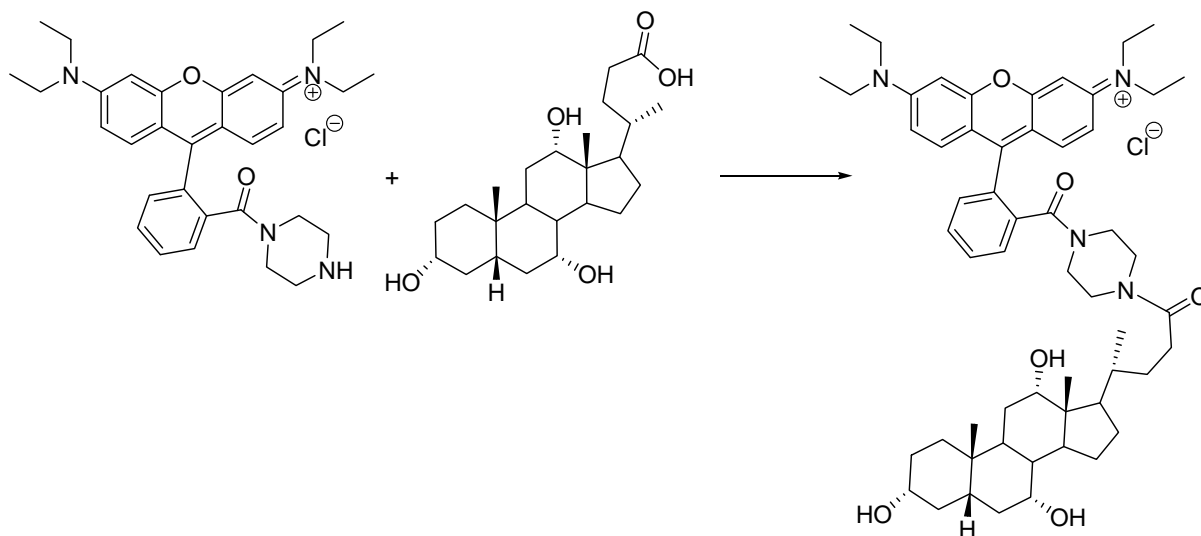
$\delta$  = 1,32 (m, 34 H, H-1 u. H-22 u. H-23 u. H-24 u. H-25 u. H-26 u. H-27 u. H-28 u. H-29 u. H-30 u. H-31 u. H-32), 1,54 (m, 4 H, H-21 u. H-33), 2,34 (m, 2 H, H-20), 3,41 (s, 8 H, H-17 u. H-18), 3,54 (t, <sup>3</sup>J = 6,49 Hz, 2 H, H-34), 3,70 (q, <sup>3</sup>J = 7,02 Hz, 8 H, H-2), 6,98 (d, <sup>4</sup>J = 2,40 Hz, 2 H, H-4), 7,10 (dd, <sup>3</sup>J = 9,55 Hz, <sup>4</sup>J = 2,28 Hz, 2 H, H-8), 7,30 (d, <sup>3</sup>J = 9,55 Hz, 2 H, H-7), 7,53 (m, 1 H, H-11), 7,78 (m, 3 H, H-12 u. H-13 u. H-14)

<b>ESI<sup>+</sup>-HR-MS</b> m/z	C <sub>48</sub> H <sub>69</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> <sup>+</sup>	[M-Cl] <sup>+</sup>	berechnet: 765,5313
			gefunden: 765,5294

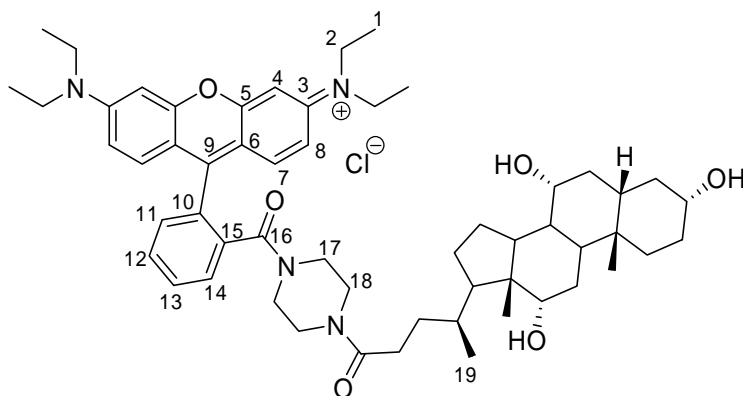
**UV/Vis**                     $\lambda$  = 566 nm                     $\epsilon$  = 63 000 l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

**Fluoreszenz**                 $\lambda_{\text{abs}}$  = 567 nm                 $\lambda_{\text{em}}$  = 591 nm

**R<sub>f</sub>**                            0,69 (SiO<sub>2</sub>, Chloroform:Methanol 3:1)

Cholsäure Rhodamin B Piperazinamid **32\*** [CS]

187 mg (0,46 mmol) Cholsäure wurden unter Argonatmosphäre in 30 ml trockenem DMF vorgelegt. Dann wurden 173 mg (0,46 mmol) HBTU und 93  $\mu$ l (70 mg, 0,46 mmol) DIEA zugegeben und 20 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 250 mg (0,46 mmol) Rhodamin B Piperazinamid zugegeben und 3 Tage bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde danach mit 50 ml Wasser versetzt und dann mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das entstandene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Chloroform:Methanol 3:1 + 1 % NEt<sub>3</sub>) aufgereinigt. Man erhielt 346 mg (0,37 mmol, 80 %) eines violetten Feststoffes.



**<sup>1</sup>H-NMR** (Methanol-d<sub>4</sub>, 200 MHz)

δ = 0,70 (s, 3 H, Cholsäure -CH<sub>3</sub>), 0,92 (s, 3 H, Cholsäure-CH<sub>3</sub>), 1,01 (d, <sup>3</sup>J = 6,13 Hz, 3 H, H-19), 1,1-2,5 (m, 39 H, H-1 u. Cholsäure CH u. CH<sub>2</sub>), 2,96-3,29 (m, 3 H, Cholsäure-CHOH), 3,40 (s, 8 H, H-17 u. H-18), 3,70 (q, <sup>3</sup>J = 6,9 Hz, 8 H, H-2), 6,97 (d, <sup>4</sup>J = 1,8 Hz, 2 H, H-4), 7,08 (dd, <sup>3</sup>J = 9,6 Hz, <sup>4</sup>J = 1,96 Hz, 2 H, H-8), 7,29 (d, <sup>3</sup>J = 9,45 Hz, 2 H, H-7), 7,54 (m, 1 H, H-12), 7,76 (m, 3 H, H-11 u. H-13 u. H-14)

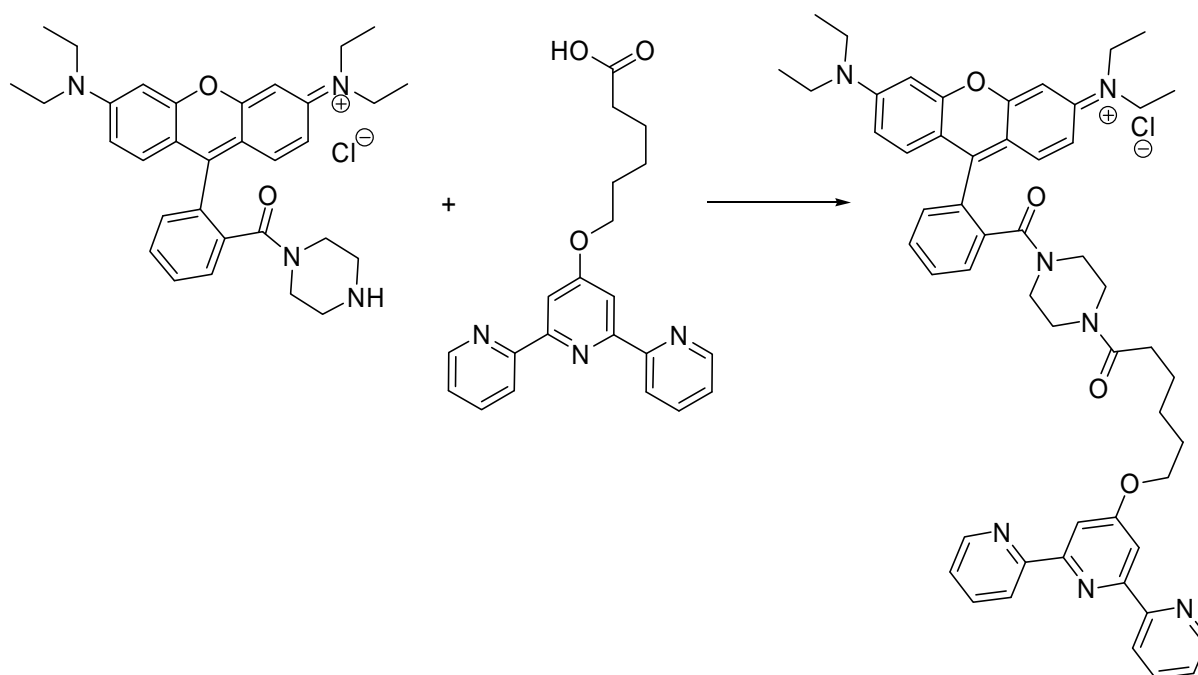
**ESI<sup>+</sup>-HR-MS** m/z C<sub>56</sub>H<sub>77</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup> [M-Cl]<sup>+</sup> berechnet: 901,5843  
 gefunden: 901,5824

**UV/Vis** λ = 565 nm ε = 63 000 l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

**Fluoreszenz** λ<sub>abs</sub> = 566 nm λ<sub>em</sub> = 593 nm

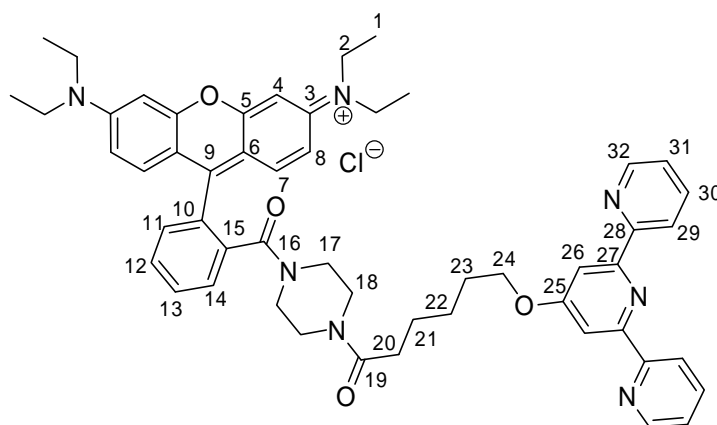
**R<sub>f</sub>** 0,57 (SiO<sub>2</sub>, Chloroform:Methanol 4:1)

## 6-(2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy)hexansäure Rhodamin B Piperazinamid **33\*** [HT]





142 mg (0,39 mmol) 6-(2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy)hexansäure, 148 mg (0,39 mmol) HBTU, 82  $\mu$ l (0,47 mmol) DIEA wurden in 40 ml absolutem DMF gelöst und 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 200 mg (0,39 mmol) Rhodamin B Piperazinamid zugegeben und 48 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 50 ml Wasser versetzt und mit Methylchlorid extrahiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung ( $\text{SiO}_2$ , Methylchlorid:Methanol 3:1) wurden 296 mg (0,33 mmol, 85 %) eines violetten Pulvers als Produkt erhalten.



**$^1\text{H-NMR}$**  (Chloroform- $d_1$ , 200 MHz)

$\delta$  = 1,28 (t,  $^3J$  = 7,23 Hz, 12 H, 1-H), 1,40-1,70 (m, 6 H, H-21 u. H-22 u. H-23), 2,37 (m, 2 H, H-20), 3,25-3,63 (m, 16 H, H-2 u. H-17 u. H-18), 4,22 (t,  $^3J$  = 6,7 Hz, 2 H, H-24), 6,65 (s, 2 H, H-4), 7,07 (m, 2 H, H-7), 7,25-7,72 (m, 8 H, H-8 u. H-11 u. H-12 u. H-13 u. H-14 u. H-31), 7,85 (t,  $^3J$  = 7,31 Hz, 2 H, H-29), 7,96 (s, 2 H, H-26), 8,59 (m, 2 H, H-30), 8,69 (m, 2 H, H-32)

<b>ESI<sup>+</sup>-HR-MS</b> m/z	$\text{C}_{53}\text{H}_{58}\text{N}_7\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{Cl}]^+$	berechnet:	856,4550
			gefunden:	856,4565

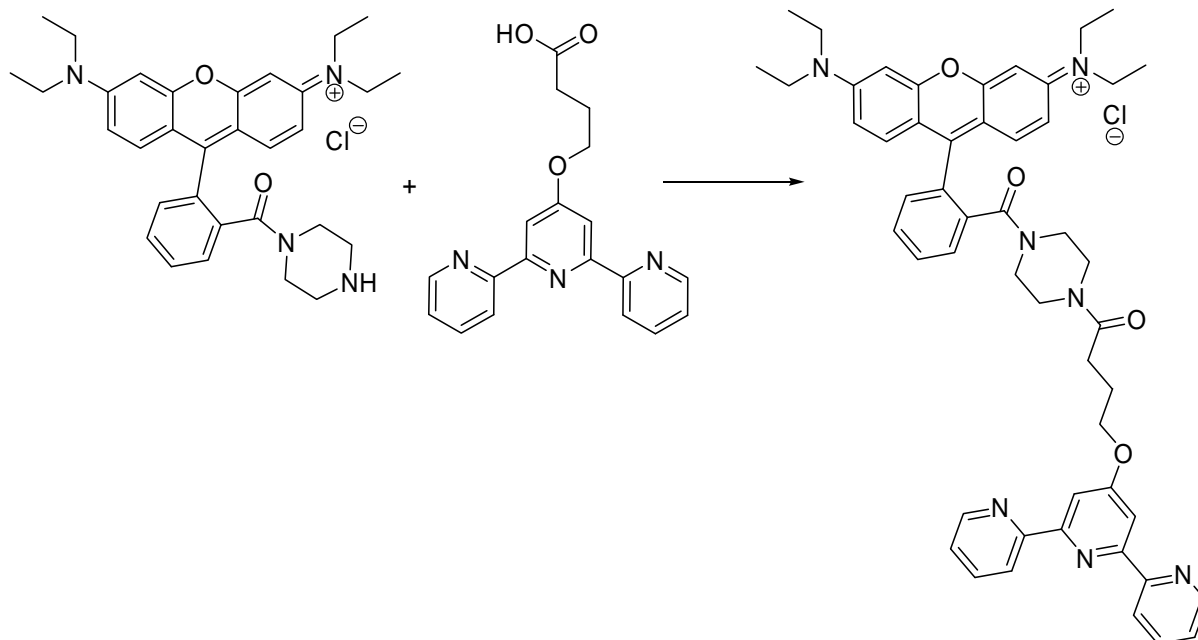
**UV/Vis**  $\lambda$  = 566 nm  $\epsilon$  = 53 000 l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

**Fluoreszenz**  $\lambda_{\text{abs}}$  = 568 nm  $\lambda_{\text{em}}$  = 593 nm

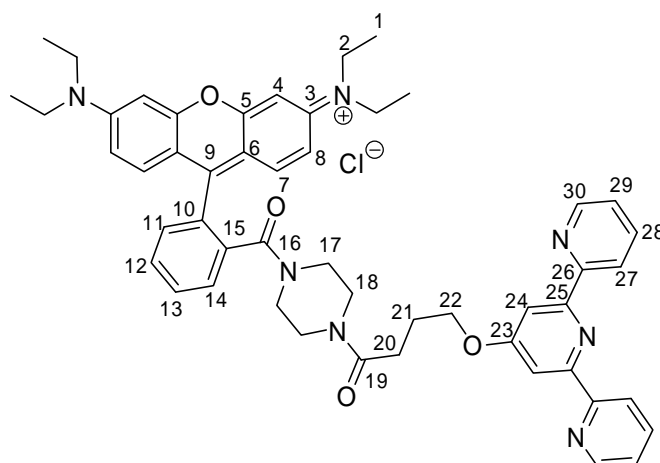
**R<sub>f</sub>** 0,7 ( $\text{SiO}_2$ , Methylchlorid:Methanol 3:1)

**HPLC** Retentionszeit 61,1 min

## 4-(2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy)butansäure Rhodamin B Piperazinamid **34\*** [BT]



100 mg (0,30 mmol) 4-(2,2':6',2''-Terpyridin-4'-yloxy)butansäure, 113 mg (0,30 mmol) HBTU, 63  $\mu$ l (0,36 mmol) DIEA wurden in 40 ml absolutem DMF gelöst und 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 163 mg (0,30 mmol) Rhodamin B Piperazinamid zugegeben und 48 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 50 ml Wasser versetzt und mit Methylenchlorid extrahiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung ( $\text{SiO}_2$ , Methylenchlorid:Methanol 3:1) wurden 171 mg (0,20 mmol, 67 %) eines violetten Pulvers als Produkt erhalten.



**<sup>1</sup>H-NMR** (Chloroform-d<sub>1</sub>, 200 MHz)

$\delta = 1,28$  (t,  $^3J = 7,2$  Hz, 12 H, H-1),  $2,16$  (t,  $^3J = 6,83$  Hz, 2 H, H-21),  $2,62$  (t,  $^3J = 6,96$  Hz, 2 H, H-20),  $3,45$  (s, 8 H, H-17 u. H-18),  $3,67$  (q,  $^3J = 6,72$  Hz, 8 H, H-2),  $4,30$  (t,  $^3J = 6,75$  Hz, 2 H, H-22),  $6,93$  (s, 2 H, H-4),  $7,06$  (d,  $^3J = 9,4$  Hz, 2 H, H-8),  $7,28$  (d,  $^3J = 9$  Hz, 2 H, H-7),  $7,49$  (m, 3 H, H-11 u. H-29),  $7,75$  (m, 3 H, H-12 u. H-13 u. H-14),  $7,93$  (s, 2 H, H-24),  $8,00$  (dt,  $^3J = 7,8$  Hz,  $^4J = 1,68$  Hz, 2 H, H-28),  $8,63$  (d,  $^3J = 8$  Hz, 4 H, H-27 u. H-30)

<b>ESI<sup>+</sup>-HR-MS</b>	m/z	C <sub>51</sub> H <sub>54</sub> N <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	[M-Cl <sup>-</sup> ]	berechnet:	828,4232
				gefunden:	828,4282

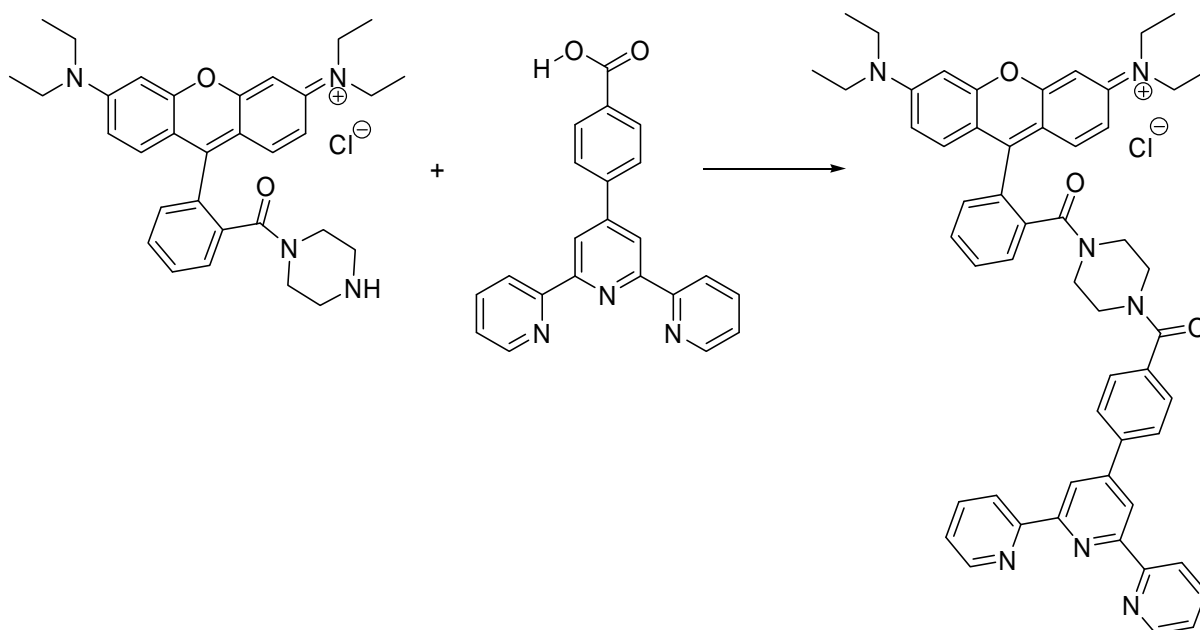
**UV/Vis**                     $\lambda = 566$  nm                     $\epsilon = 62\,000$  l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

**Fluoreszenz**                     $\lambda_{\text{abs}} = 567$  nm                     $\lambda_{\text{em}} = 593$  nm

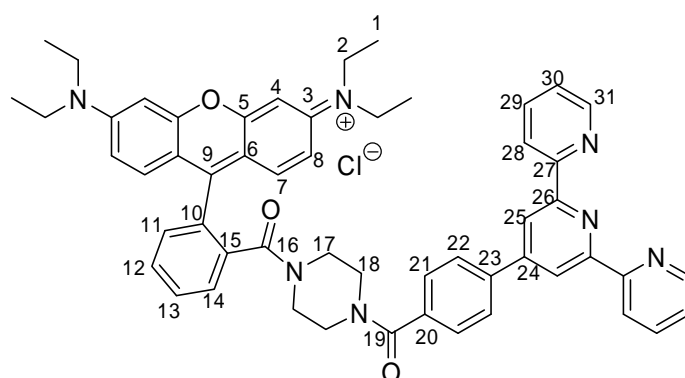
**R<sub>f</sub>**                                    0,75 (SiO<sub>2</sub>, Methylenchlorid:Methanol 3:1)

**HPLC**                                Retentionszeit                    64,5 min

## 4'-(4-Carboxyphenyl)-2,2':6',2''-Terpyridin Rhodamin B Piperazinamid **35\*** [PT]



161 mg (0,46 mmol) 4-(2,2',6',2''-Terpyridin-4'-yl)-benzoesäure, 173 mg (0,46 mmol) HBTU und 93  $\mu\text{l}$  (70 mg, 0,46 mmol) DIEA wurden in 30 ml trockenem DMF unter Argonatmosphäre vorgelegt und 20 min bei RT gerührt. Danach wurden 250 mg (0,46 mmol) Rhodamin B Piperazinamid. zugegeben und 3 Tage bei RT gerührt. Anschließend wurde die Mischung mit Wasser versetzt und mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung ( $\text{SiO}_2$ , Mit Lösungsmittelwechsel 1. Methanol:Chloroform 3:1 + 1% $\text{NEt}_3$ , 2. Methanol:Chloroform 3:1 + 1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) erhielt man 363 mg (0,40 mmol, 90 %) eines violetten Feststoffs.



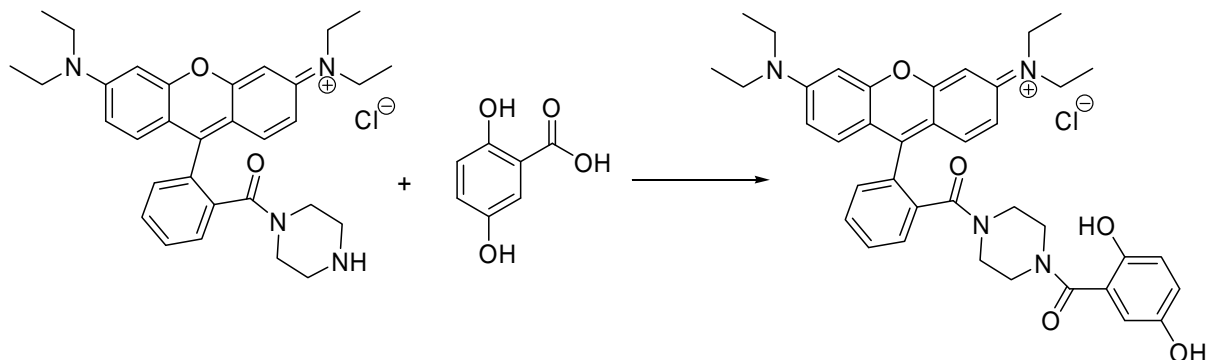
**$^1\text{H-NMR}$**  (Methanol- $d_4$ , 200 MHz)

$\delta = 1,33$  (t,  $^3J = 6,66$  Hz, 12 H, H-1), 3,55 (s, 8 H, H-17 u. H-18), 3,72 (q,  $^3J = 7,17$  Hz, 8 H, H-2), 7,00 (d,  $^4J = 2,12$  Hz, 2 H, H-4), 7,11 (dd,  $^3J = 9,92$  Hz,  $^4J = 1,54$  Hz, 2 H, H-8), 7,32 (d,  $^3J = 9,54$  Hz, 2 H, H-7), 7,54 (m, 1 H, H-11), 7,64 (m, 1 H, H-12 u. H-13 u. H-14), 7,79 (m, 4 H, H-29 u. H-20), 8,20 (m, 4 H, H-21 u. H-22), 8,68 (d,  $^3J = 8,04$  Hz, 2 H, H-31), 8,84 (s, 2 H, H-25), 8,88 (d,  $^3J = 4,52$  Hz, 2 H, H-28)

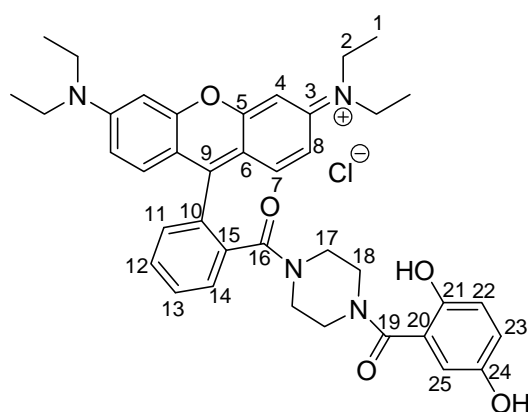
<b>ESI<sup>+</sup>-HR-MS</b> m/z	$\text{C}_{54}\text{H}_{52}\text{N}_7\text{O}_3^+$	$[\text{M}-\text{Cl}]^+$	berechnet:	846,4132
			gefunden:	846,4156

**UV/Vis**  $\lambda = 565$  nm  $\epsilon = 41\,000$  l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

**Fluoreszenz**  $\lambda_{\text{abs}} = 566$  nm  $\lambda_{\text{em}} = 590$  nm

2,5-Dihydroxybenzoesäure Rhodamin B Piperazinamid **36\*****[H]**

141 mg (0,91 mmol) 2,5-Dihydroxybenzoesäure wurden unter Argonatmosphäre in 50 ml absolutem DMF vorgelegt. Anschließend wurden 364 mg (0,91 mmol) HBTU und 186  $\mu$ l DIEA (1,14 mmol) zugegeben und 20 min bei RT gerührt. Dann wurden 500 mg (0,91 mmol) Rhodamin B Piperazinamid zugesetzt und die tiefrote Lösung 3 Tage bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 50 ml Wasser versetzt und mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der lila gefärbte Rückstand wurde durch Säulenchromatographie ( $\text{SiO}_2$ , Chloroform:Methanol 5:1) aufgereinigt. Es wurden 350 mg (0,51 mmol, 56 %) Hydrochinoncarbonsäure Rhodamin B Piperazinamid als violetter Feststoff erhalten.

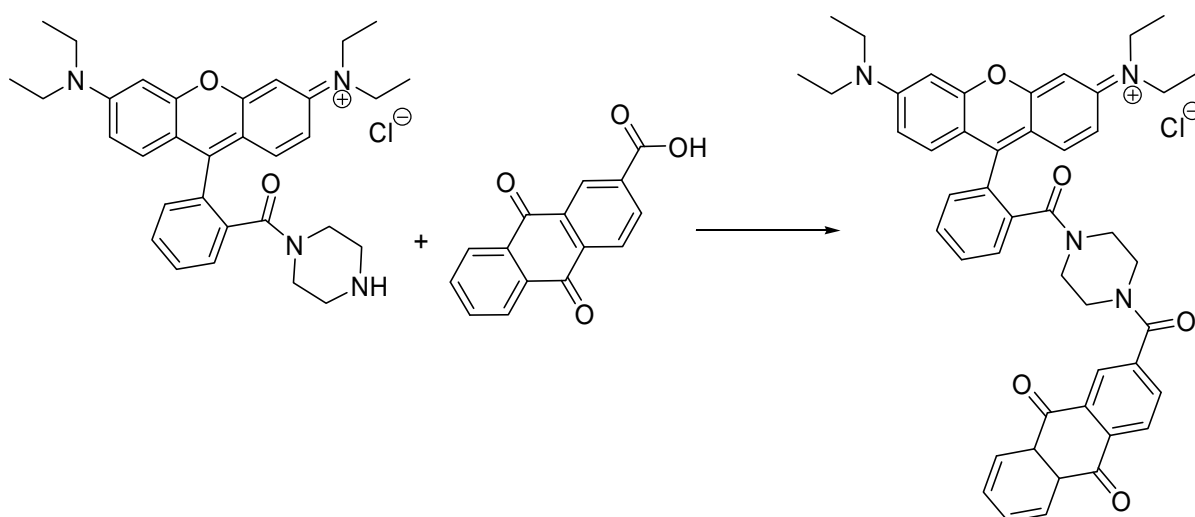
 **$^1\text{H}$  NMR** (Methanol- $d_4$ , 200 MHz)

$\delta$  = 1,31 (t,  $^3J$  = 9,55 Hz, 12 H, H-1), 3,46 (s, 8 H, H-17 u. H-18), 3,70 (q,  $^3J$  = 6,16 Hz, 8 H, H-2), 6,56 (m, 1 H, H-22), 6,71 (m, 1 H, H-23), 6,96 (s, 2 H, H-4), 7,09 (d,  $^3J$  = 9,44 Hz, 2 H, H-7), 7,30 (d,  $^3J$  = 9,31 Hz, 2 H, H-8), 7,41 (m, 1 H, H-25), 7,54 (m, 1 H, H-11), 7,76 (m, 3 H, H-12 u. H-13 u. H-14)

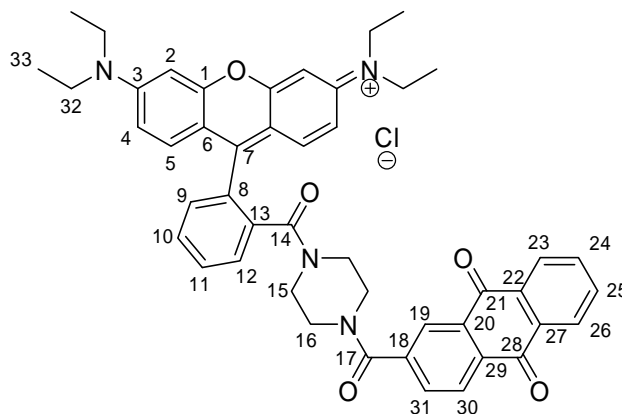
<b>ESI<sup>+</sup>-HR-MS</b> m/z	C <sub>39</sub> H <sub>43</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> <sup>+</sup>	[M-Cl] <sup>+</sup>	berechnet:	647,3228
			gefunden:	647,3229
<b>UV/Vis</b>	λ = 565 nm	ε = 65000 l mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>		
<b>Fluoreszenz</b>	λ <sub>abs</sub> = 566 nm	λ <sub>em</sub> = 592 nm		
<b>HPLC</b>	Retentionszeit	49,5 min		

## Anthrachinon-2-carbonsäure Rhodamin B Piperazinamid **37**\*

[AC]



46 mg (0,18 mmol) Anthrachinon-2-carbonsäure, 69,3 mg HBTU (0,18 mmol) und 64 µl DIEA (0,36 mmol) wurden in 50 ml DMF gelöst und 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 100 mg (0,18 mmol) Rhodamin B Piperazinamid zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Nach Zugabe von 25 ml destilliertem Wasser wurde die wässrige Phase abgetrennt und mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO<sub>2</sub>, Ethylacetat:Ethanol 7:1) erhielt man 88 mg (0,1 mmol, 57 %) violetten Feststoff.

**<sup>1</sup>H NMR** (Chloroform-d<sub>1</sub>, 200 MHz)

$\delta = 1,31$  (t,  $^3J = 7,04$  Hz, 12 H, 33-H), 3,50 (s, 8 H, 15-H u. 16-H), 3,60 (m, 8 H, H-32), 6,75 (s, 2 H, H-2), 6,97 (m, 2 H, H-5), 7,32 (m, 2 H, H-4), 7,52 (m, 1 H, H-9), 7,64 (m, 2 H, H-10, H-11), 7,80 (m, 3 H, H-23, H-26, H-12), 8,00 (s, 1 H, H-19), 8,20 (m, 1 H, H-31), 8,34 (m, 3 H, H-24 u. H-25 u. H-31)

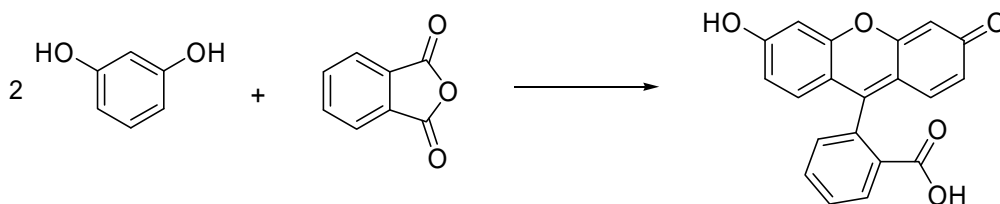
<b>ESI<sup>+</sup>-HR-MS</b>	m/z	C <sub>47</sub> H <sub>45</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> <sup>+</sup>	[M-Cl] <sup>+</sup>	berechnet:	745,3390
				gefunden:	745,3401

**UV/Vis**                     $\lambda = 566$  nm                     $\epsilon = 71000$  l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

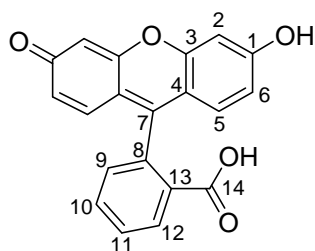
**Fluoreszenz**                 $\lambda_{\text{abs}} = 567$  nm                 $\lambda_{\text{em}} = 591$  nm

**R<sub>f</sub>**                            0,28 (SiO<sub>2</sub>, Ethanol:Ethylacetat:Chloroform 3:1:1)

## Fluorescein **38** [22]



7,50 g (50,6 mmol) Phthalsäureanhydrid und 11,01 g (100 mmol) Resorcin wurden in einen Rundkolben gegeben und auf 180°C erhitzt. Es wurden 4,60 g (34 mmol) wasserfreies ZnCl<sub>2</sub> hinzugegeben. Das Erhitzen wurde eine halbe Stunde fortgesetzt. Anschließend ließ man die Reaktionsmischung auf 90 °C abkühlen und versetzte mit 100 ml Wasser und 5 ml konz. HCl hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung eine Stunde zum Rückfluss erhitzt. Das unlösliche Fluorescein wurde abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Gereinigt wurde das Fluorescein, indem es in verdünnter NaOH-Lösung aufgelöst und durch Zugabe von verdünnter HCl wieder ausgefällt wurde. Man erhielt 7,93 g (24 mmol, 24 %) eines roten Feststoffes.



### <sup>1</sup>H-NMR (Methanol-d<sub>4</sub>, 200 MHz)

$\delta$  = 6,56 (dd, <sup>3</sup>J = 8,27 Hz, <sup>4</sup>J = 1,32 Hz, 2 H, H-6), 6,61 (d, <sup>3</sup>J = 8,63 Hz, 2 H, H-5), 6,70 (d, <sup>4</sup>J = 1,45 Hz, 2 H, H-2), 7,24 (d, <sup>3</sup>J = 7,62 Hz, 1 H, H-9), 7,72 (t, <sup>3</sup>J = 7,5 Hz, 1 H, H-10 o. H-11), 7,79 (t, <sup>3</sup>J = 7,41 Hz, 1 H, H-10 o. H-11), 8,03 (d, <sup>3</sup>J = 7,67 Hz, 1 H, H-12)

### <sup>13</sup>C-NMR (Methanol-d<sub>4</sub>, 50 MHz)

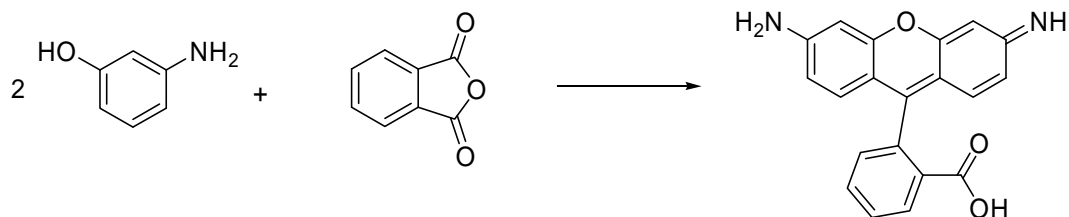
$\delta$  = 103,6 (C-2), 111,5 (C-4), 113,7 (C-6), 125,5 (C-11), 126,0 (C-9), 128,3 (C-13), 130,2 (C-5), 131,1 (C-12), 136,5 (C-10), 154,2 (C-1 o. C-3), 161,4 (C-1 o. C-3), 171,5 (C-14),

**ESI<sup>+</sup>-MS** m/z      333 [M+H]<sup>+</sup>

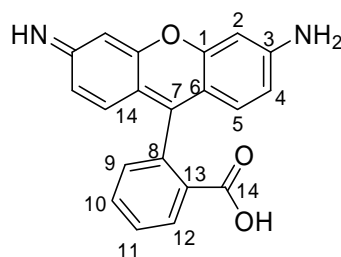
**UV/Vis**               $\lambda$  = 490 nm               $\epsilon$  = 73 000 l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

**Fluoreszenz**         $\lambda_{\text{abs}}$  = 492 nm               $\lambda_{\text{em}}$  = 515 nm



Rhodamin Grün (Rhodamin 110) **39** [99]

10,9 g (100,0 mol) 3-Aminophenol wurden in 100 ml konzentrierter Schwefelsäure unter Rühren gelöst und dann 14,8 g (100,0 mol) Phthalsäureanhydrid zugegeben. Es wurde 4 h auf 190°C erhitzt. Die erhaltene rotbraune Schmelze wurde dann auf 250 ml Eiswasser gegossen und zum Auskristallisieren über Nacht stehen gelassen. Nach Filtration wurde der Rückstand mit 10% ige Schwefelsäure (1750 ml) und 500 ml gesättigter Natriumacetatlösung umkristallisiert. Nach Filtration erhielt man 1,2 g (3,6 mmol, 4 %) rotbraune Kristalle.



**<sup>1</sup>H-NMR** (Methanol-d<sub>4</sub>, 400 MHz)

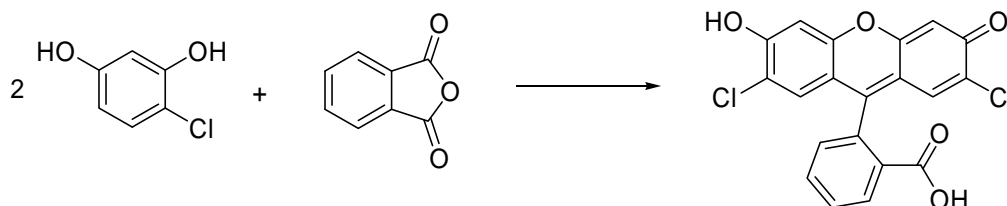
$\delta$  = 6,83 (m, 4 H, H-4 u. H-5), 7,07 (m, 2 H, H-2), 7,43 (m, 1 H, H-9), 7,75 (m, 2 H, H-10 u. H-11), 7,92 (m, 1 H, H-12)

**ESI<sup>+</sup>-MS** m/z      331 [M+H<sup>+</sup>]

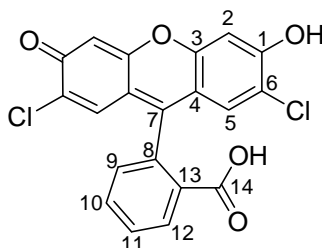
**UV/Vis**               $\lambda$  = 495 nm

**Fluoreszenz**         $\lambda_{\text{abs}}$  = 496 nm           $\lambda_{\text{em}}$  = 521 nm

**HPLC**                Retentionszeit          35,4 min

Dichlorofluorescein **40** [98]

14,46 g (100 mmol) Chlorresorcin wurden in 100 ml Methansulfonsäure gelöst und mit 7,41 g (50 mmol) Phthalsäureanhydrid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde auf 80 – 85 °C erhitzt und bei dieser Temperatur 48 h gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Reaktionsmischung auf 700 ml Eiswasser gegossen und anschließend abfiltriert. Das Produkt wurde im Vakuum bei 60 °C getrocknet. Danach wurde Wasser zugegeben um die überschüssige Methansulfonsäure zu lösen und dann erneut im Vakuum getrocknet. Man erhielt 12,82 g (32 mmol, 64 %) eines rötlichen Feststoffes.



**<sup>1</sup>H-NMR** (Methanol-d<sub>4</sub>, 200 MHz)

$\delta = 6,64$  (s, 2 H, H-5),  $6,87$  (s, 2 H, H-2),  $7,29$  (d,  $^3J = 7,59$  Hz, 1 H, H-9),  $7,82$  (m, 2 H, H-10 u. H-11),  $8,07$  (d,  $^3J = 7,56$  Hz, 1 H, H-12)

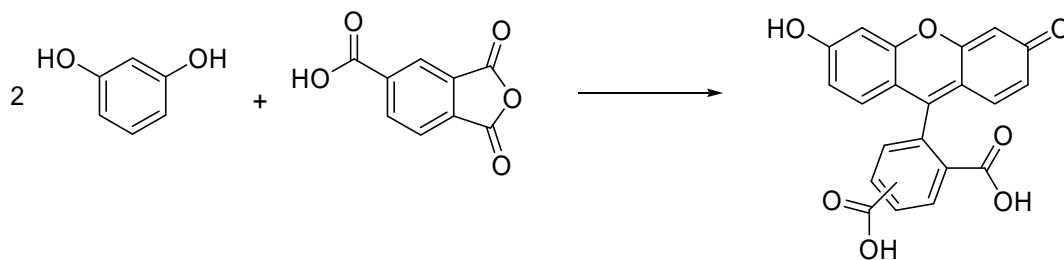
**<sup>13</sup>C-NMR** (Methanol-d<sub>4</sub>, 50 MHz)

$\delta = 104,7$  (C-2),  $113,5$  (C-4),  $120,2$  (C-6),  $126,4$  (C-11),  $127,5$  (C-9),  $128,7$  (C-13),  $130,0$  (C-5),  $131,9$  (C-12),  $136,5$  (C-10),  $153,7$  (C-1 o. C-3),  $159,1$  (C-1 o. C-3),  $170,2$  (C-14),

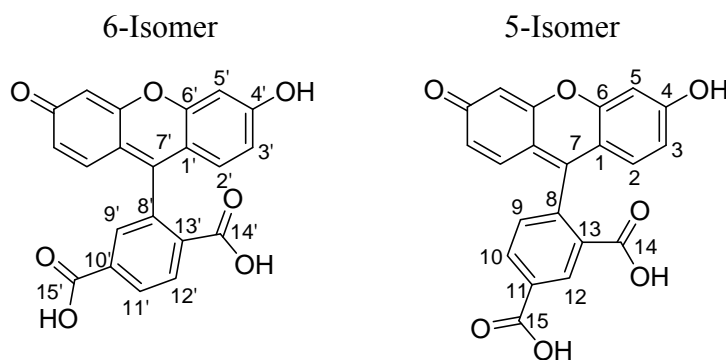
**UV/Vis**  $\lambda = 502$  nm  $\epsilon = 86\,000$  l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

**Fluoreszenz**  $\lambda_{\text{abs}} = 504$  nm  $\lambda_{\text{em}} = 529$  nm

**ESI<sup>+</sup>-MS** m/z 401 [M+H]<sup>+</sup>

5(6)-Carboxyfluorescein **41** <sup>[98]</sup>

6 g (54,5 mmol) Resorcin wurden in 50 ml Methansulfonsäure suspendiert und gerührt bis sich ein Großteil des Feststoffes gelöst hatte. Nach der Zugabe von 5,2 g (27,2 mmol) Trimellitsäureanhydrid wurde drei Tage zum Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung wurde auf 300 ml Eiswasser gegossen, wobei ein feinkörniger rostroter Niederschlag ausfiel. Der Niederschlag wurde abgesaugt und dreimal mit Wasser gewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet. Man erhielt 8,8 g (23,4 mmol, 90 %) eines rotbraunen amorphen Feststoffes.

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz)

$\delta$  = 6,51-6,64 (m, 8 H, H-2 u. H-2' u. H-3 u. H-3'), 6,69 (d,  $^4J$  = 1,77 Hz, 4 H, H-5 u. H-5'), 7,39 (dd,  $^3J$  = 8,13 Hz,  $^5J$  = 0,45 Hz, 1 H, H-9), 7,65 (s, 1 H, H-9'), 8,10 (dd,  $^3J$  = 8,0 Hz,  $^5J$  = 0,57 Hz, 1 H, H-12'), 8,23 (dd,  $^3J$  = 7,98 Hz,  $^4J$  = 1,31 Hz, 1 H, H-11'), 8,29 (dd,  $^3J$  = 8,57 Hz,  $^4J$  = 1,23 Hz, 1 H, H-10), 8,40 (s, 1 H, H-12)

**<sup>13</sup>C- NMR** (Methanol-d<sub>4</sub>, 50 MHz)

$\delta$  = 103,7 (C-5 u. C-5'), 109,8 (C-1 o. C-1'), 109,9 (C-1 o. C-1'), 116,3 (C-3 o. C-3'), 116,4 (C-3 o. C-3'), 124,4 (C-9 o. C-9' o. C-11'), 125,7 (C-9 o. C-9' o. C-11'), 127,0 (C-9 o. C-9' o. C-11'), 128,3 (C-12'), 128,4 (C-12), 133,1 (C-13' o. C-13), 136,2 (C-10), 137,4 (C-10'), 150,0

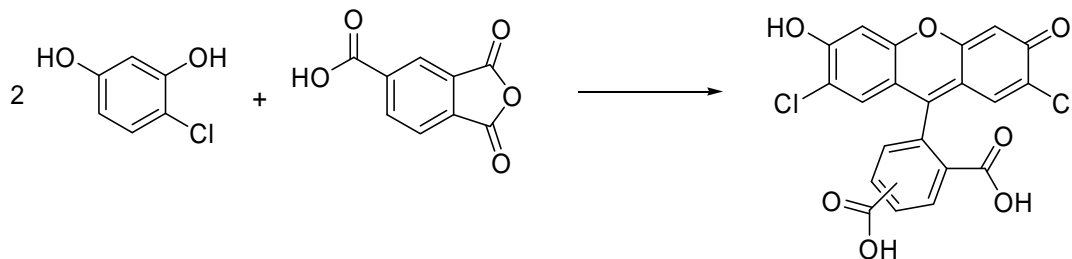
(C-4 u. C-4' u. C-6 u. C-6'), 150,1 (C-8'), 155,3 (C-8), 166,0 (C-15 u. C-15'), 167,5 (C-14 u. C-14')

**UV/Vis**  $\lambda = 491 \text{ nm}$   $\epsilon = 60\,000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

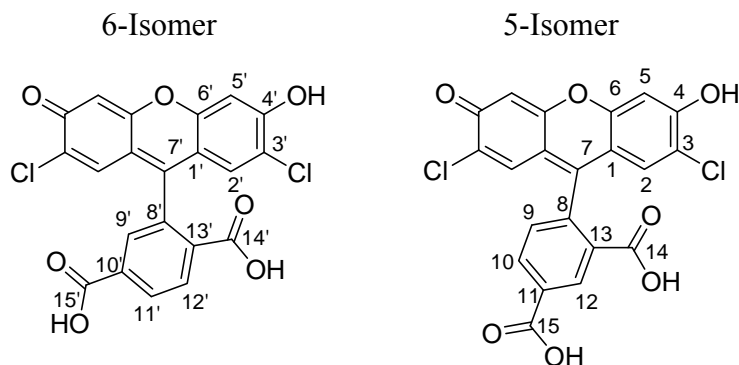
**Fluoreszenz**  $\lambda_{\text{abs}} = 493 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{em}} = 518 \text{ nm}$

**ESI<sup>+</sup>-MS** m/z 377 [M+H]<sup>+</sup>

## Dichloro-5(6)-carboxy-fluorescein **42** [98]



6,6 g (45,6 mmol) Chlorresorcin wurden in 50 ml Methansulfonsäure suspendiert. Nach der Zugabe von 4,4 g (22,8 mmol) Trimellitsäureanhydrid wurde 72 h bei 100 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf 300 ml Eiswasser gegossen, wobei ein feinkörniger rostroter Niederschlag ausfiel. Der Niederschlag wurde mit Wasser gewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet. Man erhielt 9,4 g (21,1 mmol, 92 %) eines rotbraunen amorphen Feststoffes.



**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz)

$\delta = 6,77$  (s, 2 H, H-2 o. H-2'),  $6,80$  (s, 2 H, H-2 o. H-2'),  $6,91$  (s, 4 H, H-5 u. H-5'),  $7,44$  (dd,  $^3J = 7,93 \text{ Hz}$ ,  $^5J = 0,49 \text{ Hz}$ , 1 H, H-9),  $7,74$  (s, 1 H, H-9'),  $8,11$  (dd,  $^3J = 7,95 \text{ Hz}$ ,  $^5J = 0,61 \text{ Hz}$ ,

1 H, H-12'), 8,24 (dd,  $^3J = 7,99$  Hz,  $^4J = 1,29$  Hz, 1 H, H-11'), 8,31 (dd,  $^3J = 8,02$  Hz,  $^4J = 1,56$  Hz, 1 H, H-10), 8,40 (s, 1 H, H-12)

**$^{13}\text{C}$ - NMR** (DMSO- $d_6$ , 50MHz)

$\delta = 103,48$  (C-5 u. C-5'), 110,9 (C-1 o. C-1'), 111,3 (C-1 o. C-1'), 118,3 (C-9 o. C-9' o. C-11'), 125,7 (C-9 o. C-9' o. C-11'), 127,4 (C-9 o. C-9' o. C-11'), 128,3 (C-12'), 131,5 (C-12), 133,5 (C-13'), 136,1 (C-10), 137,1 (C-10'), 151,5 (C-4 u. C-4' u. C-6 u. C-6'), 151,8 (C-8'), 156,8 (C-8), 166,4 (C-15 o. C-15'), 166,4 (C-15 o. C-15'), 168,0 (C-14 o. C-14'), 168,1 (C-14 o. C-14')

**UV/Vis**                     $\lambda = 504$  nm                     $\varepsilon = 83\,000$  l mol $^{-1}$  cm $^{-1}$

**Fluoreszenz**                 $\lambda_{\text{abs}} = 505$  nm                 $\lambda_{\text{em}} = 529$  nm

**ESI $^+$ -MS** m/z                445 [M+H] $^+$

## 9. Literatur

- [1] B. Valeur, *Molecular Fluorescence*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, 1. Auflage.
- [2] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **1996**, 2. Auflage.
- [3] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Plenum Press, New York, **1983**.
- [4] <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html>,  
Stand: 11.11.2007.
- [5] <http://www.microscopyu.com/articles/confocal/confocalintrobasics.html>  
Stand: 11.11.2007.
- [6] <http://www.microscopyu.com/galleries/fluorescence/cells/cv1/cv1large3.html>  
Stand: 11.11.2007.
- [7] <http://www.microscopyu.com/galleries/fluorescence/cells/hela/helalarge8.html>  
Stand: 11.11.2007.
- [8] H. Römpp, *Römpp Basislexikon Chemie*, Thieme Verlag, Stuttgart, **1998**, 10. Auflage.
- [9] H. R. Schweizer, *Künstliche Organische Farbstoffe und ihre Zwischenprodukte*, Springer Verlag, Heidelberg, **1964**.
- [10] H. Beyer, W. Walter, *Lehrbuch der organischen Chemie*, S. Hirzel Verlag, Stuttgart, **2004**, 24. Auflage.
- [11] A. S. Keston, R. Brandt, *Anal. Biochem.* **1965**, *11*, 1-5.
- [12] R. Brandt, A. S. Keston, *Anal. Biochem.* **1965**, *11*, 6-9.
- [13] A. Baeyer, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1876**, *183*, 1-74.
- [14] G. G. Guilbault, D. N. Kramer, *Anal. Chem.* **1964**, *36*, 409-412.
- [15] G. Jander, K. F. Jahr, *Massanalyse*, W. de Gruyter Verlag, Berlin, **2003**, 16. Auflage.
- [16] N. Schummelfeder, K.-J. Ebschner, E. Krogh, *Naturwissenschaften* **1957**, *44*, 467-468.
- [17] J. B. Le Pecq, C. Paoletti, *Anal. Biochem.* **1966**, *17(1)*, 100-107.
- [18] L. A. Brey, G.B. Schuster, H.G. Drickamer, *J. Chem. Phys.* **1977**, *67(6)*, 2648-2650.
- [19] B. T. Golding, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1990**, 803-805.
- [20] O. Fischer., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1877**, *10*, 1623-1626.
- [21] A. W. Hoffmann., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1885**, *18(1)*, 767-771.
- [22] A. Baeyer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1871**, *4*, 555-558.
- [23] A. Baeyer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1871**, *4*, 658-665.

- [24] R. P. Haughland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, Molecular Probes, **2002**, 9. Edition.
- [25] L. S. Pinheiro, M. L. A. Temperini, *Surf. Sci.* **2000**, *464*, 176-182.
- [26] J.-P. Sauvage, J. P. Collin, J. C. Chambron, S. Guillerez, C. Coudret, V. Balzani, F. Barigelletti, L. De Cola, L. Flamigni, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 993-1019.
- [27] M. Heller, U. S. Schubert, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 947-961.
- [28] H. Hofmeier, U. S. Schubert, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 373-399.
- [29] IUPAC Stability Constants Database.
- [30] F. Kröhnke, *Synthesis* **1976**, 1-24.
- [31] K. T. Potts, D. A. Usifer, A. Guadalupe, H. D. Abruna, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3961-3966.
- [32] D. L. Jameson, L. E. Guise, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1999-2002.
- [33] J. Wang, G. Hanan, *Synlett* **2005**, *8*, 1251-1254.
- [34] E. C. Constable, J. Lewis, M. Schroeder, *Polyhedron* **1982**, *1*, 303-304.
- [35] E. C. Constable, M. Ward, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1990**, 1405.
- [36] D. J. Cardenas, J. P. Sauvage, *Synlett* **1996**, *9*, 916-918.
- [37] P. R. Andres, R. Lunkwitz, G.R. Pabst, K. Boehn, D. Wouters, S. Schmatloch, S. U. Schubert, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 3769-3776.
- [38] P.R. Andres H. Hofmeier, B.G.G. Lohmeijer, U. S. Schubert *Synthesis* **2003**, *18*, 2865-2871.
- [39] J. Hovinen, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 5707-5709.
- [40] J. van Alphen, *Recl. Trav. Chim.*, **1937**, *56*, 343-350.
- [41] X. Liang, P. Sadler, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 246-266.
- [42] L. H. Gade, *Koordinationschemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **1998**.
- [43] M. Athar, M. Misra, R. C. Srivastava, *Fund. Appl. Toxicol.* **1987**, *9*, 26-33.
- [44] E. K. Barefield, *Inorg. Chem.* **1972**, *11*, 2273-2274.
- [45] Ronnie et al., U.S. 5428156, **27. Jun 1995**.
- [46] W. Yang, C. M. Giandomenico, M. Sartori, D. A. Moore, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2481-2483.
- [47] I. Tabushi, Y. Taniguchi, H. Kato, *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 1049-1052.
- [48] K. Terpe, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *60*, 523-533.
- [49] W. W. Ward, *Photochem. Photobiol. Rev.* **1979**, *4*, 1-57.
- [50] A. Coxon, T. H. Bestor, *Chemistry & Biology* **1995**, *2*, 119-121.

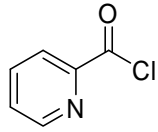
- [51] <http://www.science.mcmaster.ca/biochem/faculty/truant/trulab.html>  
Stand: 22.11.2007.
- [52] <http://www.npaci.edu/online/v4.14/gfp.html>  
Stand: 22.11.2007.
- [53] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, *Nature*, **1975**, 258, 598-599.
- [54] J. Schmitt, H. Hess, H. G. Stunnenberg, *Molecular Biology Reports*, **1993**, 18, 223-230.
- [55] R. J. Sundberg, R. B. Martin, *Chem. Rev.*, **1974**, 74, 471-512.
- [56] G. V. Los et al., *Cell Notes* **2005**, 11, 2-6.
- [57] K. Johnsson et al., *Methods* **2004**, 32(4), 437-444.
- [58] G. Hermanson et al., *Immobilized affinity ligand techniques*, Academic Press, San Diego, **1992**.
- [59] Y. Okada, *Curr. Org. Chem.* **2001**, 5, 1-43.
- [60] C. A. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, 61, 10827-10852.
- [61] A. Williams, I. T. Ibrahim, *Chem. Rev.* **1981**, 81, 589-636.
- [62] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1067-1068.
- [63] M. Mikolajczyk, P. Kielbasinski, *Tetrahedron* **1981**, 37, 233-284.
- [64] W. König, R. Geiger, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1970**, 103, 788-798.
- [65] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397-4398.
- [66] R. Knorr, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30(15), 1927-1930.
- [67] H. Staab, M. Lüking, F. Dürr, *Chem. Ber.* **1962**, 95, 1275-1283.
- [68] A. Basha, M. Lipton, S. M. Weinreb, *Tetrahedron Lett.* **1977**, 18, 4171-4174.
- [69] D. Nelson, M. Cox, *Lehninger Biochemie*, Springer, Berlin Heidelberg, **2005**, 3. Auflage.
- [70] G. Löffler, P. E. Petrides, P. C. Heinrich, *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, **2007**, 8. Auflage.
- [71] P. Schopfer, A. Brennicke, *Pflanzenphysiologie*, Spektrum(Elsevier), München, **2006**, 6. Auflage.
- [72] H.-J. Gais, H. Hemmerle, *Chemie in unserer Zeit* **1990**, 24(5), 239-248.
- [73] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 6156-6165.  
U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6032-6040.
- [74] A. Salvi, P.-A. Carrupt, J. M. Mayer, B. Testa, *Drug Metabolism and Disposition* **1997**, 25(4), 395-398.
- [75] P. G. Hill, *Ann. Clin. Biochem.* **1985**, 22, 565-578.



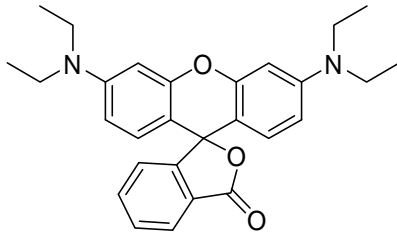
- [76] E. J. Cohn, L.E. Strong, W. L. Hughes, D. J. Mulford, J. N. Ashworth, M. Melin, H. L. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, *68*, 459-475.
- [77] E. Gagelli, H. Kozlowski, D. Valensin, G. Valensin, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1995-2044
- [78] D.R. Brown, *Biochem. Soc. Trans* **2002**, *30(4)*, 742-745
- [79] H. Kroll, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 2036-2039.
- [80] J. B. Christensen, *Molecules* **2001**, *6*, 47-51.
- [81] J. Hofmann, M. Sernetz, *Anal. Biochem.* **1983**, *131*, 180-186.
- [82] B. Cox, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *74*, 6823-6828.
- [83] Z. Warnke, *Rocz. Chem.* **1976**, *50*, 1801-1804.
- [84] A. El-Hilaly, M. El-Ezaby, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1976**, *38*, 1533-1539.
- [85] G. Wilkinson, R. D. Gillard, J. A. McCleverty, Eds., *Comprehensive Coordination Chemistry*, Pergamon, Oxford, **1990**, *Vol. 5*.
- [86] T. Riedo, T. Kaden, *Helv. Chim. Acta* **1979**, *62*, 1089-1096.
- [87] G. Brookes, L. Pettit, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1977**, 1918-1924.
- [88] C. Petitfaux, J. Barbier, J. Faucherre, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1970**, 3441-3455.
- [89] P. C. Jain, E. C. Lingafelter, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 6131-6136.
- [90] A. Mokhir, R. Krämer, *Chem. Comm.* **2005**, *17*, 2244-2246.
- [91] V. Dujols, F. Ford, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7386-7387.
- [92] T. Nguyen, M. Francis, *Org. Lett.* **2003**, *5(19)*, 3245-3248.
- [93] T.C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 702-705.
- [94] D. E. Berry, S. Girard, A. McAuley, *J. Chem. Ed.* **1996**, *73(6)*, 551-554.
- [95] J. R. Morrow, US 5684149, **11. Apr. 1994**
- [96] M. Studer, T. A. Kaden, *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69(8)*, 2081-2086
- [97] S. Bittner, R. A. Illos, D. Shamir, L. J. W. Shimon, I. Zilbermann, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 5543-5546.
- [98] R. P. Haughland, *J. Org. Chem.* **1997**, *62(19)*, 6469-6475.
- [99] R. Meyer, W. Sundmacher, *Chem. Ber.* **1899**, *32(2)*, 2112-2124.

# Synthetisierte Verbindungen:

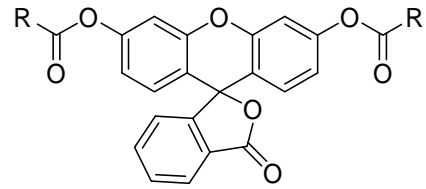
\* = nicht literaturbekannte Verbindungen



1

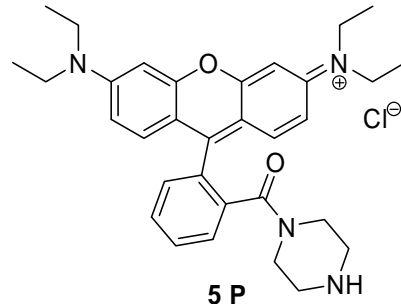


4

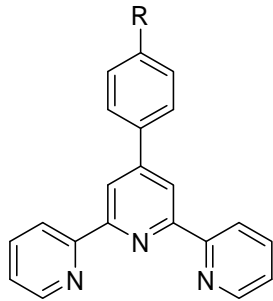


2\* R = 2-Pyridyl

3 R = CH<sub>3</sub>



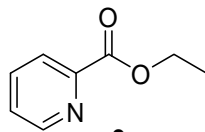
5 P



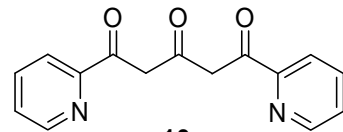
6 R = CH<sub>3</sub>

7 R = CN

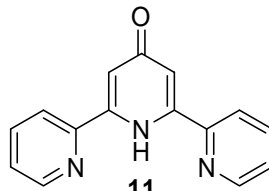
8 R = COOH



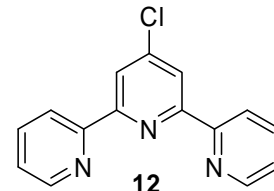
9



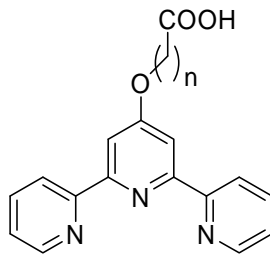
10



11

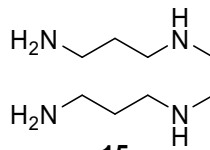


12

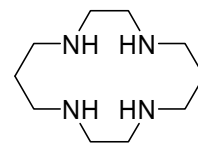


13 n = 5

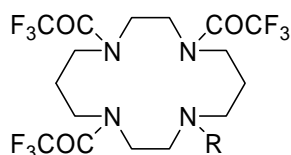
14 n = 3



15



16



17 R = H

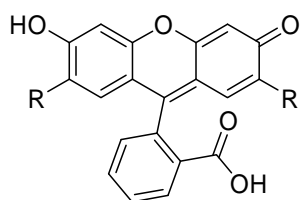
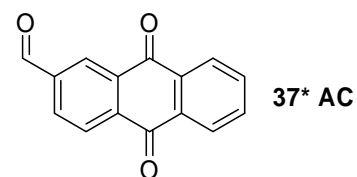
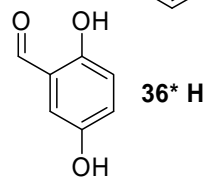
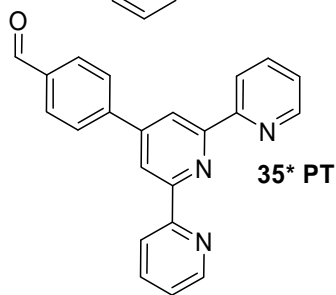
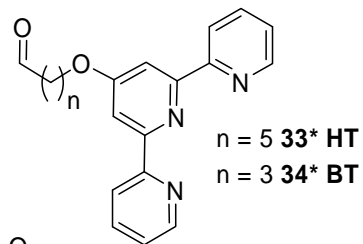
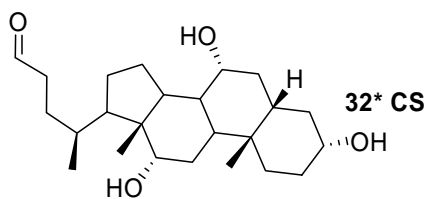
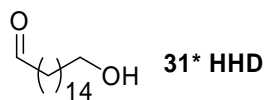
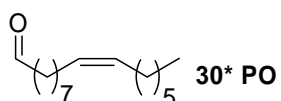
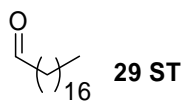
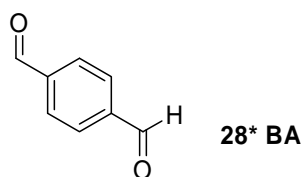
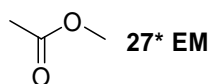
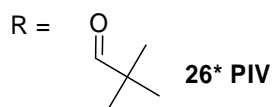
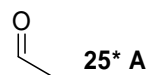
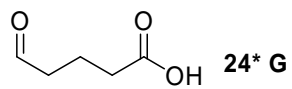
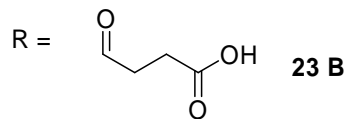
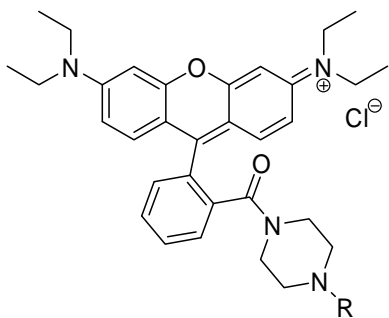
18\* R = CH<sub>2</sub>CN

19\* R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN

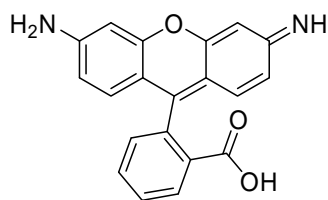
20\* R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOO-boc

21\* R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>

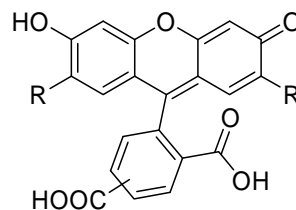
22 R = CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>p-COOH



R = H **38**  
R = Cl **40**



**39**



R = H **41**  
R = Cl **42**

Erklärungen gemäß § 8 (3) b) und c) der Promotionsordnung:

a) ich erkläre hiermit Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

b) ich erkläre hiermit Eides statt, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, den 13. 12. 2007

---

(Radoslaw Kierat)