

Lumineszierende Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexe:

Synthese, Bindung an Nukleinsäuren und zelluläre Aufnahmestudien

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Chemikerin

Annemarie Gabriele Schwarz

aus Grenzach-Wyhlen

2011

Kurzzusammenfassung

Die vorliegende Arbeit behandelt die Synthese von unterschiedlich funktionalisierten Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexen und deren biologischen Anwendung.

Durch Kopplung eines Anthrachinonderivats an Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexe konnte die Wechselwirkung dieser Komplexe mit Polynukleotiden sowie die Zellgängigkeit verbessert werden. Es zeigte sich weiterhin, dass Substituenten an den Bipyridin-Liganden die Wechselwirkung der Komplexe mit Polynukleotiden modulieren. Kleine, wasserstoffbrückenbildende bzw. positiv geladene Substituenten förderten die Bindung an Polynukleotide. Dahingegen verhinderten große bzw. negativ geladene Substituenten die Wechselwirkung dieser Rutheniumkomplexe mit Polynukleotiden.

Aufnahmegeschwindigkeit, -mechanismus und Verteilung der synthetisierten Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexe wurde an drei adhärenen Krebszelllinien sowie an einer Krebs suspensionszelllinie untersucht. Die adhärenen Zelllinien zeigten ein anderes Aufnahmeverhalten als die Suspensionszelllinien. Während die adhärenen Zellen die Rutheniumkomplexe hauptsächlich durch energieabhängigen Transport akkumulierten, wurden die unpolarsten Komplexe der getesteten Reihe von den Suspensionszellen über energieunabhängige Transportwege aufgenommen. Alle Zelllinien zeigten nach 4 h Inkubationszeit mit den Rutheniumkomplexen die für Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexe typische punktförmige Verteilung im Zytoplasma mit Aussparung des Zellkerns.

Weiterhin wurden $[\text{Ru}(\text{HDPA})_2\text{dppz}]^{2+}$ (HDPA = Di-2-pyridylamin, dppz = Dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazin) und dessen Derivate hergestellt und hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften, Erkennung von DNA-Defektstrukturen und zellulären Verteilung untersucht.

Von strukturell ähnlichen Komplexen ist in der Literatur bekannt, dass diese nur bei tiefen Temperaturen Fluoreszenz aufweisen. Durch Alkylierung des HDPA-Liganden konnte in aprotischen Lösungsmitteln Fluoreszenz bei Raumtemperatur erreicht werden. Es zeigte sich, dass die alkylierten Komplexe als Fluoreszenzsensoren für die Erkennung von Basenfehlpaarungen in DNA geeignet sind. Zudem wurden alle dppz-Rutheniumkomplexe von HeLa-Zellen akkumuliert und wiesen wiederum die für Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexe typische punktförmige Verteilung im Zytoplasma ohne Anfärbung des Nukleus auf.

Short Summary

This thesis deals with the synthesis and biological application of functionalized poly(pyridyl)ruthenium(II) complexes.

The coupling of an anthraquinone moiety to the complexes improved the interaction of poly(pyridyl)ruthenium(II) complexes with DNA and their cellular uptake. Interaction of the complexes with DNA was further modulated by variation of the substituents of the bipyridine ligands. Ligands with small, hydrogen-bonding or positively charged residues favored the interaction with DNA, while bulky or lipophilic residues decreased the affinity of these ruthenium complexes to DNA.

Three different adherent cancer cell lines and one suspension cancer cell line were utilized to explore the cellular uptake rate, mechanism and intracellular distribution of these ruthenium complexes. All adherent cells showed energy dependent uptake of the ruthenium complexes, while the suspension cells accumulated the most lipophilic complexes per energy independent mechanism. After 4 h incubation, all ruthenium complexes displayed similar intracellular distribution: Staining of the cytoplasm with no luminescence in the nucleus.

In addition, $[\text{Ru}(\text{HDPA})_2\text{dppz}]^{2+}$ (HDPA = di-2-pyridylamine, dppz = dipyrido-[3,2-a:2',3'-c]phenazine) and analogs were synthesized. $[\text{Ru}(\text{HDPA})_2\text{L}]^{2+}$ complexes (L = 2,2'-bipyridine or 1,10-phenanthroline) are known to show marginal room temperature luminescence. Only at low temperature (77 K) luminescence can be observed. Here it was shown that replacing the proton with an alkyl chain resulted in room temperature luminescence in non-aqueous solutions. These complexes exhibited luminescence enhancement on binding to mismatch DNA and could be used as sensitive luminescent probes for mismatch DNA. The cellular uptake was explored. Strongest luminescence for the dppz containing ruthenium complexes was observed in the cytoplasm.

Lumineszierende Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexe:

Synthese, Bindung an Nukleinsäuren und zelluläre Aufnahmestudien

Gutachter: Prof. Dr. Roland Krämer
Priv. Doz. Dr. Dirk-Peter Hertel

Tag der mündlichen Prüfung: 07.04.2011

Die experimentellen Arbeiten wurden im Zeitraum von Juli 2007 bis April 2009 und Dezember 2009 bis Dezember 2010 unter der wissenschaftlichen Anleitung und Betreuung von Prof. Dr. R. Krämer am Anorganisch-Chemischen Institut der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg und im Zeitraum von Mai 2009 bis November 2009 unter der wissenschaftlichen Anleitung und Betreuung von Prof. Dr. J. K. Barton am California Institute of Technology, Pasadena, USA durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Roland Krämer danke ich recht herzlich für die interessante Themenstellung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen, den Anregungen zu und dem Interesse an meiner Arbeit sowie für die Ermöglichung eines Auslandsforschungsaufenthalts.

Meiner Familie

und

Timon

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Eigenschaften von Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexen	2
1.1.1	Photophysikalische Eigenschaften von Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-Komplexen	2
1.1.2	Photophysikalische Eigenschaften von Poly(di-2-pyridylamin)-ruthenium(II)-Komplexen	3
1.2	Anwendung von Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexen	5
1.2.1	Anwendung von Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-Komplexen in Zellen	5
1.2.2	Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexe als mmDNA-Sensor	7
1.3	Zelluläre Aufnahmemechanismen von Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexen	10
2	Zielsetzung	15
3	Ergebnisse und Diskussion	17
3.1	Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-Komplexe - zelluläre Aufnahmestudien	17
3.1.1	Synthesen	17
3.1.1.1	Darstellung des Transportmoleküls bpy-T	17
3.1.1.2	Darstellung verschiedener Bipyridin-Liganden L	18
3.1.1.3	Darstellung der $[\text{RuL}_2(\text{bpy-T})]^{2+}$ -Komplexe	19
3.1.2	UV/Vis- und Fluoreszenzeigenschaften	23
3.1.2.1	UV/Vis-Eigenschaften	23
3.1.2.2	Fluoreszenzeigenschaften	25
3.1.2.3	pH-Titrationen	27
3.1.3	Wechselwirkung der Komplexe mit Polynukleotiden	32
3.1.4	Zellexperimente	37
3.1.4.1	Lipophilie	37
3.1.4.2	Zelluläre Aufnahmegeschwindigkeit	38
3.1.4.3	Zellulärer Aufnahmemechanismus	43
3.1.4.4	Verteilung der Komplexe in den Zellen	47

3.2	Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexe als mmDNA-Sensor	51
3.2.1	Synthesen	51
3.2.1.1	Darstellung des Transportmoleküls Dipyridophenazin (dppz)	51
3.2.1.2	Darstellung des <i>N</i> -Methyl-di-2-pyridylamin-Liganden (27)	51
3.2.1.3	Darstellung der [Ru(R-DPA) ₂ Cl ₂]Cl-Komplexe	52
3.2.1.4	Darstellung der [Ru(R-DPA) ₂ dppz] ²⁺ -Komplexe	52
3.2.2	UV/Vis- und Fluoreszenzeigenschaften	54
3.2.2.1	UV/Vis-Eigenschaften und pH-Titrationsen	54
3.2.2.2	Fluoreszenzeigenschaften	57
3.2.3	Wechselwirkung der Komplexe 32 - 34 mit Oligonukleotiden	58
3.2.4	Zellexperimente	59
3.2.4.1	Lipophilie	59
3.2.4.2	Zelluläre Aufnahme der Komplexe 31 - 34 und [Ru(bpy) ₂ dppz] ²⁺	60
4	Zusammenfassung	63
5	Experimenteller Teil	67
5.1	Material und Methoden	67
5.1.1	Chemikalien und Geräte	67
5.1.2	Zelllinien	69
5.1.3	Medien, Lösungen, Puffer	70
5.1.4	Methoden	71
5.1.4.1	Messung der pH-Abhängigkeit der Absorption und Emission der Komplexe 13 , 20 , 24 und 26	71
5.1.4.2	Messung der pH-Abhängigkeit der Absorption der Komplexe 31 - 34	71
5.1.4.3	Bestimmung des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten	72
5.1.4.4	Bestimmung der Wechselwirkung der Komplexe mit Polynukleotiden	72
5.1.4.5	Bestimmung der Wechselwirkung der Komplexe mit Oligonukleotiden	72
5.2	Synthesen zu „Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-Komplexe - zelluläre Aufnahmestudien“	73
5.2.1	Darstellung des Transportmoleküls bpy-T	73
5.2.1.1	Synthese von (3-Aminopropyl)-carbaminsäure- <i>tert</i> -butylester (1*)	73

5.2.1.2	Synthese von (1-Amino-8-chloroanthrachinon)-propyl-3-carbaminsäure- <i>tert</i> -butylester (T-Boc)	74
5.2.1.3	Synthese von 1-(3-Aminopropylamino)-8-chloroanthrachinon (T)	75
5.2.1.4	Synthese von 4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-carbonsäure (2*)	76
5.2.1.5	Synthese von 4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-carbonsäure-(1-amino-8-chloroanthrachinon)-propylamid (bpy-T)	77
5.2.2	Darstellung der Bipyridin-Liganden	78
5.2.2.1	Synthese von 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bipyridin (3*)	78
5.2.2.2	Synthese von 4,4'-Dimethoxycarbonyl-2,2'-bipyridin (4*)	79
5.2.2.3	Synthese von 4,4'-Diethoxycarbonyl-2,2'-bipyridin (5*)	79
5.2.2.4	Synthese von 4,4'-Bis-(hydroxymethyl)-2,2'-bipyridin (6*)	80
5.2.2.5	Synthese von 4,4'-Diethylamidocarbonyl-2,2'-bipyridin (7*)	81
5.2.2.6	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von 4,4'-Bis-(alkylamidocarbonyl)-2,2'-bipyridinen	82
5.2.3	Darstellung der Rutheniumkomplexe $[\text{RuL}_2(\text{bpy-T})]\text{Cl}_2$	84
5.2.3.1	Synthese von <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$ (12*)	84
5.2.3.2	Synthese von $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-T})]\text{Cl}_2$ (13)	85
5.2.3.3	Synthese von <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\mathbf{4})_2\text{Cl}_2]$ (14*)	86
5.2.3.4	Synthese von $[\text{Ru}(\mathbf{4})_2(\text{bpy-T})]\text{Cl}_2$ (15)	86
5.2.3.5	Synthese von <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\mathbf{5})_2\text{Cl}_2]$ (16*)	87
5.2.3.6	Synthese von $[\text{Ru}(\mathbf{5})_2(\text{bpy-T})]\text{Cl}_2$ (17)	88
5.2.3.7	Synthese von <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\mathbf{7})_2\text{Cl}_2]$ (18*)	89
5.2.3.8	Synthese von $[\text{Ru}(\mathbf{7})_2(\text{bpy-T})]\text{Cl}_2$ (19)	89
5.2.3.9	Synthese von $[\text{Ru}(\mathbf{6})_2(\text{bpy-T})]\text{Cl}_2$ (20)	91
5.2.3.10	Synthese von $[\text{Ru}(\mathbf{10})_2(\text{bpy-T})]\text{Cl}_2$ (21)	92
5.2.3.11	Synthese von $[\text{Ru}((\text{HCO})_2\text{bpy})_2(\text{bpy-T})]\text{Cl}_2$ (22)	94
5.2.3.12	Synthese von $[\text{Ru}(\mathbf{8})_2(\text{bpy-T})]\text{Cl}_2$ (23)	95
5.2.3.13	Synthese von $[\text{Ru}(\mathbf{9})_2(\text{bpy-T})]\text{Cl}_2$ (24)	96
5.2.3.14	Synthese von $[\text{Ru}(\mathbf{11})_2(\text{bpy-T})]\text{Cl}_2$ (25)	97
5.2.3.15	Synthese von $[\text{Ru}(\mathbf{3})_2(\text{bpy-T})]\text{Cl}_2$ (26)	98
5.3	Zellexperimente zu „Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-Komplexe - zelluläre Aufnahmestudien“	100
5.3.1	Kultivierung von HeLa-Zellen	100
5.3.2	Kultivierung von U373-G-Zellen	100

5.3.3	Kulturvierung von LNCaP-Zellen	101
5.3.4	Kulturvierung von HL-60-Zellen	101
5.3.5	Durchflusszytometrie	101
5.3.5.1	Passagieren, Inkubation und Vorbereitung der adhären- ten Zelllinien HeLa und U373-G	101
5.3.5.2	Passagieren, Inkubation und Vorbereitung der adhären- ten Zelllinie LNCaP	102
5.3.5.3	Passagieren, Inkubation und Vorbereitung der Suspensionszelllinie HL-60	103
5.3.5.4	Durchführung der Durchflusszytometrieeperimente	103
5.3.6	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	103
5.4	Synthesen zu „Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexe als mmDNA- Sensor“	105
5.4.1	Synthese des Transportmoleküls Dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazin (dppz*)	105
5.4.2	Synthese von <i>N</i> -Methyl-di-2-pyridylamin (27*)	105
5.4.3	Darstellung der Rutheniumkomplexe $[\text{Ru}(\text{R-DPA})_n(\text{dppz})_{3-n}]^{2+}$	106
5.4.3.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von <i>cis</i> -Dichloro-bis- (<i>N</i> -R-di-2-pyridylamin)-ruthenium(III)chlorid	106
5.4.3.2	Synthese von $[\text{Ru}(\text{HDPA})_2\text{dppz}]^{2+}$ (31*)	107
5.4.3.3	Synthese von $[\text{Ru}(\text{HDPA})(\text{dppz})_2]^{2+}$ (32)	108
5.4.3.4	Synthese von $[\text{Ru}(\text{27})_2\text{dppz}]^{2+}$ (33)	108
5.4.3.5	Synthese von $[\text{Ru}(\text{HeptDPA})_2\text{dppz}]^{2+}$ (34)	109
5.4.4	Oligonukleotid-Synthese	110
5.5	Zellexperimente zu „Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexe als mmDNA-Sensor“	111
5.5.1	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	111
5.5.2	ICP-MS-Messung von Zelllysate und Zellkernextrakt	111
6	Literaturverzeichnis	113

7	Anhang	119
7.1	Molekülverzeichnis	119
7.1.1	Literaturbekannte Verbindungen	119
7.1.2	Neue Verbindungen	120
7.2	HPLC-Spektren ausgewählter Tris(bipyridyl)ruthenium(II)- Komplexe	122
7.3	¹ H-NMR-Spektren ausgewählter Tris(bipyridyl)ruthenium(II)- Komplexe	124
7.4	Danksagung	130

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Absorptions- (blau) und Emissionsspektrum (rot) von $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ (20 μM , Wasser, pH 7, 25 $^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 452 \text{ nm}$, PMT 600 V).	2
Abbildung 2	links: Vereinfachtes Molekülorbitalschema von $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ und die elektronischen Übergänge; rechts: Schematische Darstellung der elektronischen Übergänge von $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$.	3
Abbildung 3	Vereinfachte elektronische Struktur der Grundzustände (GZ) und der angeregten Zustände für $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (links) und $[\text{Ru}(\text{HDPA})_3]^{2+}$ (rechts).	4
Abbildung 4	Reaktion von $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dabpy})]^{2+}$ mit NO unter aeroben Bedingungen.	6
Abbildung 5	Struktur von Ruthenium-Phenanthridin, Rubb_{16} und $[\{\text{Ru}(\text{phen})_2\}_2\text{tpphz}]^{4+}$.	7
Abbildung 6	Struktur der organischen mmDNA-Sensoren Polyamid A (links) und Naphthyridindimer B (rechts).	7
Abbildung 7	Struktur von $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})]^{3+}$ (links) und Kristallstruktur (rechts) von interkalierenden $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})]^{3+}$ (rot) gebunden an CA-Basenfehlpaarung (gelb).	9
Abbildung 8	Struktur von KP1019, $[\text{Ru}(\text{DIP})_2\text{dppz}]^{2+}$, Ruthenium(II)estradiol-Komplex, Ruthenium-Octaarginin und $[\text{Ru}(\text{bpy}-\text{NEt}_2)_3]^{2+}$.	13
Abbildung 9	Synthese des Transportmoleküls bpy-T .	17
Abbildung 10	Syntheseroute zu funktionalisierten Bipyridinen.	18
Abbildung 11	Synthetisierte Bipyridin-Liganden.	18
Abbildung 12	Syntheseroute zur Darstellung von Komplex 13 .	19
Abbildung 13	Syntheseroute zur Darstellung von Komplex 15 .	19
Abbildung 14	Syntheseroute zur Darstellung von Komplex 17 .	20
Abbildung 15	Syntheseroute zur Darstellung von Komplex 19 .	20
Abbildung 16	Syntheseroute zur Darstellung von Komplex 20 .	20
Abbildung 17	Syntheseroute zur Darstellung von Komplex 21 .	21
Abbildung 18	Syntheseroute zur Darstellung von Komplex 22 .	21
Abbildung 19	Syntheseroute zur Darstellung von Komplex 23 .	22
Abbildung 20	Syntheseroute zur Darstellung von Komplex 24 .	22
Abbildung 21	Syntheseroute zur Darstellung von Komplex 25 .	22
Abbildung 22	Syntheseroute zur Darstellung von Komplex 26 .	22

-
- Abbildung 23 Absorptionsspektren ausgewählter Verbindungen (20 μM , Wasser, pH 7, 25 $^{\circ}\text{C}$). 24
- Abbildung 24 Absorptionsspektren von **20** (grün) und **22** (grau) in Acetonitril (20 μM , 25 $^{\circ}\text{C}$). 25
- Abbildung 25 Fluoreszenzspektren von **13** (rot), **15** (gelb), **19** (schwarz), **20** (grün) und **25** (hellblau); (20 μM , Wasser, pH 7, 25 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 468 \text{ nm}$, PMT 600 V). 27
- Abbildung 26 Fluoreszenzspektren von **22** in Wasser (grau) und in Dichlormethan (schwarz, DCM) und **25** in Wasser (hellblau) und in Dichlormethan (blau, DCM); (20 μM , pH 7, 25 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 468 \text{ nm}$, PMT 600 V). 27
- Abbildung 27 Fluoreszenzintensitätsänderung der Komplexe **20** (links) und **13** (rechts) in Abhängigkeit des pH-Werts jeweils am entsprechenden Emissionsmaximum (658 nm bzw. 638 nm); (5 μM , Wasser, 25 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 468 \text{ nm}$, PMT 900 V (**20**) bzw. PMT 800 V (**13**), pH-Wert eingestellt durch Zugabe von Äquivalenten Salzsäure bzw. Natronlauge). 28
- Abbildung 28 Fluoreszenzintensitätsänderung des Komplexes **24** in Abhängigkeit des pH-Werts am entsprechenden Emissionsmaximum (643 nm); (5 μM , Wasser, 25 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 468 \text{ nm}$, PMT 800 V, pH-Wert eingestellt durch Zugabe von Äquivalenten Salzsäure bzw. Natronlauge). 29
- Abbildung 29 Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) von Komplex **26** in Abhängigkeit des pH-Werts (5 μM , Wasser, 25 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 468 \text{ nm}$, PMT 800 V, pH-Wert eingestellt durch Zugabe von Äquivalenten Salzsäure bzw. Natronlauge). 30
- Abbildung 30 Absorptions- (schwarz) und Fluoreszenzintensitätsänderung (rot) des Komplexes **26** in Abhängigkeit des pH-Werts jeweils am Absorptions- bzw. Emissionsmaximum (469 nm bzw. 633 nm); (5 μM , Wasser, 25 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 468 \text{ nm}$, PMT 800 V, pH-Wert eingestellt durch Zugabe von Äquivalenten Salzsäure bzw. Natronlauge). 31
- Abbildung 31 Prozentuale Intensitätszunahme der Startfluoreszenz der Rutheniumkomplexe bei Zugabe von RNA-Lösung (Torulahefe, 10 μM bezogen auf Nukleotid, Wasser) gemessen am jeweiligen MLCT-Übergang (20 μM Komplexlösung, 10 mM MOPS, pH 7, 50 mM Natriumchloridlösung, 25 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 468 \text{ nm}$, PMT 800 V). 33

- Abbildung 32 Prozentuale Intensitätszunahme der Startfluoreszenz der Rutheniumkomplexe bei Zugabe von DNA-Lösung (Lachstestis, 10 μ M bezogen auf Nukleotid, Wasser) gemessen am jeweiligen MLCT-Übergang (20 μ M Komplexlösung, 10 mM MOPS, pH 7, 50 mM Natriumchloridlösung, 25 °C, $\lambda_{\text{ex}} = 468$ nm, PMT 800 V). 35
- Abbildung 33 Formel zur Lipophiliebestimmung (C ist die Gleichgewichtskonzentration der Verbindung in Octanol bzw. Wasser). 37
- Abbildung 34 Zeitreihe zur Komplexaufnahme durch HL-60-Zellen (relative Fluoreszenzintensität von 20000 Zellen, 20 μ M Komplexlösung, 37 °C, $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{em}} > 670$ nm). 40
- Abbildung 35 Zeitreihe zur Komplexaufnahme durch HeLa-Zellen (relative Fluoreszenzintensität von 20000 Zellen, 20 μ M Komplexlösung, 37 °C, $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{em}} > 670$ nm). 40
- Abbildung 36 Zeitreihe zur Komplexaufnahme durch U373-G-Zellen (relative Fluoreszenzintensität von 20000 Zellen, 20 μ M Komplexlösung, 37 °C, $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{em}} > 670$ nm). 41
- Abbildung 37 Zeitreihe zur Komplexaufnahme durch LNCaP-Zellen (relative Fluoreszenzintensität von 20000 Zellen, 20 μ M Komplexlösung, 37 °C, $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{em}} > 670$ nm). 41
- Abbildung 38 Fluoreszenzintensitätsmittelwerte von HL-60-Zellen (links) und HeLa-Zellen (rechts) inkubiert mit Komplexlösung (20 μ M, 1 h) bei 4 °C (blau) bzw. 37 °C (rot); (20000 Zellen, $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{em}} > 670$ nm). 45
- Abbildung 39 Fluoreszenzintensitätsmittelwerte von U373-G-Zellen (links) und LNCaP-Zellen (rechts) inkubiert mit Komplexlösung (20 μ M, 1 h) bei 4 °C (blau) bzw. 37 °C (rot); (20000 Zellen, $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{em}} > 670$ nm). 46
- Abbildung 40 Durchlichtbilder und konfokale Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von HL-60-Zellen nach Inkubation mit **15** (links oben, 20 μ M), **23** (rechts oben, 20 μ M), **26** (links unten, 20 μ M) bzw. **[Ru(bpy)₃]²⁺** (rechts unten, 50 μ M); (4 h, 37 °C, $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 600$ -750 nm). 48
- Abbildung 41 Durchlichtbilder und konfokale Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von HeLa-Zellen nach Inkubation mit **13** (links oben, 20 μ M), **17** (rechts

- oben, 20 μM), **24** (links unten, 20 μM) bzw. $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (rechts unten, 50 μM); (4 h, 37 $^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 600\text{-}750 \text{ nm}$). 48
- Abbildung 42 Durchlichtbilder und konfokale Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von U373-G-Zellen nach Inkubation mit **20** (links oben, 20 μM), **21** (rechts oben, 20 μM), **24** (links unten, 20 μM) bzw. $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (rechts unten, 50 μM); (4 h, 37 $^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 600\text{-}750 \text{ nm}$). 49
- Abbildung 43 Durchlichtbilder und konfokale Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von LNCaP-Zellen nach Inkubation mit **19** (links oben, 20 μM), **22** (rechts oben, 20 μM), **25** (links unten, 20 μM) bzw. $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (rechts unten, 50 μM); (4 h, 37 $^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 600\text{-}750 \text{ nm}$). 49
- Abbildung 44 Synthese des Transportmoleküls **dppz**. 51
- Abbildung 45 Synthese der Verbindung **27**. 51
- Abbildung 46 Allgemeine Syntheseroute für die Darstellung von $[\text{Ru}(\text{R-DPA})_2\text{Cl}_2]\text{Cl}$. 52
- Abbildung 47 Syntheseroute zur Darstellung von Komplex **31**. 53
- Abbildung 48 Syntheseroute zur Darstellung von Komplex **32**. 53
- Abbildung 49 Syntheseroute zur Darstellung von Komplex **33**. 53
- Abbildung 50 Syntheseroute zur Darstellung von Komplex **34**. 54
- Abbildung 51 Übersicht über die $[\text{Ru}(\text{R-DPA})_n(\text{dppz})_{3-n}]^{2+}$ Komplexe **31 - 34**. 54
- Abbildung 52 Absorptionsspektren von **31** (schwarz), **32** (rot), **33** (grün) und **34** (blau) (10 μM , Wasser, pH 7, 25 $^\circ\text{C}$), links: komplettes Spektrum, rechts: vergrößerter Ausschnitt. 55
- Abbildung 53 Absorptionsspektren der Komplexe **31** (links oben), **32** (rechts oben), **33** (links unten) und **34** (rechts unten) bei pH 2 (rot), 7 (grau) und 13 (schwarz); (20 μM , Wasser, pH-Wert eingestellt durch Zugabe von Äquivalenten konzentrierter Salzsäure bzw. Natronlauge). 56
- Abbildung 54 Fluoreszenzspektren der Komplexe **31** (schwarz), **32** (rot), **33** (grün) und **34** (blau) in Acetonitril und Komplex **31** (grau) in Wasser (10 μM , 25 $^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$, Verstärkung 8). 57
- Abbildung 55 Sequenzen der synthetisierten Einzelstränge (R steht für eine Tetrahydrofuran-abasic-Stelle). 58
- Abbildung 56 Fluoreszenzspektren von $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ (100 nM, links oben), **32** (2,5 μM , rechts oben), **33** (5 μM , links unten) und **34** (2,5 μM , rechts unten) ohne DNA (schwarz), bzw. mit 1 eq mDNA (rot), 1 eq mmDNA

-
- (grün) oder 1 eq abDNA (blau); (5 mM Tris-Puffer, pH 7,5, 50 mM Natriumchloridlösung, 25 °C, $\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$, Verstärkung 8). 59
- Abbildung 57 Konfokale Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von HeLa-Zellen inkubiert mit **31** (50 μM , links oben), **32** (10 μM , mittig oben), **33** (50 μM , rechts oben), **34** (1 μM , links unten) und $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ (20 μM , rechts unten); (24 h, 37 °C, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} > 560 \text{ nm}$). Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm . 61
- Abbildung 58 ICP-MS-Messung von Zellkernextrakt (blau) und Zelllysate (rot) von HeLa-Zellen ohne Komplex (Kontrolle) und inkubiert mit **31**, **33**, **34**, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ und **32** (20 μM , 24 h, 37 °C). 62
- Abbildung 59 Übersicht der synthetisierten Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-Komplexe. 63
- Abbildung 60 Übersicht der synthetisierten Poly(di-2-pyridylamin)ruthenium(II)-Komplexe. 65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten der Komplexe [Ru(bpy)₃]Cl₂ , 13 , 15 , 17 und 19 - 26 (20 μM, Wasser, pH 7, 25 °C).	23
Tabelle 2	Emissionsmaxima der Komplexe [Ru(bpy)₃]Cl₂ , 13 , 15 , 17 und 19 - 26 und in Klammern das Intensitätsverhältnis bezogen auf Komplex 13 (20 μM, Wasser, pH 7, λ _{ex} = 468 nm, PMT 600 V).	26
Tabelle 3	Startfluoreszenzintensitäten der dargestellten Rutheniumkomplexe (20 μM, 10 mM MOPS, pH 7, 50 mM Natriumchloridlösung, 25 °C, λ _{ex} = 468 nm, PMT 800 V) am jeweiligen Emissionsmaximum: [Ru(bpy)₃]Cl₂ (λ _{em} = 608 nm), 13 (λ _{em} = 638 nm), 15 (λ _{em} = 649 nm), 17 (λ _{em} = 632 nm), 19 (λ _{em} = 632 nm), 20 (λ _{em} = 658 nm), 21 (λ _{em} = 639 nm), 22 (λ _{em} = 654 nm), 23 (λ _{em} = 633 nm), 24 (λ _{em} = 643 nm), 25 (λ _{em} = 634 nm), 26 (λ _{em} = 633 nm) und T (λ _{ex} = 515 nm, λ _{em} = 650 nm).	33
Tabelle 4	Anfangssteigung (m _A) und Halbsättigung (S _{1/2}) der dargestellten Rutheniumkomplexe bei Zugabe von RNA- bzw. DNA-Lösung (eq bezogen auf Nukleotid).	34
Tabelle 5	Mittelwerte der Lipophilie (log P _{ow}) und die Standardabweichungen (σ) der dargestellten Komplexe [Ru(bpy)₃]Cl₂ , 13 , 15 , 17 und 19 - 26 , sortiert nach steigender Lipophilie (jeweils am LC-Übergang bestimmt).	38
Tabelle 6	Relative Fluoreszenzintensitätsmittelwerte der Zelllinien HeLa, U373-G, LNCaP und HL-60 nach 24 h Inkubation mit 20 μM Komplexlösung (13 , 15 , 17 , 19 - 26 bzw. [Ru(bpy)₃]²⁺) bzw. unbehandelter Zellen (Kontrolle). Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Kontrolle wurde auf 1 normiert (20000 Zellen, 20 μM Komplexlösung, Medium, 37 °C, λ _{ex} = 488 nm, λ _{em} > 670 nm).	42
Tabelle 7	Prozentuale Änderung der Fluoreszenzintensität der Komplexe 13 , 15 , 17 , 19 - 26 und [Ru(bpy)₃]²⁺ in den Zelllinien HL-60, HeLa, U373-G und LNCaP bei Inkubation bei 4 °C (20 μM, Medium, 1 h). Fluoreszenzintensität bei 37 °C wurde auf 100 % festgesetzt (- = Abnahme, + = Zunahme).	44

Tabelle 8	Qualitative Fluoreszenzintensitäten der Komplexe 13 , 15 , 17 , 19 - 26 und $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ in den Zelllinien HL-60, HeLa, U373-G und LNCaP (20 μM bzw. 50 μM $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, Medium, 4 h, 37 °C, $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 600\text{-}750$ nm).	50
Tabelle 9	Extinktionskoeffizienten der Komplexe 31 - 34 .	55
Tabelle 10	Mittelwerte der Lipophilie ($\log P_{\text{ow}}$) und die Standardabweichungen (σ) der Komplexe 31 - 34 und $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$, sortiert nach steigender Lipophilie (jeweils am LC-Übergang bestimmt).	60

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ABC	ATP-bindenden Kassetten (<i>ATP binding cassette</i>)
abDNA	abasische Stellen im DNA-Strang (<i>abasic site DNA</i>)
ACN	Acetonitril
α -MEM	α -Minimal Essential Medium
APD	Avalanche-Fotodiode (<i>avalanche photodiode</i>)
ATP	Adenosintri-phosphat
a. u.	beliebige Einheit (<i>arbitrary unit</i>)
bpy	2,2'-Bipyridin
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl-
br s	breites Signal
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytidin
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
chrysi	Chrysen-5,6-chinondiimin
C _q	quartäres Kohlenstoffatom
d	Dublett bzw. Tag
Δ	unter Rückfluss erhitzen
dabpy	4-(3,4-Diaminophenoxy)-2,2'-bipyridin
dcbpy	4,4'-Dicarboxy-2,2'-bipyridin
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett von Dublett
ddd	Dublett von Dublett von Dublett
DEPT	Signalverstärkung durch Polarisations-transfer (<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>)
DIP	4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin
DME	1,2-Dimethoxyethan
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)

dppz	Dipyrido[3,2-a;2',3'-c]phenazin
DPV	Differentiale Pulsvoltametrie
dq	Dublett von Quartett
DRAQ5	<i>Deep Red-fluorescing Bisalkylaminoanthraquinone Number Five</i>
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
ϵ	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMEM	<i>Eagle's Minimal Essential Medium</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOH	Ethanol
eq	Äquivalent (<i>equivalent</i>)
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
G	Guanidin
GZ	Grundzustand
h	Stunde (<i>hour</i>)
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HC	Hydrochinon
(HCO) ₂ bpy	2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarboxaldehyd
HDPA	Di-2-pyridylamin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
h ν	Licht/Energie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
HR	Hochauflösung (<i>high resolution</i>)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
ILC	Interligand Ladungsübergang (<i>interligand charge</i>)
ISC	Spin-Bahn-Kopplung (<i>intersystem crossing</i>)
<i>J</i>	Kopplungskonstante
LC	Ligandzentrierter Übergang (<i>ligand charge</i>)
λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{ex}	Anregungswellenlänge

λ_{\max}	Absorptionsmaximum
m	Multipllett
m_A	Anfangssteigung
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (<i>matrix assisted laser desorption/ionization</i>)
mbpy-NEt ₂	4- <i>N,N</i> -Diethylcarboxamido-4'-methyl-2,2'-bipyridin
mbpy-NMe	4- <i>N</i> -Methylcarboxamido-4'-methyl-2,2'-bipyridin
MC	Metallübergang (<i>metal charge</i>)
mDNA	vollständig gepaarte DNA (<i>matched DNA</i>)
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min	Minute
MLCT	Metall-Ligand-Ladungsübergang (<i>metal to ligand charge transfer</i>)
mmDNA	DNA, mit einer Basenfehlpaarung (<i>mismatched DNA</i>)
MMR	Basenfehlpaarungsreparatursystem (<i>mismatch repair machinery</i>)
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MS	Massenspektrum
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
p	Quintett
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i> , pH 7,2)
phen	1,10-Phenanthrolin
PTM	Photoelektronenvervielfacher-Spannung (<i>photomultiplier</i>)
py	Pyridin
q	Quartett
R-DPA	<i>N</i> -R-Di-2-pyridylamin (R = H, Alkyl)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett bzw. Sekunde
σ	Standardabweichung
$S_{1/2}$	Halbsättigung
ssDNA	Einzelstrang-Desoxyribonukleinsäure

ssRNA	Einzelstrang-Ribonukleinsäure
T	Thymidin
t	Triplett
TFA	Trifluoressigsäure (<i>trifluoroacetic acid</i>)
tpphz	Tetrapyrido[3,2-a:2',3'-c:3'',2''-h:2''',3'''-j]phenazin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TOF	Flugzeit (<i>time of flight</i>)
UV/Vis	Ultraviolettes/sichtbares Licht
Vis	sichtbar (<i>visible</i>)

1 Einleitung

Die Fluoreszenzmikroskopie findet seit längerer Zeit Anwendung im Bereich der Forschung und medizinischen Diagnostik, um die Struktur und Funktion biologischer Systeme zu verstehen. Beispielsweise werden zur Markierung von Zellbestandteilen organische Moleküle an Antikörper gekoppelt. Da Antikörper nur an fixierten und permeabilisierten Zellen angewendet werden können, ist eine Untersuchung dynamischer Prozesse im Inneren lebender Zellen nicht möglich. Verbesserungen werden unter anderem durch Verwendung zellmembranpermeabler, organischer Fluorophore oder fluoreszierender Proteine erzielt. Fluoreszierende Proteine sind sehr spezifisch, da diese direkt an das zu untersuchende Protein fusioniert werden. Der Nachteil liegt einerseits in der Größe der fluoreszierenden Proteine und andererseits in der aufwendigen Transfektion der Zellen mit dem fusionierten Proteinplasmiden. Viele verwendete organische Fluorophore, vor allem diejenigen zum Anfärben von DNA, besitzen eine geringe Wasserlöslichkeit, sind toxisch und unterliegen leicht Photobleaching. Außerdem besitzen sie in der Regel eng beieinander liegende Absorptions- und Emissionsmaxima, was die Detektion erschwert. Weiterhin ist es präparativ aufwendig, durch strukturelle Variation die Selektivität der organischen Fluorophore zu ändern.¹

Lumineszierende Übergangsmetallkomplexe bieten eine interessante Alternative für die selektive Detektion zellulärer Strukturen. Sie verfügen über ein einzigartiges modulares System, bei dem das Metallzentrum in der Mitte die Anordnung der Liganden und damit die dreidimensionale Struktur des Komplexes bestimmt. Die Liganden lassen sich relativ einfach austauschen, wodurch die Selektivität für Biomoleküle vielfältig variiert werden kann. Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexe können zum Beispiel bei erhöhter Temperatur selektiv mit unterschiedlichen Liganden aufgebaut werden. Gleichzeitig sind sie als d^6 -System bei Raumtemperatur kinetisch inert, als Chloridsalz wasserlöslich, zellgängig und kaum toxisch. Werden die Komplexe in der MLCT-Bande angeregt, so emittieren sie im roten Bereich des sichtbaren Spektrums. Die Emission liegt in einem Bereich, in dem wenig Autofluoreszenz der Zelle und der Zellbestandteile zu beobachten ist. Sie ist langlebig, photostabil und durch einen großen Stokes Shift von der Anregungswellenlänge getrennt, so dass sich Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexe besonders als Sensor in lebenden Zellen eignen.^{2,3}

1.1 Eigenschaften von Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexen⁴

Auf Grund ihrer photophysikalischen sowie elektrochemischen Eigenschaften sind Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexe seit über 30 Jahren intensiver Bestandteil der Forschung. Das zweifach positiv geladene Ruthenium mit sechs d-Elektronen besitzt sechs Koordinationsstellen und bildet oktaedrische low-spin Komplexe, die durch eine relativ große Ligandenfeldstabilisierungsenergie charakterisiert und daher bei Raumtemperatur kinetisch stabil sind. Die Umsetzung mit unterschiedlichsten Liganden ermöglicht es, selektiv die entsprechenden homo- bzw. heteroleptischen Komplexe darzustellen. Dies erlaubt eine weitreichende Variation der photophysikalischen und elektrochemischen Eigenschaften.

1.1.1 Photophysikalische Eigenschaften von Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-Komplexen^{5, 6, 7}

Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-Chlorid ist der Grundkörper aller Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexe. Abbildung 1 zeigt das Absorptions- und Emissionsspektrum von $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ in Wasser (bpy = 2,2'-Bipyridin). Die Absorption bei 285 nm ist einem ligandenzentrierten Übergang (LC, $\pi_L \rightarrow \pi^*_L$) zuzuordnen. Die Banden bei 240 nm und 452 nm werden durch Metall-Ligand-Ladungsübergang (MLCT, $\pi_M \rightarrow \pi^*_L$) verursacht. Die Schulter zwischen 310 nm und 400 nm ist auf einen metallzentrierten Übergang (MC, $\pi_M \rightarrow \pi^*_M$) zurückzuführen. Abbildung 2 fasst die beschriebenen Übergänge in einem vereinfachten Molekülorbitalschema zusammen.

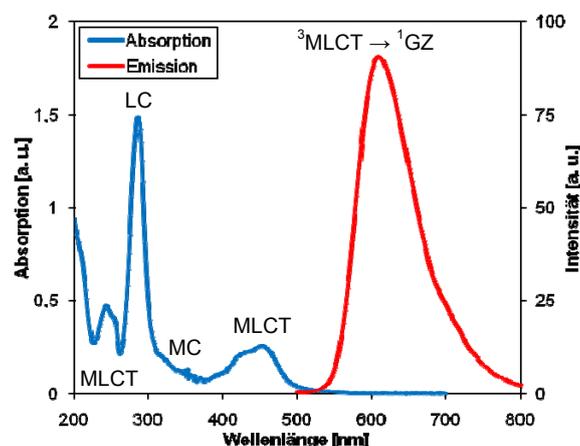


Abbildung 1 Absorptions- (blau) und Emissionsspektrum (rot) von $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ (20 μM , Wasser, pH 7, 25 °C, $\lambda_{\text{ex}} = 452 \text{ nm}$, PMT 600 V).

Wird mit der Wellenlänge der MLCT-Bande (452 nm) eingestrahlt, so wird $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ vom Grundzustand in den entsprechenden angeregten Zustand ($^1\text{MLCT}$ -Level) angehoben. Durch Spin-Bahn-Kopplung (*Intersystem Crossing*, ISC) findet ein schneller Spinflip (< 1 ps) in den tieferliegenden Triplettzustand ($^3\text{MLCT}$) statt. Da aus diesem Zustand eine relativ langsame, strahlungslose Desaktivierung erfolgt, führt dies zu einer langlebigen ($\sim \mu\text{s}$), intensiv orangefarbenen Lumineszenz. 1959 berichteten *Paris* und *Brandt*⁸ das erste Mal von dieser Lumineszenzeigenschaft des Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-Komplexes. Die Emission von $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ hat ein Maximum bei 608 nm, womit sich ein Stokes Shift von ca. 160 nm ergibt. Die Absorptions- und Emissionsspektren überlagern sich nur gering und die Fluoreszenz kann mit wenig Hintergrund detektiert werden. Insbesondere diese Eigenschaft erlaubt die Verwendung von Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexen als Sensoren in Zellen.

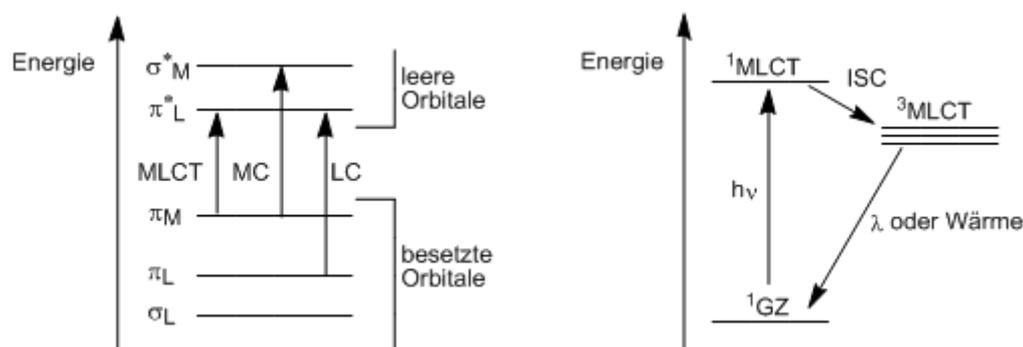


Abbildung 2 links: Vereinfachtes Molekülorbitalschema von $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ und die elektronischen Übergänge; rechts: Schematische Darstellung der elektronischen Übergänge von $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$.

Da der angeregte Zustand langlebig ist, kann dieser zusätzlich chemisch weiterreagieren und beispielsweise Redoxreaktionen eingehen.

1.1.2 Photophysikalische Eigenschaften von Poly(di-2-pyridylamin)-ruthenium(II)-Komplexen^{9, 10, 11}

Die Poly(di-2-pyridylamin)ruthenium(II)-Komplexe unterscheiden sich in ihren photophysikalischen Eigenschaften deutlich von $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$. Da der Ligand Di-2-pyridylamin (HDPA) mit Ruthenium nicht-planare Sechsringsysteme bildet, können die zwei Hälften von HDPA wie einzelne Pyridine (py) angesehen werden. Daher sind die photophysikalischen Eigenschaften von $[\text{Ru}(\text{HDPA})_3]^{2+}$ vergleichbar mit den entsprechenden Eigenschaften von $[\text{Ru}(\text{py})_6]^{2+}$.

$[\text{Ru}(\text{HDPA})_3]^{2+}$ zeigt zwei starke Absorptionsbanden bei 348 nm und 383 nm (Ethanol, $-196\text{ }^\circ\text{C}$). Die Absorption bei niedrigerer Wellenlänge ist einem Ladungstransfer vom Metall in ein antibindendes Orbital des Liganden zuzuordnen (MLCT, $d_M \rightarrow \pi^*_L$). Die Bande bei höherer Wellenlänge (383 nm) entspricht einen elektronischen Übergang von einem nichtbindenden in ein antibindendes Ligandorbital (LC, $n_L \rightarrow \pi^*_L$).

Die nur bei tiefen Temperaturen (Ethanol, $-196\text{ }^\circ\text{C}$) zu beobachtende Emission bei 730 nm ist eine schwache, strukturlöse und spinverbotene Emission. Diese findet aus dem $d_M-d^*_M$ -Zustand statt. Dieser $d_M-d^*_M$ -Zustand liegt aufgrund der geringeren Ligandenfeldaufspaltung von HDPA bzw. Pyridin tiefer als der $d_M-\pi^*_L$ -Zustand (Abbildung 3).

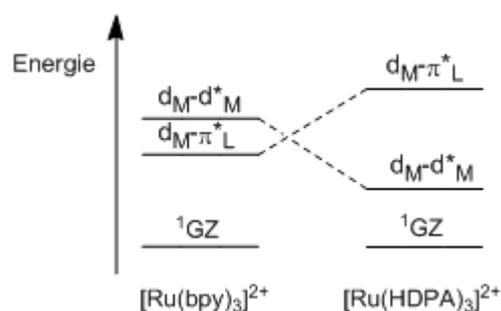


Abbildung 3 Vereinfachte elektronische Struktur der Grundzustände (GZ) und der angeregten Zustände für $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (links) und $[\text{Ru}(\text{HDPA})_3]^{2+}$ (rechts).

Werden ein bzw. zwei HDPA durch z. B. Bipyridine ersetzt, so sind im Absorptionsspektrum weitere Übergänge zu beobachten. Diese sind einem $d_M-\pi^*_{\text{bpy}}$ -Übergang (MLCT) bei ca. 460 nm und ein energieärmeren Übergang bei ca. 510 nm zuzuordnen, der auf eine Wechselwirkung zwischen den beiden Liganden HDPA und bpy zurückzuführen ist (ILC, $n_{\text{HDPA}} \rightarrow \pi^*_{\text{bpy}}$). Bereits die Substitution eines HDPA durch Bipyridin erhöht die Ligandenfeldaufspaltung in dem Maße, dass der $d_M-\pi^*_{\text{bpy}}$ -Zustand zum tiefstliegenden angeregten Zustand wird. Aus diesem findet Emission um 600 nm bis 650 nm statt. Diese Emission ist ebenfalls nur bei tiefen Temperatur ($-196\text{ }^\circ\text{C}$) zu beobachten.

*Rajendiran et al.*¹² synthetisierten verschiedene $[\text{Ru}(\text{HDPA})_2\text{L}]^{2+}$ -Komplexe, um den Einfluss der unterschiedlichen Liganden (L = HDPA, Phenanthrolin, 5,6-Dimethylpyridin, Dipyridochinoxalin, Dipyridophenazin) auf die DNA-Bindungseigenschaften zu analysieren. Bei allen Komplexen konnte bei Raumtemperatur keine Lumineszenz beobachtet werden (5 % Methanol, 5 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,1), 50 mM Natriumchlorid).

1.2 Anwendung von Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexen

Aufgrund der einzigartigen photophysikalischen sowie elektrochemischen Eigenschaften finden $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ und dessen Derivate einen weiten Anwendungsbereich. Dieser reicht von der Verwendung z. B. von $[\text{Ru}(\text{dcbpy})_2\text{NCS}]_2^{2+}$ in der Solarzellentechnik¹³ (dcbpy = 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bipyridin), über elektrochemische und optische Sensoren beispielsweise für Sauerstoff,¹⁴ Anionen^{15, 16} und Kationen¹⁷ bis zur Anwendung in Polymeren als elektrische Leiter.¹⁸ Außerdem finden Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexen viele Einsatzgebiete im zellulären Imaging (1.2.1). $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ ist in hohen Konzentrationen und mehrstündiger Inkubationsdauer zellgängig. So wird der Komplex beispielsweise in SEG-Zellen (1,3 mM, 6 h, 37 °C) akkumuliert und als Sauerstoffsensoren verwendet.¹⁹

Ruthenium(III)-Verbindungen besitzen zytostatische Eigenschaften. Die zwei Derivate, KP1019²⁰ und NAMI-A,²¹ befinden sich bereits als Therapeutika in klinischen Studien. KP1019 zeigt Effekte unter anderem bei kolorektalen Tumoren, während NAMI-A die Bildung von Metastasen unterdrückt. Beide weisen eine geringere Toxizität auf als *cis*-Platin.

1.2.1 Anwendung von Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-Komplexen in Zellen

Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-Chlorid wird unter anderem als Sensor für Sauerstoff in Zellen genutzt.^{19, 22, 23} Dies wird dadurch möglich, dass die Lumineszenzintensität und Fluoreszenzlebensdauer von $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ von der Sauerstoffkonzentration abhängen. Da die Fluoreszenzlebensdauer unabhängig von der Umgebung und der Konzentration des Komplexes ist, kann durch Fluoreszenzlebensdauermessungen die Konzentration des gelösten Sauerstoffs in Zellen quantitativ bestimmt werden. Beispielsweise zeigte sich, dass $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (1 mM) inhomogen in J774-Makrophagen verteilt ist, wohingegen die Fluoreszenzlebensdauer aber in der ganzen Zelle konstant ist und somit auch der Sauerstoff gleichmäßig in der Zelle verteilt ist.²² Dabei ist zu beachten, dass es durch mehrfaches Bestrahlen zur Produktion von Singulett-Sauerstoff kommen kann, der zur Zerstörung der Membranintegrität führt. Um dies zu vermeiden, sollte laut *Dobrucki*²³ die Konzentration des Rutheniumkomplexes unter 200 μM gehalten werden.

*Ye et al.*²⁴ entwickelten einen Stickoxid-Sensor zur Detektion der NO-Produktion in lebenden Zellen. Durch Modifikation eines Bipyridin-Liganden des Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-Komplexes mit einer elektronenreichen *o*-Diaminophenylgruppe wird die Fluoreszenz durch

einen Photoelektronentransferprozess gelöscht. Die Diaminophenylgruppe kann selektiv mit NO unter aeroben Bedingungen zu Triazol reagieren (Abbildung 4). Dieses ist elektronenarm, so dass kein Photoelektronentransfer stattfinden kann und der Rutheniumkomplex fluoresziert. Die NO-produzierenden pflanzlichen Gardenienzellen wurden beispielsweise mit $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dabpy})]^{2+}$ ($500 \mu\text{M}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{dabpy} = 4\text{-}(3,4\text{-Diaminophenoxy})\text{-}2,2'\text{-bipyridin}$) unterschiedlich lange inkubiert. Dabei zeigte sich, dass mit steigender Inkubationszeit die Fluoreszenzintensität anstieg. Dies lässt auf eine kontinuierlich steigende NO-Produktion schließen. Mittels HPLC konnte anschließend das Triazol in den Zellen nachgewiesen werden.

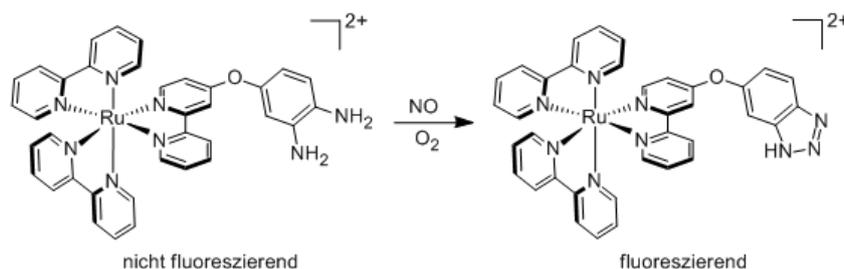


Abbildung 4 Reaktion von $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dabpy})]^{2+}$ mit NO unter aeroben Bedingungen.

*Turro et al.*²⁵ haben ein RNA sensitives Phenanthridin an einen Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-Komplex gekoppelt (Abbildung 5) und erhielten einen RNA-selektiven Sensor für *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen. Dieser vereint die RNA-Bindungseigenschaften und die Fluoreszenzsteigerung von Phenanthridin mit den langen Fluoreszenzlebensdauern des Rutheniumkomplexes. Inkubation von Brustkrebszellen (MDA-MB-231, $10 \mu\text{M}$, 24 h, $37 \text{ }^\circ\text{C}$) führte zu einer Anreicherung des Ruthenium-Phenanthridin-Komplexes in RNA-reichen Regionen. Im konfokalen Fluoreszenzmikroskopiebild waren das Zytoplasma, das mRNA enthält, und die Nukleoli, die eine hohe Dichte an RNA aufweisen, intensiv angefärbt. Im Gegensatz dazu war der Zellkern, der eine hohe Dichte an DNA aufweist, nur schwach angefärbt.

Zwei strukturell ähnliche dinukleare Rutheniumkomplexe, die sich nur in den verbrückenden Liganden unterscheiden (Abbildung 5), zeigen eine vollkommen unterschiedliche Verteilung in Zellen. Während der alkylverknüpfte dinukleare Rutheniumkomplex Rubb_{16} ($50 \mu\text{M}$, 4 h, $37 \text{ }^\circ\text{C}$) selektiv die Mitochondrien von Mausleukämiezellen (L1210) anfärbt,²⁶ bindet der aromatischverknüpfte, dinukleare Rutheniumkomplex $[\{\text{Ru}(\text{phen})_2\}_2\text{tpphz}]^{4+}$ ($\text{phen} = 1,10\text{-Phenanthrolin}$ und $\text{tpphz} = \text{Tetrapyrido}[3,2\text{-}a:2',3'\text{-}c:3'',2''\text{-}h:2''',3'''\text{-}j]\text{phenazin}$) selektiv an DNA.³ Mit diesem Komplex lässt sich beispielsweise die Struktur der DNA in lebenden humanen Brustkrebszellen (MCF-7, $500 \mu\text{M}$, 1 h, $37 \text{ }^\circ\text{C}$) sichtbar machen.³

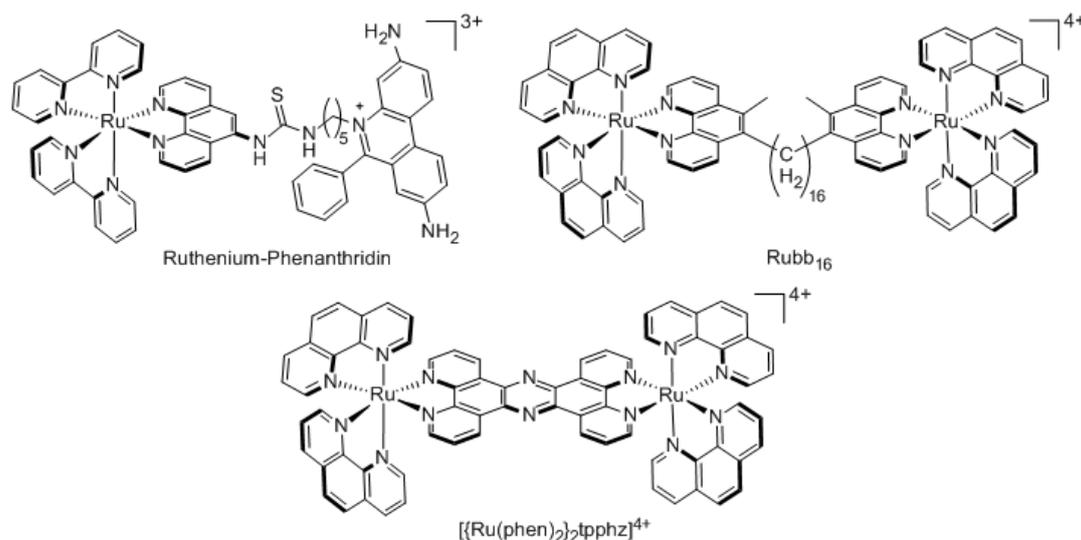


Abbildung 5 Struktur von Ruthenium-Phenanthridin, Rubb₁₆ und [Ru(phen)₂]₂tpphz⁴⁺.

1.2.2 Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexe als mmDNA-Sensor

Basenfehlpaarungen in der zellulären DNA können während der Replikation spontan, durch Exposition mit UV-Licht oder mit genotoxischen Substanzen auftreten.²⁷ Für die Erkennung und Reparatur solcher Fehler sind die Basenfehlpaarungsreparatursysteme (*mismatch repair machinery*, MMR-Systeme) verantwortlich.²⁸ Bei einigen Krebsarten, vor allem bei Kolonkarzinomen, wurden defekte MMR-Systeme entdeckt.²⁹ Außerdem führen MMR-Defizite zu erhöhter Resistenz gegen gebräuchliche Chemotherapeutika.³⁰ Angesichts der Rolle der MMR-Proteine in der Krebsprävention bilden Systeme, die Basenfehlpaarungen selektiv erkennen, neue mögliche Diagnostika und Therapeutika.

Kleine organische Moleküle wie Polyamide³¹ und Naphthyridine³² erkennen erfolgreich Stellen in der DNA mit Basenfehlpaarung (mmDNA-Stellen). Polyamid A erkennt zum Beispiel eine GT-Basenfehlpaarung und das Carbamat-verknüpfte Naphthyridindimer B bindet selektiv an GG-Basenfehlpaarungen (Abbildung 6). Nachteile sind die schwache Selektivität und die photochemische Inaktivität sowie, dass jeweils nur eine bestimmte Basenfehlpaarung erkannt wird.

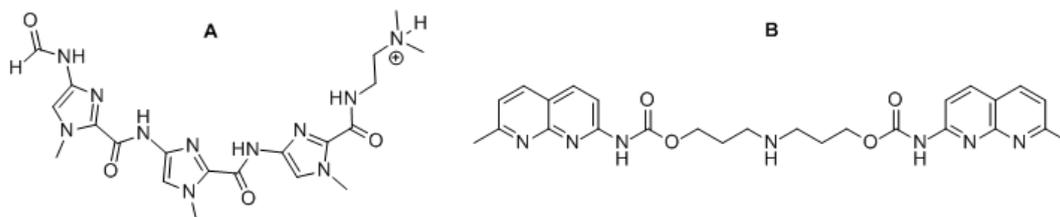


Abbildung 6 Struktur der organischen mmDNA-Sensoren Polyamid A (links) und Naphthyridindimer B (rechts).

Inerte Metallkomplexe stellen auf Grund ihrer räumlichen Struktur sowie ihrer photophysikalischen und elektrochemischen Eigenschaften interessante Kandidaten zur Strukturerkennung von Polynukleotiden dar.

*Lorenzo et al.*³³ nutzten beispielsweise $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(3-(2\text{-Phenanthren-9-yl-vinyl})\text{pyridin})]^{2+}$ (RuL) als elektrochemischen Biosensor. Dafür beschichteten sie Goldoberflächen mit Einzelstrang-DNA (25-mer, ssDNA) und versetzten die Oberfläche mit einer RuL-Lösung. Eine anschließende differentiale Pulsvoltametrie-Messung (DPV) führte zu keinem Signal für das Rutheniumzentrum, da es nicht an die ssDNA gebunden ist. Dasselbe Ergebnis wurde bei Zugabe von nicht komplementärer ssDNA erhalten. Erst durch Hybridisierung mit komplementärer ssDNA konnte RuL interkalieren, und es resultierte ein Signal im DPV-Diagramm für das Rutheniumzentrum. Verwendete man ssDNA, die eine mm-Stelle enthält, so ist die Intensität des Signals geringer als für komplementäre ssDNA. Zusätzlich zeigte sich eine Abhängigkeit der Signalintensität von der Position der mm-Stelle. Befand sich die Basenfehlpaarung am Rand, so ist ein mittelstarkes Signal zu sehen, befand sie sich in der Mitte, so verringert sich das Signal weiter. Nachteile dieser Methode ist, dass die photophysikalischen Eigenschaften des Rutheniumkomplexes nicht ausgenutzt werden und die Methode nicht in lebenden Zellen anwendbar ist.

*Barton et al.*³⁴ verwendeten Poly(pyridyl)rhodium(III)-Komplexe mit dem sterisch anspruchsvollen Diiminliganden Chrysen-5,6-chinondiimin (chrysi). Diese Komplexe banden selektiv an thermodynamisch destabilisierte Stellen der Doppelstrang-DNA (dsDNA). Dies sind Stellen mit Basenfehlpaarung (mmDNA) oder Basenmangel (abDNA).³⁴ Die Selektivität ist darauf zurückzuführen, dass der Ligand chrysi ein weitreichendes, flaches, aromatisches System aufweist, dessen Fläche größer als die Summe der Fläche der Basenpaare ist. $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})]^{3+}$ kann dementsprechend von der kleinen Furche aus in die Basenfehlpaarung insertieren, wobei die Basen nach außenklappen und diese durch den sterisch anspruchsvollen chrysi-Liganden ersetzt werden (Abbildung 7).³⁵ Dadurch rücken die Bipyridine des Komplexes in die Nähe des Phosphatrückrats der DNA.

Um den Einfluss der Größe der Nebenliganden auf die Proliferation MMR-defizienter Zellen im Vergleich zu MMR-aktiven Zellen zu testen, wurden verschiedene weitere Liganden getestet: 1,10-Phenanthrolin (phen), 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin (DIP), Di-2-pyridylamin (HDP) und Ammoniak (NH_3).³⁶ Die Proliferation der MMR-defizienten Zellen wurde stärker gehemmt als die der MMR-aktiven Zellen. Es zeigte sich, dass dieser Unterschied in der Proliferation mit kleiner werdenden Liganden und steigender Inkubationszeit zunimmt.

$[\text{Rh}(\text{HDPA})_2(\text{chrysi})]^{3+}$ besitzt bereits bei niedriger Inkubationszeit (12 h) einen hohen Inhibitionsunterschied zwischen MMR-aktiven und -defizienten Zellen, wodurch dieser Komplex als potentielles Diagnostikum und Therapeutikum eingesetzt werden könnte.

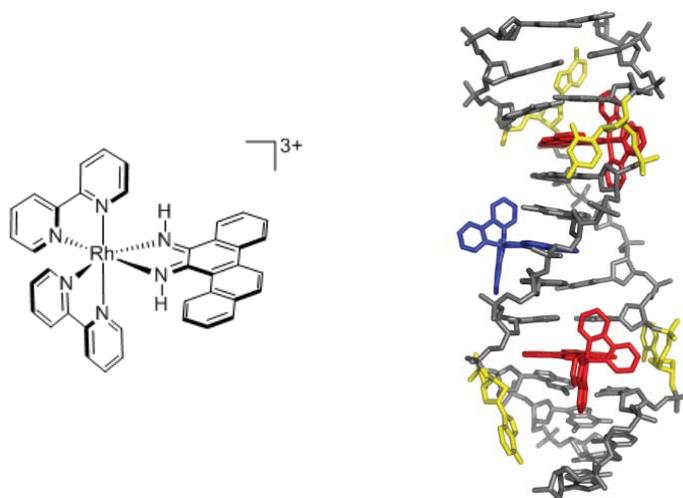


Abbildung 7 Struktur von $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})]^{3+}$ (links) und Kristallstruktur³⁵ (rechts) von interkalierenden $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})]^{3+}$ (rot) gebunden an CA-Basenfehlpaarung (gelb).

Der nächste Schritt bestand nun darin, kleine fluoreszierende Moleküle zu finden, die selektiv an Basenfehlpaarungen binden, um mmDNA in Zellen zu detektieren. Hierzu bieten sich als Ausgangspunkt die den beschriebenen Rhodiumkomplexen analogen Rutheniumkomplexe an. Rutheniumkomplexe mit Phenanthrenchinondiiminliganden wie chrysi zeigen keine Lumineszenz bei Raumtemperatur.³⁷ Es wurden verschiedene Liganden mit Phenanthrolinmotiv auf ihre Fluoreszenzeigenschaften bei Raumtemperatur und bei Bindung an mmDNA, abDNA oder mDNA (DNA, die zwei vollständig komplementäre Stränge aufweist) getestet.³⁸ Dabei zeigte sich, dass $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ (dppz = Dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazin) in Wasser nicht fluoresziert und die Fluoreszenzzunahme bei Bindung an mmDNA und abDNA größer ist als für mDNA.³⁹ Die zelluläre Aufnahme der oben genannten Rhodiumverbindungen wurde mittels der analogen fluoreszierenden Rutheniumkomplexe analysiert. Der Vergleich der analogen Rutheniumkomplexe ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{dppz}]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ und $[\text{Ru}(\text{DIP})_2\text{dppz}]^{2+}$) mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie zeigte, dass die Zellaufnahme durch passive Diffusion erfolgte und die Komplexe mit der höheren Lipophilie besser aufgenommen wurden.^{40, 41} Der besonders interessante Komplex $[\text{Ru}(\text{HDPA})_2\text{dppz}]^{2+}$ wurde allerdings nicht untersucht, da strukturell ähnliche Komplexe, wie bereits oben in Kapitel 1.1.2 erwähnt, nur bei tiefen Temperaturen (-196 °C) hinreichende Fluoreszenz zeigen.

*Keene et al.*⁴² verwendeten dinukleare Rutheniumkomplexe, um selektiv Ausbuchtungen in dsDNA und dsRNA zu erkennen (BulgeDNA). Ausbuchtungen sind Positionen in der DNA-Helix, bei denen keine Base auf dem komplementären Strang zur Verfügung steht, wodurch die Helix offener wird. Beispielsweise binden die $[(\text{Ru}(\text{phen})_2)_2(\mu\text{-phen-Alkylkette-phen})]^{4+}$ -Komplexe über ein Rutheniumzentrum an die Ausbuchtung, während die Alkylkette und das zweite Rutheniumzentrum entlang der kleinen Furche mit der DNA elektrostatisch wechselwirken. Enthält die gleiche Nukleotidsequenz keine Ausbuchtung, so bindet der Komplex nicht so stark, was über NMR-Spektroskopie nachgewiesen wurde.

1.3 Zelluläre Aufnahmemechanismen von Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexen⁴³

Übergangsmetallkomplexe haben zunehmende Aufmerksamkeit als Sensor in biologischen Systemen erlangt (1.2.1). Diese Verbindungen müssen ihren Bestimmungsort in der Zelle effektiv erreichen. Das dafür nötige Passieren der Zellmembran, die als Barriere der Zelle wirkt, kann auf verschiedene Wege geschehen. Je nach Aufnahmemechanismus werden die Aufnahmemenge, die intrazelluläre Verteilung der Verbindung und die Zelllinienspezifität beeinflusst.

Die Aufnahmemechanismen lassen sich in drei Klassen aufteilen: Passive Diffusion, Aufnahme unterstützt durch Transportproteine und Endozytose. Bei der passiven Diffusion wird die Verbindung direkt durch die Doppellipidschicht der Zellmembran entlang ihres Konzentrationsgradienten befördert. Transportproteine sind in der Membran eingebettet und transportieren energieunabhängig (Carrier- und passiver Transport) bzw. energieabhängig (ATP-getriebene Pumpen) Moleküle in die Zelle. Makromoleküle werden schließlich via Endozytose durch Umschließung mit einer Membran (als sogenannte Vesikel) in die Zelle befördert.

Zur Unterscheidung zwischen energieabhängigen (aktiver Transport, Endozytose) und energieunabhängigen Transport (passive Diffusion, passiver Transport) werden die Zellen bei 4 °C oder mit Metabolismusinhibitoren (2-Deoxyglucose oder Oligomycin) inkubiert. Dadurch werden alle Prozesse, die Energie benötigen, blockiert (aktiver Transport, Endozytose). Die Aufnahme mittels passiver Diffusion ist nicht sättigbar und kann ebenso wenig durch Inhibitoren verhindert werden. Einzig durch Änderung des Membranpotentials (von negativ intrazellulär zu negativ extrazellulär) und der Membranfluidität kann die

Aufnahme reduziert werden. Der proteingestützte passive Transport hingegen kann durch selektive Inhibitoren verhindert bzw. durch Überexpression verstärkt werden. Auch ein proteinvermittelter aktiver Transport kann durch entsprechende Verbindungen gehemmt bzw. verstärkt werden.

Endozytose kann über mehrere individuelle Wege ablaufen, die in zwei Hauptkategorien zusammengefasst werden: Phagozytose (Aufnahme von großen Partikeln, nur in spezialisierten Zellen) und der in allen Zellen stattfindenden Pinozytose. Diese ist weiter unterteilt in Makropinozytose, Clathrin-vermittelte Endozytose, Caveolin-abhängige Endozytose und Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose. Die verschiedenen Endozytosewege können durch den Einsatz unterschiedlichster Inhibitoren mehr oder weniger selektiv gehemmt oder auch verstärkt werden.

Zu berücksichtigen ist bei Aufnahmestudien, dass Zellen Effluxpumpen zur Ausscheidung von Substanzen besitzen. Diese Pumpen sind zu einem Großteil für die Resistenz von Krebszellen gegen Pharmazeutika verantwortlich. Die Effluxpumpen in humanen Krebszellen gehören größtenteils zu der Gruppe der ATP-bindenden Kassetten (*ATP binding cassette*, ABC). Diese benötigen ATP (Energie), um Substanzen aus der Zelle zu transportieren. Die Effluxpumpen einer Zelle können durch Inkubation bei 4 °C blockiert werden. Zur Unterscheidung, welcher ABC-Transporter für den Transport aus der Zelle verantwortlich ist, existiert auch hier die Möglichkeit, diese zu über- bzw. unterexprimieren.

Zur Untersuchung der Akkumulation und des Aufnahmemechanismus von Übergangsmetallkomplexen werden verschiedene Methoden angewendet. Alle Komplexe können mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) und Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) untersucht werden. Diese Methoden sind sehr sensitiv und liefern den absoluten Gehalt an Metall pro Zelle. Nachteilig wirkt sich hierbei aus, dass die Zellen für diese Methode im Falle von adhärennten Zellen trypsinisiert und zusätzlich lysiert werden müssen. Dadurch kann nur der durchschnittliche Metallgehalt bestimmt werden und nicht zwischen Oberflächen-gebundenen und intrazellulären Komplexen unterschieden werden. Die zelluläre Aufnahme von lumineszierenden Übergangsmetallkomplexen kann weiterhin mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden. Wird ein stattfindender Transport in die Zelle beispielsweise durch Inkubation mit Inhibitoren oder bei niedrigen Temperaturen blockiert, so findet keine Aufnahme der Komplexe statt und es kann keine Lumineszenz in den Zellen beobachtet werden.

Die Durchflusszytometrie ist dazu geeignet, quantitative Aussagen über Zellaufnahmegeschwindigkeit und -mechanismus zu machen. Dazu müssen die Zellen zunächst zur Analyse trypsiniert und suspendiert werden. Dies geschieht entweder vor oder nach Inkubation mit der Komplexlösung. Bei der Durchflusszytometrie strömen die Zellen einzeln durch einen Laserstrahl und die Lichtstreuung und Fluoreszenz wird aufgenommen. Optische Filter erlauben die gleichzeitige Detektion mehrerer Fluorophore. Als Ergebnis erhält man ein Histogramm der Fluoreszenzintensitätsverteilung gegen die Anzahl der Zellen. Zudem wird die mittlere Durchschnittsfluoreszenzintensität der Zellpopulation bestimmt. Es ist leicht möglich, die Fluoreszenzintensitäten verschiedener Zellpopulationen (behandelte Zellen verglichen mit unbehandelten Zellen, unterschiedliche Inkubationszeiten bzw. -temperaturen) zu vergleichen. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass nicht zwischen membrangebundenen und intrazellulären Komplexen unterschieden werden kann, was andererseits durch die konfokale Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht wird. Dafür werden die Zellen unter den entsprechenden Bedingungen inkubiert und die Verteilung und Fluoreszenzintensität der Komplexe mittels eines Mikroskops betrachtet. Zusätzlich zeichnet sich diese Methode dadurch aus, dass die Komplexe *in situ* in der natürlichen Umgebung untersucht werden können.

Bisher sind nur wenige Studien zum zellulären Aufnahmemechanismus von Übergangsmetallkomplexen durchgeführt worden. Eine Ausnahme stellen lediglich das als Zytostatikum verwendete *cis*-Platin und seine Analoga dar. Diese werden mittels passiver Diffusion, organischer Kationen- und Kupfertransporter sowie durch Endozytose in die Zelle aufgenommen.⁴⁴ Analog ist für Rutheniumkomplexe eine entsprechende Vielfalt an Aufnahmemechanismen zu erwarten.⁴¹

Das auf einem Rutheniumkomplex basierende Antikrebsmittel KP1019 bindet beispielsweise unter Abspaltung eines Chloridliganden an Fe(III)-Transferrin (Abbildung 8). Dieses wird durch Transferrin-Rezeptoren an der Zelloberfläche erkannt und durch Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen. Infolge des niedrigen pH-Werts in den Endosomen wird Fe(III) und zusätzlich KP1019 frei. Nach 2 h Inkubationszeit konnten 55 % des KP1019 im Zellkern gefunden werden. Der Rest war auf das Zytoplasma verteilt.⁴⁵ Stablen Ruthenium(II)-Komplexen steht dieser Weg der Aufnahme nicht zur Verfügung, da die Abspaltung eines Liganden nicht ermöglicht wird.⁴¹

*Dobrucki*²³ beschrieb, dass $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ und $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ von Mausmakrophagen (J144) in 200 μM Konzentration innerhalb von 70 min mittels Endozytose aufgenommen werden. Man sieht punktförmige Anfärbungen der Endosome im Zytoplasma.

Puckett und *Barton*⁴¹ zeigten mittels Durchflusszytometrie und den bereits erwähnten Inhibitionsmethoden, dass $[\text{Ru}(\text{DIP})_2\text{dppz}]^{2+}$ (DIP = 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin) über passive Diffusion in HeLa-Zellen aufgenommen wurde (Abbildung 8). Die Aufnahmemenge hing ebenso wie für andere lipophile Kationen (z. B. Rhodamin 123) vom Membranpotential ab.

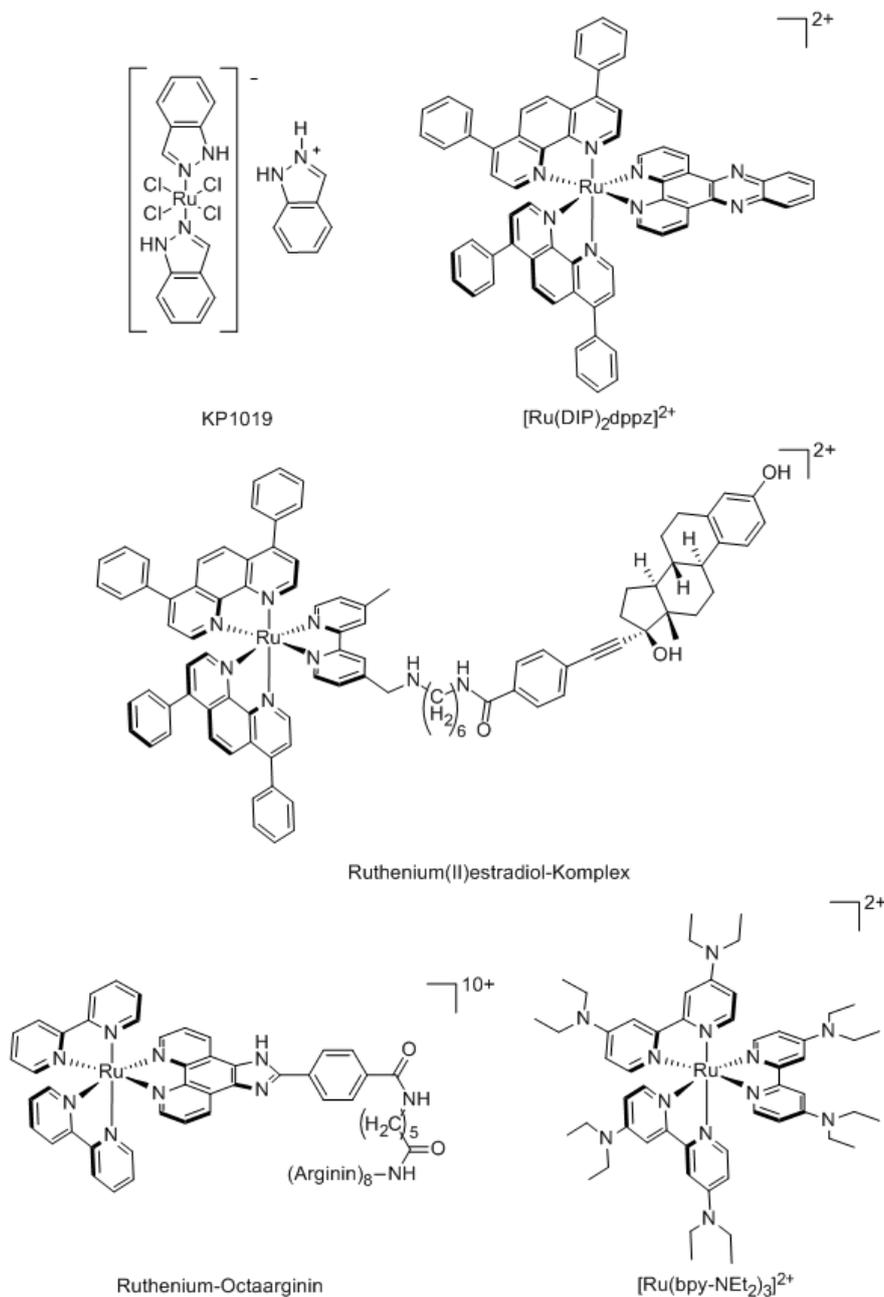


Abbildung 8 Struktur von KP1019, $[\text{Ru}(\text{DIP})_2\text{dppz}]^{2+}$, Ruthenium(II)estradiol-Komplex, Ruthenium-Octaarginin und $[\text{Ru}(\text{bpy-NEt}_2)_3]^{2+}$.

Ruthenium(II)estradiol-Komplexe zeigen einen anderen Aufnahmemechanismus (Abbildung 8). *Lo et al.*⁴⁶ inkubierten HeLa-Zellen mit dem Ruthenium(II)estradiol-Komplex bei 4 °C und 37 °C und konnten Lumineszenz mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie nur bei 37 °C beobachten. Der Ruthenium(II)estradiol-Komplex wurde durch einen aktiven Mechanismus in die Zellen aufgenommen. Der Komplex wurde im Zytoplasma besonders um den Nukleus akkumuliert, wobei der Nukleus selbst nur gering angefärbt wurde.

Ruthenium-Octaarginin zeigte ebenfalls eine temperaturabhängige Aufnahme in Blutplättchen (Abbildung 8). Da das freie Polypeptid Octaarginin mittels Endozytose in Zellen akkumuliert wird, wurde davon ausgegangen, dass sich das Rutheniumkonjugat entsprechend verhält.⁴⁷

*Zava et al.*⁴⁸ konnten zeigen, dass für $[\text{Ru}(\text{bpy-NEt}_2)_3]^{2+}$ mehr als nur ein Aufnahmemechanismus stattfindet (Abbildung 8). Dieser Komplex akkumulierte beispielsweise in hohen Konzentrationen und bei niedriger Temperatur (4 °C) passiv an der Zellmembran von Eierstockkrebszellen (A2780). Andererseits wurde bei niedriger Konzentration (1 μM) und 37 °C punktförmiges zytoplasmatisches Anfärben beobachtet, das durch aktive Endozytose verursacht wurde.

Der Mechanismus des zellkerngängigen dinuklearen Rutheniumkomplexes $[\{\text{Ru}(\text{phen})_2\}_2\text{tpphz}]^{4+}$ wurde ebenfalls untersucht (Abbildung 5). Der Komplex wurde bei einer Inkubation bei 4 °C von Brustkrebszellen (MCF-7) nicht aufgenommen. Es handelt sich somit um einen aktiven Aufnahmemechanismus. Anschließend wurden verschiedene Endozytose-Inhibitoren getestet. Unabhängig vom Inhibitor wurde eine gleich starke Lumineszenz im Zellkern beobachtet. Es handelt sich somit um einen energieabhängigen aber endozytosefreien Aufnahmemechanismus.³

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexe je nach Substituent durch unterschiedliche Wege in Zellen gelangen können.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, eine Serie von Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexen zu synthetisieren, sowie deren Wechselwirkung mit Nukleinsäuren und lebenden Zellen zu charakterisieren.

Eine verbesserte Zellgängigkeit wurde mit Hilfe des Ligands 4'-Methyl-2,2'-bipyridinyl-4-carbonsäure-(1-amino-8-chloroanthrachinon)-propylamid (**bpy-T**) erreicht. Außerdem verstärkt **bpy-T** die Wechselwirkung mit Polynukleotiden. Die Funktionalisierung der verbleibenden Bipyridine erlaubt die Variation der Komplexgesamtladung, -größe und -lipophilie. Der Einfluss der derivatisierten Bipyridin-Liganden auf die Wechselwirkung der Komplexe mit Polynukleotiden und auf die Aufnahme und Verteilung in verschiedenen Zelllinien sollte ermittelt werden.

Weiterhin sollten $[\text{Ru}(\text{HDPA})_2\text{dppz}]^{2+}$ (HDPA = Di-2-pyridylamin, dppz = Dipyrido-[3,2-a:2',3'-c]phenazin) und dessen Derivate hergestellt und hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften, mmDNA-Sensorfähigkeit und zellulären Verteilung untersucht werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-Komplexe - zelluläre Aufnahmestudien

3.1.1 Synthesen

3.1.1.1 Darstellung des Transportmoleküls *bpy-T*

Im Arbeitskreis von Prof. Krämer wurden verschiedene Transportmoleküle synthetisiert, die einerseits die Zellaufnahme von Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-Komplexen beschleunigen und andererseits die Wechselwirkung mit DNA verbessern. Als bestes Transportmolekül stellte sich 1-(3-Aminopropylamino)-8-chloroanthracinon **T** heraus (Abbildung 9). Der entsprechende Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-Komplex $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-T})]^{2+}$ (**13**) wird in 20 min in einer Konzentration von 20 μM in HeLa-Zellen akkumuliert und kann mittels der Anthrachinoneinheit in DNA interkalieren.⁴⁹

Ausgehend von 1,8-Dichloroanthracinon wurde über nukleophile Substitution⁵⁰ mit monogeschütztem Propandiamin (**1**) und nachfolgender Entschützung mittels Trifluoressigsäure (TFA)⁵¹ **T** in Ausbeuten von 44 % erhalten (Abbildung 9). **1** wurde nach der Vorschrift von *Far et. al.*⁵² synthetisiert und in Literatursausbeuten erhalten. **T** wurde mittels Carbonyldiimidazol (CDI) mit 4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-carbonsäure (**2**) in guten Ausbeuten (70 %) zum Transportmolekül **bpy-T** umgesetzt. Die Vorschrift von *McCafferty et al.*⁵³ wurde herangezogen, um **2** in Literatursausbeuten zu synthetisieren.

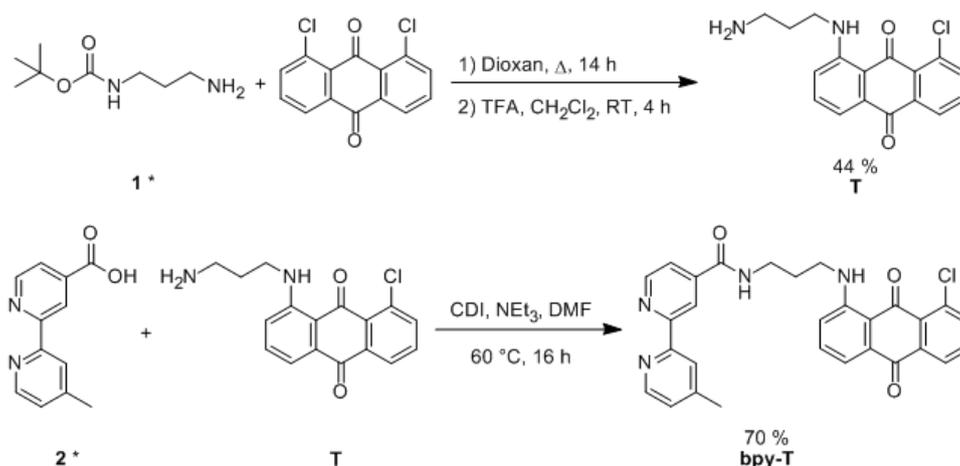


Abbildung 9 Synthese des Transportmoleküls **bpy-T**. (* Literaturbekannte Verbindung)

3.1.1.2 Darstellung verschiedener Bipyridin-Liganden *L*

Es wurden Bipyridin-Liganden (**L**) mit unterschiedlichen Substituenten synthetisiert. Durch die Funktionalisierung der Bipyridine mit verschiedenen funktionellen Gruppen sollten die Bindungseigenschaften zu Polynukleotiden und Zellbestandteilen sowie die Aufnahmegeschwindigkeit der Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-Komplexe in Zellen variiert werden.

Ausgehend von 4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridin konnten nach Oxidation zum 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bipyridin (**3**) analog folgender Syntheseroute (Abbildung 10) eine Vielzahl an Liganden mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen hergestellt werden.

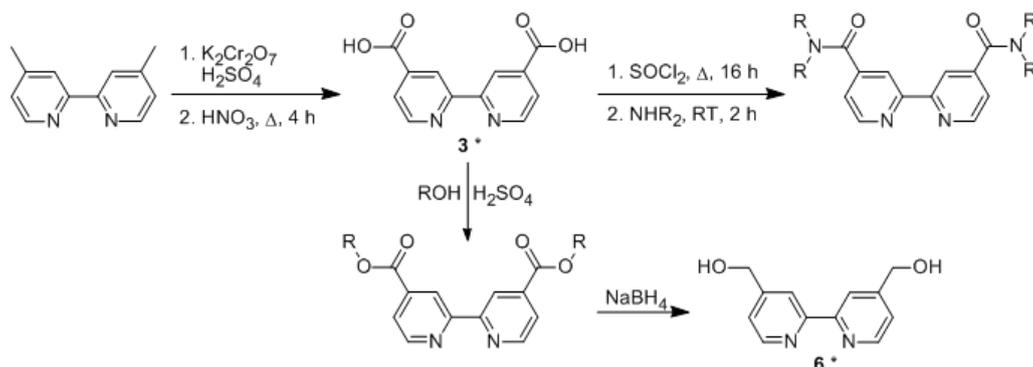


Abbildung 10 Syntheseroute zu funktionalisierten Bipyridinen. (* Literaturbekannte Verbindung)

Die Umsetzung erfolgte anhand von variierten Literaturprotokollen^{15, 54, 55, 56} in guten bis sehr guten Ausbeuten (Abbildung 11).

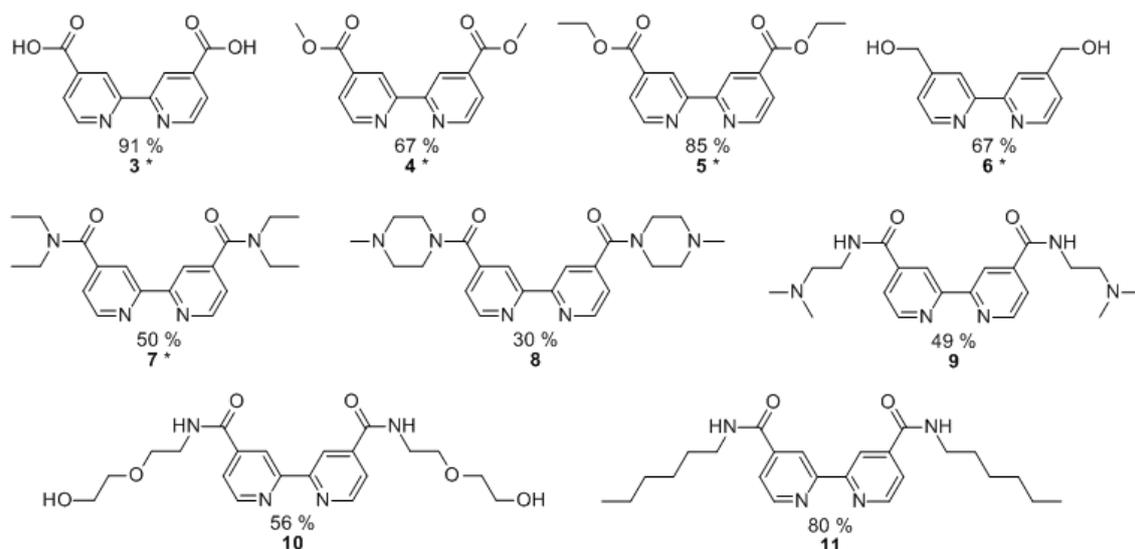


Abbildung 11 Synthetisierte Bipyridin-Liganden. (* Literaturbekannte Verbindung)

3.1.1.3 Darstellung der $[\text{RuL}_2(\text{bpy-T})]^{2+}$ -Komplexe

Zur Darstellung der $[\text{RuL}_2(\text{bpy-T})]^{2+}$ -Komplexe wurden vier verschiedene Syntheserouten verwendet.

2,2'-Bipyridin wurde ebenso wie die Liganden **4**, **5** und **7** nach der Isolierung der jeweiligen Zwischenstufe $[\text{RuL}_2\text{Cl}_2]$ zu dem entsprechenden $[\text{RuL}_2(\text{bpy-T})]^{2+}$ -Komplexen umgesetzt.

2,2'-Bipyridin wurde nach der Vorschrift von *Sullivan et al.*⁵⁷ mit Rutheniumtrichlorid-Hydrat und einem Überschuss Lithiumchlorid in Dimethylformamid erhitzt, aus Aceton umkristallisiert und mit Wasser vom Nebenprodukt $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ befreit. Nach Trocknen im Vakuum wurde **12** mit **bpy-T** weiter umgesetzt. Umkristallisation lieferte das Produkt $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bpy-T})]\text{Cl}_2$ (**13**) über zwei Stufen in 37 % Ausbeute (Abbildung 12).

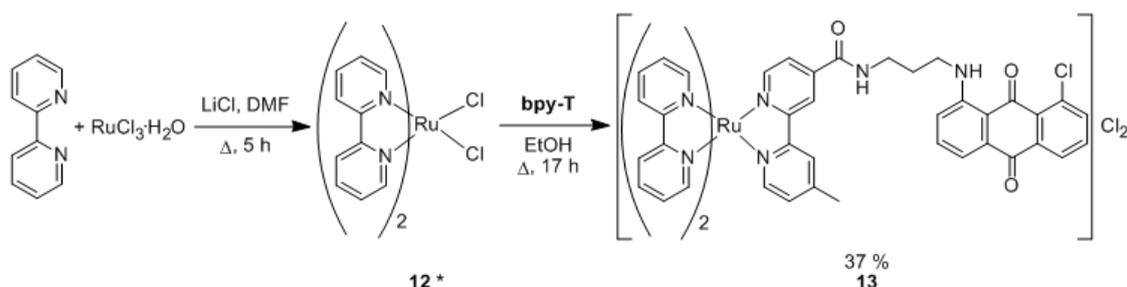


Abbildung 12 Syntheseroute zur Darstellung von Komplex **13**. (* Literaturbekannte Verbindung)

Rutheniumtrichlorid-Hydrat und Bipyridin **4** wurden in Methanol für 24 h unter Rückfluss erhitzt und anschließend säulenchromatographisch gereinigt.⁵⁸ Die lilafarbene Bande wurde eingengt und mit **bpy-T** für fünf Tage in einer Methanol/Wasser-Mischung erhitzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde **15** über zwei Stufen in 15 % Ausbeute erhalten (Abbildung 13).

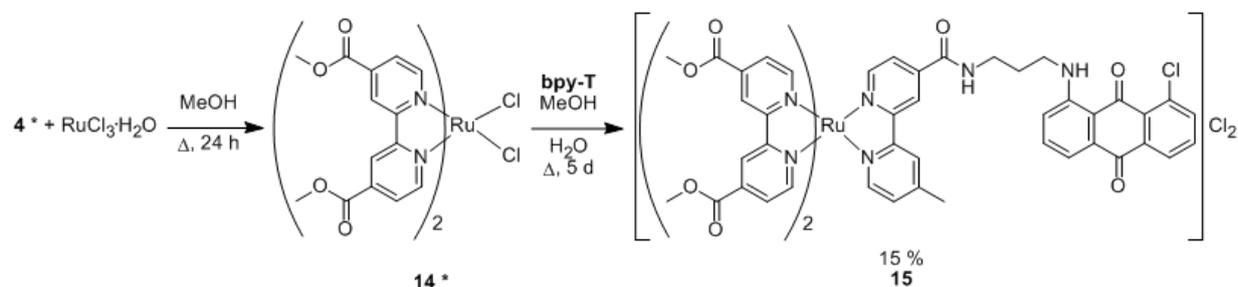


Abbildung 13 Syntheseroute zur Darstellung von Komplex **15**. (* Literaturbekannte Verbindung)

Bipyridin **5** wurde der Vorschrift von *Hou et al.*⁵⁹ entsprechend mit Rutheniumtrichlorid-Hydrat in Ethanol erhitzt und säulenchromatographisch gereinigt. Der Bis(bipyridyl)ruthenium-Komplex **16** und **bpy-T** wurden für drei Tage in Ethanol unter Rückfluss erhitzt.

Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte Komplex **17** über zwei Stufen in 38 % Ausbeute isoliert werden (Abbildung 14).

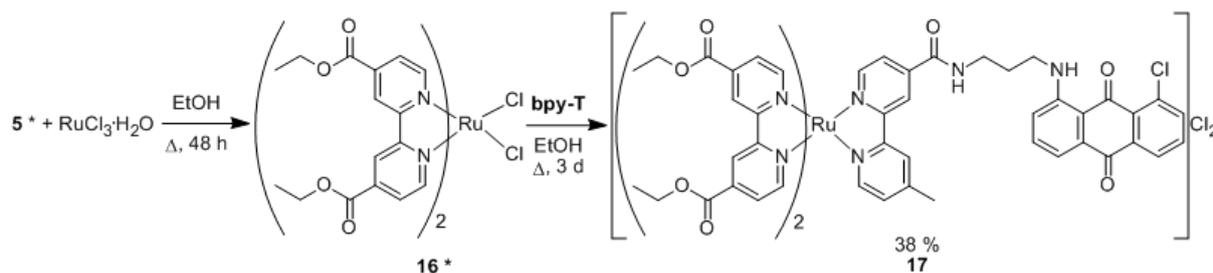


Abbildung 14 Syntheseroute zur Darstellung von Komplex **17**. (* Literaturbekannte Verbindung)

7 wurde nach *Aldrige III et al.*⁵⁶ mit Rutheniumtrichlorid-Hydrat, Lithiumchlorid und Hydrochinon (HC) zum Bis(bipyridyl)ruthenium-Komplex **18** umgesetzt. Anschließende Reaktion mit **bpy-T** in Ethanol ergab nach einer Reaktionszeit von 18 h und abschließender säulenchromatographischer Reinigung **19** in 23 % Ausbeute über zwei Stufen (Abbildung 15).

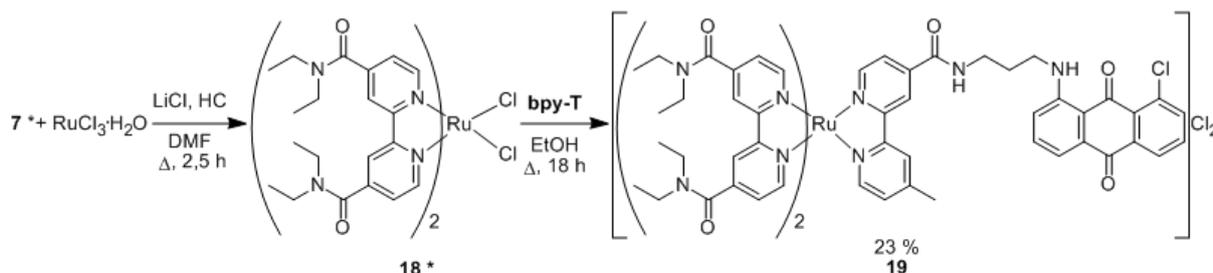


Abbildung 15 Syntheseroute zur Darstellung von Komplex **19**. (* Literaturbekannte Verbindung)

Die beiden Hydroxygruppen enthaltenden Liganden **6** und **10** wurden nach der Vorschrift von *Collins et al.*⁶⁰ zum entsprechenden Tris(bipyridyl)ruthenium-Komplex **20** bzw. **21** umgesetzt.

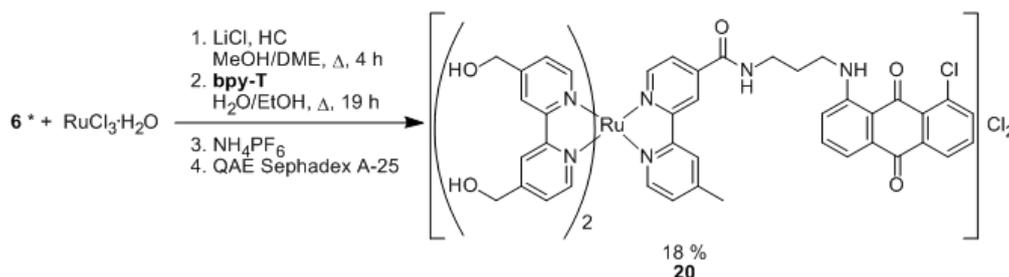


Abbildung 16 Syntheseroute zur Darstellung von Komplex **20**. (* Literaturbekannte Verbindung)

Hierzu wurde der Ligand mit Rutheniumtrichlorid-Hydrat, Lithiumchlorid und Hydrochinon in einer Methanol/Dimethoxyethan-Mischung für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Extraktion und Filtration wurde die eingedampfte Reaktionsmischung mit **bpy-T**, Wasser und Ethanol versetzt und über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Säulenchromatographische Reinigung ergab

das entsprechende Hexafluorophosphatsalz, das mittels Anionentauscher (QAE Sephadex A-25) ins gewünschte Chloridsalz **20** in 18 % Ausbeute überführt wurde (Abbildung 16).

Der Komplex **21** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung direkt als Chloridsalz in 14 % Ausbeute isoliert werden (Abbildung 17).

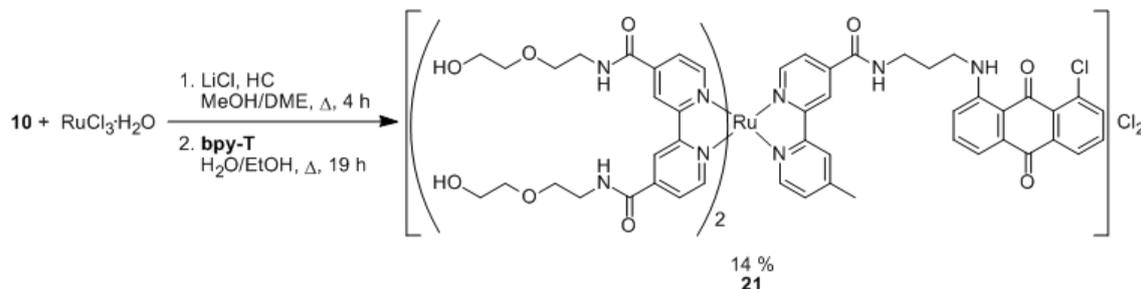


Abbildung 17 Syntheseroute zur Darstellung von Komplex **21**.

Zur Synthese der Komplexe **22** bis **25** wurde die Vorschrift von *Lee et al.*⁶¹ herangezogen. Hierzu wurde das Dichloro(*p*-cymol)ruthenium(II)-Dimer mit **bpy-T** in Ethanol bei Raumtemperatur zur Zwischenstufe $[\text{Ru}(\textit{p}\text{-Cymol})(\text{bpy-T})\text{Cl}]\text{Cl}$ umgesetzt. Anschließend wurde der entsprechende Bipyridin-Ligand **L** und Wasser hinzugefügt und die Reaktionsmischung für 24 h unter Rückfluss erhitzt.

Komplex **22** konnte nach Reaktion von $[\text{Ru}(\textit{p}\text{-Cymol})(\text{bpy-T})\text{Cl}]\text{Cl}$ mit kommerziell erhältlichen 4,4'-Dicarboxaldehyd-2,2'-bipyridin synthetisiert werden. Nach säulenchromatographischer Vorreinigung wurde das Produkt mittels Umkehrphasen-HPLC in 47 % Ausbeute isoliert (Abbildung 18).

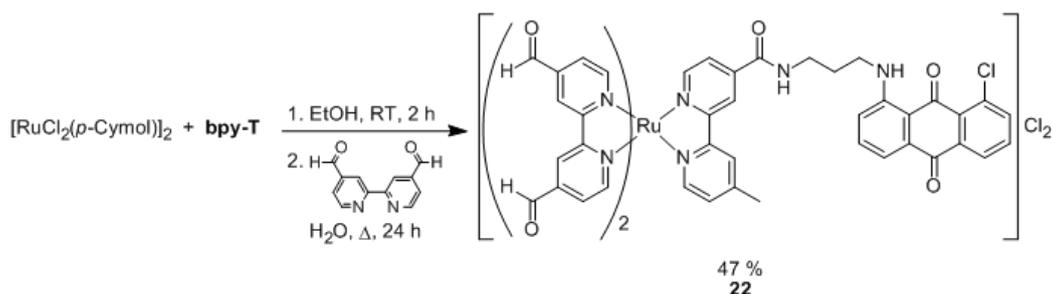
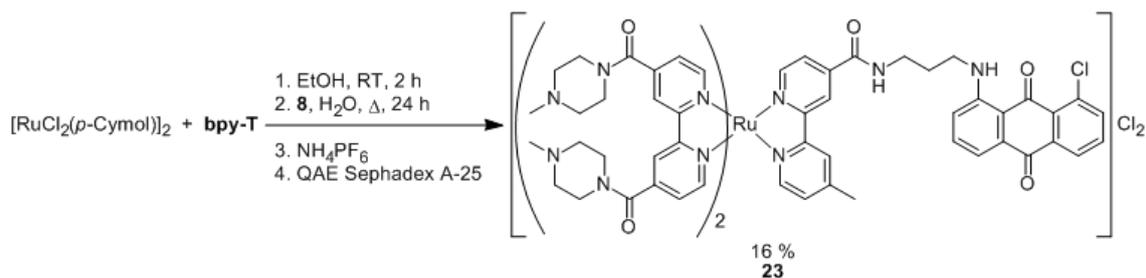
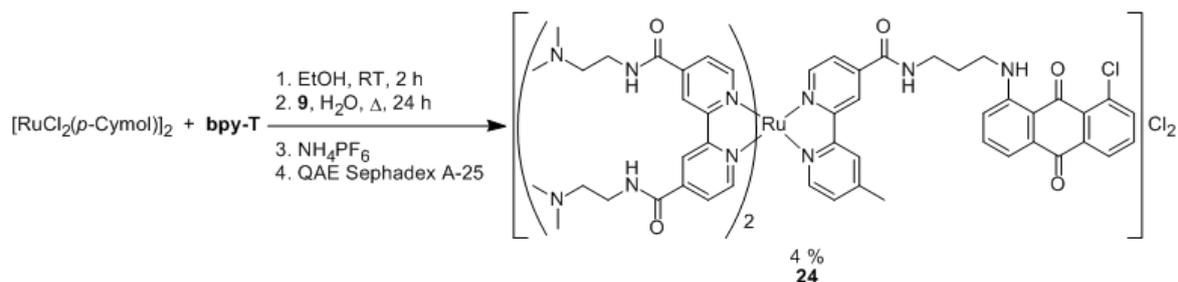
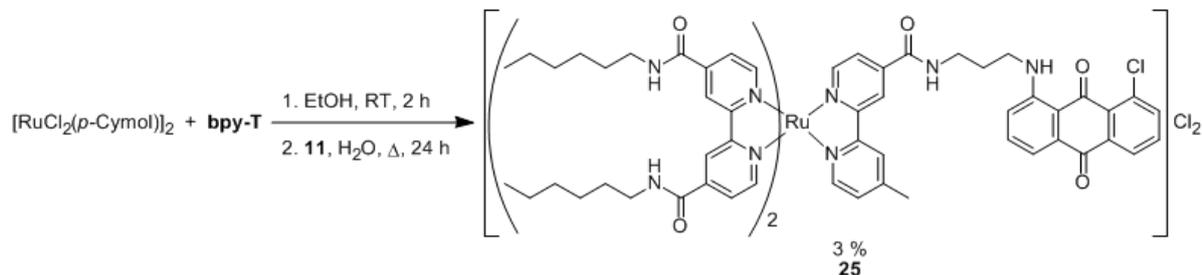


Abbildung 18 Syntheseroute zur Darstellung von Komplex **22**.

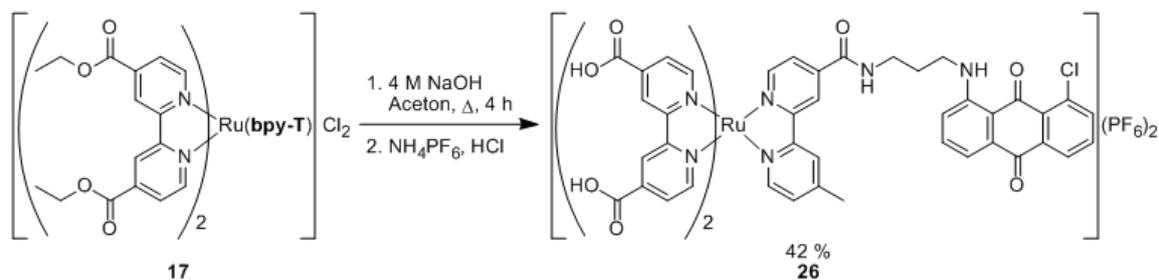
Zur Darstellung der Komplexe **23** und **24** wurde nach der Reaktion von $[\text{Ru}(\textit{p}\text{-Cymol})(\text{bpy-T})\text{Cl}]\text{Cl}$ mit **8** bzw. **9** die Reaktionsmischung eingeeengt und mit wässriger Ammoniumhexafluorophosphatlösung versetzt. Der dabei entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mehrmals mit Wasser gewaschen. Der Niederschlag wurde mittels Anionentauscherharz (QAE Sephadex A-25) in das wasserlösliche Chloridsalz überführt und mittels Umkehrphasen-HPLC gereinigt. Man erhielt Komplex **23** in 16 % Ausbeute (Abbildung 19) und Komplex **24** in 4 % Ausbeute (Abbildung 20).

Abbildung 19 Syntheseroute zur Darstellung von Komplex **23**.Abbildung 20 Syntheseroute zur Darstellung von Komplex **24**.

Komplex **25** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Ausbeute von 3 % erhalten (Abbildung 21). Es konnte zusätzlich Zwischenprodukt [Ru(*p*-Cymol)(**bpy-T**)Cl]Cl isoliert und der Ligand **11** säulenchromatographisch zurückgewonnen werden.

Abbildung 21 Syntheseroute zur Darstellung von Komplex **25**.

Komplex **26** wurde analog der Vorschrift von *Ghanem et al.*⁶² durch Verseifung der Ethylester des Komplexes **17** zu den entsprechenden Carbonsäuren erhalten. Dafür wurde Komplex **17** in Aceton mit 4 N Natronlauge unter Rückfluss erhitzt und Komplex **26** als Hexafluorophosphatsalz in 42 % Ausbeute isoliert (Abbildung 22).

Abbildung 22 Syntheseroute zur Darstellung von Komplex **26**.

3.1.2 UV/Vis- und Fluoreszenzeigenschaften

3.1.2.1 UV/Vis-Eigenschaften

Die Absorptionsspektren der synthetisierten Rutheniumkomplexe und **[Ru(bpy)₃]Cl₂** wurden mit einer Konzentration von 20 μM in Wasser (pH 7) gemessen (Tabelle 1, Abbildung 23). Wie auch andere Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexe zeigten diese eine starke Absorption im Wellenlängenbereich von 260 nm bis 320 nm, der sich einem ligandzentrierten Übergang (LC) zuordnen lässt.⁵ Die Absorption zwischen 400 nm und 500 nm stellt einen Metall-Ligand-Ladungsübergang dar (MLCT). Dieser ist für die typisch orangene Farbe der Komplexe verantwortlich. Die Wellenlängen der beiden Absorptionsmaxima und die jeweiligen Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Extinktionskoeffizienten sind Mittelwerte aus zwei Messungen und liegen für die Rutheniumkomplexe im gleichen Größenbereich. Die Wellenlängen der Absorptionsmaxima für **[Ru(bpy)₃]Cl₂** stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Werten sehr gut über ein.^{5,6,7} Die hier bestimmten Extinktionskoeffizienten sind etwas kleiner als die von *Kalyanasundaram*⁵ bestimmten Werten.

Tabelle 1 Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten der Komplexe **[Ru(bpy)₃]Cl₂**, **13**, **15**, **17** und **19 - 26** (20 μM , Wasser, pH 7, 25 °C).

Komplex	Absorption [nm] (ϵ [$\text{cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$])	
	LC	MLCT
[Ru(bpy)₃]Cl₂	285 (75200)	452 (13300)
13	286 (61800)	468 (14200)
15	307 (47200)	480 (18200)
17	305 (49600)	480 (19000)
19	295 (76100)	469 (21000)
20	290 (59000)	475 (14600)
21	303 (50600)	478 (17800)
22	291 (47400)	473 (15700)
23	297 (51200)	469 (14100)
24	303 (41200)	477 (13900)
25	308 (35000)	480 (13800)
26	302 (45400)	469 (15700)

Wie man in Abbildung 23 (links) sieht, setzt sich das Absorptionsspektrum von **13** (rot) aus dem Absorptionsspektrum von $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ (blau) und vom Anthrachinonderivat **T** (lila) zusammen. Dadurch verschiebt sich das Maximum bei ca. 450 nm um 16 nm in den roten Bereich. Die anderen Komplexe lassen sich nach ihren Substituenten in vier unterschiedliche Gruppen einteilen. In Abbildung 23 (rechts) ist jeweils ein Vertreter der Gruppen gezeigt. Die größte Gruppe wird durch die Komplexe **15**, **17**, **21**, **24** und **25** (hellblau, Abbildung 23, rechts) gebildet. Diese sind durch Ester- bzw. Amidfunktionen an der 4,4'-Position der Bipyridine charakterisiert, an denen ein Rest am Sauerstoff- bzw. Stickstoffatom gebunden ist. Das Absorptionsspektrum wird durch die Substituenten so beeinflusst, dass die LC-Bande um etwa 20 nm und die MLCT-Bande um ca. 10 nm energieärmer sind als bei **13**.

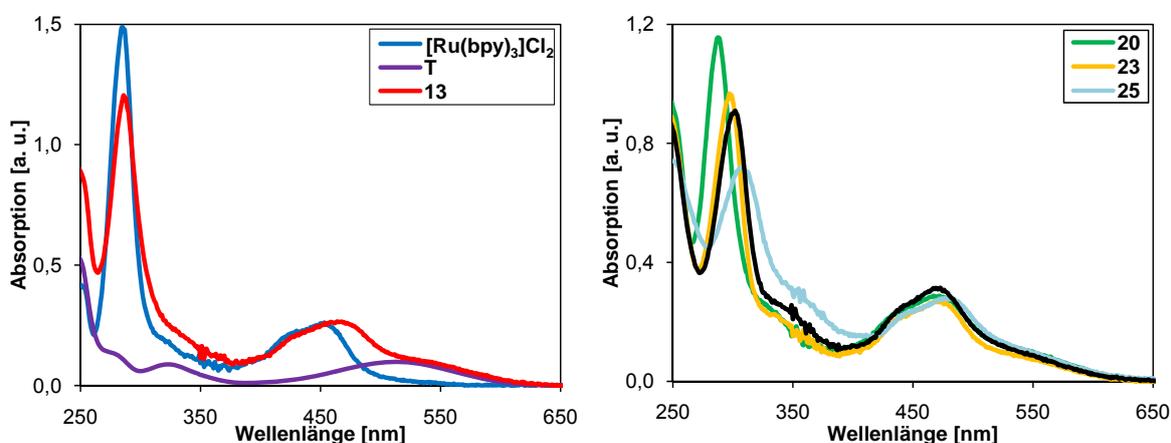


Abbildung 23 Absorptionsspektren ausgewählter Verbindungen (20 μM , Wasser, pH 7, 25 $^\circ\text{C}$).

links: $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ (blau), **T** (lila) und **13** (rot).

rechts: **20** (grün), **23** (gelb), **25** (hellblau) und **26** (schwarz).

Komplex **19** und **23** (gelb, Abbildung 23, rechts) sind in 4,4'-Position mit Amidgruppen funktionalisiert, die jeweils zwei Alkylreste am Stickstoffatom tragen. Die LC-Bande verschiebt sich dadurch im Bezug auf **13** um 10 nm zu höheren Wellenlängen, während die MLCT-Bande unverändert bleibt. Die freien Carbonsäuregruppen in **26** (schwarz, Abbildung 23, rechts) verschieben die LC-Absorption um ca. 15 nm zu größerer Wellenlänge ohne Einfluss auf die MLCT-Absorption. Die letzte Gruppe besteht aus dem hydroxymethyltragenden Komplex **20** (grün, Abbildung 23, rechts) und dem tetraaldehydsubstituierten Komplex **22**. Beide zeigen eine Absorptionsverschiebung um ca. 5 nm zu höherer Wellenlänge für sowohl LC- als auch MLCT-Übergang. Komplex **20** und **22** zeigen in Wasser ähnliche Absorptionsspektren, da Komplex **22** in Wasser hydratisiert vorliegt und somit strukturell Komplex **20** ähnelt. In aprotischem Acetonitril hingegen unterscheiden sich die Spektren von **20** und **22** (Abbildung 24). Komplex **22** zeigt in Acetonitril eine stärker

rotverschobene Absorption für die LC- und MLCT-Übergänge (300 nm bzw. 485 nm) als Komplex **20** (288 nm bzw. 470 nm). Die Maxima der Übergänge von **22** liegen näher an denen der carbonsäureestersubstituierten Komplexe **15** und **17**.

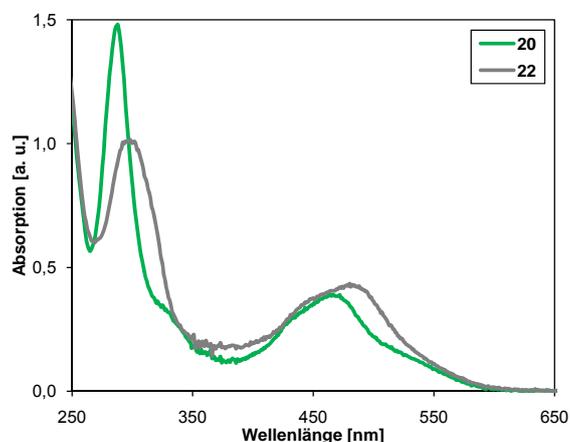


Abbildung 24 Absorptionsspektren von **20** (grün) und **22** (grau) in Acetonitril (20 μM , 25 $^{\circ}\text{C}$).

3.1.2.2 Fluoreszenzeigenschaften

Die Emissionsspektren der synthetisierten Rutheniumkomplexe und $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ wurden in einer Konzentration von 20 μM in Wasser (pH 7) aufgenommen. Bei einer Anregung mit 468 nm weisen diese die für Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-Komplexe typische Emission zwischen 550 nm und 700 nm auf,⁵ die aus dem $^3\text{MLCT}$ -Zustand stattfindet (siehe Abbildung 3).⁷ In Tabelle 2 sind die Emissionsmaxima und relativen Emissionsintensitäten der synthetisierten Komplexe aufgetragen. Alle Emissionsmaxima sind im Vergleich zu $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ zu höheren Wellenlängen verschoben und wesentlich intensitätsärmer. Durch die Kopplung von **T** über eine Amidfunktion an ein Bipyridin erniedrigt sich das π^*_L -Orbital und die Energie des Übergangs $^3\text{MLCT}$ zum Grundzustand nimmt ab (siehe 1.1.1, Abbildung 2).⁶³ Die Intensitätserniedrigung der Emission ist auf die Löschung des $^3\text{MLCT}$ -Zustand durch Elektronentransfer auf das Anthrachinon **T** zurückzuführen.⁶⁴ Bei gestrecktem Linker und in unpolaren Lösungsmitteln nimmt die Löschungseffizienz ab.^{65, 66}

Tabelle 2 Emissionsmaxima der Komplexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$, **13**, **15**, **17** und **19 - 26** und in Klammern das Intensitätsverhältnis bezogen auf Komplex **13** (20 μM , Wasser, pH 7, $\lambda_{\text{ex}} = 468 \text{ nm}$, PMT 600 V).

Komplex	Emissionsmaximum [nm] (Intensitätsverhältnis Komplex/ 13)	
$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$	608	(25,8)
13	638	(1,0)
15	649	(0,5)
17	632	(6,9)
19	632	(4,1)
20	658	(0,2)
21	639	(1,7)
22	654	(0,1)
23	633	(1,1)
24	643	(1,8)
25	634	(2,9)
26	633	(0,7)

Dies konnte auch bei den in Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Rutheniumkomplexen beobachtet werden. Die Komplexe mit sterisch anspruchsvollen Resten (**17**, **19**, **21**, **23**, **24** und **25**) haben einerseits eine höhere Emissionsintensität als **13**, da diese die Annäherung der Anthrachinoneinheit verhindern. Kleine Reste (**15**) oder Reste (**20**, **22** und **26**), die durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen auch weitere Anthrachinoneinheiten benachbarter Komplexe in die Nähe des Komplexzentrums bringen, führen andererseits zu geringeren Emissionsintensitäten als **13**. Abbildung 25 zeigt beispielhaft die Fluoreszenzspektren der stark emittierenden Komplexen **19** und **25** und der schwach emittierenden Komplexen **15** und **20** im Vergleich zu **13**. Abbildung 26 zeigt zusätzlich die beobachtbare Blauverschiebung und Intensitätsverstärkung beim Übergang zu unpolaren Lösungsmitteln am Beispiel der Komplexe **22** und **25**. Beispielsweise steigt die Emissionsintensität für **22** in Dichlormethan um 40 % verglichen mit Wasser.⁶⁶ Die zusätzlich zu beobachtende Blauverschiebung ist typisch für Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexe. Estradiolfunktionalisierte Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexe besitzen beispielsweise ein Emissionsmaximum bei 615 nm bis 622 nm in wässriger Lösung verglichen mit 603 nm bis 609 nm in Dichlormethan.⁴⁶

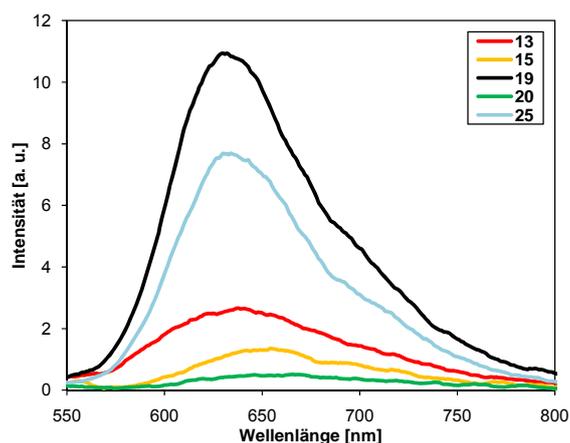


Abbildung 25 Fluoreszenzspektren von 13 (rot), 15 (gelb), 19 (schwarz), 20 (grün) und 25 (hellblau); (20 μ M, Wasser, pH 7, 25 $^{\circ}$ C, λ_{ex} = 468 nm, PMT 600 V).

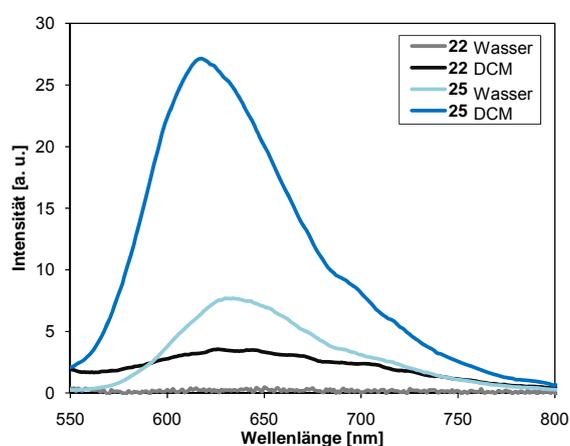


Abbildung 26 Fluoreszenzspektren von 22 in Wasser (grau) und in Dichlormethan (schwarz, DCM) und 25 in Wasser (hellblau) und in Dichlormethan (blau, DCM); (20 μ M, pH 7, 25 $^{\circ}$ C, λ_{ex} = 468 nm, PMT 600 V).

3.1.2.3 pH-Titrationen

Die Komplexe **20**, **21**, **23**, **24** und **26** tragen funktionelle Gruppen, die im Bereich des physiologisch interessanten pH-Werts (5 - 8) protoniert oder deprotoniert vorliegen können. Dadurch ist eine Beeinflussung der spektroskopischen Eigenschaften zu erwarten.

Es wurden Komplexlösungen in der Konzentration von 5 μ M hergestellt und mittels Salzsäure bzw. Natronlauge auf die entsprechenden pH-Werte eingestellt, wobei Verdünnungseffekte aufgrund der geringen Zugabemenge vernachlässigt werden können.

Die Komplexe **20** und **21** enthalten beide eine Hydroxyfunktion. Die Titration soll daher beispielhaft an **20** beschrieben werden. Im UV/Vis-Spektrum konnte dabei kaum eine Änderung der Absorption bei verschiedenen pH-Werten beobachtet werden. Hingegen zeigt

Abbildung 28 (links) eine Änderung der Fluoreszenzintensität des Komplexes **20** mit dem pH-Wert. Für $\text{pH} > 5$ bleibt die Fluoreszenzintensität konstant. Eine Deprotonierung der Hydroxygruppe findet erst bei wesentlich höheren pH-Werten statt. Vergleichsweise liegt der pK_s -Wert für die Deprotonierung von 4-Hydroxymethylpyridin bei 13,86.⁶⁷ Mit abnehmendem pH-Wert ($\text{pH} < 5$) sinkt die Fluoreszenzintensität. Dies könnte damit erklärt werden, dass die Hydroxygruppe protoniert wird. Der pK_s -Wert für die Protonierung beispielsweise von Benzylalkohol liegt bei -0,53.⁶⁸ Somit kann nicht schon ab $\text{pH} < 5$ eine Protonierung der Hydroxygruppen eintreten und das starke Absinken der Fluoreszenzintensität nicht erklärt werden. Die pH-Titration mit dem Grundkomplex **13** lieferte ein qualitativ ähnliches Ergebnis. Im UV/Vis-Spektrum ist während der Titration kaum eine Änderung der Absorption zu sehen, wohingegen die Fluoreszenzintensität auch hier mit sinkendem pH-Wert ($\text{pH} < 5$) abnimmt (Abbildung 28, rechts). Da die pH-Titration des Anthrachinonderivats **T** keine dementsprechende Änderung des Fluoreszenzspektrums zeigt, kann somit die Protonierung nur an der Amidfunktion stattfinden, die das Bipyridin mit dem Anthrachinon **T** verknüpft.

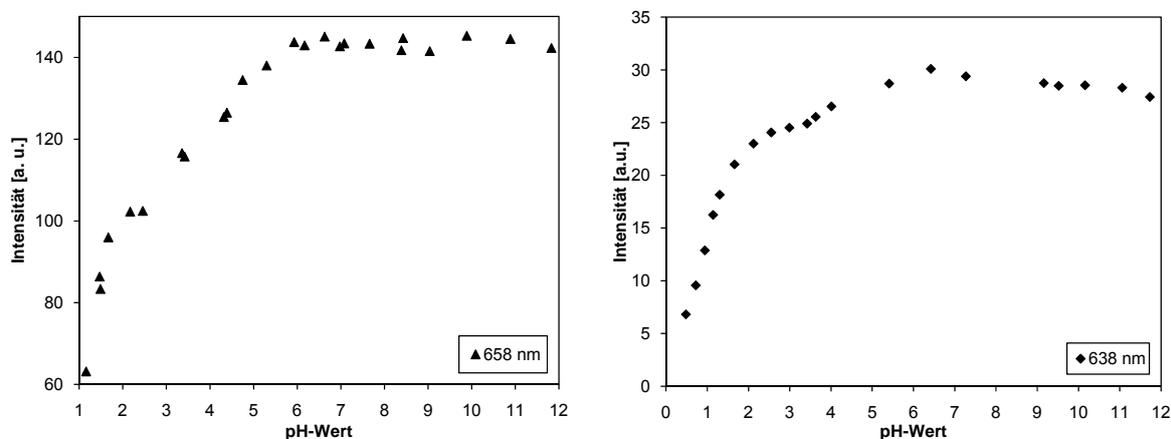


Abbildung 27 Fluoreszenzintensitätsänderung der Komplexe **20** (links) und **13** (rechts) in Abhängigkeit des pH-Werts jeweils am entsprechenden Emissionsmaximum (658 nm bzw. 638 nm); (5 μM , Wasser, 25 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 468 \text{ nm}$, PMT 900 V (**20**) bzw. PMT 800 V (**13**), pH-Wert eingestellt durch Zugabe von Äquivalenten Salzsäure bzw. Natronlauge).

*Carvalho et al.*⁶⁹ erklären das Absinken der Fluoreszenz von $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{mbpy-NMe})]^{2+}$ (mbpy-NMe = 4-*N*-Methylcarboxamido-4'-methyl-2,2'-bipyridin) für $\text{pH} < 5$ dadurch, dass der Stickstoff in der Amidbindung protoniert wird.

*Alsfasser et al.*⁷⁰ beobachteten ebenfalls einen Fluoreszenzrückgang bei sinkendem pH-Wert für den Komplex $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{mbpy-NEt}_2)]^{2+}$ (mbpy-NEt₂ = 4-*N,N*-Diethylcarboxamido-4'-methyl-2,2'-bipyridin). Dies wird durch Protonierung des Sauerstoffatoms der Amidfunktion erklärt.

Protonierte Carbonsäureamide besitzen im Grundzustand einen pK_s -Wert von ca. -1 und sind bevorzugt am Sauerstoffatom protoniert.⁷¹ Beispielsweise beträgt der pK_s -Wert für protoniertes Benzylamid in Wasser -1,14.⁷² Im angeregten Zustand des Rutheniumkomplexes wird negative Ladung durch MLCT auf den Liganden übertragen. Dadurch wird die Basizität der Amidfunktion erhöht und die Protonierung erleichtert.⁷³ Protonierung funktioneller Gruppen in Konjugation mit dem Bipyridin führt zu erhöhter strahlungsloser Desaktivierung und somit zu Lumineszenzlöschung.^{69, 73}

Wichtig für die geplante Verwendung der Rutheniumkomplexe als Zellfarbstoffe ist, dass sich die Fluoreszenzintensität im physiologischen pH-Bereich für die Komplexe **13**, **20** und **21** nicht signifikant ändert.

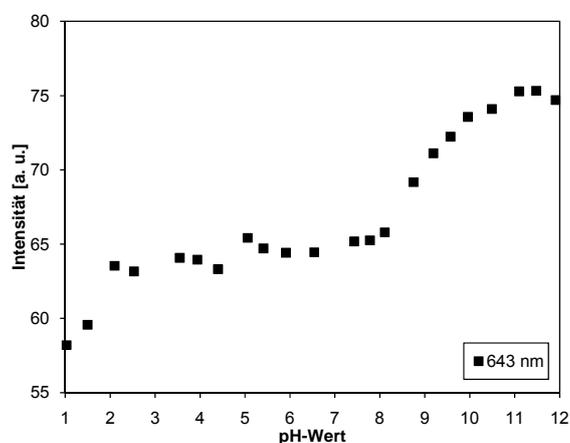


Abbildung 28 Fluoreszenzintensitätsänderung des Komplexes **24** in Abhängigkeit des pH-Werts am entsprechenden Emissionsmaximum (643 nm); (5 μ M, Wasser, 25 °C, λ_{ex} = 468 nm, PMT 800 V, pH-Wert eingestellt durch Zugabe von Äquivalenten Salzsäure bzw. Natronlauge).

Die tertiären Aminfunktionen der Komplexe **23** und **24** könnten mit abnehmenden pH-Wert protoniert werden. Für die strukturell ähnlichen Verbindungen 1,4-Dimethylpiperazin und *N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin betragen die pK_s -Werte für die erste Protonierungsstufe 8,38 - 8,49⁷⁴ bzw. 9,14⁷⁵ in Wasser bei 25 °C. Entsprechend ist zu erwarten, dass die Amine der Komplexe **23** und **24** für pH < 8 protoniert sind. In Abbildung 28 ist beispielhaft die pH-Titration von Verbindung **24** gezeigt. Im UV/Vis-Spektrum ist kaum ein Einfluss des pH-Werts auf die Absorption zu sehen. Hingegen hat der pH-Wert einen starken Einfluss auf die Fluoreszenzintensität von **24**. Wie man in Abbildung 28 sieht, weist die Titrationskurve zwei Wendepunkte auf. Im Alkalischen (pH > 11) liegen die tertiären Amine vollständig deprotoniert vor und der Komplex weist die größte Emissionsintensität auf. Bei Erniedrigung des pH-Werts sinkt die Fluoreszenzintensität ab, bis diese bei pH < 8 ein Plateau erreicht. Der Wendepunkt liegt bei pH \approx 9. Dies stimmt gut mit dem pK_s -Wert für die erste

Protonierungsstufe von *N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin überein.⁷⁵ Dieses Verhalten wurde auch für andere an Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-Komplexe gebundene tertiäre Amine beschrieben.⁷⁶ Erst bei sehr niedrigen pH-Werten ($\text{pH} < 2$) sinkt die Emissionsintensität weiter. Dieses Absinken könnte durch die oben erwähnte Protonierung der Amidfunktion verursacht werden.

Die Komplexe **23** und **24** sind im physiologischen pH-Bereich ($\text{pH} = 5 - 8$) vierfach protoniert und weisen eine Gesamtladung von +6 auf.

Der Komplex **26** enthält vier Carbonsäurefunktionen, die gleichzeitig oder unabhängig voneinander deprotoniert sein können. Die Absorptionsintensität im Absorptionsspektrum nimmt mit steigendem pH-Wert zu (Abbildung 29, links). Es sind isobestische Punkte bei 320 nm, 360 nm, 415 nm und 498 nm vorhanden. Bei Erhöhung des pH-Werts erfahren die Maxima eine Verschiebung um 10 nm zu niedrigeren Wellenlängen (312 nm \rightarrow 302 nm bzw. 482 nm \rightarrow 472 nm). Ab $\text{pH} > 5$ bleibt das Absorptionsspektrum konstant. Wird die Änderung der Absorption gegen den pH-Wert aufgetragen, wird erkenntlich, dass der Wendepunkt bei $\text{pH} \approx 3,75$ liegt (Abbildung 30, schwarz). Mit steigendem pH-Wert werden die Carbonsäurefunktionen deprotoniert und **26** liegt bei $\text{pH} > 4$ als zweifach negativ geladener Komplex vor. Ob alle Carbonsäuregruppen den gleichen pK_s -Wert aufweisen, lässt sich nicht eindeutig feststellen. *Nicolaou et al.*⁷⁷ nehmen für den Komplex $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy})]^{2+}$ (dcbpy = 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bipyridin) zwar an, dass beide Carbonsäuregruppen unabhängig voneinander protoniert werden. Da im Absorptionsspektrum nur ein Wendepunkt bei $\text{pH} 2,75$ zu sehen ist, haben sie daraus geschlossen, dass die pK_s -Werte der beiden Carbonsäuregruppen im Grundzustand relativ ähnlich sind.

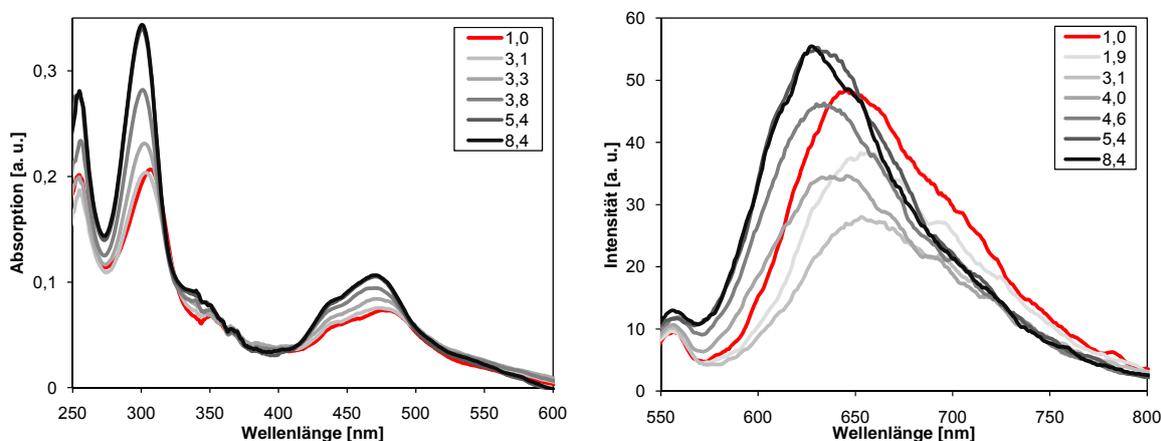


Abbildung 29 Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) von Komplex **26** in Abhängigkeit des pH-Werts (5 μM , Wasser, 25 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 468 \text{ nm}$, PMT 800 V, pH-Wert eingestellt durch Zugabe von Äquivalenten Salzsäure bzw. Natronlauge).

Das Fluoreszenzspektrum von **26** zeigt bei Änderung des pH-Werts ein anderes Verhalten als das entsprechende Absorptionsspektrum (Abbildung 29, rechts). Es bleibt von pH 12 bis 5 konstant, sinkt in seiner Intensität ab pH < 5 und steigt ab dem Emissionsminimum bei pH \approx 3 erneut an. Gleichzeitig verschiebt sich das Emissionsmaximum von 633 nm (pH > 5) über 650 nm (pH \approx 3) nach 643 nm (pH \approx 1). Dieses Verhalten wurde von *Park et al.*⁷⁸ für den Komplex $[\text{Ru}(\text{dcbpy})_3]^{2+}$ (dcbpy = 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bipyridin) beobachtet und wie folgt begründet. Im angeregten Zustand liegen bei pH < 3 alle Carbonsäuregruppen protoniert vor und der Komplex weist eine Gesamtladung von +2 auf. Bei pH \approx 3 ist der Komplex neutral geladen, da nur zwei Carbonsäuregruppen deprotoniert sind. Sobald der pH-Wert größer als drei wird, werden auch die restlichen Carbonsäuregruppen deprotoniert und ab pH > 5 liegt der Komplex vierfach negativ geladen vor. Daraus lässt sich analog für Komplex **26** schließen, dass ab pH < 3 alle vier Carbonsäuregruppen im angeregten Zustand protoniert sind und der Komplex eine Gesamtladung von +2 hat. Bei pH 3 ist er neutral geladen mit zwei deprotonierten Carbonsäuregruppen. Ab pH > 4 sind alle vier Carbonsäuregruppen deprotoniert und der Komplex **26** hat eine zweifach negative Gesamtladung.

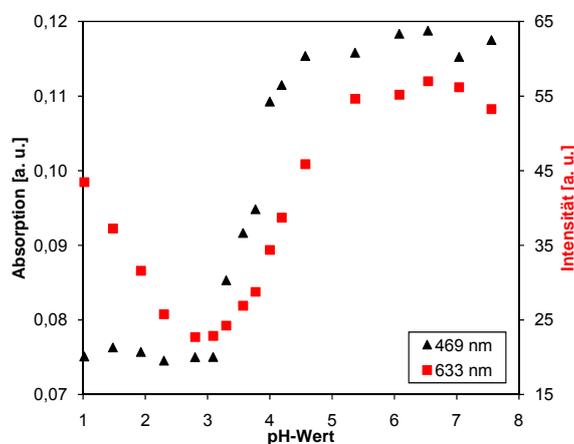


Abbildung 30 Absorptions- (schwarz) und Fluoreszenzintensitätsänderung (rot) des Komplexes **26** in Abhängigkeit des pH-Werts jeweils am Absorptions- bzw. Emissionsmaximum (469 nm bzw. 633 nm); (5 μM , Wasser, 25 $^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 468 \text{ nm}$, PMT 800 V, pH-Wert eingestellt durch Zugabe von Äquivalenten Salzsäure bzw. Natronlauge).

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass die Komplexe **13**, **15**, **17**, **19**, **20**, **21**, **22** und **25** im physiologisch relevanten pH-Bereich (5 - 8) weder protoniert noch deprotoniert vorliegen und somit insgesamt eine zweifach positive Ladung tragen. Die Komplexe **23** und **24** liegen hingegen in diesem pH-Bereich vierfach protoniert mit einer Gesamtladung von +6 vor. Komplex **26** indessen ist vierfach deprotoniert und weist eine Gesamtladung von -2 auf.

3.1.3 Wechselwirkung der Komplexe mit Polynukleotiden

Die Wechselwirkung von **13** und seiner Derivate mit ssRNA (aus Torulahefe) bzw. dsDNA (aus Lachstestis) wurde im Vergleich zu $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ und dem Anthrachinonderivat **T** untersucht. Dabei konnte ein Einfluss der Funktionalisierung der Bipyridine auf die Wechselwirkung mit Polynukleotiden nachgewiesen werden. Durch die positiven Ladungen der Komplexe können diese elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Polynukleotide eingehen. Der zweifach negativ geladene Komplex **26** bildet hierbei eine Ausnahme. Zusätzlich besteht die Möglichkeit der Interkalation der Anthrachinoneinheit **T** in die Doppelstrangstrukturen der DNA, da diese Einheit strukturell ähnlich der zellgängigen und DNA interkalierenden Anthrachinonderivaten Mitoxantron⁷⁹ und DRAQ5⁸⁰ ist.

Komplexlösungen in einer Konzentration von 20 μM (10 mM MOPS, pH 7, 50 mM Natriumchloridlösung) wurden hergestellt und ein Startemissionsspektrum aufgenommen. Anschließend wurden diese Lösungen mit Äquivalenten von RNA (10 μM bezogen auf Nukleotid, Wasser) bzw. DNA (10 μM bezogen auf Nukleotid, Wasser) versetzt und nach jeder Zugabe jeweils ein Emissionsspektrum aufgenommen. Um Verdünnungseffekte auszuschließen, wurden auch jeweils entsprechende Volumenäquivalente Wasser zu einer weiteren Komplexlösung hinzugefügt und nach jeder Zugabe ein Referenzemissionsspektrum aufgenommen. Die prozentuale Änderung der Fluoreszenz durch Verdünnung wurde mit der prozentualen Fluoreszenzänderung durch Zugabe von Polynukleotiden verrechnet. Da **23** und **24** bei Zugabe von 1 eq DNA aus der Lösung ausfielen, wurden diese Komplexe in einer Konzentration von 5 μM verwendet.

Die Startfluoreszenzintensitäten (Fluoreszenz ohne Polynukleotid) der Emissionsspektren der Komplexe am jeweiligen Emissionsmaximum sind in Tabelle 3 verzeichnet. In den Abbildung 31 und Abbildung 32 ist die Fluoreszenzintensitätszunahme in Prozent der Startfluoreszenzintensität des jeweiligen Komplexes bei Zugabe von Polynukleotiden gegen die Polynukleotidäquivalente aufgetragen.

Es ist bekannt, dass $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ durch die zweifach positive Ladung mit Polynukleotiden elektrostatische Wechselwirkungen eingehen kann.^{81, 82} Da die Bipyridine aufgrund der 3-3'-H-Wechselwirkung nicht vollkommen planar sind, kann keine Interkalation mit diesen in die dsDNA erfolgen.⁸² Die elektrostatische Wechselwirkung der Rutheniumkomplexe an Polynukleotiden führt zu einem geringen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Die verwendete RNA liegt hauptsächlich als Einzelstrang vor, so dass kaum Interkalation möglich ist.

Tabelle 3 Startfluoreszenzintensitäten der dargestellten Rutheniumkomplexe (20 μM , 10 mM MOPS, pH 7, 50 mM Natriumchloridlösung, 25 $^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 468 \text{ nm}$, PMT 800 V) am jeweiligen Emissionsmaximum:
 [Ru(bpy)₃]Cl₂ ($\lambda_{\text{em}} = 608 \text{ nm}$), 13 ($\lambda_{\text{em}} = 638 \text{ nm}$), 15 ($\lambda_{\text{em}} = 649 \text{ nm}$), 17 ($\lambda_{\text{em}} = 632 \text{ nm}$), 19 ($\lambda_{\text{em}} = 632 \text{ nm}$), 20 ($\lambda_{\text{em}} = 658 \text{ nm}$), 21 ($\lambda_{\text{em}} = 639 \text{ nm}$), 22 ($\lambda_{\text{em}} = 654 \text{ nm}$), 23 ($\lambda_{\text{em}} = 633 \text{ nm}$), 24 ($\lambda_{\text{em}} = 643 \text{ nm}$), 25 ($\lambda_{\text{em}} = 634 \text{ nm}$), 26 ($\lambda_{\text{em}} = 633 \text{ nm}$) und T ($\lambda_{\text{ex}} = 515 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 650 \text{ nm}$).

Komplex	Startfluoreszenzintensität [a. u.]	Komplex	Startfluoreszenzintensität [a. u.]
[Ru(bpy) ₃]Cl ₂	108	23	58
13	40	23 (5 μM)	23
15	43	24	90
17	487	24 (5 μM)	42
19	232	25	78
20	9	26	39
21	134	T	9
22	64		

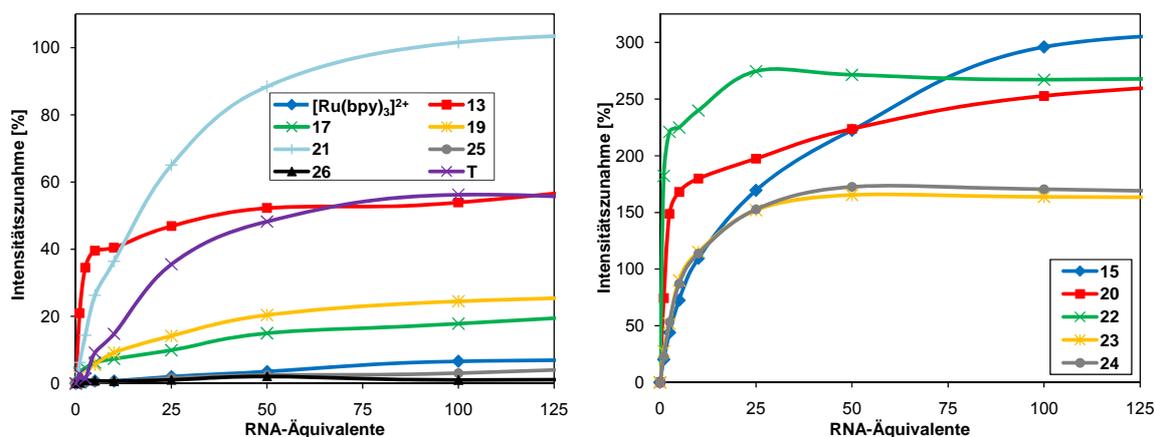


Abbildung 31 Prozentuale Intensitätszunahme der Startfluoreszenz der Rutheniumkomplexe bei Zugabe von RNA-Lösung (Torulahefe, 10 μM bezogen auf Nukleotid, Wasser) gemessen am jeweiligen MLCT-Übergang (20 μM Komplexlösung, 10 mM MOPS, pH 7, 50 mM Natriumchloridlösung, 25 $^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 468 \text{ nm}$, PMT 800 V).

links: [Ru(bpy)₃]Cl₂ (blau, $\lambda_{\text{em}} = 608 \text{ nm}$), 13 (rot, $\lambda_{\text{em}} = 638 \text{ nm}$), 17 (grün, $\lambda_{\text{em}} = 632 \text{ nm}$), 19 (gelb, $\lambda_{\text{em}} = 632 \text{ nm}$), 21 (hellblau, $\lambda_{\text{em}} = 639 \text{ nm}$), 25 (grau, $\lambda_{\text{em}} = 634 \text{ nm}$), 26 (schwarz, $\lambda_{\text{em}} = 633 \text{ nm}$) und T (lila, $\lambda_{\text{ex}} = 515 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 650 \text{ nm}$).

rechts: 15 (blau, $\lambda_{\text{em}} = 649 \text{ nm}$), 20 (rot, $\lambda_{\text{em}} = 658 \text{ nm}$), 22 (grün, $\lambda_{\text{em}} = 654 \text{ nm}$), 23 (gelb, $\lambda_{\text{em}} = 633 \text{ nm}$) und 24 (grau, $\lambda_{\text{em}} = 643 \text{ nm}$).

Abbildung 31 zeigt, dass [Ru(bpy)₃]²⁺ bei steigender RNA-Menge einen sehr geringen Fluoreszenzanstieg (um 4 %) aufweist. Durch die Bindung der Rutheniumkomplexe an RNA reduzieren sich die Freiheitsgrade der Fluoreszenzlöschung, so dass mit steigender RNA-Menge ein Fluoreszenzanstieg zu beobachten ist.⁸³ Auch der negativ geladene Komplex 26

und der unpolare Komplex **25** wechselwirken schwach mit RNA (Fluoreszenzanstieg um 2 % bzw. 3 %). Das Transportmolekül **T** und **13** können sich mittels der Anthrachinoneinheit in die Sekundärstruktur der RNA einlagern und zeigen einen mäßigen Fluoreszenzanstieg (um 48 % bzw. 47 %). Bei Zugabe von RNA zu **17** und **19** ist ein geringerer Anstieg (18 % bzw. 25 %) als für **13** zu beobachten. Dies könnte an sterischer Wechselwirkung der Ethylgruppen mit dem RNA-Rückgrat liegen. Die Ethoxyethanolreste in **21** unterstützen die Wechselwirkung mit der RNA zusätzlich, so dass ein hoher Fluoreszenzanstieg (102 %) zu beobachten ist. Die Komplexe **23** und **24** sind sechsfach positiv geladen (siehe 3.1.2.3) und zeigen somit eine stärkere elektrostatische Anziehung zur negativ geladenen RNA. Dies äußert sich in einem Anstieg der Startfluoreszenz bei RNA-Zugabe um 165 % bzw. 175 %. Durch Wasserstoffbrückenbindungen, die **15**, **20** und **22** unter anderem mit dem Phosphatrückgrat der RNA eingehen können, sind diese fester an RNA gebunden. Somit zeigen **20** (252 %), **22** (270 %) und **15** (296 %) bei Zugabe von RNA die stärksten Fluoreszenzanstiege.

Tabelle 4 Anfangssteigung (m_A) und Halbsättigung ($S_{1/2}$) der dargestellten Rutheniumkomplexe bei Zugabe von RNA- bzw. DNA-Lösung (eq bezogen auf Nukleotid).

Komplex	RNA		DNA	
	m_A [ΔI /eq]	$S_{1/2}$ [eq]	m_A [ΔI /eq]	$S_{1/2}$ [eq]
[Ru(bpy) ₃]Cl ₂	0,3	21	4	8,2
13	33	1,1	14	6,4
15	20	20	44	8,0
17	4,2	20	40	5,4
19	2,3	19	5,6	7,7
20	80	1,9	74	4,7
21	6,3	15	218	3,0
22	216	0,6	136	2,7
23	28	4,2	29	4,3
24	23	4,7	22	6,5
25	0,8	29	0,8	15,9
26	0,4	13	1,3	6,5
T	2,9	16	5,6	4,0

Betrachtet man die Anfangssteigungen der Kurven in Abbildung 31, so wird deutlich, dass **22** mit Abstand die größte Änderung der Fluoreszenzintensität pro Äquivalent Nukleotid

aufweist (Tabelle 4). Das bedeutet, dass **22** aufgrund des hohen Fluoreszenzanstiegs bei Zugabe von RNA eine sehr große Affinität zu RNA besitzt. Zudem ist bereits nach 0,6 eq Nukleotid die halbe Sättigung der Komplexlösung erreicht (Tabelle 4). Komplex **20** besitzt die zweithöchste Affinität zu RNA mit einer Halbsättigungsrate von 1,9 eq Nukleotid. Die sechsfach positiv geladenen Komplexe **23** und **24** und die gut interkalierenden Komplexe **13** und **15** besitzen eine gute Affinität zu RNA. Wobei auffällig ist, dass **15** trotz der guten Affinität zu RNA 20 eq Nukleotid benötigt, um die Hälfte der Endfluoreszenz zu erreichen.

Abbildung 32 zeigt die entsprechenden Titrations der synthetisierten Rutheniumkomplexe mit DNA. Vergleicht man die für RNA (Abbildung 31) und DNA (Abbildung 32) erhaltenen Graphen miteinander, so wird ersichtlich, dass alle Komplexe einen stärkeren Fluoreszenzanstieg bei Wechselwirkung mit DNA als mit RNA zeigen. Dies ist darin begründet, dass die Doppelhelix der DNA eine Interkalation der Anthrachinoneinheit erleichtert und somit die Fluoreszenzlöschung reduziert wird.

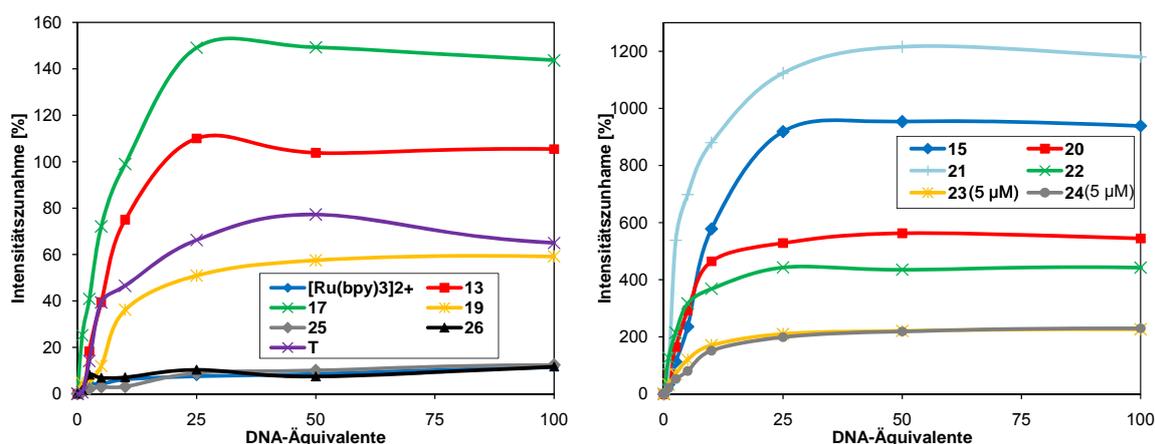


Abbildung 32 Prozentuale Intensitätszunahme der Startfluoreszenz der Rutheniumkomplexe bei Zugabe von DNA-Lösung (Lachstestis, 10 μM bezogen auf Nukleotid, Wasser) gemessen am jeweiligen MLCT-Übergang (20 μM Komplexlösung, 10 mM MOPS, pH 7, 50 mM Natriumchloridlösung, 25 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 468 \text{ nm}$, PMT 800 V).

links: $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ (blau, $\lambda_{\text{em}} = 608 \text{ nm}$), **13** (rot, $\lambda_{\text{em}} = 638 \text{ nm}$), **17** (grün, $\lambda_{\text{em}} = 632 \text{ nm}$), **19** (gelb, $\lambda_{\text{em}} = 632 \text{ nm}$), **25** (grau, $\lambda_{\text{em}} = 634 \text{ nm}$), **26** (schwarz, $\lambda_{\text{em}} = 633 \text{ nm}$) und **T** (lila, $\lambda_{\text{ex}} = 515 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 650 \text{ nm}$).

rechts: **15** (blau, $\lambda_{\text{em}} = 649 \text{ nm}$), **20** (rot, $\lambda_{\text{em}} = 658 \text{ nm}$), **21** (hellblau, $\lambda_{\text{em}} = 639 \text{ nm}$), **22** (grün, $\lambda_{\text{em}} = 654 \text{ nm}$), **23** (gelb, $\lambda_{\text{em}} = 633 \text{ nm}$, 5 μM) und **24** (grau, $\lambda_{\text{em}} = 643 \text{ nm}$, 5 μM).

Die Komplexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, **25** und **26** weisen bei Wechselwirkung mit DNA nur einen Fluoreszenzanstieg um je ca. 10 % auf. Dies liegt einerseits daran, dass $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ nur elektrostatische Wechselwirkungen eingehen kann. Andererseits wird bei **25** und **26** die Interkalation der Anthrachinoneinheit in dsDNA durch große unpolare Seitenketten (**25**) bzw. negativ geladene Carboxylgruppen (**26**) gehindert. Die geringe Affinität der Komplexe

$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, **25** und **26** zeigt sich auch in der niedrigeren Anfangssteigung (4 $\Delta\text{I}/\text{eq}$, 0,8 $\Delta\text{I}/\text{eq}$ bzw. 1,3 $\Delta\text{I}/\text{eq}$, Tabelle 4). Weiterhin benötigen diese Komplexe die größte Menge an Nukleotiden, um Halbsättigung zu erreichen. **19** kann sich auf Grund der Diethylamidgruppen nicht vollständig an die DNA anlagern (Fluoreszenzanstieg um 58 %). Das Anthrachinonderivat **T** und der entsprechende Komplex **13** interkalieren beide in die DNA, so dass die Löscheffizienz des Anthrachinons reduziert wird und ein Intensitätsanstieg der Startfluoreszenz um 65 % bzw. 105 % zu beobachten ist.⁶⁵ **T**, **13** und **19** besitzen höhere Anfangssteigungen als $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$. Komplex **17** zeigt einen Fluoreszenzanstieg um 149 %. Die Komplexe **23** und **24** sind sechsfach positiv geladen und bilden in einer Konzentration von 20 μM mit DNA ein Addukt, das aus der Lösung ausfällt. Die Titrationsexperimente wurden daher in einer Konzentration von 5 μM durchgeführt. Es zeigte sich eine Fluoreszenzsteigerung um ca. 220 %. Ihre Anfangssteigung und Halbsättigung unterscheiden sich kaum von den Werten für RNA. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Wechselwirkung von **23** bzw. **24** mit Polynukleotiden hauptsächlich elektrostatischer Natur ist. Die Komplexe **22**, **20** und **15** weisen einen starken Fluoreszenzanstieg auf (443 %, 545 % bzw. 954 %). Dies könnte an der möglichen Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Phosphatrückrat und den funktionellen Gruppen der Bipyridine liegen, wodurch die Anlagerung an die DNA verstärkt wird. Interessanterweise zeigt **21** den stärksten Fluoreszenzanstieg (1215 %). Dieser Anstieg könnte darin begründet sein, dass die Ethoxyethanoleinheiten durch ihre höhere Flexibilität und polare Kette in der Lage sind, mit Bestandteilen der DNA Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Wechselwirkungen einzugehen. **21** zeigt auch die höchste Affinität zu DNA. Dies ist durch eine große Anfangssteigung charakterisiert. **22** zeigt die zweithöchste Affinität. Beide Komplexe benötigen die geringste Nukleotidmenge (**21** 3,0 $\Delta\text{I}/\text{eq}$, **22** 2,5 $\Delta\text{I}/\text{eq}$), um die Hälfte des Endfluoreszenzanstiegs zu generieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle Komplexe einen größeren Fluoreszenzanstieg bei Wechselwirkung mit DNA als im Gegensatz mit RNA zeigen. Dies ist auf die Möglichkeit von Interkalation durch das Anthrachinonderivat **T** in die Doppelstrangstruktur der DNA zurückzuführen. Den ausgeprägtesten Unterschied im Fluoreszenzanstieg bei Wechselwirkung mit DNA gegenüber Wechselwirkung mit RNA besitzt **21**. Er besitzt im Vergleich mit den anderen getesteten Komplexen die höchste Affinität zu DNA und ist somit ein vielversprechender Kandidat für die *in vitro* Detektion von DNA. Komplex **22** besitzt für RNA die höchste und für DNA die zweithöchste Affinität. Eine alternative Form der

Wechselwirkung zeigen die Komplexe **23** und **24**, die mit Polynukleotiden starke elektrostatische Wechselwirkungen eingehen.

3.1.4 Zellexperimente

3.1.4.1 Lipophilie

Die Lipophilie einer Verbindung ist definiert als $\log P_{ow}$, wobei P_{ow} das Verhältnis der Gleichgewichtskonzentration der Verbindung in Octanol bzw. Wasser ist (Abbildung 33).^{3, 48, 84} Die Lipophilie wird auch als Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient bezeichnet. Für $\log P_{ow} > 0$ ist die Verbindung lipophil, bei $\log P_{ow} < 0$ ist die Verbindung hydrophil.

Lipophile Verbindungen werden von Zellen leichter aufgenommen als hydrophile.^{40, 85}

$$\log P_{ow} = \log (C_{Octanol}/C_{Wasser})$$

Abbildung 33 Formel zur Lipophiliebestimmung (C ist die Gleichgewichtskonzentration der Verbindung in Octanol bzw. Wasser).

Die Lipophilie der Komplexe wurde über die sogenannte „Shake-Flask“-Methode ermittelt (siehe 5.1.4.3).^{3, 84} Dazu wurden die Komplexe in Wasser gelöst, mit der gleichen Volumenmenge an Octanol überschichtet und mehrmals invertiert. Nach Trennung der Phasen wurde die Konzentration der Komplexe in den jeweiligen Phasen über UV/Vis-Spektroskopie bestimmt. Es wurden je drei Bestimmungen durchgeführt und daraus die Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt. In Tabelle 5 sind die $\log P_{ow}$ -Werte der synthetisierten Komplexe und **[Ru(bpy)₃]Cl₂** sortiert nach steigender Lipophilie angegeben.

[Ru(bpy)₃]Cl₂ hat im Vergleich mit den synthetisierten Rutheniumkomplexen den kleinsten $\log P_{ow}$ -Wert und ist damit am hydrophilsten. Die Anknüpfung des Anthrachinonderivats **T** erhöht die Lipophilie z. B. im Falle für **13** um ca. 0,9 Einheiten. Kurze Alkylketten erhöhen diese zusätzlich (**19**, **15** und **17**). Der negativ geladene Komplex **26**, die sechsfach positiv geladenen Komplexe **23** und **24** sowie die Komplexe **20** und **21**, die untereinander Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können, sind hydrophiler als **13**. Der hohe $\log P_{ow}$ -Wert von **22** liegt an der Eigenschaft der Aldehydfunktion, mit Octanol Acetale und

Halbacetale bilden zu können. **25** hat als einziger Komplex einen positiven $\log P_{ow}$ -Wert. Er ist durch die Hexylketten lipophil.

Tabelle 5 Mittelwerte der Lipophilie ($\log P_{ow}$) und die Standardabweichungen (σ) der dargestellten Komplexe $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$, **13**, **15**, **17** und **19 - 26**, sortiert nach steigender Lipophilie (jeweils am LC-Übergang bestimmt).

Komplex	$\log P_{ow}$	σ
$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$	-2,191	0,029
26	-2,084	0,008
23	-1,779	0,067
24	-1,540	0,032
21	-1,510	0,030
20	-1,397	0,022
13	-1,317	0,019
19	-0,888	0,021
15	-0,708	0,007
17	-0,333	0,029
22	-0,239	0,049
25	+0,333	0,016

3.1.4.2 Zelluläre Aufnahmegeschwindigkeit

Die Zellaufnahme lumineszierender Rutheniumkomplexe kann mittels verschiedener Methoden untersucht werden (siehe 1.3).⁴³ Besonders geeignet sind Durchflusszytometrie und konfokale Fluoreszenzmikroskopie. Die Durchflusszytometrie eignet sich zur quantitativen Aussage über die Zellaufnahmegeschwindigkeit und zur Studie des Zellaufnahmekonzepts. Die Zellen werden suspendiert und einzeln mit einem Laser bestrahlt. Die Lichtstreuung und Fluoreszenz der Zellen werden aufgenommen. Als Ergebnis erhält man eine Verteilung der Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl und die mittlere Durchschnittsfluoreszenzintensität der Zellpopulation. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass nicht zwischen membrangebundenen und intrazellulären Komplexen unterschieden werden kann. Für die räumliche Verteilung der Komplexe wird die konfokale Fluoreszenzmikroskopie verwendet (siehe 3.1.4.4).

Die Aufnahmegeschwindigkeiten der Komplexe **[Ru(bpy)₃]Cl₂**, **13**, **15**, **17** und **19 - 26** in die humanen adhärenen Zelllinien HeLa (Zervixkarzinom), U373 G (malignes Glioblastom) und LNCaP (Prostatakarzinom) sowie in die humane Suspensionszelllinie HL-60 (akute myeloische Leukämie) wurden untersucht. Dabei wurden die Zellen bei 488 nm angeregt und die Fluoreszenzemission ab Wellenlängen größer 670 nm gemessen. Es wurde ein Schwellenwert von 1000000 festgesetzt, 20000 Ereignisse (Zellen) gemessen und tote Zellen von der Fluoreszenzanalyse ausgeschlossen.

Die adhärenen Zelllinien wurden zu 200000 Zellen pro Vertiefung in einer 24-Mikrotiterplatte passagiert und die Suspensionszellen in einer Konzentration von einer Million Zellen pro Milliliter vorbereitet. Zu den Zellen wurde jeweils eine 20 µM Komplexlösung (in entsprechendem Zellmedium) gegeben und diese anschließend im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) für 0,5 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h bzw. 24 h inkubiert. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden jeweils Doppelbestimmungen jedes Komplexes durchgeführt. Zur Bestimmung der Zellaufnahmegeschwindigkeit wurde der mittlere Fluoreszenzwert von unbehandelten Zellen auf 0 % und der Fluoreszenzwert nach 24 h als Endwert gewählt und auf 100 % festgesetzt. Die Vorgehensweise wurde gewählt, um die Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten auszugleichen.

Abbildung 34 bis Abbildung 37 zeigen die daraus resultierenden Aufnahmekurven, wobei für jede Zelllinie jeweils die relative Fluoreszenzänderung in Prozent gegen die Inkubationsdauer aufgetragen wurde.

Betrachtet man die Anfangsgeschwindigkeit der Kurven aus Abbildung 34, so lässt sich allgemein für die Suspensionszelllinie HL-60 sagen, dass die lipophileren Komplexe ($P_{ow} > -1$) schneller aufgenommen werden als die polareren ($P_{ow} < -1$). Der lipophilste Komplex **25** wird am schnellsten aufgenommen. Als zweites wird der zweitlipophilste Komplex **22** akkumuliert. Erstaunlicherweise wird der sehr polare und zweifach negativ geladene Komplex **26** mit ungefähr der gleichen Anfangsgeschwindigkeit wie die Komplexe **15** und **19** aufgenommen. Der Fluoreszenzanstieg von **26** erreicht allerdings ziemlich bald ein Plateau. Auffälligerweise tritt die Aufnahme der Komplexe **20**, **21** und **[Ru(bpy)₃]²⁺** verzögert ein. Erst nach 3 h Inkubationszeit ist ein starker Fluoreszenzanstieg zu beobachten, der schnell sein Maximum erreicht. Möglicherweise setzt nach 3 h ein zusätzlicher Aufnahme-mechanismus ein, der an den Metabolismus der Zelle gekoppelt ist.

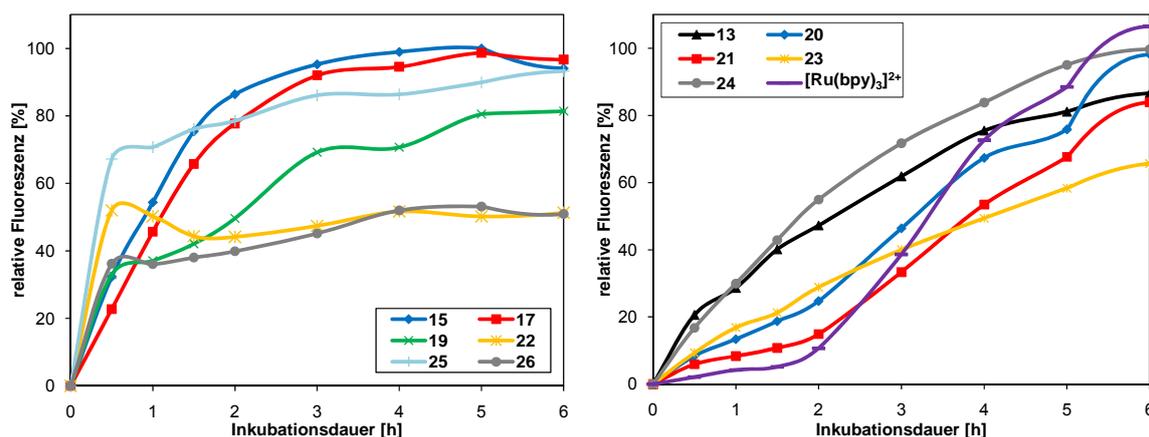


Abbildung 34 Zeitreihe zur Komplexaufnahme durch HL-60-Zellen (relative Fluoreszenzintensität von 20000 Zellen, 20 μM Komplexlösung, 37 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} > 670 \text{ nm}$).
links: 15 (blau), 17 (rot), 19 (grün), 22 (gelb), 25 (hellblau) und 26 (grau).
rechts: 13 (schwarz), 20 (blau), 21 (rot), 23 (gelb), 24 (grau) und $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (lila).

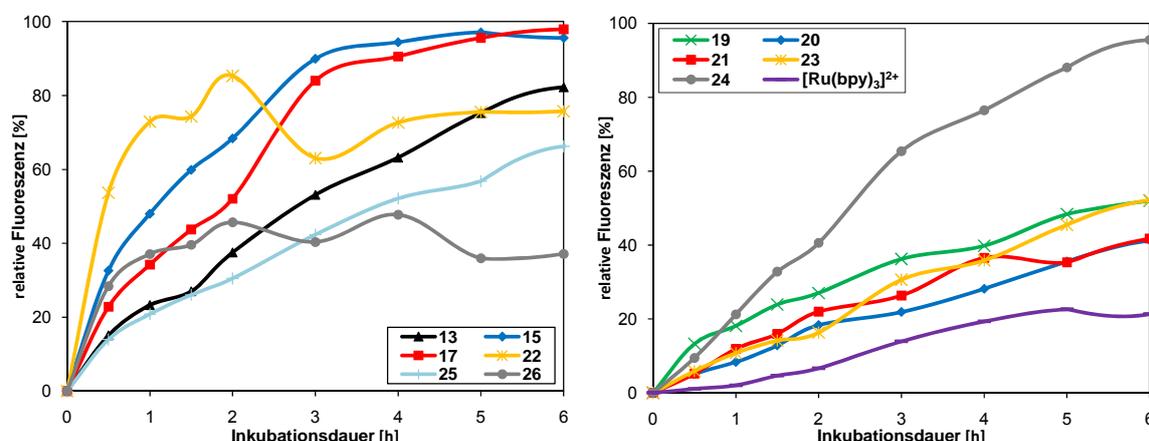


Abbildung 35 Zeitreihe zur Komplexaufnahme durch HeLa-Zellen (relative Fluoreszenzintensität von 20000 Zellen, 20 μM Komplexlösung, 37 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} > 670 \text{ nm}$).
links: 13 (schwarz), 15 (blau), 17 (rot), 22 (gelb), 25 (hellblau) und 26 (grau).
rechts: 19 (grün), 20 (blau), 21 (rot), 23 (gelb), 24 (grau) und $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (lila).

Die adhärenen Zelllinien (Abbildung 35 - Abbildung 37) zeigen einen anderen Aufnahmeverlauf als die Suspensionszelllinie. Bei allen drei Zelllinien zeigt sich auffälliger Weise, dass der lipophilste Komplex **25** nicht am schnellsten aufgenommen wird. Erste Vermutungen, dass dies an der schlechteren Löslichkeit des Komplexes **25** in diesen Zellmedien begründet sein könnte, konnte nicht bestätigt werden. Denn auch eine geringere Komplexkonzentration (5 μM) führte zur gleichen Einordnung. Am schnellsten wird der zweitlipophilste Komplex **22** aufgenommen, gefolgt von den nicht so hydrophilen Komplexen **13**, **15**, **17** und **19**. Es folgen je nach adhärenter Zelllinie in einer leicht veränderten Reihenfolge die Komplexe **20**, **21**, **23** und **24**.

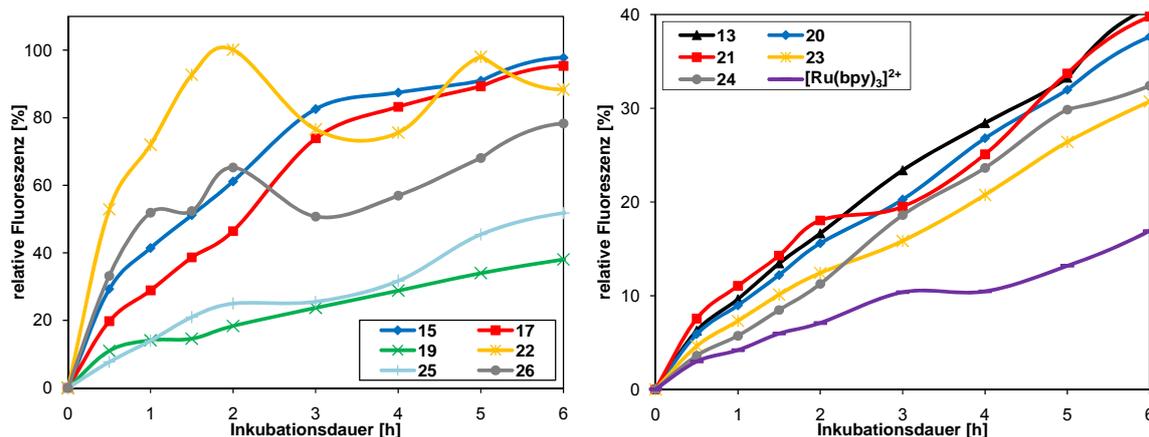


Abbildung 36 Zeitreihe zur Komplexaufnahme durch U373-G-Zellen (relative Fluoreszenzintensität von 20000 Zellen, 20 μM Komplexlösung, 37 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} > 670 \text{ nm}$). links: 15 (blau), 17 (rot), 19 (grün), 22 (gelb), 25 (hellblau) und 26 (grau). rechts: 13 (schwarz), 20 (blau), 21 (rot), 23 (gelb), 24 (grau) und $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (lila).

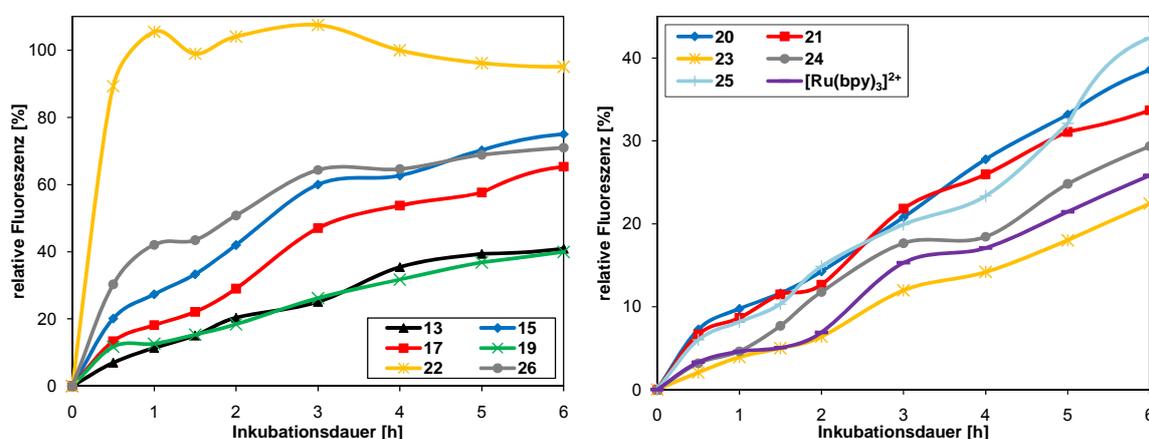


Abbildung 37 Zeitreihe zur Komplexaufnahme durch LNCaP-Zellen (relative Fluoreszenzintensität von 20000 Zellen, 20 μM Komplexlösung, 37 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} > 670 \text{ nm}$). links: 13 (schwarz), 15 (blau), 17 (rot), 19 (grün), 22 (gelb) und 26 (grau). rechts: 20 (blau), 21 (rot), 23 (gelb), 24 (grau), 25 (hellblau) und $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (lila).

Generell wird $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ am langsamsten von den adhären Zellen akkumuliert. Dies verdeutlicht, dass durch Anknüpfung der Chloroanthrachinoneinheit **T** die Zellaufnahme gefördert wird. Der Komplex **26** wird einerseits auch in diesen Zelllinien mit einer erstaunlichen Anfangsgeschwindigkeit aufgenommen, andererseits zeigt sich selbst nach 24 h-Inkubation nur eine schwache Fluoreszenz (z. B. LNCaP, **26**, 24 h: 4954 +/- 253, Kontrolle, 24 h: 2233 +/- 81). Diese Fluoreszenzintensität steigt zwar schnell an, bleibt aber auf einem niedrigen Wert stehen, so dass wahrscheinlich nur kleine Mengen des Komplexes **26** von den Zellen aufgenommen werden. Die Fluoreszenzintensität ist geringer als beispielsweise die von $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (z. B. LNCaP, 24 h: 10212 +/- 185).

In Tabelle 6 sind die relativen Fluoreszenzintensitätsmittelwerte der einzelnen Zelllinien (HL-60, HeLa, U373-G und LNCaP) nach Inkubation mit den Komplexen **13**, **15**, **17**, **19** - **26** bzw. $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (24 h, 37 °C, Doppelbestimmung) notiert, wobei der Wert der Kontrolle (unbehandelte Zellen) auf den Wert eins festgesetzt wurde. Es wird ersichtlich, dass HL-60-Zellen die geringste Fluoreszenzzunahme bei Inkubation mit den Rutheniumkomplexen aufweisen. Die adhärenen Zelllinien HeLa, U373-G und LNCaP besitzen für die meisten Komplexe sehr ähnliche relative Fluoreszenzmittelwerte. Komplex **24** hat die stärkste Fluoreszenzintensität für alle Zelllinien außer HeLa. Dort besitzt **20** die höchste Intensität gefolgt von **17**, **22** und **24**. Auffällig ist, dass **17** eine in etwa doppelt so hohe Fluoreszenzintensität in LNCaP-Zellen wie in HeLa- und U373-G-Zellen aufweist. Durch die höhere Fluoreszenzintensität kann davon ausgegangen werden, dass **17** in größerer Menge von LNCaP-Zellen wie von HL-60, HeLa- und U373-G-Zellen akkumuliert wurde.

Tabelle 6 Relative Fluoreszenzintensitätsmittelwerte der Zelllinien HeLa, U373-G, LNCaP und HL-60 nach 24 h Inkubation mit 20 μM Komplexlösung (**13**, **15**, **17**, **19** - **26** bzw. $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$) bzw. unbehandelter Zellen (Kontrolle). Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Kontrolle wurde auf 1 normiert (20000 Zellen, 20 μM Komplexlösung, Medium, 37 °C, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} > 670 \text{ nm}$).

	HL-60	HeLa	U373-G	LNCaP
13	6,0	10,7	15,0	11,8
15	3,2	5,1	5,1	8,6
17	7,6	14,1	15,4	30,1
19	3,7	7,3	9,1	8,2
20	6,3	17,1	15,7	11,6
21	4,6	6,3	8,8	6,4
22	3,4	14,0	8,1	5,3
23	5,0	6,3	7,9	9,0
24	12,3	14,0	41,4	34,3
25	7,2	11,5	23,9	18,8
26	3,1	2,1	2,0	2,0
$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$	2,1	4,1	3,0	4,4
Kontrolle	1,0	1,0	1,0	1,0

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Komplexe von Suspensionszellen und adhärenen Zelllinien unterschiedlich schnell aufgenommen werden. HL-60-Zellen akkumulieren die lipophileren Komplexe schneller als die hydrophilen. Dahingegen wird Komplex **25** mit der größten Lipophilie von den adhärenen Zelllinien nicht am schnellsten,

sondern eher mit mittlerer Geschwindigkeit aufgenommen. Zudem wird unerwarteterweise Komplex **26** trotz seiner negativen Ladung ziemlich schnell akkumuliert. Betrachtet man die Fluoreszenzintensitätsmittel nach 24 h Inkubationsdauer, so zeigt sich allerdings, dass der Komplex **26** nur in geringen Mengen in den Zellen akkumuliert wird. Die Fluoreszenzintensität für **26** steigt nur um das zwei- bis dreifache der Kontrolle. Nach 1 h ist schon mehr als die Hälfte der Endfluoreszenzintensität (Fluoreszenz nach 24 h) erreicht (z. B. HeLa-Zellen: 1 h 4357 +/- 10, 24 h 4663 +/- 124).

Anhand der höheren Fluoreszenzintensität der Komplexe in den unterschiedlichen Zelllinien kann man schließen, dass die jeweiligen Komplexe von den Zellen unterschiedlich stark akkumuliert werden. Komplex **24** zeigt beispielsweise den höchsten relativen Fluoreszenzintensitätsmittelwert in U373-G-Zellen und wurde somit in größerer Menge als z. B. von HL-60-Zellen internalisiert (**24**: U373-G 41,4; HL-60 12,3).

3.1.4.3 Zellulärer Aufnahmemechanismus

Substanzen, die von Zellen aufgenommen werden, müssen die Zellmembran durchqueren. Dabei existieren verschiedene mögliche Aufnahmemechanismen. Es wird zwischen energieunabhängigem (passive Diffusion und passiver Transport mittels Membrantransportproteinen entlang eines Konzentrationsgefälles) und energieabhängigem Transport (aktiver Transport gegen ein Konzentrationsgefälle und Endozytose) unterschieden (siehe 1.3). Eine Möglichkeit, zwischen energieabhängigem und -unabhängigem Transport zu unterscheiden, ist die Inkubation bei tiefen Temperaturen (4 °C). Dies führt dazu, dass alle energieverbrauchenden Vorgänge unterdrückt werden und nur noch energieunabhängiger Transport stattfinden kann.⁴³ Sinkt die Fluoreszenzintensität der Komplexe bei Inkubation bei tiefen Temperaturen in Vergleich zu 37 °C-Inkubation auf den Wert der Kontrolle (unbehandelte Zellen), so kann davon ausgegangen werden, dass nur energieabhängiger Transport der Komplexe in die Zellen stattfindet. Ist noch erhöhte Fluoreszenz nach Inkubation bei tiefen Temperaturen zu sehen, so ist ein energieunabhängiger Transport am Aufnahmemechanismus beteiligt.

Für die experimentellen Untersuchungen des Aufnahmemechanismus wurden 200000 Zellen pro Vertiefung von adhärennten Zellen bzw. die Suspensionszellen zu 1000000 Zellen pro ml vorbereitet und mit Komplexlösungen der Konzentration 20 µM für 1 h bei 37 °C bzw. bei

4 °C inkubiert. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt und anschließend die Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer gemessen.

Tabelle 7 zeigt die prozentuale Änderung der Fluoreszenzintensität der vier Zelllinien inkubiert mit den synthetisierten Verbindungen bei 4 °C, wobei die Fluoreszenzintensität bei Inkubation bei 37 °C auf 100 % festgesetzt wurde.

Tabelle 7 Prozentuale Änderung der Fluoreszenzintensität der Komplexe **13**, **15**, **17**, **19** - **26** und $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ in den Zelllinien HL-60, HeLa, U373-G und LNCaP bei Inkubation bei 4 °C (20 µM, Medium, 1 h). Fluoreszenzintensität bei 37 °C wurde auf 100 % festgesetzt (- = Abnahme, + = Zunahme).

Komplex	HL-60	HeLa	U373-G	LNCaP
13	- 47	- 36	- 52	- 46
15	- 55	- 60	- 66	- 64
17	- 78	- 75	- 80	- 74
19	- 15	- 22	- 28	- 22
20	- 40	- 42	- 44	- 38
21	- 19	- 25	- 28	- 19
22	+ 16	- 32	- 62	- 52
23	- 23	- 26	- 20	- 32
24	- 65	- 72	- 69	- 61
25	- 15	- 53	- 52	- 67
26	+ 20	- 16	- 22	- 11
$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$	- 13	- 11	- 10	- 18

In Abbildung 38 (links) sind die Fluoreszenzintensitätsmittelwerte von HL-60-Zellen dargestellt. Die meisten Komplexe werden bei 4 °C weniger gut von HL-60-Zellen aufgenommen als bei 37 °C. Die Komplexe **13**, **20**, **21**, **23** und $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ werden überwiegend durch einen aktiven Mechanismus in die Zellen aufgenommen, da deren Fluoreszenzintensität bei 4 °C-Inkubation auf den Wert der Kontrolle absinken. Die Komplexe **15**, **17** und **24** weisen einen hohen Anteil an energieabhängigem Transport in die Zellen auf, der von einem Anteil an energieunabhängigem Transport begleitet wird. Denn die Fluoreszenzintensitäten bei 4 °C-Inkubation sind höher als die Intensität der Kontrolle. Auffällig ist, dass die Komplexe **19** und **25** bei 4 °C nur einen geringen Rückgang der Fluoreszenzintensität (um je 15 %) gegenüber der Inkubation bei 37 °C zeigen, während **22** und **26** sogar einen Fluoreszenzanstieg um 16 % bzw. 20 % zu verzeichnen haben. Daraus lässt sich schließen, dass die Komplexe **19**, **22**, **25** und **26** wahrscheinlich hauptsächlich

mittels passiver Mechanismen in die HL-60-Zellen gelangen. Eine mögliche Erklärung für den Anstieg der Fluoreszenzintensität von **22** und **26** ist, dass hier zusätzlich der energieabhängige Transport aus der Zelle (Efflux) bei 4 °C unterdrückt wird (siehe 1.3).⁴³ Weiterhin könnte die Zunahme der Fluoreszenzintensität von Komplex **22** bei 4 °C-Inkubation darin begründet sein, dass die Aldehydgruppen durch Bindung an Zellproteine reaktiv aminiert werden könnten. *Lo et al.*⁸⁶ verknüpften einen Bisaldehyd-funktionalisierten Iridiumkomplex mittels reduktiver Aminierung mit dem Protein BSA. Zudem konnten sie feststellen, dass der aldehydtragende Komplex aus fixierten Zellen wesentlich schwerer herausgewaschen werden konnte als der Komplex ohne Aldehydfunktionen. Dieser Befund wird auf eine Verankerung des Komplexes über die Aldehydfunktionen mit Zellbestandteilen zurückgeführt.

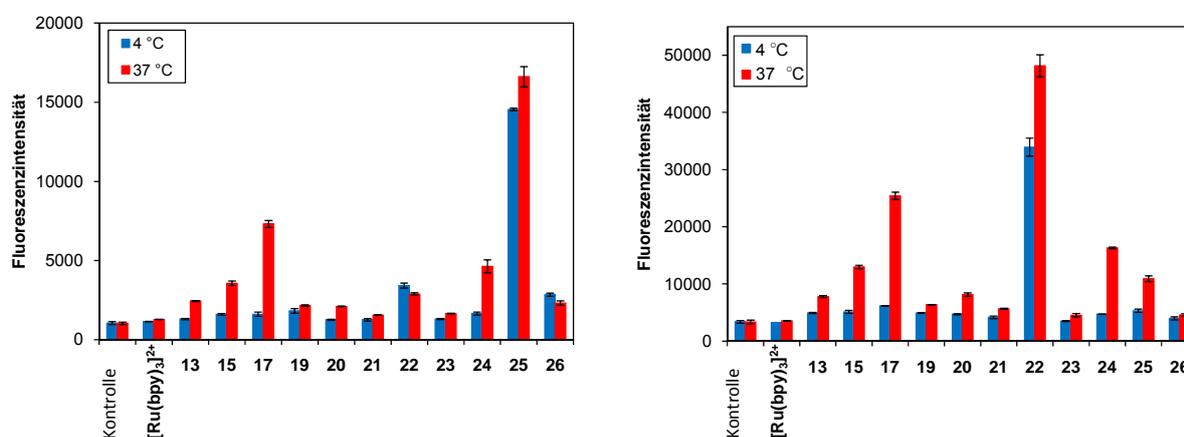


Abbildung 38 Fluoreszenzintensitätsmittelwerte von HL-60-Zellen (links) und HeLa-Zellen (rechts) inkubiert mit Komplexlösung (20 μM , 1 h) bei 4 °C (blau) bzw. 37 °C (rot); (20000 Zellen, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} > 670 \text{ nm}$).

Abbildung 38 (rechts) verdeutlicht, dass alle Komplexe in HeLa-Zellen bei 4 °C eine geringere Fluoreszenzintensität besitzen als bei 37 °C und somit von diesen weniger akkumuliert werden. Die Komplexe **21**, **23**, **26** und $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ besitzen einen rein aktiven Aufnahmemechanismus, da die Fluoreszenzintensität bei 4 °C-Inkubation mit dem Wert der Kontrolle übereinstimmt. Die anderen Komplexe zeigen einen mehr oder weniger großen Anteil an energieunabhängigen Aufnahmemechanismen. Die relativ geringe prozentuale Abnahme der Fluoreszenzintensität (um 32 %) von Komplex **22** bei 4 °C-Inkubation im Vergleich zur 37 °C-Inkubation könnte wiederum durch reduktive Aminierung an Zellbestandteilen verursacht werden.

Die synthetisierten Komplexe werden von U373-G-Zellen hauptsächlich durch energieabhängigem Transport akkumuliert (Abbildung 39, links). Die Fluoreszenzintensität der Komplexe **23**, **26** und $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ist bei der Inkubation bei 4 °C so gering wie für die Kontrolle, so dass diese Komplexe einem energieabhängigem Mechanismus unterliegen. Die Komplexe **19** und **21** besitzen nur einen geringen Fluoreszenzintensitätsunterschied nach Inkubation von U373-G-Zellen bei 37 °C bzw. 4 °C. Die gemessene Fluoreszenzintensität beträgt bei 4 °C nur je 28 % weniger als bei 37 °C, so dass ein großer Teil an passiver Aufnahme stattfindet. Die restlichen Komplexe **13**, **15**, **17**, **20**, **22**, **24** und **25** zeigen einen stärkeren Fluoreszenzintensitätsrückgang und werden somit von U373-G-Zellen in geringerem Maße durch energieunabhängigen Transport akkumuliert.

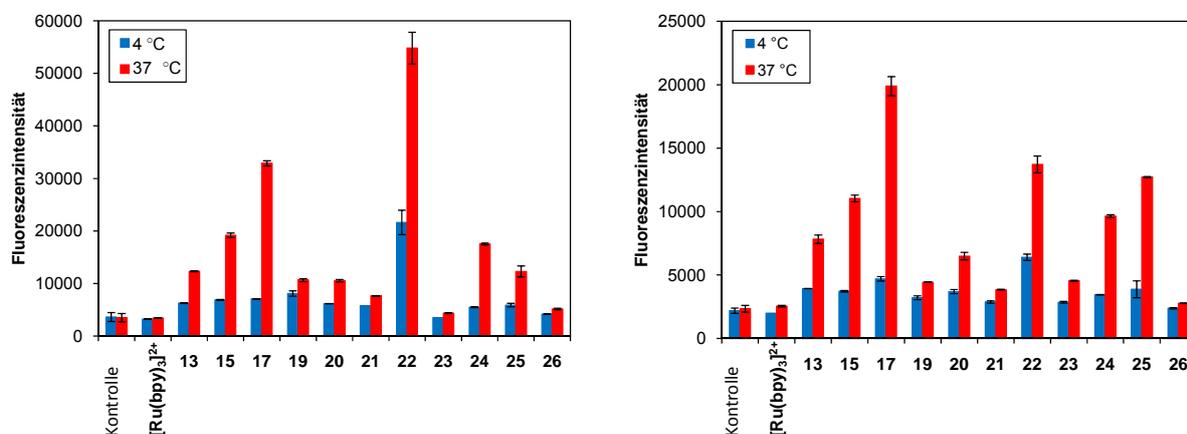


Abbildung 39 Fluoreszenzintensitätsmittelwerte von U373-G-Zellen (links) und LNCaP-Zellen (rechts) inkubiert mit Komplexlösung (20 μM , 1 h) bei 4 °C (blau) bzw. 37 °C (rot); (20000 Zellen, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} > 670 \text{ nm}$).

Die Rutheniumkomplexe werden von LNCaP-Zellen größtenteils über energieabhängigen Transport aufgenommen, da die Fluoreszenzintensität bei 4 °C kleiner als bei 37 °C Inkubationstemperatur ist (Abbildung 39, rechts). Nur die Komplexe **26** und $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ zeigen einen reinen energieabhängigen Transport. Die restlichen Komplexe werden zu einem mehr (Komplexe **19**, **20**, **21** und **23**) oder weniger (Komplexe **13**, **15**, **17**, **22**, **24** und **25**) großen Anteil mittels energieunabhängigem Transport in LNCaP-Zellen akkumuliert (Tabelle 7).

Allgemein lässt sich sagen, dass $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ von allen hier aufgeführten Zelllinien über einen energieabhängigen Mechanismus aufgenommen wird. Die synthetisierten Komplexe werden größtenteils auch über energieabhängige Mechanismen von den Zellen akkumuliert, wobei sich über den genauen Anteil des zusätzlich stattfindenden energieunabhängigen

Transports hingegen keine allgemeingültige Aussage treffen lässt. Beispielsweise akkumulieren HL-60-Zellen die Komplexe **19**, **22**, **25** und **26** großteils mittels passiver Aufnahme. Weiterhin besitzen die Komplexe **22** bei HeLa-Zellen, **19** und **21** bei U373-G-Zellen und **19**, **20**, **21** und **23** bei LNCaP-Zellen einen Anteil an energieunabhängiger Zellaufnahme.

3.1.4.4 Verteilung der Komplexe in den Zellen

Die räumliche Verteilung der Komplexe in den vier getesteten Zelllinien (HL-60, HeLa, U373-G und LNCaP) wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu wurden 6000 Zellen pro Kammer mit Komplexlösung in einer Konzentration von 20 μM für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Fluoreszenz- und Durchlichtbilder wurden mit einem Konfokalen-Laserraster-Mikroskop detektiert.

In Abbildung 40 - 43 sind die Durchlichtbilder und konfokalen Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen ausgewählter Komplexe in HeLa-, U373-G-, LNCaP- und HL-60-Zellen aufgeführt.

Die Komplexe wurden von den Zellen in 4 h mehr oder weniger stark aufgenommen, was eine unterschiedlich hohe Fluoreszenzintensität liefert. Die verschiedenen Komplexe verteilen sich innerhalb der jeweiligen Zelllinien relativ ähnlich. Kürzere Inkubationszeiten (10 min) führten zu einer gleichen Verteilung bei entsprechend geringerer Intensität. Nach 4 h ist im Zytoplasma punktförmiges Anfärben mit Aussparung des Zellkerns zu erkennen. Dies ist für Rutheniumkomplexe die charakteristische Verteilung in Zellen, obwohl die unterschiedlichsten Aufnahmemechanismen stattfinden.^{23, 41, 46} Es ist wahrscheinlich, dass diese Komplexe sich an hydrophobe Organellen wie das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat anlagern.⁴⁶

Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Zelllinien zeigt sich, dass die Komplexe in den Zellen analog zu $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ verteilt sind (Abbildung 40 - 43).

Die Suspensionszellen HL-60 weisen eine gleichmäßige und punktförmige Fluoreszenz vom Rand des Zellkerns bis zur Zellmembran auf (Abbildung 40). In HeLa-Zellen lässt sich Fluoreszenz hauptsächlich in zellkernnahen Regionen detektieren (Abbildung 41). Hingegen verteilen sich die Komplexe in U373-G-Zellen gleichmäßig und punktförmig in der ganzen Zelle mit Aussparung des Nukleus (Abbildung 42). LNCaP-Zellen zeigen eine verstärkte

Komplexanlagerung in peripheren Zellgebieten, wobei um den Zellkern nur eine schwächere Anlagerung vorzufinden ist (Abbildung 43).

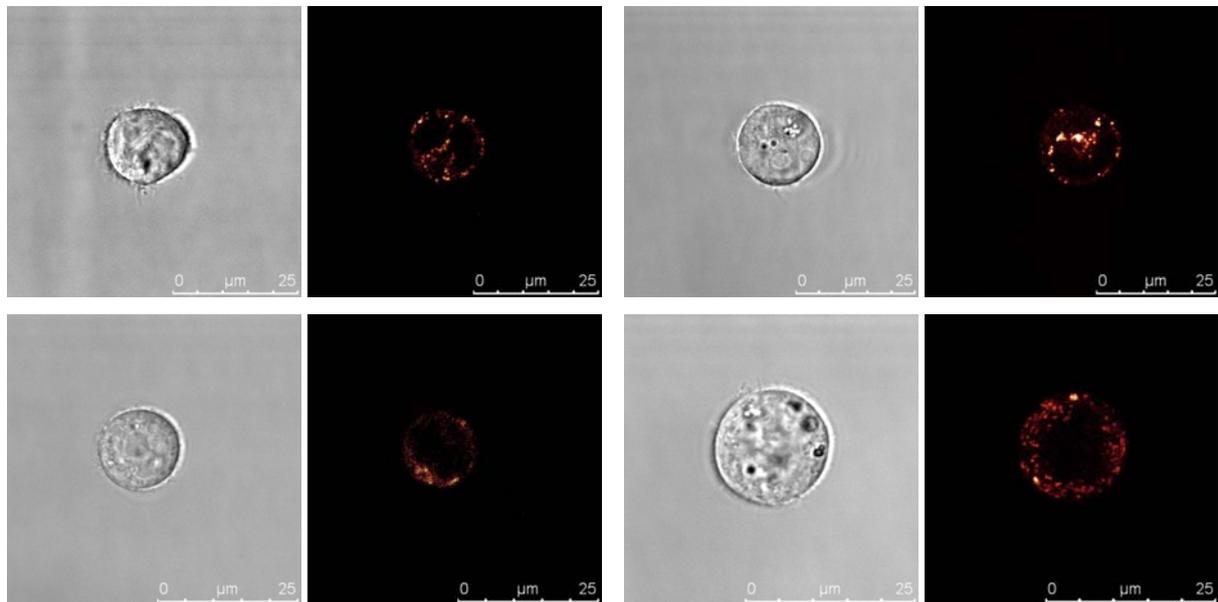


Abbildung 40 Durchlichtbilder und konfokale Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von HL-60-Zellen nach Inkubation mit 15 (links oben, 20 µM), 23 (rechts oben, 20 µM), 26 (links unten, 20 µM) bzw. $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (rechts unten, 50 µM); (4 h, 37 °C, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 600\text{-}750 \text{ nm}$).

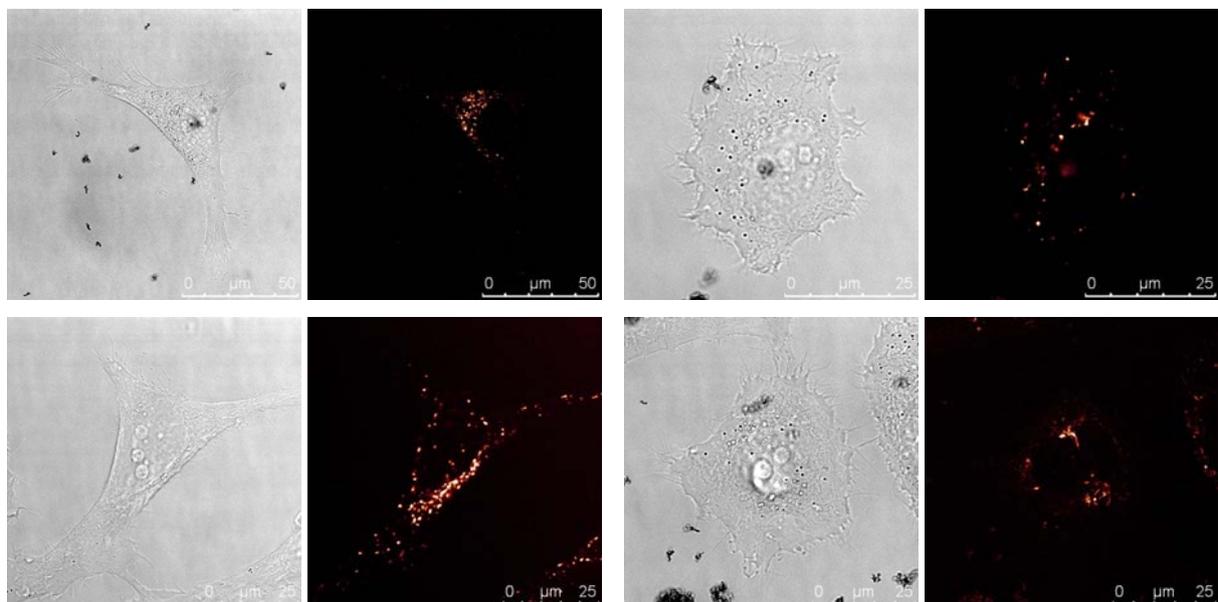


Abbildung 41 Durchlichtbilder und konfokale Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von HeLa-Zellen nach Inkubation mit 13 (links oben, 20 µM), 17 (rechts oben, 20 µM), 24 (links unten, 20 µM) bzw. $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (rechts unten, 50 µM); (4 h, 37 °C, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 600\text{-}750 \text{ nm}$).

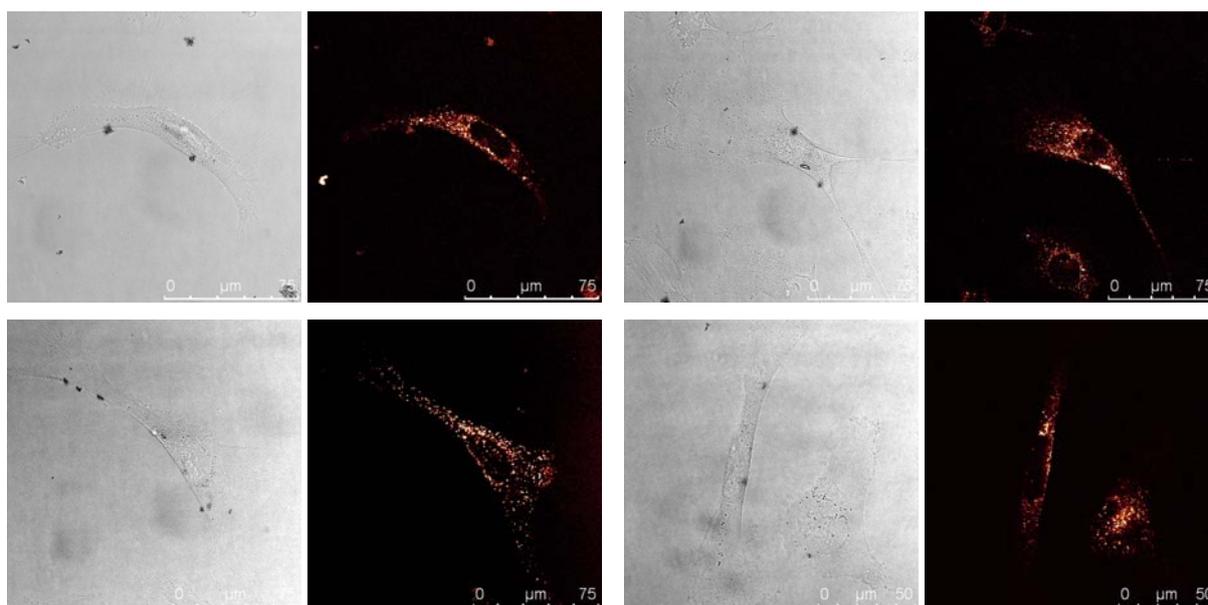


Abbildung 42 Durchlichtbilder und konfokale Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von U373-G-Zellen nach Inkubation mit 20 (links oben, 20 μM), 21 (rechts oben, 20 μM), 24 (links unten, 20 μM) bzw. $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (rechts unten, 50 μM); (4 h, 37 $^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 600\text{-}750 \text{ nm}$).

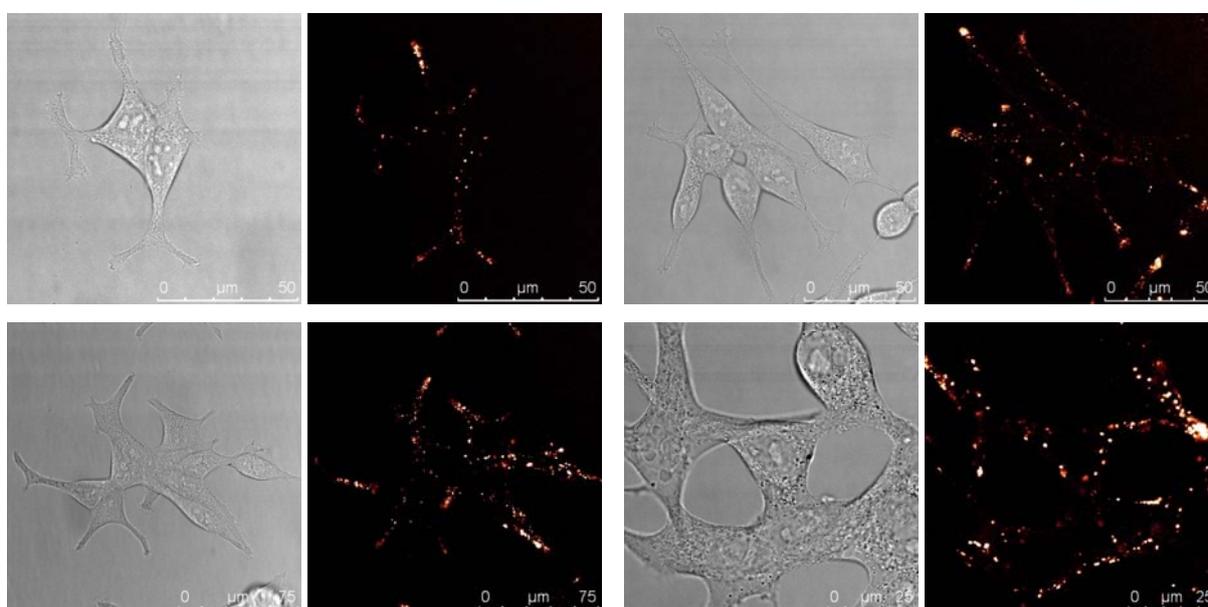


Abbildung 43 Durchlichtbilder und konfokale Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von LNCaP-Zellen nach Inkubation mit 19 (links oben, 20 μM), 22 (rechts oben, 20 μM), 25 (links unten, 20 μM) bzw. $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (rechts unten, 50 μM); (4 h, 37 $^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 600\text{-}750 \text{ nm}$).

In Tabelle 8 sind die qualitativen Fluoreszenzintensitäten der synthetisierten Komplexe (20 μM) und $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (50 μM) in den verwendeten Zelllinien nach 4 h Inkubation bei 37 $^\circ\text{C}$ aufgeführt. Es besteht jedoch keine ersichtliche Korrelation zwischen Lipophilie (siehe

3.1.4.1, Tabelle 5) der Komplexe und ihrer Fluoreszenzintensität in den Zellen. Komplex **24** besitzt in allen Zelllinien die stärkste Fluoreszenzintensität, wohingegen $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ und **26** die schwächsten Intensitäten aufweisen. Unter Berücksichtigung der relativen Fluoreszenzintensitäten (siehe 3.1.2.2, Tabelle 2) lässt sich daraus schließen, dass **24** am meisten und $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ am wenigsten in den Zellen akkumuliert werden. Der lipophilste Komplex **25** zeigt in allen Zelllinien eine gute Fluoreszenzintensität. Auffällig ist, dass in LNCaP-Zellen für alle Komplexe gute bis sehr gute Fluoreszenzintensitäten detektiert werden konnten.

Tabelle 8 Qualitative Fluoreszenzintensitäten der Komplexe **13, 15, 17, 19 - 26** und $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ in den Zelllinien HL-60, HeLa, U373-G und LNCaP (20 μM bzw. 50 μM $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, Medium, 4 h, 37 °C, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 600\text{-}750 \text{ nm}$).

	HL-60	HeLa	U373-G	LNCaP
13	++	+	++	+
15	++	+	++	+
17	++	+	++	++
19	++	-	+	+
20	+	+	++	+
21	+	+	++	+
22	+	+	++	++
23	-	--	--	+
24	+++	++	++	++
25	++	+	++	+
26	--	--	--	+
$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$	--	-	-	+

+++ = sehr stark fluoreszierend, ++ = stark fluoreszierend, + = fluoreszierend,
 - = schwach fluoreszierend, -- = sehr schwach fluoreszierend

3.2 Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexe als mmDNA-Sensor⁸⁷

3.2.1 Synthesen

3.2.1.1 Darstellung des Transportmoleküls Dipyridophenazin (*dppz*)

*Barton et al.*⁸⁸ etablierten den Liganden Dipyrido[3,2-a;2',3'-c]phenazin (**dppz**) als molekularen Lichtschalter für DNA (*DNA Light Switch*) in $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ -Komplexen. Der Rutheniumkomplex zeigt keine Fluoreszenz in wässriger Lösung. Erst wenn dieser an DNA gebunden ist, kann Fluoreszenz beobachtet werden, da die Stickstoffatome des **dppz** vor Protonentransfer geschützt sind. Zudem kann die Zellaufnahme von Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexen durch Komplexierung eines **dppz**-Liganden verstärkt werden.⁴⁰ Der Ligand wurde analog einer Literaturvorschrift synthetisiert (Abbildung 44).⁸⁹ 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion wurde mit 1,2-Phenyldiamin in Ethanol für 30 min unter Rückfluss erhitzt. Beim Abkühlen kristallisierte das Produkt als blass gelber Feststoff in 92 % Ausbeute aus.

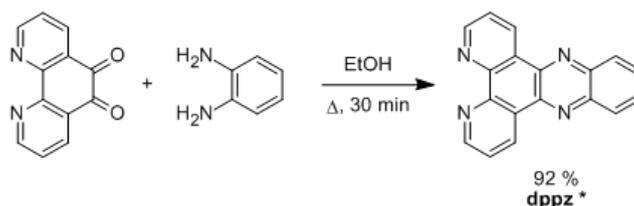


Abbildung 44 Synthese des Transportmoleküls **dppz**.⁸⁹ (* Literaturbekannte Verbindung)

3.2.1.2 Darstellung des *N*-Methyl-di-2-pyridylamin-Liganden (**27**)

N-Methyl-di-2-pyridylamin wurde analog einer Synthesevorschrift von *Zeglis*⁹⁰ für *N*-Heptyl-di-2-pyridylamin (HeptDPA) hergestellt. Di-2-pyridylamin (HDPa) wurde mit Natriumhydrid deprotoniert und durch Zugabe von Methyljodid methyliert (Abbildung 45). Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde **27** in 27 % Ausbeute erhalten.

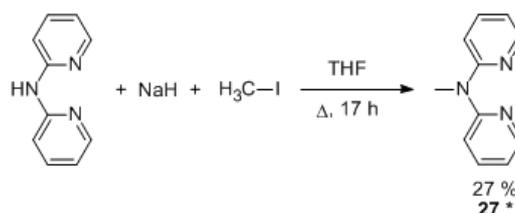


Abbildung 45 Synthese der Verbindung **27**.⁹¹ (* Literaturbekannte Verbindung)

3.2.1.3 Darstellung der $[Ru(R-DPA)_2Cl_2]Cl$ -Komplexe

In der Literatur sind verschiedene Syntheserouten zur Darstellung von $[Ru(HDPA)_2Cl_2]Cl$ beschrieben.^{12, 92} Sie alle beruhen auf der in Abbildung 46 gezeigten Syntheseroute. Der HDPA-Ligand wurde mit Rutheniumtrichlorid-Trihydrat, unterschiedlichen Zusätzen (Lithiumchlorid, Hydrochinon, Salzsäure) und Lösungsmitteln (Dimethylformamid, Dimethoxyethan, Ethanol, Wasser) unter Rückfluss erhitzt.

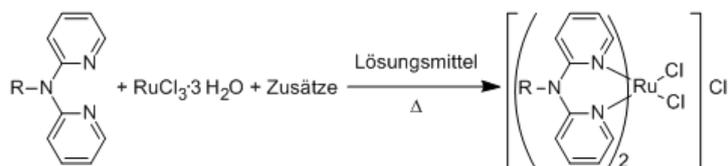


Abbildung 46 Allgemeine Syntheseroute für die Darstellung von $[Ru(R-DPA)_2Cl_2]Cl$.

Es wurden verschiedene Reaktionsbedingungen getestet, um $[Ru(HDPA)_2Cl_2]Cl$ (**28**) zu synthetisieren. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn Rutheniumtrichlorid-Trihydrat in einer Wasser/Ethanol-Mischung für 4 h unter Rückfluss erhitzt wurde.⁹² Die braune Lösung färbte sich während dem Erhitzen dunkelblau. Anschließend wurden HDPA und konzentrierte Salzsäure hinzugegeben und für weitere 2 h unter Rückfluss erhitzt. Durch Umkristallisation aus Methanol/Diethylether wurde das Edukt fast vollständig entfernt. Das Produkt **28** wurde in 37 % Ausbeute als grüner Feststoff erhalten, der ohne weitere Reinigung verwendet wurde.

Die Komplexe $[Ru(\mathbf{27})_2Cl_2]Cl$ (**29**) und $[Ru(\text{HeptDPA})_2Cl_2]Cl$ (**30**) wurden analog zu **28** synthetisiert und als grüne Feststoffe in guten Ausbeuten erhalten. Diese konnten ohne weitere Reinigung direkt in der nächsten Reaktion eingesetzt werden.

3.2.1.4 Darstellung der $[Ru(R-DPA)_2dppz]^{2+}$ -Komplexe

Im nächsten Schritt wurde **dppz** an die Bis(*N*-R-di-2-pyridylamin)-rutheniumkomplexe addiert. Dazu wurden die Komplexe **28** - **30** mittels unterschiedlicher Protokolle mit **dppz** umgesetzt.

Die Synthese von $[Ru(HDPA)_2dppz]^{2+}$ (**31**) gelang durch Kombination verschiedener Literaturvorschriften (Abbildung 47).^{12, 93} **28** und **dppz** wurden in Ethanol unter Argonatmosphäre für 20 min unter Rückfluss erhitzt. Hydrochinon (HC) wurde hinzugefügt

und die Reaktionslösung für weitere 3 h unter Rückfluss erhitzt. Vorreinigung des Produkts fand durch Umkristallisation (Ethanol/Diethylether), die vollständige Reinigung anschließend durch HPLC statt. Das Produkt **31** eluierte bei 26,3 min.

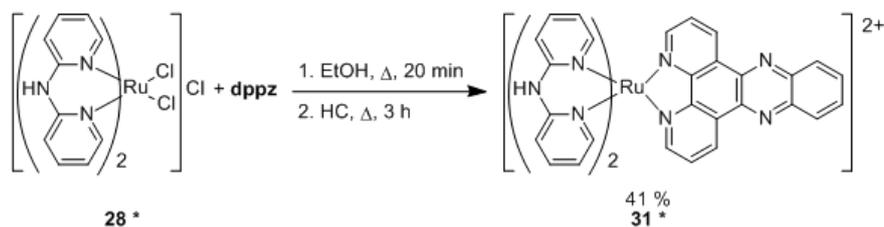


Abbildung 47 Syntheseroute zur Darstellung von Komplex **31**. (* Literaturbekannte Verbindung)

Zur Synthese von $[\text{Ru}(\text{HDP A})(\text{dppz})_2]^{2+}$ (**32**) wurde **28** mit **dppz** und Hydrochinon in Ethanol für 8 h unter Rückfluss erhitzt (Abbildung 48). Die analytisch reine Verbindung wurde mittels HPLC erhalten. Das Produkt **32** eluierte bei 35,8 min.

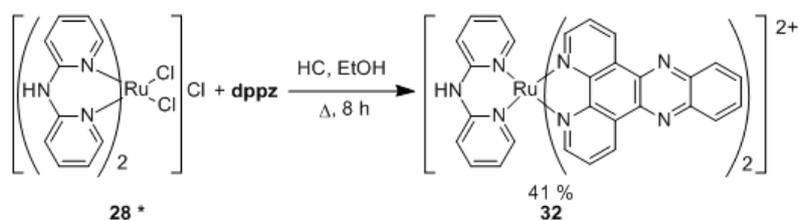


Abbildung 48 Syntheseroute zur Darstellung von Komplex **32**. (* Literaturbekannte Verbindung)

$[\text{Ru}(\mathbf{27})_2\text{dppz}]^{2+}$ (**33**) wurde durch Kombination bekannter Synthesebedingungen dargestellt (Abbildung 49).^{12, 93, 94} Dazu wurde **29** in Ethanol mit Hydrochinon erhitzt und anschließend mit Silbernitrat versetzt. Nach Abfiltrieren des Niederschlags wurde das Filtrat für 23 h mit **dppz** unter Rückfluss erhitzt. Das Produkt **33** wurde vom Nebenprodukt $[\text{Ru}(\mathbf{27})(\text{dppz})_2]^{2+}$ mittels HPLC getrennt. Die Retentionszeiten betragen 27,5 min für **33** und 37,0 min für $[\text{Ru}(\mathbf{27})(\text{dppz})_2]^{2+}$.

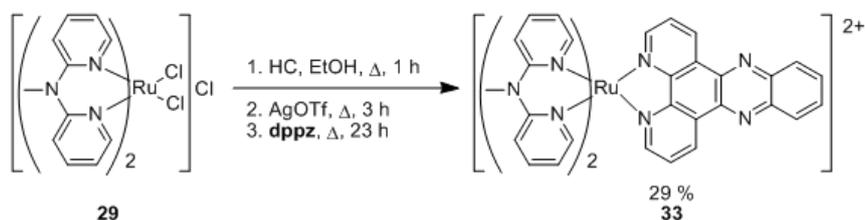


Abbildung 49 Syntheseroute zur Darstellung von Komplex **33**.

30 und **dppz** wurden in einer Ethanol/Wasser-Mischung (1:1) für 23 h unter Rückfluss erhitzt (Abbildung 50). Nach säulenchromatographischer Reinigung und Umkristallisation (Acetonitril/Diethylether) wurde der Komplex **34** in 22 % Ausbeute erhalten. Die Reinheit des Komplexes wurde mittels HPLC bestätigt. Die Retentionszeit betrug 51,4 min.

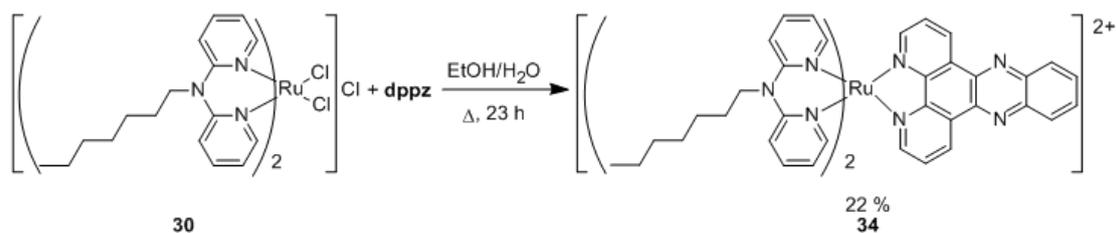


Abbildung 50 Syntheseroute zur Darstellung von Komplex 34.

3.2.2 UV/Vis- und Fluoreszenzeigenschaften

3.2.2.1 UV/Vis-Eigenschaften und pH-Titrationen

Die UV/Vis-Spektren der in Abbildung 51 gezeigten Verbindungen **31** - **34** wurden in einer Konzentration von 10 μM in Wasser (pH = 7) aufgenommen.

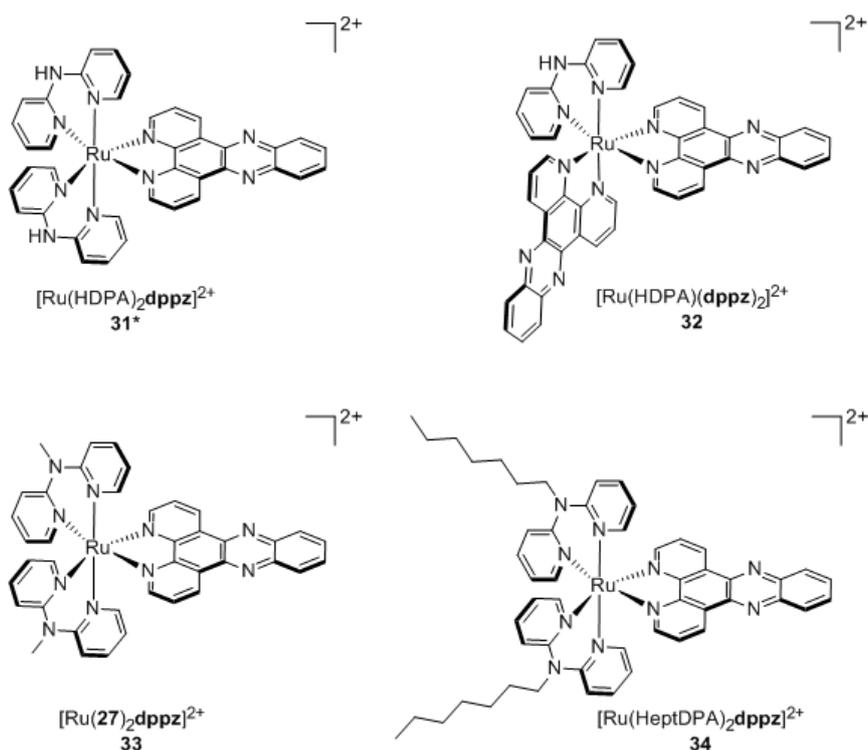


Abbildung 51 Übersicht über die $[\text{Ru}(\text{R-DPA})_n(\text{dppz})_{3-n}]^{2+}$ Komplexe **31** - **34** ($n = 1 - 2$). (* Literaturbekannte Verbindung)

Alle $[\text{Ru}(\text{R-DPA})_2\text{dppz}]^{2+}$ Komplexe (**31**, **33** und **34**) weisen Absorptionsmaxima bei 279 nm (LC), 360 nm (MLCT), 373 nm (LC), 437 nm (MLCT) und 479 nm (ILC) auf (Abbildung 52). Diese stimmen mit von *Rajendiran et al.*¹² veröffentlichten UV/Vis-Daten für $[\text{Ru}(\text{HDPA})_2\text{dppz}](\text{ClO}_4)_2$ überein. $[\text{Ru}(\text{HDPA})(\text{dppz})_2]^{2+}$ (**32**) besitzt Absorptionsmaxima

bei identischen Wellenlängen wie **31**, **33** und **34** (279 nm (LC), 360 nm (MLCT), 373 nm (LC)) sowie ein breites Plateau um 463 nm (MLCT) (Abbildung 52, rechts, rot).

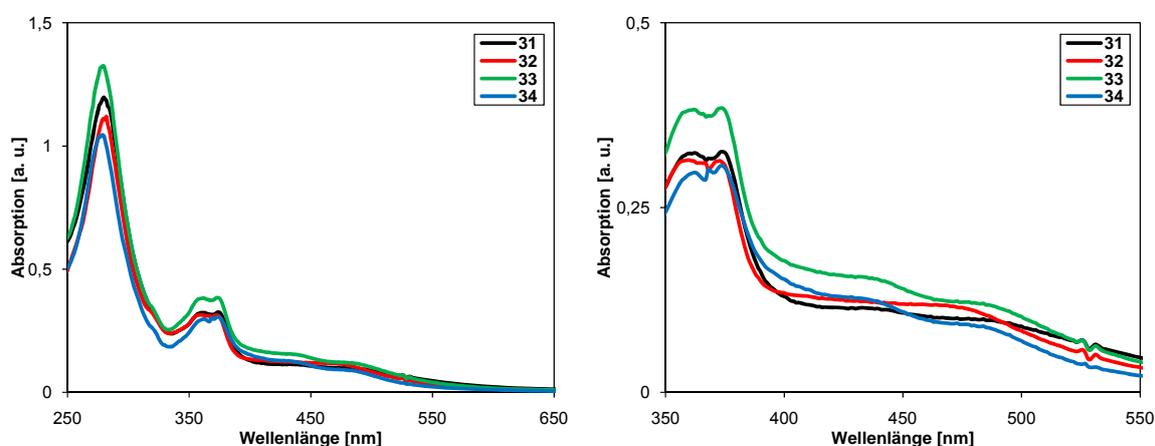


Abbildung 52 Absorptionsspektren von **31** (schwarz), **32** (rot), **33** (grün) und **34** (blau) (10 μM , Wasser, pH 7, 25 $^{\circ}\text{C}$), links: komplettes Spektrum, rechts: vergrößerter Ausschnitt.

Es wurden die Absorptionsspektren von jeweils drei Lösungen eines Rutheniumkomplexes aufgenommen und anschließend die Rutheniumkonzentration dieser Lösungen mittels ICP-MS bestimmt. Die Mittelwerte der so bestimmten Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Sie befinden sich alle in der gleichen Größenordnung.

Tabelle 9 Extinktionskoeffizienten der Komplexe **31** - **34**.

Komplex	ϵ [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]					
	279 nm	360 nm	373 nm	437 nm	463 nm	479 nm
31	120300	32700	32900	11700	-	10600
32	99200	27500	27900	-	10300	-
33	117300	34600	35000	15500	-	12600
34	118800	33700	34000	13600	-	11600

Die Absorptionsspektren der Komplexe **31** - **34** wurden bei pH = 2 - 13 in einer Konzentration von 20 μM gemessen. In Abbildung 53 sind exemplarisch die Absorptionsspektren bei pH 2, 7 und 13 aufgeführt. Für die alkylierten Komplexe **33** und **34** lässt sich keine pH-Wertabhängigkeit des Absorptionsspektrums nachweisen. Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass weder R-DPA noch **dppz** bei niedrigen pH-Werten protoniert sind. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Protonierung an einem bereits positiv geladenen Zentrum (Ru^{2+}) nur unter stark sauren Bedingungen stattfindet.⁹⁵ Beispielsweise tritt erst bei pH < 1 eine einfache Protonierung der Phenazinstickstoffatome des Liganden **dppz** ein.⁹⁵

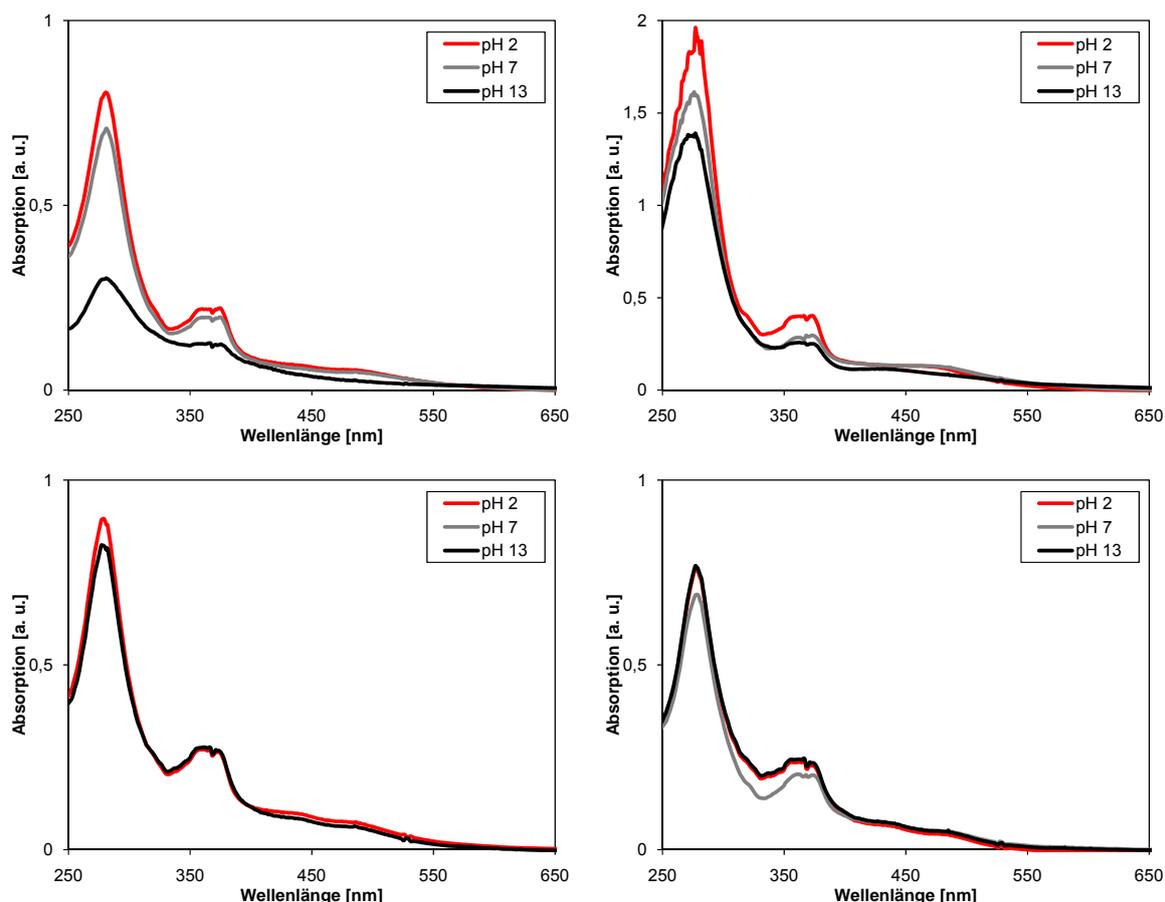


Abbildung 53 Absorptionsspektren der Komplexe **31** (links oben), **32** (rechts oben), **33** (links unten) und **34** (rechts unten) bei pH 2 (rot), 7 (grau) und 13 (schwarz); (20 μ M, Wasser, pH-Wert eingestellt durch Zugabe von Äquivalenten konzentrierter Salzsäure bzw. Natronlauge).

Im Falle der HDPA enthaltenden Komplexe (**31** und **32**) sinkt die Absorption bei hohem pH-Werten signifikant bei 279 nm, 360 nm sowie 363 nm ab, während sie bei 580 nm etwas zunimmt (Abbildung 53). Dieses Verhalten entspricht dem bereits von *Blakley et al.*¹¹ für $[\text{Ru}(\text{HDPA})_2\text{bpy}]^{2+}$ und $[\text{Ru}(\text{HDPA})(\text{bpy})_2]^{2+}$ beobachteten Verlauf. Die Absorption sank auch in diesem Fall nach Zugabe eines Überschusses an festem Natriumhydroxid bei 430 nm und 480 nm verbunden mit einem gleichzeitigen Anstieg bei 588 nm.¹¹ Der geringe Ab- und Anstieg der Absorption für die Komplexe **31** und **32** liegt an der nicht vollständigen Deprotonierung bei pH 13.

Abschließend lässt sich sagen, dass keine signifikante Absorptionsänderung im physiologisch wichtigen pH-Bereich (pH 5 - 8) auftritt.

3.2.2.2 Fluoreszenzeigenschaften

Die Fluoreszenzspektren der Komplexe **31** - **34** wurden in einer Konzentration von 10 μM in Wasser und Acetonitril aufgenommen (Abbildung 54). Die Anregungswellenlänge betrug 440 nm. Erwartungsgemäß besitzen alle vier Komplexe keine Fluoreszenz im Wasser.⁹⁶ Die Fluoreszenz wird durch Protonentransfer an die Stickstoffatome des **dppz**-Liganden im angeregten Zustand gelöscht.⁹⁶ In aprotischen Lösungsmitteln könnte hingegen Fluoreszenz auftreten. Komplex **31** zeigt allerdings auch in Acetonitril nur eine schwache Fluoreszenz. Dieses Phänomen wurde bereits für ähnliche HDPA-Rutheniumkomplexe beschrieben, die nur bei tiefen Temperaturen (-196 °C) eine starke Fluoreszenz zeigten (Kapitel 1.1.2).^{10, 11} Eine Substitution des Aminwasserstoffatoms durch Alkylgruppen führt zu Raumtemperaturfluoreszenz. Denn die Komplexe **33** und **34** besitzen eine fünfmal bzw. sechzehnmal so starke Fluoreszenzintensität wie **31** mit einem Fluoreszenzmaximum bei ca. 670 nm. Die größte Fluoreszenzintensität besitzt **32** (vierzigmal) mit einem Maximum bei 655 nm. Alle Komplexe sind im Vergleich zu $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+97}$ schwach fluoreszierend (300mal höher als **31**) und die zugehörigen Maxima besitzen eine Rotverschiebung (um ca. 40 nm).

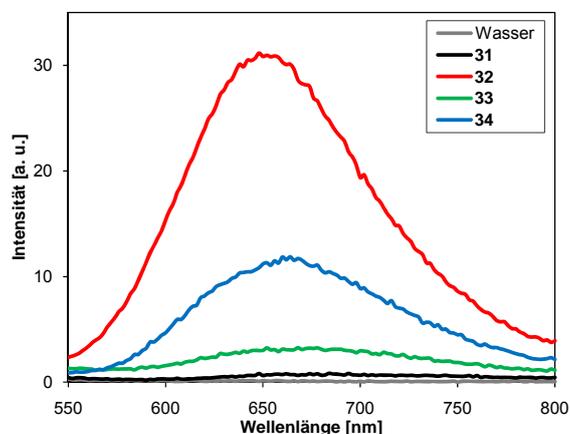


Abbildung 54 Fluoreszenzspektren der Komplexe **31** (schwarz), **32** (rot), **33** (grün) und **34** (blau) in Acetonitril und Komplex **31** in Wasser (grau); (10 μM , 25 °C, $\lambda_{\text{ex}} = 440$ nm, Verstärkung 8).

3.2.3 Wechselwirkung der Komplexe 32 - 34 mit Oligonukleotiden

Der Ligand **dppz** ist ein bekannter DNA-Interkalator. Durch Interkalation in dsDNA sind die zugehörigen Stickstoffatome vor Protonentransfer im angeregten Zustand geschützt, so dass die Fluoreszenz der entsprechenden **dppz**-Rutheniumkomplexe detektierbar ist.³⁹ Dieses Phänomen wird auch als „*DNA Light Switch*“ bezeichnet.

Die Wechselwirkung der Komplexe **32 - 34** und $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ wurde mit verschiedenen Defekten enthaltenden DNA-Stränge untersucht, um die Eigenschaft der Komplexe als mmDNA-Sensor zu testen (siehe 1.2.2). Komplex **31** wurde auf Grund der geringen Fluoreszenz in Acetonitril nicht weiter berücksichtigt.

Für die DNA-Versuche wurden drei unterschiedliche 27-mer Oligonukleotide synthetisiert: eine Doppelstrang-DNA mit fehlerfreier Basenpaarung (mDNA, *match DNA*), eine mit einer Basenfehlpaarung (mmDNA, *mismatch DNA*, CC-Fehlpaarung) und eine mit einer fehlenden Base (abDNA, *abasic site DNA*). Abbildung 55 zeigt die Sequenzen der synthetisierten Einzelstränge.

	5'-GAC CAG CTT ATC ACC CCT AGA TAA GCG-3'
m	3'-CTG GTC GAA TAG TGG GGA TCT ATT CGC-5'
mm	3'-CTG GTC GAA TAG TCG GGA TCT ATT CGC-5'
ab	3'-CTG GTC GAA TAG TRG GGA TCT ATT CGC-5'

Abbildung 55 Sequenzen der synthetisierten Einzelstränge (R steht für eine Tetrahydrofuran-abasic-Stelle).

Die Komplexe wurden in wässriger Pufferlösung (5 mM TRIS-Puffer, pH 7,5, 50 mM Natriumchloridlösung) in einer ihrer Fluoreszenzintensität angepassten Konzentration eingesetzt ($[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ 100 nM, **32** 2,5 μM , **33** 5 μM und **34** 2,5 μM ; Abbildung 56). Alle Komplexe zeigten keine Fluoreszenz in wässriger Lösung.

Anschließend wurde die Fluoreszenz der an je ein Äquivalent mDNA, mmDNA und abDNA gebundenen Komplexe gemessen. Alle Komplexe interkalieren in die DNA, was in einem Fluoreszenzanstieg resultiert. Der Unterschied zwischen mDNA, mmDNA und abDNA ist für Komplex **32** am schwächsten ausgeprägt, für die Komplexe **33** und **34** hingegen am stärksten. Generell zeigen die Komplexe **32**, **33** und **34** die stärkste Wechselwirkung mit mmDNA, während $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ die stärkste Fluoreszenz bei Wechselwirkung mit abDNA aufweist. Die Komplexe **33** und **34** sind somit im Gegensatz zu $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ als Fluoreszenzsensor für mmDNA geeignet.

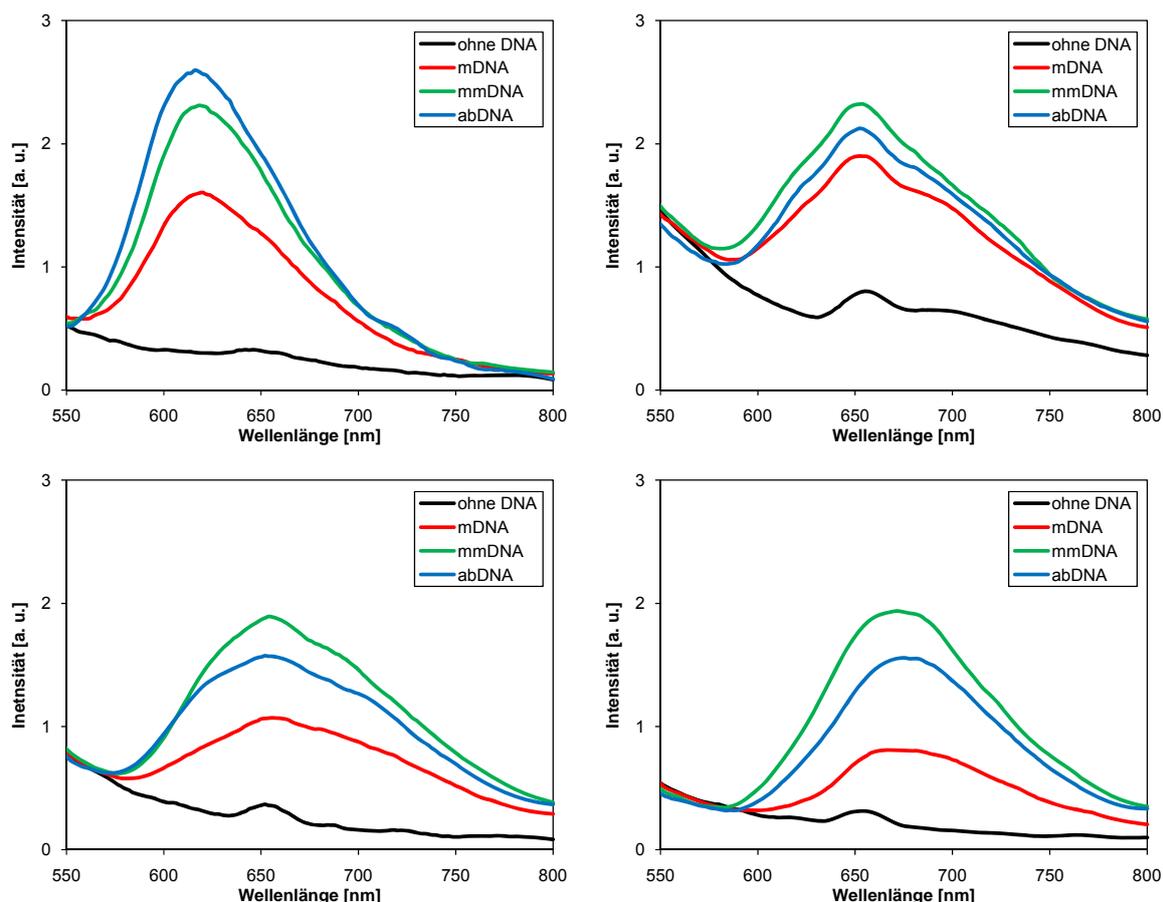


Abbildung 56 Fluoreszenzspektren von $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ (100 nM, links oben), **32** (2,5 μM , rechts oben), **33** (5 μM , links unten) und **34** (2,5 μM , rechts unten) ohne DNA (schwarz), bzw. mit 1 eq mDNA (rot), 1 eq mmDNA (grün) oder 1 eq abDNA (blau); (5 mM TRIS-Puffer, pH 7,5, 50 mM Natriumchloridlösung, 25 °C, $\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$, Verstärkung 8).

3.2.4 Zellexperimente

3.2.4.1 Lipophilie

In Tabelle 10 sind die mittels „Shake-Flask“-Methode erhaltenen Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten der Komplexe **31** - **34** und $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ nach steigender Lipophilie geordnet aufgelistet (Dreifachbestimmung). Der Komplex mit den Heptylresten (**34**) ist am lipophilsten, gefolgt von **32**. Komplex **33** und der Vergleichskomplex $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ weisen nahezu den gleichen $\log P_{\text{ow}}$ -Wert auf. Komplex **31** ist etwas lipophiler als **33**.

Lipophile Verbindungen werden von Zellen leichter aufgenommen als hydrophile.^{40, 85}

Tabelle 10 Mittelwerte der Lipophilie ($\log P_{ow}$) und die Standardabweichungen (σ) der Komplexe **31** - **34** und $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$, sortiert nach steigender Lipophilie (jeweils am LC-Übergang bestimmt).

Komplex	$\log P_{ow}$	σ
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$	-1,082	0,039
33	-1,040	0,018
31	-0,866	0,083
32	-0,478	0,014
34	-0,203	0,053

3.2.4.2 Zelluläre Aufnahme der Komplexe **31** - **34** und $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$

HeLa-Zellen wurden in 96-Mikrotiterplatten mit Glasboden zu 3000 Zellen pro Vertiefung ausgesät und im Brutschrank für 24 h adhärirt. Anschließend wurden die Zellen mit **31** (50 μM), **32** (10 μM), **33** (50 μM), **34** (1 μM) und $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ (20 μM) für 24 h bei 37 °C inkubiert. Abbildung 57 zeigt, dass alle Komplexe die gleiche intrazelluläre Verteilung aufweisen. Sie reichern sich im Zytoplasma mit nahezu vollständiger Aussparung des Zellkerns an. Der lipophilste Komplex **34** akkumuliert in Zellen in einer Konzentration von 1 μM . Auch die anderen Komplexe verhalten sich ihrem $\log P_{ow}$ -Werten entsprechend. Eine Ausnahme bildet der Komplex $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$, der trotz seiner geringen Lipophilie in geringer Konzentration in den Zellen zu sehen ist. Dies ist allerdings nicht auf eine erhöhte Anreicherung in der Zelle zurückzuführen, sondern auf die höhere Fluoreszenzintensität (3.2.2.2).

Überraschenderweise ist selbst der kaum lumineszierende Komplex **31** in der gleichen Konzentration wie der stärker lumineszierende Komplex **33** in Zellen sichtbar. Daraus lässt sich folgern, dass die sekundären Amingruppen der Liganden die Zellaufnahme erhöhen und somit mehr **31** aufgenommen werden kann als **33**.³⁶ Dies konnte mittels ICP-MS-Messungen von Zelllysaten und Zellkernextrakten bestätigt werden (Abbildung 58).

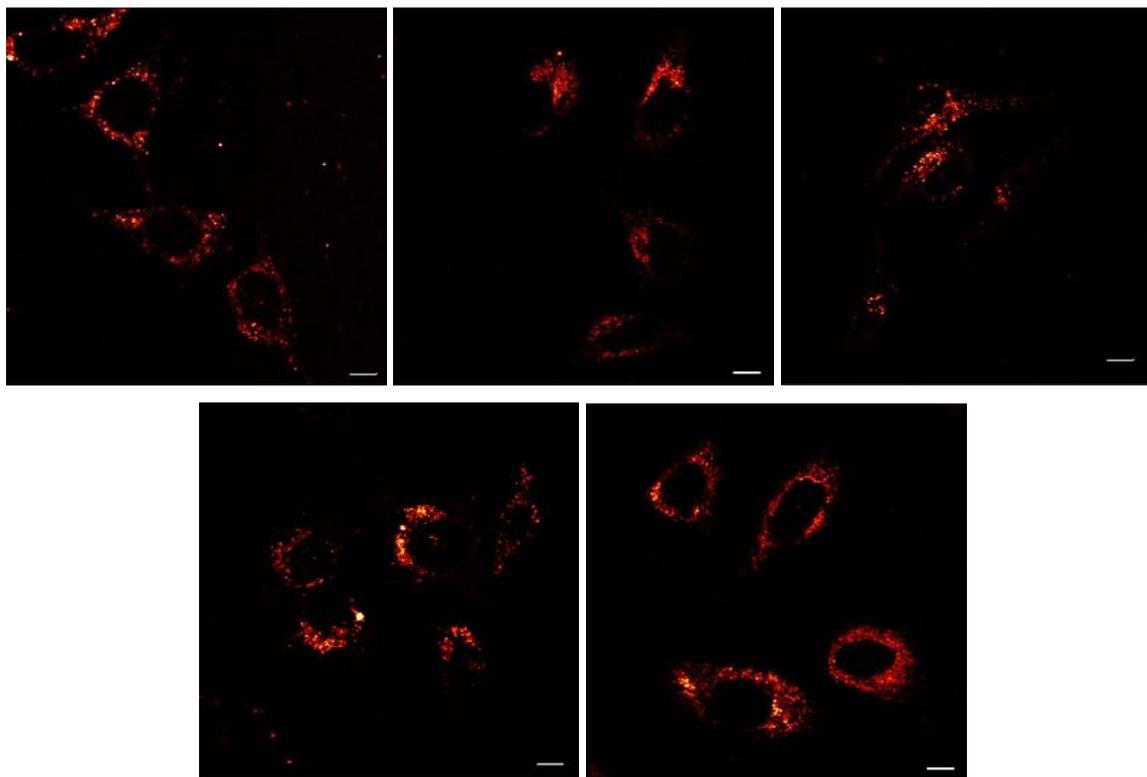


Abbildung 57 Konfokale Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von HeLa-Zellen inkubiert mit **31** (50 μM , links oben), **32** (10 μM , mittig oben), **33** (50 μM , rechts oben), **34** (1 μM , links unten) und $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ (20 μM , rechts unten); (24 h, 37 $^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} > 560 \text{ nm}$). Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

ICP-MS erlaubt einen direkten Vergleich der akkumulierten Rutheniumkomplexmenge in einer Zelle. Dieses Ergebnis ist unabhängig von der Fluoreszenzintensität der Komplexe.

HeLa-Zellen wurden in einer Konzentration von 20 μM mit den Komplexen **31** - **34** und $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ bei 37 $^\circ\text{C}$ für 24 h inkubiert. Anschließend wurden Zelllysate und Zellkernextrakt in 1 %iger Salpetersäure gelöst und mittels ICP-MS der Rutheniumgehalt pro einer Million Zellen bestimmt.⁹⁸ Der Rutheniumgehalt ist für die mit **31** und **34** inkubierten Zellen am größten (Abbildung 58). Am niedrigsten ist der Wert für Zellen, die mit **33** und $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ inkubiert wurden, während mit **32** inkubierte Zellen einen etwas höheren Gehalt aufweisen. **31** wird von Zellen stärker aufgenommen, als man aufgrund seiner Lipophilie erwarten würde. Dies lässt vermuten, dass ein zweiter Aufnahmemechanismus eine Rolle spielt. Die mit **31** bzw. **32** und besonders **34** inkubierten Zellen zeigen eine verstärkte Ruthenium-komplexaufnahme im Zellkernextrakt. Es ist zu beachten, dass dieser Assay nicht zwischen im Zellkern aufgenommenen Komplexen und nur mit der Zellkernmembran assoziierten Komplexen unterscheiden kann. Betrachtet man die konfokalen Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen der Komplexe (Abbildung 57), so zeigt sich eine bevorzugte Anreicherung der Komplexe an der Zellkernmembran und kaum Akkumulation im Zellkern.

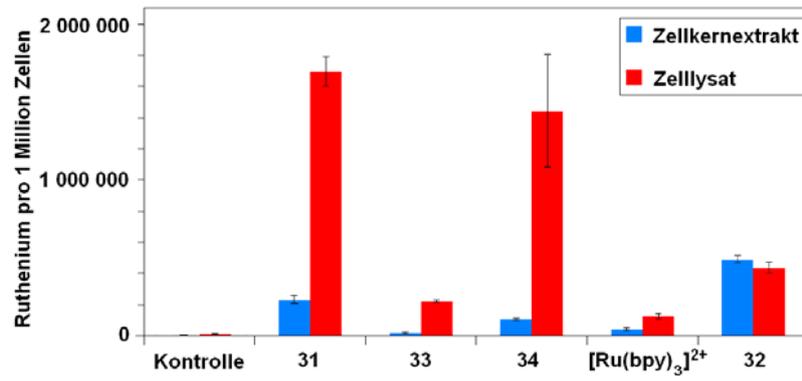


Abbildung 58 ICP-MS-Messung von Zellkernextrakt (blau) und Zelllysate (rot) von HeLa-Zellen ohne Komplex (Kontrolle) und inkubiert mit 31, 33, 34, [Ru(bpy)₂dppz]²⁺ und 32 (20 μ M, 24 h, 37 $^{\circ}$ C).⁹⁸

4 Zusammenfassung

Es konnten elf Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-Komplexe mit folgender Struktur synthetisiert werden (Abbildung 59):

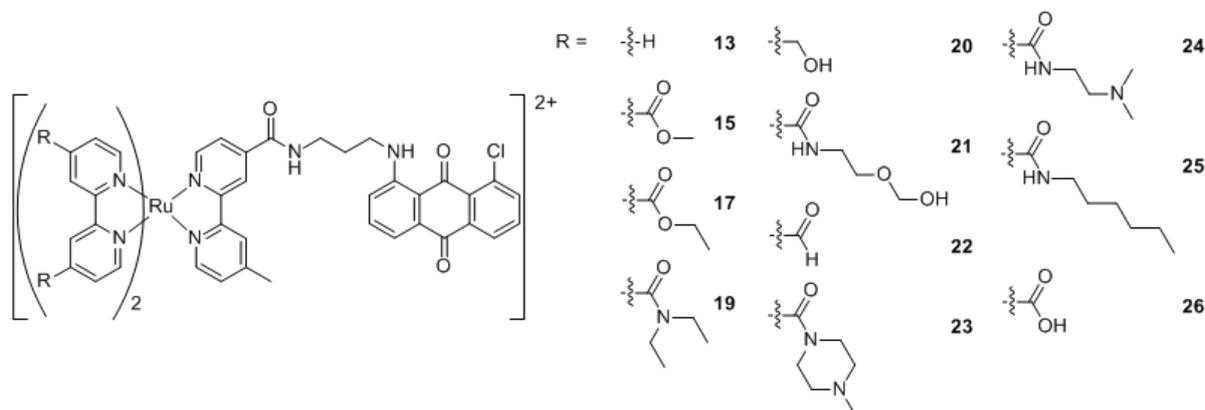


Abbildung 59 Übersicht der synthetisierten Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-Komplexe.

Die in den Komplexen koordinierte Anthraquinoneinheit erhöhte hierbei die Zellgängigkeit und die Wechselwirkung mit Polynukleotiden.

Durch pH-Titrationen konnte gezeigt werden, dass **23** und **24** vierfach protoniert (somit sechsfach positiv geladen), **26** vierfach deprotoniert (somit zweifach negativ geladen) und die restlichen Komplexe weder protoniert noch deprotoniert, also zweifach positiv geladen, im physiologisch relevanten pH-Bereich vorliegen.

Der Einfluss der Funktionalisierung der Bipyridine auf die Wechselwirkung der Komplexe mit ssRNA und dsDNA wurde fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Es zeigte sich, dass die sechsfach positive Ladung der Komplexe **23** und **24** die Wechselwirkung mit Polynukleotiden im Vergleich zum unsubstituierten Komplex **13** erhöht. Zu Wasserstoffbrückenbindungenbefähigte Gruppen (Hydroxy **20**, Ethoxyethanol **21**) verbesserten die Wechselwirkung zusätzlich. Der Aldehyd-funktionalisierte Komplex **22** wies eine sehr hohe Affinität zu RNA und DNA auf. Die stärkste Affinität für DNA zeigte Komplex **21**. Der beobachtete Fluoreszenzanstieg ist zwölfmal größer bei Zugabe von DNA als bei RNA.

Aufnahmegeschwindigkeit, -mechanismus und Verteilung der Komplexe wurden an vier unterschiedlichen kanzerogenen Zelllinien untersucht. Es wurden die drei adhärenenten humanen Zelllinien HeLa (Zervixkarzinom), U373-G (malignes Glioblastom) und LNCaP (Prostatakarzinom) und die humane Suspensionslinie HL-60 (akute myeloische Leukämie) verwendet.

Es wird angenommen, dass lipophilere Verbindungen von Zellen schneller aufgenommen werden als hydrophilere. Mittels Durchflusszytometrie wurden die Aufnahmegeschwindigkeiten der Komplexe in den unterschiedlichen Zelllinien ermittelt. Die adhären Zellen akkumulierten den zweitlipophilsten Komplex **22** am schnellsten, gefolgt von den lipophilen Komplexen **13**, **15**, **17** und **19**. Der lipophilste Komplex **25** wurde nur mit mittlerer Geschwindigkeit von den adhären Zellen aufgenommen. Die Suspensionszellen HL-60 zeigten eine der Lipophilie der Komplexe entsprechende Aufnahmegeschwindigkeit. Der lipophilste Komplex **25** wurde am schnellsten von den Zellen aufgenommen, in der Anfangsgeschwindigkeit gefolgt von **22**. Die eher hydrophilen Komplexe **20**, **21**, **23** und **24** wurden relativ langsam akkumuliert.

Um zwischen energieabhängigem und -unabhängigem Transport in die Zellen zu unterscheiden, wurden diese bei 4 °C bzw. 37 °C für 1 h mit den Komplexlösungen (20 µM) inkubiert und die mit Durchflusszytometer gemessenen Fluoreszenzintensitäten miteinander verglichen. Diese deuteten daraufhin, dass die Komplexe von allen Zelllinien zu einem Großteil über energieabhängigen Transport aufgenommen wurden. Eine Ausnahme bildeten die Komplexe **19**, **22**, **25** und **26**, die von HL-60-Zellen hauptsächlich mittels energieunabhängigen Transports akkumuliert wurden. Weiterhin besaßen die Komplexe **22** bei HeLa-Zellen, **19** und **21** bei U373-G-Zellen und **19**, **20**, **21** und **23** bei LNCaP-Zellen einen Anteil an energieunabhängiger Zellaufnahme.

Nach Inkubation jeder Zelllinie mit den unterschiedlichen Komplexlösungen (20 µM, Medium, 4 h, 37 °C) konnte die Verteilung der Komplexe in den Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Die Komplexe verteilten sich in jeder Zelllinie ähnlich und führten zu punktförmigem Anfärben im Zytoplasma mit Aussparung des Zellkerns. Die Hauptfluoreszenz bei HeLa-Zellen war in zellkernnahen Regionen zu sehen, wohingegen sich die Komplexe in U373-G-Zellen gleichmäßig und punktförmig mit Aussparung des Nukleus verteilten. LNCaP-Zellen zeigten verstärkte Komplexanlagerung in peripheren Gebieten der Zellen mit schwächerer Anlagerung um den Zellkern. Vom Rand des Zellkerns bis zur Zellmembran waren die HL-60-Zellen gleichmäßig und punktförmig angefärbt. Komplex **24** besaß in allen Zelllinien die stärkste Fluoreszenzintensität. **[Ru(bpy)₃]²⁺** und **26** wiesen die schwächsten Intensitäten auf.

Außerdem wurden folgende Poly(di-2-pyridylamin)ruthenium(II)-Komplexe synthetisiert und hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften, Erkennung von DNA-Defektstrukturen sowie zellulären Verteilung untersucht (Abbildung 60).

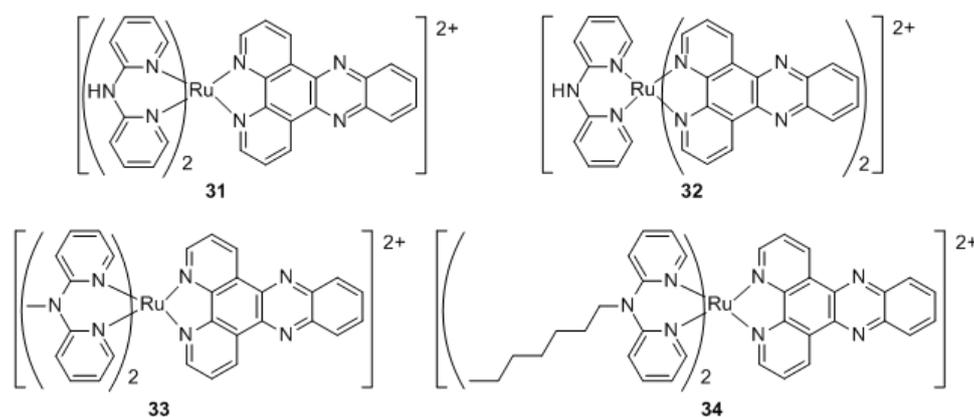


Abbildung 60 Übersicht der synthetisierten Poly(di-2-pyridylamin)ruthenium(II)-Komplexe.

Komplexe **31** - **34** zeigten keine Fluoreszenz in Wasser. Die Fluoreszenz wird in protischen Lösungsmitteln durch Protonentransfer an die Phenazinstickstoffatome des **dppz**-Ligands im angeregten Zustand gelöscht. In Acetonitril wies **31** kaum Fluoreszenz auf. Von ähnlichen Komplexen wurde in der Literatur beschrieben, dass sie nur starke Fluoreszenz bei tiefen Temperaturen (-196 °C) aufweisen. **32**, **33** und **34** zeigten in Acetonitril eine Intensitätsverstärkung der Fluoreszenz um das vierzig-, fünf- bzw. sechsfache.

Der Ligand **dppz** ist ein bekannter DNA-Interkalator. Durch die Interkalation in dsDNA sind die Phenazinstickstoffatome vor Protonentransfer geschützt und Fluoreszenz der Rutheniumkomplexe ist detektierbar. Interkalation ist bevorzugt an Basenfehlpaarungen der DNA möglich. Die Fähigkeit der Komplexe **32** - **34**, Basenfehlpaarungen (mmDNA = falsch gepaartes Basenpaar) zu erkennen, wurde über Fluoreszenzspektroskopie untersucht. **32** zeigte nur einen kleinen Fluoreszenzintensitätsunterschied zwischen fehlerfreier DNA und mmDNA. **33** und **34** hingegen wiesen eine größere Fluoreszenzintensitätssteigerung bei Bindung an mmDNA gegenüber fehlerfreier DNA auf.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Komplexe **31** (50 µM), **32** (10 µM), **33** (50 µM) und **34** (1 µM) innerhalb 24 h von HeLa-Zellen akkumuliert wurden. Sie zeigten die für Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexe typische punktförmige Verteilung im Zytoplasma ohne Färbung des Nukleus. Hier zeigte sich deutlich, dass die Komplexe in ihrer Lipophilie entsprechenden Konzentrationen in den Zellen sichtbar waren. Erstaunlich ist, dass der wenig fluoreszierende Komplex **31** in HeLa-Zellen detektiert werden konnte. Dies lässt darauf schließen, dass freie Amingruppen die Aufnahme in HeLa-Zellen fördern, was auch anhand von ICP-MS-Messungen an Zelllysat und -kernextrakt bestätigt werden konnte. Komplex **31** wurde von HeLa-Zellen in etwa der gleichen Menge aufgenommen wie der lipophilste Komplex **34**.

5 Experimenteller Teil

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Chemikalien und Geräte

Die Chemikalien wurden von Acros Organics (Geel, Belgien), Deutero (Kastellaun, Deutschland), Invitrogen (Carlsbad, USA), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland), Vector Laboratories (Burlingame, USA) und VWR (Brisbane, USA) bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Außerdem wurden Chemikalien von der Chemikalienausgabe der Fakultät für Chemie der Universität Heidelberg und dem Theoretikum der Universität Heidelberg ohne weitere Reinigung verwendet.

Die NMR-Spektren wurden auf einem Varian 300 MHz (Santa Clara, USA), Bruker AVANCE II 400 (Ettlingen, Deutschland) oder Bruker AVANCE III 600 (Ettlingen, Deutschland) NMR-Spektrometer aufgenommen. Als interner Standard wurden die Restprotonen der deuterierten Lösungsmittel verwendet:

CDCl_3	$^1\text{H } \delta = 7,26$	$^{13}\text{C } \delta = 77,0$
CD_3OD	$^1\text{H } \delta = 3,31$	$^{13}\text{C } \delta = 49,1$
$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$	$^1\text{H } \delta = 2,50$	$^{13}\text{C } \delta = 39,4$
CD_3CN	$^1\text{H } \delta = 1,94$	$^{13}\text{C } \delta = 1,2$
$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	$^1\text{H } \delta = 2,05$	$^{13}\text{C } \delta = 30,8$

Spinmultiplizitäten wurden mit s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), p (Quintett), dd (Dublett von Dublett), ddd (Dublett von Dublett von Dublett), dq (Dublett von Quartett), m (Multipllett) und br s (breites Signal) abgekürzt. Die Zuordnung der quartären Kohlenstoffatome (C_q), CH-, CH_2 - und CH_3 -Gruppen wurde mit Hilfe von 135-DEPT- und HSQC-Spektren vorgenommen. Die ESI-Massenspektren wurden auf einem Q-Tof Ultima API Massenspektrometer von Micromass/Waters (Milford, USA), auf einem ApexQe FT-ICR Massenspektrometer der Firma Bruker (Ettlingen, Deutschland) oder auf einem Finnigan LCG Ion Trap (Palo Alto, USA) im ESI^+ -Modus aufgenommen. Die Proben wurden als 10^{-4} bis 10^{-5} molare Lösungen in Acetonitril, Methanol bzw. Methanol/Dimethylsulfoxid in die Probenkammer eingebracht. Die Massenspektren der Oligonukleotide wurden auf einem Voyager DE-PRO MALDI-TOF Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems (Vernon Hills, USA) aufgenommen.

Die UV/Vis-Spektren wurden auf einem Varian Cary 100BIO- (Darmstadt, Deutschland) bzw. Beckmann DU7400-Spektrometer (Fullerton, USA) aufgenommen. Die Extinktions-

koeffizienten wurden aus dem Mittelwert von drei Messungen bestimmt. Die Konzentration der Komplexe **31 - 34** wurde mittels ICP-MS (Hewlett-Packard 4500, Wilmington, USA) bestätigt.

Fluoreszenzspektren wurden auf einem Fluorescence Spectrometer Modell Cary Eclipse von Varian (Darmstadt, Deutschland) mit einem Multiplate Assay Reader oder ISS-K2 Multifrequenz Phase Fluorometer (Champaign, USA) bei Raumtemperatur gemessen.

Alle Reaktionen, die Ruthenium enthielten, wurden unter Argonatmosphäre durchgeführt. Die Komplexe **20 - 26** wurden in Anlehnung an Literaturprotokollen hergestellt.^{61, 62, 63}

Analytische HPLC wurde mit einer Shimadzu (Duisburg, Deutschland) durchgeführt, die mit einem UV/Vis-Detektor ausgestattet war. Als feste Phase wurde eine Nucleosil C18 Säule (250 x 4,6 mm) und als mobile Phase ein Wasser (0,1 % Trifluoressigsäure)/Acetonitril-Gradient verwendet. Die ersten 5 min wurden nur mit Wasser (0,1 % Trifluoressigsäure) getrennt. Anschließend wurde der Anteil an Acetonitril innerhalb von 10 min auf 15 % erhöht. In den nächsten 60 min wurde die Acetonitrilkonzentration auf 85 % erhöht und in weiteren 10 min auf 100 % gesteigert.

Die Reinigung der Komplexe **31 - 34** wurde an einem Hewlett-Packard 1100 Hochdruckflüssigchromatographen (Wilmington, USA) durchgeführt. Dieser war mit einem Diodendetektor und einer Varian DynaMax C18 semipräparativen Säule ausgestattet. Die Komplexe wurden durch einen Wasser (0,1 % Trifluoressigsäure)/Acetonitril (0,1 % Trifluoressigsäure)-Gradienten gereinigt. Dazu wurde der Anteil an Acetonitril (0,1 % Trifluoressigsäure) zunächst für 5 min auf 15 % belassen und dann innerhalb von 60 min von 15 % auf 85 % und innerhalb von 5 min von 85 % auf 99 % erhöht.

Präparative Umkehrphasen-HPLC wurde an einer Gilson (Middleton, USA) präparativen HPLC mit einem Knauer Smartline UV Detektor 2600 durchgeführt. Hierbei wurde eine Gorom-Sil 120 ODS-4HE Säule mit einer Länge von 250 mm, einem Durchmesser von 30 mm und einer Porengröße von 10 µm verwendet. Als Lösungen kamen Acetonitril und Wasser mit 0,1 % Trifluoressigsäure zum Einsatz. Es wurde ein Gradient angewendet, bei dem mit 85 % Wasser (0,1 % Trifluoressigsäure) und 15 % Acetonitril begonnen wurde. In 60 min wurde dieses Verhältnis umgekehrt und nach 85 min war das Endverhältnis 1 % Wasser (0,1% Trifluoressigsäure) zu 99 % Acetonitril erreicht.

Die Oligonukleotide wurden auf einem Applied Biosystems (Vernon Hills, USA) 3400 DNA Synthesizer mittels Standardphosphoramiditchemie hergestellt. Die DNA wurde mit einem Ammoniumacetatpuffer (50 mM)/Acetonitril-Gradienten auf einer Hewlett-Packard 1100 HPLC (Wilmington, USA) gereinigt. Im ersten HPLC-Lauf wurde die Acetonitril-

konzentration innerhalb von 30 min von 2 % auf 68 % erhöht, im zweiten HPLC-Lauf innerhalb von 25 min von 2 % auf 85,5 %.

Messungen des pH-Werts wurden mit einer Mikro-pH-Einstabmesskette der Firma Orion (Cambridge, USA) durchgeführt.

Für die Durchflusszytometrie wurde ein Durchflusszytometer accuri C6 Flow Cytometer der Firma Accuri (Ann Arbor, USA) verwendet.

Die konfokalen Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem TSC SP5 X Konfokalen-Laser-Raster-Mikroskop der Firma Leica (Wetzlar, Deutschland) aufgenommen. Angeregt wurde mit 488 nm und die Fluoreszenz im Bereich von 600-750 nm mittels PMT (100 %) bzw. mittels APD (630 nm +/- 37,5 nm) detektiert. Die Zellaufnahmen der Komplexe **31 - 34** wurden auf einem Zeiss (Thornwood, USA) LSM 510 invertiertem Mikroskop durchgeführt. Die optische Schnittdicke wurde auf 1,1 µm gesetzt. Die Rutheniumkomplexe wurden mit 488 nm angeregt und die Emission wurde ab 560 nm detektiert.

5.1.2 Zelllinien⁹⁹

In der vorliegenden Arbeit wurden die humanen adhärennten Zelllinien HeLa, U373-G und LNCaP verwendet. Als humane Suspensionszelllinie wurde HL-60 eingesetzt.

HeLa, abgeleitet von Henrietta Lacks, der Patientin, der diese Zellen 1951 entnommen wurden, sind menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs). Aus ihnen wurde die erste menschliche Zelllinie etabliert.

Die Glioblastom-Zelllinie U373-G besteht aus Epithelgehirnzellen, die aus einem malignen Gliom entnommen wurden.

LNCaP sind Fibroblasten, die 1977 aus Lymphknotenmetastasen eines Patienten mit Prostatakarzinom entnommen wurden.

Die HL-60-Zellen sind Tochterzellen von peripheren Blutzellen, die einer Patientin mit akuter myeloischer Leukämie im Jahre 1976 entnommen wurden.

5.1.3 Medien, Lösungen, Puffer

Die Materialien für die Zellarbeiten wurden von Biochrom AG (Berlin, Deutschland), Gibco (Darmstadt, Deutschland), Invitrogen (Carlsbad, USA) und Lonza (Basel, Schweiz) erworben.

Die Zellexperimente mit den Komplexen **31 - 34** wurden mit HeLa-Zellen (ATCC, CCL2) durchgeführt, die in α -Minimal Essential Medium mit 10 % fötalem Kälberserum und 1 % Penicillin-Streptomycin (100x) kultiviert wurden.

Für die Zellexperimente an den weiteren Komplexen wurden folgende Medien, Lösungen und Puffer verwendet:

Phenolrothaltiges EMEM mit 1000 mg/l Glucose:

500 ml	EMEM
1 %	Penicillin/Streptomycin
2 mM	L-Glutamin
10 %	FCS

Phenolrotfreies DMEM mit 1000 mg/l Glucose, pH 7,4:

500 ml	DMEM
1 %	Penicillin/Streptomycin
2 mM	L-Glutamin
10 %	FCS
20 mM	HEPES

Phenolrothaltiges RPMI 1640 Medium mit 1000 mg/l Glucose:

500 ml	RPMI 1640, phenolrothaltig
1 %	Penicillin/Streptomycin
2 mM	L-Glutamin
10 %	FCS

Phenolrotfreies RPMI 1640 Medium mit 1000 mg/l Glucose:

500 ml	RPMI 1640, phenolrotfrei
1 %	Penicillin/Streptomycin
2 mM	L-Glutamin
10 %	FCS

HEPES-Glucose-Puffer, pH 7,2:

115,0 mM	NaCl
1,2 mM	CaCl ₂
1,2 mM	MgCl ₂
1,2 mM	K ₂ HPO ₄
20,0 mM	HEPES
10,0 mM	Glucose

Penicillin/Streptomycin-Lösung:

5000 U/ml	Penicillin G
5000 U/ml	Streptomycin-Sulfat

In physiologischer Kochsalzlösung (Lagerung: -20°C)

5.1.4 Methoden

5.1.4.1 *Messung der pH-Abhängigkeit der Absorption und Emission der Komplexe 13, 20, 24 und 26*

Eine 5 µM Lösung des jeweiligen Komplexes wurde in 2 ml Wasser hergestellt. Durch Zugabe von wenigen Mikrolitern an 10 M, 1 M und 0,1 M Salzsäure bzw. Natronlauge wurde die Lösung auf pH-Werte im Bereich von pH 1 – 12 eingestellt. Der pH-Wert wurde direkt in der Küvette mit einer Mikro-pH-Einstabmesskette überprüft. Nach Einstellen des pH-Werts wurde erst ein Absorptionsspektrum (250-700 nm) und anschließend ein Emissionsspektrum ($\lambda_{\text{ex}} = 468 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500-900 \text{ nm}$, PMT 800 V) bei Raumtemperatur aufgenommen.

5.1.4.2 *Messung der pH-Abhängigkeit der Absorption der Komplexe 31 - 34³⁷*

Eine 20 µM Lösung der Komplexe wurde in 100 ml Wasser hergestellt. Unter Rühren wurde die Lösung mit wenigen Mikrolitern konzentrierter Salzsäure bzw. konzentrierter Natronlauge titriert. Der pH-Wert wurde mit einer internen pH-Elektrode gemessen. An verschiedenen pH-Werten wurde 1 ml entnommen und ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Anschließend wurde der Milliliter wieder zur Titrierlösung gegeben und mit dem Experiment fortgefahren. Es wurde im pH-Bereich von 1 – 13 gemessen.

5.1.4.3 *Bestimmung des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten*^{48, 84}

Die Lipophilie der Komplexe wurde über die sogenannte „Shake-Flask“-Methode bestimmt und ist definiert als $\log P_{ow} = \log (C_{Octanol}/C_{Wasser})$. 0,5 μ l der Komplexstammlösung wurden mit 750 μ l Wasser verdünnt, das vorher über Nacht mit 1-Octanol gesättigt wurde. Nach Überschichtung mit 750 μ l 1-Octanol, das über Nacht mit Wasser gesättigt wurde, wurde das Reaktionsgefäß (Eppendorf 1,5 ml) 100-mal invertiert, um das Gleichgewicht zwischen den beiden Phasen einzustellen. Nach Zentrifugieren (10000 rpm, 5 min) wurde je 500 μ l jeder Phase in eine Küvette gegeben und die Konzentration der Komplexe über Absorptionsspektroskopie bestimmt. Die $\log P_{ow}$ -Werte wurden bei Wellenlängen für den LC-Übergang bestimmt. Es wurden je drei Bestimmungen durchgeführt und daraus die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

5.1.4.4 *Bestimmung der Wechselwirkung der Komplexe mit Polynukleotiden (RNA und DNA)*

Wenn nicht anders angegeben, wurde eine 20 μ M Komplexlösung in 10 mM MOPS (pH 7) und 50 mM Natriumchloridlösung vorbereitet. Diese Lösungen wurden im Fluoreszenzspektrometer ($\lambda_{ex} = 468$ nm, $\lambda_{em} = 500-800$ nm, PMT 800 V) gemessen. Anschließend wurden Äquivalente einer RNA- bzw. DNA-Lösung (10 μ M bezogen auf Nukleotid) hinzugegeben und spektroskopisch vermessen. Gleichzeitig wurden entsprechende Volumenäquivalente an Wasser zu einer weiteren Komplexlösung hinzugefügt und spektroskopisch gemessen. Um Verdünnungseffekte auszuschließen, wurde die prozentuale Änderung bei Wasserzugabe mit der prozentualen Änderung bei Zugabe von RNA bzw. DNA verrechnet.

5.1.4.5 *Bestimmung der Wechselwirkung der Komplexe mit Oligonukleotiden*³⁹

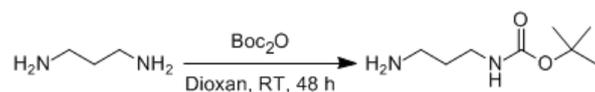
Es wurden Komplexlösungen ohne DNA bzw. mit jeweils einem Äquivalent mDNA, mmDNA und abDNA in der jeweils angegebenen Konzentration in 5 mM TRIS (pH 7,5) und 50 mM Natriumchloridlösung hergestellt. Die Fluoreszenzspektren der jeweiligen Lösungen wurden bestimmt ($\lambda_{ex} = 440$ nm, $\lambda_{em} = 500-800$ nm, Verstärkung 8).

5.2 Synthesen zu „Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-Komplexe – zelluläre Aufnahmestudien“

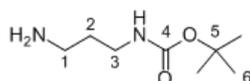
(Literaturbekannte Verbindungen sind mit * gekennzeichnet)

5.2.1 Darstellung des Transportmoleküls bpy-T

5.2.1.1 Synthese von (3-Aminopropyl)-carbaminsäure-tert-butylester (I*)⁵²



Di-*tert*-butyl-dicarbonat (16,7 g, 77 mmol, 1,0 eq) wurde in 100 ml Dioxan gelöst und die Lösung unter Rühren über eine Dauer von 4 h zu einer Lösung aus Diaminopropan (32 ml, 380 mmol, 4,9 eq) in 200 ml Dioxan getropft. Anschließend wurde die weiße, trübe Mischung für weitere 48 h gerührt. Das zweifach geschützte Nebenprodukt wurde abfiltriert und mit viermal 25 ml Ether gewaschen. Das Filtrat wurde auf die Hälfte eingeeengt. Nach Zugabe von 500 ml Wasser fiel erneut zweifachgeschütztes Nebenprodukt aus, das wieder abfiltriert wurde. Aus dem Filtrat wurde viermal mit 125 ml Methylenchlorid das gewünschte Produkt extrahiert. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels blieb ein gelbliches Öl (12,2 g, 70 mmol, 91 %) zurück; (Literaturausbeute: 52 %).

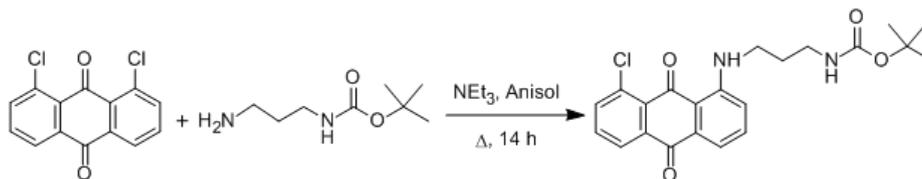


¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,38 (s, 9 H, H 6), 1,55 (p, J = 6,6 Hz, 2 H, H 2), 2,70 (t, J = 6,6 Hz, 2 H, H 1), 3,14 (q, J = 6,6 Hz, 2 H, H 3), 5,04 (s, 1 H, NH).

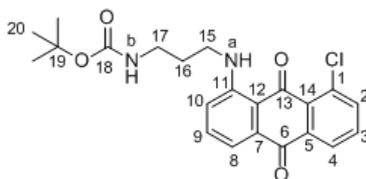
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 28,4 (C 6), 33,2 (C 2), 38,3 (C 3), 39,5 (C 1), 79,0 (C 5), 156,1 (C 4).

HR-ESI: berechnet für C₈H₁₉N₂O₂⁺: 175,1447; gef.: 175,1445.

5.2.1.2 Synthese von (1-Amino-8-chloroanthracinon)-propyl-3-carbaminsäure-tert-butylester (T-Boc)



Eine gelbe Suspension aus 3,46 g 1,8-Dichloroanthracinon (12,5 mmol, 1 eq) und 4,36 g **1** (25,0 mmol, 2 eq) in 100 ml Anisol wurden mit 3,50 ml Triethylamin (25,0 mmol, 2 eq) versetzt und unter Argon für 14 h bei 135 °C gerührt. Die rote Lösung wurde im Vakuum eingengt. Der Feststoff wurde in 100 ml Chloroform gelöst und zweimal mit 100 ml gesättigter Ammoniumchloridlösung und 100 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und vom Lösungsmittel im Vakuum befreit. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Chloroform/Methanol 99,98:0,02). Es wurden 1,95 g (4,7 mmol, 38 %) eines roten Feststoffs erhalten.

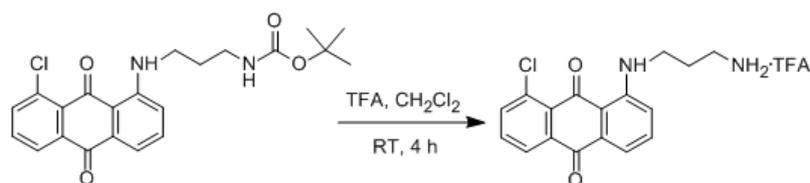


¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,44 (s, 9 H, H 20), 1,95 (p, $J = 6,9$ Hz, 2 H, H 16), 3,33 (zwei t, $J = 6,9$ Hz, $J = 6,9$ Hz, 4 H, H 15/H 17), 4,75 (br s, 1 H, NH b), 7,03 (m, 1 H, H 10), 7,53 (m, 3 H, H 9/H 8/H 3), 7,73 (dd, $J = 6,5$ Hz, $J = 1,4$ Hz, 1 H, H 2), 8,20 (dd, $J = 6,2$ Hz, $J = 1,4$ Hz, 1 H, H 4), 9,57 (t, $J = 5,0$ Hz, 1 H, NH a).

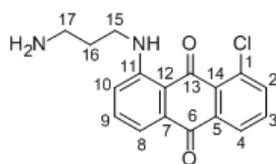
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 28,4 (C 20), 29,6 (C 16), 38,4 (C 17), 40,5 (C 15), 79,3 (C 19), 113,8 (C 12), 115,1 (C 10), 118,1 (C 8), 126,3 (C 4), 130,6 (C 14), 132,6 (C 3), 133,5 (C 7), 134,4 (C 1), 135,0 (C 9), 135,4 (C 5), 137,9 (C 2), 151,3 (C 11), 156,0 (C 18), 182,8/184,0 (C 6/C 13).

HR-ESI: berechnet für C₂₂H₂₄N₂O₄Cl⁺: 415,1425; gef.: 415,1429.

5.2.1.3 Synthese von 1-(3-Aminopropylamino)-8-chloroanthrachinon (T)



1,95 g **T-Boc** (4,7 mmol) wurden in 10 ml Dichlormethan gelöst und unter Rühren mit einem Überschuss an Trifluoressigsäure (3,50 ml, 47,0 mmol, 10 eq) versetzt. Nach 4 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und aus Methanol/Diethylether umkristallisiert. Es wurden 1,80 g (4,2 mmol, 89 %) eines roten Feststoffs isoliert.



¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 2,11 (p, $J = 7,6$ Hz, 2 H, H 16), 3,13 (t, $J = 7,6$ Hz, 2 H, H 17), 3,52 (t, $J = 7,6$ Hz, 2 H, H 15), 7,25 (d, $J = 8,6$ Hz, 1 H, H 10), 7,52 (dd, $J = 7,4$ Hz, $J = 0,9$ Hz, 1 H, H 8), 7,61 (dd, $J = 8,6$ Hz, $J = 7,4$ Hz, 1 H, H 9), 7,70 (t, $J = 7,8$ Hz, 1 H, H 3), 7,84 (dd, $J = 8,0$ Hz, $J = 1,3$ Hz, 1 H, H 2), 8,22 (dd, $J = 7,7$ Hz, $J = 1,3$ Hz, 1 H, H 4).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 28,2 (C 16), 38,7 (C 17), 40,7 (C 15), 115,0 (C 12), 116,2 (C 10), 119,4 (C 8), 127,3 (C 4), 131,5 (C 14), 134,2 (C 3), 134,7 (C 7), 135,6 (C 1), 136,2 (C 9), 136,7 (C 5), 139,2 (C 2), 152,2 (C 11), 183,7/185,0 (C 6/C 13).

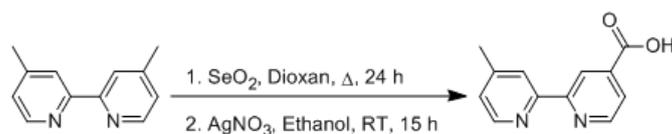
HR-ESI: berechnet für C₁₇H₁₆N₂O₂Cl⁺: 315,0900; gef.: 315,0900.

Elementaranalyse: berechnet für C₁₉H₁₆N₂O₄ClF₃: 53,22 % C, 3,76 % H, 6,53 % N; gef.: 52,92 % C, 3,75 % H, 6,53 % N.

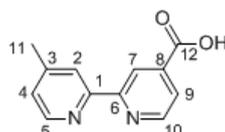
UV/Vis (H₂O): λ_{\max} [nm] (ϵ [M⁻¹·cm⁻¹]) = 515 (6800).

Fluoreszenz (H₂O): λ_{em} [nm] = 650.

5.2.1.4 Synthese von 4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-carbonsäure (2*)⁵³



Eine Suspension aus 6,0 g 4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridin (32,6 mmol, 1,0 eq) und 4,7 g Selendioxid (42,7 mmol, 1,3 eq) in 350 ml Dioxan wurde für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Der entstandene Niederschlag wurde heiß über Celite filtriert und das Lösungsmittel des gelben Filtrats entfernt. Der Feststoff wurde in 215 ml Ethanol suspendiert und unter Rühren mit 6,1 g Silbernitrat (35,9 mmol, 1,1 eq) in 60 ml Wasser versetzt. Anschließend wurden innerhalb von 30 min 145 ml einer 1 M Natronlauge hinzugegeben. Nach 15 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Suspension eingedampft, filtriert und der Feststoff zweimal mit je 45 ml 1,3 M wässriger Natronlauge und einmal mit 45 ml Wasser gewaschen. Die vereinigten basischen Filtrate wurden viermal mit 150 ml Dichlormethan gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 4 N Salzsäure/Essigsäure (1:1) auf pH 3,5 eingestellt und für 5 h bei -22 °C gelagert. Die Suspension wurde auf Raumtemperatur gebracht, der entstandene Niederschlag abfiltriert und über Nacht im Exsikkator getrocknet. Anschließend wurde der Feststoff für 72 h in einer Soxhlet-Apparatur mit Aceton extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurden 3,7 g (17,5 mmol, 54 %) eines weißen Feststoffs erhalten; (Literaturausbeute: 72 %).



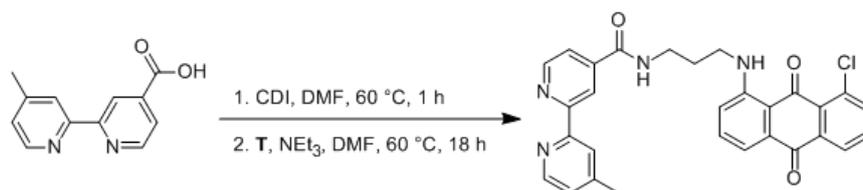
¹H-NMR (400 MHz, (CD₃)₂SO): δ [ppm] = 2,46 (s, 3 H, H 11), 7,41 (dq, $J = 5,2$ Hz, $J = 0,9$ Hz, 1 H, H 4), 7,89 (dd, $J = 5,0$ Hz, $J = 1,6$ Hz, 1 H, H 9), 8,34 (s, 1 H, H 2), 8,60 (d, $J = 5,2$ Hz, 1 H, H 5), 8,81 (dd, $J = 1,5$ Hz, $J = 0,8$ Hz, 1 H, H 7), 8,88 (dd, $J = 5,0$ Hz, $J = 0,8$ Hz, 1 H, H 10).

¹³C-NMR (100 MHz, (CD₃)₂SO): δ [ppm] = 20,8 (C 11), 119,8 (C 7), 121,8 (C 2), 123,2 (C 9), 125,7 (C 4), 139,4 (C 3), 148,2 (C 5), 149,8 (C 6), 150,3 (C 10), 153,1 (C 1), 155,2 (C 8), 165,9 (C 12).

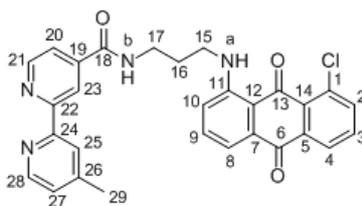
HR-ESI: berechnet für C₁₂H₁₁N₂O₂⁺: 215,0821; gef.: 215,0823.

Elementaranalyse: berechnet für C₁₂H₁₀N₂O₂: 67,28 % C, 4,71 % H, 13,08 % N; gef.: 65,60 % C, 4,66 % H, 12,69 % N.

5.2.1.5 Synthese von 4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-carbonsäure-(1-amino-8-chloro-anthracinon)-propylamid (bpy-T)



Eine Lösung aus 835 mg **2** (3,9 mmol, 1 eq) und 632 mg Carbonyldiimidazol (3,9 mmol, 1 eq) in 25 ml absolutem Dimethylformamid wurde für 1 h unter Argonatmosphäre bei 60 °C gerührt. Zu dieser Lösung wurde 1,665 g **T** (3,9 mmol, 1 eq) und 544 µl Triethylamin (3,9 mmol, 1 eq) in 20 ml Dimethylformamid langsam zugetropft und über Nacht bei 60 °C gerührt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte säulenchromatographisch (Kieselgel, Chloroform/Methanol 9:1). Das Produkt wurde als roter Feststoff (1,945 g, 3,8 mmol, 97 %) erhalten.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2,15 (p, J = 6,7 Hz, 2 H, H 16), 2,43 (s, 3 H, H 29), 3,49 (q, J = 6,3 Hz, 2 H, H 15), 3,71 (q, J = 6,4 Hz, 2 H, H 17), 6,81 (br s, 1 H, NH b), 7,09 (t, J = 4,9 Hz, 1 H, H 10), 7,13 (d, J = 4,3 Hz, 1 H, H 27), 7,54 (m, 3 H, H 3/H 8/H 9), 7,70 (dd, J = 8,0 Hz, J = 1,2 Hz, 1 H, H 2), 7,76 (dd, J = 5,0 Hz, J = 1,6 Hz, 1 H, H 20), 8,18 (m, 2 H, H 4/H 25), 8,44 (d, J = 5,0 Hz, 1 H, H 28), 8,56 (s, 1 H, H 23), 8,75 (d, J = 4,9 Hz, 1 H, H 21), 9,67 (t, J = 4,9 Hz, 1 H, NH a).

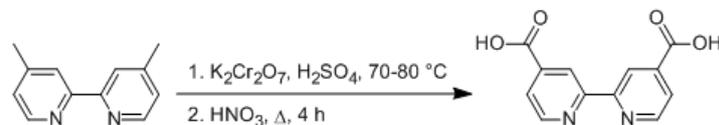
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 21,2 (C 29), 28,9 (C 16), 38,5 (C 17), 41,0 (C 15), 114,0 (C 12), 115,4 (C 8), 117,3 (C 23), 118,2 (C 10), 121,1 (C 20), 122,8 (C 25), 125,2 (C 27), 126,3 (C 4), 130,5 (C 7), 132,6 (C 3), 133,6 (C 1), 134,5 (C 5), 135,2 (C 9), 135,5 (C 14), 137,9 (C 2), 142,4 (C 22), 148,4 (C 26), 148,8 (C 28), 150,1 (C 21), 151,2 (C 11), 154,6 (C 24), 156,6 (C 19), 165,8 (C 18), 182,8/184,2 (C 6/C 13).

HR-ESI: berechnet für C₂₉H₂₄N₄O₃Cl⁺: 511,1537; gef.: 511,1537.

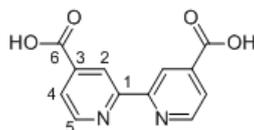
Elementaranalyse: berechnet für C₂₉H₂₃N₄O₃Cl: 68,17 % C, 4,54 % H; 10,96 % N, gef.: 66,56 % C, 4,45 % H, 10,60 % N.

5.2.2 Darstellung der Bipyridin-Liganden

5.2.2.1 Synthese von 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bipyridin (3*)⁵⁴



Zu einer Lösung aus 4,0 g 4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridin (22 mmol, 1,0 eq) in 105 ml konzentrierter Schwefelsäure wurden portionsweise 19,3 g Kaliumdichromat (73 mmol, 3,3 eq) hinzugegeben, so dass die Temperatur zwischen 70 °C und 80 °C gehalten wurde. Nach Abkühlen auf 40 °C wurde die grüne Suspension auf Eiswasser gegeben (650 g) und der Niederschlag abfiltriert. Der Feststoff wurde so lange mit Wasser gewaschen, bis das Filtrat nur noch schwach gelblich war. Der gelbliche Feststoff wurde in 140 ml 50 %iger Salpetersäure gelöst und für 4 h unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung zum Auskristallisieren auf Eiswasser geben und für 30 min bei 4 °C gelagert. Filtrieren, Waschen mit Wasser und Aceton und anschließendem Trocknen im Vakuum lieferte einen weißen Feststoff in 91 % Ausbeute (4,0 g, 20 mmol); (Literaturausbeute 94 %).



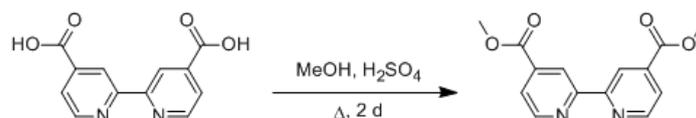
¹H-NMR (400 MHz, (CD₃)₂SO): δ [ppm] = 7,92 (dd, $J = 5,0\text{ Hz}$, $J = 1,4\text{ Hz}$, 2 H, H 4), 8,85 (br s, 2 H, H 2), 8,92 (d, $J = 4,8\text{ Hz}$, 2 H, H 5).

¹³C-NMR (100 MHz, (CD₃)₂SO): δ [ppm] = 119,5 (C 4), 123,4 (C 2), 139,5 (C 3), 150,6 (C 5), 155,5 (C 1), 166,0 (C 6).

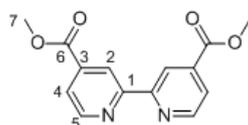
HR-ESI: berechnet für C₁₂H₉N₂O₄⁺: 245,0562; gef.: 245,0565.

Elementaranalyse: berechnet für C₁₂H₈N₂O₄: 59,02 % C, 3,41 % H, 11,61 % N; gef.: 58,76 % C, 3,41 % H, 11,61 % N.

5.2.2.2 Synthese von 4,4'-Dimethoxycarbonyl-2,2'-bipyridin (4*)⁵⁵



Eine Suspension aus 1,46 g **3** (6 mmol, 1 eq) und 2,6 ml konzentrierter Schwefelsäure in 22 ml Methanol wurde für 2 d bei 70 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 60 ml Wasser hinzugegeben und die Lösung mit 25 %iger Natronlauge auf pH 8 eingestellt. Die entstandene Suspension wurde dreimal mit je 60 ml Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Es wurden 1,12 g des Produkts (4 mmol, 67 %) als weißes Pulver erhalten; (Literaturausbeute: 99 %).



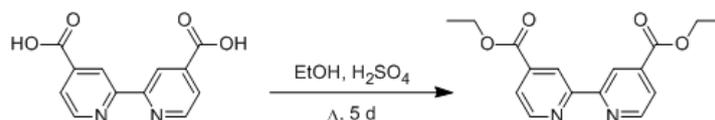
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3,99 (s, 6 H, H 7), 7,90 (dd, $J = 4,8$ Hz, $J = 1,2$ Hz, 2 H, H 4), 8,86 (d, $J = 4,8$ Hz, 2 H, H 5), 8,96 (br s, 2 H, H 2).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 52,8 (C 7), 120,6 (C 2), 123,3 (C 4), 138,7 (C 3), 150,0 (C 5), 156,2 (C 1), 165,5 (C 6).

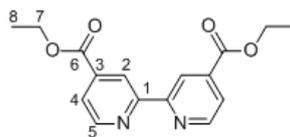
HR-ESI: berechnet für C₁₄H₁₃N₂O₄⁺: 273,0875; gef.: 273,0896.

Elementaranalyse: berechnet für C₁₄H₁₂N₂O₄: 61,76 % C, 4,44 % H, 10,25 % N; gef.: 61,69 % C, 4,42 % H, 10,25 % N.

5.2.2.3 Synthese von 4,4'-Diethoxycarbonyl-2,2'-bipyridin (5*)¹⁰⁰



2,4 g **3** (9,8 mmol, 1 eq) wurden in 190 ml Ethanol suspendiert und mit 5 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 5 d unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung mit 190 ml Wasser versetzt und das Ethanol im Vakuum entfernt. Die Suspension wurde mit 5 M Natronlauge auf pH 7 eingestellt, der Niederschlag abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Phosphorpentoxid im Vakuum wurde **5** (2,5 g, 8,3 mmol, 85 %) als weißes Pulver erhalten; (Literaturausbeute: 90 %).



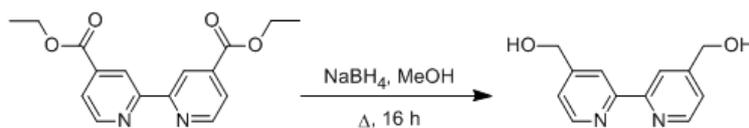
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1,44 (t, $J = 7,2$ Hz, 6 H, H 8), 4,46 (q, $J = 7,2$ Hz, 4 H, H 7), 7,92 (dd, $J = 5,1$ Hz, $J = 1,8$ Hz, 2 H, H 4), 8,87 (d, $J = 5,1$ Hz, 2 H, H 5), 8,96 (br s, 2 H, H 2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14,3 (C 8), 61,9 (C 7), 120,6 (C 2), 123,3 (C 4), 139,0 (C 3), 150,0 (C 5), 156,2 (C 1), 165,0 (C 6).

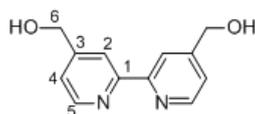
HR-ESI: berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4^+$: 301,1188; gef.: 301,1202.

Elementaranalyse: berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$: 63,99 % C, 5,37 % H, 9,33 % N; gef.: 63,75 % C, 5,36 % H, 9,26 % N.

5.2.2.4 Synthese von 4,4'-Bis-(hydroxymethyl)-2,2'-bipyridin (6*)¹⁰⁰



600 mg **5** (2,0 mmol, 1,0 eq) wurden in 40 ml absolutem Methanol suspendiert. Natriumborhydrid (1,642 g, 43,4 mmol, 21,7 eq) wurde vorsichtig hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 16 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 40 ml gesättigte Ammoniumchloridlösung hinzugegeben, um überschüssiges Natriumborhydrid zu quenchen. Methanol wurde im Vakuum entfernt und der Niederschlag in wenig Wasser gelöst. Die resultierende Lösung wurde fünfmal mit je 50 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das gewünschte Produkt wurde als weißes Pulver erhalten (290 mg, 1,3 mmol, 65 %); (Literaturausbeute: 79 %).



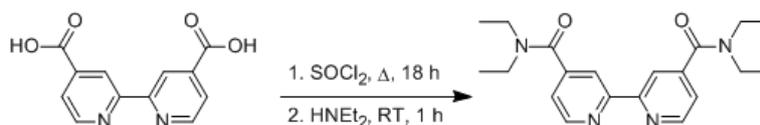
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 4,75 (s, 4 H, H 6), 7,43 (d, $J = 4,8$ Hz, 2 H, H 4), 8,27 (s, 2 H, H 2), 8,59 (d, $J = 4,8$ Hz, 2 H, H 5).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 63,6 (C 6), 120,2 (C 2), 122,7 (C 4), 150,2 (C 5), 154,4 (C 1), 157,2 (C 3).

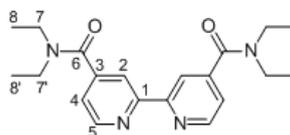
HR-ESI: berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2^+$: 217,0977; gef.: 217,0952.

Elementaranalyse: berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 0,25 \text{H}_2\text{O}$: 65,29 % C, 5,71 % H, 12,69 % N; gef.: 65,65 % C, 5,64 % H, 12,40 % N.

5.2.2.5 Synthese von 4,4'-Diethylamidocarbonyl-2,2'-bipyridin (7*)⁵⁶



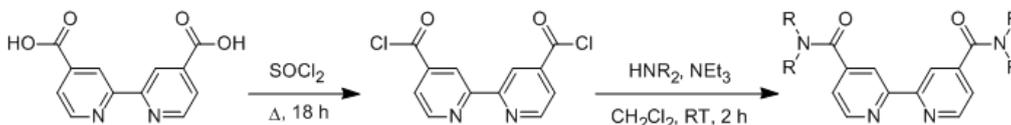
244 mg **3** (1,0 mmol, 1 eq) wurden in 5,0 ml Thionylchlorid unter Argonatmosphäre für 18 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde überschüssiges Thionylchlorid im Vakuum entfernt. Der gelbliche Rückstand wurde in 4,0 ml absolutem Dichlormethan gelöst und tropfenweise mit 1,7 ml Diethylamin (16,4 mmol, 8,2 eq pro COOH-Gruppe) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das zurückbleibende Öl wurde säulenchromatographisch (neutrales Aluminiumoxid, Dichlormethan/Methanol 99:1) vorgereinigt. Anschließend wurde das Öl in heißem Acetonitril gelöst und unter Rühren in Diethylether getropft, um protoniertes Diethylamin zu entfernen. Nach Filtration der Suspension wurde das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und mit 40 ml Diethylether/Hexan (1:1) versetzt. Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum lieferte 170 mg eines gelben Feststoffs (0,5 mmol, 50 %); (Literaturausbeute: 54 %).



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1,11 (t, $J = 7,2$ Hz, 6 H, H 8), 1,25 (t, $J = 7,2$ Hz, 6 H, H 8'), 3,23 (q, $J = 7,2$ Hz, 4 H, H 7), 3,55 (q, $J = 7,2$ Hz, 4 H, H 7'), 7,28 (d, $J = 4,8$ Hz, 2 H, H 4), 8,39 (br s, 2 H, H 2), 8,70 (d, $J = 4,8$ Hz, 2 H, H 5).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 12,8 (C 8'), 14,2 (C 8), 39,3 (C 7'), 43,2 (C 7), 118,1 (C 2), 121,0 (C 4), 145,8 (C 3), 149,6 (C 5), 155,8 (C 1), 168,6 (C 6).

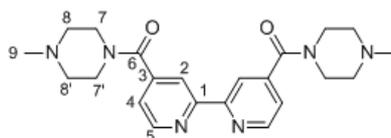
5.2.2.6 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von 4,4'-Bis-(alkylamido-carbonyl)-2,2'-bipyridinen



1 eq **3** wurde in einem Überschuss Thionylchlorid unter Argonatmosphäre für 18 h unter Rückfluss erhitzt. Das restliche Thionylchlorid wurde im Vakuum entfernt und der resultierende Feststoff in absolutem Dichlormethan aufgenommen. Diese Lösung wurde zu einer Lösung aus 2,2 eq Alkylamin und 2,2 eq Triethylamin in Dichlormethan getropft. Die Reaktionslösung wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Wasser wurde für 15 min weitergerührt. Im Falle der Bildung eines Feststoffs wurde dieser abfiltriert, mit Dichlormethan und Wasser gewaschen und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet. Bei einer Phasentrennung wurde die wässrige Phase abgetrennt und noch dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

4,4'-Bis-(N'-methylpiperazin-N-amidocarbonyl)-2,2'-bipyridin (**8**)

Nach Umkristallisation aus Chloroform wurden 121 mg eines weißen Feststoffs (0,30 mmol, 30 %) erhalten.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2,34 (s, 6 H, H 9), 2,39 (br s, 4 H, H 8), 2,54 (br s, 4 H, H 8'), 3,45 (br s, 4 H, H 7), 3,84 (br s, 4 H, H 7'), 7,33 (dd, $J = 4,8$ Hz, $J = 1,6$ Hz, 2 H, H 4), 8,41 (br s, 2 H, H 2), 8,74 (dd, $J = 4,8$ Hz, $J = 0,8$ Hz, 2 H, H 5).

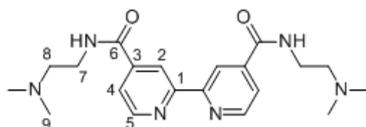
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 41,8 (C 7'), 45,9 (C 9), 47,3 (C 7), 54,5 (C 8'), 55,1 (C 8), 118,6 (C 2), 121,6 (C 4), 144,5 (C 3), 149,8 (C 5), 155,9 (C 1), 167,7 (C 6).

HR-ESI: berechnet für C₂₂H₂₉N₆O₂⁺: 409,2347; gef.: 409,2348.

Elementaranalyse: berechnet für C₂₂H₂₈N₆O₂: 64,68 % C, 6,91 % H, 20,57 % N; gef.: 62,71 % C, 6,74 % H, 19,71 % N.

4,4'-Bis-(N',N'-Dimethylethylendiamin-N-amidocarbonyl)-2,2'-bipyridin (9)

Der erhaltene Feststoff wurde säulenchromatographisch (Kieselgel, Chloroform/Methanol 2:1 und 3 % Triethylamin) gereinigt. Nach Umkristallisation aus Chloroform wurde **9** als weißer Feststoff (190 mg, 0,49 mmol, 49 %) erhalten.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2,30 (s, 12 H, H 9), 2,57 (t, $J = 5,6$ Hz, 4 H, H 8), 3,58 (q, $J = 5,6$ Hz, 4 H, H 7), 7,10 (br s, 2 H, NH), 7,78 (dd, $J = 4,8$ Hz, $J = 1,6$ Hz, 2 H, H 4), 8,69 (br s, 2 H, H 2), 8,82 (d, $J = 4,8$ Hz, 2 H, H 5).

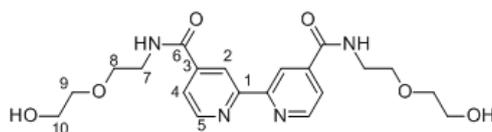
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 37,4 (C 7), 45,2 (C 9), 57,6 (C 8), 118,0 (C 2), 122,0 (C 4), 143,0 (C 3), 150,1 (C 5), 156,2 (C 1), 165,5 (C 6).

HR-ESI: berechnet für C₂₀H₂₉N₆O₂⁺: 385,2347; gef.: 385,2347.

Elementaranalyse: berechnet für C₂₀H₂₈N₆O₂: 62,48 % C, 7,34 % H, 21,86 % N; gef.: 61,65 % C, 7,26 % H, 21,40 % N.

4,4'-Bis-(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl-1-amidocarbonyl)-2,2'-bipyridin (10)

Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, Chloroform/Methanol 7:1) wurden 60 mg eines weißen Feststoffs (0,14 mol, 56 %) erhalten.



¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 3,59 (m, 4 H, H 7), 3,64 (m, 4 H, H 10), 3,69 (m, 8 H, H 8/H 9), 7,79 (dd, $J = 5,2$ Hz, $J = 1,2$ Hz, 2 H, H 4), 8,78 (d, $J = 1,2$ Hz, 2 H, H 2), 8,82 (d, $J = 5,2$ Hz, 2 H, H 5).

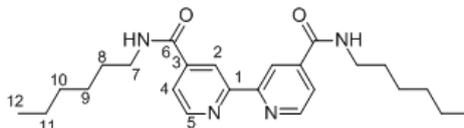
¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 41,2 (C 10), 62,3 (C 9), 70,5 (C 8), 73,5 (C 7), 120,1 (C 2), 123,0 (C 4), 144,6 (C 3), 151,2 (C 5), 157,6 (C 1), 168,3 (C 6).

HR-ESI: berechnet für C₂₀H₂₇N₄O₆⁺: 419,1931; gef.: 419,1960.

Elementaranalyse: berechnet für C₂₀H₂₆N₄O₆: 57,41 % C, 6,26 % H, 13,39 % N; gef.: 56,66 % C, 6,18 % H, 13,12 % N.

4,4'-Bis-(hexylamidocarbonyl)-2,2'-bipyridin (**11**)

Das Produkt wurde abfiltriert, mit Dichlormethan gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 167 mg eines weißen Pulvers (0,40 mmol, 80 %) erhalten.



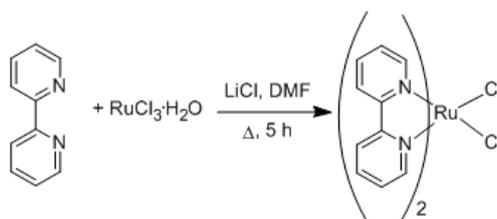
¹H-NMR (400 MHz, (CD₃)₂SO): δ [ppm] = 0,87 (t, $J = 6,6$ Hz, 6 H, H 12), 1,30 (m, 12 H, H 9/H 10/H 11), 1,55 (m, 4 H, H 8), 3,29 (m, 4 H, H 7), 7,84 (dd, $J = 5,3$ Hz, $J = 1,4$ Hz, 2 H, H 4), 8,78 (s, 2 H, H 2), 8,74 (d, $J = 5,3$ Hz, 2 H, H 5), 8,94 (t, $J = 5,4$ Hz, 2 H, NH).

HR-ESI: berechnet für C₂₄H₃₅N₄O₂⁺: 411,2755; gef.: 411,2755.

Elementaranalyse: berechnet für C₂₄H₃₄N₄O₂: 70,21 % C, 8,35 % H, 13,65 % N; gef.: 69,92 % C, 8,23 % H, 13,80 % N.

5.2.3 Darstellung der Rutheniumkomplexe [RuL₂(bpy-T)]Cl₂

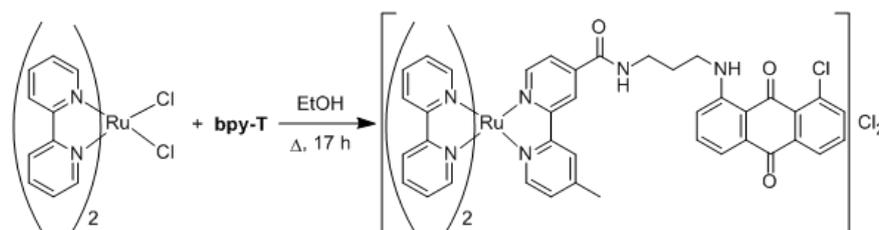
5.2.3.1 Synthese von *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂] (**12***)⁵⁷



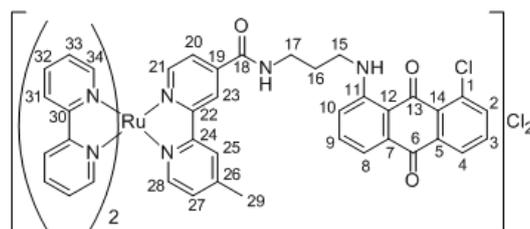
Eine Lösung aus 500 mg Rutheniumtrichlorid-Hydrat (1,90 mmol, 1 eq), 597 mg 2,2'-Bipyridin (3,82 mmol, 2 eq) und 161 mg Lithiumchlorid (3,82 mmol, 2 eq) in 7 ml absolutem Dimethylformamid wurden unter Argonatmosphäre für 5 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 25 ml Aceton hinzugegeben und über Nacht (4 °C, 18 h) gekühlt. Durch Filtration erhielt man dunkelgrüne Kristalle. Diese wurde solange mit Wasser gewaschen bis die dünnschichtchromatographische Kontrolle (Acetonitril/Wasser/gesättigte Kaliumnitratlösung 5:1:1) keinen Tris(bipyridyl)ruthenium(II)komplex mehr aufwies. Anschließend wurde der Feststoff dreimal mit je 5 ml Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 427 mg (0,88 mmol, 46 %) eines grünen Pulvers erhalten; (Literaturausbeute: 65-70 %).

HR-ESI: berechnet für C₂₀H₁₆N₄ClRu⁺: 449,0107; gef.: 449,0099.

5.2.3.2 Synthese von $[Ru(bpy)_2(bpy-T)]Cl_2$ (**13**)



52 mg **12** (0,10 mmol, 1 eq) in 30 ml Ethanol wurden mit 51 mg **bpy-T** (0,1 mmol, 1 eq) gemischt und für 17 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Umkristallisation (Chloroform/Diethylether) wurden 82 mg dunkel-braunrote Kristalle erhalten (0,08 mmol, 80 %).



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 2,12 (p, $J = 6,5$ Hz, 2 H, H 16), 2,56 (s, 3 H, H 29), 3,50 (t, $J = 6,5$ Hz, 2 H, H 17), 3,66 (t, $J = 6,5$ Hz, 2 H, H 15), 7,20 (d, $J = 8,6$ Hz, 1 H, H 10), 7,36 (d, $J = 5,6$ Hz, 1 H, H 27), 7,39 (d, $J = 7,1$ Hz, 1 H, H 8), 7,49 (m, 5 H, H 9/H 33), 7,63 (d, $J = 5,5$ Hz, 1 H, H 28), 7,67 (d, $J = 7,8$ Hz, 1 H, H 3), 7,74 (dd, $J = 8,0$ Hz, $J = 1,1$ Hz, 1 H, H 2), 7,80 (m, 4 H, H 34), 7,85 (dd, $J = 5,9$ Hz, $J = 1,6$ Hz, 1 H, H 20), 7,93 (d, $J = 5,9$ Hz, 1 H, H 21), 8,14 (m, 5 H, H 4/H 32), 8,66 (s, 1 H, H 25), 8,71 (dd, $J = 8,0$ Hz, $J = 2,8$ Hz, 4 H, H 31), 9,09 (d, $J = 1,1$ Hz, 1 H, H 23).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 21,3 (C 29), 29,8 (C 16), 39,7 (C 15), 42,1 (C 17), 114,4 (C_q), 116,0 (C 8), 119,8 (C 10), 123,1 (C 23), 125,7 (C 31), 126,3 (C 20), 126,9 (C 4), 127,4 (C_q), 129,0 (C 33), 130,2 (C 27), 131,8 (C_q), 134,2 (C 3), 134,8 (C_q), 135,5 (C 9), 136,3 (C_q), 136,8 (C_q), 139,2 (C 2), 139,4 (C 32), 143,8 (C_q), 151,8 (C 28), 152,4 (C_q), 152,7 (C 34), 153,3 (C 21), 157,6 (C_q), 158,5 (C_q), 159,4 (C_q), 165,9 (C 18), 184,0/185,0 (C 6/C 13).

HR-ESI: berechnet für $\text{C}_{49}\text{H}_{39}\text{N}_8\text{O}_3\text{ClRu}^+$: 924,1877; gef.: 924,1890.

Elementaranalyse: berechnet für $\text{C}_{49}\text{H}_{39}\text{N}_8\text{O}_3\text{Cl}_3\text{Ru} \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$: 56,57 % C, 4,26 % H, 10,77 % N; gef.: 56,48 % C, 4,19 % H, 11,04 % N.

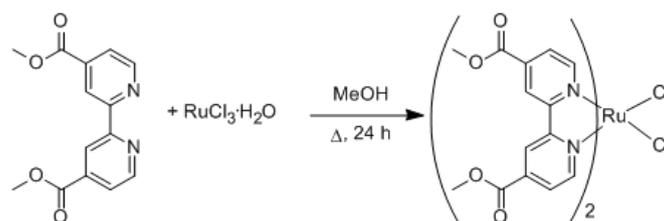
UV/Vis (H_2O): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]) = 286 (61800), 468 (14200).

Fluoreszenz (H_2O): λ_{em} [nm] = 638.

Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient: -1,317 +/- 0,019.

Retentionszeit (analytische HPLC): 50,1 min.

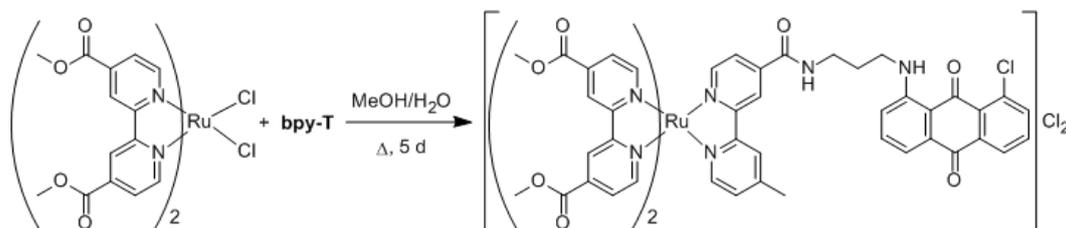
5.2.3.3 Synthese von *cis*-[Ru(4)₂Cl₂] (14*)⁵⁸



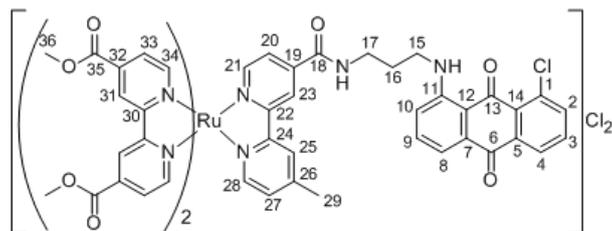
Es wurde eine Abwandlung der Vorschrift von *McFarland et al.*⁵⁸ verwendet. 613 mg **4** (2,25 mmol, 1,9 eq) und 245 mg Rutheniumtrichlorid-Hydrat (1,18 mmol, 1 eq) wurden in 25 ml Methanol unter Argonatmosphäre für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Chloroform/Methanol 95:5). Es wurden 448 mg (0,63 mmol, 53 %) eines lilafarbenen Pulver erhalten; (Literaturausbeute: 38 %).

HR-ESI: berechnet für C₂₈H₂₄N₄O₈ClRu⁺: 681,0326; gef.: 681,0290.

5.2.3.4 Synthese von [Ru(4)₂(bpy-T)]Cl₂ (15)



150 mg **14** (0,21 mmol, 1 eq) und 107 mg **bpy-T** (0,21 mmol, 1 eq) wurden in 5 ml Methanol und 3 ml Wasser unter Argonatmosphäre fünf Tage unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde in Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Chloroform/Methanol 8:2). **15** wurde als orangefarbener Feststoff (70 mg, 0,06 mmol, 29 %) erhalten.



¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 1,86 (br s, 2 H, H 16), 2,58 (s, 3 H, H 29), 3,20 (br s, 2 H, H 17), 3,35 (s, 9 H, H 36), 3,53 (br s, 2 H, H 15), 3,98 (m, 3 H, H 36'), 6,87 (d,

$J = 8,4$ Hz, 1 H, H 10), 7,04 (d, $J = 7,2$ Hz, 1 H, H 8), 7,23 (d, $J = 7,6$ Hz, 1 H, H 9), 7,41 (d, $J = 5,6$ Hz, 1 H, H 27), 7,53 (m, 2 H, H 2/H 3), 7,66 (d, $J = 5,6$ Hz, 1 H, H 28), 7,93 (m, 6 H, H 4/H 20/H 33), 8,06 (m, 3 H, H 21/H 34), 8,13 (m, 2 H, H 34'), 8,85 (s, 1 H, H 25), 9,05 (d, $J = 6,0$ Hz, 2 H, H 31), 9,11 (s, 2 H, H 31'), 9,29 (s, 1 H, H 23).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 21,5 (C 29), 29,9 (C 16), 39,4 (C 15), 42,0 (C 17), 49,9 (C 36), 114,4 (C_q), 115,9 (C 8), 119,7 (C 10), 123,5 (C 23), 125,1 (C 31), 126,9 (C 25), 127,3 (C 21), 127,5 (C 4/C 20), 128,2 (C 33), 130,6 (C 27), 131,1 (C_q), 134,2 (C_q), 134,3 (C 3), 135,2 (C_q), 136,1 (C 9), 136,5 (C_q), 139,2 (C 2), 140,3 (C_q), 140,4 (C_q), 144,5 (C_q), 152,1 (C 28), 152,3 (C_q), 153,3 (C_q), 153,9/154,1 (C 34/C 34'), 154,4 (C 21), 157,1 (C_q), 158,8/159,0 (2 C_q), 165,0/165,1 (C 35/C 35'), 165,4 (C 18), 183,4 /184,4 (C 6/C 13).

HR-ESI: berechnet für $\text{C}_{57}\text{H}_{47}\text{N}_8\text{O}_{11}\text{ClRu}^+$: 1156,2096; gef.: 1156,2123.

Elementaranalyse: berechnet für $\text{C}_{57}\text{H}_{47}\text{N}_8\text{O}_{11}\text{Cl}_3\text{Ru} \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$: 49,91 % C, 4,63 % H, 8,17 % N; gef.: 50,01 % C, 4,18 % H, 8,16 % N.

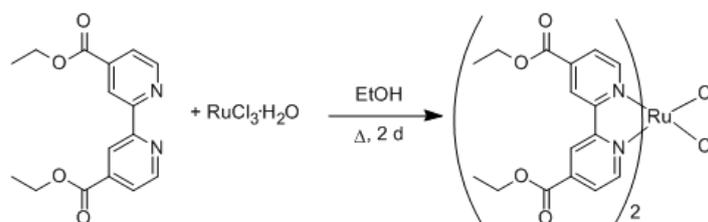
UV/Vis (H_2O): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]) = 307 (47200), 480 (18200).

Fluoreszenz (H_2O): λ_{em} [nm] = 649.

Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient: -0,708 +/- 0,007.

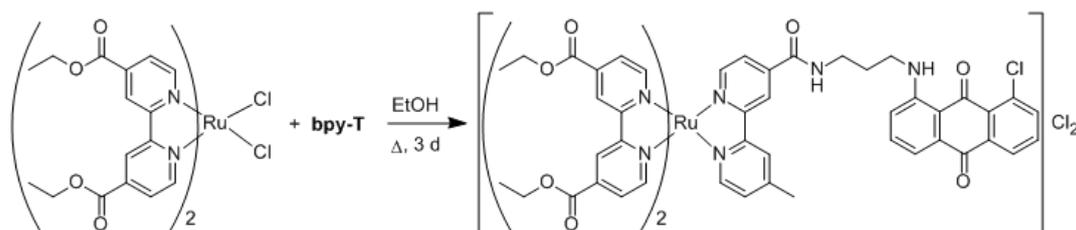
Retentionszeit (analytische HPLC): 52,2 min.

5.2.3.5 Synthese von *cis*-[Ru(5)₂Cl₂] (16*)⁵⁹

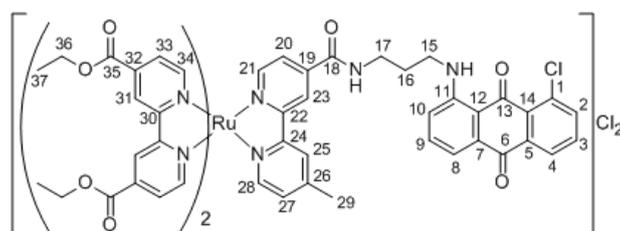


Eine Lösung aus **5** (150 mg, 0,50 mmol, 2 eq) und Rutheniumtrichlorid-Hydrat (52 mg, 0,25 mmol, 1 eq) wurde unter Argonatmosphäre für zwei Tage unter Rückfluss erhitzt. Säulenchromatographische Reinigung (Kieselgel, Chloroform/MeOH 95:5) lieferte das lilafarbene Produkt in 64 % Ausbeute (120 mg, 0,16 mmol) und dieses wurde ohne Charakterisierung in der Folgereaktion verwendet; (keine Literatursausbeute angegeben).

5.2.3.6 Synthese von $[Ru(5)_2(bpy-T)]Cl_2$ (**17**)



585 mg **16** (0,76 mmol, 1 eq) und 388 mg **bpy-T** (0,76 mmol, 1 eq) wurden in 30 ml Ethanol unter Argonatmosphäre für drei Tage unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Chloroform/Methanol 85:15). **17** wurde als orange-brauner Feststoff (300 mg, 0,23 mmol, 30 %) erhalten.



1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 1,40 (m, 12 H, H 37), 1,79 (s, 2 H, H 16), 2,60 (s, 3 H, H 29), 3,11 (s, 2 H, H 17), 3,50 (s, 2 H, H 15), 4,43 (m, 8 H, H 36), 6,80 (d, $J = 8,8$ Hz, 1 H, H 10), 6,96 (d, $J = 7,2$ Hz, 1 H, H 8), 7,19 (t, $J = 7,8$ Hz, 1 H, H 9), 7,45 (d, $J = 5,6$ Hz, 1 H, H 27), 7,50 (d, $J = 4,0$ Hz, 2 H, H 2/H 3), 7,71 (d, $J = 5,6$ Hz, 1 H, H 28), 7,81 (t, $J = 4,4$ Hz, 1 H, H 4), 7,97 (m, 5 H, H 20/H 33), 8,13 (m, 3 H, H 21/H 34), 8,21 (t, $J = 6,2$ Hz, 2 H, H 34'), 8,92 (s, 1 H, H 25), 9,03 (d, $J = 7,2$ Hz, 2 H, H 31), 9,08 (br s, 2 H, H 31'), 9,35 (s, 1 H, H 23).

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 14,5 (C 37), 21,5 (C 29), 29,9 (C 16), 39,3 (C 15), 41,9 (C 17), 64,0 (C 35), 114,1 (C_q), 115,9 (C 8), 119,7 (C 10), 123,5 (C 23), 125,0 (C 31), 127,0 (C 28), 127,3 (C 25), 127,6 (C 20), 128,2 (C 33), 130,6 (C 27), 130,9 (C_q), 134,0 (C_q), 134,3 (C 3), 135,1 (C_q), 136,1 (C 9), 136,3 (C_q), 139,2 (C 2), 140,4 (C_q), 140,5 (C_q), 140,9 (C_q), 144,3 (C_q), 152,1 (C 28), 153,2 (C_q), 153,9/154,2 (C 34/C 34'), 154,5 (C 21), 157,0 (C_q), 158,7-159,0 (4 C 32), 164,5/164,6 (C 35/C 35'), 165,2 (C 18), 183,2/184,1 (C 6/C 13).

HR-ESI: berechnet für $C_{61}H_{55}N_8O_{11}ClRu^{2+}$: 606,1362; gef.: 606,1365.

Elementaranalyse: berechnet für $C_{61}H_{55}N_8O_{11}Cl_3Ru \cdot 3 H_2O$: 54,77 % C, 4,60 % H, 8,38 % N; gef.: 54,53 % C, 4,64 % H, 8,60 % N.

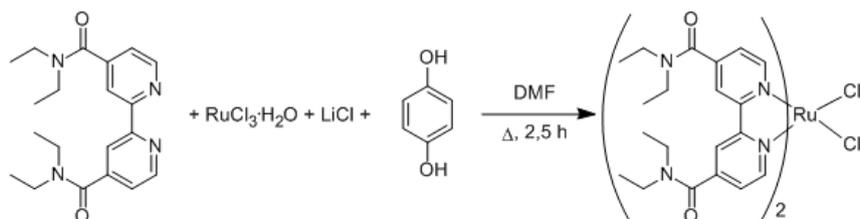
UV/Vis (H_2O): λ_{max} [nm] (ϵ [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$]) = 305 (49600), 480 (19000).

Fluoreszenz (H_2O): λ_{em} [nm] = 632.

Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient: $-0,333 \pm 0,029$.

Retentionszeit (analytische HPLC): 57,0 min.

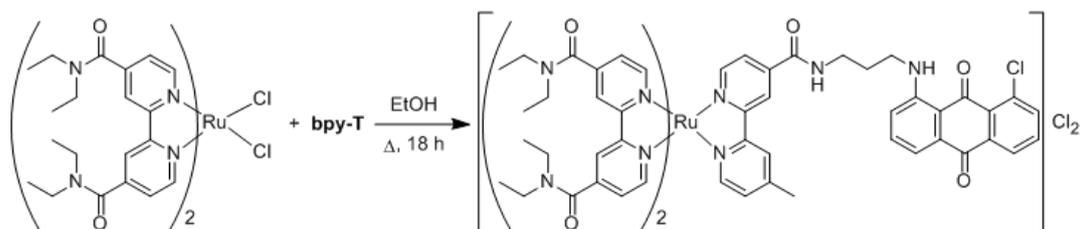
5.2.3.7 Synthese von *cis*-[Ru(7)₂Cl₂] (18*)⁵⁶



Eine Lösung aus 170 mg **7** (0,48 mmol, 2 eq), 50 mg Rutheniumtrichlorid-Hydrat (0,24 mmol, 1 eq), 66 mg Lithiumchlorid (1,56 mmol, 6,6 eq) und 21 mg Hydrochinon (0,19 mmol, 0,8 eq) in absolutem Dimethylformamid wurden für 15 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend 2,5 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das lilafarbene Öl wurde in 100 ml Chloroform aufgenommen und fünfmal mit je 100 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, Chloroform/Methanol 96:4) wurden 100 mg eines lilafarbenen Feststoffs (0,11 mmol, 46 %) erhalten; (Literaturausbeute: 95 %).

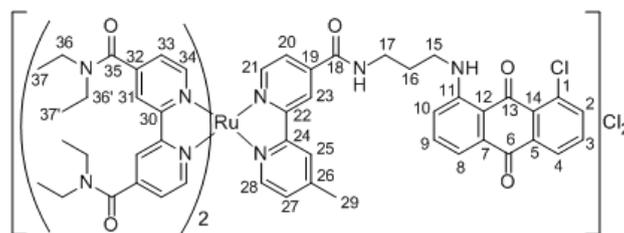
HR-ESI: berechnet für $C_{40}H_{52}N_8O_4ClRu^+$: 845,2844; gef.: 845,2910.

5.2.3.8 Synthese von [Ru(7)₂(bpy-T)]Cl₂ (19)



90 mg **18** (0,10 mmol, 1 eq) und 51 mg **bpy-T** (0,10 mmol, 1 eq) wurden in 25 ml Ethanol unter Argonatmosphäre über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel,

Chloroform/Methanol 95:5) gereinigt und aus Chloroform/Diethylether umkristallisiert. Es wurden 65 mg dunkelorange Kristalle erhalten (0,05 mmol, 50 %).



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 1,15 (m, 12 H, H 37), 1,28 (m, 12 H, H 37'), 2,14 (p, $J = 6,6$ Hz, 2 H, H 16), 2,57 (s, 3 H, H 29), 3,35 (m, 8 H, H 36), 3,53 (t, $J = 6,6$ Hz, 2 H, H 17), 3,60 (m, 8 H, H 36'), 3,68 (t, $J = 6,6$ Hz, 2 H, H 15), 7,23 (d, $J = 8,4$ Hz, 1 H, H 10), 7,41 (m, 2 H, H 8/H 27), 7,48 (m, 2 H, H 33), 7,54 (m, 3 H, H 9/H 33'), 7,66 (t, $J = 8,0$ Hz, 1 H, H 28), 7,69 (d, $J = 6,0$ Hz, 1 H, H 3), 7,77 (dd, $J = 8,0$ Hz, $J = 1,2$ Hz, 1 H, H 2), 7,88 (dd, $J = 8,0$ Hz, $J = 2,0$ Hz, 1 H, H 20), 7,91 (t, $J = 5,6$ Hz, 2 H, H 34), 7,99 (d, $J = 6,0$ Hz, 1 H, H 21), 8,02 (t, $J = 6,0$ Hz, 2 H, H 34'), 8,16 (dd, $J = 7,6$ Hz, $J = 1,2$ Hz, 1 H, H 4), 8,68 (s, 1 H, H 25), 8,86 (m, 4 H, H 31), 9,12 (d, $J = 1,2$ Hz, 1 H, H 23).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 13,0 (C 37'), 14,4 (C 37), 21,4 (C 29), 29,8 (C 16), 39,7 (C 15), 41,1 (C 36'), 42,0 (C 17), 44,9 (C 36), 113,8 (C_q), 116,0 (C 8), 119,8 (C 10), 123,3 (C 23), 123,6 (C 31), 126,0 (C 33), 126,1 (C 33'), 126,6 (C 20), 127,1 (C 25), 127,4 (C 4), 130,4 (C 27), 134,4 (C 28), 135,1 (C_q), 135,5 (C_q), 136,0 (C_q), 136,3 (C 9), 136,9 (C_q), 139,3 (C 2), 143,2 (C_q), 147,7 (C_q), 152,0 (C 3), 152,7 (C_q), 153,4-153,6 (C 34/C 34'), 153,8 (C 21), 157,5 (C_q), 158,8 (C_q), 159,3 (C_q), 168,6 (C 35), 171,2 (C 18), 184,1/185,1 (C 6/C 13).

HR-ESI: berechnet für $\text{C}_{69}\text{H}_{75}\text{N}_{12}\text{O}_7\text{ClRu}^+$: 1320,4614; gef.: 1320,4628.

Elementaranalyse: berechnet für $\text{C}_{69}\text{H}_{75}\text{N}_{12}\text{O}_7\text{Cl}_3\text{Ru} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$: 55,25 % C, 5,85 % H, 11,21 % N; gef.: 55,34 % C, 5,58 % H, 10,80 % N.

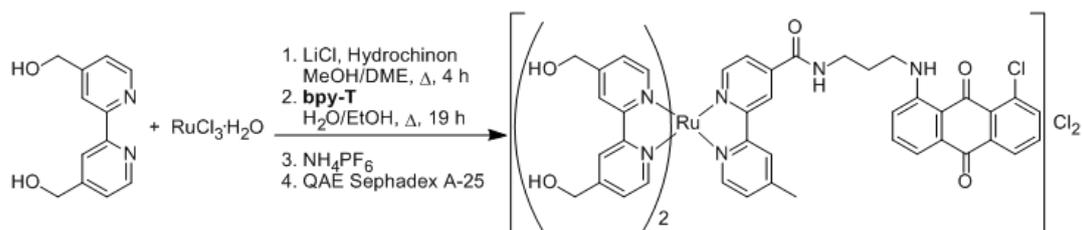
UV/Vis (H_2O): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]) = 295 (76100), 469 (21000).

Fluoreszenz (H_2O): λ_{em} [nm] = 632.

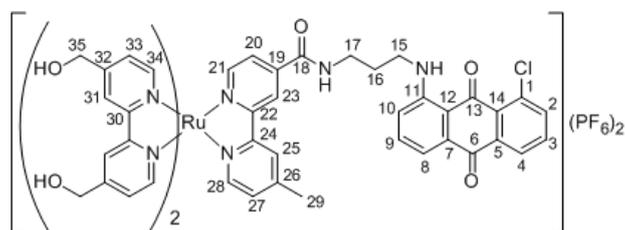
Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient: -0,888 +/- 0,021.

Retentionszeit (analytische HPLC): 54,8 min.

5.2.3.9 Synthese von $[Ru(6)_2(bpy-T)]Cl_2$ (20)



78 mg **6** (0,36 mmol, 1,8 eq), 43 mg Rutheniumtrichlorid-Hydrat (0,20 mmol, 1,0 eq), 254 mg Lithiumchlorid (6,00 mmol, 30,0 eq) und 55 mg Hydrochinon (0,50 mmol, 2,5 eq) wurden in Methanol/Dimethoxyethan (2:1) für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wurde die braune Suspension auf 20 ml Wasser gegeben und fünfmal mit Dichlormethan gewaschen. Die wässrige Phase wurde über Celite filtriert und im Vakuum eingengt. Anschließend wurden 92 mg **bpy-T** (0,18 mmol, 0,9 eq) hinzugefügt und in Wasser/Ethanol (1:2) über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung eingengt. Der Rückstand wurde in 50 ml Wasser aufgenommen und zehnmal mit je 40 ml Dichlormethan gewaschen. Die wässrige Phase wurde im Vakuum eingengt und säulenchromatographisch (Kieselgel, Aceton/Wasser/gesättigte Kaliumnitratlösung 20:1:1) gereinigt. Die orangefarbene Lösung wurde eingengt, mit Ammoniumhexafluorophosphat versetzt und zum Kristallisieren über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Der erhaltene orangefarbene Feststoff wurde abzentrifugiert, mehrmals mit Wasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Das Produkt wurde in Methanol gelöst, mit der fünffachen Menge an Anionentauscher QAE Sephadex A-25 versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration und Trocknen im Vakuum wurde das Produkt als Chloridsalz erhalten (40 mg, 0,04 mmol, 20 %).



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 2,08 (p, $J = 6,4$ Hz, 2 H, H 16), 2,52 (s, 3 H, H 29), 3,46 (t, $J = 6,6$ Hz, 2 H, H 17), 3,64 (t, $J = 6,4$ Hz, 2 H, H 15), 4,83 (m, 8 H, H 35), 7,15 (d, $J = 8,4$ Hz, 1 H, H 10), 7,33 (m, 2 H, H 8/H 27), 7,44 (m, 5 H, H 9/H 33), 7,63 (m, 2 H, H 3/H 28), 7,71 (m, 5 H, H 2/H 34), 7,79 (dd, $J = 6,0$ Hz, $J = 1,6$ Hz, 1 H, H 20), 7,95 (d, $J = 6,0$ Hz, 1 H, H 21), 8,12 (dd, $J = 7,6$ Hz, $J = 0,8$ Hz, 1 H, H 4), 8,54 (s, 1 H, H 25), 8,61 (br s, 4 H, H 31), 8,97 (d, $J = 1,2$ Hz, 1 H, H 23).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 21,3 (C 29), 29,7 (C 16), 39,8 (C 15), 42,0 (C 17), 62,9 (C 35), 114,4 (C_q), 116,0 (C 8), 119,8 (C 10), 122,6 (C 31), 122,9 (C 23), 126,1 (C 20), 126,2 (C 33), 126,9 (C 25), 127,4 (C 4), 130,1 (C 27), 131,7 (C_q), 133,6 (C_q), 134,3 (C 3), 134,8 (C_q), 136,3 (C 9), 136,8 (C_q), 139,2 (C 2), 143,6 (C_q), 150,4 (C_q), 151,8 (C 28), 152,1 (C 34), 152,7 (C_q), 153,3 (C 21), 155,8 (C_q), 157,7 (C_q), 158,1 (C_q), 158,3 (C_q), 166,1 (C 18), 184,0/185,0 (C 6/C 13).

HR-ESI: berechnet für $\text{C}_{53}\text{H}_{47}\text{N}_8\text{O}_7\text{ClRu}^+$: 1044,2300; gef.: 1044,2322.

Elementaranalyse: berechnet für $\text{C}_{53}\text{H}_{47}\text{N}_8\text{O}_7\text{P}_2\text{ClF}_{12}\text{Ru}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 45,26 % C, 3,94 % H, 7,97 % N; gef.: 44,98 % C, 3,80 % H, 7,80 % N.

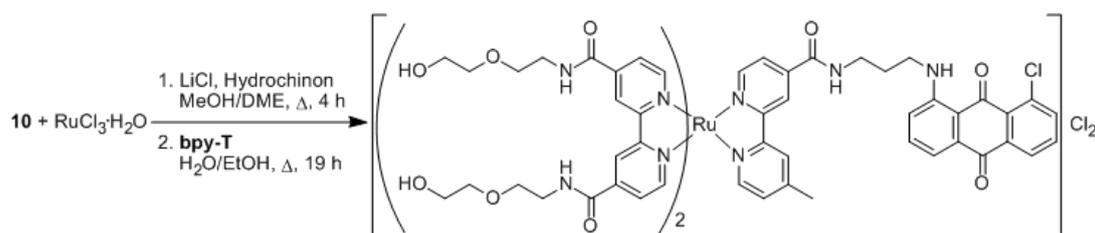
UV/Vis (H_2O): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]) = 290 (59000), 475 (14600).

Fluoreszenz (H_2O): λ_{em} [nm] = 658.

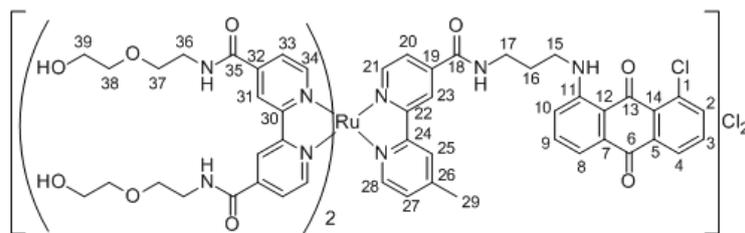
Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient: -1,397 +/- 0,022.

Retentionszeit (analytische HPLC): 45,1 min.

5.2.3.10 Synthese von $[\text{Ru}(10)_2(\text{bpy-T})]\text{Cl}_2$ (21)



38 mg **10** (0,090 mmol, 1,8 eq), 11 mg Rutheniumtrichlorid-Hydrat (0,050 mmol, 1,0 eq), 64 mg Lithiumchlorid (1,500 mmol, 30,0 eq) und 14 mg Hydrochinon (0,125 mmol, 2,5 eq) wurden in 1,5 ml Methanol/Dimethoxyethan (2:1) für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die lilafarbene Reaktionslösung auf 5 ml Wasser gegeben und fünfmal mit 5 ml Dichlormethan gewaschen. Die wässrige Phase wurde über Celite filtriert, mit Wasser nachgespült und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde mit 23 mg **bpy-T** (0,045 mmol, 0,9 mmol) versetzt und in Wasser/Ethanol (5:11) über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in 15 ml Wasser aufgenommen und fünfmal mit je 5 ml Dichlormethan gewaschen. Die wässrige Phase wurde bis zur Trockene eingengt und säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Chloroform/Methanol 4:1). Es wurden 10 mg eines orange-farbenen Produkts erhalten (7 μmol , 14 %).



¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD/CD₃CN): δ [ppm] = 2,07 (br s, 2 H, H 16), 2,57 (s, 3 H, H 29), 3,45 (t, J = 6,4 Hz, 2 H, H 17), 3,59 (m, 8 H, H 36), 3,64 (m, 10 H, H 15/H 39), 3,68 (m, 16 H, H 37/H 38), 7,15 (d, J = 8,4 Hz, 1 H, H 10), 7,34 (d, J = 5,6 Hz, 1 H, H 27), 7,37 (d, J = 6,8 Hz, 1 H, H 8), 7,50 (t, J = 8,4 Hz, 1 H, H 9), 7,61 (d, J = 6,0 Hz, 1 H, H 28), 7,65 (d, J = 8,0 Hz, 1 H, H 3), 7,73 (dd, J = 7,8 Hz, J = 1,0 Hz, 1 H, H 2), 7,80 (m, 5 H, H 20/H 33), 7,95 (m, 5 H, H 21/H 34), 8,13 (dd, J = 7,6 Hz, J = 1,2 Hz, 1 H, H 4), 8,58 (s, 1 H, H 25), 8,68 (m, 1 H, NH), 8,97 (s, 1 H, H 23), 9,09 (m, 4 H, H 31).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD/CD₃CN): δ [ppm] = 21,3 (C 29), 29,5 (C 16), 39,3 (C 15), 41,2 (C 39), 41,7 (C 17), 62,0/70,0 (C 37/C 38), 73,2 (C 36), 115,8 (C 8), 119,7 (C 10), 123,0 (C 23), 123,3 (C 31), 126,1 (C 20), 126,5 (C 33), 126,8 (C 25), 127,3 (C 4), 129,2 (C_q), 130,1 (C 27), 131,5 (C_q), 134,3 (C 3), 134,6 (C_q), 136,2 (C 9), 136,6 (C_q), 139,1 (C 2), 140,0 (C_q), 144,2 (C_q), 152,0 (C 28), 152,4 (C_q), 152,6 (C_q), 153,5 (C 34), 153,7 (C 21), 156,9 (C_q), 158,3 (C_q), 158,6 (C_q), 158,8 (C_q), 165,2 (C 18/C 35), 183,9 (C 6/C 13).

HR-ESI: berechnet für C₆₉H₇₅N₁₂O₁₅Cl₂Ru⁺: 1448,4207; gef.: 1448,4120.

Elementaranalyse: berechnet für C₆₉H₇₅N₁₂O₁₅P₂ClF₁₂Ru·3 NH₄PF₆: 37,20 % C, 3,94 % H, 9,43 % N; gef.: 37,71 % C, 3,89 % H, 10,05 % N.

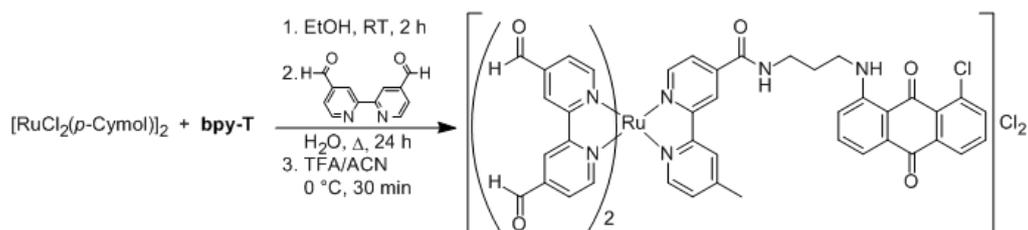
UV/Vis (H₂O): λ_{\max} [nm] (ϵ [M⁻¹·cm⁻¹]) = 303 (50600), 478 (17800).

Fluoreszenz (H₂O): λ_{em} [nm] = 639.

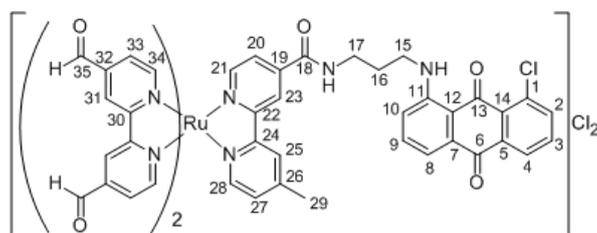
Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient: -1,510 +/- 0,030.

Retentionszeit (analytische HPLC): 42,7 min.

5.2.3.11 Synthese von $[Ru((HCO)_2bpy)_2(bpy-T)]Cl_2$ (22)



31 mg Dichloro(*p*-cymol)ruthenium(II)-Dimer (0,05 mmol, 1 eq) und 51 mg **bpy-T** (0,10 mmol, 2 eq) wurden in 3 ml absolutem Ethanol für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 43 mg 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarboxaldehyd (0,20 mmol, 4 eq) und 6 ml Wasser hinzugegeben und für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittel wurde der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Chloroform/Methanol 85:15). Die orangefarbene Bande wurde gesammelt und im Vakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 2 ml Acetonitril gelöst und bei 0 °C mit 0,5 ml konzentrierter Trifluoressigsäure versetzt. Nach 30 min Rühren bei 0 °C wurde das Lösungsmittel entfernt und aus Acetonitril/Diethylether umkristallisiert. Weitere Reinigung fand mittels Umkehrphasen-HPLC statt. Das Produkt eluierte nach 45 min. Es wurden 26 mg eines orangefarbenen Feststoffs erhalten (0,02 mmol, 20 %).



1H -NMR (400 MHz, CD_3CN): δ [ppm] = 2,02 (br s, 2 H, H 16), 2,52 (s, 3 H, H 29), 3,45 (br s, 2 H, H 17), 3,58 (br s, 2 H, H 15), 7,17 (br s, 1 H, H 10), 7,28 (d, $J = 5,6$ Hz, 1 H, H 27), 7,39 (br s, 1 H, H 8), 7,48 (d, $J = 6,0$ Hz, 1 H, H 28), 7,51 (br s, 1 H, H 9), 7,64 (m, 1 H, H 3), 7,76 (m, 7 H, H 2/H 20/H 21/H 33), 7,98 (m, 4 H, H 34), 8,14 (br s, 1 H, H 4), 8,27 (br s, 1 H, NH), 8,57 (m, 1 H, H 25), 8,97 (m, 1 H, H 23), 9,05 (m, 4 H, H 31), 10,18 (m, 4 H, H 35).

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3CN): δ [ppm] = 21,2 (C 29), 29,4 (C 16), 39,0 (C 15), 41,5 (C 17), 113,8 (C_q), 115,5 (C 8), 119,5 (C 10), 122,9 (C 23), 124,2 (C 31), 125,9 (C 20), 126,0 (C 25), 126,8-127,0 (C 33), 127,1 (C 4), 129,9 (C 27), 132,8 (C_q), 134,1 (C_q), 134,7 (C 3), 136,0 (C 9), 138,0 (C_q), 138,8 (C 2), 143,3/143,4 (2 C_q), 150,6 (C_q), 151,8 (C 28), 152,3 (C_q), 152,9 (C 21), 153,3 (C_q), 154,3 (C 34), 154,5 (C_q), 156,4 (C_q), 158,2 (C_q), 158,7/158,8 (2 C_q), 167,0 (C 18), 185,7/185,8 (C 6/C 13), 191,2 (C 35).

HR-ESI: berechnet für $C_{53}H_{39}N_8O_7ClRu^+$: 1036,1674; gef.: 1036,1672.

Elementaranalyse: berechnet für $C_{57}H_{39}N_8O_{11}ClF_6Ru \cdot 2 TFA \cdot 4 H_2O$: 46,89 % C, 3,16 % H, 7,17 % N; gef.: 46,73 % C, 3,12 % H, 7,38 % N.

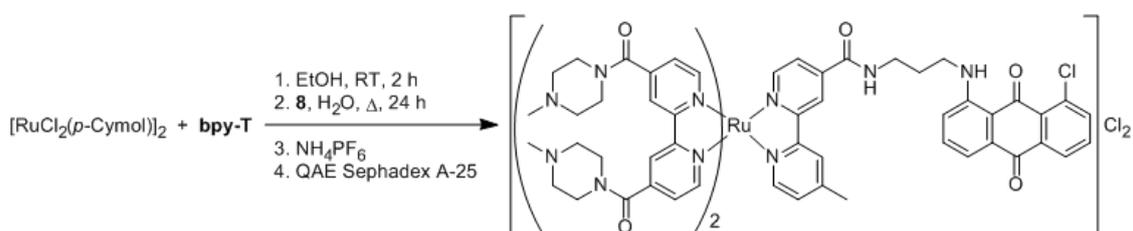
UV/Vis (H_2O): λ_{max} [nm] (ϵ [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$]) = 291 (47400), 477 (15700).

Fluoreszenz (H_2O): λ_{em} [nm] = 654.

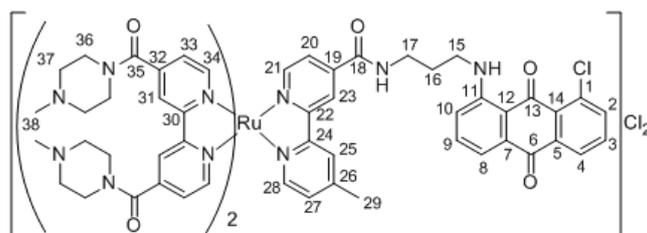
Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient: -0,239 +/- 0,049.

Retentionszeit (analytische HPLC): 44,6 min.

5.2.3.12 Synthese von $[Ru(8)_2(bpy-T)]Cl_2$ (23)



Dichloro(*p*-cymol)ruthenium(II)-Dimer (8 mg, 13 μ mol, 1 eq) und **bpy-T** (13 mg, 25 μ mol, 2 eq) wurden in 1 ml absolutem Ethanol für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von **8** (20 mg, 50 μ mol, 4 eq) und 2 ml Wasser wurde die Reaktionsmischung für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde anschließend eingengt, mit wässriger Ammoniumhexafluorophosphatlösung versetzt und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen und im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Der orangefarbene Feststoff wurde in Acetonitril/Wasser (3:2) gelöst und auf eine QAE Sephadex A-25 Anionentauschersäule gegeben. Das Chloridsalz eluierte in 56 % Ausbeute (21 mg, 14 μ mol). Ein Teil des Rohprodukts wurde mit Hilfe einer Umkehrphasen-HPLC gereinigt. Das Produkt eluierte nach 35 min. Es wurden 6,3 mg eines orange-roten Feststoffs erhalten (4 μ mol, 16 %).



1H -NMR (600 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ [ppm] = 2,07 (m, 8 H, H 37), 2,11 (p, $J = 7,2$ Hz, 2 H, H 16), 2,55 (s, 3 H, H 29), 2,87 (m, 12 H, H 38), 3,43 (br s, 16 H, H 37'/H 38), 3,56 (t, $J = 6,6$ Hz, 2 H, H 17), 3,64 (t, $J = 6,0$ Hz, 2 H, H 15), 3,74 (br s, 8 H, H 38'), 7,32 (d,

$J = 8,4$ Hz, 1 H, H 10), 7,37 (d, $J = 4,2$ Hz, 1 H, H 27), 7,44 (d, $J = 7,2$ Hz, 1 H, H 8), 7,59 (m, 5 H, H 9/H 33), 7,76 (t, $J = 7,8$ Hz, 1 H, H 3), 7,85 (d, $J = 7,8$ Hz, 1 H, H 2), 7,90 (m, 2 H, H 20/H 28), 8,14 (m, 3 H, H 21/H 34), 8,21 (m, 3 H, H 4/H 34'), 9,01 (s, 1 H, H 25), 9,27 (d, $J = 9,0$ Hz, 4 H, H 31), 9,51 (s, 1 H, H 23).

HR-ESI: berechnet für $C_{73}H_{79}N_{16}O_7ClRu^{2+}$: 714,2528; gef.: 714,2530.

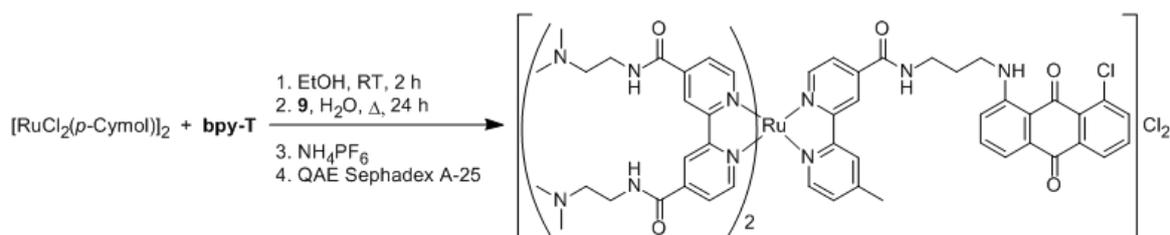
UV/Vis (H₂O): λ_{max} [nm] (ϵ [$M^{-1}\cdot cm^{-1}$]) = 297 (51200), 469 (14100).

Fluoreszenz (H₂O): λ_{em} [nm] = 633.

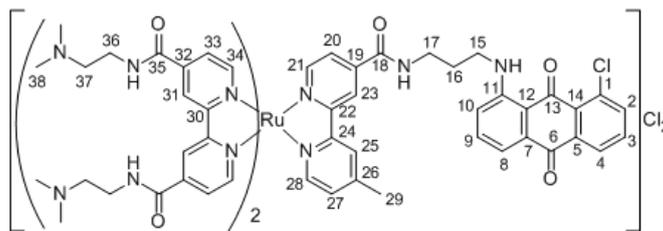
Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient: -1,779 +/- 0,067.

Retentionszeit (analytische HPLC): 35,1 min.

5.2.3.13 Synthese von $[Ru(9)_2(bpy-T)]Cl_2$ (24)



31 mg Dichloro(*p*-cymol)ruthenium(II)-Dimer (50 μ mol, 1 eq) und 51 mg **bpy-T** (100 μ mol, 2 eq) wurden in 3 ml absolutem Ethanol für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 77 mg **9** (200 μ mol, 4 eq) und 6 ml Wasser hinzugegeben und für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde eingengt, mit wässriger Ammoniumhexafluorophosphatlösung versetzt und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen und im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Der orangefarbene Feststoff wurde in Acetonitril/Wasser (3:2) gelöst und auf eine QAE Sephadex A-25 Anionentauschersäule gegeben. Das Chloridsalz eluierte in 33 % Ausbeute (47 mg, 33 μ mol). Ein Teil des Rohprodukts wurde mit Hilfe einer Umkehrphasen-HPLC gereinigt. Das Produkt eluierte nach 38 min. Es wurden 5,5 mg eines orange-roten Feststoffs (4 μ mol, 4 %) erhalten.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 2,13 (p, $J = 7,9$ Hz, 2 H, H 16), 2,57 (s, 3 H, H 29), 2,98 (s, 24 H, H 38), 3,43 (br s, 8 H, H 36), 3,53 (t, $J = 6,4$ Hz, 2 H, H 17), 3,68 (p, $J = 6,4$ Hz, 2 H, H 15), 3,86 (br s, 8 H, H 37), 7,24 (d, $J = 8,8$ Hz, 1 H, H 10), 7,36 (d, $J = 6,0$ Hz, 1 H, H 27), 7,45 (d, $J = 7,2$ Hz, 1 H, H 8), 7,56 (d, $J = 8,0$ Hz, 1 H, H 9), 7,59 (d, $J = 6,4$ Hz, 1 H, H 28), 7,68 (t, $J = 7,8$ Hz, 1 H, H 3), 7,78 (d, $J = 7,6$ Hz, 1 H, H 2), 7,88 (m, 6 H, H 20/H 21/H 33), 7,97 (m, 4 H, H 34), 8,21 (d, $J = 7,2$ Hz, 1 H, H 4), 8,62 (s, 1 H, H 25), 9,08 (s, 1 H, H 23), 9,18 (br s, 4 H, H 31).

HR-ESI: berechnet für $\text{C}_{69}\text{H}_{79}\text{N}_{16}\text{O}_7\text{ClRu}^{2+}$: 690,2527; gef.: 690,2529.

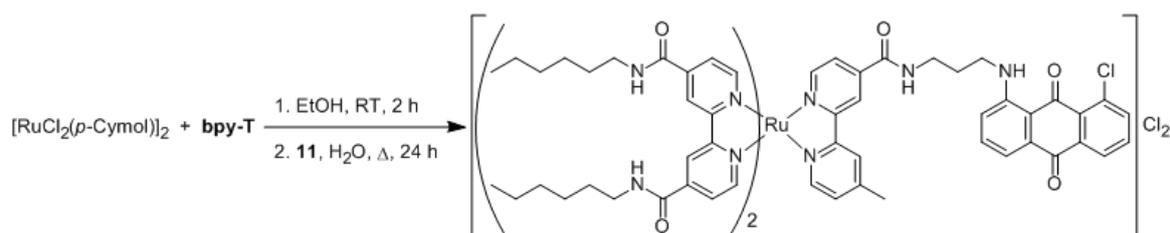
UV/Vis (H_2O): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]) = 303 (41200), 477 (13900).

Fluoreszenz (H_2O): λ_{em} [nm] = 643.

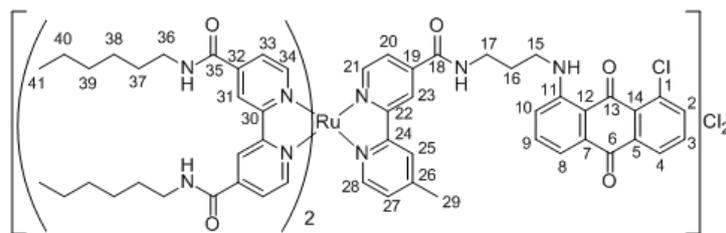
Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient: -1,540 +/- 0,032.

Retentionszeit (analytische HPLC): 37,8 min.

5.2.3.14 Synthese von $[\text{Ru}(\text{11})_2(\text{bpy-T})]\text{Cl}_2$ (25)



31 mg Dichloro(*p*-cymol)ruthenium(II)-Dimer (50 μmol , 1 eq) und 51 mg **bpy-T** (100 μmol , 2 eq) wurden in 3 ml absolutem Ethanol für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 82 mg **11** (200 μmol , 4 eq) und 6 ml Wasser hinzugegeben und für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde eingeeengt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Chloroform/Methanol 95:5). Das Produkt wurde als oranger Feststoff isoliert (5 mg, 3 μmol , 3 %).



¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 0,90 (m, 12 H, H 41), 1,34 (br s, 16 H, H 39/H 40), 1,39 (br s, 8 H, H 38), 1,66 (m, 8 H, H 37), 2,10 (t, $J = 6,3$ Hz, 2 H, H 16), 2,56 (s, 3 H, H 29), 3,44 (t, $J = 6,9$ Hz, 8 H, H 36), 3,51 (t, $J = 5,7$ Hz, 2 H, H 17), 3,66 (t, $J = 6,0$ Hz, 2 H, H 15), 7,21 (d, $J = 8,4$ Hz, 1 H, H 10), 7,37 (d, $J = 5,4$ Hz, 1 H, H 27), 7,41 (d, $J = 7,2$ Hz, 1 H, H 8), 7,53 (t, $J = 7,8$ Hz, 1 H, H 9), 7,63 (d, $J = 5,4$ Hz, 1 H, H 28), 7,66 (t, $J = 8,1$ Hz, 1 H, H 3), 7,75 (d, $J = 7,8$ Hz, 1 H, H 2), 7,85 (m, 5 H, H 20/H 34), 7,96 (m, 5 H, H 21/H 33), 8,17 (d, $J = 7,8$ Hz, 1 H, H 4), 8,64 (s, 1 H, H 25), 9,08 (s, 1 H, H 23), 9,23 (br s, 4 H, H 31).

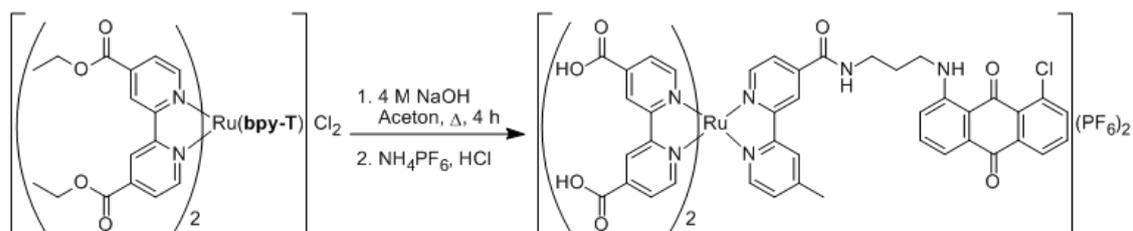
HR-ESI: berechnet für C₇₇H₉₁N₁₂O₇ClRu²⁺: 716,2936; gef.: 716,2919.

UV/Vis (H₂O): λ_{\max} [nm] (ϵ [M⁻¹·cm⁻¹]) = 308 (35000), 480 (13800).

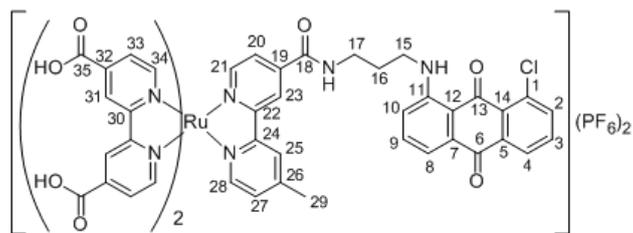
Fluoreszenz (H₂O): λ_{em} [nm] = 634.

Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient: +0,333 +/- 0,016.

5.2.3.15 Synthese von [Ru(3)₂(bpy-T)]Cl₂ (26)



Zu einer Suspension aus **17** (35 mg, 0,027 mmol, 1 eq) in 4 ml Aceton wurden 35 μ l 4 M Natronlauge (0,140 mmol, 5 eq) gegeben und unter Argonatmosphäre im Dunkeln für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der Niederschlag abzentrifugiert, mehrmals mit Aceton gewaschen und an der Luft getrocknet. Der Niederschlag wurde in 5 ml Wasser gelöst, mit Ammoniumhexafluorophosphat versetzt, 60 μ l 2 M Salzsäure hinzugegeben und zum Kristallisieren über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, dreimal mit Wasser gewaschen und aus Methanol/Aceton umkristallisiert. Es wurden 16 mg eines roten Feststoffs (11,5 μ mol, 42 %) erhalten.



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CD}_3\text{CN}$): δ [ppm] = 2,05 (t, $J = 6,6$ Hz, 2 H, H 16), 2,50 (s, 3 H, H 29), 3,49 (t, $J = 6,6$ Hz, 2 H, H 17), 3,59 (t, $J = 6,6$ Hz, 2 H, H 15), 7,21 (d, $J = 9,6$ Hz, 1 H, H 10), 7,27 (d, $J = 6,0$ Hz, 1 H, H 27), 7,44 (d, $J = 7,2$ Hz, 1 H, H 8), 7,49 (d, $J = 5,4$ Hz, 1 H, H 28), 7,56 (t, $J = 7,8$ Hz, 1 H, H 9), 7,64 (t, $J = 7,8$ Hz, 1 H, H 3), 7,69 (dd, $J = 6,0$ Hz, $J = 1,8$ Hz, 1 H, H 20), 7,74 (dd, $J = 7,8$ Hz, $J = 1,2$ Hz, 1 H, H 2), 7,77 (d, $J = 6,0$ Hz, 1 H, H 21), 7,80 (m, 4 H, H 34), 7,87 (m, 4 H, H 33), 8,17 (dd, $J = 7,8$ Hz, $J = 1,2$ Hz, 1 H, H 4), 8,48 (s, 1 H, H 25), 8,85 (br s, 1 H, H 23), 9,06 (br s, 4 H, H 31).

HR-ESI: berechnet für $\text{C}_{53}\text{H}_{39}\text{N}_8\text{O}_{11}\text{ClRu}^+$: 1100,1470; gef.: 1100,1472.

UV/Vis (H_2O): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]) = 302 (45400), 469 (15700).

Fluoreszenz (H_2O): λ_{em} [nm] = 633.

Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient: -2,084 +/- 0,008.

5.3 Zellexperimente zu „Tris(bipyridyl)ruthenium(II) – Komplexe - zelluläre Aufnahmestudien“

Alle mit der Zellkultur in Verbindung stehenden Arbeitsschritte erfolgten in einer sterilen Werkbank (HERAsafe). Die verwendeten Medien und Lösungen wurden auf 37 °C vortemperiert. Wachstum und Inkubation der Zellen fand im Brutschrank unter sterilen Bedingungen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Gehalt statt. In Abständen von zwei bis fünf Tagen wurde je nach Konfluenz ein Medienwechsel oder das Passagieren der Zellen durchgeführt.

5.3.1 Kultivierung von HeLa-Zellen

Die Kultur der Zelllinie HeLa erfolgte in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Verwendung des phenolrothaltigen Mediums EMEM. Das Medium wurde von den Zellen entfernt und diese zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 0,8 ml Trypsin-EDTA-Lösung versetzt und für ca. 2 min geschwenkt, bis die Zellen anfangen sich abzurunden. Nach Entfernen der Trypsin-EDTA-Lösung wurde für 5 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden vom Flaschenboden geklopft und mit 8 ml frischem Medium suspendiert. 2 ml Zellsuspension wurden in eine neue Zellkulturflasche überführt, die bereits 8 ml frisches Medium enthielt. Zum Wachstum wurde die Zellkulturflasche in den Brutschrank gelegt.

5.3.2 Kultivierung von U373-G-Zellen

Die Kultur der Zelllinie U373-G erfolgte in 150 cm²-Zellkulturflaschen unter Verwendung des phenolrothaltigen Mediums EMEM. Das Medium wurde von den Zellen entfernt und diese zweimal mit je 20 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung versetzt und für ca. 2 min geschwenkt bis die Zellen anfangen sich abzurunden. Nach Entfernen der Trypsin-EDTA-Lösung wurde für 4 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden vom Flaschenboden geklopft und mit 20 ml frischem Medium suspendiert. 5 ml Zellsuspension wurden in eine neue Zellkulturflasche überführt, die bereits 45 ml frisches Medium enthielt. Zum Wachstum wurde die Zellkulturflasche in den Brutschrank gelegt.

5.3.3 Kulturvierung von LNCaP-Zellen

Die Kultur der Zelllinie LNCaP erfolgte in 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Verwendung des phenolrothaltigen Mediums RPMI. Das Medium wurde von den Zellen entfernt und diese zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung versetzt und für 5 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vom Flaschenboden geklopft und mit 10 ml Medium suspendiert. Die Zellsuspension wurde bei 1000 rpm für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 10 ml RPMI suspendiert. 2 ml Zellsuspension wurden in eine neue Zellkulturflasche überführt, die bereits 8 ml frisches Medium enthielt. Zum Wachstum wurde die Zellkulturflasche in den Brutschrank gelegt.

5.3.4 Kulturvierung von HL-60-Zellen

Die Suspensionszellen HL-60 wurden in 150 cm²-Zellkulturflaschen unter Verwendung des phenolrotfreien Mediums RPMI kultiviert. 5 ml der Zellsuspension wurden in eine neue Zellkulturflasche überführt, die bereits 45 ml frisches Medium enthielt, und im Brutschrank weiter kultiviert.

5.3.5 Durchflusszytometrie

5.3.5.1 Passagieren, Inkubation und Vorbereitung der adhärennten Zelllinien HeLa und U373-G

Die adhärennten Zellen HeLa und U373-G wurden nach ihrer Kultivierungsvorschrift (5.3.1, 5.3.2) behandelt. Anstatt die Zellsuspension in neue Zellkulturflaschen zu geben, wurden 500 µl entnommen und mittels Durchflusszytometrie die Zellzahl pro µl bestimmt. Eine definierte Menge der Zellsuspension wurde zentrifugiert (1000 rpm, 7 min). Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen in neuem Medium aufgenommen und auf eine Zellzahl von 200000 Zellen/ml eingestellt. Je 1 ml dieser Zellsuspension wurde in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte (24 Vertiefungen) gegeben. Die Platte wurde für 24 h im Brutschrank aufbewahrt, um Zelladhäsion zu ermöglichen. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit je 1 ml PBS gewaschen, anschließend mit 500 µl Komplexlösung (20 µM in phenolrotfreiem

DMEM) versetzt und für die entsprechende Inkubationszeit im Brutschrank (oder im Kühlschrank) aufbewahrt. Nach der Inkubationszeit wurde die Komplexlösung entfernt und die Zellen mit je 500 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden diese mit 100 µl Trypsin-EDTA-Lösung (1 min, RT) behandelt, die Trypsin-EDTA-Lösung entfernt und die Mikrotiterplatte für 4 min zurück in den Brutschrank gestellt. Die Zellen wurden in 500 µl phenolrothaltigem EMEM Medium suspendiert, in Reaktionsgefäße (Eppendorf 1,5 ml) überführt und bei 1000 rpm für 3 min zentrifugiert. Das Medium wurde entfernt, die Zellen in 200 µl PBS suspendiert und die Fluoreszenzintensitätsverteilung mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

5.3.5.2 Passagieren, Inkubation und Vorbereitung der adhärenen Zelllinie LNCaP

Die adhärenen Zellen LNCaP wurden nach ihrer Kultivierungsvorschrift (5.3.3) behandelt. Anstatt die Zellsuspension in neue Zellkulturflaschen zu geben, wurden 500 µl davon entnommen und mittels Durchflusszytometrie die Zellzahl pro µl bestimmt. Eine definierte Menge der Zellsuspension wurde zentrifugiert (1000 rpm, 7 min). Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen in neuem Medium aufgenommen und auf eine Zellzahl von 200000 Zellen/ml eingestellt. Je 1 ml dieser Zellsuspension wurde in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte (24 Vertiefungen) gegeben. Die Platte wurde für 48 h im Brutschrank aufbewahrt, um Zelladhäsion zu ermöglichen. Anschließend wurden die Zellen mit je 1 ml PBS gewaschen, mit 500 µl Komplexlösung (20 µM in phenolrothaltigem RPMI) versetzt und für die entsprechende Inkubationszeit im Brutschrank (oder im Kühlschrank) aufbewahrt. Nach der Inkubationszeit wurde die Komplexlösung entfernt und die Zellen mit je 500 µl PBS gewaschen. 100 µl Trypsin-EDTA-Lösung wurden auf die Zellen gegeben und diese für 3 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden in 500 µl phenolrothaltigem RPMI Medium suspendiert, in Reaktionsgefäße (Eppendorf 1,5 ml) überführt und bei 1000 rpm für 3 min zentrifugiert. Das Medium wurde entfernt, die Zellen in 200 µl PBS suspendiert und die Fluoreszenzintensitätsverteilung mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

5.3.5.3 Passagieren, Inkubation und Vorbereitung der Suspensionszelllinie HL-60

500 μl der Zellsuspension wurden entnommen und mit dem Durchflusszytometer die Zellzahl pro μl bestimmt. Eine definierte Menge an Zellsuspension wurde bei 1000 rpm für 7 min zentrifugiert. Das Medium wurde entfernt und das Zellpellet in soviel Medium suspendiert, dass eine Zellzahl von 1000000 Zellen/ml eingestellt wurde. Nach Zugabe der Komplexlösung wurde die Zellsuspension zu je 200 μl in sterile Reaktionsgefäße (Eppendorf 1,5 ml) verteilt und im Brutschrank (oder im Kühlschrank) für die entsprechende Zeit inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1000 rpm, 3 min), das Medium entfernt und mit 200 μl PBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in 200 μl PBS aufgenommen und die Fluoreszenzintensitätsverteilung mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

5.3.5.4 Durchführung der Durchflusszytometrieexperimente

Die Zellen wurden ohne Komplexlösung und jeweils nach Versetzen mit 20 μM Komplexlösung nach 0,5 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h und 24 h Inkubationsdauer gemessen. Zur Bestimmung des Aufnahmemechanismus wurden die Zellen für 1 h mit 20 μM Komplexlösung bei 4 °C (Kühlschrank) bzw. 37 °C (Brutschrank) inkubiert. Es wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt. Dabei wurde ein Schwellenwert von 1000000 festgesetzt, 20000 Ereignisse gemessen und tote Zellen von der Analyse ausgeschlossen. Die Komplexe wurde mit 488 nm angeregt und die Fluoreszenz der Wellenlängen > 670 nm detektiert.

5.3.6 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Die adhärennten Zelllinien HeLa, U373-G und LNCaP wurden wie in 5.3.5.1, 5.3.5.2 bzw. 5.3.5.3 beschrieben behandelt. Die Zellzahl wurde nach Zählen und Zentrifugieren auf 20000 Zellen pro ml eingestellt. Davon wurden je 300 μl in eine Vertiefung der Ibidi μ -Slide 8 well der Firma Ibidi (Martinsried, Deutschland) gegeben. Es ergibt sich eine Zellzahl von 6000 Zellen pro Vertiefung. Nach der entsprechenden Adhäsionszeit wurden die Zellen mit 300 μl PBS gewaschen und mit 20 μM Komplexlösung für 4 h inkubiert. Nach einmaligem Waschen

mit PBS wurden die Zellen in phenolrotfreien Medium mit 20 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) unter dem Mikroskop beobachtet.

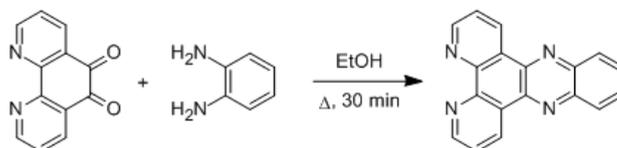
HL-60-Zellen wurden auf eine Zellzahl von 40000 Zellen pro Milliliter eingestellt, zu je 150 μ l in Reaktionsgefäße (Eppendorf 1,5 ml) verteilt und direkt mit der entsprechenden Menge an Komplexlösung versetzt. Nach Inkubation für 4 h wurden die Zellen zentrifugiert, einmal in 300 μ l PBS gewaschen, in 300 μ l phenolrotfreien RPMI-Medium mit 20 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) aufgenommen und zum Mikroskopieren in Ibidi-Vertiefungen gegeben.

Die Komplexe wurden mit 488 nm angeregt und die Fluoreszenz von 600-750 nm mit PMT (100 %) bzw. mit APD 630 nm \pm 37,5 nm detektiert. Gleichzeitig wurde ein Durchlichtbild aufgenommen.

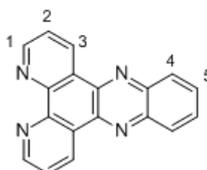
5.4 Synthesen zu „Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexe als mmDNA-Sensor“

(Literaturbekannte Verbindungen sind mit * gekennzeichnet)

5.4.1 Synthese des Transportmoleküls Dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazin (dppz*)⁸⁹



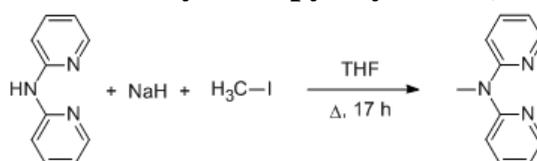
504 mg 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion (2,4 mmol, 1 eq) in 8 ml Ethanol wurden unter Rückfluss erhitzt. 560 mg 1,2-Phenyldiamin (2,4 mmol, 1 eq) wurden in 2 ml Ethanol in der Wärme gelöst und über den Rückflusskühler zu der Phenanthrolindionsuspension unter Ausbildung einer braunen Lösung gegeben. Nach 30 min Erhitzen unter Rückfluss bildete sich ein Feststoff. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Suspension filtriert und der Feststoff mit eiskaltem Ethanol (30 ml) und Diethylether (5 ml) gewaschen. Nach Trocknen an der Luft wurde ein schwach gelber Feststoff erhalten (626 mg, 2,2 mmol, 92 %); (Literaturausbeute: 80 %).



¹H-NMR (300 MHz, (CD₃)₂SO): δ [ppm] = 7,95 (dd, $J = 8,1$ Hz, $J = 4,5$ Hz, 2 H, H 2), 8,06 (dd, $J = 6,5$ Hz, $J = 3,5$ Hz, 2 H, H 5), 8,39 (dd, $J = 6,5$ Hz, $J = 3,5$ Hz, 2 H, H 4), 9,21 (dd, $J = 4,5$ Hz, $J = 1,8$ Hz, 2 H, H 3), 9,53 (dd, $J = 8,1$ Hz, $J = 1,8$ Hz, 2 H, H 1).

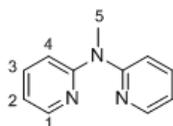
ESI-MS: 283 [dppz+H]⁺ 100 %.

5.4.2 Synthese von N-Methyl-di-2-pyridylamin (27*)⁹⁰



171 mg Di-2-pyridylamin (1,0 mmol, 1,0 eq) wurden in 2 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst und für 15 min mit Argon gespült. 24 mg Natriumhydrid (1,0 mmol, 1,3 eq) wurden vorsichtig hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 15 min mit Argon gespült. 185 mg

Methyljodid (1,3 mmol, 1,3 eq) wurden tropfenweise hinzugegeben. Nachdem die Lösung für 15 min mit Argon gespült wurde, wurde die Reaktion unter Argonatmosphäre für 17 h unter Rückfluss erhitzt. Am nächsten Tag wurden 5 ml Wasser hinzugegeben und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung auf pH = 10 eingestellt. Das Produkt wurde mit Dichlormethan (viermal 10 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum getrocknet. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, vorbehandelt mit 10 % Triethylamin in Hexan, Hexan/Essigsäureethylester 7:1) wurde **27** als gelbes Öl erhalten (50 mg, 0,27 mmol, 27 %).

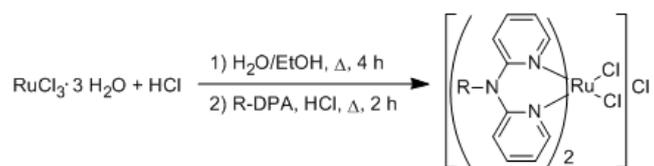


¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3,62 (s, 3 H, H 5), 6,86 (ddd, $J = 7,2$ Hz, $J = 5,0$ Hz, $J = 1,0$ Hz, 2 H, H 2), 7,17 (dd, $J = 8,6$ Hz, $J = 1,0$ Hz, 2 H, H 4), 7,53 (ddd, $J = 8,6$ Hz, $J = 7,2$ Hz, $J = 2,0$ Hz, 2 H, H 3), 8,35 (ddd, $J = 5,0$ Hz, $J = 2,0$ Hz, $J = 0,8$ Hz, 2 H, H 1).

ESI-MS: 186 [**27**+H]⁺ 100 %.

5.4.3 Darstellung der Rutheniumkomplexe [Ru(R-DPA)_n(dppz)_{3-n}]²⁺ (n = 1, 2)

5.4.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von *cis*-Dichloro-bis-(*N*-*R*-di-2-pyridylamin)ruthenium(III)chlorid



Eine braune Lösung aus Rutheniumtrichlorid-Trihydrat (1,0 eq) in einer Wasser/Ethanol-Mischung (3:5) wurde für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Während des Erhitzens änderte sich die Farbe von braun über grün zu dunkelblau. Eine Lösung aus *N*-*R*-Di-2-pyridylamin (R-DPA) (2,6 eq) und konzentrierter Salzsäure (13,5 eq) in Ethanol wurde über den Rückflusskühler zur Reaktionsmischung gegeben und für 2 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die grüne Lösung am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde umkristallisiert (Ethanol/Diethylether) und lieferte den gewünschten Komplex [Ru(R-DPA)₂Cl₂]Cl, der ohne weitere Reinigung verwendet wurde.

cis-Dichloro-bis-(di-2-pyridylamin)ruthenium(III)chlorid (**28***)⁹²

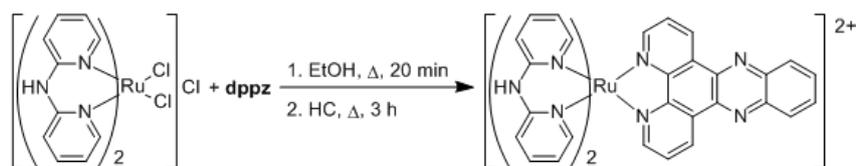
Ausbeute: 40 mg (0,07 mmol, 37 %)

ESI-MS: 443 [**28**-3 Cl]⁺ 35 %, 479 [**28**-2 Cl]⁺ 80 %, 514 [**28**-Cl]⁺ 100 %.*cis*-Dichloro-bis-(*N*-methyl-di-2-pyridylamin)ruthenium(III)chlorid (**29**)

Ausbeute: 44 mg (0,08 mmol, 73 %)

ESI-MS: 186 [**27**+H]⁺ 37 %, 507 [**29**-2 Cl]⁺ 5 %, 542 [**29**-Cl]⁺ 100 %.*cis*-Dichloro-bis-(*N*-heptyl-di-2-pyridylamin)ruthenium(III)chlorid (**30**)

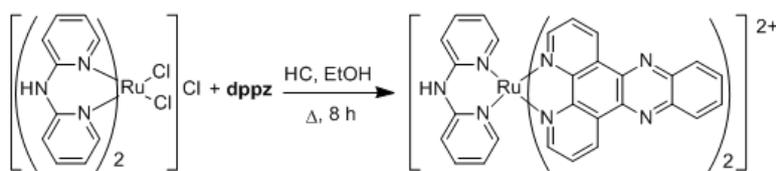
Ausbeute: 115 mg (0,15 mmol, 150 %)

ESI-MS: 270 [HeptDPA¹⁰¹+H]⁺ 100 %, 675 [**30**-2 Cl]⁺ 70 %, 710 [**30**-Cl]⁺ 100 %.**5.4.3.2** *Synthese von [Ru(HDPA)₂dppz]²⁺ (**31***)¹²*

Eine Mischung aus **28** (27 mg, 49 μmol, 1,0 eq) und **dppz** (14 mg, 49 μmol, 1,0 eq) in 4 ml Ethanol wurden unter Argonatmosphäre für 20 min unter Rückfluss erhitzt. Nachdem die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden 14 mg Hydrochinon (123 μmol, 2,5 eq) hinzugegeben und unter Argonatmosphäre für 3 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Ethanol/Diethylether umkristallisiert. Der Niederschlag wurde in wenig Wasser gelöst und auf eine semipräparative Umkehrphasen-HPLC aufgebracht. Das Produkt eluierte nach 26,3 min. Nach Trocknen im Vakuum erhielt man 1,7 mg eines orangefarbenen Feststoffs (2 μmol, 41 %).

ESI-MS: 363 [**31**]²⁺ 100 %, 725 [**31**]⁺ 100 %.**UV/Vis (H₂O)**: λ_{max} [nm] (ε [M⁻¹·cm⁻¹]) = 279 (120300), 360 (32700), 373 (32900), 437 (11700), 479 (10600).**Fluoreszenz (ACN)**: λ_{em} [nm] = 655.**Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient**: -0,866 +/- 0,083.**Retentionszeit (semipräparative HPLC)**: 26,3 min.

5.4.3.3 Synthese von $[Ru(HDPA)(dppz)_2]^{2+}$ (**32**)



27 mg **28** (49 μmol , 1 eq), 18 mg **dppz** (98 μmol , 2 eq) und 14 mg Hydrochinon (123 μmol , 2,5 eq) wurden in 4 ml Ethanol gelöst und für 8 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand mit kaltem Diethylether gewaschen, der Niederschlag in wenig Wasser gelöst und auf eine semipräparative Umkehrphasen-HPLC aufgebracht. Das Produkt eluierte nach 35,8 min. Nach Trocknen im Vakuum erhielt man 1,8 mg eines orangefarbenen Feststoffs (2 μmol , 41 %).

ESI-MS: 419 $[32]^{2+}$ 70 %, 836 $[32]^+$ 100 %.

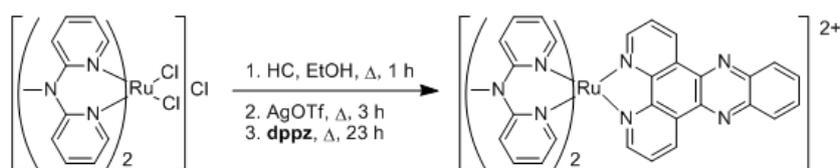
UV/Vis (H_2O): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]) = 279 (99200), 360 (27500), 373 (27900), 463 (10300).

Fluoreszenz (ACN): λ_{em} [nm] = 655.

Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient: -0,478 +/- 0,014.

Retentionszeit (semipräparative HPLC): 35,8 min.

5.4.3.4 Synthese von $[Ru(27)_2dppz]^{2+}$ (**33**)



Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Syntheseroute basiert auf einer Kombination von literaturbekannten Protokollen.^{93, 94, 102} 20 mg **29** (35 μmol , 1,0 eq) und 10 mg Hydrochinon (875 μmol , 2,5 eq) wurden in 4 ml Ethanol unter Argonatmosphäre für 1 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurden 27 mg Silbertriflat (105 μmol , 3,0 eq) hinzugegeben und für weitere 2 h erhitzt. Die gelbe Suspension wurde heiß filtriert und der Rückstand mehrmals mit Ethanol (10 ml) gewaschen. Zum Filtrat wurden 10 mg **dppz** (35 μmol , 1,0 eq) gegeben und für 23 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die orangefarbene Reaktionslösung im Vakuum eingeeengt, in 10 ml Wasser aufgenommen und zentrifugiert, um das überschüssige Edukt zu entfernen. Zum Zentrifugat wurden 57 mg Ammoniumhexafluorophosphat (350 μmol , 10 eq) gegeben. Der entstandene Niederschlag

wurde durch Zentrifugieren abgetrennt, zweimal mit Wasser gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Der erhaltene orangefarbene Feststoff wurde in Acetonitril/Wasser (3:2) gelöst und auf eine Sephadex QAE-125 Anionentauschersäule gegeben. Die orangefarbene Bande wurde gesammelt, im Vakuum getrocknet, in wenig Wasser aufgenommen und per semipräparativer Umkehrphasen-HPLC gereinigt. Das Produkt hatte eine Retentionszeit von 27,5 min und wurde in 29 % Ausbeute (1 mg, 1 μmol) erhalten.

ESI-MS: 377 [**33**]²⁺ 100 %.

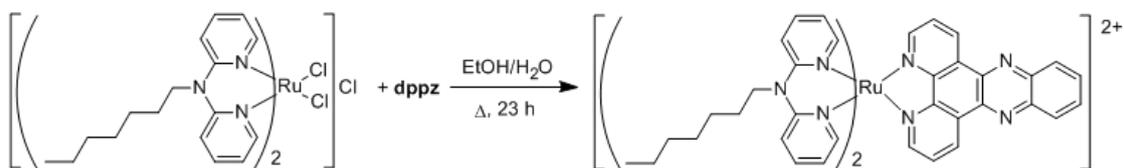
UV/Vis (H₂O): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]) = 279 (117300), 360 (34600), 373 (35000), 437 (15500), 479 (12600).

Fluoreszenz (ACN): λ_{em} [nm] = 670.

Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient: -1,040 +/- 0,018

Retentionszeit (semipräparative HPLC): 27,5 min.

5.4.3.5 Synthese von $[\text{Ru}(\text{HeptDPA})_2\text{dppz}]^{2+}$ (**34**)



40 mg **30** (54 μmol , 1,0 eq) und 17 mg **dppz** (59 μmol , 1,1 eq) wurden in einer Ethanol/Wasser-Mischung (1:1) für 23 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgelsäule, Acetonitril/Wasser/gesättigte Kaliumnitratlösung 50:1:1). Nach Einengen der Bande wurde der Rückstand mit wässriger Ammoniumhexafluorophosphatlösung versetzt und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Anschließend wurde der Niederschlag abzentrifugiert, zweimal mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Nach Umkristallisation aus Acetonitril/Diethylether wurde der Feststoff in wenig Acetonitril/Wasser (3:2) gelöst und das Hexafluorophosphatanion an einer Sephadex QAE-125 Anionentauschersäule durch Chlorid ersetzt. Das Chloridsalz eluierte in 22 % Ausbeute (12 mg, 12 μmol). Die Reinheit von **34** wurde mit einer semipräparativen Umkehrphasen-HPLC bestätigt. Die Retentionszeit betrug 51,4 min.

ESI-MS: 461 [34]²⁺ 100 %.

UV/Vis (H₂O): λ_{\max} [nm] (ϵ [M⁻¹·cm⁻¹]) = 279 (118800), 360 (33700), 373 (34000), 437 (13600), 479 (11600).

Fluoreszenz (ACN): λ_{em} [nm] = 670.

Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient: -0,203 +/- 0,053.

Retentionszeit (semipräparative HPLC): 51,4 min.

5.4.4 Oligonukleotid-Synthese

Folgende 27-mer Oligonukleotide wurden mit einem DNA-Synthesizer mittels Standard-phosphoramiditchemie synthetisiert (**R** steht für eine Tetrahydrofuran-abasic-Stelle):

<i>forward</i> Strang	5'-GAC CAG CTT ATC ACC CCT AGA TAA GCG-3'
<i>match</i> Strang	3'-CTG GTC GAA TAG TGG GGA TCT ATT CGC-5'
<i>mismatch</i> Strang	3'-CTG GTC GAA TAG TCG GGA TCT ATT CGC-5'
<i>abasic site</i> Strang	3'-CTG GTC GAA TAG TRG GGA TCT ATT CGC-5'

Die DNA wurde mit einer 5'-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe synthetisiert. Die Abspaltung von den Beads wurde durch Reaktion mit konzentriertem Ammoniak bei 60 °C über Nacht erreicht. Nach HPLC-Aufreinigung wurden die freien Oligonukleotide mittels Essigsäure (80 %ig) für 15 min bei 4 °C entschützt. Die Oligonukleotide wurden mit absolutem Ethanol gefällt und ein zweites Mal mit HPLC gereinigt. Die Identifizierung der Oligonukleotide erfolgte ebenso wie die Bestimmung der Reinheit durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Die Konzentration wurde über UV/Vis-Spektroskopie unter Zuhilfenahme des bei 260 nm für Einzelstrang-DNA berechneten Extinktionskoeffizient ermittelt. Entsprechende Mengen von *forward* Strang wurden mit *match*, *mismatch* bzw. *abasic site* Strang vereint, 10 min auf 90 °C erhitzt und während des Abkühlens über Nacht anneliert.

<i>forward</i> Strang:	berechnete Masse: 8213	MALDI-TOF: 8213
<i>match</i> Strang:	berechnete Masse: 8346	MALDI-TOF: 8347
<i>mismatch</i> Strang:	berechnete Masse: 8306	MALDI-TOF: 8309
<i>abasic site</i> Strang:	berechnete Masse: 8197	MALDI-TOF: 8196

5.5 Zelleexperimente zu „Poly(pyridyl)ruthenium(II)-Komplexe als mmDNA-Sensor“

5.5.1 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

HeLa-Zellen (ATCC, CCL-2) wurden in α -MEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin in 75 cm²-Zellkulturflaschen bis zu ~40 % Konfluenz kultiviert. Um die Zellen zu passagieren, wurden diese mit EDTA-Lösung (0,48 mM PBS) vom Flaschenboden gelöst, mit einer Neubauer Zählkammer gezählt und auf die entsprechende Zellzahl eingestellt. Es wurden 3000 Zellen pro Vertiefung einer 96-Mikrotiterplatte pipettiert und diese für 24 h im Brutschrank adhärirt. Nach Waschen mit HBSS wurden die Zellen mit entsprechenden Konzentrationen an Komplexlösung für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit HBSS gewaschen und in HBSS an einem Zeiss LSM 510 mikroskopiert. Die Komplexe wurde mit 488 nm angeregt und die Fluoreszenz mit Wellenlänger > 560 nm detektiert. Gleichzeitig wurde ein Durchlichtbild aufgenommen.

5.5.2 ICP-MS-Messung von Zellysat und des Zellkernextrakt⁹⁸

HeLa-Zellen wurden trypsiniert, mit kalten PBS gewaschen und zentrifugiert. Die Zellen wurden entweder in 1 %iger Salpetersäure suspendiert und durch wiederholtes Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen in einem Wasserbad (37 °C) lysiert oder in Extraktionspuffer (320 mM Saccharose, 5 mM Magnesiumchlorid, 10 mM HEPES, 1 % Triton X-100, pH 7,4) suspendiert, kurz geschüttelt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation (2000 g, 3-4 min) gewonnen und zweimal mit Waschlösung (320 mM Saccharose, 5 mM Magnesiumchlorid, 10 mM HEPES) gewaschen. Zur ICP-MS-Analyse wurden die Zellkerne in 1 %iger Salpetersäure aufgenommen.

6 Literaturverzeichnis

- 1 R. M. Martin, H. Leonhardt, M. C. Cardoso, *Cytometry A*, **2005**, 67A, 45-52.
B. N. G. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, *Science*, **2006**, 312, 217-224.
- 2 E. Meggers, G. E. Atilla-Gokcumen, H. Bregman, J. Maksimoska, S. P. Mulcahy, N. Pagano, D. S. Williams, *Synlett*, **2007**, 8, 1177-1189.
- 3 M. R. Gill, J. Garcia-Lara, S. J. Foster, C. Smythe, G. Battaglia, *Nature Science*, **2009**, 1, 662-667.
- 4 J. G. Vos, J. M. Kelly, *Dalton Trans.*, **2006**, 41, 4869-4883.
- 5 K. Kalyanasundaram, *Coord. Chem. Rev.*, **1982**, 46, 159-244.
- 6 A. Juris, V. Balazani, F. Barigelletti, S. Campagna, P. Belser, A. von Zelewsky, *Coord. Chem. Rev.*, **1988**, 84, 85-277.
- 7 S. Campagna, F. Puntoriero, F. Nastasi, G. Bergamini, V. Balzani, *Top. Curr. Chem.*, **2007**, 280, 117-214.
- 8 J. P. Paris, W. W. Brandt, *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, 81, 5001-5002.
- 9 D. P. Segers, M. K. DeArmond, *J. Phys. Chem.*, **1982**, 86, 3768-3776.
- 10 D. E. Morris, Y. Ohsawa, D. P. Segers, M. K. DeArmond, *Inorg. Chem.*, **1984**, 23, 3010-3017.
- 11 R. L. Blakley, M. L. Myrick, M. K. DeArmond, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 7843-7844.
R. L. Blakley, M. K. DeArmond, *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, 109, 4895-4901.
- 12 V. Rajendiran, M. Murali, E. Suresh, M. Palaniandavar, V. S. Periasamy, M. A. Akbarsha, *Dalton Trans.*, **2008**, 16, 2157-2170.
- 13 B. O'Regan, M. Grätzel, *Nature*, **1991**, 353, 737-740.
A. Hagefeldt, M. Grätzel, *Acc. Chem. Res.*, **2000**, 33, 269-277.
- 14 J. N. Demas, B. A. DeGraff, *J. Chem. Educ.*, **1997**, 74, 690-695.
- 15 M. S. Vickers, K. S. Martindale, P. D. Beer, *J. Mater. Chem.*, **2005**, 15, 2784-2790.
- 16 S. R. Bayly, P. D. Beer, *Struct. Bond.*, **2008**, 129, 45-94.
- 17 S. Rau, T. Buttner, C. Temme, M. Ruben, H. Gorls, D. Walther, M. Duati, S. Fanni, J. G. Vos, *Inorg. Chem.*, **2000**, 39, 1621-1624.
V. W.-W. Yam, A. S.-F. Kai, *Inorg. Chim. Acta*, **2000**, 300-302, 82-90.
- 18 A. P. Doherty, R. J. Forster, M. R. Smyth, J. G. Vos, *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 572-575.
- 19 D. Sud, W. Zhong, D. G. Beer, M.-A. Mycek, *Optics Exp.*, **2006**, 14, 4412-4426.

- 20 C. G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M. A. Jakupec, B. Kynast, H. Zorbas, B. K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, *100*, 891-904.
- 21 P. J. Dyson, G. Sava, *Dalton Trans.*, **2006**, *16*, 1929-1933.
- 22 H. C. Gerritsen, R. Sanders, A. Draaijer, C. Ince, Y. K. Levine, *J. Fluorescence*, **1997**, *7*, 11-15.
- 23 J. W. Dobrucki, *J. Photochem. Photobio. B*, **2001**, *65*, 136-144.
- 24 R. Zhang, Z. Ye, G. Wang, W. Zhang, J. Yuan, *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 6884-6891.
- 25 N. A. O'Conner, N. Stevens, D. Samaroo, M. R. Solomon, A. A. Marti, J. Dyer, H. Vishwasrao, D. L. Akins, E. R. Kandel, N. J. Turro, *Chem. Commun.*, **2009**, *19*, 2640-2642.
- 26 M. J. Pisani, D. K. Weber, K. Heimann, J. G. Collins, F. R. Keene, *Metallomics*, **2010**, *2*, 393-396.
- 27 P. L. Modrich, *Annu. Rev. Genet.*, **1991**, *25*, 229-253.
R. Kolodner, *Genes Dev.*, **1996**, *10*, 1433-1442.
- 28 R. R. Iyer, A. Pluciennik, V. Burdett, P. L. Modrich, *Chem. Rev.*, **2006**, *106*, 302-323.
P. L. Modrich, *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*, 30305-30309.
- 29 R. D. Kolodner, *Trends Biochem. Sci.*, **1995**, *20*, 397-401.
- 30 D. Fink, S. Aebi, S. B. Howell, *Clinical Cancer Res.*, **1998**, *4*, 1-6.
- 31 E. R. Lacy, K. K. Cox, W. D. Wilson, M. Lee, *Nuc. Acids Res.*, **2002**, *30*, 1834-1841.
- 32 T. Peng, T. Murase, Y. Goto, A. Kobori, K. Nakatani, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 259-262.
- 33 T. Garcia, M. Revenga-Parra, H. D. Abruna, F. Pariente, E. Lorenzo, *Anal. Chem.*, **2008**, *80*, 77-84.
- 34 B. A. Jackson, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 12986-12987.
B. A. Jackson, J. K. Barton, *Biochemistry*, **2000**, *39*, 6176-6182.
B. M. Zeglis, J. A. Boland, J. K. Barton, *Biochemistry*, **2009**, *48*, 839-849.
- 35 B. M. Zeglis, V. C. Pierre, J. K. Barton, *Chem. Commun.*, **2007**, *44*, 4565-4579.
- 36 R. J. Ernst, H. Song, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 2359-2366.
- 37 A. M. Pyle, M. Y. Chiang, J. K. Barton, *Inorg. Chem.*, **1990**, *29*, 4487-4495.
- 38 E. Rüba, J. R. Hart, J. K. Barton, *Inorg. Chem.*, **2004**, *43*, 4570-4578.
- 39 M. H. Lee, H. Song, E. D. Olmon, E. E. Dervan, J. K. Barton, *Inorg. Chem.*, **2009**, *48*, 5392-5397.
- 40 C. A. Puckett, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 46-47.
- 41 C. A. Puckett, J. K. Barton, *Biochemistry*, **2008**, *47*, 11711-11716.

- 42 F. R. Keene, J. A. Smith, J. G. Collins, *Coord. Chem. Rev.*, **2009**, 253, 2021-2035.
- 43 C. A. Puckett, R. J. Ernst, J. K. Barton, *Dalton Trans.*, **2010**, 39, 1159-1170.
- 44 M. D. Hall, M. Okabe, D. W. Shen, X. J. Liang, M. M. Gottesman, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **2008**, 48, 495-535.
- 45 M. Pongratz, P. Schluga, M. A. Jakupec, V. B. Arion, C. G. Hartinger, G. Allmaier, B. K. Keppler, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2004**, 19, 46-51.
- 46 K. K.-W. Lo, T. K.-M. Lee, J. S.-Y. Lau, W.-L. Poon, S.-H. Cheng, *Inorg. Chem.*, **2008**, 47, 200-208.
- 47 U. Neugebauer, Y. Pellgrin, M. Devocelle, R. J. Forster, W. Signac, N. Moran, T. E. Keyes, *Chem. Commun.*, **2008**, 42, 5307-5309.
- 48 O. Zava, S. M. Zakeeruddin, C. Danelon, H. Vogel, M. Grätzel, P. J. Dyson, *ChemBioChem*, **2009**, 10, 1796-1800.
- 49 A. Schwarz, *Zellmembranpermeable Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-Komplexe Synthese, Eigenschaften und biologische Anwendung*, **2007**, Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- 50 R. K.-Y. Zee-Cheng, A. E. Mathew, P.-L. Xu, R. V. Northcutt, C. C. Cheng, *J. Med. Chem.*, **1987**, 30, 1682-1686.
- 51 Z. Kaya, R. Krämer, **2008**, EP 1905801 A1.
- 52 R. Csuk, T. Brezesinski, G. Göthe, C. Raschke, S. Reißmann, *Z. Naturforsch.*, **2004**, 60b, 89-98.
- 53 D. G. McCafferty, B. M. Bishop, S. G. Wall, S. G. Hughes, S. L. Mecklenberg, T. J. Meyer, B. W. Erickson, *Tetrahedron*, **1995**, 51, 1093-1106.
- 54 A. R. Oki, R. J. Morgan, *Synth. Commun.*, **1995**, 25, 4093-4097.
- 55 D. Miyoshi, H. Karimata, Z.-M. Wang, K. Koumoto, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 5919-5925.
- 56 W. S. Aldrige III, B. J. Hornstein, S. Serron, D. M. Dattelbaum, J. R. Schoonover, T. J. Meyer, *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 5186-5190.
- 57 B. P. Sullivan, D. J. Salmon, T. J. Meyer, *Inorg. Chem.*, **1978**, 17, 3334-3341.
- 58 S. A. McFarland, F. S. Lee, K. A. W. Y. Cheng, F. L. Cozens, N. P. Scheep, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 7065-7070.
- 59 Y.-J. Hou, P.-H. Xie, B.-W. Zhang, Y. Cao, X.-R. Xiao, W.-B. Wang, *Inorg. Chem.*, **1992**, 38, 6320-6322.
- 60 J. E. Collins, J. J. S. Lamba, J. C. Love, J. E. McAlvin, C. Ng, B. P. Peters, X. Wu, C. L. Fraser, *Inorg. Chem.*, **1999**, 38, 2020-2024.

- 61 D. N. Lee, J. H. Min, H. M. Kim, Y. M. Jun, H. N. Choi, W.-Y. Lee, B. H. Kim, *J. Organomet. Chem.*, **2005**, *690*, 2002-2008.
D. N. Lee, H. M. Kim, E. H. Kim, B. K. Soh, C.-H. Kim, B. M. Lee, S. H. Yoon, W.-Y. Lee, B. H. Kim, *Synth. Met.*, **2006**, *156*, 885-892.
- 62 R. Ghanem, Y. Xu, J. Pan, T. Hoffmann, J. Andersson, T. Polivka, T. Pascher, S. Styring, L. Sun, V. Sundström, *Inorg. Chem.*, **2002**, *41*, 6258-6266.
- 63 M. K. Nazeeruddin, S. M. Zakeeruddin, R. Humphry-Baker, M. Jirousek, P. Liska, N. Vlachopoulos, V. Shklover, C.-H. Fischer, M. Grätzel, *Inorg. Chem.*, **1999**, *38*, 6298-6305.
- 64 Y. Pellegrin, R. J. Forster, T. E. Keyes, *Inorg. Chim. Acta*, **2009**, *362*, 1715-1722.
- 65 J. Otsuki, H. Ogawa, N. Okuda, K. Araki, M. Seno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1997**, *70*, 2077-2084.
- 66 S. L. Mecklenburg, D. G. McCafferty, J. R. Schoonover, B. M. Peek, B. W. Erickson, T. J. Meyer, *Inorg. Chem.*, **1994**, *33*, 2974-2983.
- 67 C. Tissier, *C. R. Acad. Sc. Paris, C*, **1971**, *272*, 527-526.
- 68 P. K. Sen, A. Sanyal, K. K. Sen Gupta, *Intern. J. Chem. Kin.*, **1995**, *27*, 379-389.
- 69 I. M. M. de Carvalho, I. C. N. Diógenes, Í. de S. Moreira, M. H. Gehlen, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **2005**, *171*, 107-112.
- 70 B. Geisser, A. Ponce, R. Alsfasser, *Inorg. Chem.*, **1999**, *38*, 2030-2037.
- 71 A. Bagno, G. Scorrano, *Rev. Chem. Intermed.*, **1987**, *7*, 313-352.
A. Bagno, B. Bujnicki, S. Bertrand, C. Comuzzi, F. Dorigo, P. Janvier, G. Scorrano, *Chem. Eur. J.*, **1999**, *5*, 523-536.
- 72 R. A. Cox, L. M. Druet, A. E. Klausner, T. A. Modro, P. Wan, K. Yates, *Can. J. Chem.*, **1981**, *59*, 1568-1573.
- 73 W. Hosek, S. A. Tysoe, H. D. Gafney, A. D. Baker, T. C. Streckas, *Inorg. Chem.*, **1989**, *28*, 1228-1231.
- 74 J. J. Delpuech, Y. Martinet, *Tetrahedron*, **1971**, *27*, 2499-2515.
F. Khalili, A. Henni, A. L. L. East, *J. Chem. Eng. Data*, **2009**, *54*, 2914-2917.
- 75 R. L. Gustafson, A. E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, *81*, 525-529.
- 76 Z. Murtaza, Q. Chang, G. Rao, H. Lin, J. R. Lakowicz, *Analyt. Biochem.*, **1997**, *247*, 216-222.
- 77 K. C. Nicolaou, Z. Lysenko, *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 3187-3189.
- 78 J. W. Park, J. Ahn, C. Lee, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **1995**, *86*, 89-95.
- 79 T. D. Shenkenberg, D. D. von Hoff, *Ann. Intern. Med.*, **1986**, *105*, 67-81.

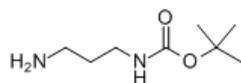
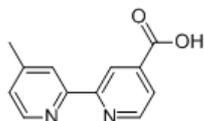
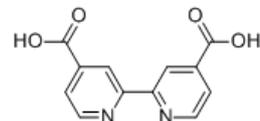
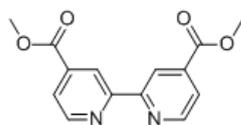
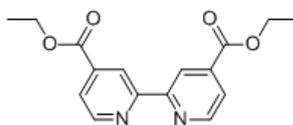
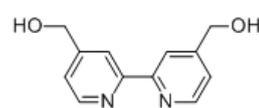
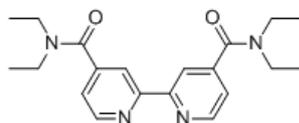
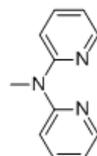
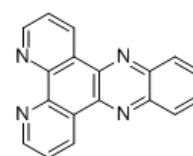
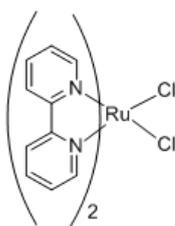
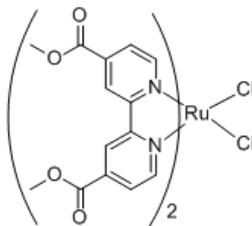
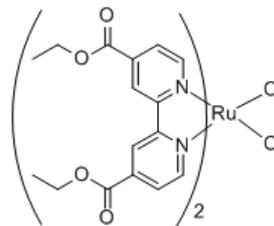
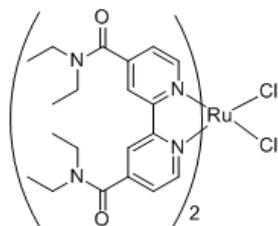
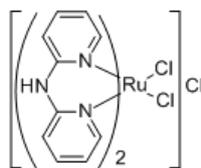
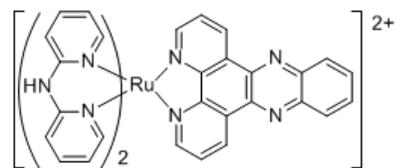
- 80 P. J. Smith, N. Blunt, M. Wiltshire, T. Hoy, P. Teesdale-Spittle, M. R. Craven, J. V. Watson, W. B. Amos, R. J. Errington, L. H. Patterson, *Cytometry*, **2000**, *40*, 280-291.
- 81 J. M. Kelly, A. B. Tossi, D. J. McConnell, C. OhUigin, *Nucl. Acids Res.*, **1985**, *13*, 6017-6034.
- 82 C. V. Kumar, J. K. Barton, N. J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 5118-5523.
- 83 J. G. Collins, T. P. Shields, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 9840-9846.
D. L. Carlson, D. H. Huchital, E. J. Matilla, R. D. Sheary, W. R. Murphy, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 6424-6425.
A. H. Krotz, L. Y. Kuo, T. P. Shields, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 3877-3882.
L.-M. Chen, J. Liu, J.-C. Chen, C.-P. Tan, S. Shi, K.-C. Zheng, L.-N. Ji, *J. Inorg. Biochem.*, **2008**, *102*, 330-341.
- 84 J. Sangster "Chapter 3, Experimental Methods of Measurement", *Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamental and Physical Chemistry*, **1997**, Wiley, Chichester.
- 85 A. Ghezzi, M. Aceto, C. Cassino, E. Gabano, D. Osella, *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, *98*, 73-78.
- 86 P.-K. Lee, H.-W. Liu, S.-M. Yiu, M.-W. Louie, K. K.-W. Lo, *Dalton Trans.*, **2010**, *Advance Articel*.
S. P.-Y. Li, H.-W. Liu, K. Y. Zhang, K. K.-W. Lo, *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 8329-8339.
- 87 Durchgeföhrt im Rahmen des Forschungsaufenthalts vom Mai 2009 bis November 2009 am California Institute of Technology, Pasadena, USA unter Anleitung von Prof. J. K. Barton.
- 88 A. E. Friedman, J.-C. Chambron, J.-P. Sauvage, N. J. Turro, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 4960-4962.
- 89 J. E. Dickeson, L. A. Summers, *Aust. J. Chem.*, **1970**, *23*, 1023-1027.
- 90 B. Zeglis, *Investigations into the Generality of Metalloinsertion at DNA Defects*, **2009**, Dissertation, California Institute of Technology, Pasadena, USA.
- 91 M. J. Rauterkus, S. Fakih, C. Mock, I. Puscasu, B. Krebs, *Inorg. Chim. Acta*, **2003**, *350*, 355-365.
- 92 T. Togano, N. Nagao, M. Tsuchida, H. Kumakura, K. Hisamtsu, F. S. Howell, M. Mukaida, *Inorg. Chim. Acta*, **1992**, *195*, 221-225.
- 93 R. M. Leasure, W. Ou, J. A. Moss, R. W. Linton, T. J. Meyer, *J. Chem. Mater.*, **1996**, *8*, 264-273.

- 94 N. Armaroli, G. Accorsi, D. Felder, J.-F. Niergarten, *Chem. Eur. J.*, **2002**, *8*, 2314-2323.
E. Holder, O. Trapp, G. Trapp, V. Marin, R. Hoogenbaum, U. S. Schubert, *Chirality*, **2004**, *16*, 363-368.
- 95 Y. Sun, S. N. Collins, L. E. Joyce, C. Turro, *Inorg. Chem.*, **2010**, *49*, 4257-4262.
- 96 C. Turro, S. H. Bossmann, Y. Jenkins, J. K. Barton, N. J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 9026-9032.
E. J. C. Olson, D. Hu, A. Hörmann, A. M. Jonkman, M. R. Arkin, E. D. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 11458-11467.
B. Onflet, P. Lincoln, B. Nodén, J. S. Baskin, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2000**, *97*, 5708-5713.
- 97 Hergestellt von C. Puckett, California Institute of Technology, Pasadena, USA.
- 98 Durchgeführt von R. J. Ernst, California Institute of Technology, Pasadena, USA.
- 99 http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/, 13.08.2010.
<http://www.cell-lines-service.de/content/>, 13.08.2010.
- 100 I. Gillaizeau-Gauthier, F. Odobel, M. Alebbi, R. Argazzi, E. Costa, C. A. Bignozzi, P. Qu, G. J. Meyer, *Inorg. Chem.*, **2001**, *40*, 6073-6079.
- 101 Hergestellt von B. Zeglis, *California Institute of Technology*, Pasadena, USA.
- 102 J. F. Berry, F. A. Cotton, C. A. Murillo, *Inorg. Chim. Acta*, **2004**, *357*, 3847-3853.
R. M. Leasure, W. Ou, J. A. Moss, R. W. Linton, T. J. Meyer, *J. Chem. Mater.*, **1996**, *8*, 264-273.

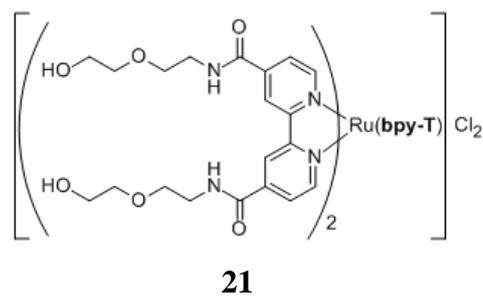
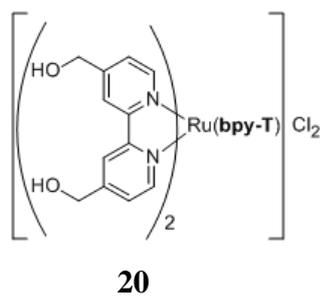
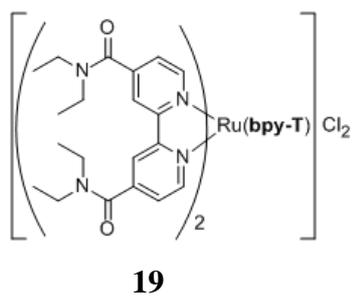
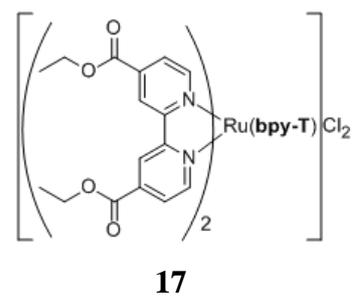
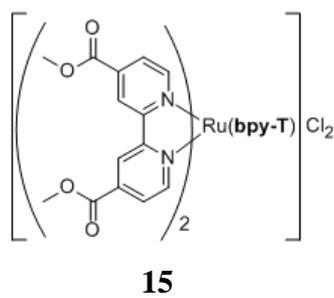
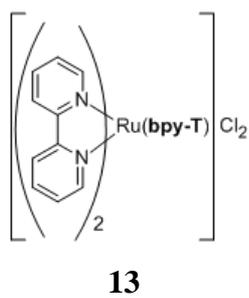
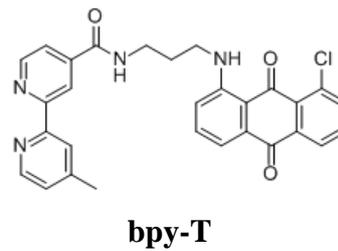
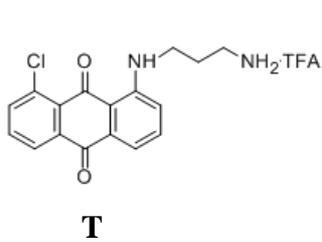
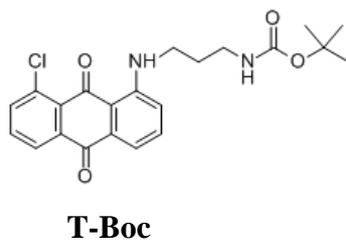
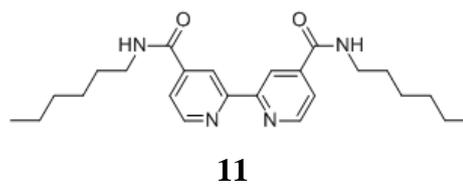
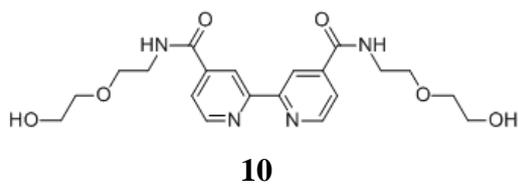
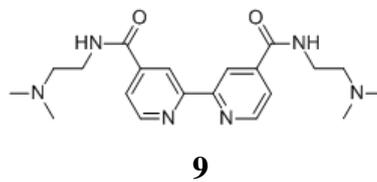
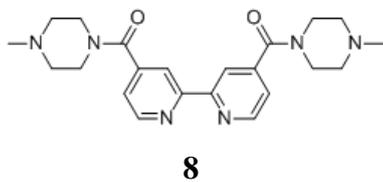
7 Anhang

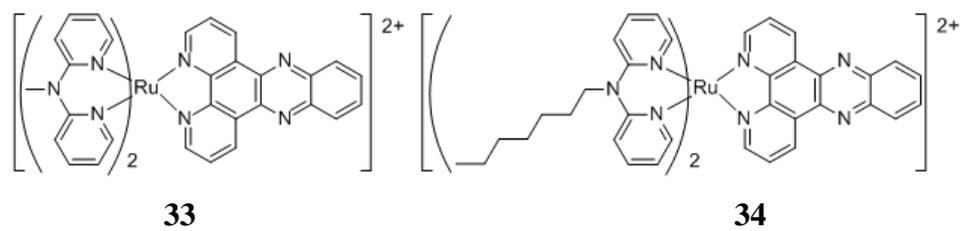
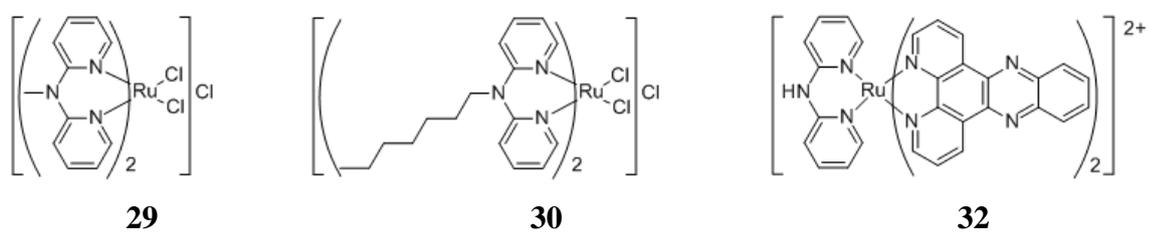
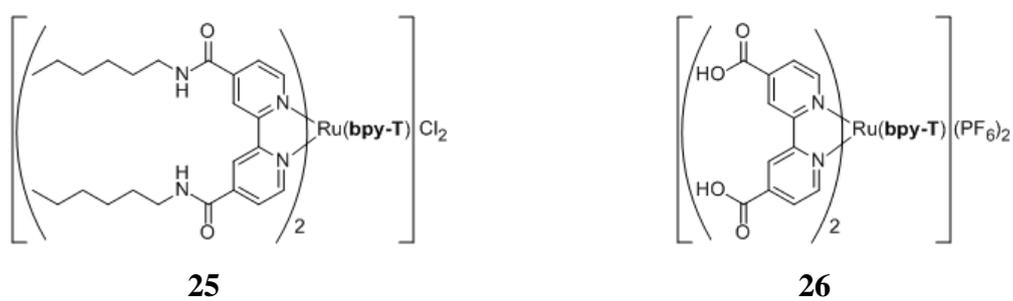
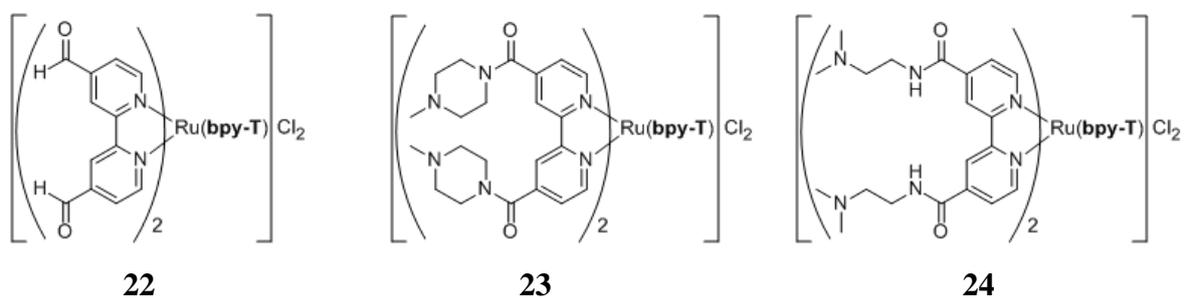
7.1 Molekülverzeichnis

7.1.1 Literaturbekannte Verbindungen

**1****2****3****4****5****6****7****27****dppz****12****14****16****18****28****31**

7.1.2 Neue Verbindungen

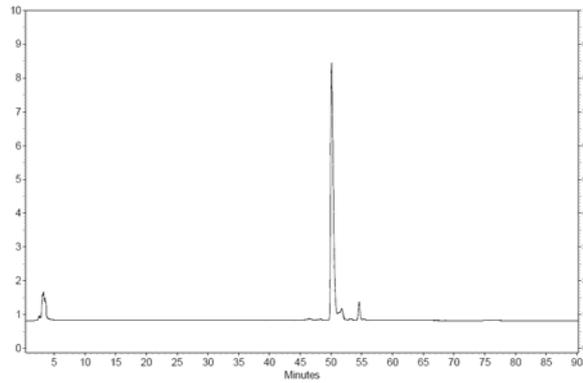
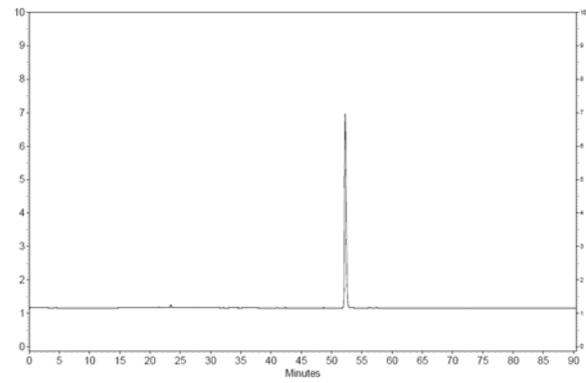
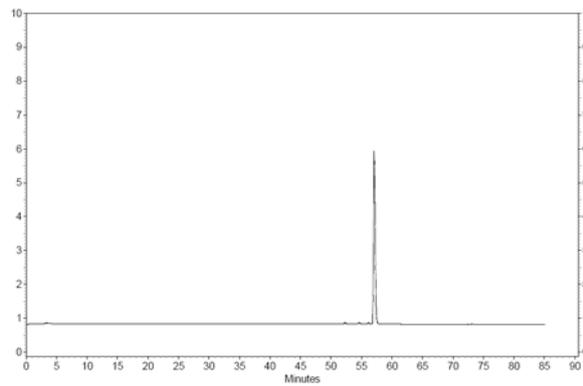
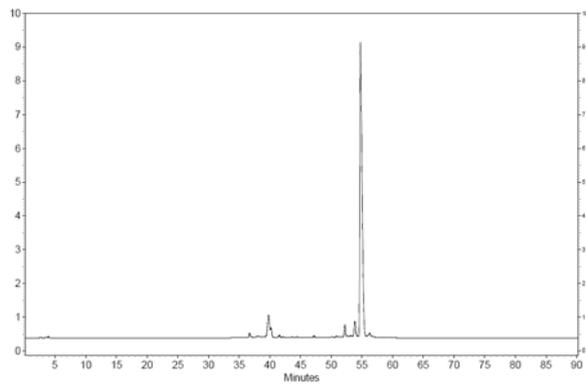
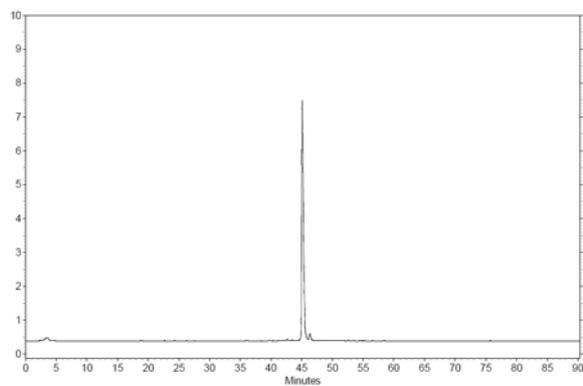
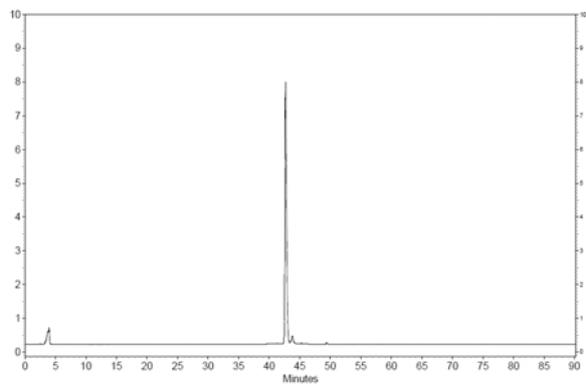




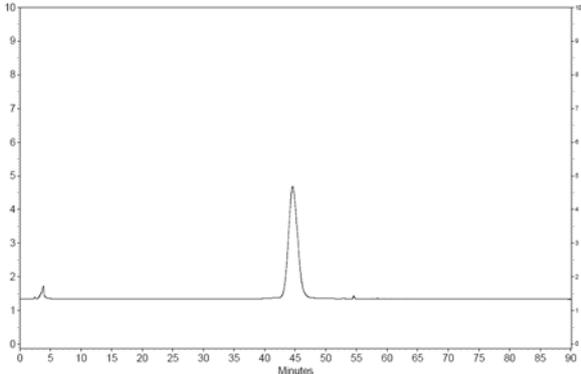
7.2 HPLC-Spektren Komplexe

ausgewählter

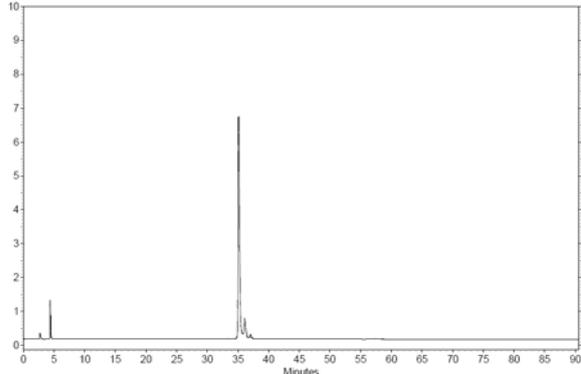
Tris(bipyridyl)ruthenium(II)-

13**15****17****19****20****21**

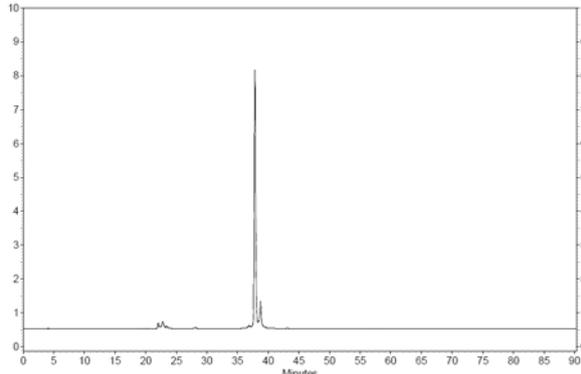
22



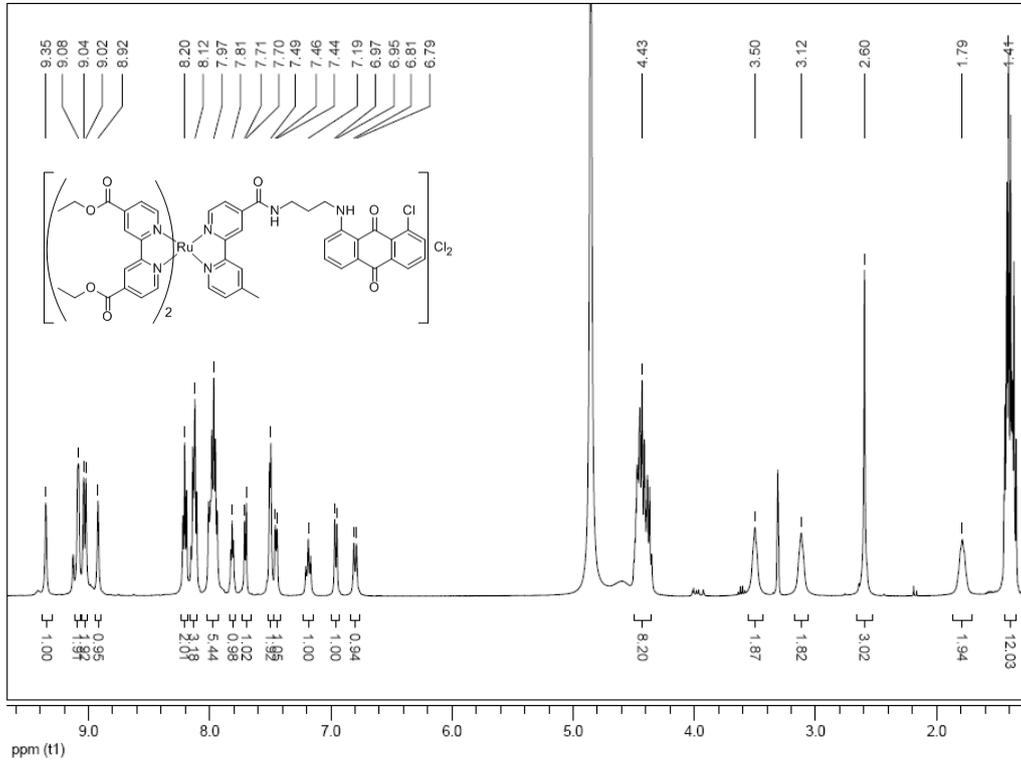
23



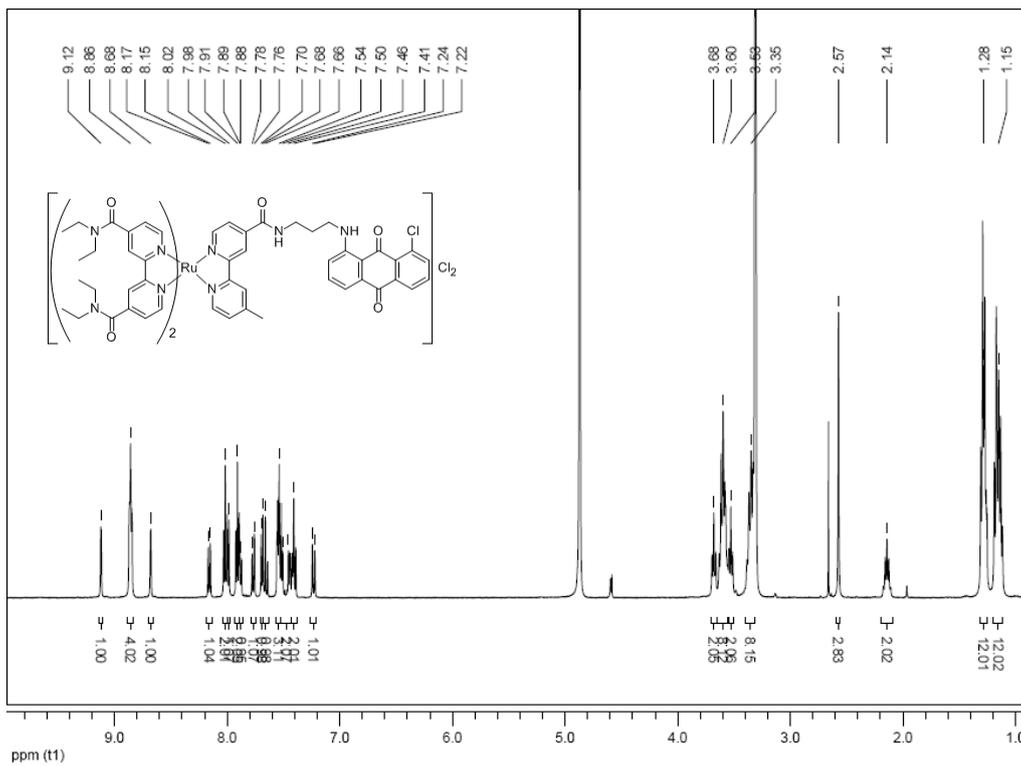
24



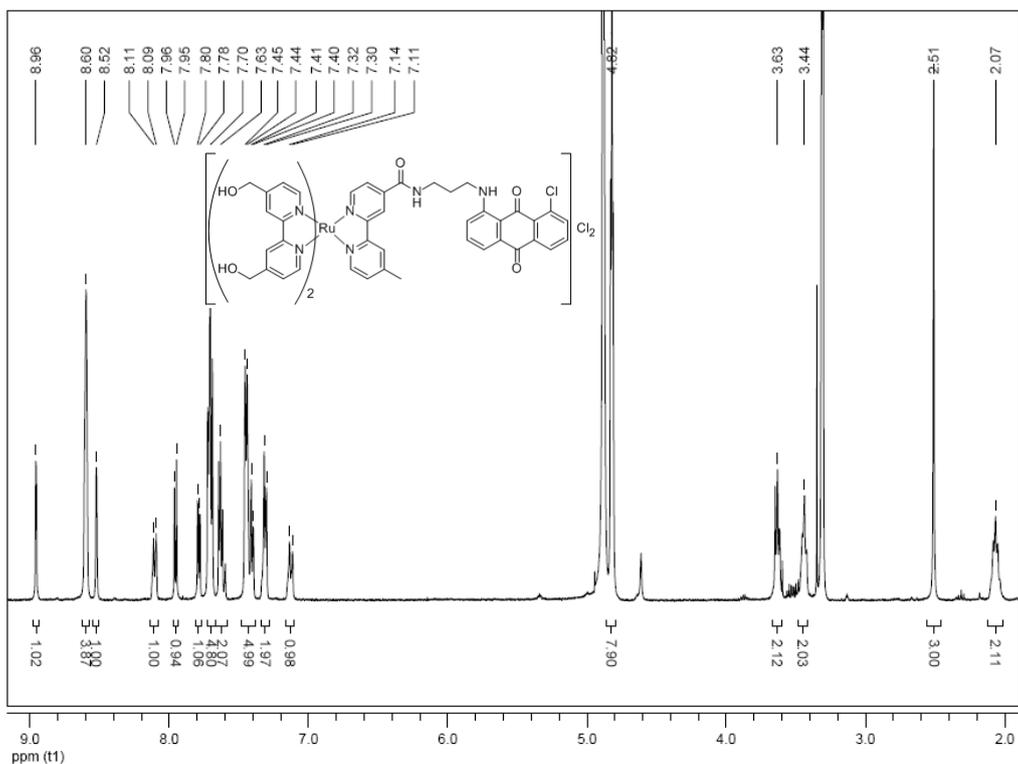
17



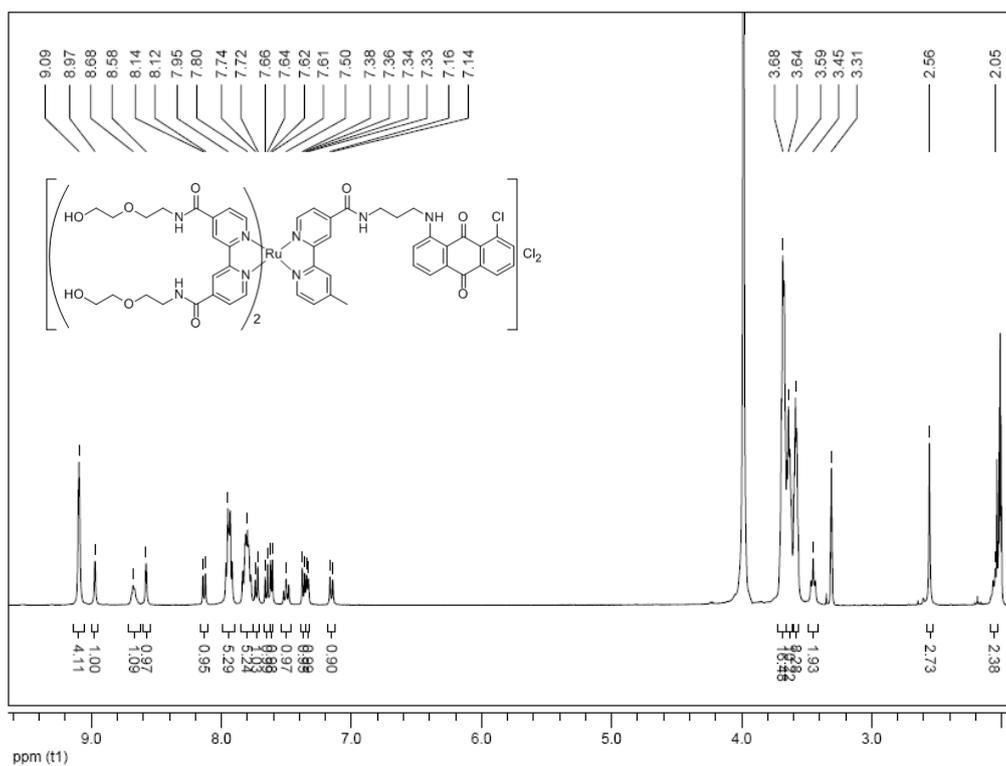
19



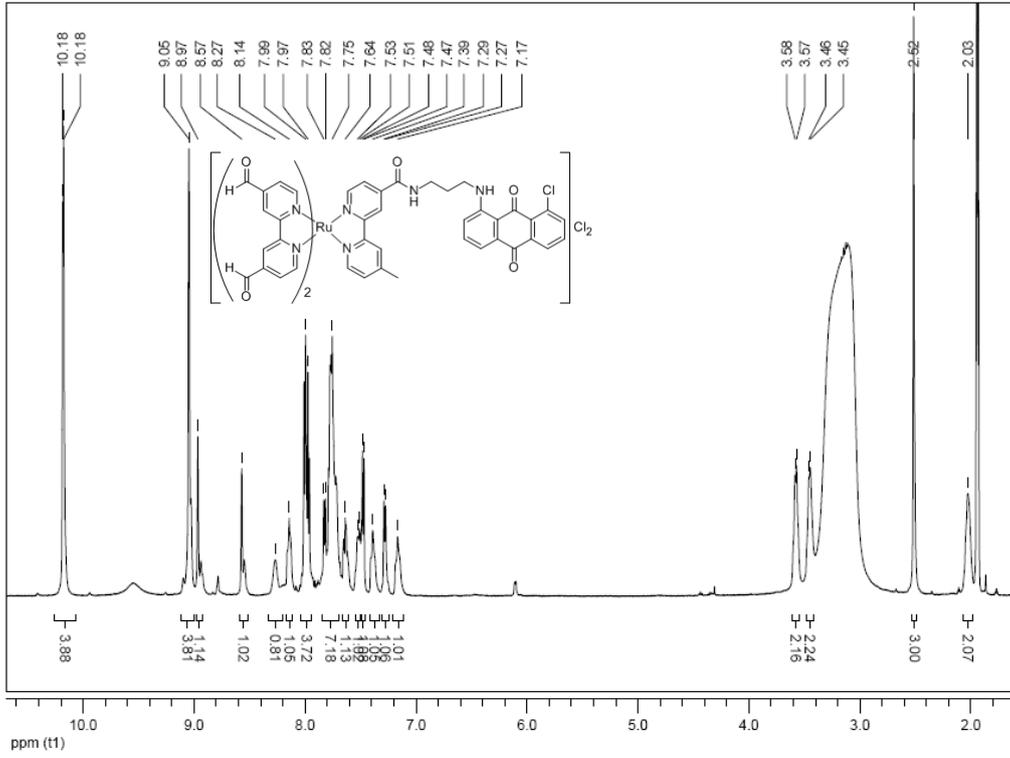
20



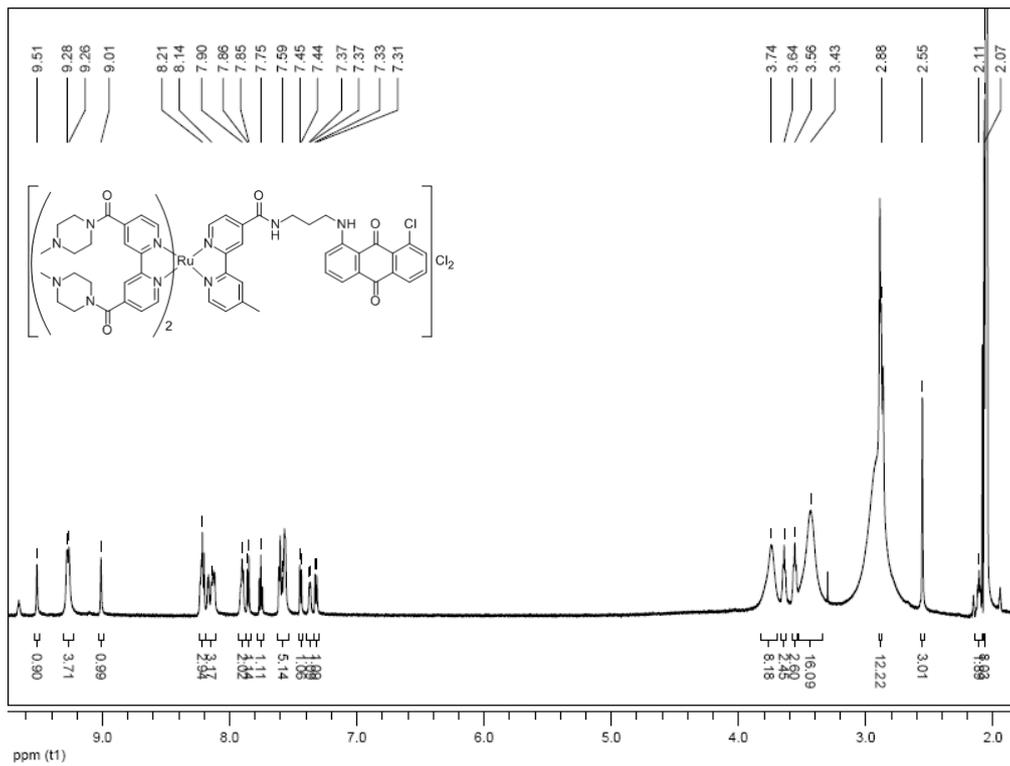
21



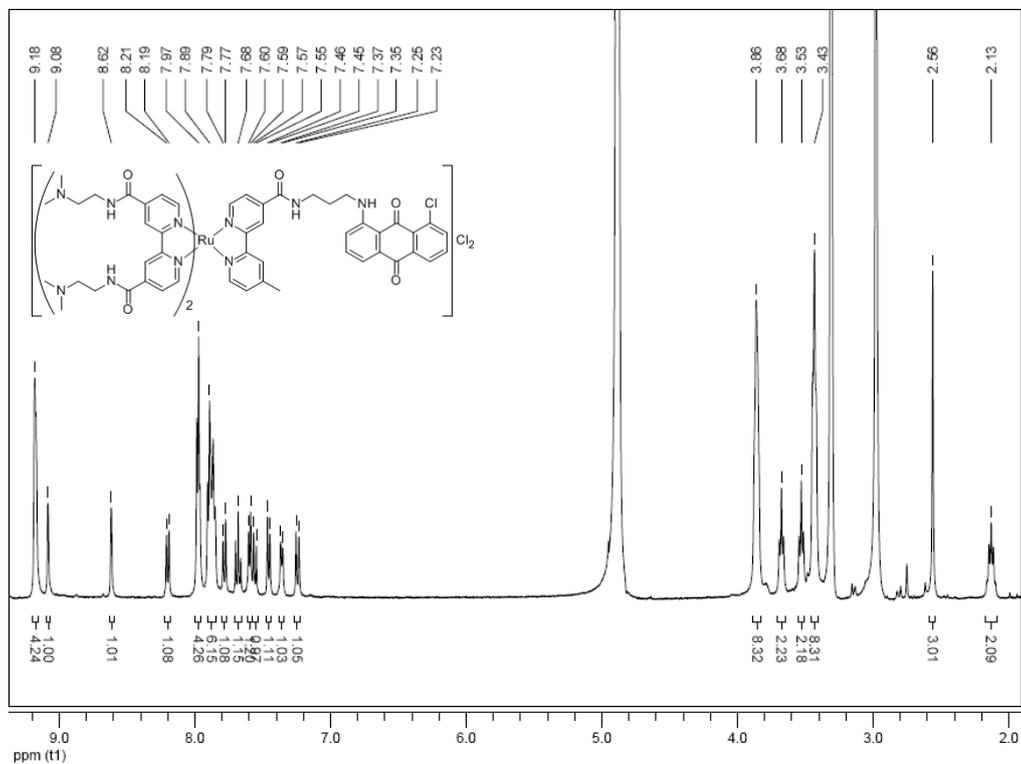
22



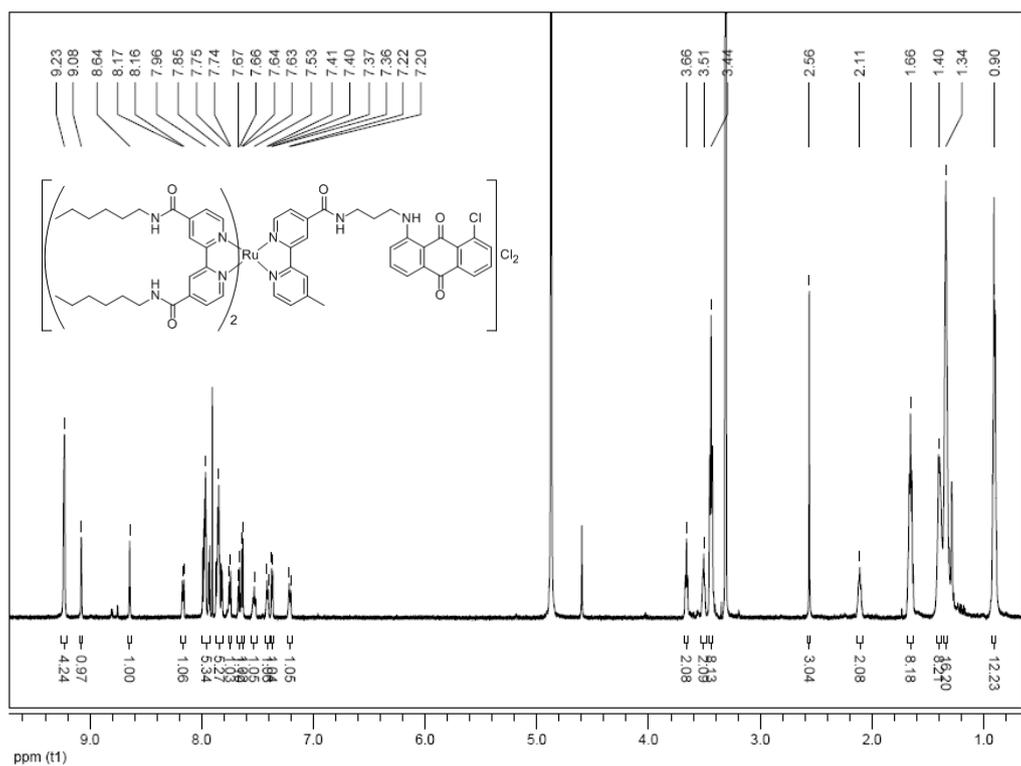
23



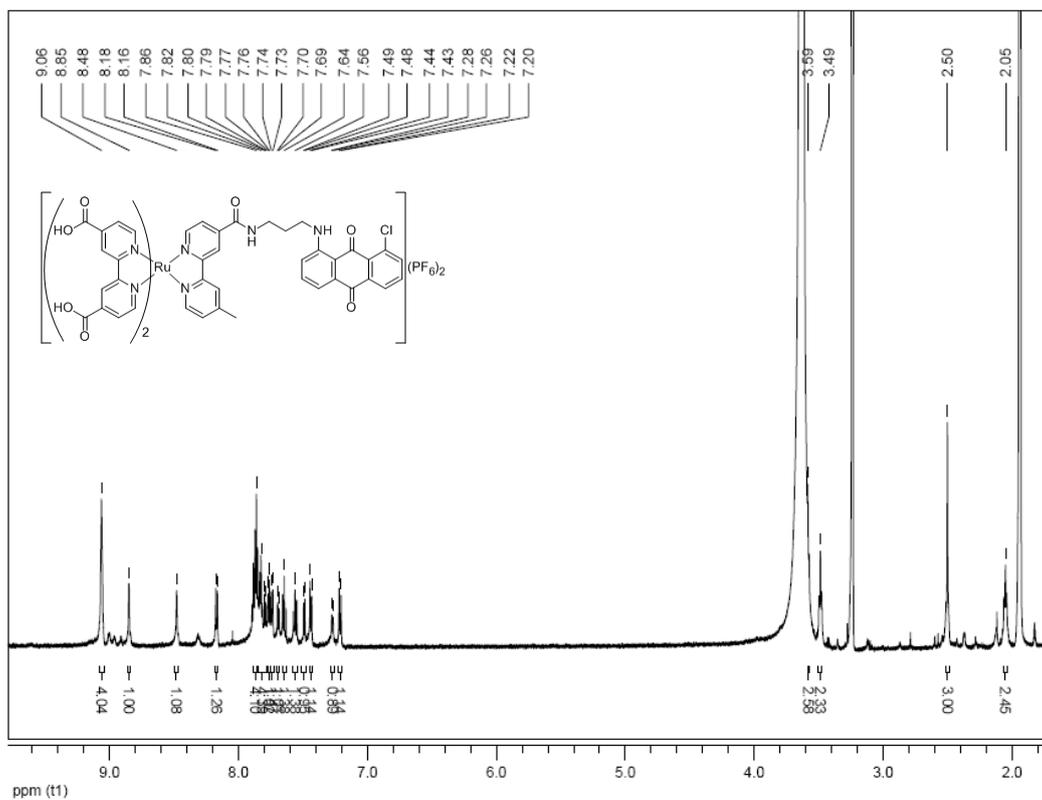
24



25



26



7.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Roland Krämer danke ich für die Möglichkeit, an einem interessanten Thema zu forschen, das Interesse an meiner Arbeit und die daraus resultierenden Ratschläge. Außerdem danke ich ihm für die Ermöglichung eines Forschungsauslandsaufenthalts während meiner Doktorarbeit.

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich bei der Landesgraduierten Förderung Baden-Württemberg und dem Deutschen Akademischen Auslandsdienst.

Ich danke auch dem gesamten Arbeitskreis Krämer und Mokhir für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Besonders danke ich meinen ehemaligen Laborkollegen Dr. Radoslaw Kierat, Jasmin Barth, Dr. Birgit Thaler und Armin Pöck für die reibungslose Zusammenarbeit im Labor und die Unterstützung im Laboralltag. Chemielaborantin Jasmin Barth danke ich zusätzlich für die unersätzbliche präparative Unterstützung bei den Synthesen.

Dr. Tobias Graf und Susanne Kohlmajer danke ich für die gemeinsame Zeit als Administratoren und die damit verbundenen Lösungen unsäglicher Computerprobleme.

Für die gute Zusammenarbeit, Kompromissbereitschaft und Hilfsbereitschaft im Zelllabor bedanke ich mich bei Annabelle Fülöp, Helen Hagen, Gerrit Rebmann und Zuhal Kaya.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Zuhal Kaya, die mir die Arbeiten im Zelllabor beigebracht hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei Ute Wildenberg für die Kultivierung und Vorbereitung der Zelllinien, sowie der Organisation des Zelllabors.

Bei meinen Forschungspraktikantinnen Isabel Thome, Mascha Jäckel und Anna-Maria Rensland bedanke ich mich für die präparative Unterstützung.

Claudia Dienemann, Karin Gabel, Volker Seifried und Heike Vongerichten möchte ich für die gute Organisation des Laborbetriebs und für die ESI-Aufnahmen danken.

Zu Danken habe ich auch dem Arbeitskreis Helmchen für die Möglichkeit präparativer HPLC-Auftrennungen. Ins Besondere gilt mein Dank Kerstin Brödner, die mich in die HPLC eingelernt hat.

Bedanken möchte ich mich desweitem beim Arbeitskreis Herten, vor allem bei Privatdozent Dr. Dirk-Peter Herten sowie Daniel Barzan, für die Möglichkeit Fluoreszenzmikroskopie im Bioquant durchzuführen.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Studienkollegen und Freunden, die mich während des Studiums und der Promotion begleitet haben. Es war schön, euch alle kennenzulernen.

Für die Aufnahme in Ihrem Arbeitskreis während meines Forschungsaufenthalts bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Jacqueline K. Barton. Ich danke ihr für das entgegen gebrachte Vertrauen, das stete Interesse an, Diskussionen über und Anregungen zu meinem Forschungsthema.

Dem ganzen Arbeitskreis von Jackie danke ich für die herzliche Aufnahme, die konstruktiven Diskussionen im Labor, die gemeinsamen Unternehmungen außerhalb des Labors, besonders bei Pam Sontz, und das Näherbringen der amerikanischen Kultur. Bei den Mitgliedern von „*Subgroup 1*“ Dr. Curtis Schneider, Dr. Brian Zeglis, Dr. Cindy Puckett, Russ Ernst und Hang Song möchte ich mich für die moralische Unterstützung bei „*Show&Tell*“ sowie den konstruktiven Diskussionen und zahlreichen Hilfestellungen bedanken. Weiterhin bedanke ich mich bei Cindy Puckett und Brian Zeglis für die zur Verfügung gestellten Verbindungen sowie bei Russ Ernst für die ICP-MS-Messungen von Zelllysate und Zellkernextrakt.

Thank you Barton Group.

Fürs Korrekturlesen dieser Arbeit bin ich Dr. Birgit Thaler, Dr. Timon Stork und Dr. Korbinian Müller-Graff zu Dank verpflichtet.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner ganzen Familie und meinem Freund Timon für die anhaltende Unterstützung, den Rückhalt und den Glauben an mich während meines Studiums und der Promotion aus ganzen Herzen bedanken.

Erklärung gemäß § 8 (3) b) und c) der Promotionsordnung

- a) Ich erkläre hiermit, 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, 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 02.02.2011

Annemarie Schwarz