

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

vorgelegt von
Diplom-Chemikerin Zuhail Kaya
aus Waldshut-Tiengen
Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2008

**Synthese fluoreszierender Aminoanthrachinon-Farbstoffe und
deren Anwendung für das zelluläre Imaging**

Gutachter: Prof. Dr. Roland Krämer
Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer

Synthese fluoreszierender Aminoanthrachinon-Farbstoffe und deren Anwendung für das zelluläre Imaging: Anthrachinonfarbstoffe zählen zu den stabilsten Verbindungen in der organischen Chemie und weisen besonders brillante Farben sowie eine hohe Lichtechtheit auf. Sie zeichnen sich durch gute photophysikalische Eigenschaften aus und sind heute als molekulare Sonden für bioanalytische Anwendungen und das zelluläre Imaging von großer Bedeutung.

In dieser Arbeit wurden Derivate und Biokonjugate von nahinfrarot emittierenden Anthrachinonfarbstoffen entwickelt, die ungewöhnliche Akkumulation und subzelluläre Verteilungen in lebenden Zellen zeigen, die hochspezifische Markierungen in fixierten Zellen ermöglichen, die auf biologisch wichtige Metallionen ansprechen oder den programmierten Zelltod in lebenden Zellen auslösen. Die wichtigsten neu entwickelten Sonden und ihre Anwendungen sind hier zusammengefasst:

- *In vivo* selektive Fluoreszenzfarbstoffe

Die neu entwickelten Anthrachinonderivate **3**, **13** und **15** erkennen selektiv die Plasmamembranen und den *Nuclear Envelope* (Zellkernmembran, Endoplasmatisches Retikulum) in lebenden Zellen, während Verbindung **12** eine hohe Affinität zum Zellkern aufweist. Infolge der sehr guten photophysikalischen Eigenschaften sind die Fluorophore für die modernen hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopiemethoden (4pi, STED, SMI-Vertico) geeignet.

- Metallbindende Sonden

Zur fluorometrischen Bestimmung von intrazellulären Zn^{2+} -Ionen wurde das Ligandensystem **17** entwickelt. Die qualitative Bestimmung der Zn^{2+} -Ionen erfolgte durch die Emissionsabnahme des nahinfrarot emittierenden Fluorophors infolge der Komplexierung von Zn^{2+} -Ionen über die Bispicolylamineinheit des Ligandensystems.

Aufgrund der zellulären, phototoxischen Eigenschaften von Trisbipyridylrutheniumkomplexen wurde ein mit Anthrachinonderivat funktionalisierter Trisbipyridylrutheniumkomplex synthetisiert. Das Konjugat zeigt im Vergleich zu den bekannten Trisbipyridylrutheniumkomplexen eine erhöhte Zellpermeabilität, eine erhöhte Phototoxizität und eine Zellakkumulation, die vom Anthrachinon dirigiert wird.

- Biokonjugate (Protein- und Peptidnukleinsäurekonjugate)

Die Spezifität der Aminoanthrachinon-Fluorophore wurden durch Konjugation an das Protein *Wheat germ agglutinin* (WGA) und an eine spezielle, repetitive Peptidnukleinsäuresequenz in fixierten Zellen verbessert. Das WGA-Konjugat stellt ein Beispiel aus dem Bereich der Immunofärbungen in der biotechnologischen Anwendung dar.

Über die hochselektive Markierung der entwickelten PNS-Konjugate wurde mit Hilfe von Fluoreszenz in situ Experimenten und mittels Mikroinjektions-

technik die topologische Anordnung der Zentromerregion von Chromosom 9 in menschlichen Zellen quantifiziert.

- Zytostatika

Zwei etablierte und bekannte Zytostatika auf Anthrachinonbasis sind Doxorubicin und Mitoxantron. Ein weiteres Derivat wurde entwickelt, das eine hohe zytostatische Wirkung auf diverse Zellen zeigt. Die zelluläre Toxizität der Verbindung beruht auf Apoptosevorgängen.

Synthesis of Fluorescent Aminoanthraquinone-Fluorophores and their application in cellular Imaging: Anthraquinone dyes belong to the stable compounds in the organic chemistry and show brilliant colours as well as high lightfastness. One of the features of these dyes are good photophysical properties and therefore they have a high relevance as molecular probes for bioanalytical applications and for cellular imaging.

Various nearinfrared emitting anthraquinone derivatives and bioconjugates were developed. Dyes showing unusual accumulation and subcellular distribution in live cells, dyes providing high specific labelling in fixed cells, dyes reporting on biorelevant metal ions and dyes releasing the programmed cell death are reported in this thesis. The most important newly developed probes and their applications are discussed below:

- *In vivo* selective markers

The new developed anthraquinone derivatives **3**, **13** and **15** recognize selectively plasmamembranes and nuclear envelope (nuclear membrane, endoplasmatic reticulum) in live cells while compound **12** shows a high affinity to the nucleus. Due to the good photophysical properties the fluorophores are appropriate to modern, high resolution fluorescence microscopy methodology (4pi, STED, SMI-Vertico).

- Metal binding probes

Compound **17** was developed for fluorometric determination of intracellular Zn^{2+} -ions. The qualitative determination of Zn^{2+} -ion concentration results from quenching of the nearinfrared emission due to Zn^{2+} -Ion complexation by the bispicolyamine unit of the ligand system.

Due to cellular, phototoxic properties of trisbipyridylruthenium complexes a functionalized anthraquinone derivative of the trisbipyridylruthenium complex was synthesized. The new developed ruthenium conjugate shows, compared to known trisbipyridylruthenium complexes, high cell permeability, high phototoxicity and cell accumulation which is conducted by the anthraquinone.

- Bioconjugates (protein- and peptidenucleic acid conjugates)

The specificity of Aminoanthraquinone-Fluorophores were improved by conjugation to the protein Wheat germ agglutinin (WGA) and to a special, repetitive peptide-nucleic acid sequence in fixed cells. WGA conjugate presents an example of immunostains in biotechnology applications.

By the high selective labelling of designed PNA conjugates the topological arrangement of the centromer region of chromosome 9 in human cells were quantified via fluorescence in situ experiments and microinjection technology.

- Cytostatic drug

Two established and known cytostatic drugs of anthraquinone basis are doxorubicin and mitoxantrone. Further derivative, which shows a high cytostatic

effect to diverse cells, was developed. Cellular toxicity of this compound depends on apoptotic procedures.

Für meine Lieben

Phantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt.
Albert Einstein

Die experimentellen Untersuchungen zu dieser Arbeit wurden in der Zeit von April 2005 bis April 2008 am Anorganisch-Chemischen Institut der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg durchgeführt.

>> <<

Mein Dank gilt allen, die ich während meiner Arbeit kennen und schätzen gelernt habe.

>> <<

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

Herrn Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer danke ich für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen auf dem Gebiet der hochauflösenden Mikroskopietechniken und Herrn Prof. Dr. Peter Lichter danke ich herzlich zur Vergügungstellung des Konfokalen Laser Raster Mikroskops.

Meinen jetzigen und ehemaligen Laborkollegen Dr. Kai Strotmeyer, Dr. Helga Szelke, Dr. Valery Pavlov und Korbinian Müller-Graff danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die lustige Zeit.

Ich danke auch dem gesamten Arbeitskreis Krämer für die gute Zusammenarbeit, die vielen anregenden Diskussionen und die gute Zeit. Besonders danken möchte ich den „ehemaligen“ Dr. Tobias Graf, Dr. Radoslaw Kierat und Dr. Farouq Kiani sowie den „aktuellen“ Annemarie Schwarz, Birgit Thaler, Torbinian, Dr. Janos Kovacs, Dr. Matthias Hoffmann und Annabelle Fülöp.

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

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

Bei Volker Seifried möchte ich mich für die abwechslungsreichen und motivierenden Gespräche bedanken.

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

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit und für die netten Kaffeepausen und für die Tanzabende möchte ich mich bei Birgit Thaler bedanken.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Claudia Bartram für die fachliche Hilfe in biologischen Fragestellungen und für die unterhaltsame Zeit miteinander. Schön, dass ich dich kennengelernt habe.

Bei meinen Forschungspraktikanten Alexandra Fischer, Armin Alexander Poeck und Paul David Marzenell bedanke ich mich für die engagierte Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Ute Schmidt und Dr. Karsten Richter für die

sehr gute Zusammenarbeit im DKFZ, die geduldigen Erklärungen der funktionsweise des CLSM und biologischer Fragen und die unermüdliche Hilfsbereitschaft.

Eine weiterer großer Dank gilt den Kooperationspartnern, die die Experimente außerhalb des Instituts ermöglicht haben, wie Dr. Markus Langhans (HIP, Universität Heidelberg), Dr. Benjamin Funke (Pathologie, Universität Heidelberg), Dr. David Baddeley (KIP, Universität Heidelberg), Paul Lemmer (KIP, Universität Heidelberg), Dorothea Hahn (Bioquant, Universität Heidelberg) Dr. Lars Kastrup (MPI, Göttingen).

Ein weiterer Dank gilt an Dr. Simon Sauter (MoBiTec, Göttingen), Dr. Gunther Jäger (Biotrend, Köln), Dr. Sumant Dhawan (Cell technology, Mountain View, USA), Dr. Gunter Festel (Festel Capital, Hünenberg, Schweiz), Dr. Truc Brui (Promega, Madison, USA) für die Interesse an den KAYA-Farbstoffen.

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

Ich möchte mich bei allen Studienkollegen und Freunden bedanken die mich während des Studiums und der Promotion begleitet haben und dafür gesorgt haben, dass es eine unvergessliche Zeit war, darunter auch Andreas, Axel, Barzi, Becci, Bella, Claudia, Conny, David, Erhard, Frank, Helmut, Kai, Katsche, Krauß, Kristl, Marc, Martha, My Yen, Radek, Robert, Sabine, Sven, Staudt, Thomas, Tobi und Vogel Sabine.

Vielen Dank Frau Dr. Andrea Nestl für die große Unterstützung, die sie mir innerhalb der Promotion gegeben haben und für die Bearbeitung der Patentanmeldung.

Mein besonderer Dank geht an Florian Staier für seine unermässliche Bereitschaft und für die große Unterstützung während der Promotion.

>> <<

Zuletzt möchte ich meinen Eltern Ahmet und Zahide Kaya und meinem Bruder Süleyman für die anhaltende Unterstützung während des Studiums und der Promotion aus ganzem Herzen danken.

>> <<

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	13
2 Kenntnisstand	16
2.1 Anthrachinonfluoreszenzfarbstoffe	16
2.1.1 Anthrachinonfarbstoffe	16
2.1.2 DRAQ5	18
2.2 Zellkernarchitektur	20
2.2.1 DNS und PNS	20
2.2.2 Genommarkierungen	23
2.3 Metallkomplexe als molekulare Sonden	25
2.3.1 Bis[(picolyl)amin]zink(II) als Zinksensor	25
2.3.2 Tris(bipyridyl)ruthenium(II) als Fluoreszenzsonde	27
3 Theoretische Grundlagen	32
3.1 Biologische Grundlagen	32
3.1.1 Aufbau von Zellen	32
3.1.2 Methoden der Fluoreszenzmarkierungen (<i>In vivo</i> - Markierungen, Immunofärbungen, Halo Tag-Technologie, FISH)	36
3.1.3 Chromatin	41
3.1.4 Zellzyklus	43
3.1.5 Zelltod (Apoptose/Nekrose)	44
3.2 Methoden	46
3.2.1 Fluoreszenz	46
3.2.2 Fluoreszenzspektroskopie	49
3.2.3 UV/VIS Spektroskopie	50
3.2.4 Konfokale Laser Raster Mikroskopie	51
3.2.5 Differential-Interferenz-Kontrast Mikroskopie	53
3.2.6 <i>Spatially Modulated Illumination</i> Mikroskopie	54
3.2.7 4Pi Mikroskopie	55
3.2.8 <i>Stimulated Emission Depletion</i>	56
3.2.9 Mikroinjektion	57
3.2.10 Automatisierte PNS-Festphasensynthese	58

3.2.11	MALDI-TOF	59
4	Zielsetzung	61
5	Experimenteller Teil	62
5.1	Reagenzien, Materialien und Geräte	62
5.1.1	Chemikalien	62
5.1.2	Zellkulturen	62
5.1.3	Medien, Lösungen und Puffer	63
5.1.4	Geräte	65
5.2	Synthesen	66
5.2.1	Allgemeine Synthesevorschrift für einfach N-geschützten Diaminoalkane	66
5.2.2	Allgemeine Syntheseroute zur Darstellung der Amino- Anthrachinon-Farbstoffe	68
5.2.3	Darstellung von Dichloroanthrarufin	69
5.2.4	Allgemeine Synthesevorschrift zur Darstellung der monosubstituierten Aminoanthrachinon-Farbstoffe	69
5.2.5	Allgemeine Synthesevorschrift zur Darstellung der Diaminoanthrachinone	78
5.2.6	Allgemeine Synthesevorschrift zur Entfernung der Boc-Schutzgruppen	83
5.2.7	Darstellung der aktivierten Aminoanthrachinone	87
5.2.8	Darstellung des Halo Tag-Liganden	92
5.2.9	Kopplung von Dichloroanthrarufin an Dipicolylamin	93
5.2.10	Kopplung von Verbindung 13 an 4'-Methyl-2,2'- bipyridin-4-carbonsäure	97
5.2.11	Kopplung von Verbindung 17 an [RuCl ₂ (bpy) ₂]	98
5.2.12	Synthese von PNS-Farbstoffkonjugaten an der Festphase	100
5.3	Zellexperimente	103
5.3.1	Zellkultivierung	103
5.3.2	Formaldehydfixierung	104
5.3.3	<i>In vivo</i> Färbungen mit den Anthrachinonfluoreszenz- farbstoffen	105
5.3.4	<i>In vivo</i> Färbungen mit der Verbindung 16 (<i>Halo Tag</i> ® <i>Interchangeable Technology</i>)	106
5.3.5	<i>In vivo</i> Kontrolle der Zn ²⁺ -Ionen mit der Verbindung 17	107
5.3.6	<i>In vitro</i> Färbung mit der Verbindung 12	107
5.3.7	Immunofärbung	108
5.3.8	Kokalisationsexperimente mit den Amino- anthrachinonen und <i>WGA-FITC</i>	109

5.3.9	Kolokalisationsexperimente mit den Aminoanthrachinonen und DIOC ₆	109
5.3.10	Metaphasen-Chromosomenpräparationen	110
5.3.11	FISH-Experimente mit Zentromer 9 spezifischen PNS-Konjugaten.....	111
5.3.12	Mikroinjektionsexperimente mit Zentromer 9 spezifischen PNS-Konjugaten	112
5.3.13	Toxizitätsexperimente.....	113
5.4	Bildauswertung	116
6	Ergebnisse und Diskussion	117
6.1	Synthesen	117
6.1.1	Darstellung der Aminoanthrachinon-Farbstoffe.....	117
6.1.2	Darstellung der aktivierten Aminoanthrachinon-Farbstoffe.....	118
6.1.3	Kopplung von Dichloroanthrarufin an Dipicolylamin	119
6.1.4	Kopplung von Verbindung 13 an [Ru(bpy) ₃] ²⁺	120
6.1.5	Synthese von PNS-Farbstoffkonjugaten.....	120
6.1.6	Kopplung der Aminoanthrachinon-Farbstoffe an Proteine ...	121
6.2	Fluoreszenz der Aminoanthrachinon-Farbstoffe in Lösung	122
6.2.1	Abhängigkeit der Fluoreszenz von Lösungsmittel, Temperatur und pH-Wert	122
6.2.2	Wechselwirkung der Aminoanthrachinon-Farbstoffe mit DNS	125
6.2.3	Detektion von Metallionen durch 17	127
6.2.4	Absorptions- und Emissionseigenschaften des Rutheniumkomplexes 19	129
6.2.5	Bestimmung der Singulett-Sauerstoff-Produktion des Rutheniumkonjugats 19	130
6.3	Anwendung der Fluoreszenzfarbstoffe und ihrer Konjugate für das zelluläre <i>Imaging</i>	131
6.3.1	Selektive Visualisierung zellulärer Substrukturen.....	131
6.3.2	Bestätigung der Membranselektivität von 13 und 15 durch Kolokalisation mit anderen Farbstoffen	137
6.3.3	Bestimmung der Zytotoxizitäten von 13 und 15	139
6.3.4	Vergleich der Photostabilitäten von 15 und DID.....	140
6.3.5	Einsatz von 12, 13 und 19 in der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie	141
6.3.6	Versuche zur Einsatz von 16 als Halo Tag-Liganden	144
6.3.7	<i>In vivo</i> Bestimmung von Zn ²⁺ -Ionen durch 17	145
6.3.8	Visualisierung von Membranen mit einem Amino-	

	anthrachinon-Proteinkonjugat	146
6.3.9	Spezifische Markierung der Zentromerregion von Chromosom 9 mit Farbstoff-PNS-Konjugaten	146
6.3.10	Phototoxizitätsexperimente mit $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ und 19	152
6.3.11	Quantifizierung der Zytotoxizität von 14.....	153
7	Zusammenfassung	156
8	Literaturverzeichnis	159

Abbildungsverzeichnis

Abb.1:	Strand von San Diego.....	14
Abb.2.1:	Struktur einiger Anthrachinonfarbstoffe und die Farbe der Kristalle.....	16
Abb.2.2:	Mesomere Grenzstrukturen von an Position 1 donorsubstituierten Anthrachinonen.....	17
Abb.2.3:	Strukturformel von DRAQ5.....	18
Abb.2.4:	Dreifach gefärbte Brustkrebszellen.....	19
Abb.2.5:	Absorptions- und Emissionsspektrum von DRAQ5.....	19
Abb.2.6:	<i>Molecular Modelling</i> der Interkalation von DRAQ5 in die DNS...	19
Abb.2.7:	Absorptionsspektren von DRAQ5 mit und ohne DNS in Tris-Puffer.....	20
Abb.2.8:	Schematische Darstellung der DNS-Doppelhelix und ihrer Komponenten.....	21
Abb.2.9:	Gegenüberstellung eines DNS und eines PNS-Oligomers.....	22
Abb.2.10:	<i>In vivo</i> Kohybridisierung von cy3-PNS und CFP-TRF2 in U2OS Zellen.....	24
Abb.2.11:	Dynamiken der Telomerregionen in U2OS Zellen.....	24
Abb.2.12:	Strukturformeln der Zinksensoren von <i>Nagano</i>	26
Abb.2.13:	Absorptions- und Emissionsspektrum von 15 μ M ZnAF-R2 in HEPES Puffer bei Titration mit Zn ²⁺ -Ionen.....	26
Abb.2.14:	Ratiometrische Detektion von Zn ²⁺ -Ionen in Makrophagen über ZnAF-R2EE in PBS Puffer bei pH 7,4.....	27
Abb.2.15:	Vereinfachte elektronische Struktur von [Ru(bpy) ₃]Cl ₂ und die möglichen elektronischen Übergänge.....	27
Abb.2.16:	Absorptionsspektrum von [Ru(bpy) ₃] ²⁺	28
Abb.2.17:	Schematische Darstellung der elektronischen Übergänge von [Ru(bpy) ₃] ²⁺ und das Emissionsspektrum von [Ru(bpy) ₃] ²⁺	29
Abb.2.18:	DIC und konfokale Fluoreszenzaufnahme von SEG-Zellen nach Inkubation mit [Ru(bpy) ₃]Cl ₂	29
Abb.2.19:	Dipyridophenazinkomplexe von Ruthenium.....	30
Abb.2.20:	Konfokale Fluoreszenzaufnahme von HeLa-Zellen inkubiert mit [Ru(DIP) ₂ dppz] ²⁺	30
Abb.2.21:	Konfokale Fluoreszenzaufnahme von Makrophagen nach	

	Inkubation mit $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$	31
Abb.3.1:	Schematische Darstellung einer tierischer und einer pflanzlicher Zelle	33
Abb.3.2:	Querschnitt durch die Plasmamembran einer tierischer Zelle und Flüssig-Mosaik-Modell	33
Abb.3.3:	Übersicht über selektive <i>in vivo</i> Fluoreszenzfarbstoffe für diverse subzelluläre Strkturen	36
Abb.3.4:	Schematische Darstellung der <i>Labelled</i> Avidin-Biotin-Methode....	38
Abb.3.5:	Konfokale Aufnahme einer 3T3-Zelle.....	38
Abb.3.6:	MM-Kalkulation der Bindungsknüpung zwischen einem Halo Tag-Liganden und Halo Tag-Protein	39
Abb.3.7:	Der Halo Tag [®] -TMR Ligand, bestehend aus Linker sowie Farbstoff.....	40
Abb.3.8:	Schematische Darstellung des Prinzips der <i>in situ</i> Hybridisierung	41
Abb.3.9:	Kompaktierungstufen der DNS in einem Chromosom.....	42
Abb.3.10:	Schematische Darstellung und elektronenmikroskopische Aufnahme eines Metaphasenchromosoms	43
Abb.3.11:	Schematische Darstellung vom Zellzyklus einer eukaryotischen Zelle	44
Abb.3.12:	Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen einer Zelle während Nekrose bzw. Apoptose	46
Abb.3.13:	Vereinfachtes Jablonski Diagramm.....	48
Abb.3.14:	Schematische Darstellung eines Fluoreszenzspektrometers.....	50
Abb.3.15:	Mögliche elektronische Übergänge in einem oktaedrischen Komplex	51
Abb.3.16:	Blockschema eines UV/VIS-Spektrometers.....	51
Abb.3.17:	Prinzip eines konfokalen Laser Raster Mikroskops	52
Abb.3.18:	Optischer Aufbau eines Differential Interferenz Kontrast Mikroskops	53
Abb.3.19:	Objektraum des SMI-Mikroskops	55
Abb.3.20:	Theoretische Punktbildfunktion des CLSM und des 4Pi Typ A, Typ B und Typ C mit den dazugehörigen simulierten Intensitätsplots	55
Abb.3.21:	Schematischer Aufbau der STED-Mikroskopie und Verkleinerung des Bildpunktes durch den ringförmigen Abregungspuls	56
Abb.3.22:	Mikroinjektion einer Samenzelle direkt in eine Eizelle	57
Abb.3.23:	Halbautomatisierte Mikroinjektionssystem für adhärente Zellen ...	58
Abb.3.24:	Schematische Darstellung einer PNS-Synthesezyklus an der Festphase	59

Abb.5.1:	Schematische Darstellung des Prinzips der randbasierten relativen radialen Position.....	116
Abb.6.1:	Synthesestrategie zur Darstellung der Aminoanthrachinon-Farbstoffe	117
Abb.6.2:	Übersicht der in dieser Arbeit dargestellten, ausgesuchten Aminoanthrachinon-Farbstoffe	118
Abb.6.3:	Strukturformeln der aktivierten Aminoanthrachinon-Farbstoffe	119
Abb.6.4:	Strukturformel von Halo Tag-Ligand 16	119
Abb.6.5:	Synthese von <i>N,N</i> -Di-2-methylpyridin-1,2-ethandiamin	119
Abb.6.6:	Strukturformel von 17	120
Abb.6.7:	Strukturformel von 19	120
Abb.6.8:	Strukturformeln von PNS-Farbstoffkonjugaten	121
Abb.6.9:	Absorptions- und Emissionsspektren von 13 und 15 gemessen in wässriger Lösung bei pH 7.....	122
Abb.6.10:	Emissionsspektren von 15 und 4 bei verschiedenen Konzentrationen	123
Abb.6.11:	Emissionsspektren von 13 und 15 in H ₂ O, MeOH und CH ₂ Cl ₂	124
Abb.6.12:	Temperaturabhängigkeit am Emissionsmaximum einer 50 µM Lösung von 13 und 15 in MOPS-Puffer	125
Abb.6.13:	pH-Abhängigkeit am Emissionsmaximum einer 50 µM Lösung von 13 und 15 in MOPS-Puffer	125
Abb.6.14:	UV-VIS Titrations von 13, 15, 4, 12 und DRAQ5 mit DNS in MOPS-Puffer	126
Abb.6.15:	UV-VIS Titration einer 50 µM Lösung von 17 mit ZnSO ₄ in EtOH/H ₂ O und Absorptionsdiagramm	128
Abb.6.16:	Fluoreszenztitration einer 50 µM Lösung von 17 mit ZnSO ₄ in EtOH/H ₂ O und Emissionsdiagramm	128
Abb.6.17:	UV-VIS- und Fluoreszenzspektren einer 45 µM Lösung von 19 in Ethanol bei verschiedenen Anregungswellenlängen.....	129
Abb.6.18:	Quantifizierung von Singulett-Sauerstoff durch Oxidation von DCFH zu DCF.....	131
Abb.6.19:	CLSM-Aufnahmen von lebenden HeLa- und LnCAP-Zellen inkubiert mit 5 µM 13 in HEPES-Puffer.....	132
Abb.6.20:	Dreidimensionale CLSM-Aufnahmen einer HeLa-Zelle während der Zellteilung inkubiert mit 5 µM 13.....	133
Abb.6.21:	CLSM-Aufnahmen von menschlichen Dünndarmgewebeschnitten inkubiert mit 10 µM 13 bei RT für 3 min.....	133
Abb.6.22:	DIC-Aufnahme von einer lebenden WT-MDB-Zelle und der dazugehörige CLSM-Aufnahme gefärbt mit 10 µM 13.....	134
Abb.6.23:	CLSM-Aufnahmen von lebenden HeLa-Zellen inkubiert mit 7,5 µM 15 und 10 µM 3.....	134

Abb.6.24: CLSM-Aufnahmen von lebenden LnCAP-Zellen inkubiert mit 7,5 μM 15 bzw. CLSM-Aufnahme von WT-MDB-Zellen mit 10 μM 15	134
Abb.6.25: CLSM-Aufnahmen von menschlichen Dünndarmgewebeschnitten inkubiert mit 10 μM 15 bei RT für 3min	135
Abb.6.26: CLSM-Aufnahmen von lebenden LnCAP- und HeLa-Zellen gefärbt mit 10 μM 12 und 10 μM DRAQ5.....	135
Abb.6.27: CLSM- und DIC-Aufnahmen von lebenden BY2-Zellen gefärbt mit 10 μM 12.....	136
Abb.6.28: CLSM-Aufnahmen von fixierten HeLa-Zellen inkubiert mit 10 μM 12	136
Abb.6.29: CLSM-Aufnahmen von lebenden HeLa-Zellen gefärbt mit 5 μM 4	137
Abb.6.30: CLSM-Aufnahmen von lebenden HeLa-Zellen gefärbt mit 10 μM 11 und mit 5 μM 10	137
Abb.6.31: CLSM-Aufnahmen von fixierten HeLa-Zellen gefärbt mit WGA-FITC, mit 13 und mit 15	138
Abb.6.32: CLSM-Aufnahmen von fixierten LnCAP-Zellen gefärbt mit WGA-FITC, mit 13 und mit 15	139
Abb.6.33: CLSM-Aufnahmen einer lebenden HeLa-Zelle gefärbt mit 1 μM DIOC ₆ und mit 10 μM 13.....	139
Abb.6.34: Proliferationsreihen von HeLa-Zellen inkubiert mit unterschiedlichen Konzentrationen von 13 und 15.....	140
Abb.6.35: CLSM-Zeitaufnahmen einer lebenden HeLa-Zelle gefärbt mit 7,5 μM 15	141
Abb.6.36: 4pi-Detektionen einer fixierten HeLa-Zelle gefärbt mit 5 μM 13	142
Abb.6.37: CLSM- und 4pi-Detektion einer fixierten HeLa-Zelle gefärbt mit 10 μM 19	142
Abb.6.38: STED-Detektion einer fixierten HeLa-Zelle gefärbt Mit 5 μM 13.....	143
Abb.6.39: Dreidimensionale SMI-Detektion einer fixierten HeLa-Zelle gefärbt mit 10 μM 12.....	144
Abb.6.40: Fluoreszenzaufnahmen von lebenden HeLa-Zellen, in denen das Protein p65 nach der Halo Tag-Methode markiert ist.....	144
Abb.6.41: CLSM-Aufnahmen von lebender HeLa-Zellen. Links: 10 μM 17, am Anfang der Bestrahlung; Mitte: 10 μM 17, am Ende der Bestrahlung; Rechts: 10 μM 17, 150 μM ZnSO ₄ , 15 μM Pyrithion, am Ende der Bestrahlung.....	145
Abb.6.42: CLSM-Aufnahmen fixierter HeLa-Zellen gefärbt mit WGA-Aminoanthrachinon und mit WGA-FITC	146

Abb.6.43: CLSM-Aufnahmen von Metaphasenchromosomen von HeLa-Zellen nach Markierung mit Chromosom 9 spezifischen Farbstoff-PNS und DNS-Konjugaten	147
Abb.6.44: CLSM-Aufnahmen von Metaphasenchromosomen von HeLa-Zellen	147
Abb.6.45: CLSM-Aufnahmen von Interchromosomen von HeLa-Zellen nach Markierung mit Chromosom 9 spezifischen Farbstoff-PNS-Konjugaten	149
Abb.6.46: CLSM-Aufnahmen von TMR-PNS-Konjugat in Interphase-chromosomen der fixierten HeLa-Zellen	149
Abb.6.47: Kolokalisation von TMR-PNS und Coumarin-PNS auf den Chromosom 9-Zentromer im Zellkern von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation <i>in vivo</i> und anschließender Fixierung mit Formaldehyd	150
Abb.6.48: Kolokalisation von TMR-PNS und Coumarin-PNS auf den Chromosom 9-Zentromer im Zellkern von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation <i>in vivo</i> und anschließender Fixierung mit Methanol/Eisessig	151
Abb.6.49: Auftragung der relativen Radialverteilung der Zentromere im Bezug auf den Zellkernschwerpunkt.....	152
Abb.6.50: Häufigkeitsverteilung der absoluten Distanzen der Zentromere untereinander	152
Abb.6.51: CLSM-Aufnahmen lebender HeLa-Zellen inkubiert mit den Rutheniumkonjugaten 19 und [Ru(bpy) ₃]Cl ₂	153
Abb.6.52: DIC-Aufnahmen lebender HeLa-Zellen inkubiert mit 10 µM 19 vor und nach der Belichtung	154
Abb.6.53: Detektion der Lumineszenz von Luciferin mit Cell Titer-Glo, Caspase-Glo 3/7 Assay, MultiTox-Glo Multiplex bei unterschiedlichen Zeiten.....	155

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Spektroskopische Daten von disubstituierten Anthrachinonen in MEOH.....	17
Tabelle 2.2:	Spektroskopische Daten von monosubstituierten Anthrachinonen in MEOH.....	17
Tabelle 5.1:	Verdünnungspuffer, Konzentrationen und Inkubationsdauer der Aminoanthrachinonfarbstoffe.....	105
Tabelle 5.2:	Hybridisierungskonzentrationen der PNS-Farbstoff-Konjugate und die entsprechenden Zellkernfarbstoffe.....	112
Tabelle 5.3:	Mikroinjektionsparameter der PNS-Farbstoff-Konjugate und die entsprechenden Zellkernfarbstoffe.....	113
Tabelle 5.4:	Inkubationsparameter und die Zelltypen der Proliferationsexperimente von Verbindungen 13, 15, 19, und Tris(bipyridyl)ruthenium(II).....	113
Tabelle 5.5:	Inkubationsparameter der Ru-Komplexe.....	114
Tabelle 5.6:	Inkubationskonzentrationen und -zeiten von 14 bei den jeweiligen Zytotoxizitätsassays.....	115
Tabelle 6.1:	Absorptions- und Emissionsdaten der Aminoanthrachinon-Farbstoffe in H ₂ O.....	123
Tabelle 6.2:	Änderung der Absorptions- und Emissionseigenschaften Der 17-M ²⁺ -Komplexe der Verbindung 17.....	129

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Boc-	tert-Butoxycarbonyl-
Bpy	2,2'-Bipyridin
CH₂Cl₂	Dichlormethan
CLSM	Konfokale Laser Raster Mikroskopie
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
d	Tag
DEMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DIC	Differential Interferenz Kontrast
DID	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine-perchlorate
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethyl-aminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dppz	Dipyridophenazin
DRAQ5	Deep Red fluorescing bisalkylamino-anthraquinone
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
EMEM	<i>Eagle's Minimal Essential Medium</i>
eq	Äquivalente
ESI	Elektronenspray-Ionisation
EtOH	Ethanol
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HOBTU	1-Hydroxybenzotriazol
HBTU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-O-(Benzotriazol-1-yl)-uroniumhexafluorophosphat

H₂O	Wasser
M	Molar
max	Maximum
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MgSO₄	Magnesiumsulfat
min	Minuten
ml	Milliliter
mmol	Millimol
μM	Mikromolar
μl	Mikroliter
MOPS	3-[<i>N</i> -Morpholino]propansulfonsäure
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
PIPES	Piperazine- <i>N,N'</i> -bis(ethansulfonsäure)
PNS	Peptidnukleinsäure
PTM	Photomultiplier
RLU	<i>Relative Light Unit</i>
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SMI	<i>Spatially Modulated Illumination</i>
SOCl₂	Thionylchlorid
SO₂Cl₂	Sulfurylchlorid
SSC	<i>Saline-Sodium Citrate Buffer</i>
STED	<i>Stimulated Emission Depletion</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TMR	Tetramethylrhodamin
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
YOYO1	1,1'-(4,4,7,7-Tetramethyl-4,7,-diazadecamethylen)-bis-4-[3-methyl-2,3-dihydro-(benzo-1,3-oxazol)-2-methyliden-chinolinium-tetraiodid]
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>

1 Einleitung

Schon im alten Rom war das Phänomen der Biolumineszenz bekannt. So beschrieb *Plinius* der Ältere im ersten Jahrhundert nach Christus das helle Leuchten einiger Quallenarten.^[1] Heute ist die Fluoreszenzmikroskopie eine der wichtigsten Methoden der Zellbiologie. Dementsprechend gehören zur Zeit fluoreszierende Verbindungen in Kombination mit den modernen Mikroskopietechniken zu den essentiellen Werkzeugen in der lebenswissenschaftlichen Grundlagenforschung und ihre Entwicklung nimmt gegenwärtig stark zu. Im Bereich des zellulären *Imaging* wurden im Jahr 2004 \$1,65 Milliarden umgesetzt, die Wachstumsraten sind zweistellig.^[2]

Fluoreszenzmarkierungen haben die Möglichkeiten der fluoreszenzmikroskopischen Echtzeit-Beobachtung von Vorgängen in lebenden Zellen revolutioniert. So wird beispielsweise GFP (*Green Fluorescent Protein*), zur intrazellulären Proteinlokalisierung benutzt^[3]. Hierbei wird die DNS, die für das zu untersuchende Protein kodiert, mit Hilfe von gentechnischen Methoden mit der GFP-kodierenden DNS ligiert und dieses künstliche Gen in die Zellen transfiziert. Die beiden Proteine werden von der Zelle als „Tandem“ produziert. Wandert das zu untersuchende Protein in ein Zellkompartiment, trägt es den fluoreszierenden *Marker* mit sich. Mit dieser biotechnologischen Entwicklung kann die Dynamik vieler Proteine in lebenden Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop annähernd in Echtzeit verfolgt werden. Mittlerweile ist eine große Anzahl von fluoreszierenden Proteinen bekannt, die sich sehr gut für *in vivo* Beobachtungen eignen (Abb.1).

Eine andere Möglichkeit bioaktive Molekül in Zellen zu verfolgen, ist die Kopplung an ein organisches Fluorophor, z. B. Fluorescein oder Tetramethylrhodamin. Im Bereich des zellulären *Imaging* haben Fluoreszenzfarbstoffe eine große Bedeutung.

Eine besondere Eigenschaft ist, da Fluorophore niedermolekulare Verbindungen sind, die leichte chemische Zugänglichkeit und die einfache Modifikation der Moleküle. Sie zeichnen sich durch ihre sehr guten photophysikalischen Eigenschaften aus und besitzen im Allgemeinen recht gute Quantenausbeuten und Extinktionskoeffizienten. Für Echtzeitbeobachtungen in lebenden Zellen wird eine Verschiebung der Lichtabsorptionen und die -emissionen der Fluoreszenzfarbstoffe in den langwelligen, roten Spektralbereich angestrebt. Eine Verschiebung der Absorption in diesen Bereich hat den Vorteil, dass diese Strahlung ener-

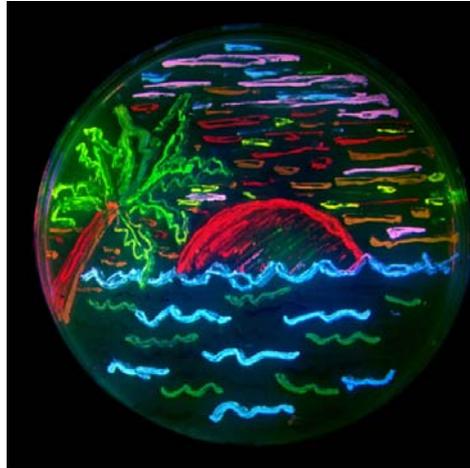


Abb.1: Strand von San Diego: gemalt mit acht verschiedenen farbigen Bakterienkolonien, die in Tsiens Labor entwickelten Fusionsproteine exprimieren.

gieärmer ist, da Bestrahlung mit energiereichem blauem oder ultraviolettem Licht zu Zellschädigungen führen kann. Eine Verschiebung der Emission in den langwelligen roten Bereich bringt zusätzlich den Vorteil, dass in diesem Spektralbereich die Eigenfluoreszenz von eukaryotischen Zellen, hauptsächlich durch aromatische Aminosäuren wie Tryptophan verursacht, gering ist. Durch diese Eigenfluoreszenz wird ein Strahlungsuntergrund erzeugt, der die Detektion der Fluorophore, wie beispielsweise TMR und Fluorescein erschwert.

Eine weitere Eigenschaft von einigen Fluoreszenzfarbstoffen ist die selektive Erkennung subzellulärer Strukturen oder Organellen, wie z. B. Membranen, Zellkern, Mitochondrien usw., in lebenden Zellen. Solche Fluorophore sind für das zelluläre *Imaging* besonders interessant, da die Fluoreszenzmarkierungen im Vergleich zu denen mit Fusionsproteinen sehr einfach und leicht realisiert werden können. Des Weiteren werden sie im Bereich der Immunofluoreszenz vermehrt eingesetzt um hochspezifische Visualisierungen an nicht lebenden Systemen zu ermöglichen. Hierbei werden die chemisch aktivierten Fluoreszenzfarbstoffe an verschiedene Biomoleküle wie z. B. Proteine, Antikörper, Peptide, DNS und PNS gekoppelt. Diese Biokonjugate erkennen selektiv in den Zellen ihre entsprechenden Bindungspartner. Die Anwendung solcher Biokonjugate bleibt weitgehend beschränkt auf fixierte Zellen, da diese Techniken diverse Waschschrte zur Entfernung überschüssiger Sonden beinhalten.

Weiterhin werden Fluorophore als Hilfsmittel in der Bioanalytik und Diagnostik eingesetzt. Hierbei kommen sie in verschiedenen *Assays* zum Einsatz, wie

z. B. in der forensischen Abteilung zur Quantifizierung von DNS, in der Medizin zur Detektion von Krebszellen oder in der biologischen Grundlagenforschung zum indirekten Nachweis von Proteinen oder Stoffwechselprodukten in Zellen. Die Stärke der Fluoreszenzsignale, die einfach über ein Fluoreszenzmikroskop oder einen Fluorimeter detektiert werden können, dienen hierbei als Kriterium zur Qualifizierung bzw. Quantifizierung.

2 Kenntnisstand

2.1 Anthrachinonfluoreszenzfarbstoffe

Anthrachinonfarbstoffe sind nach den Azofarbstoffen die wichtigste Klasse organischer Färbemittel. Das technische Anwendungsspektrum der Anthrachinonderivate umfaßt die Gruppen der *Vat Dyes*, *Disperse Dyes* und die *Acid Dyes*. Sie zählen zu den stabilsten organischen Farbstoffen und weisen besonders brillante Farben sowie eine hohe Lichtechtheit auf. Das Farbspektrum (Abb.2.1) reicht vom gelben Anthrachinon über oranges Alizarin, rotes Aminoanthrachinon, blaues DRAQ5 bis zum grünen Alizarincyangrün G Extra.

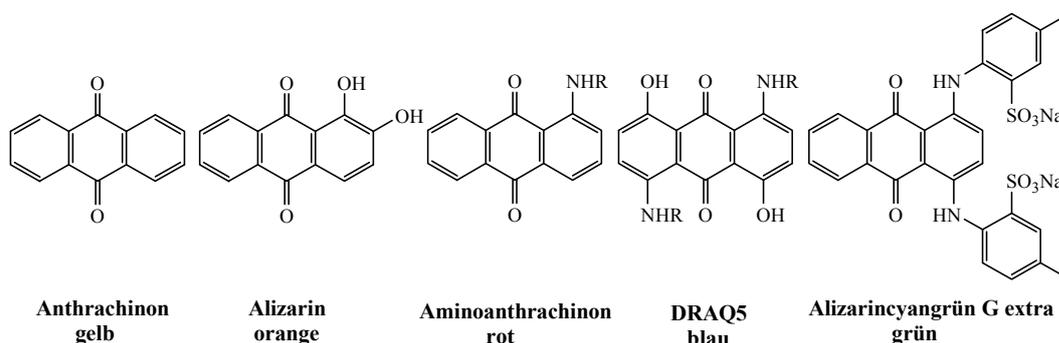


Abb.2.1: Struktur einiger Anthrachinonfarbstoffe und die Farbe der Kristalle.

2.1.1 Anthrachinonfarbstoffe

Die Anthrachinone sind die größte Gruppe der natürlich vorkommenden Chinone. Als wesentliches Strukturelement enthalten sie zwei Carbonylfunktionen, die über mehrere π -Bindungen miteinander in Konjugation stehen. Die meisten Anthrachinonfarbstoffe sind in Position 1 mit Donorsubstituenten versehen, welche als auxochrome Gruppen fungieren (Abb.2.2) und die Delokalisation des π -Systems verstärken.

Anthrachinon wurde 1840 von *Laurent* entdeckt, der Salpetersäure auf Anthracen einwirken ließ. Heute wird Anthrachinon mittels einer Friedel-Crafts-

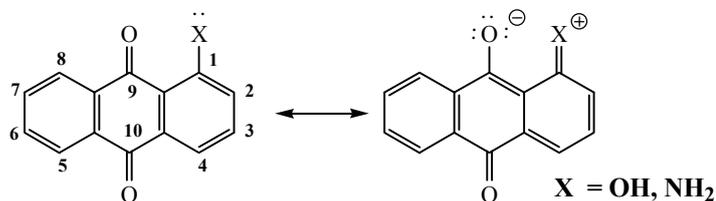


Abb.2.2: Mesomere Grenzstrukturen von an Position 1 donorsubstituierten Anthrachinonen.

Reaktion von Phtalsäureanhydrid und Benzol in Gegenwart von Aluminiumchlorid technisch hergestellt. Das schwach gelbe Anthrachinon zeigt eine mäßige Absorption im sichtbaren Bereich des Spektrums ($n \rightarrow \pi^*$ Übergang). Die Anwesenheit von einem oder mehreren Elektronendonorsubstituenten am Grundgerüst des Anthrachinons ermöglicht einen signifikanten bathochromen Effekt (Tabelle 2.1 und 2.2). Die Farben von Verbindungen, die Amino- oder Hydroxygruppen aufweisen, sind auf die Charge-Transfer-Absorptionsbanden zurückzuführen.^[4]

Substituenten	λ_{\max} [nm]	ϵ_{\max}
1,4-diOH	470	17000
1,5-diOH	425	10000
1,8-diOH	430	10960
1,4-diNH ₂	550, 590	15850
1,5-diNH ₂	487	12600
1,8-diNH ₂	507	10000

Tabelle 2.1: Spektroskopische Daten von disubstituierten Anthrachinonen in MeOH.

Substituent	1 - Position		2 - Position	
	λ_{\max} [nm]	ϵ_{\max}	λ_{\max} [nm]	ϵ_{\max}
OH	402	5500	368	3900
OCH ₃	378	5200	363	3950
NHCOCH ₃	400	5600	367	4200
NH ₂	475	6300	440	4500
NHCH ₃	503	7100	462	5700
NHC ₆ H ₅	500	7250	467	7100
NH(CH ₃) ₂	503	4900	472	5900

Tabelle 2.2: Spektroskopische Daten von monosubstituierten Anthrachinonen in MeOH.

Der erste schon im alten Ägypten benutzte Anthrachinonfarbstoff ist das aus der Krappwurzel (*Rubia tinctorum*) gewonnene Alizarin. Bei Alizarin und weiteren Farbstoffen der Hydroxyanthrachinone handelt es sich um Beizenfarbstoffe. Berühmtheit erlangte der Krapp vor allem durch die Türkisch-Rot-Färberei. Mit dieser Technik wurden im Orient Jahrhunderte lang Rottöne von faszinierender Brillanz und Echtheit erzielt. Bis zur Synthese von *Graebe* und *Perkin* im Jahr 1869 wurde Alizarin ausschließlich aus der Krappwurzel gewonnen. Die Hydroxyanthrachinone der Krappwurzel zählen, benannt nach dem Hauptvertreter Alizarin, zur Alizarinreihe. Sie bilden mit verschiedenen Metallionen farbige Komplexe, so genannte Krapplacke oder Metall-Beizen.^[5]

2.1.2 DRAQ5

Eine in zellulären *Imaging* eingesetzter Anthrachinonfluoreszenzfarbstoff ist DRAQ5 (*deep red-fluorescing bisalkylaminoanthraquinone*, Abb.2.3). Er diffundiert sehr schnell in den Zellkern lebender Zellen und färbt die DNS (Abb.2.4). DRAQ5 ist bei einem zellkompatiblen pH-Wert und bei Raumtemperatur stabil.^[6] Er kann durch einen im roten Spektralbereich arbeitenden Laser angeregt werden.

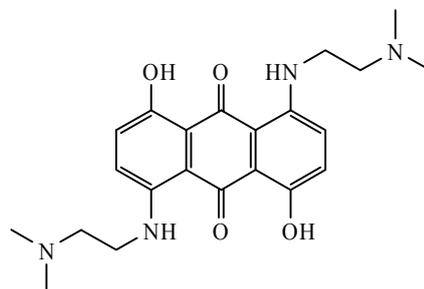


Abb.2.3: Strukturformel von DRAQ5.

Das Absorptionsmaximum von DRAQ5 liegt bei 647 nm. Die Emission liegt im Rotbereich des Spektrums zwischen $\lambda = 665\text{-}800$ nm mit einem Maximum bei 679 nm (Abb.2.5). So emittiert DRAQ5 bei höheren Wellenlängen als andere Farbstoffe. Mit diesen Emissionseigenschaften kann DRAQ5 mit weiteren Fluorophoren z. B. TMR, Fluorescein oder Texas Rot bei Kollokalisationsexperimenten eingesetzt werden ohne einen *cross-talk* der Emissionen zu erzeugen. Zudem liegt die Autofluoreszenz der eukaryotischen Zellen in einem niedrigeren Wellenlängenbereich und stört die markierten Bereiche bei der Detektion nicht.^[7]

Die Spezifität von DRAQ5 ist die Folge der Interkalation mit der DNS. Aufgrund von *Molecular Modelling* Experimenten wird angenommen, dass

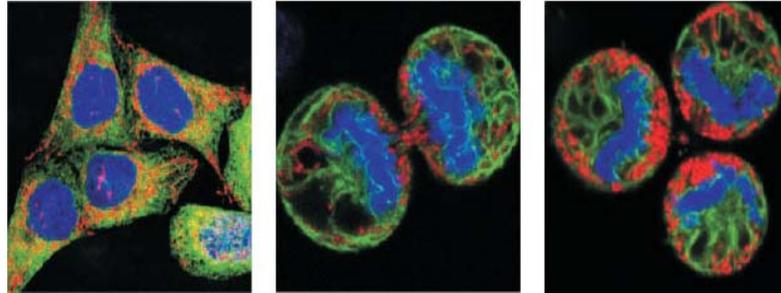


Abb.2.4: Dreifach gefärbte Brustkrebszellen: Zellkerne DRAQ5 (blau), mitochondrienspezifischer Farbstoff (rot), GFP-gelabeltes Fusionsprotein (grün). Gezeigte Phasen des Zellzyklus (von links nach rechts): Interphase, Anaphase und Metaphase.

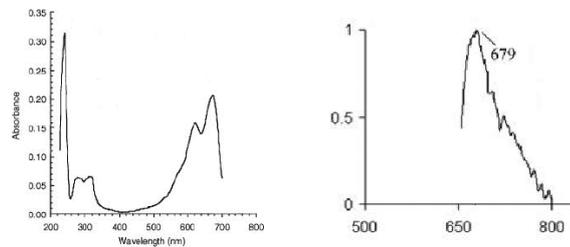


Abb.2.5: Absorptions- (links) und Emissionsspektrum (rechts) von DRAQ5 in Dichlormethan.

sich DRAQ5 in den *Minor Groove* der DNS einlagert (Abb.2.6). Diese Interkalation wird durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Phosphatgruppen des DNS-Rückgrats stabilisiert.^[8]

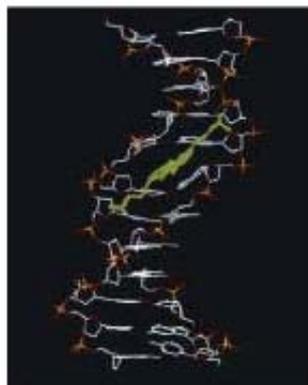


Abb.2.6: *Molecular Modelling* der Interkalation von DRAQ5 in die DNS.

Die DNS-Bindung wird durch das Absorptionsspektrum bestätigt (Abb.2.7). Die Absorptionsmaxima verschieben sich zu längerer Wellenlänge. Weiterhin ändert sich das Verhältnis der Absorptionsmaxima.^[8]

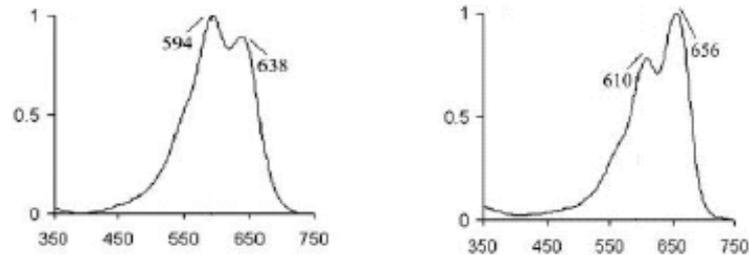


Abb.2.7: Absorptionsspektren von DRAQ5 in Tris-Puffer (pH 7,2): ohne DNS (links) und mit 6,5 eq DNS (rechts).

2.2 Zellkernarchitektur

Die spezielle Struktur der DNS erlaubt das Kopieren, Ablesen, Reparieren und Rekombinieren der genetischen Information, wobei für die genaue Funktion neben der Primärstruktur auch die lokale Konformation wichtig ist. Diese wird entweder in Wechsel mit Proteinen oder durch spezielle Sequenzen der DNS direkt erzeugt. *J. Watson* und *F. Crick* beschrieben 1953 als Erste mit der Bezeichnung Doppelhelix die grundlegende, dreidimensionale Struktur der DNS.^[9] Seitdem wurden zahlreiche Methoden entwickelt, die die statistische (*in situ*) und die dynamische Struktur (*in vivo*) der DNS im Zellkern untersuchen. Die gewonnenen Erkenntnisse können Grundlage für die Frühdiagnostik, Therapie und Prognose von Krankheiten sein. Im Forschungsgebiet der Zellkernarchitektur wird versucht die dreidimensionale Struktur der DNS in Form des Chromatins im Interphasezellkern zu untersuchen und zu verstehen. Grundlegende Gedanken dieses Gebietes sind, dass die Chromosomen im Zellkern nicht zufällig strukturiert sind und dass Abberationen der Architektur mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit entstehen.

2.2.1 DNS und PNS

DNS:

Desoxyribonukleinsäure (DNS) ist das größte bekannte Makromolekül und enthält durch eine bestimmte Kodierung seiner Bestandteile, den Genen, die Erbinforma-

reste nach außen orientiert sind. Dabei bilden jeweils zwei sich gegenüberliegende, zueinander komplementäre Basen Wasserstoffbrücken aus. Hierbei hybridisiert Adenin mit Thymin und Guanin mit Cytosin. Die einzelnen planaren Basenpaare sind in der Doppelhelix übereinandergestapelt, so dass durch übereinander angeordnete Paare zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen auftreten (Abb.2.8). In der am häufigsten vorkommenden Form der Doppelhelix, der B-Konformation, verläuft eine vollständige Windung über 3,4 nm und enthält etwa 10 Basenpaare.^[10, 11, 12, 13]

PNS:

Peptidnukleinsäuren (PNS) wurden Ende der 1980er Jahre von den Arbeitsgruppen um den organischen Chemiker *Ole Buchardt* und den Biochemiker *Peter Nielsen* in Kopenhagen entwickelt. 1991 wurden sie als neue sequenzspezifische Nukleinsäure-Reagenzien vorgestellt.^[14]

PNS sind DNS-Analoga und -Mimetika, in denen das Zucker-Phosphat-Rückgrat durch eine *N*-(2-Aminoethyl)-glycin-polyamidstruktur ersetzt ist (Abb.2.9). Zu den Vorteilen der PNS zählt neben ihrer hohen chemischen und thermischen Stabilität die hohe Bindungsaffinität und -spezifität an Nukleinsäuren sowie die Resistenz gegenüber Nukleasen und Proteasen.^[15]

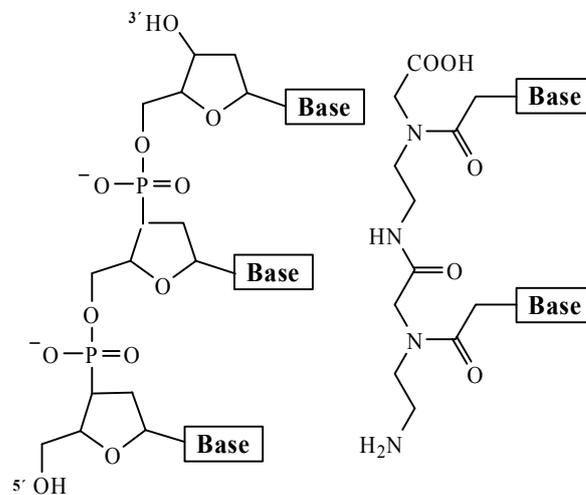


Abb.2.9: Gegenüberstellung eines DNS (links) und eines PNS-Oligomers (rechts).

Da der PNS-Strang im Gegensatz zu einem DNS-Strang keine negativ geladenen Phosphatgruppen trägt, ist die Hybridisierung unabhängig von der Ionenstärke.^[16] Peptidnukleinsäuren kombinieren gewissermaßen die Vorteile der

DNS mit der Robustheit und flexiblen Synthesechemie von Peptiden.^[17] PNS binden im Einklang mit den Watson-Crick-Basenpaarungsregeln und mit höherer Affinität als ihre natürlichen Vorbilder an komplementäre Nukleinsäuren; so ist die Verdrängung eines Strangs aus der DNS-Doppelhelix und die Bildung einer Tripelhelix möglich. Am höchsten ist die Bindungsaffinität jedoch gegenüber PNS selbst. Die antiparallele Orientierung der Oligonukleotide ist in der Duplex bevorzugt.

Die PNS ist sowohl gegen Säuren als auch gegen schwache Basen ausreichend stabil. Eine gewisse Instabilität kann aber von der freien Aminofunktionalität am N-Terminus herrühren. Bei reiner PNS handelt es sich um neutrale, zur Selbstaggregation neigende Verbindungen mit eingeschränkter Wasserlöslichkeit. Diese lässt sich jedoch durch den Einbau geladener Gruppierungen, etwa C-terminaler Lysine stark verbessern.^[14] Für therapeutische Nutzung als Antisense- (Inhibierung der Translation) und Antigen-Wirkstoffe (Modulierung der Transkription) müssen die PNS eine ausreichende biologische Stabilität in Serum und Zellen aufweisen. Dies ist der Fall, da die PNS gegenüber hydrolytischer (enzymatischer) Spaltung resistent ist.^[18]

Peptidnukleinsäuren können sehr leicht mit diversen Fluoreszenzfarbstoffen wie Fluorescein oder Tetramethylrhodamin modifiziert werden. Sie werden im Bereich der Biotechnologie als Werkzeuge für Genommarkierungen in fixierten wie auch in lebenden Zellen benutzt.

2.2.2 Genommarkierungen

Zur Quantifizierung genomischer Strukturen wird nach molekularer Markierung bestimmter Bereiche der DNS im Zellkern, z.B. mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) mit anschließender Detektion am Fluoreszenzmikroskop, die Topologie durch digitale Bildauswertung berechnet. Hierbei wird die Lage der Signale relativ zum Kernmittelpunkt und die Bestimmung der Distanz zwischen den Signalen als Parameter der Zellkerntopologie verwendet. Aufgrund der präparativen und optischen Grenzen sind die Möglichkeiten die FISH markierten, chromosomalen Regionen im nm-Bereich zu vermessen, begrenzt. *In vivo* Markierungen subchromosomaler Regionen in Zellen sind aufgrund der Präparation schwierig. Dies konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt nur von *Tanke* durch Markierung von Telomerregionen realisiert werden.^[19]

Telomere sind Protein-DNS-Strukturen, die an den Enden der Chromosomenarme liegen. Diese Regionen weisen eine kurze DNS-Sequenz auf, die sich wiederholt. Ihre Länge ist bestimmend für die Stabilität der Chromosomen in Zellen. Je länger die Telomerregionen in Zellen sind, desto höher sind die Proliferationsraten der Zellen, d.h. sie teilen sich schneller. Weiterhin sind die Alterungsprozesse beschleunigt. Viele Krebszellen besitzen lange Telomerbereiche, da das

Enzym Telomerase, das für den Abbau dieser Sequenzen verantwortlich ist, nicht aktiv ist und dementsprechend die Zellen hohe Teilungsraten haben.

Tanke konnte als erster mit fluoreszenzmarkierten Peptidnukleinsäuren diese Bereiche in lebenden Zellen visualisieren (Abb.2.10) um die *in vitro* Daten zu überprüfen. Er konnte mit der *glas bead loading* Methode die PNS-Sonden effektiv in den Zellkern bringen und nachweisen. Er zeigte, dass die *in vivo* Hybridisierung der PNS an die Telomer-DNS-Sequenz nicht die Telomerstruktur (Proteine) beeinflusst und konnte die Dynamiken und die Beweglichkeit dieser Bereiche *in vivo* (Abb.2.11) quantifizieren.^[19]

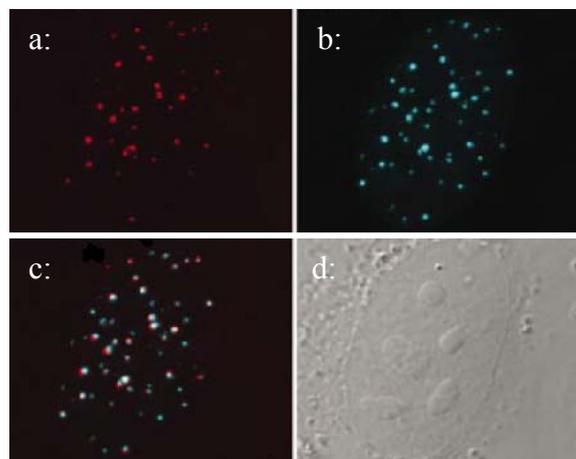


Abb.2.10: *In vivo* Kohybridisierung von cy3-PNS und CFP-TRF2 in U2OS Zellen; a: Hybridisierung von cy3-PNS an die Telomer-DNS, b: Expression von CFP-TRF2 (Telomer bindendes Protein), c: Kolokalisation von cy3-PNS und CFP-TRF2, d: DIC-Aufnahme des Zellkerns von einer U2OS Zelle.

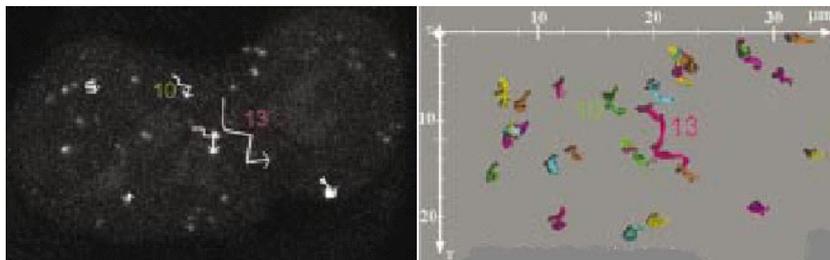


Abb.2.11: Dynamiken der Telomerregionen in U2OS Zellen; links: Bewegung einiger Telomerbereiche innerhalb 20 min nach Hybridisierung, rechts: xy-Plot über die Bewegungsrichtung der Telomere innerhalb dieser Zeit.

Weiterhin stellte er fest, dass die Telomerbereiche untereinander assoziiert sind und dass nicht nur Telomerase für die Größe der Telomerregionen ausschlaggebend ist, sondern gewisse Krebszellen auch alternative Mechanismen besitzen.^[19]

2.3 Metallkomplexe als molekulare Sonden

Metalle spielen in der belebten Natur in Organismen und Zellen eine wichtige Rolle. Um die Wirkweise von Metallionen in Organismen zu verstehen, ist es von Bedeutung deren Konzentration und subzelluläre Verteilung zu kennen. Zur Detektion von Metallionen gibt es verschiedene Methoden. Eine seit langem angewandte Methode ist die Bestimmung von Konzentrationen mittels Indikatoren, die im metallgebundenen Zustand eine andere Farbe besitzen, als im freien Zustand.^[20] Eine weitere Analyseverfahren beruht auf den unterschiedlichen elektronischen Eigenschaften von Molekülen im komplexierten bzw. freien Zustand und dem daraus folgenden unterschiedlichen Redoxverhalten.^[21] Eine dritte Möglichkeit zur Metallionendetektion beruht auf den unterschiedlichen optischen Eigenschaften eines Liganden und des entsprechenden Metall-Komplexes. So können z. B. die Absorptionen oder Emissionen des freien Liganden und des Ligand-Metall-Komplexes stark unterschiedlich sein. Bei manchen fluoreszierenden Liganden ist eine Verschiebung der Emission bei Metallkoordination beobachtbar. Diese Phänomene sind für bestimmte Metallionen charakteristisch und geben Aufschluss über deren Konzentrationen.^[22]

2.3.1 Bis[(picolyl)amin]zink(II) als Zinksensor

Zink spielt eine wichtige Rolle innerhalb des Zellapparates. Im zentralen Nervensystem von Säugetieren ist komplexiertes Zink (Zn^{2+} -Ionen) in hohen Konzentrationen zu finden. Eine erhöhte bzw. erniedrigte Zinkkonzentration kann zu Krankheiten wie z. B. Alzheimer führen, da Zink die Produktion von β -Amyloid im Organismus fördert.^[23] Weiterhin ist in bestimmten Tumoren die Zinkkonzentration höher als in gesunden Zellen. Viele chemische Zinksensoren, die zur Bestimmung der Zinkkonzentration in biologischen Proben dienen, wurden deshalb entwickelt.^[24]

Zur direkten bzw. indirekten Quantifizierung von Zn^{2+} -Ionen sind als fluoreszierende Sonden, u.a. Quinoline, Fluoresceine und Proteine oder bekannt.^[25] Viele dieser Sonden können unter physiologischen Bedingungen angewendet werden, jedoch sind Selektivität und Sensivität nicht optimal. *Nagano* entwickelte einen

Zinksensor, der ratiometrisch die Zinkkonzentration in lebenden Zellen bestimmt. Die Sensoren (Abb.2.12) bestehen aus Bispicolylamin-Liganden, die Zn^{2+} -Ionen stark komplexieren, und aus zellgängigen Benzofuranderivaten, die bei Komplexbildung ihre photophysikalischen Eigenschaften ändern.^[24]

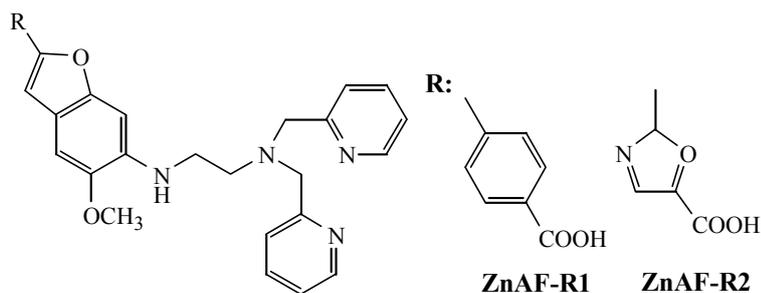


Abb.2.12 Strukturformeln der Zinksensoren von *Nagano*.

ZnAF-R2 zeigt ein Absorptionsmaximum bei 365 nm als freier Ligand. Im komplexierten Zustand findet eine Verschiebung der Absorption von 30 nm in den kurzwelligen Bereich des Spektrums (Abb.2.13) statt.^[24]

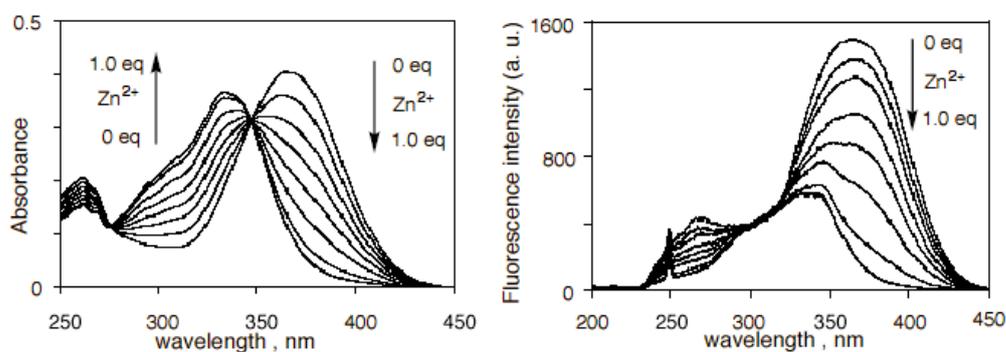


Abb.2.13: Absorptions- und Emissionsspektrum von 15 μM ZnAF-R2 in HEPES Puffer (pH 7,4) bei Titration mit Zn^{2+} -Ionen.

Nagano konnte weiterhin zeigen, dass die Selektivität und die Sensivität der beiden Sonden ausreichend sind um quantitativ die Zinkkonzentration der Zellen mittels Konfokaler Laser Raster Mikroskopie (CLSM) zu detektieren. Er inkubierte Makrophagen mit den Sonden. Anschließend behandelte er die Zellen mit einer Zinksulfatlösung und detektierte einen Abfall der Fluoreszenz der Sonden. Durch eine weitere Inkubation mit *N,N,N',N'*-Tetrakis-(2-pyridylmethyl)-ethylendiamin (TPEN) stellte er die Anfangsfluoreszenz der Sonden wieder her, da TPEN ein stärkerer Ligand für Zn^{2+} -Ionen ist als Bispicolylamin-Liganden (Abb.2.14). Der

wesentliche Nachteile dieser Sonden sind die Absorptionsmaxima. Sie liegen im Eigenfluoreszenzbereich der Zellen. Die Sensitivität dieser Sonden kann durch die Verschiebung des Absorptionsmaximums in den langwelligen Bereich deutlich verstärkt werden. Weiterhin sind die Sonden schlecht zellgängig und die Herstellung der Sonden ist präparativ aufwendig.^[24]

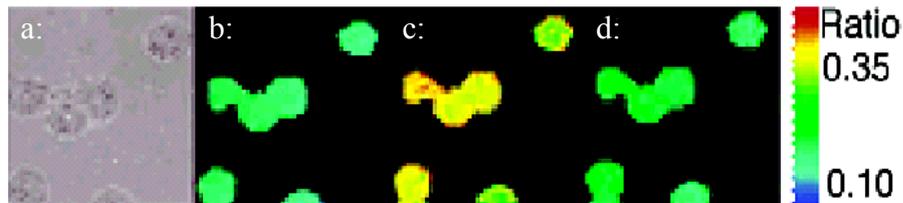


Abb.2.14: Ratiometrische Detektion (340 nm/380 nm) von Zn^{2+} -Ionen in Makrophagen (RAW264.7) über ZnAF-R2EE in PBS Puffer bei pH 7,4; a: Breitfeld Transmissionsaufnahme, b: Fluoreszenzaufnahme von a, c: Zugabe von 15 μ M Pyriothion (Zink Ionophor) und 150 μ M $ZnSO_4$, d: Zugabe von 400 μ M TPEN nach 15 min Inkubation mit $ZnSO_4$

2.3.2 Tris(bipyridyl)ruthenium(II) als Fluoreszenzsonde

Tris(bipyridyl)ruthenium(II)komplex:

Ruthenium ist das mittlere Metall der Eisengruppe. Es besitzt 8 Valenzelektronen und kann in den Oxidationsstufen $-II$ bis $+VIII$ vorkommen, wobei am häufigsten die Oxidationsstufe $+III$ (d^5) ist. In Komplexen bildet Ruthenium in der Oxidationsstufe $+II$ und $+III$ bevorzugt mit 6 Liganden oktaedrische low-spin Komplexe, welche kinetisch inert sind.^[26]

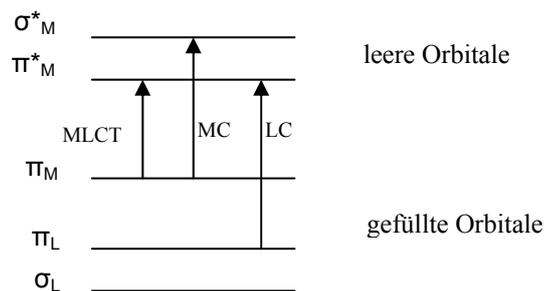


Abb.2.15: Vereinfachte elektronische Struktur von $[Ru(bpy)_3]Cl_2$ und die möglichen elektronischen Übergänge.

Das Ru^{2+} -Ion ist ein d^6 -Metallion und [2,2']-Bipyridin ist ein farbloser N-zentrierter σ -Donor, π -Donor und π^* -Akzeptor mit über dem Ringsystem delokalisierten Orbitalen. Die elektronische Struktur von $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ und die möglichen elektronischen Übergänge sind in Abbildung 2.15 dargestellt. Die Absorption im sichtbaren Bereich wird durch Ladungstransfer(CT)-Übergängen von gefüllten $d\pi$ -Ruthenium(II)- (π_M , Abb.2.15) zu den tiefliegenden unbesetzten π^* (π_L^* , Abb.2.15)-Ligandorbitalen verursacht. Dies kann folgendermaßen schematisch dargestellt werden:



Diese Übergänge liegen bei 240 nm ($\epsilon = 24,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und 450 nm ($\epsilon = 14,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Die in Abbildung 2.16 zu sehende Absorption bei 285 nm ($\epsilon = 79,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ist auf LC $\pi_L \rightarrow \pi_L^*$ (*Ligand Charge*)-Übergänge zurückzuführen. Die Schultern (322 nm und 344 nm) beruhen auf MC (d-d)-Übergängen ($\pi_M \rightarrow \sigma_M^*$).

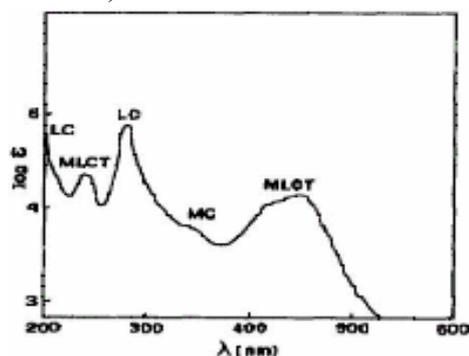


Abb.2.16: Absorptionsspektrum von $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$.

Die Absorption bei 450 nm (MLCT) hebt $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ vom Grundzustand in das $^1\text{MLCT}$ -Level. Durch Spin-Bahn-Kopplung findet ein schneller Spinflip (ISC = *intersystem-crossing*) in den tiefer liegenden $^3\text{MLCT}$ -Zustand statt. Durch Emission von Licht bei 626 nm geht $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ wieder in den Grundzustand über (Abb.2.16). Die Emission findet zwischen 550 und 700 nm statt, mit einem Emissionsmaximum bei 626 nm (Abb.2.17). $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ weist einen großen Stokes-Shift von ca. 170 nm auf, d. h. die Absorptions- und Emissionsspektren überlagern sich nur gering, und die Fluoreszenz kann deshalb gut detektiert werden. Aus dem angeregten, langlebigen ($\tau \sim \mu\text{s}$) $^3\text{MLCT}$ -Zustand kann $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ chemisch weiterreagieren (Redoxreaktionen) oder durch Kollision mit anderen Molekülen strahlungslos in den Grundzustand übergehen. Die

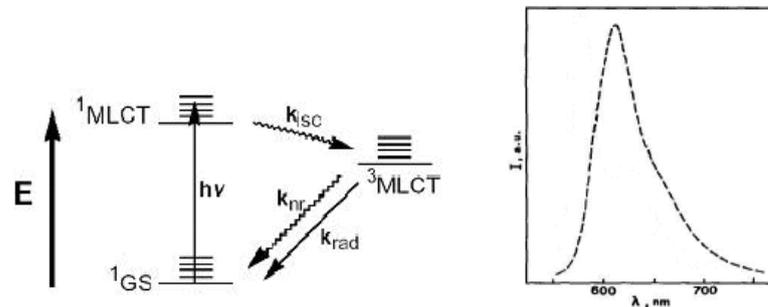


Abb.2.17: Schematische Darstellung der elektronischen Übergänge von $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (links) und das Emissionsspektrum von $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (rechts).

Emission von $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ wird durch molekularen Sauerstoff gequencht. Das Ausmaß der Fluoreszenzlöschung durch O_2 kann von Substituenten der Bipyridin-Liganden moduliert werden. Das elektronisch angeregte $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ überträgt seine Energie nach einem bimolekularen Mechanismus an den molekularen Sauerstoff unter Bildung von Singulett-Sauerstoff ($\text{O}_2, {}^1\Delta_g$). Die Quantenausbeute für Singulett-Sauerstoff-Produktion beträgt in wässriger Lösung 0,5.^[27]

Auf Grund seiner Eigenschaften finden der Tris(bipyridyl)rutheniumkomplex und dessen Derivate Anwendung als Photo- und Absorptionssensitizer z. B. in Farbstoffsolarzellen, als Redoxschalter, bei der Konzentrationsbestimmung von Sauerstoff in Zellen und in vielen weiteren Bereichen.

Tris(bipyridyl)ruthenium(II) als Fluoreszenzsonde:

Es ist bekannt, dass $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ schlecht zellpermeabel ist, d.h. es werden hohe Konzentrationen von 300 μM bis 1,3 mM und eine mehrstündige Inkubationszeit benötigt. Die Rutheniumkomplexe clustern in der Zelle und können sich an bestimmte Organelle anlagern (Abb.2.18). Da keine signifikante Zytotoxizität und

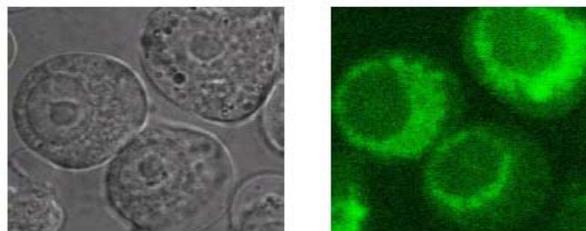


Abb.2.18: DIC (links) und konfokale Fluoreszenzaufnahme von SEG-Zellen nach Inkubation mit $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ (1,3 mM, 6 h, 37 °C).

eher moderate Phototoxizität auftritt, wird der Komplex wegen seiner langen Fluoreszenzlebensdauer vor allem als intrazelluläre Sauerstoffsonde verwendet.^[28, 29]

Anfang 2007 haben *C. A. Puckett* und *J. K. Barton* herausgefunden, dass die zelluläre Aufnahme von Polypyridyl-Rutheniumkomplexen beschleunigt werden kann, wenn ein Bipyridin durch einen Dipyridophenazin-Liganden (dppz) ersetzt wird.^[30] Hierdurch haben sie je nach Bipyridinderivat (Abb.2.19) eine gute Zellfärbung bei 5 bis 20 μM Konzentration und einer Inkubationsdauer von 2 bis 4 h erreicht. Am leichtesten wird der Komplex mit DIP als Bipyridinderivat auf Grund der größeren Lipophilie aufgenommen. Die Gesamtladung des Komplexes spielt für die Aufnahme in die Zelle kaum eine Rolle. Dieses Verhalten wurde auch bei Cis-Platin-Derivaten beobachtet.

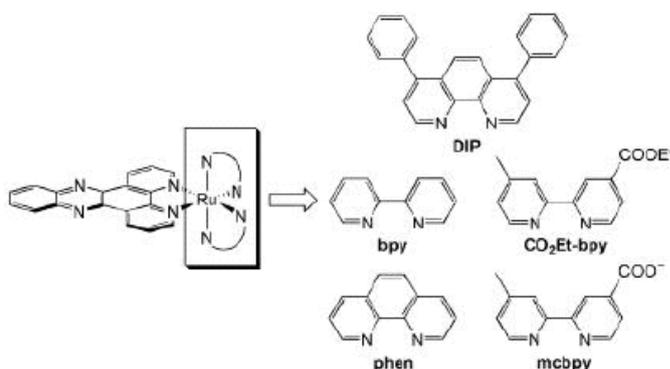


Abb.2.19: Dipyridophenazinkomplexe von Ruthenium.

Abbildung 2.20 zeigt die inhomogene Verteilung des Rutheniumkomplexes $[\text{Ru}(\text{DIP})_2\text{dppz}]^{2+}$ im Cytoplasma der Zelle. Der Komplex ist mit den Mitochondrien und dem Endoplasmatischen Retikulum assoziiert, wie über Kollokalisationsexperimente herausgefunden wurde.^[30]

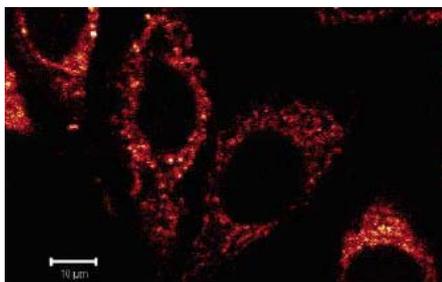


Abb.2.20: Konfokale Fluoreszenzaufnahme von HeLa Zellen inkubiert mit $[\text{Ru}(\text{DIP})_2\text{dppz}]^{2+}$ (5 μM , 2 h, 37 °C).

J. W. Dobrucki hat die Phototoxizität von $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ und $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ untersucht. Hierbei wurden Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Rutheniumkomplexen (0,2 mM, 1 mM, 2 mM) während der Inkubation mittels Laserlichts eines CLSM belichtet. Bei Konzentrationen $< 200 \mu\text{M}$ trat keine Phototoxizität auf. Bei den höheren Konzentrationen stellte sich während des Bestrahleins eine Verstärkung der Fluoreszenz ein. *J. W. Dobrucki* führt dies darauf zurück, dass bei der Bestrahlung der Rutheniumkomplexe entstehender Singulett-Sauerstoff die Plasmamembran schädigt und diese durchlässiger für die Rutheniumkomplexe wird. Möglicherweise akkumulieren die Komplexe besonders an der DNS im Zellkern und der RNS im Cytoplasma und können dadurch ihre Fluoreszenz verstärken. Eine weitere Beobachtung ist, dass nur die belichteten Zellen die erhöhte Fluoreszenz zeigen (Abb.2.21).^[31]

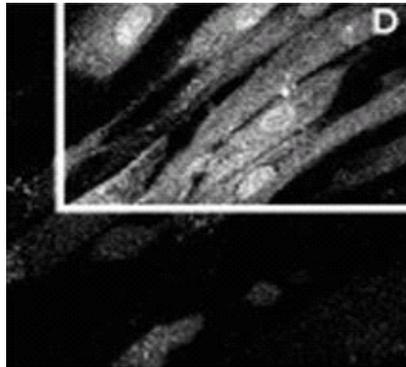


Abb.2.21: Konfokale Fluoreszenzaufnahme von Makrophagen nach Inkubation mit $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (200 μM , 37 °C); (rechts oben), mehrmals mit 457 nm bestrahlte Stelle, (links unten), unbestrahlte Stelle.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Biologische Grundlagen

3.1.1 Aufbau von Zellen

Alle Lebewesen bestehen aus Zellen. In der Hierarchie der biologischen Organisation ist die Zelle die einfachste lebensfähige Materieansammlung. Sie sind als grundlegende Struktur- und Funktionseinheit eines Organismus zu erkennen. In einem vielzelligen Organismus gibt es viele, verschieden differenzierte Zelltypen. So besteht der menschliche Körper aus rund 220 verschiedenen Zell- und aus diesen aufgebauten Gewebetypen.

Die Zellen aller Lebewesen gehören zu einem von zwei Grundtypen: Es sind entweder Prokaryotenzellen („Procyten“) oder Eukaryotenzellen („Eucyten“). Prokaryotische Zellen sind typisch für die beiden Organismendomänen Archaea und Bacteria. Die Vertreter der Eukarya sind Protisten, Pflanzen, Pilze und Tiere. Die Zellgröße der Eukaryoten schwankt zwischen 10 μM und 100 μM und die der Prokaryoten zwischen 100 nm und 1 μM .^[40, 41]

Alle Zelltypen haben eine ganze Reihe gemeinsamer Merkmale. Sie sind von einer Plasmamembran umhüllt. Bei Pflanzenzellen bezeichnet man diese als Plasmalemma. Innerhalb der Plasmamembran der Zellen befindet sich das Cytoplasma. Es setzt sich aus dem wasserreichen Cytosol, welches unter anderem Proteine, Kohlenhydrate, Lipide, niedermolekulare Verbindungen des intermediären Stoffwechsels und Salze enthält, sowie aus membranumschlossenen Zelleinschlüssen, den Zellorganellen, zusammen (Abb.3.1). Insgesamt besteht das Cytoplasma zu etwa 75 bis 95 % aus Wasser. Niedermolekulare Bestandteile, Proteine, die Komponenten des Cytoskeletts und die Ribosomen bilden zusammen das cytoplasmatische Kompartiment (im Unterschied zu den Zellorganellen, die jeweils eigene Kompartimente bilden), in dem wichtige Reaktionen des Intermediärstoffwechsels (Protein- und Kohlenhydratstoffwechsel, sowie Lipidsynthese) ablaufen.

Die Plasmamembran bzw. Zellmembranen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht. Diese bestehen aus amphiphilen Lipiden, die einen hydrophilen und einen hydrophoben Anteil (meistens aus Kohlenwasserstoffketten) besitzen (Abb.3.2). In der Zellmembran bildet sich eine Doppelschicht, bei der der hydrophobe Anteil

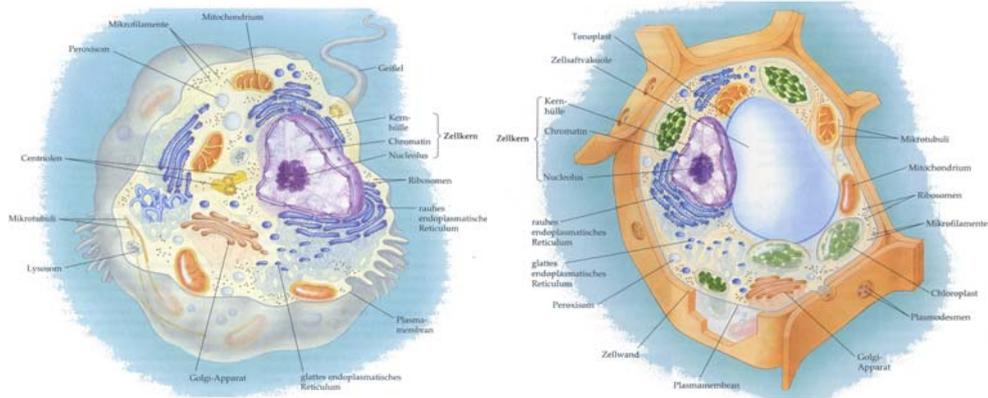


Abb.3.1: Schematische Darstellung einer tierischer (links) und einer pflanzlicher Zelle (rechts).

nach innen und der hydrophile Anteil nach außen zeigt. In diese Doppelschicht sind Membranproteine eingelagert. Eine Biomembran besteht im Wesentlichen aus Phospholipiden. Sie dienen als Trennschicht zwischen verschiedenen Bereichen innerhalb einer lebenden Zelle und sorgen so für eine Kompartimentierung. Weiterhin trennen sie das Innere der Organellen und Vakuolen vom Cytoplasma oder das Innere einer Zelle vom Zellaußenraum und schaffen so unterschiedliche Reaktionsräume.

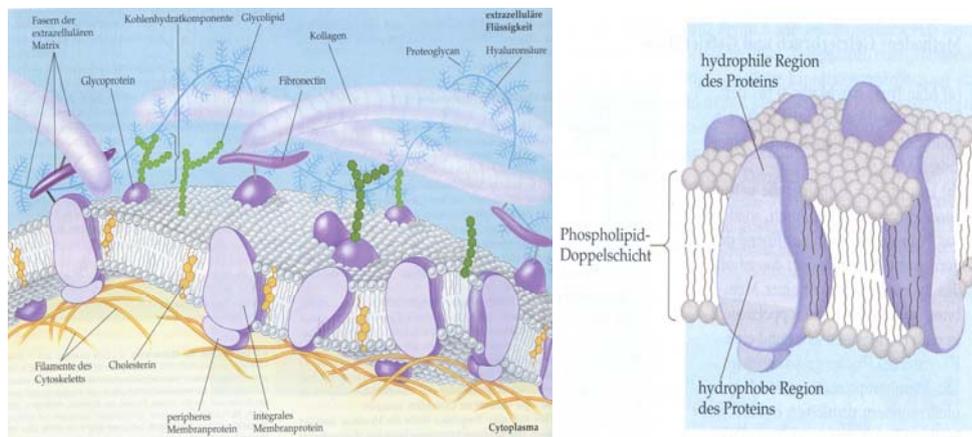


Abb.3.2: Querschnitt durch die Plasmamembran einer tierischer Zelle (links) und Flüssig-Mosaik-Modell (rechts).

Die Lipiddoppelschicht einer Biomembran ist normalerweise flüssig, d. h. die Lipide und Proteine sind in der Ebene der Membran recht beweglich, ein Austausch zwischen den beiden Schichten ist schwierig (Abb.3.2). Eine gezielte Be-

wegung von einer Membranseite zur anderen (Flipflop) ist nur unter dem aktiven Mitwirken von speziellen Proteinen (sog. Flipasen) unter Verbrauch von ATP möglich. Der Mengenanteil der Lipide und Proteine schwankt zwischen 30 und 70 %. Membranen sind semipermeabel, d. h. sie sind für kleine Moleküle wie Wasser durchlässig. Große, insbesondere hydrophile, Moleküle und Ionen gelangen durch aktiven Transport über Kanäle und Transportproteine zu den verschiedenen Zellkompartimenten.^[42, 43]

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

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

Mitochondrien: Mitochondrien sind meist ovale bis stäbchenförmige Organellen innerhalb der eukaryotischen Zelle. Die Hauptfunktion der Mitochondrien ist die Energieversorgung der Zellen, weshalb sie auch oft als zelluläre „Kraftwerke“ bezeichnet werden. Sie sind von einer Membran umhüllt. Die innere Membran enthält in erster Linie die Enzyme der Atmungskette. Über die Atmungskette entsteht in der Zelle der Energieträger Adenosintriphosphat (ATP), der bei nahezu allen biochemischen Prozessen als Energielieferant fungiert. Daneben finden in den Mitochondrien weitere Abbaureaktionen statt, darunter der Citratzyklus sowie der Abbau von Fettsäuren (β -Oxidation). Mitochondrien vermehren sich durch Teilung, enthalten eigenes genetisches Material (mitochondriale DNS) und sind in der Lage selbst Proteine zu synthetisieren.

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

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

Golgi-Apparat: Der Golgi-Apparat ist ein submikroskopisches Membransystem im Zellplasma, welches mit dem ER in Verbindung steht. Neben dem

Stofftransport ist der Golgi-Apparat auch für posttranslationale Funktionalisierung von Proteinen mit Kohlenhydraten, Lipiden oder Sulfaten zuständig.

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

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

Peroxisomen: Peroxisomen sind rundliche, von einer Membran umschlossene Zellorganellen mit einem Durchmesser von 0,2 bis 1,5 μm . Sie sind besonders reich an Katalase und Peroxidasen, die an Entgiftungsreaktionen beteiligt sind.

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

Pflanzenzellen (Abb.3.8) unterscheiden sich in einigen Merkmalen von tierischen Zellen. Sie haben zusätzlich zur Zellmembran eine feste Zellwand die aus Cellulose und anderen Kohlenhydratpolymeren besteht. Die Zellwand ist starr, aber für Wasser und kleine Moleküle permeabel. In pflanzlichen Zellen gibt es keine Lysosomen. Ihre Funktion wird von den Vakuolen übernommen. Vakuolen können einen großen Teil der Zelle einnehmen (bis zu 90 %) und halten zusätzlich den osmotischen Druck der Zelle aufrecht. Pflanzenzellen besitzen mit Plastiden, neben Mitochondrien, einen zweiten Organelltyp der eine eigene DNS besitzt. Es gibt verschiedene Arten von Plastiden. Die bekanntesten sind Chloroplasten, die mit ca. 5 μm Durchmesser größer als Mitochondrien sind und der Photosynthese dienen. Da sie Chlorophyll in großen Mengen enthalten, sind sie üblicherweise grün. Andere Varianten von Plastiden sind die Chromoplasten, die die Pflanzenfarbstoffe enthalten und die Leukoplasten, die für die Speicherung von Nährstoffen verantwortlich sind. Zu den Leukoplasten gehören die Amyloplasten, die Stärke einlagern, Elaioplasten für die Speicherung von Lipiden sowie Proteinoplasten, die Proteine enthalten. Eine besondere Variante der Amyloplasten sind die Statolithen. Sie sind Schwerkraftsensoren und daher für das senkrechte Wachstum von Pflanzen verantwortlich.

3.1.2 Methoden der Fluoreszenzmarkierungen (*In vivo*-Markierungen, Immunofärbungen, Halo Tag-Technologie®, FISH)

In vivo-Markierungen:

Fluoreszenzfarbstoffe werden seit Ende des 19. Jahrhunderts hergestellt und entwickelt. Eine Reihe von Farbstoffen ist geeignet bestimmte zelluläre Substrukturen und Organellen wie z. B. Membranen, Zellkern und Mitochondrien fluoreszenzmikroskopisch sichtbar zu machen, ohne die lebenden Zellen wesentlich zu beeinträchtigen (Abb.3.3).

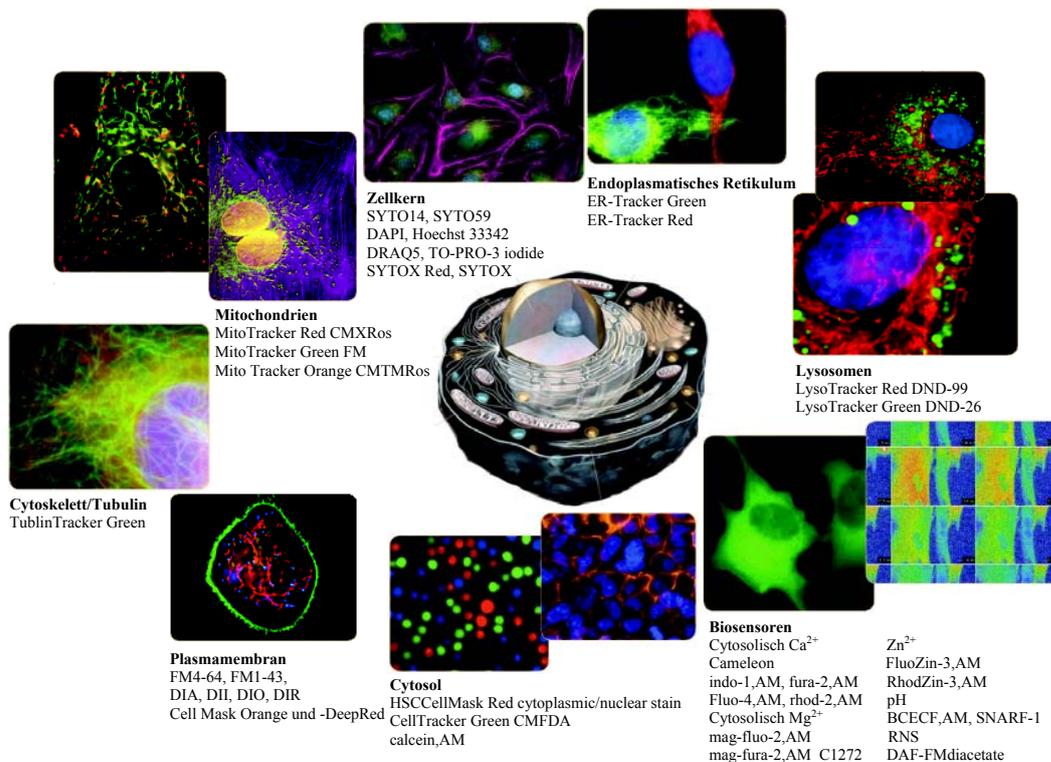


Abb3.3: Übersicht über selektive *in vivo* Fluoreszenzfarbstoffe für diverse subzelluläre Strukturen.

Hauptmerkmal solcher Fluorophore ist die Zellpermeabilität bzw. die Zellkernpermeabilität. Die Selektivität für zelluläre Strukturen wird oft durch funktionelle Gruppierungen am Fluorophorgrundgerüst oder durch das Grundgerüst kontrolliert. So binden manche Farbstoffe in Folge des planaren Grundgerüsts über Interkalation an die DNS. Der Farbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol

(DAPI) wurde ursprünglich als ein Mittel zur Bekämpfung der Erreger der Schlafkrankheit synthetisiert. Heute wird er zur Färbung von Zellkernen und zur schnellen Identifikation von Pathogenen benutzt. Weitere Fluorophore weisen lange hydrophobe Alkylketten und polare Funktionalitäten auf. Solche Farbstoffe assoziieren mit den Lipiddoppelschichten der Zellen. Hierbei wird die Klasse der FM- und DI-Farbstoffe zur Visualisierung von Plasmamembranen in lebenden Zellen eingesetzt.

Die Fluorophore sind meist niedermolekular und chemisch leicht zugänglich. Sie zeichnen sich durch ihre sehr guten photophysikalischen Eigenschaften aus. Sie weisen eine hohe Photostabilität, hohen Exinktionskoeffizient, hohe Quantenausbeute und hohe chemische bzw. thermische Stabilität auf. Im Vergleich zu weiteren *in vivo* Färbetechniken, wie z. B. mit Fusionsproteinen werden die Fluoreszenzmarkierungen sehr leicht realisiert. Hierbei werden die Farbstoffe als Lösungen auf die lebenden Zellen appliziert und für einige Minuten inkubiert. Nach dem Entfernen der Inkubationslösung können die Markierungen mit einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

Immunofluoreszenz:

Die Immunofluoreszenz stellt einen Seitenzweig der Immunohistochemie dar und ist gleichzeitig ihre älteste Variante. In den 1940er Jahren gelang dem Mikrobiologen *Albert Coons* die Darstellung bakterieller Erreger mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren. Auch heute ist die Immunofluoreszenz ein wichtiges diagnostisches Hilfsmittel der Biologen und Mediziner. In der Regel werden fluoreszenzmarkierte Antikörper benutzt, die spezifisch an die entsprechenden Substanzen (Antigene) in fixierten Zellen oder Gewebeschnitten binden (Abb.3.5). Hierbei gibt es verschiedene Methoden um die Interaktion empfindlich zu visualisieren.

Direkte Methode: Das zu untersuchende Antigen (Protein) wird mit einem spezifischen Antikörper zusammengebracht, der mit einem Enzym oder Fluorophor konjugiert ist. Der Antikörper bindet an das Antigen, nicht gebundener Antikörper wird ausgewaschen. Dem Enzym wird in einem weiteren Schritt ein Substrat angeboten, das unter Bildung eines Farbstoffs mit dem Enzym reagiert. Dieser Farbstoff bildet sich dort, wo die immunochemische Reaktion stattfindet.

Indirekte Methode: Hierbei wird im ersten Schritt ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper) auf das zu untersuchende Gewebe/Zellen gebracht. In einem zweiten Schritt wird ein Antikörper aufgetragen, der sich gegen den ersten Antikörper richtet. Es ist der sogenannte Sekundärantikörper, der mit einem Enzym oder Fluorophor gekoppelt ist. Die Farbentstehung findet aufgrund einer Enzym-Substrat-Reaktion statt. Ein weiterer, tertiärer Antikörper ermöglicht eine Signalverstärkung.

Labelled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode: Das Prinzip basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) und Avidin (Hühnereiweiß) für Biotin. Streptavidin und Avidin besitzen jeweils vier Bindungsstellen für Biotin. Die Reihenfolge der Reagenzien ist bei dieser Methode: Unkonjugierter Primärantikörper, biotinmarkierter Sekundärantikörper, Avidin-Biotin-Enzym-Konjugat und anschließend Substrat /Fluorophor (Abb.3.4).

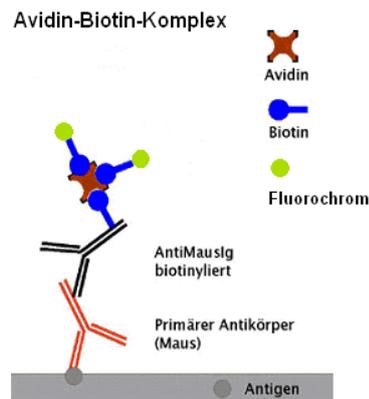


Abb3.4: Schematische Darstellung der *Labelled* Avidin-Biotin-Methode.

Die Spezifität der Fluoreszenzfarbstoffe kann weiterhin durch Konjugation an Toxine (Pilzgifte) verbessert werden. Phalloidin (Toxin des weißen Knollenblätterpilzes) bindet an Aktinfilamente und ermöglicht somit die Lokalisation im Cytoskelett (Abb.3.5) der Zelle.

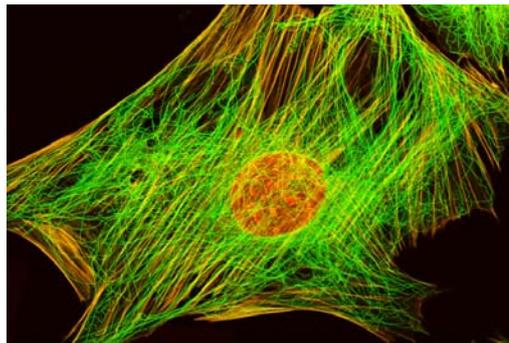


Abb.3.5: Konfokale Aufnahme einer 3T3-Zelle: F-Actin (Phalloidin konjugiert mit Alexa Fluor 546), DNS (TO-PRO-3), Mikrotubuli bzw. α -tubulin (Antikörper konjugiert mit Alexa Fluor 488).

Weit spezifischer sind Lektine. Lektin-Farbstoff-Konjugate sind in der medizinischen Forschung weit verbreitet und relativ preiswert im Handel erhältlich. Sie eignen sich als Sonden zur Detektion von Glykokonjugaten (= Lektinrezeptoren) Zelloberflächen, an Membranoberflächen und in Kompartimenten. Sie werden vor allem zur Kartierung von Lektinrezeptoren in oder an Zellwänden, zum Nachweis einer Polarität von Zellen, unterschiedlicher Aktivitätszustände oder bestimmter Stadien des Zellzyklus (Messung der Löslichkeitseigenschaften der Lektinrezeptoren) verwendet. *Wheat-germ-agglutinin* (*WGA*, Lectin) ist ein Indikator für Pilzmycelien in infiziertem pflanzlichen Gewebe. *WGA* erkennt selektiv *N*-Acetylglucosamin und Chitobiosen und sie bindet an spezifische Glykoproteine mit Sialinsäureresten, die sich im Membransystem befinden.^[44, 45]

Halo Tag-Technologie®:

Die HaloTag® *Interchangeable Labeling Technology* ist ein von der Firma PROMEGA vorgestelltes Konzept, das eine alternative Proteinmarkierung in lebenden oder fixierten Zellen ermöglicht. Die Technologie basiert auf einer Hydrolase, das 33 kDa schwere Halo Tag® Protein, die gentechnisch so verändert ist, dass sie selektiv eine sehr stabile, kovalente Bindung mit einem Halo Tag®-Liganden eingeht. Die Liganden werden mit verschiedenen funktionalisierten Molekülen, z.B. Fluoreszenzmarkern gekoppelt. Weiterhin können Fusionsproteine am N- oder C-Terminus des Halo Tag®-Proteins exprimiert werden. Der das Halo Tag®-Protein kodierende Vektor wird dabei in die Zelle transfiziert. Nach Expressierung des Proteins wird der funktionalisierte Linker (Chloralkan-Linker) in die Zelle inkubiert. Der Linker bindet kovalent an ein Aspartat des HaloTag-Fusionsproteins (Abb.3.6). Nach Auswaschen von ungebundenem Ligand kann die Fluoreszenzuntersuchung beginnen. In Abbildung 3.7 ist der Halo Tag®-TMR Ligand gezeigt, dessen signalgebende Einheit Tetramethylrhodamin ist.^[46]

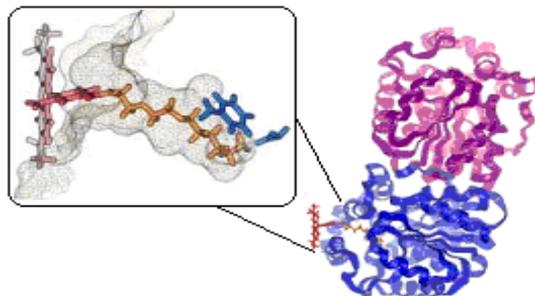


Abb3.6: MM-Kalkulation der Bindungsknüpfung zwischen einem Halo Tag-Liganden und Halo Tag-Protein.

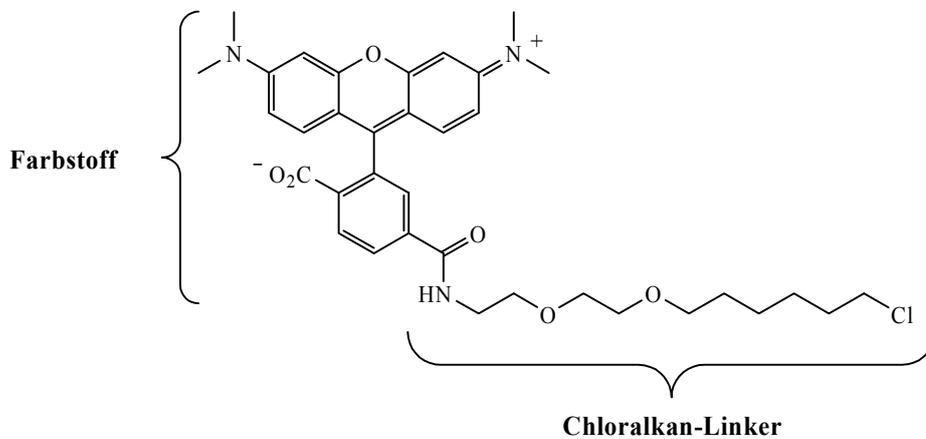


Abb.3.7: Der HaloTag[®]-TMR Ligand, bestehend aus Linker (zur Bindungsknüpfung an das Protein) sowie Farbstoff.

FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung):

In der molekularen Genetik stellt die Fluoreszenz in situ Hybridisierung ein wichtiges Markierungsverfahren dar, welches für viele Untersuchungen benutzt wird.^[47] So kann z. B. mit Hilfe der Fluoreszenz in situ Hybridisierung die Anzahl und Lage von Genen studiert oder auch bestimmte Sequenzen chromosomaler DNS auf Metaphasechromosomen oder in Zellkernen spezifisch markiert werden. Dabei benutzte man in der Anfangszeit der in situ Hybridisierung zur Markierung vorwiegend radioaktive Isotope. Seit der Einführung der Fluoreszenz in situ Hybridisierung ist eine spezifische Markierung auch ohne radioaktive Präparate möglich. Die Markierung ganzer Chromosomen bzw. einzelner Genabschnitte erfolgt hier mit Fluorophoren, welche mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden.^[48]

Hierbei wird die chromosomale Ziel-DNS zunächst, z. B. thermisch (Denaturierung) in ihre Einzelstränge zerlegt. Bei der anschließenden Hybridisierung lagern sich komplementäre Bereiche der markierten Sonden-DNS oder -PNS und der Ziel-DNS aneinander. Dies setzt eine komplementäre Sequenz auf den verschiedenen Nukleinsäuresträngen voraus, woraus sich die Spezifität ergibt. Die komplementären Sonden werden im Überschuß eingesetzt und unterdrücken somit die Rückbildung der Doppelstrang Ziel-DNS (Abb.3.8).

Markierung der DNS- bzw. PNS-Sonden:

Bei der Markierung der DNS- bzw. PNS-Sonden unterscheidet man zwischen einer direkten und einer indirekten Markierung der DNS. Im Falle der direkten

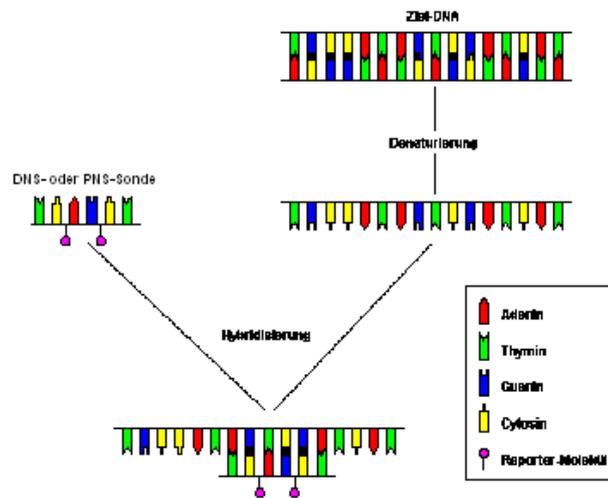


Abb.3.8: Schematische Darstellung des Prinzips der in situ Hybridisierung. Die zu markierende chromosomale DNS ist als Ziel-DNS bezeichnet. Im ersten Schritt wird die Ziel-DNS denaturiert. Anschließend findet eine Rekombination mit der fluoreszenzmarkierten DNS oder PNS statt. Dadurch wird eine bestimmte Region der Ziel-DNS spezifisch markiert.

Markierung werden Nukleotide mit Fluoreszenzfarbstoffen in die DNS- bzw. PNS-Sonde eingebaut. Unmittelbar nach der in situ Hybridisierung ist die Fluoreszenzmarkierung der Zielregionen im Genom abgeschlossen. Im Falle der indirekten Markierung werden Nukleotide mit Reporter molekülen in die DNS- bzw. PNS-Sonde eingebaut. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgt in einem oder mehreren Schritten nach der in situ Hybridisierung. Dadurch kann ein stärkeres Signal als bei der direkten Markierung erreicht werden. Als Reporter moleküle stehen unter anderem Digitoxinin und Biotin zur Verfügung.

3.1.3 Chromatin

Das Chromosom im Zellkern ist die größte Verpackungsstufe der DNS. Die Basen sind durch kovalente Bindungen zu mehreren Megabasen langen DNS-Strängen verbunden, die in hierarchisch angeordneten Verpackungsstrukturen angeordnet sind. Der haploide Teil der DNS eines menschlichen Zellkerns besteht aus etwa $3 \cdot 10^9$ Basenpaaren. In gestreckter Form entspricht dies einer Länge der Doppelhelix von etwa einem Meter.

Die Kompaktierung der DNS-Stränge erfolgt in mehreren Stufen, um ihn in einem Zellkern mit 5-10 μm zu verpacken. Untersuchungen, bei denen man die reine DNS aus Interphasezellkernen oder aus Metaphasechromosomen extrahierte, zeigten, dass Chromosomen Proteine enthalten. Proteine sind demnach entscheidend für eine wirkungsvolle Verpackung der DNS. *Olins* und *Olins* konnten 1974 einen Komplex aus DNS und Histonen als einen wichtigen Bestandteil dieser Verpackung unter dem Elektronenmikroskop nachweisen, das Nukleosom.^[49] Hierbei windet sich ein DNS-Abschnitt von 146 Basenpaare (bp) 1,75 mal um ein Histon-Oktamer. Die darüber hinaus gehende Linker-DNS verbindet die Nukleosomen miteinander und ist ca. 54 Basenpaare lang. Für die relative Lage der Linker-DNS bei Ein- und Austritt aus der Wicklung ist ein weiteres Protein, das Histon H1, verantwortlich. Die Bindung der DNS an das Histon-Oktamer erfolgt durch elektrostatische Wechselwirkungen des negativ geladenen Phosphatrückgrats der DNS mit den positiv geladenen Histonen. Es wird außerdem vermutet, dass die Enden der Histone die DNS umgreifen und so zusätzlich fixieren. Die nächste Stufe der Kompaktierung entsteht durch die Faltung dieser Nukleosomenkette und wird als Chromatin bezeichnet. Bei physiologischen Konzentrationen kondensiert diese Kette zu einer etwa 30 nm dicken Chromatinfaser. Inwieweit diese „regelmäßige“ 30 nm-Faser der Struktur in der lebenden Zelle entspricht, ist aber noch weitgehend unbekannt (Abb3.9).

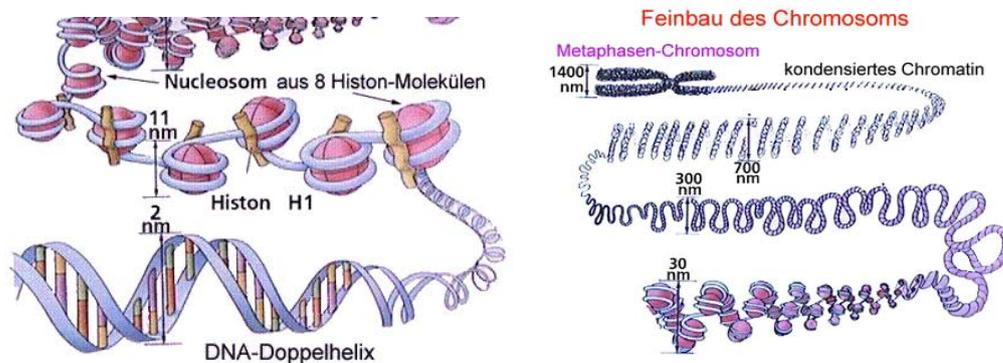


Abb.3.9: Kompaktierungsstufen der DNS in einem Chromosom.

Auch über die Anordnung der Nukleosomen in einer 30 nm-Faser existieren verschiedene Vorstellungen. Die gemessene Massenbelegungsdichte von sechs Nukleosomen pro 11 nm und dem bekannten Durchmesser von 30 nm führten zu dem Solenoidmodell von Finch und *Klug* (1976) mit sechs Nukleosomen pro Umdrehung.^[50] Neue Untersuchungen mittels Rasterkraftmikroskopie und Kryoelektronenmikroskopie zeigten jedoch eine eher unregelmäßige Anordnung der Nukleosomen und favorisieren eine Zick-Zack-Struktur, die sich bei zunehmende

Salzkonzentration wie ein Akkordeon faltet.^[51, 52]

Die menschliche DNS ist in 22 homologe Chromosomenpaare sowie in zwei Geschlechtschromosomen, XX (weibliche Zelle) oder XY (männliche Zelle), aufgeteilt. Ein Chromosom besteht aus zwei zylinderförmigen Schwesterchromatiden mit einem Durchmesser von ca. $0.8 \mu\text{m}$ und einer Länge zwischen zwei und $10 \mu\text{m}$. Die Verbindungsstelle beider Schwesterchromatiden wird als Zentromerregion bezeichnet, wobei das Chromatid in den kürzeren p- und den längeren q-Arm unterteilt wird (Abb.3.10). Nach *Paulson* besteht jedes Schwesterchromatid aus einem durchgehenden DNS-Faden. Die Größe der Chromosomen und somit die Anzahl der Basenpaare können untereinander stark variieren. Die Werte reichen vom kleinsten Chromosom Y mit 59 Megabasenpaaren (Mbp), bis zum größten Chromosom 1 mit 263 Mbp (*Morten* 1991). Etwa 5 bis 10 % der Basenpaare dienen hierbei der Kodierung der 20000 bis 25000 Gene. Die Funktion der restlichen 90 bis 95 % der DNS ist noch weitgehend unbekannt.^[53]

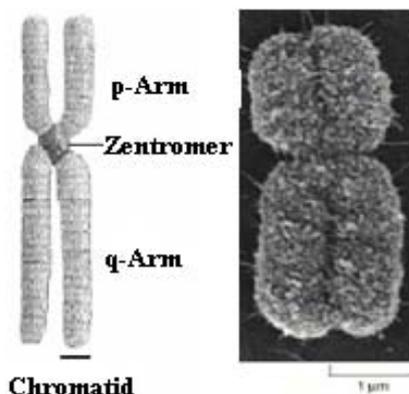


Abb.3.10: Schematische Darstellung (links) und elektronenmikroskopische Aufnahme eines Metaphasechromosoms (rechts).

3.1.4 Zellzyklus

Abhängig vom Zellzyklus variieren die Morphologie und die Topologie der Chromosomen. Im Zellzyklus unterscheidet man zwischen dem Chromosomen-Zyklus und dem gleichzeitig stattfindenden Cytoplasma-Zyklus. Der Chromosomen-Zyklus umfaßt die DNS-Synthese, in welcher eine identische Kopie der gesamten DNS des Zellkerns erzeugt wird, sowie die Mitose, in der beide Kopien des Genoms getrennt werden. Im Cytoplasma-Zyklus findet die Verdopplung der anderen Bestandteile der Zelle statt. Anschließend erfolgt die Cytokinese, in

welcher sich die Zelle in zwei Tochterzellen teilt.^[54] Der Zellzyklus einer eukaryotischen Zelle besteht aus vier Phasen, der M-, G₁-, S- und der G₂-Phase (siehe Abb.3.11). Die M-Phase (mitotische Phase) des Zyklus umfasst sowohl die Zellkernteilung (Mitose) als auch die eigentliche Zellteilung (Cytokinese). G₁-, S- und G₂-Phase bezeichnen die Interphase des Zellzyklus.

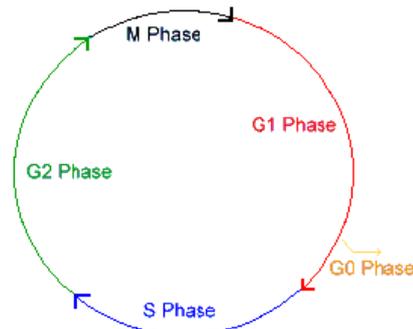


Abb.3.11: Schematische Darstellung vom Zellzyklus einer eukaryotischen Zelle.

Nach der M-Phase kann eine neu gebildete Zelle entweder in eine Wachstums- und Differenzierungsphase ohne Teilungsvorbereitung eintreten (G₀-Phase), in der sie auch je nach Zelltyp irreversibel verbleibt (z.B. Muskelzellen, Erythrozyten), oder sie tritt sofort nach der Mitose oder nach einer verschiedenen langen G₀-Phase (z.B. Leberzellen, Lymphozyten) in den neuen Zellzyklus ein, der mit der G₁-Phase beginnt (Präsynthesephase). In der G₁-Phase liegt ein diploider Chromosomensatz vor. Ihr folgt von der S-Phase (Synthesephase), in welcher die gesamte DNS des Zellkerns verdoppelt (Replikation) wird. Die G₂-Phase wird als Postsynthesephase bezeichnet. Hier prüft die Zelle, ob die vollständige Replikation der DNS abgeschlossen ist und ob die eigene Größe für eine Zellteilung ausreicht.^[54] Die Mitose selbst lässt sich in vier Abschnitte einteilen: Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase. Für das Chromatin bedeuten diese Phasen den Beginn einer zunehmenden Verdichtung in der Prophase, den Höhepunkt der Kondensation in der Metaphase, die Trennung des Chromosomensatzes in zwei diploide Sätze in der Anaphase und das Ausbilden einer neuen Kernmembran in der Telophase.

3.1.5 Zelltod (Apoptose/Nekrose)

Die Zellzahl eines Organismus wird durch Zellteilung und -tod kontrolliert. Der dabei stattfindende Zelltod wird durch die Zelle selbst, z. B. wenn sie Defekte

aufweist, oder durch die Umgebung (Signalproteine) induziert, falls die Zellen nicht mehr benötigt werden. Zellen können somit durch Nekrose („Mord“) oder Apoptose („Selbstmord“) sterben. Bei der Nekrose gehen Zellen durch äußere Einflüsse z.B. durch Verbrennungen, Vergiftungen, Strahlung oder mechanischen Verletzungen zugrunde. Diese führen in größeren Bereichen des Gewebes zur Kondensation der Kernsubstanz und zum Anschwellen der Zellorganellen. Die Folge ist das Platzen der Zellen durch Schädigung der Plasmamembranen. Dadurch werden Stoffe aus dem Cytoplasma freigesetzt, die Fresszellen anlocken und damit eine Entzündungsreaktion hervorrufen (Abb.3.12). Ein Beispiel für die Nekrose ist Sonnenbrand.^[55,56]

Im Gegensatz dazu läuft bei der Apoptose ein genetisch gesteuertes Programm ab. Apoptose wird von einer Kaskade von Enzymen schrittweise initiiert. Die wichtigsten dieser Enzyme sind die Caspasen (Cysteinyln-Aspartasen). Caspasen sind Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Proteine nach der Aminosäure Aspartat schneiden. Die aktivierte Caspase löst eine zur Apoptose führende Signalkaskade aus. Beim Menschen sind 11 verschiedene Caspasen bekannt,^[55] die in Signalkaskaden angeordnet sind. Extrazelluläre Signale leiten die Aktivierung eines membranständigen zellulären „Todesrezeptors“ ein, der die erste Aktivierung in der Caspasekaskade auslöst. In einer zweiten Phase der Caspaseaktivierung sind mitochondriale Proteine wie Cytochrom C beteiligt. Die Caspaseaktivierung findet anfangs in einem Komplex mit dem „Todesrezeptor“ statt und danach im Apoptosom, zu dessen Komponenten Cytochrom C, das Protein Apaf-1, Procaspase-9 und dATP gehören. Procaspase-9 wird proteolytisch aktiviert und freigesetzt. Sie aktiviert wiederum die Procaspasen 3, 6 und 7, die verschiedene Enzyme aktivieren, welche für das Absterben der Zelle verantwortlich sind.

Morphologisch gesehen erfolgt in der Anfangsphase der Apoptose eine Verringerung des Zellvolumens statt. Infolge des sinkenden Zellvolumens verliert die Zelle ihren Kontakt zu den Nachbarzellen und tritt in eine als Zeiose bezeichnete Phase ein. Während der Zeiose verdichtet sich das Chromatin. Die Organellen bleiben im Gegensatz zur Nekrose intakt, und der Stoffwechsel der apoptotischen Zelle läuft normal weiter. Intensives *membrane blebbing* (die Bildung von Ausstülpungen und Bläschen) sind an der Cytoplasmamembran zu beobachten. Am Ende der Apoptose lösen sich membranumschlossene Vesikel die sogenannten apoptotischen Körperchen (*apoptotic bodies*) von der Zelle ab, die von Nachbar- oder Fresszellen eliminiert werden (Abb.3.12). Die resorbierten Vesikel werden durch Lysozyme biochemisch aufgeschlossen und die Reste der abgestorbenen Zelle vollständig verwertet.^[57]

Um qualitativ zwischen vitalen Zellen, Nekrose und Apoptose zu unterscheiden, kann man die morphologische Veränderung der Zelle unter dem Mikroskop beobachten. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, die Zellen mit se-

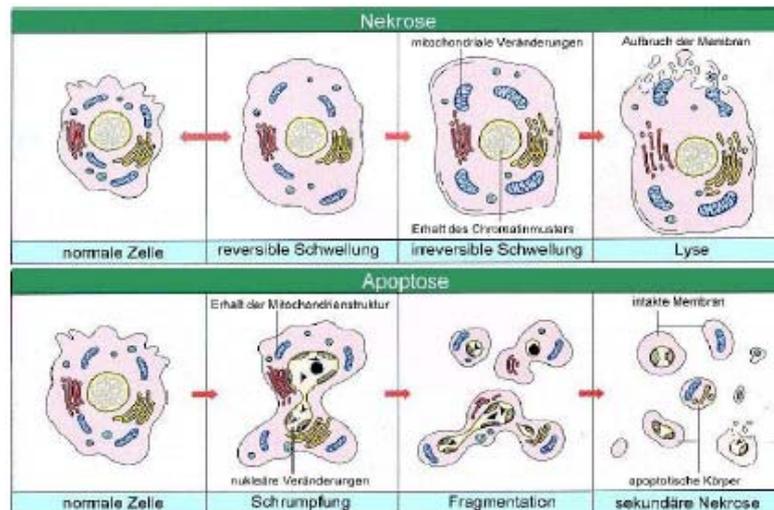


Abb.3.12: Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen einer Zelle während Nekrose bzw. Apoptose.

lektiven Fluorophoren zu versetzen, die jeweils andere Bindungseigenschaften haben. Ein beliebtes Paar sind Annexin-V-FITC und Propidiumiodid. Propidiumiodid bindet an die DNS und ist nicht membranängig. Es kann nur an Zell-DNS binden, deren Membran lysiert ist, wie es bei nekrotischen Zellen der Fall ist. Dagegen bindet Annexin-V-FITC an das membranständige Phosphatidylserinlipid. Dies wird bei apoptotischen und nekrotischen Zellen nach außen verlagert. Bei vitalen Zellen weißt Phosphatidylserin in die Zelle.

Quantitativ kann man Apoptose- und Nekroseprozesse durch Sekundärdektionen von spezifischen Proteinen, die während dem jeweiligen Zelltod gebildet werden, ermöglichen. Bei der Apoptose werden Caspasen aktiviert, die dann in mehreren Rektionsschritten die unterschiedlichsten Substrate spalten. Es gibt inzwischen Kits für Apoptose- und Nekroseprozesse. Die meisten Kits enthalten fluorogene, luminogene oder chromogene Peptidsubstrate sowie Inhibitoren, um in Zellextrakten diverse Proteinaktivitäten zu messen.

3.2 Methoden

3.2.1 Fluoreszenz

Unter Fluoreszenz versteht man die Emission von Photonen durch Atome oder Moleküle, deren Elektronen vorübergehend durch Strahlungsenergie einer äußeren Quelle in einen angeregten Zustand versetzt wurden.

Absorbiert ein Molekül ein Photon einer bestimmten Wellenlänge, werden Elektronen aus ihren energetischen Grundzuständen (S_0) in Niveaus höherer Energie (S_n , $n=1, 2, 3, 4, \dots$) angehoben. Ist die Energie des absorbierten Photons zu gering um Elektronen anzuregen, wird die aufgenommene Energie im Molekül in mechanische Energie, in Rotations- oder Schwingungsenergie umgewandelt. Eine Anregung erfolgt meistens nur in den ersten angeregten Singulettzustand (S_1). Seltener treten auch Anregungen in höhere Singulettzustände auf, welche jedoch schnell (10^{-12} s) strahlungslos (IC) in den S_1 Zustand übergehen. IC (*internal conversion*) ist der strahlungslose Übergang eines Elektrons aus einem angeregten Zustand in einen energetisch niedriger liegenden angeregten Zustand, wobei die frei werdende Energie in Form von Wärme abgegeben wird. Da es sich um einen Übergang zwischen Singulett-niveaus handelt, bleibt die Multiplizität des Zustandes erhalten (spinerlaubter Übergang). Kann die Umgebung nicht die gesamte Energie des Übergangs $S_n \rightarrow S_0$ in Form von Stößen aufnehmen, wird die überschüssige Energie als Photon abgegeben. Bei diesem Übergang wird immer ein Teil der Energie strahlungslos abgegeben. Deshalb hat das emittierte Photon eine größere Wellenlänge als das anfangs absorbierte Photon. Ein Molekül im angeregten Zustand kann auch durch Spinbahntkopplung mittels ICS (*Intersystem Crossing*) von einem Singulett- in einen Triplettzustand übergehen. Dieser $S_n \rightarrow T_n$ Übergang geht mit einer Änderung der Multiplizität des Zustandes einher (spinverbotener Übergang). Diese Art des Übergangs wird wichtig, wenn durch Anwesenheit eines einigermaßen schweren Atoms z. B. Schwefel die Spin-Bahn-Kopplung groß genug ist, um einen derartigen Übergang zu ermöglichen. Auch im Triplettzustand gibt das Molekül Energie durch Stöße ab, bis es sich im Schwingungsgrundzustand befindet. Der Übergang $T_1 \rightarrow S_0$ ist spinverboten und nur bei einer entsprechend großen Spin-Bahn-Kopplung teilweise erlaubt. Dieser Übergang erfolgt langsam und die Emission hält lange nachdem die anregende Strahlung abgeschaltet wurde an. Man bezeichnet ihn als Phosphoreszenz. Die Prozesse der Absorption, Energieumwandlung und Emission von Licht werden in einem Jablonski-Diagramm, benannt zu Ehren des polnischen Physikers *Alexander Jablonski*, in Abbildung 3.13 graphisch dargestellt.

Ein Maß für die Fluoreszenz von Molekülen ist die so genannte Quantenausbeute (Φ). Sie ist allgemein als der Quotient aus der Anzahl definierter Ereignisse bei photophysikalischen oder photochemischen Prozessen und der Zahl der absorbierten Lichtquanten (Photonen) definiert. Bei der Fluoreszenz ergibt sich die Quantenausbeute aus der Zahl der emittierten geteilt durch die der absorbierten Photonen. Die Quantenausbeute ist im Idealfall gleich 1, wenn jedes einfallende Photon genau einen Reaktionsprozess auslöst. Im Allgemeinen ist sie jedoch kleiner 1. Die Quantenausbeute von Fluorescein (50 μmol in 0,1 mol Natriumborat boratpuffer, pH 9,5) beträgt 93 %.

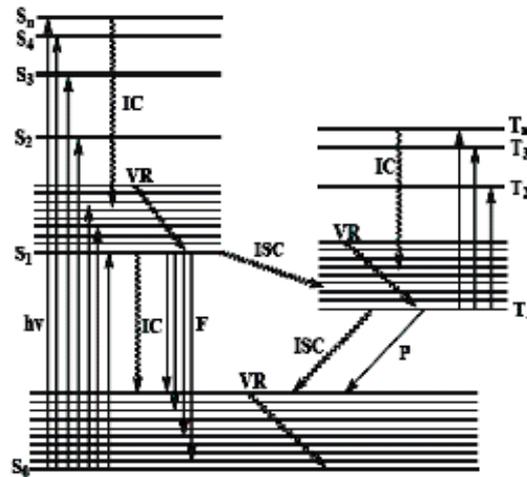


Abb.3.13: vereinfachtes Jablonski Diagramm. ($h\nu$: Energie des absorbierten Photons, IC: internal conversion = strahlungslose Deaktivierung, ISC: intersystem crossing, VR: vibrational relaxation, F: Fluoreszenz, P: Phosphoreszenz).

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

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

Eine andere Art der Fluoreszenzlöschung ist die statische Löschung, bei der der Farbstoff und das Löschmolekül einen Grundzustandskomplex bilden, der schwächer bzw. überhaupt nicht mehr fluoresziert. Es wird also die Anzahl der fluoreszenzfähigen Moleküle verringert. Die Löschwirkung durch Komplexbildung

ist meist stärker als durch Stoßlöschung.

In der Regel tritt keiner der beiden vorgestellten Prozesse isoliert auf. Vielmehr findet meist eine kombinierte Löschung statt, bei der Art und Konzentration von Farbstoff bzw. Löschmolekül das Verhältnis von dynamischer zu statischer Löschung bestimmen. Bei der Dimerisierung zweier Farbstoffmoleküle kann es ebenso zu einer Fluoreszenzlöschung kommen. Sie ist ein Beispiel dafür, dass Moleküle die eigene Fluoreszenz beeinträchtigen.^[58, 59, 60]

3.2.2 Fluoreszenzspektroskopie

Unter Fluoreszenzspektroskopie versteht man eine optische Untersuchungsmethode, bei der kurzwelliges Licht auf die zu untersuchende Probe gestrahlt wird, mit längeren Wellenlängen von der Probe reemittiert und anschließend gemessen wird. Sie ist besonders bei Fluoreszenzfarbstoffen von Interesse. Fluoreszierende Verbindungen können mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie bis zu drei Größenordnungen empfindlicher nachgewiesen werden als mit der UV/VIS-Spektroskopie. Weiterhin ermöglicht sie wichtige Aussagen über Molekularität und Molekülaufbau, Konzentrationen und räumliche Ausdehnung biologischer Strukturen und wird in den verschiedensten Formen in vielen Bereichen der Physik, Chemie, Biologie und Medizin als Analysemethode eingesetzt.

Bei der Messung können mehrere Messprinzipien angewendet werden. Im einfachsten Fall wird die Probe bei einer festen Wellenlänge angeregt und die Intensität der Fluoreszenz bei einer festen Wellenlänge gemessen. Die Selektion der Wellenlänge(n) erfolgt mit Hilfe von Filtern (Filterfluorimeter). Werden statt dieser Filter Monochromatoren eingesetzt, so können Emissionsspektren (Messung der Fluoreszenzintensität als Funktion der Emissionswellenlänge bei fester Anregungswellenlänge) oder Anregungsspektren (Messung der Fluoreszenzintensität als Funktion der Anregungswellenlänge bei fester Fluoreszenzwellenlänge) aufgenommen werden.^[58, 61]

Als Anregungslicht werden häufig Quecksilberdampf- und Xenonlampen verwendet. Quecksilberdampflampen emittieren ein Linienspektrum mit hoher Intensität über einem intensitätsschwachen kontinuierlichen Hintergrund. Xenonlampen haben ein kontinuierliches Emissionsspektrum, dessen Intensität im UV-Bereich allerdings abnimmt. Wichtige Eigenschaften von Monochromatoren sind ihre Lichtstärke, die spektrale Spaltbreite sowie die Streulichtfreiheit. In modernen Geräten werden abbildende holographische Gitter verwendet. Als Photodetektor werden Sekundär-Elektronen-Vervielfacher (*Photomultiplier*, PMT) eingesetzt, die aufgrund ihrer hohen Verstärkung (10^6 bis 10^8 fach) auch die Messung geringster Lichtintensitäten bis zum Nachweis einzelner Photonen ermöglichen

(Abb.3.14).

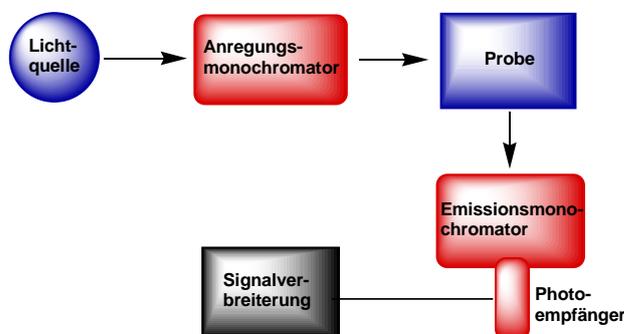


Abb.3.14: Schematische Darstellung eines Fluoreszenzspektrometers.

3.2.3 UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektroskopie gehört zu den Elektronenanregungsspektroskopien. Dabei werden durch Einstrahlung von UV- und sichtbarem Licht Elektronenübergänge in den Valenzschalen angeregt, oft vom HOMO zum LUMO, d. h. vom Grundzustand in einen angeregten Zustand. Die Moleküle absorbieren selektiv einen Teil des Lichts. Die Verbindung erscheint der jeweiligen Komplementärfarbe des absorbierten Spektralbereichs.

Bei organischen Molekülen wird Farbigkeit durch konjugierte Doppelbindungen verursacht. Je ausgedehnter das π -System ist, desto geringer ist der Abstand zwischen HOMO und LUMO und somit langwelliger die absorbierte Strahlung. Durch die Donor-Akzeptor-Substitution wird die Farbigkeit beeinflusst. Donoren sind z. B. $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}$, $-\text{NR}_2$, $-\text{OH}$, Akzeptorgruppen sind $-\text{NO}_2$ und $-\text{COR}$. Bei anorganischen Verbindungen wie Metallkomplexen finden d-d-Übergänge (LF) und Charge-Transfer-Übergänge (CT) statt (Abb.3.15). CT können zwischen Metall- und Ligand- (MLCT oder LMCT), zwischen verschiedenen Ligandorbitalen (LLCT) oder zwischen verschiedenen Metallzentren (MMCT) erfolgen. Durch diese Übergänge zeigen viele Übergangskomplexe intensive Farben.

Bei der Aufnahme eines UV/Vis-Spektrums (Abb.3.16) wird die Wellenlänge mittels eines Prismas kontinuierlich geändert und die Intensität des Lichtstrahls vor Durchqueren (I_0) und nach Durchqueren (I) des Probenraums (d = Dicke der Küvette) bzw. die Intensität des Vergleichsstrahls (Blindwert) und des Probenstrahls gemessen. Mittels des Lambert-Beer'schen-Gesetzes wird die Absorption mit der Konzentration c und dem Extinktionskoeffizient ϵ der Substanz korreliert.

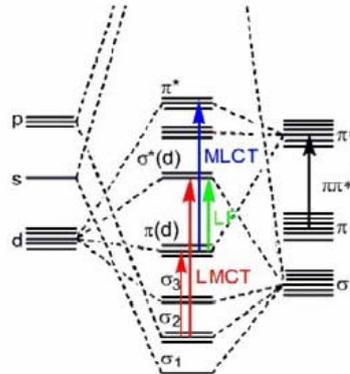


Abb.3.15: Mögliche elektronische Übergänge in einem oktaedrischen Komplex.

$$A = \log \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Diese lineare Beziehung ist nur für kleine Konzentrationen gültig. ε wird immer für die Wellenlänge der Absorptionsmaxima angegeben und ist spezifisch für jede chemische Verbindung.^[5, 62]

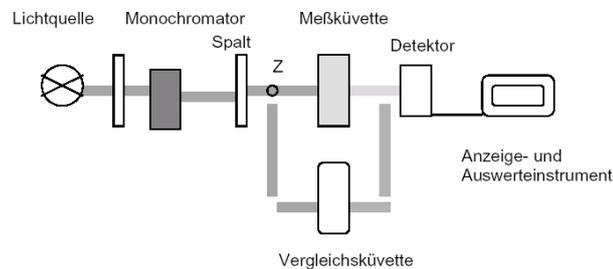


Abb.3.16: Blockschema eines UV/VIS-Spektrometers.

3.2.4 Konfokale Laser Raster Mikroskopie

Mit dem konfokalen Laser Raster Mikroskop (*confocal laser scanning microscope*, CLSM) ist es möglich nicht-invasiv dreidimensionale Bilder biologischer Strukturen zu erzeugen. Die konfokale Mikroskopie mit inkohärentem Licht wurde von *Minsky* entwickelt und 1961 patentiert.^[63] Erst die Einführung von Laserlicht, als Quelle der Anregung von Fluoreszenz, machte die breite Anwen-

dung der konfokalen Mikroskopie in der Biologie möglich.^[64] In der praktischen Anwendung erreicht man mit einem CLSM eine laterale Auflösung von ca. 250 nm und eine axial von ca. 600 nm. Die Besonderheit dieses Mikroskops gegenüber eines Weitfeldmikroskops ist die fokussierte Beleuchtung und die Unterdrückung von Streulicht und Licht außerhalb des Fokus. Abbildung 3.17 zeigt den Aufbau eines konfokalen Mikroskops.

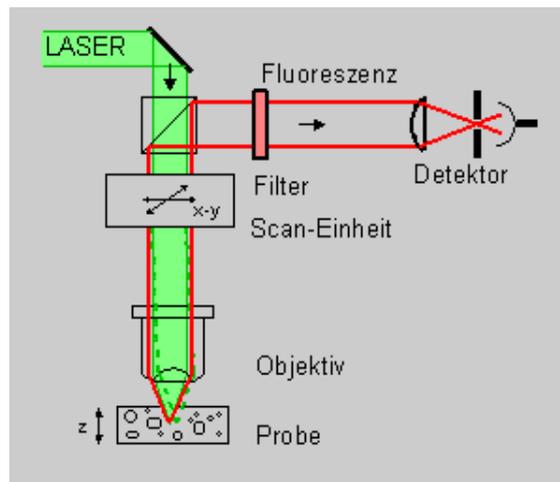


Abb.3.17: Prinzip eines konfokalen Laser Raster Mikroskops.

Das Laserlicht mit der Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{Absorption}}$ wird vom Farbteiler (dichroitischer Spiegel) oder einen AOBS (*acousto optical beam splitter*) reflektiert und anschließend auf die Ebene der biologischen Probe fokussiert. Die Fokussierung erfolgt durch ein Objektiv hoher numerischer Apertur (NA), welche definiert ist als:

$$NA = n \cdot \sin\left(\frac{\alpha}{2}\right)$$

Wobei n der Brechungsindex des Immersionsmediums ist und α der Öffnungswinkel des Objektivs. Eine hohe numerische Apertur ergibt einen großen Winkel und damit sowohl eine hohe Lichtstärke als auch ein hohes Auflösungsvermögen mit gutem Kontrast in z-Richtung. Der Fluoreszenzstrahl $\lambda_{\text{Emission}}$, das von der Probe emittierte Licht, wird dann durch das Objektiv zurück geleitet und vom Farbteiler zum Detektor durchgelassen. Hierbei wird der Fluoreszenzstrahl optisch mit Emissionsfiltern vom anregenden Strahl getrennt und auf eine konfokal angeordnete Lochblende fokussiert. Die Blende hat einen variablen Durchmesser, der im Idealfall unendlich klein ist. Die Detektion erfolgt über einen

Photomultiplier. Das Fluoreszenzlicht, welches aus Objektteilen außerhalb des Beleuchtungsfokus stammt, wird nicht auf die Blendenöffnung fokussiert und somit weitgehend unterdrückt. Die Bildgebungseigenschaften eines CLSM werden durch die 3D-Punktbildfunktion oder Punktverwaschungsfunktion (*point spread function*, PSF) beschrieben, wobei ein ideales Objektiv das Fluoreszenzlicht in eine kugelförmige Wellenfront verwandelt, die sich in Richtung der Fokusregion bewegt. Um ein komplettes 3D-Bild des Objekts zu erhalten, wird der Laserstrahl zunächst mit Hilfe einer Scanning-Einheit Punkt für Punkt lateral (*xy*-Ebene) über das Objekt bewegt und anschließend die nächste Ebene abgerastert. Aus den dabei aufgenommenen Einzelpunkten wird im Rechner ein Bild rekonstruiert.^[65]

3.2.5 Differential-Interferenz-Kontrast Mikroskopie

Die Differential-Interferenz-Kontrast Mikroskopie (DIC) wurde von dem Franzosen *Georges Nomarski* in den 50er Jahren erfunden. Sie findet bei Phasenobjekten, wie beispielsweise Zellen, Anwendung. Wird ein Phasenobjekt von Lichtstrahlen durchdrungen, so erfahren die Strahlen auf Grund unterschiedlicher Brechungsindices eine Phasenverschiebung relativ zu den Strahlen, die nur das Medium passieren. Die Phasenverschiebung ist umso größer, je größer dieser Unterschied ist und je dicker die Objekte sind. Phasenunterschiede sind für das bloße Auge nicht wahrnehmbar und müssen in Helligkeitskontraste umgewandelt werden. Dies ermöglicht das DIC mittels zweier *Wollaston-Prismen*. Das *Wollaston-Prisma* ist doppelbrechend und besteht aus zwei Quarzprismahälften (Abb.3.18).

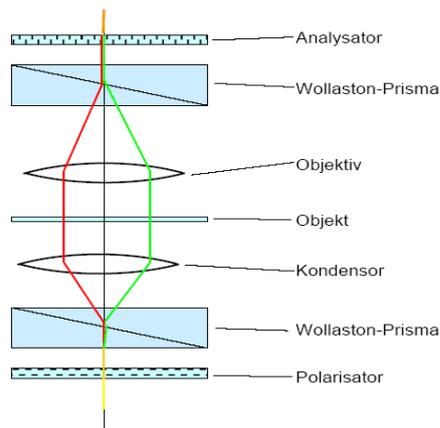


Abb:3.18: Optischer Aufbau eines Differential Interferenz Kontrast Mikroskops..

Zunächst trifft im DIC-Mikroskop Licht auf einen Polarisator. Das polarisierte Licht wird durch das erste *Wollaston-Prisma* in zwei senkrecht zueinander stehende Strahlen gespalten und räumlich voneinander getrennt. Der Abstand der Strahlen muss unterhalb der Auflösungsgrenze sein. Die beiden Strahlen werden auf das Objekt gelenkt und erfahren durch dieses, je nach Brechungsindex, eine zusätzliche Phasenverschiebung. Durch die Phasenverschiebung ändert sich die Polarisationsrichtung der Strahlen unterschiedlich stark. Im zweiten *Wollaston-Prisma* werden die Strahlen wieder vereint und im Analysator interferieren sie miteinander. Da Polarisator und Analysator senkrecht zueinander stehen, erscheinen Grenzflächen (Grenzen von Flächen, die stark unterschiedliche optische Dichten besitzen) sehr hell. Das Interferenzkontrastbild erscheint also reliefartig. Dies spiegelt nicht die dreidimensionale Präparatstruktur wieder, sondern nur Dichteunterschiede im Objekt.^[66]

3.2.6 *Spatially Modulated Illumination* Mikroskopie

Da die Auflösung eine Funktion der Wellenlänge ist, verwendet man für höhere Auflösungen kleinere Wellenlängen mit höherer Energie. Ein Teil dieser Energie wird bei der Interaktion mit dem Objektiv an dieses abgegeben. Dieser Anteil steigt bei höherer Energie. Eine Möglichkeit bei Strahlung niedrigerer Energie auf eine Auflösung unter 200 nm zu kommen bietet die Wellenfeldmikroskopie.

Das *Spatially Modulated Illumination Microscope* (SMI) ist ein Spezialfall der Wellenfeldmikroskopie und basiert auf dem Prinzip der räumlich strukturierten Beleuchtung,^[67] wobei sich die strukturierte Beleuchtung nur auf die axiale optische Achse konzentriert. Die Vernachlässigung der lateralen Strukturierung ermöglicht eine höhere Messgenauigkeit in axialer Richtung. Hierbei werden zwei kollimierte, kohärente Laserstrahlen gleicher Intensität und Polarisation in zwei, sich gegenüberliegende Objektive eingekoppelt und zur Interferenz gebracht (Abb.3.19). Dadurch bildet sich eine stehende Lichtwelle aus, die einzelne Objektbereiche selektiv zur Fluoreszenz anregt. Charakteristisch für diese Technik ist, dass die äquidistanten Intensitätsmaxima der stehenden Welle senkrecht zur optischen Achse des Objektivs ausgerichtet sind, das zur Detektion des Fluoreszenzsignals verwendet wird. Vor der Detektion befindet sich ein Block-Filter, der das Anregungslicht vom Fluoreszenzstrahl der Probe abtrennt. Mit dieser Mikroskopietechnik ist es möglich, die axiale Ausdehnung von sphärischen Objekten bis zu 40 nm mit einer Genauigkeit von bis zu 10 nm zu messen.^[68] Die obere Grenze der messbaren axialen Ausdehnung bzw. Größe mittels SMI liegt bei ca. 180 nm, deutlich unterhalb der axialen PSF der CLSM. Diese Mikroskopietechnik ist für die Größenmessung kleiner Objekte interessant.

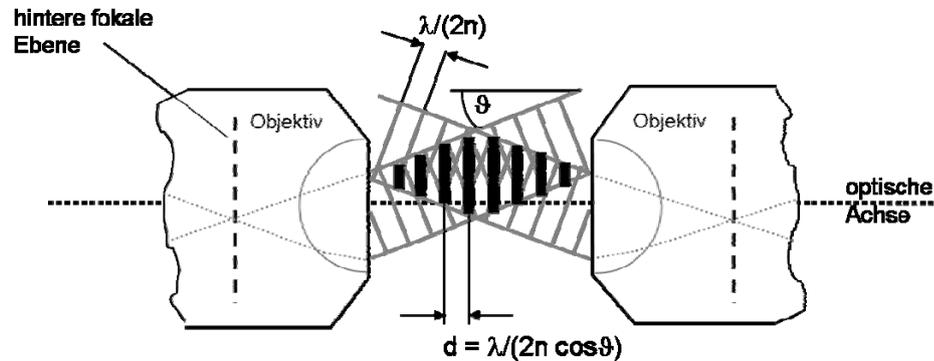


Abb.3.19: Objektraum des SMI-Mikroskops (n = Brechungsindex des Mediums im Objektraum, λ = Anregungswellenlänge, ϑ = Winkel des ausfallenden Laserstrahls, d = Abstand der Intensitätsmaxima im Wellenfeld).

3.2.7 4Pi Mikroskopie

Eine Weiterentwicklung der konfokalen Mikroskopie stellt die 4Pi Mikroskopie dar. Ähnlich wie bei einem SMI-Mikroskop werden zwei gegenüberliegende Objektive verwendet, durch die 1- oder 2-Photonen-Laser eingekoppelt werden können. Detektiert wird ein spezifisches Interferenzmuster mit einem Hauptmaxima und zwei Nebenmaxima (*side lobes*). Eine Möglichkeit die *side lobes* zu entfernen bietet die mathematische Bearbeitung. Dies ist ab einer relativen Höhe der *side lobes* von unter 50 % möglich.

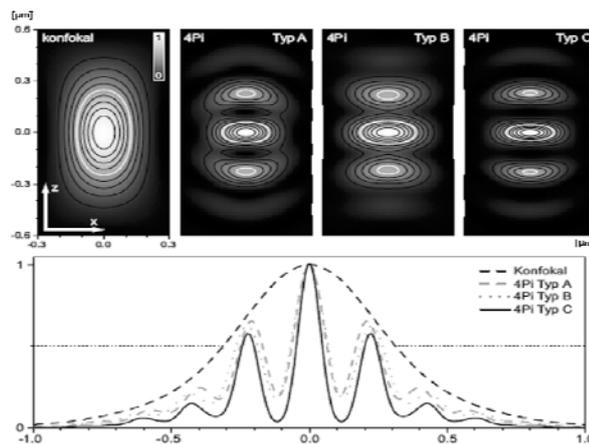


Abb.3.20: Theoretische Punktbildfunktionen des CLSM und des 4Pi Typ A, Typ B und Typ C mit den dazugehörigen simulierten Intensitätsplots.

Bei 1-Photonenanregung und Objektiven mit einer sehr hohen numerischen Apertur ist jedoch das Signalverhältnis 60 bis 70 %. Eine weitere Möglichkeit bietet die 2-Photonenanregung mit konfokaler Detektion. Hiermit erreicht man eine quadratische Abhängigkeit der Anregungseffizienz von der Beleuchtungsintensität. Die doppelte Wellenlänge bewirkt eine stärkere Beugung und schiebt die Nebenmaxima weiter nach außen.

Es gibt drei 4Pi-Mikroskopietypen. Beim Typ A erfolgt die kohärente Beleuchtung mit zwei Objektiven. Die Detektion ist eine gewöhnliche konfokale Detektion mit einem Objektiv. Bei Typ B wird die kohärente Detektion über beide Objektive und die Beleuchtung über ein Objektiv ausgeführt. Beim Typ C erfolgen die kohärente Beleuchtung und die Detektion mit zwei Objektiven. Eine Übersicht über die Punktbildfunktion des CLSM sowie der PSF des 2-Photonen-4Pi-Typ A, -Typ B und -Typ C sind in Abbildung 3.20 dargestellt.^[65, 69, 70, 71]

3.2.8 Stimulated Emission Depletion

Eine weitere Methode zur Erhöhung der effektiven Auflösung eines Mikroskops ist, von *S. Hell* entwickeltem, die Fluoreszenz der Probe durch eine stimulierte Emission zu unterdrücken (*Stimulated Emission Depletion*, STED).

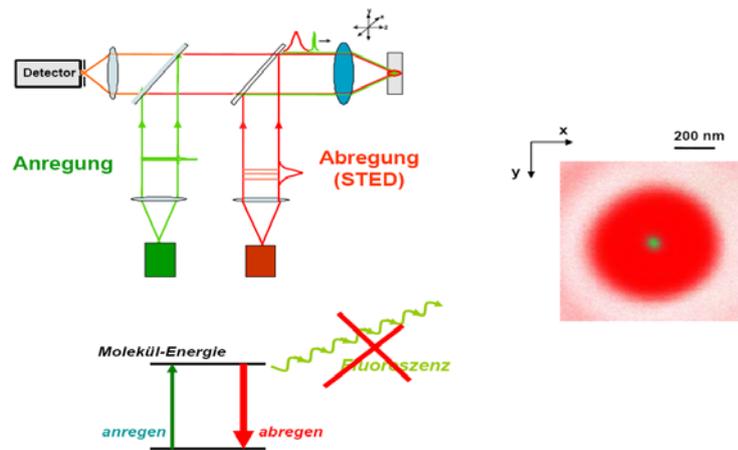


Abb.3.21: Schematischer Aufbau der STED-Mikroskopie (links) und Verkleinerung des Bildpunktes (grün) durch den ringförmigen Abregungspuls (rechts).

Bei diesem Mikroskopiesystem, das ebenfalls auf dem konfokalen Prinzip mit Fokussierung der Anregung auf die Probe beruht, wird zusätzlich zum Anregungsstrahl ein zweiter, gepulster und rotverschobener Laserstrahl in die

Probe eingestrahlt (Abb.3.21). Dieser STED-Strahl wird durch optische Elemente so geformt, dass sich um den Anregungsfokus ein dreidimensionaler Ring bildet. In diesem Bereich findet dann eine stimulierte Emission statt. Die Energie der abgeregten Elektronen trägt nicht zum Bild bei, da von den Elektronen abgegebene Photonen die gleichen Quantenzahlen haben (gleiche Wellenlänge, gleiche Polarisation, gleiche Phase, gleiche Ausbreitungsrichtung) wie die, der Emission hervorrufenden Elektronen. Bei dieser Mikroskopiemethode wird folglich die Breite der Anregungs-PSF durch eine stimulierte Fluoreszenzemission von der Probe im Randbereich der PSF vor der eigentlichen Fluoreszenzdetektion deutlich verringert.^[72, 73] Mit STED wird eine Auflösung von bis zu 30 nm erreicht.

3.2.9 Mikroinjektion

Die Mikroinjektion ermöglicht es, je nach experimenteller Fragestellung unterschiedliche Substanzen in geringsten Mengen und in definierter Konzentration in Zellen oder Zellkerne zu injizieren. Bei dieser Methode werden z. B. Markierungsreagenzien in bestimmte Bereiche einer Zelle direkt, mit einer speziell geformten Glaskanüle, gespritzt und ihr weiterer Weg durch die Zelle unter dem konfokalen Mikroskop verfolgt. Hierbei können komplexe Regulations- und Transportvorgänge auf zellulärer Ebene studiert werden. Das klassische Gentransferverfahren seit Beginn der 80er Jahre ist die DNS-Mikroinjektion in einen der Vorkerne befruchteter Eizellen (Abb.3.22).

Das Mikroinjektionssystem (z. B. Firma Eppendorf, siehe Abb.3.23) kann an die jeweilige Zellkulturlinie angepaßt werden. Hauptsächlich besteht das System aus einem Mikroinjektor und einem menügesteuerten programmierbaren Mikromanipulator. Durch einen Luft- oder Öl-Kompressor wird ein hoher Druck von bis zu 8 bar aufgebaut.

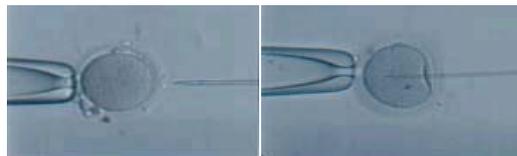


Abb.3.22: Mikroinjektion einer Samenzelle direkt in eine Eizelle.

Drei Druckgrößen werden unterschieden: Der Reinigungsdruck (p_1) dient zum kräftigen Ausblasen der Kapillare bei Verstopfungen, der regulierbare Injektionsdruck (p_2) zur möglichst schonenden Injektion und der Kompensationsdruck (p_3) verhindert den Rückfluß von Flüssigkeit in die Kapillare nach erfolgter Injektion. Mit diesem System können kleinste Flüssigkeitsmengen (ca. 10 fl) mit

Hilfe sehr fein ausgezogener Glaskapillaren in lebende Zellen injiziert werden. Der Mikromanipulator erlaubt mit einer automatisierten Injektionsbewegung einen möglichst schonenden Einstich. Bei einem Injektionsbefehl vollzieht der Manipulator eine Ausholbewegung, die Kapillare sticht dann in einem Winkel von 45° axialer Richtung in die Zelle ein und fährt nach beendeter Injektion in die Suchebene zurück. Durch Variation von Injektionsdruck und Injektionszeit kann die Menge der zu injizierenden Substanz eingestellt werden. Abhängig ist sie auch vom Durchmesser der Austrittsöffnung der Glaskapillare und der Viskosität der Lösung.^[74, 75]



Abb.3.23: Halbautomatisierte Mikroinjektionssystem für adhärenente Zellen.

3.2.10 Automatisierte PNS-Festphasensynthese

Die Synthese von PNS-Oligomeren durch automatisierte Festphasentechniken ist heute Routine. Als reaktive Nukleobasen werden Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin eingesetzt, die jeweils eine N-(2-Aminoethyl)-glycineinheit tragen. Die erste Aminogruppe des Peptidrückgrats ist mit der Schutzgruppe Fluorenyl-9-methoxy-carbonyl (Fmoc) und die exocyclische Aminogruppe der Basen A, G, C über die Benzhydryloxycarbonyl-Schutzgruppe (Bhoc) geschützt.

Die PNS-Synthese geht von einer Polystyrol-Festphase aus, welche nach außen stehende Aminogruppen trägt. Diese Aminogruppen werden dann mit dem ersten PNS-Monomeren an der Carboxylgruppe kondensiert. Die Synthese kann auch mit einem Fmoc-geschütztem Lysin beginnen. Lysin erhöht die Löslichkeit der PNS in wässrigen Medien, da die PNS-Moleküle zur Selbstaggregation neigen und somit bei der Aufreinigung Probleme bereiten. Im Syntheseautomaten wird eine sequenzielle PNS-Synthese durchgeführt. Da die PNS während der Synthese an der Festphase gebunden bleibt, können die überschüssigen Reagenzien

zwischen den einzelnen Syntheseyklen mit Dimethylformamid ausgewaschen werden.

Der erste Schritt des Syntheseyklus ist die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe am N-Terminus, gefolgt von einem Waschschrift. Danach wird das nächste Basen-Monomer aktiviert und es folgt ein weiterer Waschschrift. Anschließend wird über den „*capping*“ Schritt jede noch freie Aminogruppe mit Acetanhydrid acetyliert und für weitere Reaktionen blockiert. Dieser Schritt verhindert die Verlängerung von PNS-Ketten, in denen ein Nukleobasen-Baustein fehlt. Im letzten Schritt, vor der Abspaltung der PNS-Kette von der Festphase, kann zusätzlich das Aminoende der Kette mit aktivierten Fluorophoren modifiziert werden (Abb.3.24). Hierbei werden z. B. die Succinimidylester der Fluoreszenzfarbstoffe (z. B. TMR, Carboxyfluorescein) eingesetzt. Die Modifizierung findet ebenfalls an der Festphase statt.

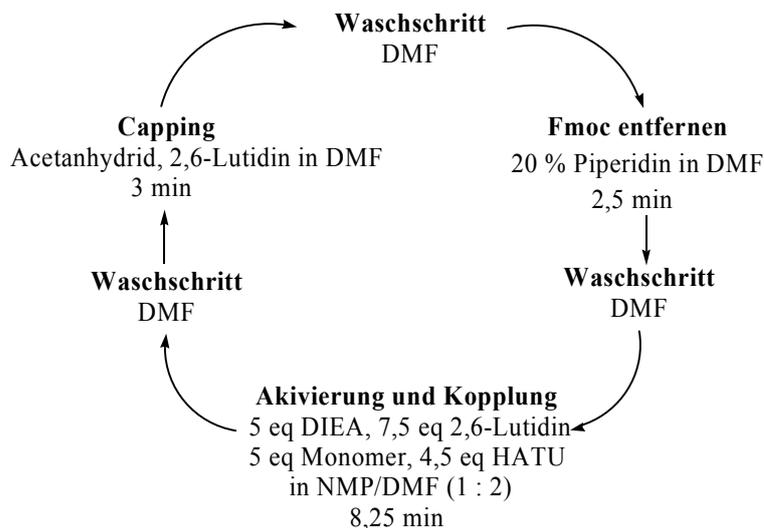


Abb.3.24: Schematische Darstellung einer PNS-Syntheseyklus an der Festphase.

3.2.11 MALDI-TOF

1988 wurde MALDI-Spektrometer (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation*) von *Hillenkamp* und *Tanaka* vorgestellt. Es ist eine Methode um große, labile Moleküle als intakte Ionen in die Gasphase zu bekommen. Die zu untersuchende Substanz wird mit einem großen Überschuss eines Matrix-Moleküls, eine schwache organische Säure gemischt. Die vorbereitete Probe wird ins Vakuum in ein MALDI-*Time of Flight*-Massenspektrometer gegeben.

Die Methode ermöglicht eine präzise und schnelle Molmassenbestimmung

von großen Molekülen wie z. B. Peptiden, Proteinen, Kohlenhydraten, Nukleinsäuren, synthetischen Polymeren und anderen natürlichen Verbindungen bis zu 100 kDa. Die Massen-Ladungsverteilung (m/z) kann durch die Messung der Geschwindigkeit der Ionen nach Beschleunigung in einem elektrischen Feld bestimmt werden. Am Ende des Feldes ist ein Detektor angebracht, der die Flugzeit der Ionen misst. Da die kinetische Energie der Ionen konstant ist, fliegen kleine Ionen schneller als große: $E_{\text{kin}} = U \cdot z = \frac{1}{2} m v^2$.

Ein MALDI-TOF-Spektrometer liefert ein komplettes Spektrum des Massenbereichs in einer kurzen Zeit. Die einfachste Methode eines Flugzeit-Massenspektrometers ist die lineare Methode, bei der die Ionen in eine feldfreie Zone hinein beschleunigt und von einem Analysator am Ende dieser Zone registriert werden.

4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von neuen Anthrachinonfluoreszenzfarbstoffen, die im langwelligen Spektralbereich des sichtbaren Lichts oder im nahinfraroten Bereich fluoreszieren und deren Anwendung als Molekulare Sonden für bioanalytische oder biologische Fragestellungen, einschließlich des zellulären *Imagings*. Von Interesse waren u. a. Fluorophore, die selektiv bestimmte subzelluläre Strukturen (*in vivo* Markierungen) in lebenden Zellen erkennen, deren Biokonjugate für hochspezifische Markierungen in fixierten Zellen, sowie Derivate die auf biologische Spurenmetalle wie Zn^{2+} -Ionen ansprechen (Metall-Sensoren) oder den programmierten Zelltod (Apoptose) in lebenden Zellen auslösen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Reagenzien, Materialien und Geräte

5.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien für die Experimente in dieser Arbeit wurden von den Firmen Acros Organics, Cambrex, Deutero, GIBCO, Invitrogen, Merck, Meck Schuchard, Promega, Serva, Sigma-Aldrich, und Vector bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Außerdem wurden Chemikalien von der Chemikalienausgabe der Fakultät für Chemie der Universität Heidelberg und dem Theoretikum der Universität Heidelberg ohne weitere Aufreinigung benutzt.

5.1.2 Zellkulturen

Zelllinien:

- HeLa TK-

HeLa-Zellen sind menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs) und sind die ersten menschlichen Zellen, aus denen eine permanente Zelllinie etabliert wurde. Die Bezeichnung der Zellen geht auf den Namen der Patientin, *Henrietta Lacks*, zurück.^[76]

Bereits seit Anfang der 50er Jahre werden diese Zellen als Standardzellen verwendet, um virologische, molekular- und zellbiologische Vorgänge zu erforschen. Inzwischen haben Forscher viele Mutanten der HeLa-Zellen erzeugt, die sich z. B. in der Morphologie, in der Virusempfindlichkeit, der Chromosomenzahl und im Karyotyp voneinander unterscheiden. Hierbei sind die HeLa TK- Zellen eine subklonierte Spezies, die einen Desoxythimidin-Kinase-Defizit besitzen.

- LnCAP

LnCAP-Zellen sind humane Prostatakarzinomzellen. Sie wurden 1977 aus der linken supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines 50 Jahre alten Mannes entnommen. LnCAP-Zellen sind adhärente Fibroblasten.

- VH7-Zellen
VH7-zellen sind embryonale Stammzellen. Sie stammen von der Vorhaut und gehören zu den adhärennten Fibroblasten.
- Humane Gewebeschnitte aus dem Dünndarm (Muskelzellen)
- Pflanzenzellen (Tabak; WT-MDB, MDB_ER/GFP, BY2)
- Viren (HIV)

5.1.3 Medien, Lösungen und Puffer

- Absorptions- und Fluoreszenzexperimente

MOPS-Puffer pH 7,0

10 mM	MOPS
50 mM	NaCl
100 ml	HPLC-Wasser (VWR)

- Zellkultur

HEPES-Glucose-Puffer pH 7,2

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

Penicillin/Streptomycin-Lösung (Biochrom AG)

5000 U/ml	Penicillin G
5000 U/ml	Streptomycinsulfat
In physiologischer Kochsalzlösung (Lagerung bei -20 °C)	

Phenolrothaltiges RPMI Medium mit 1000 mg/l Glucose (Gibco)

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

Phenolrothaltiges EMEM mit 1000 mg/l Glucose (Lonza)

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

Phenolrotfreies DMEM mit 1000 mg/l Glucose für CLSM-Detektionen pH 7,4 (Lonza)

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

- Mikroinjektion

Mikroinjektionspuffer, pH 7,2

80 mM	KCl
10 mM	K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O
4 mM	NaCl

- Fixierungspuffer

Formaldehyd-Fixierung (HEPEM-Puffer) pH 6,9

3,7 %	Formaldehydlösung aus einer 37%igen Formaldehydlösung in 1 x PBS
65 mM	PIPES
30 mM	HEPES
10 mM	EGTA
2 mM	MgCl ₂

Methanol/Eisessig-Fixierung

30 ml	MeOH
10 ml	CH ₃ COOH

- Puffer für die FISH-Experimente

Hypertonische Lösung pH 7,2 mit KOH

75 mM	KCl
50 ml	HEPES
500 ml	Wasser

Hybridisierungspuffer

80 mM	KCl
4 mM	NaCl
10 mM	K ₂ HPO ₄

Waschpuffer

0,1 g	Natriumdodecylsulfat
50 ml	20 x SSC
500 ml	Wasser

5.1.4 Geräte

Die NMR-Spektren wurden auf einem Bruker AVANCE DPX 200 oder Bruker AVANCE II 400 NMR-Spektrometer aufgenommen. Als interner Standard wurden die Restprotonen der deuterierten Lösungsmittel verwendet:

CDCl ₃	¹ H δ = 7,26	¹³ C δ = 77,00
CD ₃ OD	¹ H δ = 3,31	¹³ C δ = 49,05
DMSO-d ₆	¹ H δ = 2,50	¹³ C δ = 39,43
Aceton-d ₆	¹ H δ = 2,05	¹³ C δ = 30,83

Für die Multiplizität der Signale wurden folgende Abkürzungen benutzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett. Die chemischen Verschiebungen wurden in ppm relativ zum Signal von Tetramethylsilan (TMS) angegeben.

ESI⁺- und ESI⁻-Spektren wurden am Micromass ESI-Q-TOF Ultima API Massenspektrometer mit einem Autosampler aufgenommen. Die Proben wurden als 10⁻⁴-bis 10⁻⁵ M Lösungen in dem geeigneten Lösungsmittel verdünnt mit Acetonitril in die Probenkammer eingebracht. FAB-Spektren wurden am MAT 8400 Massenspektrometer detektiert. Die Proben wurden als Feststoffe in p-Nitrobenzylalkohol (NIBEOL) eingebettet.

Die MALDI-TOF MS Untersuchungen wurden an einem BrukerBIFLEX III Spektrometer durchgeführt. Für die Detektion von PNA wurde der positive Messmodus verwendet. Als Matrix wurde eine Lösung von 27 mM Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxymethylsäure) in CH₃CN/H₂O/CH₃OH = 1:1:1 mit 0,1 % TFA eingesetzt. 1 µl der zu untersuchende Probe wurde auf einen MALDI-Stahlträger gegeben und mit der Matrix vermischt. Die Proben wurden im Ölvakuum getrocknet und anschließend untersucht.

Fluoreszenzspektren wurden am Fluoreszenzspektrometer Varian Cary Eclipse gemessen. Die UV/Vis-Spektren wurden mit einem Varian Cary 100BIO-Spektrometer aufgenommen.

In dieser Arbeit wurden die Fluoreszenzdetektionen mit einem Fluoreszenzmikroskops Axiovert 200 (Zeiss) in der Gruppe von Prof. Krämer (ACI) und die DIC- und die konfokalen Aufnahmen mit einem Leica DM IRBE (TSC/SP2) konfokalen Laser Raster Mikroskops in der Arbeitsgruppe von Prof. Lichter (DKFZ) abgelichtet. Die 4pi-Detektionen wurden in der Gruppe von Prof. Cremer (KIP) mit einem konventionellen 4pi-Mikroskop (Leica) des Typs A und in der Gruppe von Prof. Hell (Bioquant) mit einem CLSM (Leica), das einen 4pi Typ C Kopf trägt, realisiert. Weiterhin wurden die STED-Aufnahmen an einem selbst entwickelten STED-Mikroskop von Prof. Hell am Max-Planck-Institut in Göttingen

gen abgeleuchtet. Die SMI-Aufnahmen wurden mit einem SMI-Vertico-Mikroskop, das von Prof. Christoph Cremer entwickelt und von der Universität Heidelberg zur Patentanmeldung eingereicht ist, belichtet. Im Vergleich zu SMI sind die beiden Objektive des SMI-Vertico Mikroskops räumlich vertikal ausgerichtet und nicht horizontal. Dies hat insofern den Vorteil, dass die Proben sehr einfach und automatisiert an das Mikroskop angebracht werden.

Die HPLC-Messungen wurden bei 22 °C an einem Shimadzu Flüssigkeits-Chromatographen durchgeführt, der mit einem UV/VIS-Detektor ausgerüstet ist. Als Trennsäule wurde eine EC 250 x 4,6 mm Nucleosil 300-5 C4-Säule der Firma Machery-Nagel eingesetzt. Zur Reinigung der Biokonjugate wurde eine 500 µl Injektionsschleife verwendet. Das Injektionsvolumen betrug 250 µl. Die Elution der PNA-Konjugate wurde mit einem Gradienten von CH₃CN + 0,1 % TFA und 0,1 % TFA-Lösung in Wasser durchgeführt.

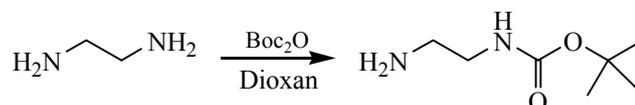
Die Mikroinjektionen wurden an einem halbautomatisierten Mikroinjektionssystem von der Firma Eppendorf am DKFZ (Gruppe Prof. Lichter) durchgeführt. Das System bestand aus Inject-Man NI 2 mit einem Zeiss Mikroskop Axiovert 200 und aus einem Mikroinjektor FemtoJet.

5.2 Synthesen

5.2.1 Allgemeine Synthesevorschrift für einfach N-geschützten Diaminoalkane^[77]

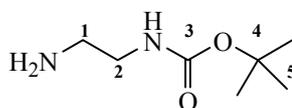
Ansatz: 8 äq Diaminoalkan
1 äq Di-*tert*-butyl-dicarbonat

In Anlehnung an die Literaturvorschrift 77 wurde das Di-*tert*-butyl-dicarbonat (Sigma) in 50 ml Dioxan gelöst und unter Rühren über ca. 3 h zu einer Lösung aus dem entsprechenden Diaminoalkan in 50 ml Dioxan zugetropft. Nach Beenden des Zutropfens wird die weiße, trübe Lösung für weitere 48 h gerührt. Der Feststoff wird abfiltriert, mit Ether gewaschen und verworfen. Das Filtrat wird auf die Hälfte eingeengt. Nach Zugabe von 200 ml H₂O fällt erneut etwas weißer Feststoff aus, das wiederum abfiltriert und verworfen wird. Aus dem Filtrat wird viermal mit 100 ml CH₂Cl₂ das gewünschte Produkt extrahiert. Die organischen Phasen werden mit destilliertem H₂O gewaschen und mit MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels bleibt ein gelbliches Öl zurück.

Synthese von (2-Amino-ethyl)-carbaminsäure-*tert*-butylester^[77]

Ansatz: 10,0 g (166,1 mmol) 1,2-Ethylendiamin
4,6 g (21,1 mmol) Di-*tert*-butyl-dicarbonat

Ausbeute: 2,3 g (14,6 mmol; 69 %)

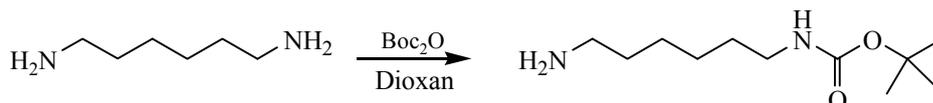


¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,19 (s, 2 H, NH₂), 1,49 (s, 9 H, H 5), 2,77 (t, 2 H, H 1), 3,19 (t, 2 H, H 2), 4,85 (s, 1 H, NH).

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 28,4 (C 5), 41,9 (C 1), 43,4 (C 2) 79,0 (C 4), 156,1 (C 3).

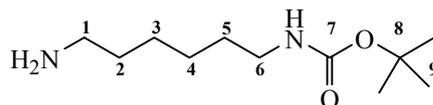
MS-ESI: m/z C₇H₁₆N₂O₂

[M+H]⁺ berechnet: 161,12
gefunden: 161,12

Synthese von (6-Amino-hexyl)-carbaminsäure-*tert*-butylester^[77]

Ansatz: 18,9 g (166,1 mmol) 1,6-Diaminohexan
4,7 g (21,1 mmol) Di-*tert*-butyl-dicarbonat

Ausbeute: 4,0 g (18,8 mmol; 85 %)



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,05 (s, 2 H, NH₂) 1,12 (q, 2 H, H 4),

1,27 (m, 4 H, H 2, H 3), 1,38 (s, 9 H, H 9), 1,43 (m, 2 H, H 5), 2,62 (t, 2 H, H 1), 3,05 (q, 2 H, H 6), 4,66 (t, 1 H, NH).

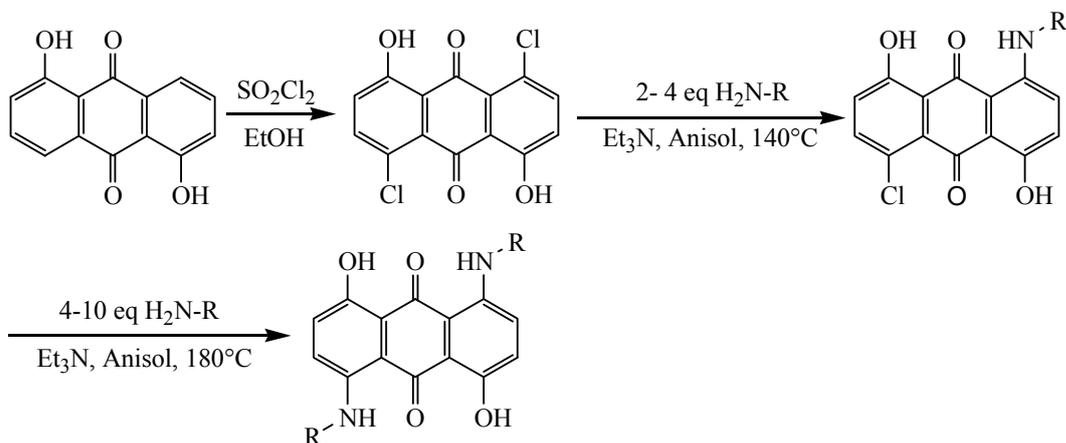
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 26,4 (C 4), 26,5 (C 3), 28,3 (C 9), 29,9 (C 5), 33,6 (C 2), 40,4 (C 6), 42,0 (C 1), 78,8 (C 8), 155,9 (C 7)

MS-ESI: m/z $\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$

$[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet: 217,19

gefunden: 216,12

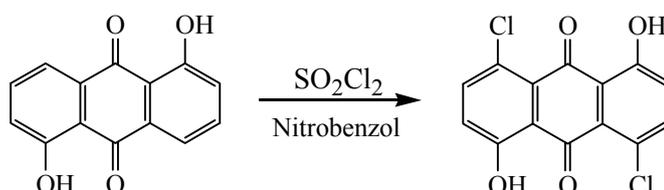
5.2.2 Allgemeine Syntheseroute zur Darstellung der Aminoanthrachinon-Farbstoffe



Im ersten Schritt der Reaktion wird Anthrarufin mit Sulfurylchlorid (SO_2Cl_2) umgesetzt. Das durch diese elektrophile aromatische Substitution erhaltene 1,5-Dichloro-4,8-dihydroxy-anthrachinon (Dichloroanthrarufin) wird in einem zweiten Schritt mit verschiedenen Aminen R-NH_2 über eine nukleophile aromatische Substitution zu den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen umgesetzt. Es entstehen überwiegend bei höherer Temperatur monosubstituierte Produkte. Mit einer weiteren nukleophilen Substitution erhält man die disubstituierten Farbstoffe. Eventuell enthaltene Boc-Schutzgruppen werden mit Trifluoressigsäure abgespalten.^[78]

5.2.3 Darstellung von Dichloroanthrarufin

Synthese von 1,5-Dichloro-4,8-dihydroxy-anthrachinon^[79]



Ansatz: 10,0 g (42,0 mmol) 1,5-Dihydroxyanthrachinon
20,0 ml (120,0 mmol) Sulfurylchlorid

In Anlehnung an die Literaturvorschrift 79 wird 1,5-Dihydroxyanthrachinon in 200 ml Nitrobenzol gelöst. Zu der entstehenden Suspension wird unter Rühren Sulfurylchlorid zugetropft und auf 170 °C erhitzt. Nach 1 h erfolgt erneut eine Zugabe von Sulfurylchlorid. Nach 18 h Erhitzen unter Rückfluss verfärbt sich die Lösung dunkelrot. Beim Abkühlen fällt ein dunkelroter Feststoff aus. Dieser wird abfiltriert und mit 150 ml Methanol und 100 ml Diethylether gewaschen. Das Produkt wird in Anisol umkristallisiert, wieder abfiltriert, mit etwas Ether gewaschen und als orangefarbener, kristalliner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 6,6 g (21,0 mmol; 51 %)

Elementaranalyse:

Berechnet: C 54,40 %, H 1,96 %,
Gefunden: C 54,68 %, H 2,05 %,

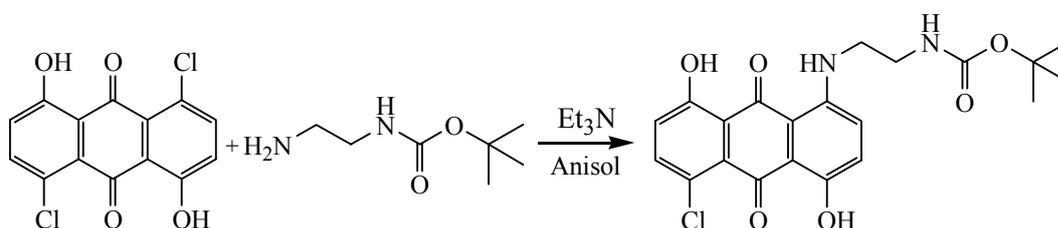
5.2.4 Allgemeine Synthesevorschrift zur Darstellung der mono-substituierten Aminoanthrachinon-Farbstoffe

Ansatz: 1 äq Dichloroanthrarufin
2-4 äq Amin
2-4 äq Triethylamin

Dichloroanthrarufin und die entsprechenden Amine werden in 100 ml Anisol gelöst. Es wird Triethylamin zugegeben und 18 h unter Stickstoff-Atmosphäre bei 140 °C gerührt. Nach dem Abkühlen der Reaktionslösung wird Anisol im Vakuum

entfernt. Es bleiben schwarze Feststoffe zurück. Die Feststoffe werden in CH_2Cl_2 gelöst und je nach Produkt säulenchromatographisch (SiO_2 , Ø 0,063-0,2) zwei- bis dreimal gereinigt. Die Produkte werden durch einen Lösungsmittelgemisch aus CH_2Cl_2 und MeOH eluiert. Die blauen Fraktionen werden gesammelt und das Lösungsmittelgemisch entfernt. Es bleiben dunkelblaue Feststoffe zurück.

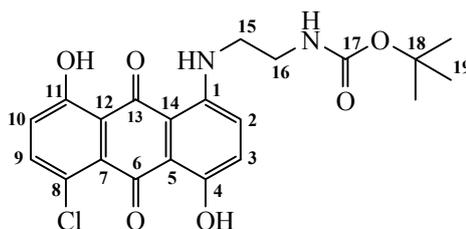
Synthese von 1-Chloro-5-(2-tert-Butoxycarbonylamino-ethylamino)-4,8-dihydroxy-anthrachinon (1)



Ansatz: 1,4 g (4,5 mmol) Dichloroanthrarufin
 1,4 g (9,0 mmol) (2-Amino-ethyl)-carbaminsäure-*tert*-butylester
 0,9 g (9,0 mmol) Triethylamin

SiO₂-Säule: (0-5% steigend MeOH/CH₂Cl₂)

Ausbeute: 0,7 g (1,6 mmol; 56 %)



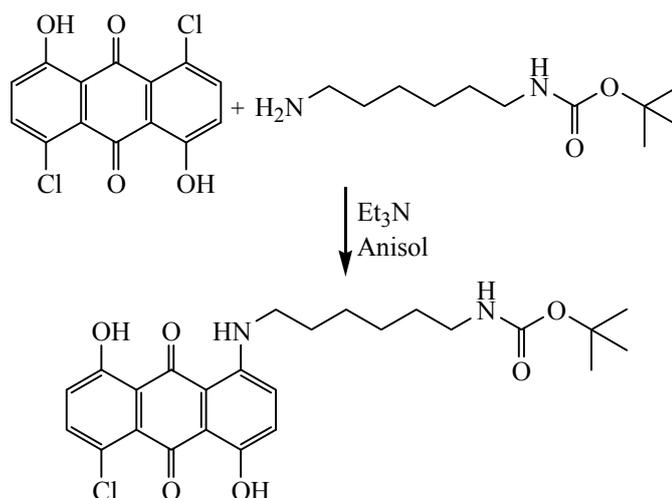
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,45 (s, 9 H, H 19), 3,45 (m, 2 H, H 16), 3,68 (m, 2 H, H 15), 4,92 (s, 1 H, NHCO), 7,20 (m, 4 H, H 2, H 3, H 9, H 10), 9,80 (t, 1 H, NH), beide OH-Gruppen sind nicht sichtbar.

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 28,6 (C 19), 42,5 (C 15), 44,4 (C 16) 80,0 (C 18), 122,3 (C 2), 123,5 (C 3), 125,4 (C 14), 126,9 (C 5), 129,1 (C 7), 130,1 (C 10), 133,3 (C 12), 134,5 (C 1), 137,5 (C 9), 148,6 (C 8), 155,1 (C 17), 155,9 (C 4), 162,1 (C 11), 185,0 und 185,4 (C 13/C 6).

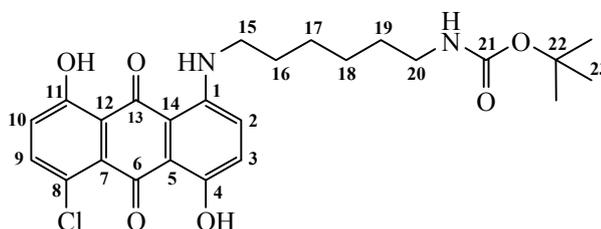
MS-FAB: $m/z_{C_{21}H_{21}N_2O_6Cl}$

[M] berechnet: 432,1

gefunden: 432,3

Synthese von 1-Chloro-5-(6-tert-Butoxycarbonylamino-hexylamino)-4,8-dihydroxy-anthrachinon (2)

Ansatz: 0,7 g (2,3 mmol) Dichloroanthrarufin
 1,0 g (4,6 mmol) (6-Amino-hexyl)-carbaminsäure-
tert-butylester
 0,5 g (5 mmol) Triethylamin

SiO₂-Säule: (0,1 % MeOH/CH₂Cl₂)**Ausbeute:** 0,75 g (1,6 mmol; 68 %)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,44-1,75 (m, 17 H, H 16, H 17, H 18, H 19, H 23), 3,13 (q, 2 H, H 20), 3,28 (q, 2 H, H 15), 4,57 (s, 1 H, NHCO), 7,05 (d, 1 H, H 2), 7,10 (d, 1 H, H 3), 7,46 (d, 1 H, H 10), 7,51 (d, 1 H, H 9), 9,74 (t,

1 H, NH), beide OH-Gruppen sind nicht sichtbar.

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 26,3 (C 18), 26,7 (C 17), 27,4 (C 23), 28,6 (C 19), 34,1 (C 16), 39,8 (C 20), 42,5 (C 15), 80,0 (C 22), 123,4 (C 2), 124,1 (C 3), 125,4 (C 14), 127,5 (C 5), 129,3 (C 7), 130,0 (C 10), 132,3 (C 12), 134,5 (C 1), 138,5 (C 9), 147,6 (C 8), 155,5 (C 21), 156,4 (C 4), 161,1 (C 11), 185,2 und 185,4 (C 13/C 6).

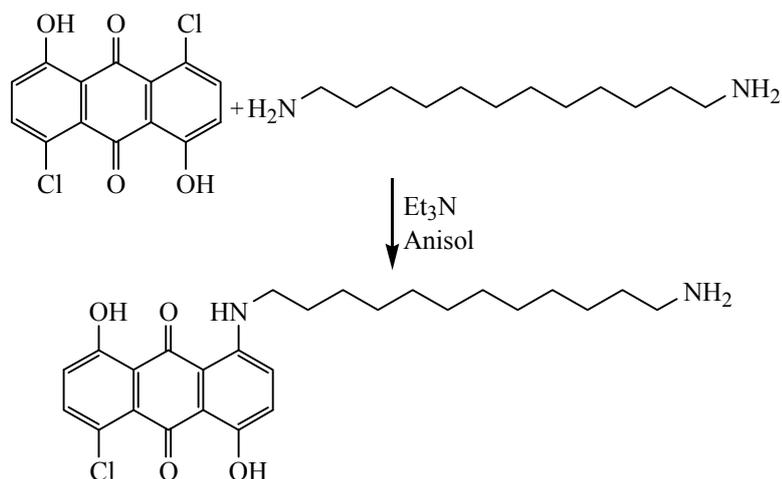
MS-FAB: $m/z\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_6\text{Cl}$

[M] berechnet: 488,17

gefunden: 487,90

Synthese von 1-(12-Amino-dodecylamino)-5-chloro-4,8-dihydroxy-anthrachinon

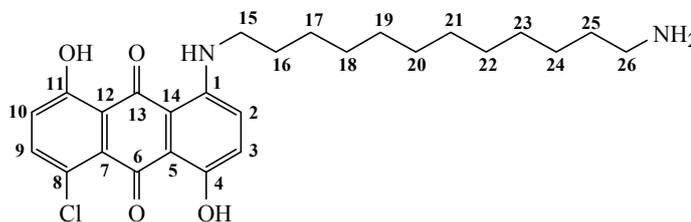
(3)



Ansatz: 0,7 g (2,3 mmol) Dichloroanthrarufin
 1,8 g (9,2 mmol) 1,12-Diaminododecan
 1,0 g (9 mmol) Triethylamin

SiO₂-Säule: (0-10 % steigend MeOH/3% DEA/ CH_2Cl_2)

Ausbeute: 0,5 g (1,0 mmol; 45 %)



¹H-NMR (200 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 1,39-1,72 (m, 20 H, H 16-H 25), 2,92 (t, 2 H, H 26), 3,38 (t, 2 H, H 15), 7,05 (d, 1 H, H 2), 7,13 (d, 1 H, H 3), 7,48 (d, 1 H, H 10), 7,60 (d, 1 H, H 9), beide OH-Gruppen und NH-Gruppe sind nicht sichtbar.

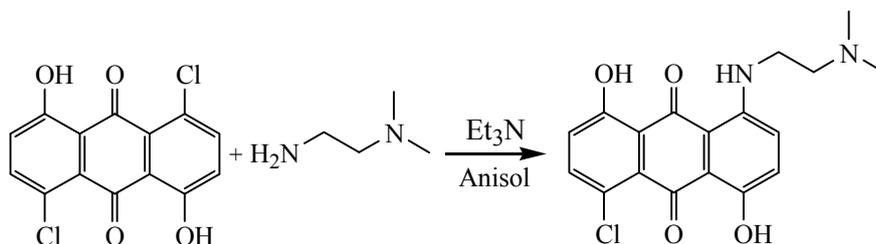
MS-ESI: m/z C₂₆H₃₃N₂O₄Cl

[M+H]⁺ berechnet: 473,22
gefunden: 473,22

HR-ESI: m/z C₂₆H₃₃N₂O₄Cl

[M+H]⁺ berechnet: 473,2200
gefunden: 473,2207

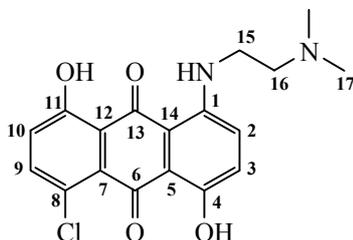
Synthese von 1-Chloro-5-(2-dimethylamino-ethylamino)-4,8-dihydroxy-anthra-
chinon (4)



Ansatz: 0,7 g (2,3 mmol) Dichloroanthrarufin
0,4 g (4,6 mmol) *N,N*-Dimethylethylendiamin
0,5 g (5 mmol) Triethylamin

SiO₂-Säule: (1 %steigend MeOH/CH₂Cl₂)

Ausbeute: 0,4 g (1,2 mmol; 52 %)



$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 2,37 (s, 6 H, H 17), 2,63 (t, 2 H, H 16), 3,39 (q, 2 H, H 15), 7,14 (d, 1 H, H 2), 7,16 (d, 1 H, H 3), 7,50 (d, 1 H, H 10), 7,53 (d, 1 H, H 9), 9,80 (t, 1 H, NH), beide OH-Gruppen sind nicht sichtbar.

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 40,1 (C 17), 44,5 (C 15), 56,9 (C 16), 122,6 (C 2), 123,5 (C 3), 124,5 (C 14), 127,7 (C 5), 129,3 (C 7), 129,3 (C 10), 129,9 (C 12), 133,7 (C 1), 137,4 (C 9), 146,5 (C 8), 156,3 (C 4), 160,7 (C 11), 185,0 und 185,6 (C 13/C 6).

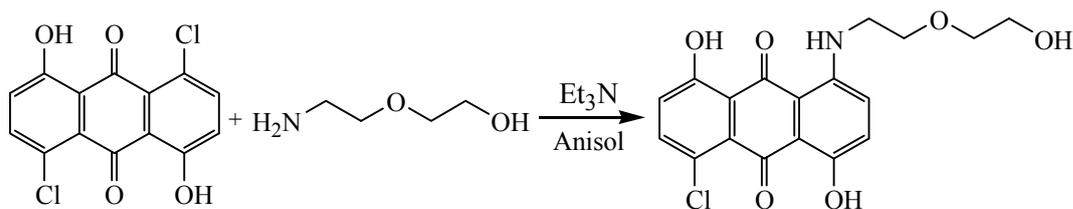
MS-ESI: m/z $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4\text{Cl}$

$[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet: 361,1
gefunden: 361,1

HR-ESI: m/z $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4\text{Cl}$

$[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet: 361,1000
gefunden: 361,1042

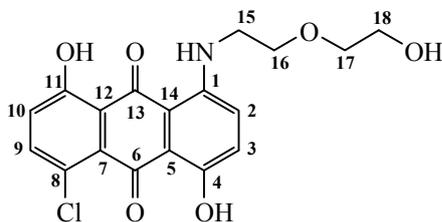
Synthese von 1-Chloro-4,8-dihydroxy-5-[2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamino]-anthrachinon (5)



Ansatz: 0,7 g (2,3 mmol) Dichloroanthrarufin
1,0 g (9,3 mmol) 2-(2-Aminoethoxy)-ethanol
1,0 g (9,0 mmol) Triethylamin

SiO₂-Säule: (1 % steigend MeOH/CH₂Cl₂)

Ausbeute: 0,34 g (0,9 mmol; 40 %)



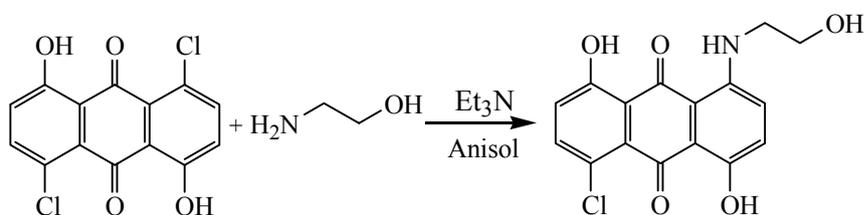
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3,38 (q, 2 H, H 16), 3,58 (t, 2 H, H 17), 3,77 (m, 4 H, H 15, H 18), 6,80 (d, 1 H, H 2), 6,92 (d, 1 H, H 3), 7,34 (d, 1 H, H 10), 7,55 (d, 1 H, H 9), 9,76 (t, 1 H, NH), beide OH-Gruppen sind nicht sichtbar.

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 61,9 (C 15), 69,3 (C 18), 72,4 (C 16), 72,8 (C 17), 122,4 (C 2), 123,7 (C 3), 124,5 (C 14), 126,7 (C 5), 130,1 (C 7) 131,3 (C 10), 131,9 (C 12), 133,5 (C 1), 138,2 (C 9), 145,9 (C 8), 156,5 (C 4), 161,2 (C 11), 185,2 und 185,5 (C 13/C 6).

MS-ESI: m/z C₁₈H₁₆N₁O₆Cl

[M+H]⁺ berechnet: 376,1
gefunden: 376,1

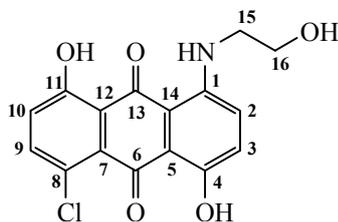
Synthese von 1-Chloro-4,8-dihydroxy-5-(2-hydroxyethylamino)-anthrachinon (6)



Ansatz: 0,7 g (2,3 mmol) Dichloroanthrarufin
0,3 g (5,0 mmol) 2-Aminoethanol
0,5 g (5,0 mmol) Triethylamin

SiO₂-Säule: (1-5 % steigend MeOH/CH₂Cl₂)

Ausbeute: 0,5 g (1,5 mmol; 65 %)



¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3,25 (q, 2 H, H 15), 3,80 (t, 2 H, H 16), 6,85 (d, 1 H, H 2), 6,90 (d, 1 H, H 3), 7,25 (d, 1 H, H 10), 7,44 (d, 1 H, H 9), 9,8 (t, 1 H, NH), beide OH-Gruppen sind nicht sichtbar.

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 57,4 (C 15), 66,5 (C 16), 122,6 (C 2), 123,5 (C 3), 125,1 (C 14), 126,4 (C 5), 129,8 (C 7), 130,3 (C 10), 131,5 (C 12), 133,6 (C 1), 138,6 (C 9), 146,4 (C 8), 156,3 (C 4), 161,4 (C 11), 185,0 und 185,5 (C 13/C 6).

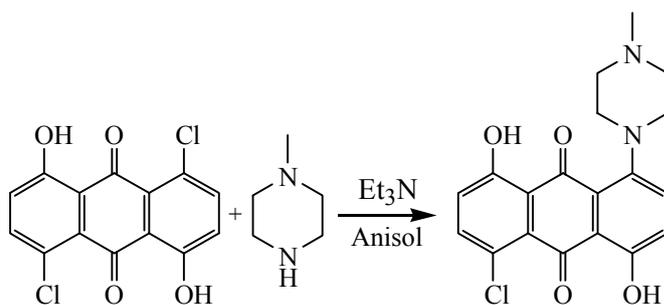
MS-ESI: m/z C₁₆H₁₂N₁O₅Cl

[M+H]⁺ berechnet: 332,03
gefunden: 332,05

HR-ESI: m/z C₁₆H₁₂N₁O₅Cl

[M+H]⁺ berechnet: 332,0300
gefunden: 332,0310

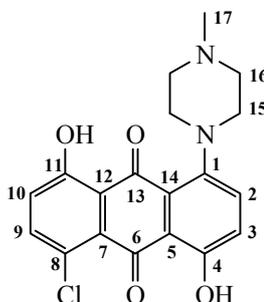
Synthese von 1-Chloro-4,8-dihydroxy-5-(4-methyl-piperazin-1-yl)-anthrachinon (7)



Ansatz: 0,7 g (2,3 mmol) Dichloroanthrarufin
0,9 g (9,2 mmol) 1-Methylpiperazin
1,0 g (9,0 mmol) Triethylamin

SiO₂-Säule: (5 % MeOH/CH₂Cl₂)

Ausbeute: 0,45 g (1,2 mmol; 52 %)



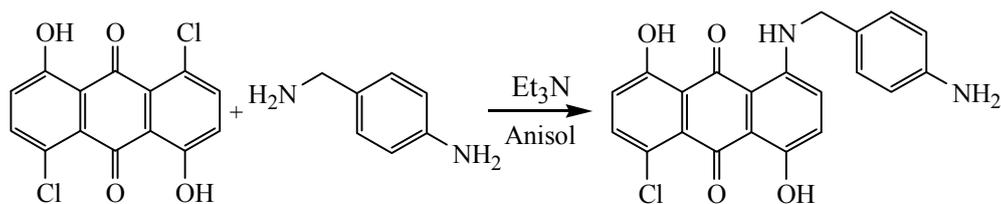
¹H-NMR (200 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 2,33 (s, 3 H, H 17), 2,64 (t, 4 H, H 16), 3,67 (t, 4 H, H 15), 6,84 (d, 1 H, H 2), 6,90 (d, 1 H, H 3), 7,32 (d, 1 H, H 10), 7,55 (d, 1 H, H 9), 9,74 (t, 1 H, NH), beide OH-Gruppen sind nicht sichtbar.

¹³C-NMR (50 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 43,8 (C 17), 54,2 (C 15, C 16), 122,2 (C 2), 123,0 (C 3), 124,3 (C 14), 127,5 (C 5), 129,2 (C 7), 129,5 (C 10), 130,1 (C 12), 132,9 (C 1), 137,1 (C 9), 146,7 (C 8), 156,5 (C 4), 161,3 (C 11), 185,5 und 186,0 (C 13/C 6).

MS-ESI: m/z C₁₉H₁₇N₂O₄Cl

[M+H]⁺ berechnet: 373,10
gefunden: 373,13

Synthese von 1-(4-Amino-benzylamino)-5-chloro-4,8-dihydroxy-anthrachinon (8)

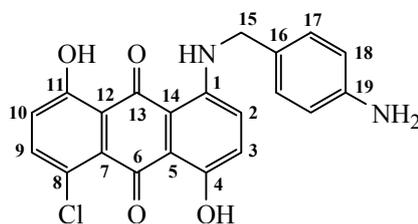


Ansatz:

0,7 g	(2,3 mmol)	Dichloroanthrarufin
0,6 g	(4,6 mmol)	4-Aminobenzylamin
0,5 g	(5,0 mmol)	Triethylamin

SiO₂-Säule: (5 % Aceton/CH₂Cl₂)

Ausbeute: 0,5 g (0,9 mmol; 55 %)



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 4,49 (d, 2 H, H 15), 5,08 (s, 2 H, NH_2), 6,56 (d, 2 H, H 18), 7,06 (d, 1 H, H 17), 7,29 (m, 2 H, H 2, H 3), 7,47 (d, 1 H, H 10), 7,69 (d, 1 H, H 9), 10,05 (s, 1 H, NH), beide OH-Gruppen sind nicht sichtbar.

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 56,4 (C 15), 115,6 (C 18), 122,4 (C 2), 123,2 (C 3), 124,5 (C 14), 127,0 (C 17), 127,5 (C 5), 129,2 (C 7), 129,7 (C 10), 130,3 (C 12), 132,5 (C 1), 132,7 (C 16), 137,4 (C 9), 145,0 (C 19), 146,5 (C 8), 155,9 (C 4), 161,2 (C 11), 185,4 und 185,7 (C 13/C 6).

MS-ESI: m/z $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_4\text{Cl}$

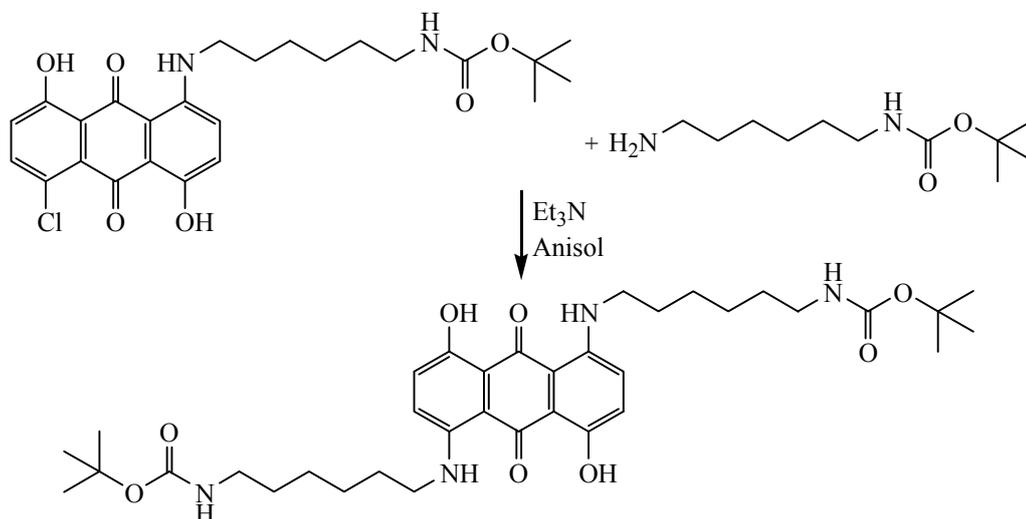
$[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet: 393,06
gefunden: 393,14

5.2.5 Allgemeine Synthesevorschrift zur Darstellung der Diaminoanthrachinone

Ansatz: 1 äq Anthrachinon
4-10 äq Amin
4-10 äq Triethylamin

Das Anthrachinon und die entsprechenden Amine werden in 100 ml Anisol gelöst. Es wird Triethylamin zugegeben und 18 h unter Stickstoff-Atmosphäre bei 180 °C gerührt. Nach dem Abkühlen der Reaktionslösung wird Anisol im Vakuum entfernt. Es bleiben schwarze Feststoffe zurück. Die Feststoffe werden in CH_2Cl_2 gelöst und säulenchromatographisch gereinigt. Die türkisfarbenen Fraktionen werden gesammelt und das Lösungsmittel entfernt. Es bleiben dunkelgrüne Feststoffe zurück.

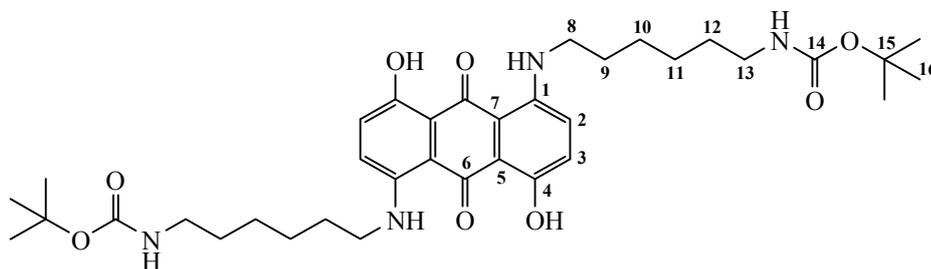
Synthese von 1,5-Bis-(6-*tert*-Butoxycarbonylamino-hexylamino)-4,8-dihydroxy-anthrachinon (9)



Ansatz:	0,5 g	(1,0 mmol)	1-Chloro-5-(6- <i>tert</i> -Butoxy-carbonylamino-hexylamino)-4,8-dihydroxy-anthrachinon
	2,16 g	(10,0 mmol)	(6-Amino-hexyl)-carbaminsäure- <i>tert</i> -butylester
	1 g	(10,0 mmol)	Triethylamin

SiO₂-Säule: (0,5 % MeOH/CH₂Cl₂)

Ausbeute: 0,25 g (0,4 mmol; 37 %)



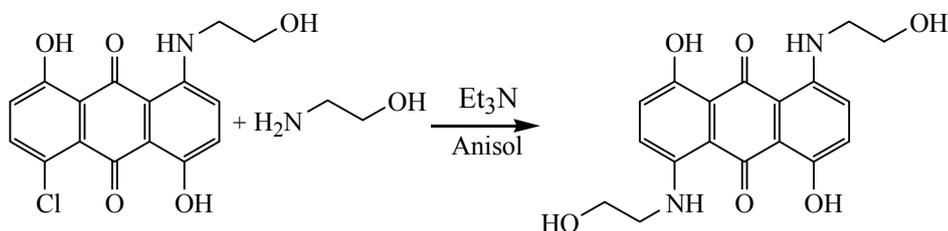
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,44-1,79 (m, 34 H, H 9, H 10, H 11, H 12, H 16), 3,23 (q, 4 H, H 13), 3,45 (q, 4 H, H 8), 4,25 (s, 2 H, NHCO), 7,09 (d, 4 H, H 2, H 3), 9,8 (t, 2 H, NH), beide OH-Gruppen sind nicht sichtbar.

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 26,4 (C 11), 26,8 (C 10), 27,0 (C 16), 28,2 (C 12), 33,9 (C 9), 40,1 (C 13), 42,3 (C 8), 79,6 (C 15), 121,5 (C 2), 122,5 (C 3), 128,3 (C 5), 129,3 (C 7), 137,5 (C 1), 154,3 (C 14), 161,5 (C 4), 186,4 (C 6).

MS-FAB: $m/z\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_8$

[M] berechnet: 668,38
gefunden: 668,20

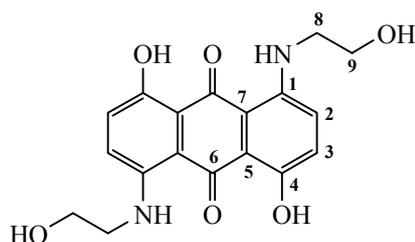
Synthese von 1,5-Dihydroxy-4,8-bis-(2-hydroxy-ethylamino)-anthrachinon (10)



Ansatz: 0,5 g (1,5 mmol) 1-Chloro-4,8-dihydroxy-5-(2-hydroxy-ethylamino)-anthrachinon
0,37 g (6,0 mmol) 2-Aminoethanol
0,6 g (6,0 mmol) Triethylamin

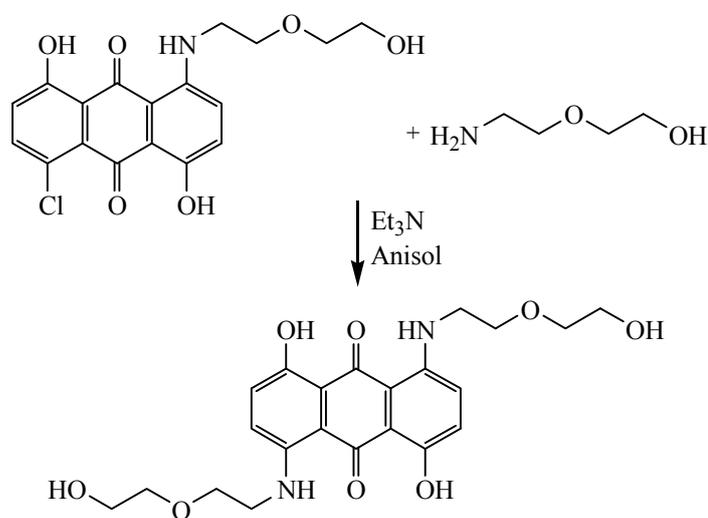
SiO₂-Säule: (5-10 % MeOH/CH₂Cl₂)

Ausbeute: 0,23 g (0,65 mmol; 43 %)

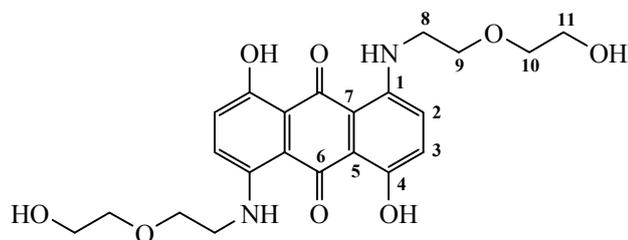


$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 3,26 (q, 4 H, H 8), 3,65 (t, 4 H, H 9), 6,92 (d, 2 H, H 2), 7,05 (d, 2 H, H 3), NH- und die OH-Gruppen sind nicht sichtbar.

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 57,3 (C 8), 66,0 (C 9), , 122,4 (C 2), 122,8 (C 3), 128,0 (C 5), 129,1 (C 7), 137,5 (C 1), 160,9 (C 4), 186,0 (C 6).

MS-ESI: m/z C₁₈H₁₈N₂O₆[M+H]⁺ berechnet: 357,11
gefunden: 357,10**HR-ESI:** m/z C₁₈H₁₈N₂O₆[M+H]⁺ berechnet: 357,1100
gefunden: 357,1125Synthese von 1,5-Dihydroxy-4,8-bis-[2-(2-hydroxy-ethoxy)-ethylamino]-anthrachinon (11)

Ansatz: 0,5 g (1,3 mmol) 1-Chloro-4,8-dihydroxy-5-[2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamino]-anthrachinon
 0,56 g (5,3 mmol) 2-(2-Aminoethoxy)-ethanol
 0,6 g (6,0 mmol) Triethylamin

SiO₂-Säule: (5 % MeOH/CH₂Cl₂)**Ausbeute:** 0,15 g (0,3 mmol; 26 %)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 3,40 (q, 4 H, H 9), 3,65 (t, 4 H, H 10), 3,76 (m, 8 H, H 8, H 11), 6,82 (d, 2 H, H 2), 6,95 (d, 2 H, H 3), NH- und die OH-Gruppen sind nicht sichtbar.

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 61,8 (C 8), 69,3 (C 11), 72,6 (C 9), 72,8 (C 10), 122,2 (C 2), 122,6 (C 3), 127,3 (C 5), 129,5 (C 7), 135,5 (C 1), 156,3 (C 4), 185,6 (C 6).

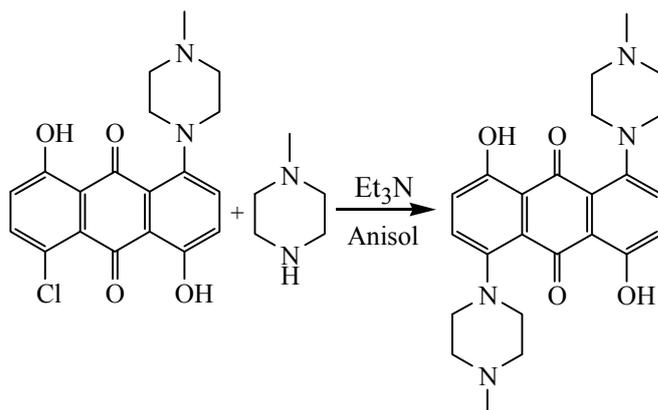
MS-ESI: m/z $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_8$

$[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet: 445,16
gefunden: 445,16

HR-ESI: m/z $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_8$

$[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet: 445,1600
gefunden: 445,1617

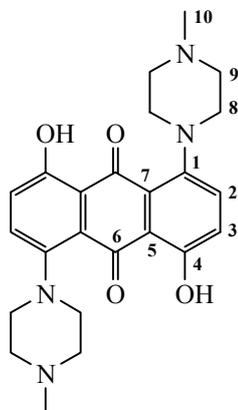
Synthese von 1,5-Dihydroxy-4,8-bis-(4-methyl-piperazin-1-yl)-anthrachinon (**12**)



Ansatz: 0,5 g (1,3 mmol) 1-Chloro-4,8-dihydroxy-5-(4-methyl-piperazin-1-yl)-anthrachinon
1,0 g (10,3 mmol) 1-Methylpiperazin
1,0 g (10,0 mmol) Triethylamin

SiO₂-Säule: (1 % MeOH/ CH_2Cl_2)

Ausbeute: 0,18 g (0,4 mmol; 33 %)



¹H-NMR (200 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 2,30 (s, 6 H, H 10), 2,63 (t, 8 H, H 9), 3,65 (t, 8 H, H 8), 6,92 (d, 2 H, H 2), 7,10 (d, 2 H, H 3), die OH-Gruppen sind nicht sichtbar.

¹³C-NMR (50 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 43,6 (C 10), 54,7 (C 8, C 9), 122,0 (C 2), 122,4 (C 3), 127,1 (C 5), 129,3 (C 7), 136,5 (C 1), 156,0 (C 4), 185,7 (C 6).

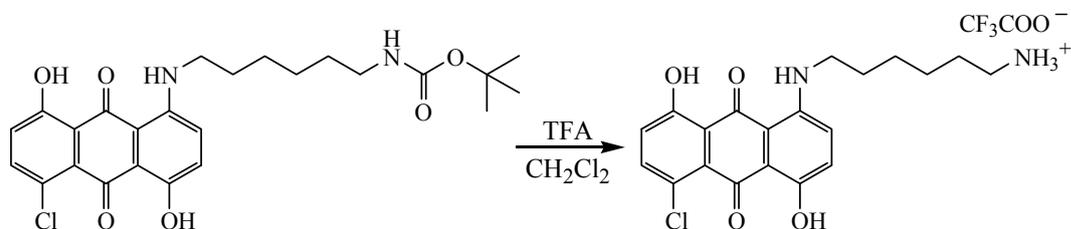
MS-FAB: m/z C₂₄H₂₈N₄O₄ [M] berechnet: 436,2
gefunden: 436,1

HR-ESI: m/z C₂₄H₂₈N₄O₄ [M+H]⁺ berechnet: 437,2200
gefunden: 437,2363

5.2.6 Allgemeine Synthesevorschrift zur Entfernung der Boc-Schutzgruppen

Ansatz: 1 äq Boc-geschütztes Anthrachinon
0,5 ml Trifluoressigsäure

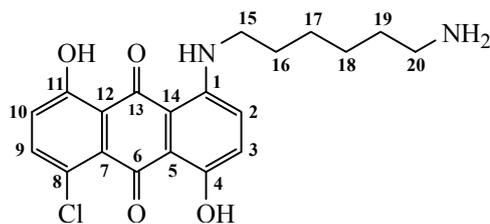
Zu einer blauen Lösung bestehend aus Boc-geschütztem Anthrachinon in CH₂Cl₂ wird TFA bei RT getropft. Diese Reaktionslösung wird 4.5 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird im Kühlschrank umkristallisiert. Der entstandene Niederschlag wird filtriert und im Vakuum getrocknet. Es werden dunkelblaue Feststoffe für die monosubstituierten Anthrachinone oder dunkelgrüne Feststoffe für die disubstituierten Anthrachinone erhalten.

Synthese von 1-(6-Amino-hexylamino)-5-chloro-4,8-dihydroxy-anthrachinon (13)

Ansatz: 0,1 g (0,2 mmol) 1-Chloro-5-(6-*tert*-Butoxycarbonyl-amino-hexylamino)-4,8-dihydroxy-anthrachinon
 1,0 ml Trifluoressigsäure

Kristallisation: Anisol

Ausbeute: 0,08 g (1,7 mmol; 86 %)



¹H-NMR (200 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 1,39-1,64 (m, 8 H, H 16, H 17, H 18, H 19), 2,80 (t, 2 H, H 20), 3,24 (t, 2 H, H 15), 7,03 (d, 1 H, H 2), 7,08 (d, 1 H, H 3), 7,42 (d, 1 H, H 10), 7,65 (d, 1 H, H 9), NH- und die OH-Gruppen sind nicht sichtbar.

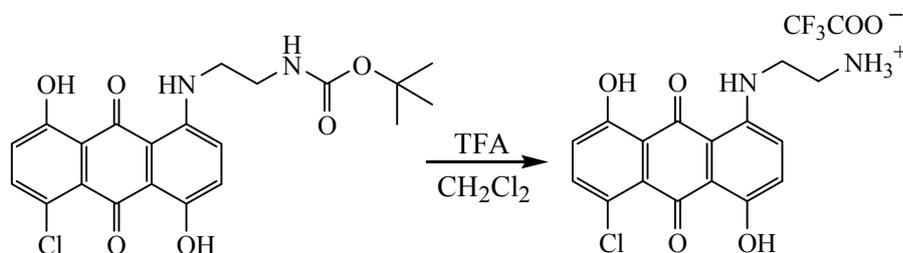
¹³C-NMR (50 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 26,0 (C 18), 26,4 (C 17), 27,2 (C 16), 28,9 (C 19), 39,4 (C 20), 42,7 (C 15), 123,5 (C 2), 124,3 (C 3), 125,5 (C 14), 27,9 (C 5), 129,5 (C 7), 130,0 (C 10), 132,5 (C 12), 134,6 (C 1), 138,5 (C 9), 147,6 (C 8), 156,7 (C 4), 161,3 (C 11), 185,0 und 185,6 (C 13/C 6).

MS-ESI: m/z C₂₀H₂₁N₂O₄Cl

[M+H]⁺ berechnet: 389,13
 gefunden: 389,13

HR-ESI: m/z C₂₀H₂₁N₂O₄Cl

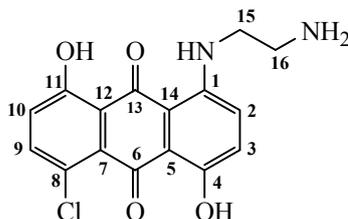
[M+H]⁺ berechnet: 389,1300
 gefunden: 389,1227

Synthese von 1-(2-Amino-ethylamino)-5-chloro-4,8-dihydroxy-anthrachinon (14)

Ansatz: 0,2 g (0,5 mmol) 1-Chloro-5-(2-*tert*-Butoxycarbonyl-amino-ethylamino)-4,8-dihydroxy-anthrachinon
1,0 ml Trifluoressigsäure

Kristallisation: MeOH mit Diethylether

Ausbeute: 0,14g (0,32 mmol; 64 %)



¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3,26 (t, 2 H, H 16), 3,79 (m, 2 H, H 15), 7,21 (d, 1 H, H 2), 7,29 (d, 1 H, H 3), 7,40 (d, 1 H, H 10), 7,66 (d, 1 H, H 9), NH- und die OH-Gruppen sind nicht sichtbar.

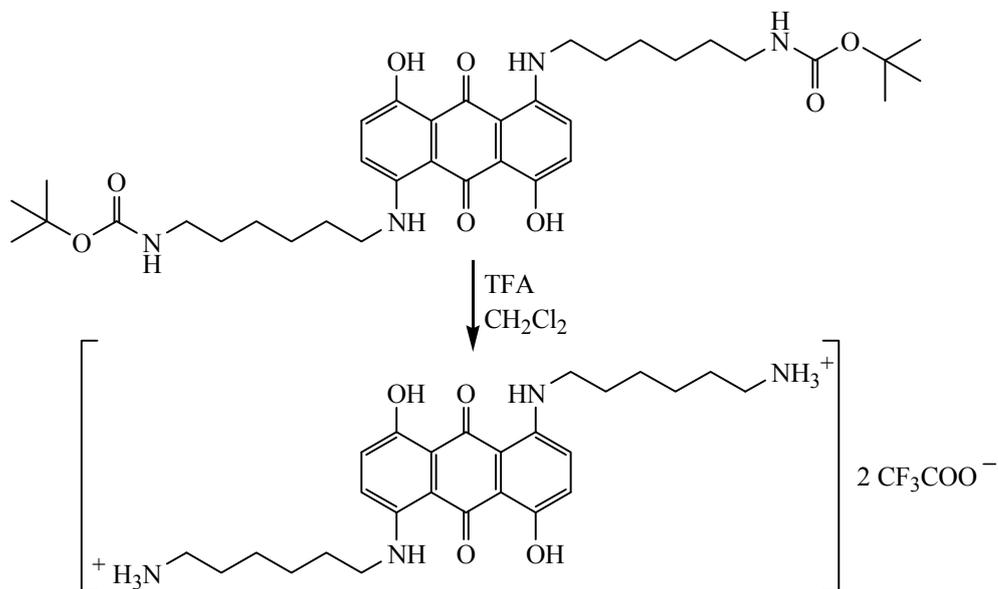
¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 42,4 (C 16), 47,4 (C 15), 122,0 (C 2), 123,7 (C 3), 125,4 (C 14), 127,0 (C 5), 129,0 (C 7), 130,3 (C 10), 133,1 (C 12), 135,1 (C 1), 136,5 (C 9), 148,4 (C 8), 156,0 (C 4), 161,5 (C 11), 185,1 und 185,5 (C 13/C 6).

MS-ESI: m/z C₁₆H₁₃N₂O₄Cl

[M+H]⁺ berechnet: 333,06
gefunden: 333,12

HR-ESI: m/z C₂₀H₂₁N₂O₄Cl

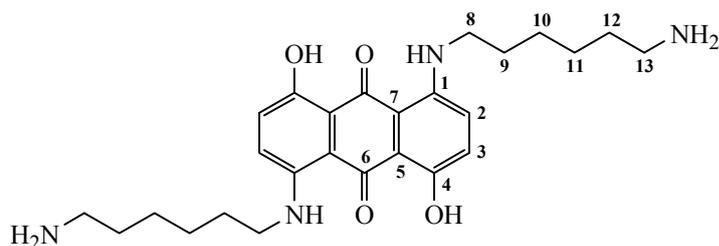
[M+H]⁺ berechnet: 333,0600
gefunden: 333,0628

Synthese von 1,5-Bis-(6-amino-hexylamino)-4,8-dihydroxy-anthrachinon (15)

Ansatz: 0,2 g (0,3 mmol) 1,5-bis-(6-*tert*-Butoxycarbonyl
amino-hexylamino)-4,8-dihydroxy-
anthrachinon
1,0 ml Trifluoressigsäure

Kristallisation: MeOH mit Diethylether

Ausbeute: 0,1 g (0,15 mmol; 50 %)



¹H-NMR (200 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 1,29 (m, 8 H, H 10, H 11), 1,54 (m, 4 H, H 9), 1,71 (m, 4 H, H 12), 2,95 (t, 4 H, H 13), 3,32 (q, 4 H, H 8), 7,09 (s, 4 H, H 2, H 3), NH- und die OH-Gruppen sind nicht sichtbar.

¹³C-NMR (50 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 26,3 (C 11), 26,7 (C 10), 27,4 (C 9), 28,9 (C 12), 39,0 (C 13), 42,5 (C 8), 121,7 (C 2), 122,7 (C 3), 128,1 (C 5), 129,0 (C 7), 137,7 (C 1), 161,4 (C 4), 186,0 (C 6).

MS-ESI: m/z C₂₆H₃₆N₄O₄

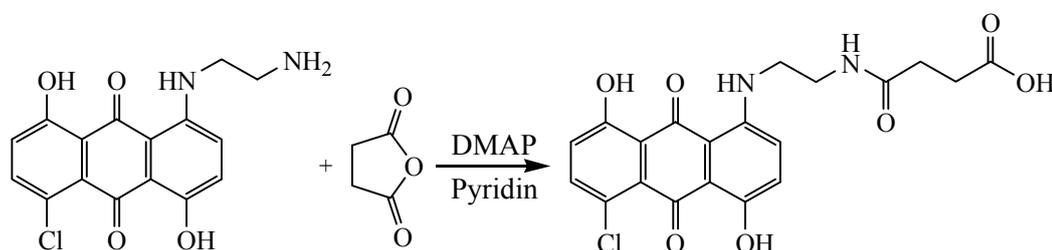
[M+H]⁺ berechnet: 469,28
gefunden: 469,28

HR-ESI: m/z C₂₆H₃₆N₄O₄

[M+H]⁺ berechnet: 469,2800
gefunden: 469,2809

5.2.7 Darstellung der aktivierten Aminoanthrachinone

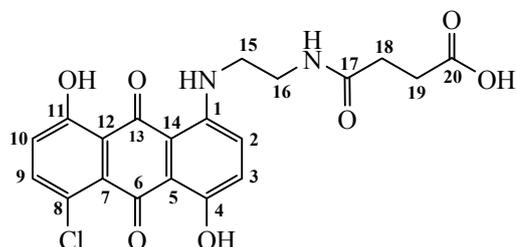
Synthese von 1-[2-(3-Carboxy-propionylamino)-ethylamino]-5-chloro-4,8-dihydroxy-anthrachinon



Ansatz: 0,10 g (0,23 mmol) Verbindung **14**
0,06 g (0,6 mmol) Bernsteinsäureanhydrid
0,03 g (2,0 mmol) *N,N*-Dimethyl-aminopyridin

Verbindung **14** sowie Bernsteinsäureanhydrid werden in 3 ml Pyridin gelöst. Unter Rühren wird zu der blauen Lösung *N,N*-Dimethyl-aminopyridin gegeben. Diese Reaktionslösung wird 18 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand in CH₂Cl₂ mit 10 % MeOH gelöst. Das Rohprodukt wird zweimal säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, 10 % MeOH/CH₂Cl₂). Die blauen Fraktionen werden gesammelt und das Lösungsmittel entfernt.

Ausbeute: 0,07 g (1,7 mmol; 75 %)



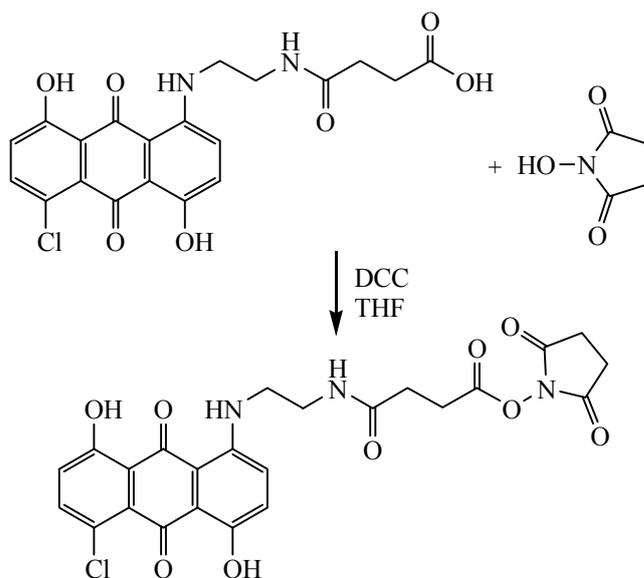
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2,37 (t, 2 H, H 18), 2,52 (t, 2 H, H 19), 3,46 (t, 2 H, H 16), 3,54 (m, 2 H, H 15), 7,08 (d, 1 H, H 2), 7,16 (d, 1 H, H 3), 7,46 (d, 1 H, H 10), 7,60 (d, 1 H, H 9), NH- und die OH-Gruppen sind nicht sichtbar.

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 28,5 (C 18), 32,5 (C 19), 42,3 (C 15), 45,4 (C 16), 122,0 (C 2), 123,4 (C 3), 125,7 (C 14), 127,2 (C 5), 129,4 (C 7), 130,1 (C 10), 133,5 (C 12), 134,9 (C 1), 137,2 (C 9), 147,9 (C 8), 155,9 (C 4), 162,1 (C 11), 172,4 (C 17), 177,0 (C 20), 185,3 und 186,4 (C 13/C 6).

MS-ESI: m/z C₂₀H₁₇N₂O₇Cl

[M+H]⁺ berechnet: 431,06
gefunden: 431,10

Synthese von 1-Chloro-4,8-dihydroxy-5-ethylamino-2-((2,5-dioxo-1-pyrrolidinyl)oxy)propanoic acid



Ansatz:	50 mg (0,12 mmol)	1-[2-(3-Carboxy-propionylamino)-ethylamino]-5-chloro-4,8-dihydroxy-anthrachinon
	17 mg (0,12 mmol)	<i>N</i> -Hydroxy-succinimid
	29 mg (0,12 mmol)	<i>N,N</i> -Dicyclohexylcarbodiimid

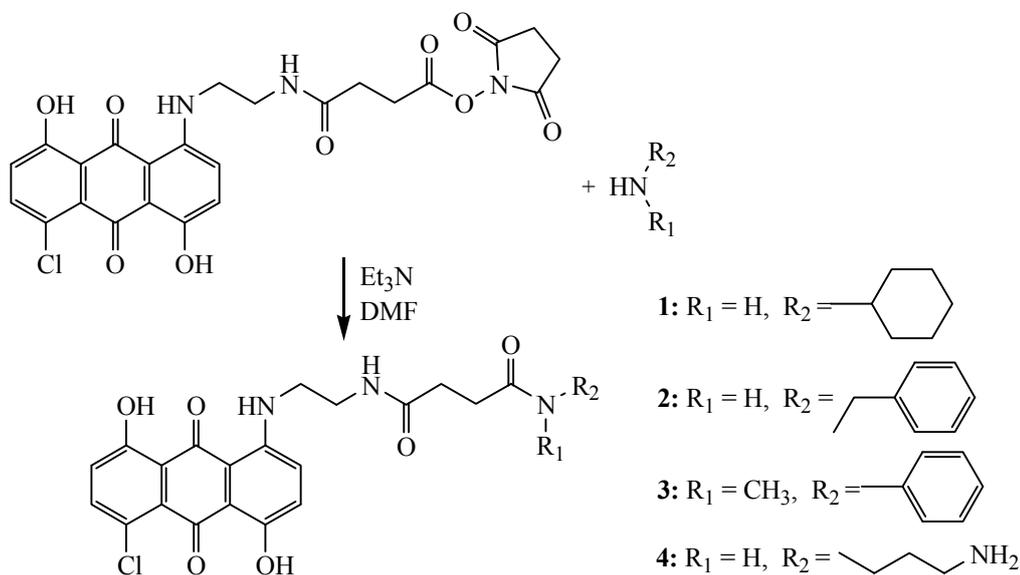
Das *N*-[2-(5-Chloro-4,8-dihydroxy-9,10-dioxo-9,10-dihydro-anthracen-1-ylamino)-ethyl]-succiniminsäure, das *N*-Hydroxy-succinimid und *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid werden in 30 ml THF gelöst und über Nacht bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wird filtriert und der weiße Rückstand verworfen. THF wird im Vakuum entfernt und es bleibt ein blauer Feststoff zurück.

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

MS-ESI: m/z C₂₄H₂₀N₃O₉Cl

[M+H]⁺ berechnet: 530,09
gefunden: 530,09

Reaktion von 1-Chloro-4,8-dihydroxy-5-{2-[3-(2,5-dioxo-pyrollidin-1-yloxy-carbonyl)-propionylamino]-ethylamino}-anthrachinon mit diversen Aminen



Ansatz: 5 mg (9,0 μmol) 1-Chloro-4,8-dihydroxy-5-{2-[3-(2,5-dioxo-pyrollidin-1-yloxy-carbonyl)-propionylamino]-ethylamino}-anthrachinon

1 äq (9,0 μ mol) Amin (**1, 2, 3, 4**)
 9 mg (90 μ mol) Triethylamin

Das Anthrachinon, die jeweiligen Amine (**1, 2, 3, 4**) und Triethylamin werden in 1,5 ml DMF gelöst und über Nacht bei RT gerührt. Nachweis der Produktbildung erfolgte über ESI-MS.

MS-ESI: m/z **1:** C₂₆H₂₆N₃O₆Cl

[M+H]⁺ berechnet: 514,17
 gefunden: 514,25

[M+H]⁻ berechnet: 512,15
 gefunden: 512,21

2: C₂₇H₂₃N₃O₆Cl

[M+H]⁺ berechnet: 522,14
 gefunden: 522,23

[M+H]⁻ berechnet: 520,05
 gefunden: 520,16

3: C₂₇H₂₃N₃O₆Cl

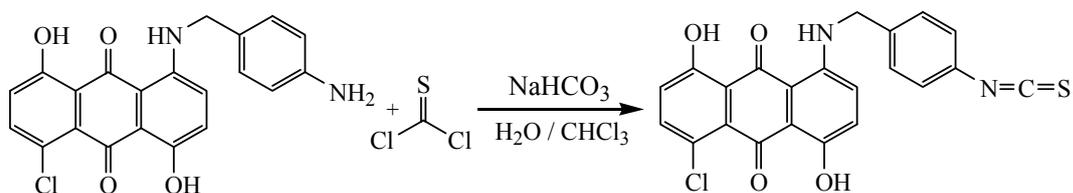
[M+H]⁻ berechnet: 520,12
 gefunden: 520,23

4: C₂₃H₂₄N₄O₆Cl

[M+H]⁺ berechnet: 489,15
 gefunden: 489,20

[M+H]⁻ berechnet: 487,13
 gefunden: 487,19

Synthese von 1-Chloro-4,8-dihydroxy-5-(-4-isothiocyanato-benzylamino)-anthrachinon



Ansatz: 0,1 g (1,2 mmol) Natriumhydrogencarbonat
 0,13 ml (1,8 mmol) Thiophosgen
 0,14 mg (0,34 mmol) 1-(4-Amino-benzylamino)-5-chloro-4,8-dihydroxy-anthrachinon

Natriumhydrogencarbonat wird in 2,5 ml H₂O gelöst. Zu der Lösung wird 1-(4-Amino-benzylamino)-5-chloro-4,8-dihydroxyanthracen-9,10-dion, gelöst in 2 ml Chloroform, zugegeben. Nach 15 min rühren unter Stickstoffatmosphäre wird Thiophosgen, gelöst in 1 ml CHCl₃, langsam über ein Septum zu der Reaktionslösung getropft. Nach einer weiteren Stunde rühren wird die Reaktionslösung mit 20 ml H₂O gewaschen. Die wässrige Phase wird zweimal mit jeweils 20 ml CHCl₃ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird in wenig Dichlormethan aufgenommen. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgt mittels Säulenchromatographie (Kieselgel, CH₂Cl₂). Die blauen Fraktionen werden gesammelt und das Lösungsmittel entfernt.

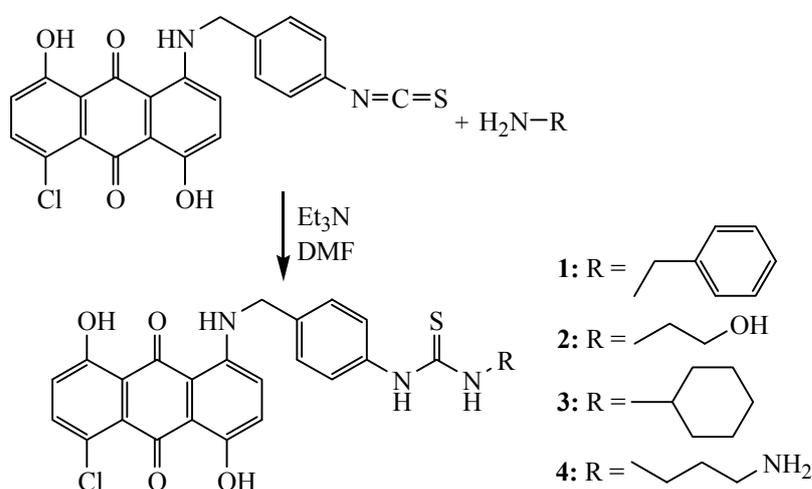
Ausbeute: 71 mg (0,17 mmol; 50 %)

MS-ESI: m/z C₂₂H₁₃N₂O₄SCl

[M+H]⁺ berechnet: 435,02

gefunden: 435,13

Synthese diverser 1-Chloro-4,8-dihydroxy-5-(-4-isothiocyanato-benzylamino)-anthrachinon-Konjugate



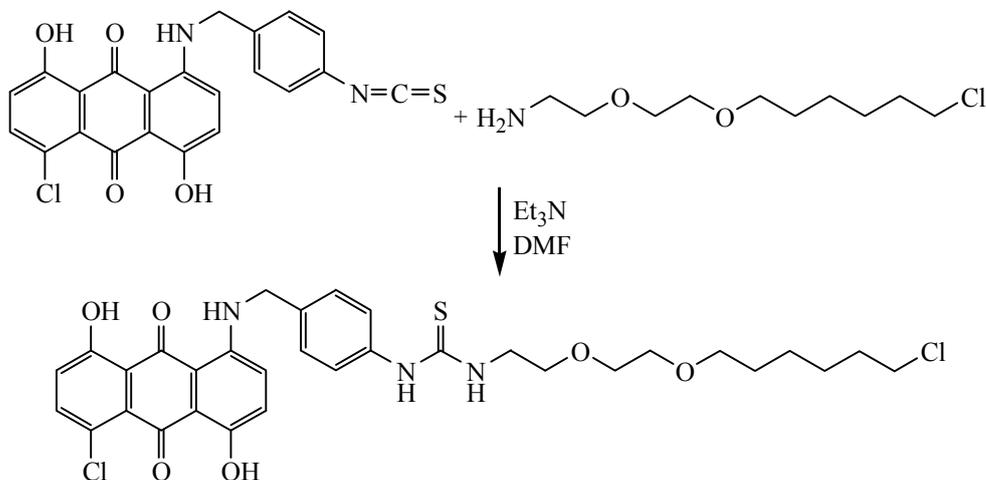
Ansatz: 1 mg (2 μmol) 1-Chloro-4,8-dihydroxy-5-(-4-isothiocyanato-benzylamino)-anthrachinon
 2 eq (4 μmol) Amin (**1, 2, 3, 4**)
 4 mg (40 μmol) Triethylamin

Das Anthrachinon, die jeweiligen Amine (**1**, **2**, **3**, **4**) und Triethylamin werden in 1 ml DMF gelöst und eine Stunde bei RT gerührt. Nachweis der Produktbildung erfolgte über ESI-MS.

MS-ESI: m/z 1: C ₂₉ H ₂₂ N ₃ O ₄ SCl	[M+H] ⁺ berechnet: 557,11 gefunden: 557,28
2: C ₂₄ H ₂₀ N ₃ O ₅ SCl	[M+H] ⁺ berechnet: 496,07 gefunden: 496,24
3: C ₂₈ H ₂₅ N ₃ O ₄ SCl	[M+H] ⁺ berechnet: 534,13 gefunden: 534,24
4: C ₂₅ H ₂₃ N ₄ O ₄ SCl	[M+H] ⁺ berechnet: 509,11 gefunden: 509,27

5.2.8 Darstellung des Halo Tag-Liganden

Synthese von 1-Chloro-5-[4-(3-{2-[2-(6-Chloro-hexyloxy)-ethoxy]-ethyl}-isothiocyanato)-benzylamino]-4,8-dihydroxy-anthrachinon (**16**)



Ansatz: 17,5 mg (40 μmol)	1-Chloro-4,8-dihydroxy-5-(4-isothio-
10,0 mg (40 μmol)	cyanato-benzylamino)-anthrachinon
4,0 mg (40 μmol)	2-(2-(6-Chlorohexyloxy)ethoxy)-
	ethanamin
	Triethylamin

Das Isothicyanat, 2-(2-(6-Chlorohexyloxy)ethoxy)-ethanamin, und Triethylamin werden in 2 ml DMF gelöst. Die Reaktionslösung wird für 2h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird in wenig Dichlormethan gelöst. Reinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie (Kieselgel, 5% MeOH / CH₂Cl₂). Die Produktfraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel entfernt.

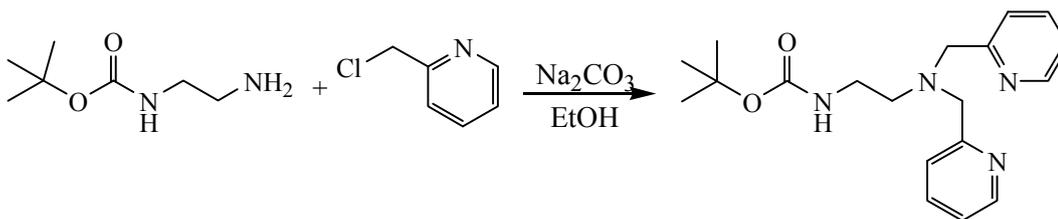
Ausbeute: 12 mg (18 μ mol; 46 %)

MS-ESI: m/z C₃₂H₃₅N₃O₆SCl₂

[M+H]⁺ berechnet: 658,16
gefunden: 658,29

5.2.9 Kopplung von Dichloroanthrarufin an Dipicolylamin

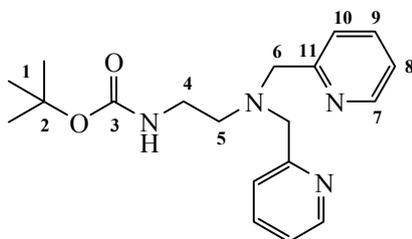
Synthese von [2-(Bis-pyridin-2ylmethyl-amino)-ethyl]-carbaminsäure-*tert*-butylester^[80]



Ansatz: 2,5 g (15,3 mmol) 2-Chlormethylpyridin
1,2 g (7,3 mmol) (2-Amino-ethyl)-carbaminsäure-*tert*-butylester
3,7 g (34,4 mmol) Natriumcarbonat

In Anlehnung an die Literaturvorschrift 80 wird in einem Schlenkkolben unter Stickstoffatmosphäre (2-Aminoethyl)-carbaminsäure-*tert*-butylester in 50 ml Ethanol gelöst und anschließend unter Rühren Natriumcarbonat und Chlormethylpyridin zugegeben. Die so erhaltene Suspension wird für 22h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT und Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird 50 ml Natronlauge (2 M in H₂O) zugegeben und dreimal mit jeweils 100 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung in Wasser) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird das Rohprodukt zweimal säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, 3 % MeOH/CH₂Cl₂) und ein gelbliches Öl erhalten.

Ausbeute: 1,4 g (4,0 mmol; 55 %)



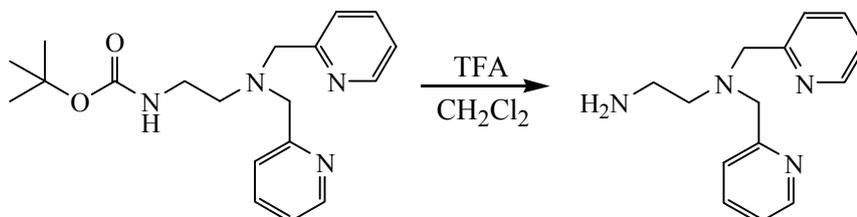
$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1,41 (s, 9 H, H 1), 2,66 (t, 2 H, H 5), 3,23 (m, 2 H, H 4), 3,82 (s, 4 H, H 6), 5,78 (s, 1 H, NH), 7,15 (dd, 2 H, H 8), 7,36 (d, 2 H, H 10), 7,63 (m, 2 H, H 9), 8,53 (dd, 2 H, H 6).

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 28,4 (C 1), 38,9 (C 4), 57,4 (C 5), 60,8 (C 6), 79,0 (C 2), 121,9 (C 8), 122,9 (C 10), 136,4 (C 9), 149,1 (C 7), 156,1 (C 3), 159,6 (C 11).

MS-ESI: m/z $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_2$

$[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet: 343,21
gefunden: 343,19

Synthese von *N,N*-Di-2-methylpyridin-1,2-ethandiamin^[80]

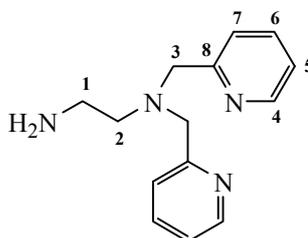


Ansatz: 1,4 g (4,0 mmol) [2-(Bis-pyridin-2ylmethyl-amino)-ethyl]-carbaminsäure-*tert*-butyl-ester
40 ml (7,3 mmol) Trifluoressigsäure

[2-(Bis-pyridin-2ylmethyl-amino)-ethyl]-carbaminsäure-*tert*-butyl-ester wird in 15 ml Dichlormethan gelöst und bei 0 °C unter Rühren tropfenweise 25 ml kaltes TFA zugegeben. Nach 3h Rühren werden weitere 15 ml TFA zugetropft und es wird über Nacht bei RT weiter gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels und der Säure am Rotationsverdampfer wird der orangene Rückstand in wenig Methanol gelöst und in Diethylether gefällt. Es bildet sich ein orangenes Öl. Man dekan-

tiert die Flüssigkeit ab. Das Rohprodukt wird in 100 ml 2 M NaOH gelöst und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und anschließend zweimal säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, 1-5 % MeOH steigend und 3 % DEA/CH₂Cl₂). Alle Fraktionen mit einem R_f-Wert von 0,3 werden gesammelt. Nach Entfernen des Lösungsmittels bleibt ein orangenes Öl zurück

Ausbeute: 0,8 g (3,4 mmol; 85 %)



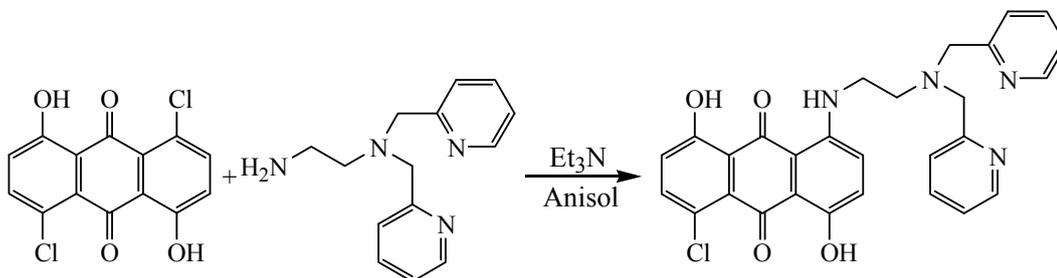
¹H-NMR (200 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 1,51 (s, 2 H, NH₂), 2,61 (m, 2 H, H 1), 2,74 (m, 2 H, H 2), 3,82 (s, 4 H, H 3), 7,15 (m, 2 H, H 5), 7,49 (d, 2 H, H 7), 7,62 (dd, 2 H, H 6), 8,47 (dd, 2 H, H 4).

¹³C-NMR (50 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 39,6 (C 1), 57,4 (C 2), 60,7 (C 3), 121,9 (C 5), 122,9 (C 7), 136,3 (C 6), 149,0 (C 4), 159,6 (C 8).

MS-ESI: m/z C₁₄H₁₈N₄

[M+H]⁺ berechnet: 243,16
gefunden: 243,16

Synthese von 1-[2-(Bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-ethylamino]-5-chloro-4,8-dihydroxy-anthracinon (17)

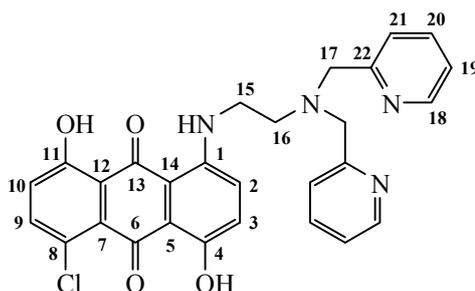


Ansatz: 0,5 g (1,5 mmol) Dichloroanthrarufin
0,7 g (2,9 mmol) N,N-Di-2-methylpyridin-1,2-

ethandiamin
2,9 ml (29 mmol) Triethylamin

Dichloroanthrarufin und *N,N*-Di-2-methylpyridin-1,2-ethandiamin werden in Anisol gelöst. Zu dieser Suspension wird Triethylamin zugegeben. Die Reaktionslösung wird für 5 h unter Stickstoffatmosphäre bei 135 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wird entfernt und das zurückgebliebene blaue Rohprodukt in wenig CH₂Cl₂ aufgenommen. Es wird dreimal säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, 0-1 % MeOH steigend und 1 % DEA/CH₂Cl₂). Die blauen Fraktionen werden gesammelt und das Lösungsmittel wird entfernt. Das Produkt wird erneut in CH₂Cl₂ gelöst und mit destilliertem H₂O gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Entfernen von CH₂Cl₂ erhält man einen dunkelblauen Feststoff.

Ausbeute: 0,2 g (0,3 mmol; 23 %)



¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2,96 (t, 2 H, H 16), 3,47 (q, 2 H, H 15), 3,8 (s, 4 H, H 17), 7,15 (m, 4 H, H 2, H 3, H 19), 7,2 (d, 2 H, H 21), 7,55 (d, 1 H, H 10), 7,61 (m, 2 H, H 9), 7,63 (m, 2 H, H 20) 8,50 (d, 2 H, H 18), OH- und NH-Gruppen sind nicht sichtbar.

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 40,6 (C 15), 52,5 (C 16), 60,5 (C 17), 107,4 (C 14), 113,5 (C 2), 119,0 (C 3), 122,3 (C 19), 123,4 (C 10), 124,0 (C 5), 124,5 (C 12), 125,6 (C 21), 128,1 (C 8), 130,3 (C 7), 136,5 (C 9), 138,7 (C 20), 147,5 (C 1), 149,0 (C 18), 157,5 (C 4), 158,9 (C 22), 162,0 (C 11), 185,1 und 185,6 (C 13 und C 6).

MS-ESI: m/z C₂₈H₂₃N₄O₄Cl

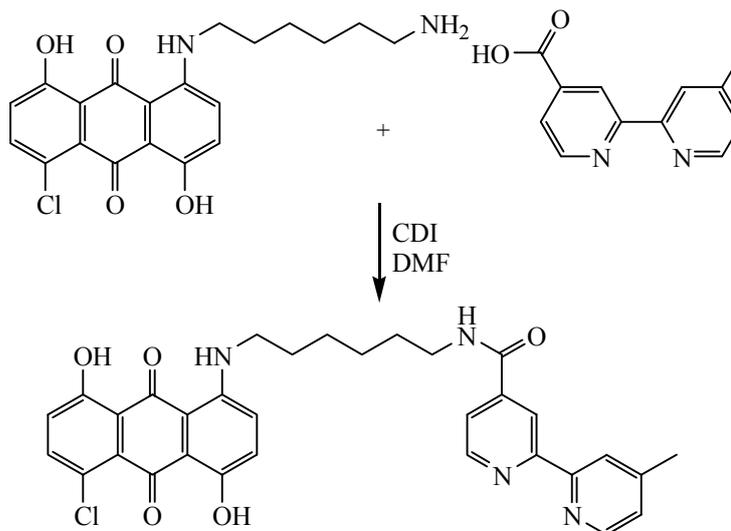
[M+H]⁺ berechnet: 515,14
gefunden: 515,15

HR-ESI: m/z C₂₈H₂₃N₄O₄Cl

[M+H]⁺ berechnet: 515,1400
gefunden: 515,1524

5.2.10 Kopplung von Verbindung 13 an 4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-carbonsäure

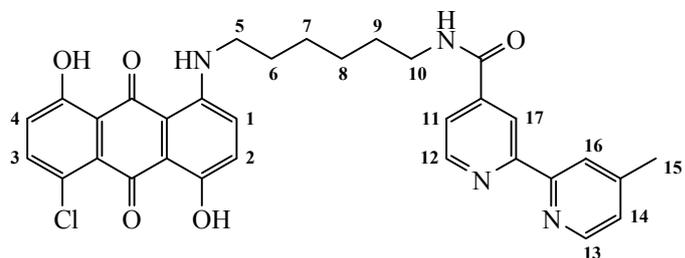
Synthese von 1-Chloro-4,8-dihydroxy-5-{6-[(4'-Methyl-2,2'-bipyridinyl-4-carbonyl)-amino]-hexylamino}-anthrachinon (18)



Ansatz: 0,2 g (0,5 mmol) Verbindung 13
 0,1 g (0,5 mmol) 4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-carbonsäure
 0,08 g (0,5 mmol) 1,1'-Carbonyldiimidazol

4'-Methyl-2,2'-bipyridin-4-carbonsäure und 1,1'-Carbonyldiimidazol werden unter Argonatmosphäre in 4ml absolutem DMF gelöst und eine Stunde bei RT gerührt. Anschließend wird Verbindung 13 in 4 ml DMF gelöst und zu der Reaktionslösung gegeben. Man lässt über Nacht bei RT rühren. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, 0-10 % MeOH steigend/CH₂Cl₂). Die blauen Fraktionen werden gesammelt und das Lösungsmittel entfernt. Der so erhaltene blaue Farbstoff wird in wenig Methanol gelöst und mit Ether umkristallisiert.

Ausbeute: 0,14 g (0,24 mmol; 47 %)



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1,30-1,85 (m, 8 H, H 9, H 8 H 7 H 6), 2,45 (s, 3 H, H 15), 3,46 (q, 2 H, H 10), 3,58 (q, 2 H, H 5), 6,61 (t, 1 H, NHCO), 7,19-7,62 (m, 5 H, H 1, H 2, H 3, H 4, H 14), 7,83 (m, 1 H, H 11), 8,3 (bs, 1 H, H 16), 8,58 (m, 2 H, H 13, H 17), 8,82 (m, 1 H, H 12), 9,98 (t, 1 H, NH), 13,92 (s, 1 H, OH), 14,08 (s, 1 H, OH).

HR-ESI: m/z $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_5\text{Cl}$

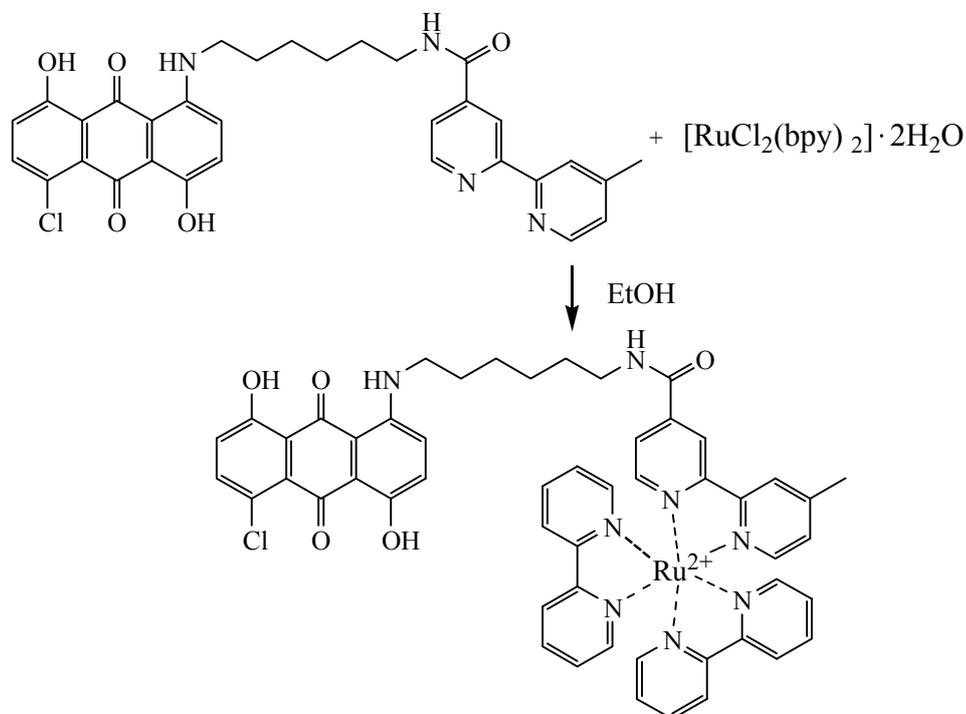
$[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet: 585,1905
gefunden: 585,1894

5.2.11 Kopplung von Verbindung 17 an $[\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2]$

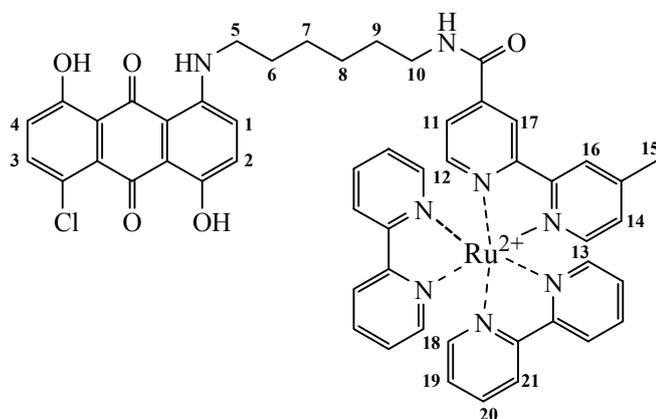
Synthese von [Dibipyridin-*N*-(6-(5-chloro-4,8-dihydroxy-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-1-ylamino)hexyl)-4'-methyl-2,2'-bipyridin-4-carboxamid]-Ruthenium(II)chlorid (19)

Ansatz: 47 mg (0,09 mmol) $[\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2] \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
60 mg (0,1 mmol) Verbindung 17

$[\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2] \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ und Verbindung **18** werden unter Argonatmosphäre in 20 ml absolutem EtOH (99 %) 24 h zum Sieden erhitzt. Nach beendeter Reaktion wird das Produktgemisch in CH_2Cl_2 gelöst und mit H_2O gewaschen. Dabei löst sich das Produkt in dunkelgrüner Farbe in der wässrigen Phase, wobei das blaue Edukt in der organischen Phase zu sehen ist. Zu der wässrigen Phase wird eine gesättigte Lösung KPF_6 gegeben, worauf sich ein brauner Niederschlag und ein orangener Überstand bildet. Die Lösung wird verworfen und der Rückstand in CH_2Cl_2 gelöst. Zu dieser Lösung wird eine Lösung von $(\text{PPh}_4)\text{Cl}$ gegeben. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels bleibt ein dunkelgrüner Feststoff zurück.



Ausbeute: 76 mg (0,07 mmol; 72 %)



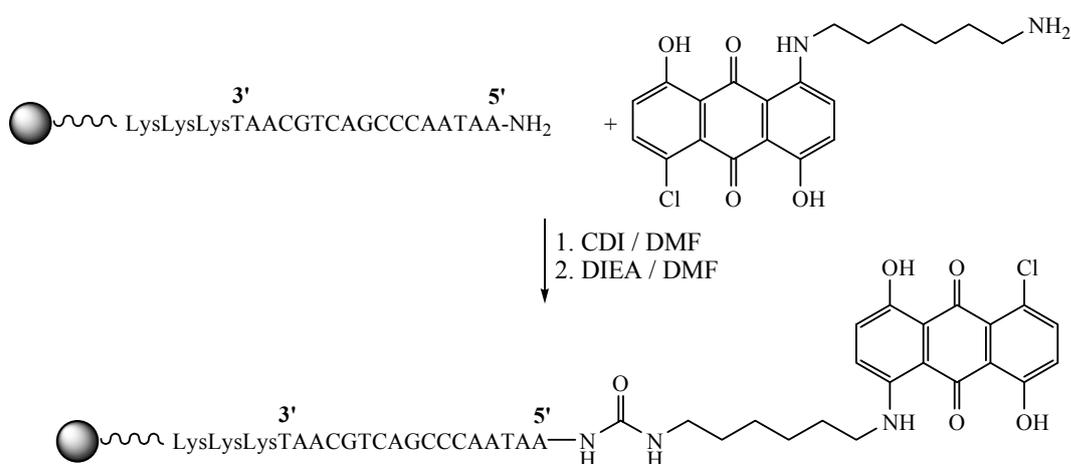
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 1,53-1,73 (m, 8 H, H 9, H 8 H 7 H 6), 2,73 (s, 3 H, H 15), 3,48 (bt, 4 H, H 5), 7,05 (bs, 3 H, H 1, H 2, H 14), 7,37 (d, 1 H, H 11), 7,48 (d, 5 H, H 19, H 4), 7,65 (d, 1 H, H 13), 7,81 (m, 5 H, H 20, H 3), 7,96 (d, 1 H, H 17), 8,12 (m, 4 H, H 18), 8,60 (s, 1 H, H 12), 8,66 (m, 4 H, H 21), 8,95 (s, 1 H, H 16), H 10, fällt unter das Signal von MeOH in CD₃OD.

HR-ESI: m/z C₅₂H₄₅N₈O₅ClRu[M+H]⁺ berechnet: 998,2245

gefunden: 998,2242

5.2.12 Synthese von PNS-Farbstoffkonjugaten an der Festphase

Kopplung von **13** an ^{5'}AATCAACCCGACTGCAATLysLysLys^{3'} (**20**)^[81, 82, 83]

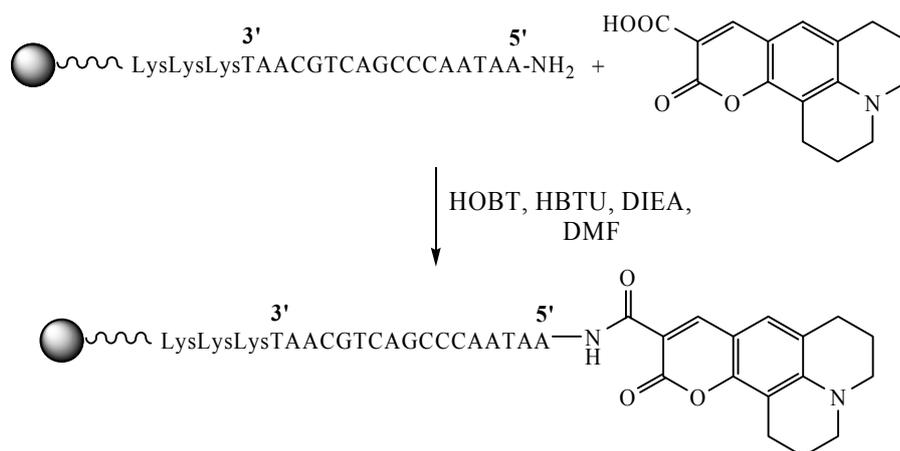


Ansatz:	(1 μmol)	PNS
16,2 mg	(0,1 mmol)	1,1'-Carbonyldiimidazol
24mg	(50 μmol)	Verbindung 13
13 mg	(0,1 mmol)	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin

Der Aufbau einer Lys₃-PNS (17mer) an der Festphase erfolgte wie in der Literatur beschrieben. Hierbei wird zuerst 1,1'-Carbonyldiimidazol in einem Eppendorf-gefäß unter Vakuum getrocknet und in absolutem 1,5 ml DMF gelöst. Diese Lösung wird in die Spritze mit der festphasen gebundenen PNS aufgenommen. Über Nacht wird die Reaktionslösung mit einem Thermomixer bei RT mit 850 rpm gerührt. Die Lösung wird entfernt und das Polymer wird jeweils dreimal mit 2 ml DMF und anschließend mit 2 ml CH₂Cl₂ gewaschen und im Vakuum getrocknet. Im zweiten Schritt der Kopplung wird **13** getrocknet und in absolutem 2 ml DMF gelöst. Zu der Lösung wird DIEA gegeben. Die blaue Lösung wird in die Spritze mit dem Polymer aufgenommen. Die Reaktionslösung wird erneut über Nacht mit einem Thermo-mixer bei RT mit 850 rpm gerührt. Die Lösung wird entfernt und das Polymer wird jeweils dreimal mit 2 ml DMF, mit 2 ml Acetonitril und anschließend mit 2 ml CH₂Cl₂ gewaschen und im Vakuum

getrocknet.

Kopplung von Coumarin 343 an $5'$ -AATCAACCCGACTGCAATLysLysLys $3'$ (21)



Ansatz:	(2 μ mol)	PNS
	14 mg (0,1 mmol)	HOBT
	34 mg (90 μ mol)	HBTU
	13 mg (0,1 mmol)	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
	7,13 mg (25 μ mol)	Coumarin 343

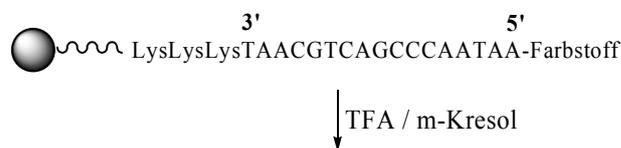
Coumarin 343, HOBT und HBTU werden zuerst in einem Eppendorfgefäß im Vakuum getrocknet und in trockenen 2 ml absolutem DMF gelöst. Zu dieser Lösung wird DIEA gegeben. Die Lösung wird in die Spritze mit der PNS aufgenommen und 1 h mit einem Thermomixer bei RT mit 850 rpm gerührt. Die Lösung wird entfernt und das Polymer wird jeweils dreimal mit 2 ml DMF, 2 ml Acetonitril und anschließend mit 2 ml CH_2Cl_2 gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Abspaltung der Farbstoff-modifizierten-PNS von der Festphase^[81, 82, 83]

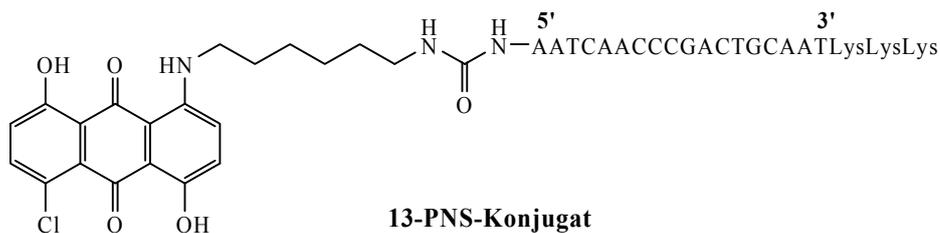
Ansatz:	(1 μ mol)	modifizierte PNS
	0,1 ml (1,5 mmol)	Trifluoressigsäure
	0,4 ml (3,6 mmol)	<i>m</i> -Kresol

Die modifizierte PNS wird in ein Eppendorfgefäß überführt. Ein Gemisch von TFA und *m*-Kresol wird hinzugegeben. Die Lösung lässt man 90 min bei RT

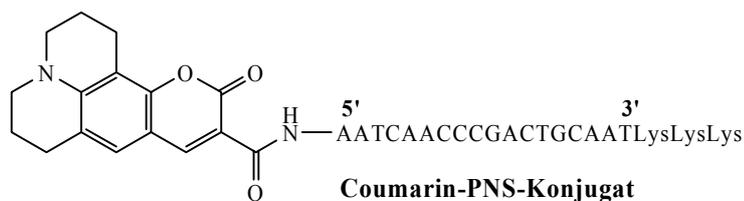
stehen. Nach der Abspaltung wird die Lösung bei 12000 rpm zentrifugiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Das Polymer wird mit TFA/*m*-Kresol Gemisch gewaschen und erneut zentrifugiert und zu der modifizierten PNS-Lösung gegeben. Aus der PNS-Lösung wird die modifizierte PNS mit 1ml Diethylether gefällt. Die weiße Suspension wird zentrifugiert, die Lösung wird verworfen und der Niederschlag dreimal mit Ether gewaschen. Die PNS wird im Vakuum getrocknet, in 250 µl HPLC-Wasser gelöst und mittels einer HPLC gereinigt. Die Konzentration der PNS wird durch Absorptionsmessung bei 265 nm und bei den jeweiligen Absorptionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe bestimmt.



1:



2:

MALDI-TOF: m/z 1: C₂₃₁H₂₉₅N₁₁₄O₅₈Cl[M]⁺ berechnet: 5629,63
gefunden: 5632,852: C₂₂₆H₂₈₉N₁₁₃O₅₆[M]⁺ berechnet: 5482,60
gefunden: 5477,84Konzentration: 1: 6,2 · 10⁻⁵ M
2: 2,3 · 10⁻⁴ M

5.3 Zellexperimente

5.3.1 Zellkultivierung

Alle mit der Zellkultur in Verbindung stehenden Arbeitsschritte erfolgten in einer sterilen Werkbank. Die verwendeten Medien und Lösungen sind auf 37 °C vortemperiert.

Passagieren von Zellen:

Die am weitesten verbreitete Methode, adhärente Zellen zu subkultivieren, ist der Gebrauch von Trypsin/EDTA-Lösung. Die Zellen sollten nicht zu lange Trypsin ausgesetzt sein. Lange Einwirkzeiten mit Trypsin können die Lebensfähigkeit der Zellen irreversibel schädigen. Die Kultur der Zellen erfolgt in 25 cm²- und 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Verwendung phenolrothaltiger Medien. Für das Wachstum und die Inkubation im Brutschrank benötigen die Zellen sterile Bedingungen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Gehalt. Alle Pipettierungen für die Passagierung werden nicht direkt auf den Zellen durchgeführt, sondern durch Drehen der Kulturflasche auf die zellfreie Oberseite. Das Aussäen der Zellen in neue Kulturflaschen erfolgt nach einem Verdünnungsfaktor, dessen Optimum für jede Zelllinie vorher bestimmt werden muss.

- Altes Medium entfernen
- Zweimaliges Waschen der Zellen mit jeweils 3 ml 1 x PBS
- Je nach Konfluenz der Zellen und Zellkulturflasche 1 ml (T25¹) bzw. 2 ml (T75²) Trypsin zugeben
- Flasche im Brutschrank 1-3 min inkubieren
- Abkugeln der Zellen im Lichtmikroskop kontrollieren
- Trypsin bis auf einen kleinen Rest entfernen und die Zellen im Brutschrank ca. 1-5 min nachinkubieren
- Zellen abklopfen, dabei eine starke Schaumbildung meiden
- Die Zellen in 5 ml Medium resuspendieren, je nach Bedarf in eine neue Kulturflasche überführen und mit Medium auf insgesamt 5 ml (T25¹) bzw. 15 ml (T75²) auffüllen
- Je nach Zelldichte alle 2-3 Tage Kulturmedium wechseln

Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest:

Für die Wachstumsgeschwindigkeit der meisten adhärennten Zellen ist die anfängliche zugesetzte Zellzahl von großer Bedeutung. Zu dünn ausgesäte Zellen

wachsen langsam, zu dicht ausgesäte müssen oft subkultiviert werden. Zur Bestimmung der Vitalität der Zellen vor und nach dem Auftauen wird eine Vitalfärbung mit Trypanblau durchgeführt. Ziel des Trypanblau-Ausschlusstests ist es, nicht vitale Zellen aufgrund ihrer Membranschädigungen von vitalen Zellen zu unterscheiden und gleichzeitig die Zellzahl der vorliegenden Suspension zu bestimmen. Die intakte Zellmembran vitaler Zellen schließt den sauren Farbstoff aus, während er durch die geschädigte Plasmamembran nicht vitaler Zellen diffundiert und somit das Zytoplasma blau bis violett anfärbt.

- Zellen trypsinieren und in definierte Menge Medium aufnehmen
- 20 µl aus Zellsuspension entnehmen und mit 20 µl Trypanblau mischen
- 10 µl der Zellsuspension auf eine geeichte Neubauer-Zählkammer auftragen
- Im Lichtmikroskop bei 10facher Vergrößerung die Zellen in den fünf Großquadranten zählen und den Mittelwert berechnen
- Berechnung der Zellzahl:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{gezählte Zellen} \cdot \text{DF} \cdot V}{5 \text{ Felder}} * 10^4$$

DF = Verdünnungsfaktor, V = Gesamtvolumen der Zellsuspension.

- Berechnung der Vitalität:

$$\text{Vitalität}[\%] = \frac{\text{Zellen, vital}}{\text{Gesamtzellzahl}} * 100$$

5.3.2 Formaldehydfixierung

- Aussaat der Zellen mit geringer Zellzahl auf sterile, eckige Deckgläser (1,8 x 1,8 cm oder 2 x 2 cm) in Petrischalen (Ø 5 cm)
- Inkulturnahme bis 50-80 % Konfluenz der Zellen
- Entfernen des Mediums
- Zweimaliges Waschen mit jeweils 3 ml 1 x PBS
- Inkubation mit 2 ml HEPES-Puffer; 12 min, RT
- Dreimaliges Waschen mit 1 x PBS (3 ml, jeweils 5 min)
- Überschichten der Zellen mit 10 µl Vectashield und versiegeln mit Deckgläsern und Fixogum oder klarem Nagellack
- Lagerung bei -20 °C

5.3.3 *In vivo* Färbungen mit den Anthrachinonfluoreszenzfarbstoffen

Humane Zelllinien:

- Aussaat der Zellen (LnCAP, HeLa, VH7) mit geringer Zellzahl auf sterile, runde Deckgläser (Ø 4 cm) in Petrischalen (Ø 5 cm)
- Inkulturnahme bis 50-80 % Konfluenz der Zellen
- Entfernen des Mediums; Zweimaliges Waschen mit jeweils 3 ml 1 x PBS
- Inkubation der Zellen mit den Anthrachinonen (Tabelle 5.1)
- Waschen mit 1 x PBS
- Einspannen des Deckglases in die *in vivo*-Kammer (CLSM)
- Inkubation mit 1 ml phenolrotfreiem Medium
- Detektion der Zellen

Verbindung	Puffer	Konzentration [μ M]	Inkubationsdauer [min]
3	Medium	10	10
4	HEPES-Glucose	5	3
10	Medium	5	5
11	HEPES-Glucose	10	30
12	Medium	10	2
13	HEPES-Glucose	5	1
14	Medium	5	5
15	Medium	7,5	2

Tabelle 5.1: Verdünnungspuffer, Konzentrationen und Inkubationsdauer der Aminoanthrachinonfarbstoffe.

Humane Gewebeschnitte (Dünndarm; nativ, PFA-fixiert, Paraffin fixiert):

- Entfernen des Paraffins; Waschen mit 100 %Xylol (15 min, RT)
- Schnitte je 5 min durch eine absteigende Isopropanolreihe (100 %, 96 %, 70 %) ziehen
- Waschen mit 1 x PBS
- Inkubation der Schnitte mit 10 μ M Verbindung **13** und **15** in HEPES-Glucose Puffer (2 min, RT)
- Waschen mit 1 x PBS
- Überschichten der Schnitte mit 10 μ l Vectashield und versiegeln mit Deck-

- gläsern und Fixogum oder klarem Nagellack
- Lagerung bei -20 °C

Pflanzenzellen (Tabak):

- Überführen der Zellen (WT-MDB, MDB_ER/GFP, BY2) auf runde Deckgläser (Ø 1 cm) in Petrischalen (Ø 3 cm)
- Inkubation der Zellen mit 10 µM Verbindung **13**, **15** und **12** in Saccharose/MS-Medium pH 5,8 (15 min, RT)
- Einspannen des Deckglases in die *vivo*-Kammer (CLSM)
- Detektion der Zellen

Viren (HIV):

- Überführen der HI-Viren auf runde Deckgläser (Ø 4 cm) in Petrischalen (Ø 5 cm)
- Inkubation der Viren mit 50 µM Verbindung **13** und **15** in 1 x PBS (10 min, RT)
- Einspannen des Deckglases in die *vivo*-Kammer (CLSM)
- Detektion der Viren

5.3.4 *In vivo* Färbungen mit der Verbindung 16 (Halo Tag[®] Interchangeable Technology)

Transfektion der Plasmid-DNS:

- Aussaat der HeLa Zellen mit geringer Zellzahl auf 96-well Platten
- Inkulturnahme bis 70 % Konfluenz der Zellen
- Waschen mit 1 x PBS
- Mediumwechsel durch 50 µl serumreduziertes Opti-MEM I Medium
- 2 µg Plasmid-DNS (Halo Tag[®] p65-Vektor) in 250 µl serumreduziertes Opti-MEM I Medium verdünnen
- 5 µl Lipofectamine 2000 in 250 µl serumreduziertes Opti-MEM I Medium verdünnen und 5 min bei RT inkubieren
- Plasmid DNS Lösung und Lipofectaminlösung vorsichtig mischen und 20 min bei RT inkubieren
- In jede Vertiefung der 96-well Platten 50 µl der Transfektionslösung geben
- Zellen über Nacht im Brutschrank inkubieren

Kopplung der Verbindung **16** an das Halo Tag-Protein p65:

- Transfektionslösung entfernen und die Zellen zweimal mit 1 x PBS bei RT waschen
- Inkubation mit 5 μM Halo Tag-TMR- und 25 μM Verbindung **16** in EMEM Medium bei 37 °C für 15 min
- Die Inkubationslösung entfernen
- Dreimaliges Waschen mit 37 °C warmem 1 x PBS
- Waschen mit phenolrotfreiem DMEM Medium (37 °C, 30 min) und frisches Medium hinzugeben
- Detektion (Fluoreszenzmikroskop)

5.3.5 *In vivo* Kontrolle der Zn^{2+} -Ionen mit der Verbindung 17

- Aussaat der HeLa Zellen mit geringer Zellzahl auf sterile, runde Deckgläser (\varnothing 4 cm) in Petrischalen (\varnothing 5 cm)
- Inkulturnahme bis 60 % Konfluenz der Zellen
- Entfernen des Mediums; Zweimaliges Waschen mit jeweils 3 ml 1 x PBS
- Inkubation der Zellen mit 10 μM Verbindung **17** in 1 ml phenolrotfreiem DMEM Medium (10 min, 37 °C)
- Entfernen der Inkubationslösung
- Waschen mit 1 x PBS
- Einspannen des Deckglases in die *in vivo*-Kammer (CLSM)
- Zugabe von 1 ml DMEM Medium
- *In vivo* Detektion (CLSM)
- Zugabe von 150 μM ZnSO_4 - und 15 μM Pyridithion Lösung
- Erneute Detektion (CLSM, 15 min)

5.3.6 *In vitro* Färbung mit der Verbindung 12

- Aussaat der HeLa Zellen mit geringer Zellzahl auf sterile, eckige Deckgläser (1,8 x 1,8 cm) in Petrischalen (\varnothing 5 cm)
- Inkulturnahme bis 60 % Konfluenz der Zellen
- Formaldehydfixierung der Zellen
- Inkubation der Zellen mit 10 μM Verbindung **12** in 1 x PBS (10 min, RT)
- Zweimaliges Waschen mit 1 x PBS (je 5 min, RT)
- Überschichten der Zellen mit 10 μl Vectashield und versiegeln mit Deck-

- gläsern und Fixogum oder klarem Nagellack
- Lagerung bei -20 °C

5.3.7 Immunofärbung

Konjugation von 1-Chloro-4,8-dihydroxy-5-(-4-isothiocyanato-benzylamino)-anthrachinon an WGA:

- 1mg WGA in 200 µl 1 x PBS lösen und bei RT in einem Eppendorfgefäß rühren
- 20 µl NaHCO₃-Puffer (0,84 g NaHCO₃ in 10 ml HPLC-Wasser, pH 8,3) zu der Proteinlösung geben
- 1 µl N-Acetyl-D-glucosamin (6 mg NAG in 100 µl HPLC-Wasser) zu der gepufferte Lösung geben
- 10 mg Anthrachinon in 1 ml DMSO lösen und 10 µl unter Rühren langsam in die Reaktionslösung überführen
- 1 h bei RT rühren
- Die Konjugation mit 5 µl Hydroxylaminhydrochlorid-Puffer (2,1 g Hydroxylaminhydrochlorid in 10 ml HPLC-Wasser, pH 8,5 mit 5 M NaOH einstellen) stoppen
- 30 min bei RT rühren
- Spin columns (F-6163; Invitrogen) öffnen und den Puffer (1 x PBS) durch Zentrifugation bei 1100 g, 3 min entfernen
- Die Konjugationslösung auf den Spin column langsam mittig auftragen
- Bei 1100 g, 5 min zentrifugieren und die Lösung in einem Eppendorfgefäß auffangen
- 200-250 µl WGA-Aminoanthrachinon in 1 x PBS mit 2 mM Natriumazid bei -20 °C lagern

Immunofärbung:

- Aussaat der HeLa Zellen mit geringer Zellzahl auf sterile, eckige Deckgläser (1,8 x 1,8 cm) in Petrischalen (Ø 5 cm)
- Inkulturnahme bis 60 % Konfluenz der Zellen
- Entfernen des Mediums; Zweimaliges Waschen mit jeweils 3 ml 1 x PBS
- Formaldehydfixierung
- Zellen permeabilisieren mit Saponin (0,05 g in 50 ml 1 x PBS) für 30 min bei 4 °C
- Waschen mit 1 x PBS (5 min, RT)

- Inkubation mit 75 μ l *WGA*-Aminoanthrachinon (1:10 Verdünnung aus der obigen Stocklösung) für 15 min bei 37 °C
- Waschen mit 1 x PBS (5 min, RT)
- Überschichten der Zellen mit 10 μ l Vectashield und versiegeln mit Deckgläsern und Fixogum oder klarem Nagellack
- Lagerung bei -20 °C

5.3.8 Kolokalisationsexperimente mit den Aminoanthrachinonen und *WGA*-FITC

- Aussaat der Zellen (LnCAP, HeLa, VH7) mit geringer Zellzahl auf sterile, eckige Deckgläser (1,8 x 1,8 cm) in Petrischalen (\varnothing 5 cm)
- Inkulturnahme bis 60 % Konfluenz der Zellen
- Entfernen des Mediums; Zweimalige Waschen mit jeweils 3 ml 1 x PBS
- Inkubation der Zellen mit 5 μ M Verbindung **13** und 7,5 μ M **15** in HEPES-Glucose Puffer (2 min, 37 °C)
- Entfernen der Inkubationslösung
- Zweimaliges Waschen mit 1 x PBS
- Formaldehydfixierung
- Zellen permeabilisieren mit Saponin (0,05 g in 50 ml 1 x PBS) für 30 min bei 4 °C
- Waschen mit 1 x PBS (5 min, RT)
- Inkubation mit 75 μ l *WGA*-FITC (50 μ g/ml in Lösung) für 15 min bei 37 °C
- Waschen mit 1 x PBS (5 min, RT)
- Überschichten der Zellen mit 10 μ l Vectashield und versiegeln mit Deckgläsern und Fixogum oder klarem Nagellack
- Lagerung bei -20 °C

5.3.9 Kolokalisationsexperimente mit den Aminoanthrachinonen und *DIOC*₆

- Aussaat der HeLa-Zellen mit geringer Zellzahl auf sterile, eckige Deckgläser (1,8 x 1,8 cm) in Petrischalen (\varnothing 5 cm)
- Inkulturnahme bis 60 % Konfluenz der Zellen
- Entfernen des Mediums; Zweimaliges Waschen mit jeweils 3 ml 1 x PBS
- Inkubation der Zellen mit 10 μ M Verbindung **13** für 3 min und mit 10 μ M **19** für 30 min in DMEM-Medium bei 37 °C

- Entfernen der Inkubationslösung
- Waschen mit 1 x PBS
- Inkubation der Zellen mit 1 μM DIOC₆ für 15 min in DMEM-Medium bei 37 °C
- Zweimaliges Waschen mit 1 x PBS
- Einspannen des Deckglases in die *vivo*-Kammer (CLSM)
- Inkubation mit 1 ml phenolrotfreiem Medium
- Detektion der Zellen

5.3.10 Metaphasen-Chromosomenpräparationen

- Aussaat der HeLa Zellen in eine T25¹-Zellkulturflasche
- Inkulturnahme bis 95 % Konfluenz der Zellen
- Zugabe von 20 μl Colcemid (Stammlösung: 10 $\mu\text{g/ml}$) und Inkubation der Zellen für 1,5 h bei 37 °C (Colcemid ist ein Spindelgift und arretiert die Zellen in der Metaphase)
- Zellen vorsichtig ernten und in 5 ml vorgewärmtem EMEM-Medium suspendieren
- Die Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugengefäß überführen
- Zentrifugieren bei RT für 10 min (1000 g) und den Überstand bis auf einen Rest von 500 μl EMEM entfernen
- Die Zellen resuspendieren
- Tropfenweise Zugabe von 18 ml der vorgewärmten hypertonischen Lösung unter Schwenken des Zentrifugengefäßes
- Inkubation der Zellsuspension bei 37 °C für 30 min
- Erneutes Zentrifugieren, entfernen der KCl-Lösung bis auf ca. 500 μl , resuspendieren des Zellpellets
- Inkubation der Zellen mit 3 ml eines MeOH/CH₃COOH (3:1)-Fixierungspuffers für 30 min bei RT
- Zentrifugieren bei RT für 10 min (1000 g), verwerfen des Überstandes bis auf 500 μl , resuspendieren der Zellen in der Fixierungslösung
- Waschen der Objektträger in Joplin-Jars für 10 min in H₂O
- Auftropfen von 25 μl der Zellsuspension mit einer Kolbenhubpipette auf Objektträger. Der Objektträger befindet sich beim Auftropfen der Zellsuspension in einem Winkel von 45°, die Zellsuspension wird senkrecht auf den Objektträger getropft (beim Auftropfen der Zellsuspension auf den Objektträger platzen die Zellen, die sich im Metaphasenstadium befinden)
- Der Objektträger wird an der Luft getrocknet und bei -20 °C gelagert

5.3.11 FISH-Experimente mit Zentromer 9 spezifischen PNS-Konjugaten

- Waschen der Objektträger der Metaphasen-Chromosomenpräparation der HeLa Zellen (5 min in 1 x PBS)
- Inkubation der Zellen in Permeabilisierungspuffer (TritonX100/Saponin; 100 µl/0,1 g in 100 ml 1 x PBS (20 min, RT)
- Zweimaliges Waschen mit 2 x SSC jeweils (5 min, RT)
- RNS-Verdau mit 100 µl RNase (1:100 Verdünnung aus 10 mg/1 ml Stocklösung) in einer Hybridisierungskammer (1 h, 37 °C)
- Zweimaliges Waschen mit 2 x SSC jeweils für 3 min bei RT
- Pepsin-Verdau mit 60 µl Pepsin (100 mg Pepsin in 1 ml 10 mM HCl) in 100 ml, 37 °C warmer, 10 mM HCl, (2 min, 37 °C)
- Waschen mit 1 x PBS (5 min, RT)
- Objektträger je 2 min durch eine aufsteigende Ethanolreihe (70 %, 80 %, 95 %) bei RT ziehen
- Die DNS mit Formamid-Puffer (70 % Formamid in 2 x SSC, pH 7,0) bei 70 °C für 2 min denaturieren
- Objektträger je 2 min durch eine aufsteigende Ehanolreihe (70 %, 80 %, 95 %) bei 0 °C ziehen und bei RT trocknen lassen
- 20 µl der PNS-Konjugate in Hybridisierungspuffer auf die Zellen auftragen (Tabelle 6.2)
- Versiegeln der Zellen mit Deckgläsern und Fixogum
- Hybridisierung in einer Hybridisierungskammer ür (24 h, 37 °C)
- Entfernen des Fixogums, waschen mit 1 x PBS (10 min, RT)
- Zellen mit Waschpuffer inkubieren (5 min, 45 °C)
- Waschen mit 1 x PBS (5 min, RT)
- Färbung der Zellkerne mit YOYO1 oder DRAQ5: Objektträger kurz trocknen lassen, Zellen mit 30 µl YOYO1 (1:2000 Verdünnung in 2 x SSC aus 1 mM DMSO) oder 30 µl DRAQ5 (5 µM in 1 x PBS) inkubieren (3-, 5 min, RT) (Tabelle 5.2)
- Waschen mit 2 x SSC (5 min, RT)
- Überschichten der Zellen mit 10 µl Vectashield und versiegeln mit Deckgläsern und Fixogum oder klarem Nagellack

PNS-Konjugat	Hybridisierungskonzentration [μM]	Zellkernfärbung
TMR-PNS-Konjugat	2,3	YOYO1
Coumarin-PNS-Konjugat	7,5	DRAQ5
TMR- und Coumarin-PNS-Konjugat	3 und 6	DRAQ5
13-PNS-Konjugat	6,75	YOYO-1

Tabelle 5.2: Hybridisierungskonzentrationen der PNS-Farbstoff-Konjugate und die entsprechenden Zellkernfarbstoffe.

5.3.12 Mikroinjektionsexperimente mit Zentromer 9 spezifischen PNS-Konjugaten

- Aussaat der HeLa Zellen mit geringer Zellzahl auf sterile, runde Deckgläser (\varnothing 4 cm) oder Cellocates von Eppendorf in Petrischalen (\varnothing 5 cm oder \varnothing 4 cm)
- Inkulturnahme bis 60-70 % Konfluenz der Zellen
- Für die Injektion mit einem Kapillarenzieher 300 nm dünne Kapillaren ziehen
- Die PNS-Konjugate mit dem Mikroinjektionspuffer verdünnen (Tabelle 6.3)
- 5 μ l der Verdünnung mit einem Mikroloader aufnehmen und in die Glaskapillare überführen
- Die Glaskapillare am Mikromanipulator des Injektionssystem befestigen
- Die Petrischale auf dem Tisch des Mikroinjektionssystem plazieren und die Zellen bei 10 facher Vergrößerung fokussieren
- Die Glaskapillare mit dem Mikromanipulator auf die Fokusebene der Zellen fokussieren
- Umschalten auf die 32fache Vergrößerung
- Die z-Ebene der Glaskapillare mit dem Mikromanipulator festlegen
- Mikroinjizieren von ca. 100-300 Zellen
- Inkubation der Zellen bei 37 °C (Tabelle 5.3)
- Formaldehydfixierung
- Zellkernfärbung (Tabelle 5.3)
- Überschichten der Zellen mit 10 μ l Vectashield und versiegeln mit Deckgläsern und Fixogum oder klarem Nagellack

PNS-Konjugat	TMR-PNS-Konjugat	TMR- und Coumarin-PNS-Konjugat
Injektionskonzentration [μM]	5,37	3 und 6
Injektionsdruck [hPa]	100	100
Kompensationsdruck [hPa]	30	30
Injektionszeit [s]	0,5	0,5
Injektionsdauer [min]	45, 30	30
Inkubationszeit [h]	0,5, 2, 24,26	0,5, 24
Zellkernfärbung	YOYO1	DRAQ5

Tabelle 5.3: Mikroinjektionsparameter der PNS-Farbstoff-Konjugate die Inkubationszeiten und die entsprechenden Zellkernfarbstoffe.

5.3.13 Toxizitätsexperimente

Proliferationsexperimente mit den Verbindungen 13, 15, 19 und Trisbipyridylruthenium(II):

- Aussaat der Zellen (HeLa, LnCAP) in T25¹-Zellkulturflaschen
- Inkulturnahme bis 20 % Konfluenz der Zellen
- Bestimmung der Zellzahl am Tag 0 aus zwei T25¹-Zellkulturflaschen
- Inkubation der Zellen mit den Aminoanthrachinonen (Tabelle 5.4)
- Bestimmung der Zellzahlen aus zwei T25¹ Zellkulturflaschen alle 24 h

Verbindung	Zelltyp	Inkubationsmedium	Inkubationskonzentration [μM]	Inkubationszeit [d]
13	HeLa	EMEM ohne FCS	0, 5, 10	3
15	HeLa, LnCAP	EMEM, RPMI	0, 5, 10, 15	5
[Ru(bpy) ₃]Cl ₂	HeLa	EMEM	0, 5, 10, 15	4
19	HeLa	EMEM	0, 5, 10, 15	4

Tabelle 5.4: Inkubationsparameter und die Zelltypen der Proliferationsexperimente von den Verbindungen 13, 15, 19 und Tris(bipyridyl)ruthenium(II).

Qualitative Bestimmung der Phototoxizitäten von Trisbipyridylruthenium(II) und der Verbindung 19:

- Aussaat der HeLa Zellen mit geringer Zellzahl auf sterile, runde Deckgläser (Ø 4 cm) in Petrischalen (Ø 5 cm)
- Inkulturnahme bis 60-70 % Konfluenz der Zellen
- Medium entfernen und waschen mit 1 x PBS
- Inkubation der Zellen mit den Ru-Komplexen (Tabelle 5.5)
- Entfernen des Inkubationslösung und zweimaliges Waschen mit 1 x PBS
- Einspannen des Deckglases in die *vivo*-Kammer (CLSM)
- Zugabe von 1 ml frisches DMEM Medium
- *In vivo*-Detektion (CLSM, 1 h)

Ru-Komplex	[Ru(bpy) ₃]Cl ₂	19
Inkubationskonzentration [µM]	100, 10	10
Inkubationszeit [h]	6, 0,5	0,5

Tabelle 5.5: Inkubationsparameter der Ru-Komplexe.

Quantitative Bestimmung der Zytotoxizität von 14 (Cell Titer-Glo[®] Luminescent, Caspase-Glo[®] 3/7 Assay, MultiTox-Glo[™] Multiplex):

Cell Titer-Glo[®]:

- Aussaat der Zellen (HeLa, LnCAP, VH7) mit geringer Zellzahl auf 96-well Platten
- Inkulturnahme bis 10 % Konfluenz der Zellen
- Medium entfernen und waschen mit 1 x PBS
- Inkubation der Zellen mit **14** (Tabelle 5.6)
- Cell Titer-Glo Reagenz auftauen und in 10 ml Cell Titer-Glo Puffer lösen
- Zellen 30 min bei RT stehen lassen
- Lyse der Zellen mit 100 µl Cell Titer-Glo Reagenzlösung pro Vertiefung
- Bei 450 rpm für 2 min die well Platten schütteln
- 10 min bei RT inkubieren
- Zellen überführen auf weiße 96-well Platten
- Detektion der Lumineszenz

	Inkubationskonzentration [μM]	Inkubationszeit [h]
Cell Titer-Glo	0, 1, 2,5, 5, 7,5	2, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 60,72
Caspase-Glo	0, 1, 2,5, 5, 7,5	2, 4, 6, 12, 24
MultiTox-Glo	0, 1, 2,5, 5, 7,5	2, 4, 6, 12

Tabelle 5.6: Inkubationskonzentrationen und -zeiten von **14** bei den jeweiligen Zytotoxizitätsassays.

Caspase-Glo[®] 3/7 Assay:

- Aussaat der Zellen (HeLa, LnCAP, VH7) mit geringer Zellzahl auf 96-well Platten
- Inkulturnahme bis 10 % Konfluenz der Zellen
- Medium entfernen und waschen mit 1 x PBS
- Inkubation der Zellen mit **14** (Tabelle 5.6)
- Caspase-Glo 3/7 Reagenz auftauen und in 10 ml Caspase-Glo 3/7 Puffer lösen
- Zellen 30 min bei RT stehen lassen
- Lyse der Zellen mit 100 μ l Caspase-Glo 3/7 Reagenzlösung pro Vertiefung
- Bei 450 rpm für 2 min die well Platten schütteln
- 30 min bei RT inkubieren
- Zellen überführen auf weiße 96-well Platten
- Detektion der Lumineszenz

MultiTox-Glo[™] Multiplex:

- Aussaat der Zellen (HeLa, LnCAP, VH7) mit geringer Zellzahl auf 96-well Platten
- Inkulturnahme bis 10 % Konfluenz der Zellen
- Medium entfernen und waschen mit 1 x PBS
- Inkubation der Zellen mit **14** (Tabelle 5.6)
- Alle MultiTox-Glo Reagenzien auftauen
- 100 μ l AAF-Glo Reagenz in 5 ml Assay Puffer lösen
- 10 μ l GF-AFC Reagenz in 5 ml Assay Puffer lösen
- Zellen mit 50 μ l GF-ACF Reagenzlösung pro Vertiefung inkubieren (30 min, 37 °C)
- Lyse der Zellen mit 50 μ l AAF-Glo Reagenzlösung pro Vertiefung
- Bei 450 rpm für 2 min die well Platten schütteln
- 15 min bei RT inkubieren

- Zellen auf weiße 96-well Platten überführen
- Detektion der Lumineszenz

5.4 Bildauswertung

Bestimmung der relativen radialen Positionen subchromosomaler Domänen:

In dieser Arbeit wird eine von *S. Stein* (Prof. Cremer, KIP) neu eingeführte randbasierte, radiale Positionsbestimmung verwendet. Bei der randbasierten Positionierung wird der Zellkernrand als Bezugspunkt gewählt.

In der Abbildung 5.1 ist das grundlegende Prinzip dargestellt. Die radial (orthogonal) von einem Punkt P_i auf der Oberfläche ausgehenden Strecken werden in Segmente Δn_m mit $m = 1, \dots, j$ unterteilt. Die Länge der Segmente ist in alle Richtungen gleich $\Delta n_2 = \Delta n_1$. Damit haben Segmente mit dem gleichen m den gleichen Abstand zum Rand. Verbindet man die vom Rand äquidistanten Punkte, dann ergeben sich Isolinien bzw. Isoflächen, die alle Punkte mit gleichem Abstand zum Rand beinhalten. $Dist_{max}$ ist die maximale Minimaldistanz und entspricht der Normierung auf 100 %. Daraus ergibt sich die radiale Position von 0 % für die innere und 100 % für die randständige Position.^[84]

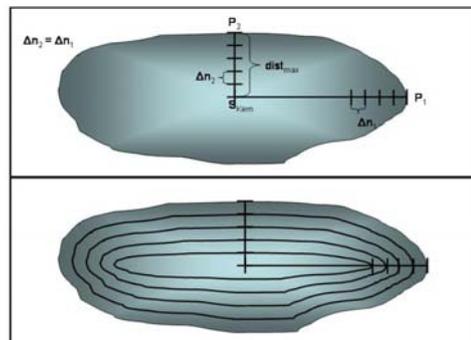


Abb.5.1: Schematische Darstellung des Prinzips der randbasierten relativen radialen Position.

Bestimmung der absoluten Distanzen zwischen subchromosomalen Domänen:

Die Berechnung der absoluten euklidischen Distanz zwischen zwei subchromosomalen Regionen erfolgt anhand der Intensitätsschwerpunkte der beiden segmentierten Chromatinregionen, hier als P und O bezeichnet.

$$dist_{euklid}(P|O) = \sqrt{(P_1 - O_1)^2 + (P_2 - O_2)^2 + (P_3 - O_3)^2}$$

6 Ergebnisse und Diskussion

6.1 Synthesen

6.1.1 Darstellung der Aminoanthrachinon-Farbstoffe

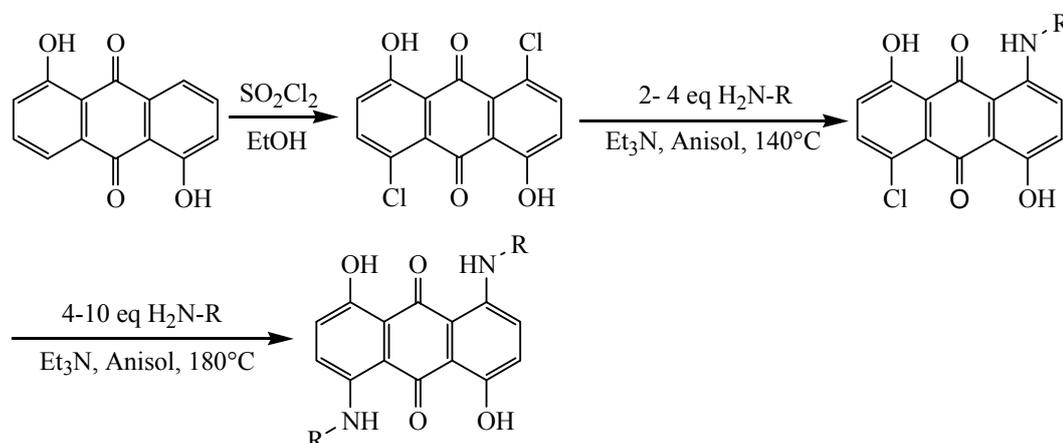


Abb.6.1: Synthesestrategie zur Darstellung der Aminoanthrachinon-Farbstoffe.

Die Synthese der Aminoanthrachinon-Farbstoffe gelang mit der oben dargestellten Synthesestrategie in guten Ausbeuten. Ausgangsverbindung war das 1,5-Dihydroxy-4,8-dichloroanthrachinon, das durch die Umsetzung von 1,5-Dihydroxyanthrachinon mit Sulfurylchlorid nach *Allen* hergestellt wurde.^[79] 1,5-Dihydroxy-4,8-dichloro-anthrachinon wurde in einer nukleophilen, aromatischen Substitution mit diversen Aminen (Abb.6.2) umgesetzt.^[78] Diamine wurden zunächst nach der Vorschrift von *Krapcho* und *Kuell* an einem N-Atom geschützt.^[77] Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppen erfolgte schließlich mit Trifluoressigsäure.

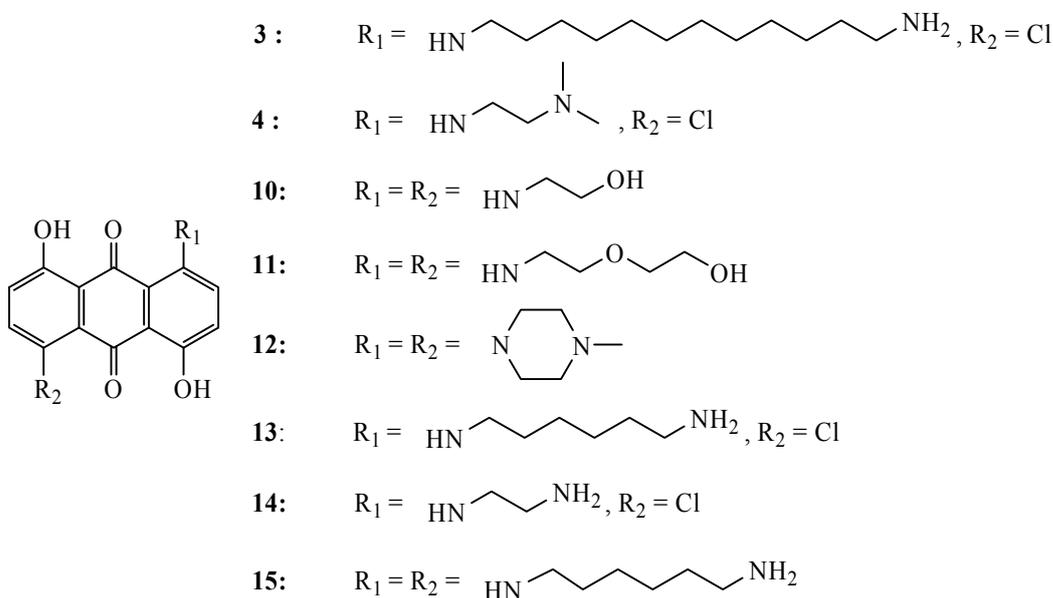


Abb.6.2: Übersicht der in dieser Arbeit dargestellten, ausgesuchten Aminoanthrachinon-Farbstoffe.

6.1.2 Darstellung der aktivierten Aminoanthrachinon-Farbstoffe

Zur Kopplung an Biomoleküle wie Proteine und Nukleinsäuren werden Fluoreszenzfarbstoffe in der Regel mit reaktiven Gruppen modifiziert, beispielsweise als Succinimidylester, Säurechloride oder Isothiocyanate werden die Fluorophore in wässriger Lösung mit den Biomolekülen zur Reaktion gebracht.^[85] Hier wurden Derivate der KAYA-Farbstoffe (Abb.6.3), die als Succinimidylester und als Isothiocyanate aktiviert waren, synthetisiert um milde Konjugationen an *WGA* und an den Halo Tag-Linker zu ermöglichen.

Für die Synthese des Succinimidylesterderivats ist wurde zunächst eine Carbonsäurefunktion durch die Reaktion von Bersteinsäureanhydrid mit **14** erzeugt.^[86] Über DCC vermittelte Kondensation mit *N*-Hydroxysuccinimid wurde der aktivierte Farbstoff in guten Ausbeuten erhalten. Die Synthese des Isothiocyanatderivats erfolgte durch die Umsetzung von 1-(4-Amino-benzylamino)-5-chloro-4,8-dihydroxy-anthrachinon mit Thiophosgen in einer Zwei-Phasen-Reaktion in Wasser und Chloroform.^[87, 88] Die basische Umsetzung des Isothiocyanats mit dem Halo Tag-Linker (2-(2-(6-Chlorohexyloxy)-ethanamin) lieferte den rot emittierenden Halo Tag-Liganden (**16**).

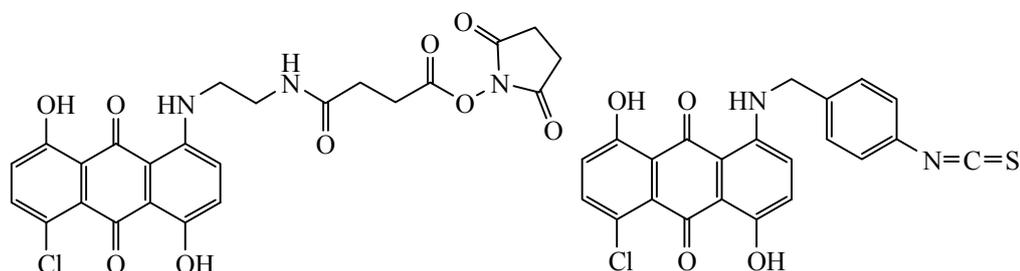


Abb.6.3: Strukturformeln der aktivierten Aminoanthraquinon-Farbstoffe.

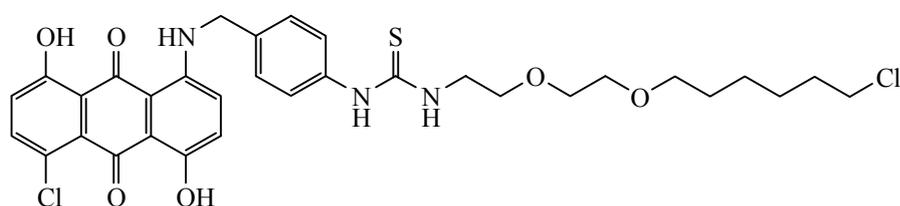


Abb.6.4: Strukturformel von Halo Tag-Ligand 16.

6.1.3 Kopplung von Dichloroanthrarufin an Dipicolylamin

Dipicolylamin ist ein dreizähliger Chelatligand, und bildet mit zweiwertigen Metallionen stabile Komplexe. Im ersten Schritt der Synthese (Abb.6.5) eines Farbstoffderivats wurde Boc-geschütztes Ethandiamin mit 2-Chlormethylpyridin in Ethanol und Natriumcarbonat umgesetzt. Das Zwischenprodukt [2-(Bispyridin-2-ylmethyl-amino)-ethyl]-carbaminsäure-*tert*-butyl-ester wurde säulenchromatographisch gereinigt. Nach der Hydrolyse der Boc-Schutzgruppe mit TFA in Dichlormethan und Reinigung wurde der Ligand in guten Ausbeuten erhalten.^[80]

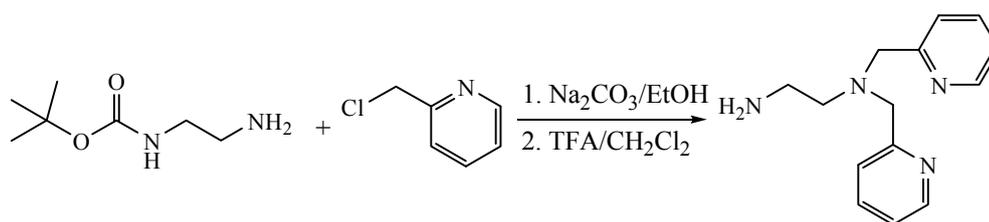


Abb.6.5: Synthese von *N,N*-Di-2-methylpyridin-1,2-ethandiamin.

Die Derivatisierung des Dichloroanthrarufins mit Dipicolylamin wurde nach der in Kapitel 6.1 angegebenen Reaktionsvorschrift durchgeführt. Verbindung **17**

(Abb.6.6) wurde nach der Aufreinigung in einer mäßigen Ausbeute erhalten.

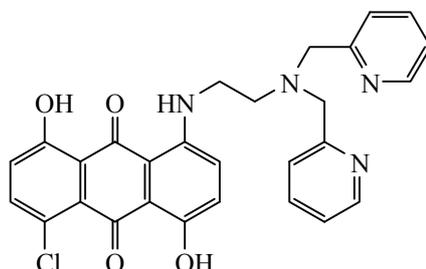


Abb.6.6: Strukturformel von 17.

6.1.4 Kopplung von Verbindung 13 an $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$

4'-Methyl-[2,2']-bipyridin-4-carbonsäure^[89] wurde mit Carbonyldiimidazol aktiviert und mit der Verbindung 13 zum Amid 18 umgesetzt. Die Umsetzung von 18 mit $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ ^[90] in Ethanol lieferte den Rutheniumkomplex 19 (Abb.6.7) in 72 % Ausbeute.

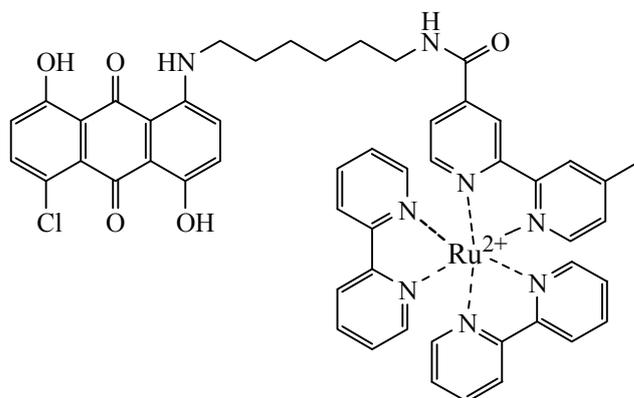


Abb.6.7: Strukturformel von 19.

6.1.5 Synthese von PNS Farbstoffkonjugaten

Die Kopplung von Coumarin 343 an den N-Terminus der festphasengebundenen PNS erfolgte über eine Peptidkopplungsreaktion. Hierbei wurde Coumarin 343 mit dem Uroniumsalz (HBTU) und HOBT aktiviert, mit der Base DIEA versetzt und an die PNS gekoppelt.^[81, 82, 83] Die Kopplung der Verbindung 13 fand durch die Aktivierung des N-terminalen Amins der PNS mit Carbonyldiimidazol und durch die anschließende Umsetzung mit 13 zum funktionalisierten Harnstoff statt.

Die Abspaltung der beiden PNS-Konjugate (Abb.6.8) vom festen Träger erfolgte mit einer 4:1 Mischung von TFA und *m*-Kresol. Die Reaktionskontrolle wurden mittels MALDI-TOF-Massen-spektroskopie durchgeführt. Die Trennung der Farbstoffmodifizierten PNS von unmodifizierter PNS erfolgte mittels HPLC. Fraktionen, die mehr als 90 % des gewünschten Produktes enthielten, wurden vereinigt. Die Bestimmung der Konzentration der Konjugate erfolgte photometrisch. Hierbei wurde über den Extinktionskoeffizient der PNS-Sequenz ($\epsilon = 184700$) bei 260 nm die Konzentration der Konjugate ermittelt.

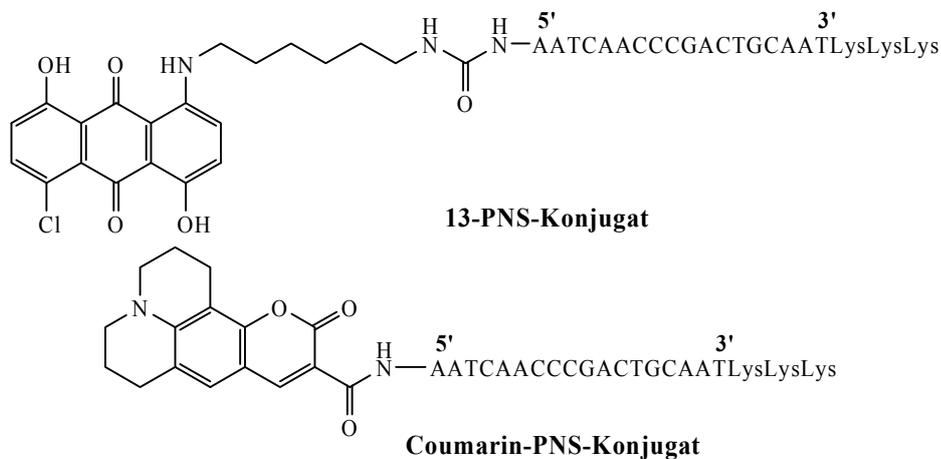


Abb.6.8: Strukturformeln von PNS-Farbstoffkonjugaten.

6.1.6 Kopplung der Aminoanthrachinon-Farbstoffe an Proteine

Konjugation des Succinimidylderivats an *Wheat germ agglutinin*:

Die Protokolle für Farbstoffkonjugationen an Proteine werden im allgemeinen in fünf Schritte unterteilt: Herstellung der Proteinlösung, Kalkulation der Konzentration des Fluorophors, Konjugationsreaktion, Aufreinigung und Bestimmung des Konjugationsgrades.

Die Konjugation des Succinimidylderivats an das Protein *WGA* wurde nach dem Protokoll F6434 von Invitrogen durchgeführt. Für eine optimale Konjugation liegen die Konzentrationen der Proteinlösungen zwischen 1 und 10 mg/ml. Hierbei wurde 1 mg WGA in 1 ml 1 x PBS gelöst. Die Kalkulation der Konzentration des Farbstoffs wird nach der unten aufgeführten Gleichung durchgeführt:

$$\mu\text{l Farbstoff (Lösung)} = \frac{\text{mg/ml Protein} \times 0,2\text{ml}}{\text{MW}_{\text{protein}}} \times \text{MW}_{\text{farbstoff}} \times 100 \times \text{MR}$$

Das Molekulargewicht ($\text{MW}_{\text{protein}}$) von *WGA* und vom Fluorophor beträgt 36 kDa bzw. 529 g/mol. MR bezeichnet das molare Verhältnis zwischen Protein und Fluorophor. Vor der Konjugationsreaktion wird *WGA* mit *N*-Acetyl-D-glucosamin versetzt. *N*-Acetyl-D-glucosamin blockiert das aktive Zentrum des Proteins, so dass keine Farbstoffmoleküle mit den basischen Aminosäuren am aktiven Zentrum reagieren können. Die Konjugationsreaktion wurde in einer wässrigen mit Natriumhydrogencarbonat gepufferten Lösung durchgeführt. Durch Zusatz von Hydroxylamin wird die Reaktion beendet. Mittels Gelfiltration (Spin Column) wird das Farbstoffmodifizierte *WGA* nach Protokoll gereinigt.

6.2 Fluoreszenz der Aminoanthrachinon-Farbstoffe in Lösung

6.2.1 Abhängigkeit der Fluoreszenz von Lösungsmittel, Temperatur und pH-Wert

Die in dieser Arbeit neu entwickelten Aminoanthrachinon-Farbstoffe weisen ähnliche Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften auf wie *DRAQ5*.^[6, 7] In wässriger Lösung zeigt das Absorptionsspektrum eine für Anthrachinonfarbstoffe charakteristische Doppelbande (Abb.6.9). Sie absorbieren etwa zwischen 500 und 650 nm und die Emissionsmaxima liegen zwischen 650-710 nm (Tabelle 6.1). Die Absorptions- und die Emissionsmaxima der Diaminoanthrachinone sind im Vergleich zu denen der Monoaminoanthrachinone ca. 15 bis 30 nm in den roten Bereich des Spektrums verschoben. Diese Rotverschiebung wird durch die zweite Aminogruppe (Elektronendonator) am Anthrachinongrundgerüst hervorgerufen.^[4, 109]

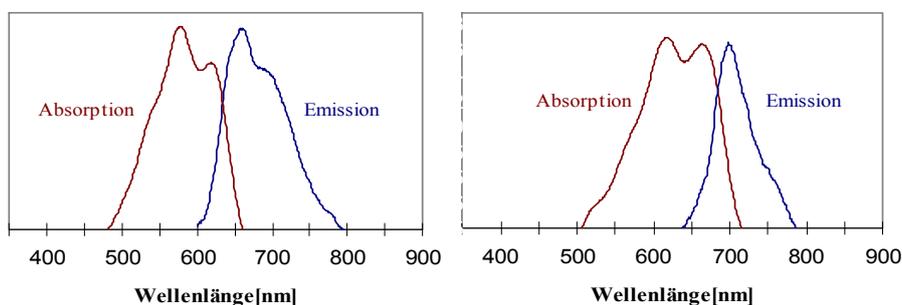


Abb.6.9: Absorptions- und Emissionsspektren von **13** (links) und **15** (rechts) gemessen in wässriger Lösung bei pH 7 (MOPS-Puffer).

Verbindung	Absorption	Emission	Extinktionskoeffizient
3	576 nm, 624 nm	661 nm	5430 M ⁻¹ cm ⁻¹ , 4730 M ⁻¹ cm ⁻¹
4	578 nm, 611 nm	637 nm	5318 M ⁻¹ cm ⁻¹ , 5524 M ⁻¹ cm ⁻¹
10	563 nm, 605 nm	657 nm	5780 M ⁻¹ cm ⁻¹ , 5128 M ⁻¹ cm ⁻¹
11	612 nm, 663 nm	700 nm	3595 M ⁻¹ cm ⁻¹ , 2945 M ⁻¹ cm ⁻¹
12	582 nm, 620 nm	693 nm	2256 M ⁻¹ cm ⁻¹ , 2030 M ⁻¹ cm ⁻¹
13	574 nm, 618 nm	660 nm	5639 M ⁻¹ cm ⁻¹ , 4887 M ⁻¹ cm ⁻¹
14	565 nm, 606 nm	653 nm	3112 M ⁻¹ cm ⁻¹ , 4286 M ⁻¹ cm ⁻¹
15	614 nm, 663 nm	705 nm	2687 M ⁻¹ cm ⁻¹ , 2506 M ⁻¹ cm ⁻¹

Tabelle 6.1: Absorptions- und Emissionsdaten der Aminoanthrachinon-Farbstoffe (10 µM) in H₂O.

Die Quantenausbeuten der ausgewählter Anthrachinon-Farbstoffe wurden relativ zu Nilblau-Perchlorat bestimmt. Die Quantenausbeute von einer 1 µM Nilblau-Lösung (0,5% igen 0,1 M HCl in Ethanol) beträgt bei einer Anregung bei 627 nm 0,27.^[91] Relativ zum Nilblau sind die Quantenausbeuten der Aminoanthrachinon-Fluorophore etwa um den Faktor 10 niedriger. Die Quantenausbeute von **13** beträgt 0,036 und von **12** 0,034.

Weiterhin ist die Emission der Farbstoffe konzentrationsabhängig. Die in Abbildung 6.10 dargestellten Emissionsspektren von **15** und **4** zeigen den Abfall der Emissionen mit der Zunahme der Konzentrationen der Fluorophore. Bei höheren Konzentrationen ordnen sich die Farbstoffmoleküle aufgrund des planaren Anthrachinongerüsts und der langen polaren Seitenketten über Van-der-Waals Kräfte stapelförmig an, wodurch die Elektronen ohne Strahlung auf das nächste Molekül übertragen werden können (strahlungslose Übergänge).^[108]

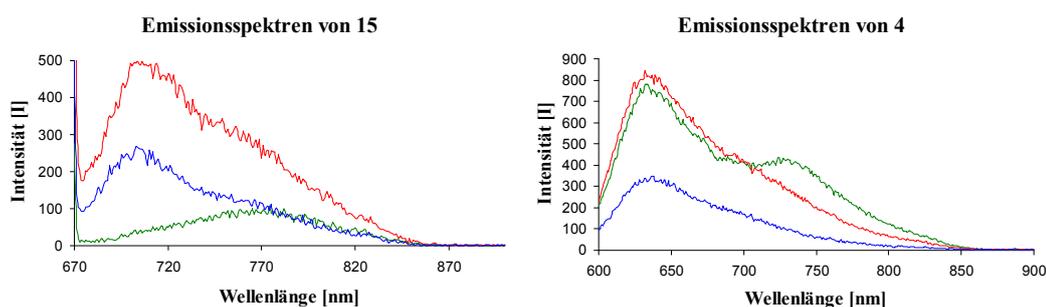


Abb.6.10: Emissionsspektren von **15** (links) und **4** (rechts) bei verschiedenen Konzentrationen; grüne Linie 1 mM, rote Linie 100 µM, blaue Linie 10 µM. (MOPS-Puffer, Anregung bei 663 nm (**15**) und 575 nm (**4**), PMT = 1000 V).

Es tritt ein Quencheffekt auf. Der Quencheffekt ist deutlich stärker, je sperriger die Seitenketten der Fluorophore sind. Die endständigen Methylgruppen der Alkylkette von **4** verringern die Bildung von Stapelstrukturen, so dass bei höheren Konzentrationen des Farbstoffes kein Abfall der Emission zu beobachten ist. Bei einer Konzentration von 1 mM Fluorophor verschieben sich die Emissionsmaxima hin zu größeren Wellenlängen. Die Maximum von **15** verschiebt sich von 705 nm auf 770 nm und das von **4** von 643 nm auf 731 nm.

Die Emission der Farbstoffe ist in organischen Lösungsmitteln größer als in Wasser. Die Steigerung der Emission ist in Abbildung 6.11 beispielhaft für **13** und **15** dargestellt. Die Emission der Fluorophore ist in wässrigen Lösungen extrem gering und in organischen Lösungsmitteln für **13** um einen Faktor von ca. 26 und für **15** von ca. 21 höher. Neben der Emissionsverstärkung verschiebt sich beim Übergang von polaren zu unpolaren Lösungsmitteln auch das Emissionsmaximum zu kürzerer Wellenlänge. Die Emission von **13** verschiebt sich von 663 nm auf 653 nm und die von **15** von 705 nm auf 700 nm.

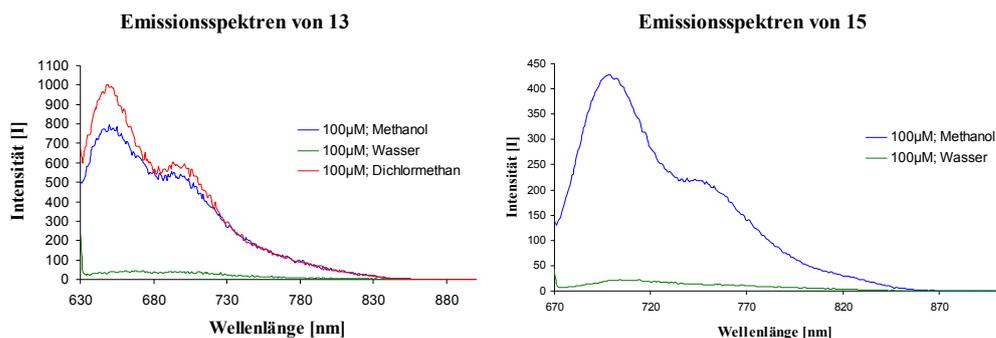


Abb.6.11: Emissionsspektren von **13** (links) und **15** (rechts) in H₂O, MeOH und CH₂Cl₂ (Anregung bei 623 nm (**13**) und 663 nm (**15**), PMT = 1000 V).

Die Emission der Aminoanthrachinon-Fluorophore verändern sich bei Temperaturerhöhung. Die Emissionsspektren in Abbildung 6.12 zeigen die Temperaturabhängigkeit von **13** und **15** unter Argonatmosphäre. Die Emission am Maximum der Farbstoffe steigt linear mit kontinuierlicher Temperatur an und fällt beim Abkühlen linear auf die Anfangsemission zurück. Durch die Temperaturerhöhung werden die Farbstoffmoleküle in Lösung beweglich (Vibration der Bindungen) und die intermolekulare Assoziation der Moleküle ist erschwert.

Die Emissionen sind gegenüber pH-Änderungen relativ unempfindlich. In Abbildung 6.13 werden die Emissionsmaxima von **13** und **15** in Abhängigkeit vom pH-Wert gezeigt. Im Bereich von pH 3 bis pH 8,5 treten kaum Änderungen der Intensitätsmaxima auf. Im Bereich von pH 9-10 erfolgt ein Abfall der Intensität der Emissionsmaxima. Durch die Deprotonierung der OH-Gruppen ändern sich die elektronischen Eigenschaften der Fluorophore. Die Emissionssta-

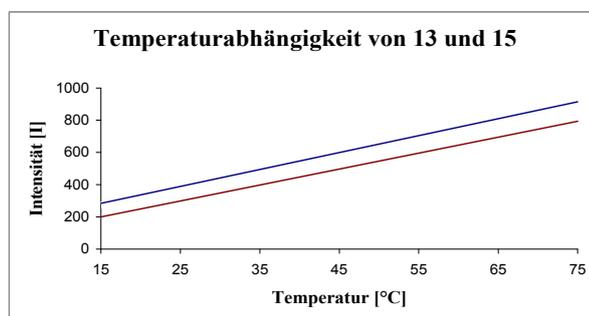


Abb.6.12: Temperaturabhängigkeit am Emissionsmaximum einer 50 μM Lösung von **13** (rot) und von **15** (blau) in MOPS-Puffer (Anregung bei 623 nm (**13**), 663 nm (**15**), PMT = 1000 V).

bilität der Fluorophore in Abhängigkeit vom pH-Wert ist wichtig für *in vivo* Färbungen von Zellen. Die pH-Werte von Zellen können sowohl intrazellulär als auch in Abhängigkeit vom Zelltyp schwanken.

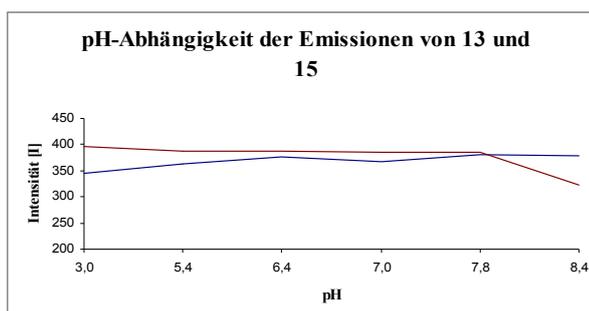


Abb.6.13: pH-Abhängigkeit am Emissionsmaximum einer 50 μM Lösung von **13** (rot) und von **15** (blau) in MOPS-Puffer (Anregung bei 623 nm (**13**), 663 nm (**15**), PMT = 1000 V).

6.2.2 Wechselwirkung der Aminoanthrachinon-Farbstoffe mit DNS

Anthrachinonderivate können aufgrund des planaren Ringgerüsts mit der DNS wechselwirken. Im Allgemeinen können die Verbindungen reversibel zwischen den Basen der DNS interkalieren, oder sie binden an die große oder kleine „Furche“ der DNS. DRAQ5 besitzt eine hohe Affinität zu DNS. Die Absorptionen und die Emissionen von DRAQ5 verschieben sich durch die Anlagerung an die

DNS in den roten Bereich des Spektrums. Im Vergleich zu DAPI oder Hoechst 33342 findet keine signifikante Intensitätssteigerung der Emission infolge der Interkalation mit der DNS statt.^[8,110]

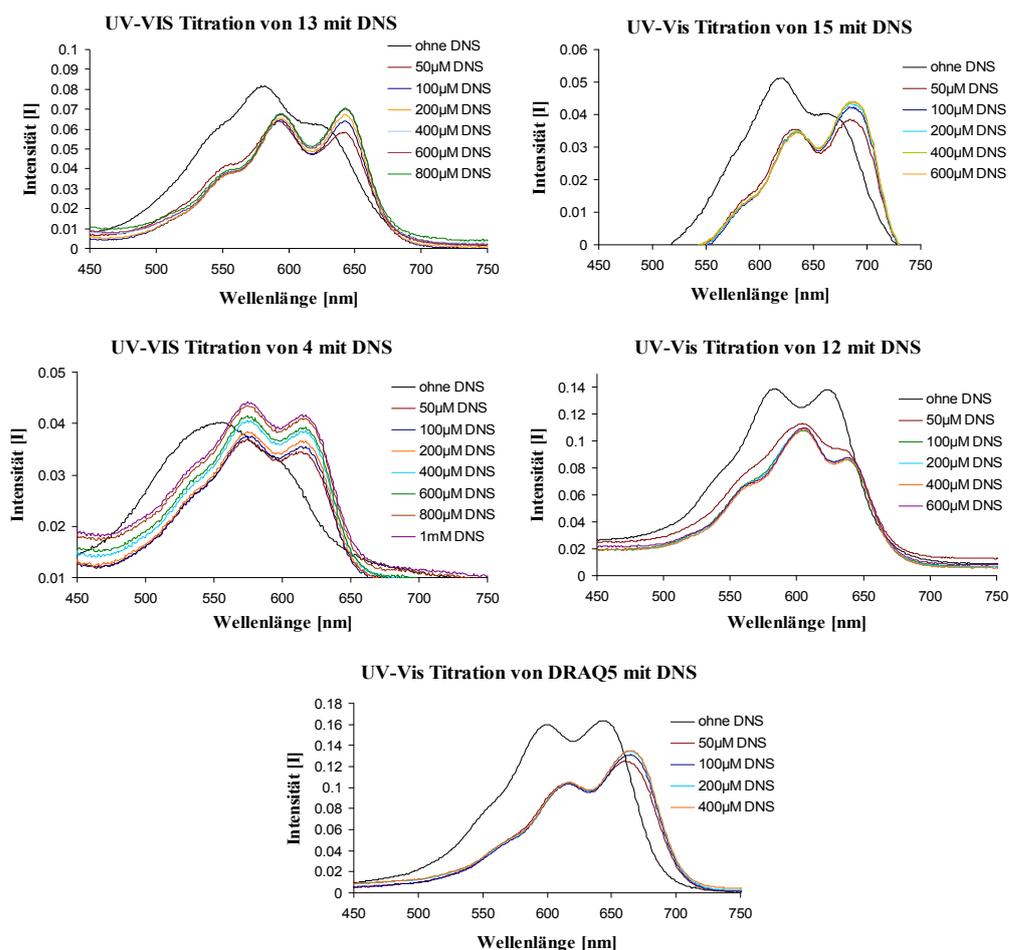


Abb.6.14: UV-Vis Titrations von **13**, **15**, **4**, **12** und DRAQ5 (jeweils 10 μM) mit DNS in MOPS-Puffer.

Verbindung **13**, **15**, **4**, **12** und DRAQ5 wurden mit einer DNS-Lösung aus Lachssperma titriert und die Verschiebung der Absorption detektiert. Für die DNS-Titration wurde 10 μM Farbstoff in MOPS-Puffer vorgelegt und mit einer 10 mM DNS-Lösung, bezogen auf die Nucleotid-Konzentration ($M=293,3$ g/mol) titriert (Abb. 6.14).

Alle Fluorophore verhalten sich wie DRAQ5. Die Absorption verschiebt sich in den Rotbereich des Spektrums. Bei **13** verschieben sich die Absorptionsmaxima

um ca. 40 nm bei **15**, **4** und **12** um ca. 20 nm. Die Verschiebung wird durch die Abnahme der Polarität in der Umgebung der Fluorophore in Folge der Wechselwirkung mit der DNS hervorgerufen.^[110] Die Extinktion fällt zunächst bei Zugabe von DNS. Mit steigendem Verhältnis von DNS zu Farbstoff steigen die Absorptionsintensitäten wieder an und stagnieren schließlich. Dabei steigt das langwellige Absorptionsmaximum stärker an.

6.2.3 Detektion von Metallionen durch **17**

Die photophysikalischen Eigenschaften von Verbindung **17** sind denen der anderen Aminoanthrachinon-Farbstoffe ähnlich. Verbindung **17** zeigt im Vergleich zu dem Vorläufermolekül **14** zwei Banden im Absorptionsspektrum, und die Absorptionsmaximas sind ca. 20 nm in den langwelligen Bereich des Spektrums verschoben. Das UV/Vis Spektrum von einer 50 µM Lösung von **17** in Ethanol/Wasser-Mischung (1:1) bei pH = 7,2 (HEPES-Puffer) zeigt zwei intensive Banden im sichtbaren Bereich bei 580 nm und 624 nm. **17** wurde mit verschiedenen zweiwertigen Metallionen (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+}) fluorimetrisch und UV/Vis-spektroskopisch titriert.

Titration mit Zn^{2+} -Ionen:

Bei Komplexbildung von **17** mit Zn^{2+} -Ionen kann eine Verschiebung des Absorptionsmaximums im UV-Vis-Spektrum (Abb. 6.15) von 580 nm nach 585 nm beobachtet. Während der Titration findet eine Farbänderung der Probelösung von blau nach violett statt. Das zweite Absorptionsmaximum des freien Liganden bei 625 nm wird durch Komplexbildung auf ca. 50 % der Anfangsintensität gesenkt, im längerwelligen Bereich (> 650 nm) wird ein Ansteigen der Absorptionskurve beobachtet. Das Absorptionsspektrum besitzt einen isobestischen Punkt bei ca. 650 nm. Dies zeigt, dass sich nur eine Spezies durch Addition von Zn^{2+} -Ionen an **17** bildet. Bei einem Verhältnis von **17** zu Zn^{2+} -Ionen von 1:0,8 geht die Steigung der Titrationskurven gegen null und die Absorptionskurve verändert sich bei weiterer Zinkzugabe nicht. Der Ligand ist nun vollständig komplexiert und die Konzentration des Zink-Ligand-Komplexes bleibt konstant. Aus diesen Ergebnissen folgt, dass der Anthrachinonfarbstoff eine hohe Affinität zu Zn^{2+} -Ionen besitzt und ein 1:1 Komplex gebildet wird.

Im Fluoreszenzspektrum wird ein Abfall der Emissionsintensität bei Titration mit Zn^{2+} -Ionen beobachtet. Die Emissionsintensität des Fluoreszenzfarbstoffes sinkt auf ca. 15 %. Das Emissionsmaximum bei 653 nm wird nach 633 nm verschoben, wobei das zweite Maximum bei 702 nm im Emissionsspektrum des Komplexes vollständig verschwindet. Die Ergebnisse aus der UV-

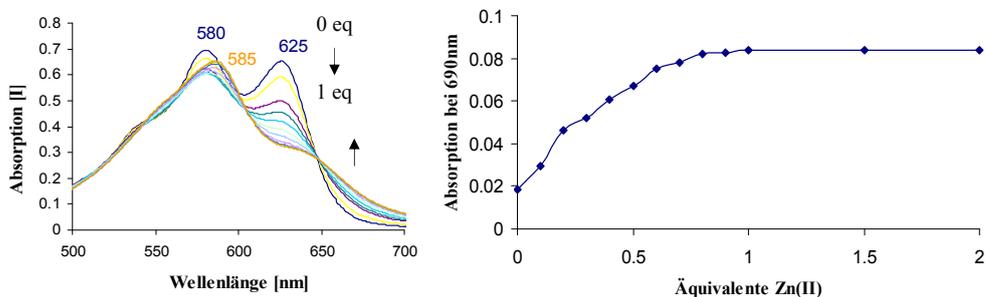


Abb.6.15: UV-Vis Titration einer 50 μM Lösung von **17** mit ZnSO₄ in EtOH/H₂O = 1:1, pH 7,0 (links) und Absorptionsdiagramm bei 690 nm (rechts).

Vis-Titration in Bezug auf die Bindungsaffinität und Zusammensetzung des gebildeten Komplexes werden durch die Fluoreszenzexperimente bestätigt. (Abb. 6.16).

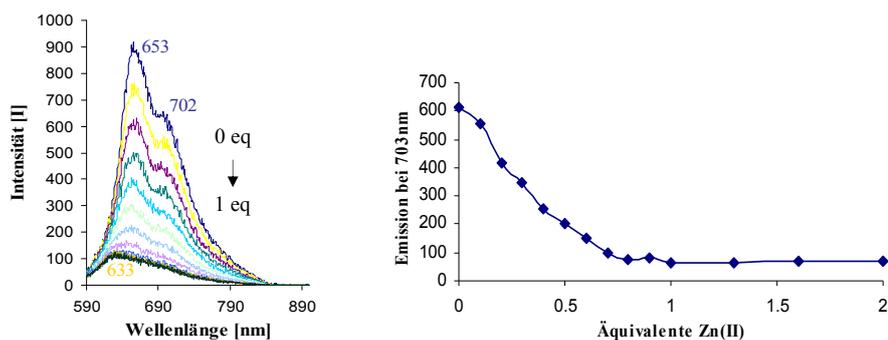


Abb.6.16: Fluoreszenztitration einer 50 μM -Lösung von **17** mit ZnSO₄ in EtOH/H₂O = 1:1, pH 7,0, λ_{ex} = 580 nm, PMT = 850 V (links) und Emissionsdiagramm bei 703 nm (rechts).

Titration mit Cu²⁺-, Ni²⁺-, Co²⁺-Ionen:

Bei der Titration von **17** mit Cu²⁺-, Ni²⁺- und Co²⁺-Ionen wird ebenfalls eine Veränderung des Absorptionsspektrums beobachtet. Das Absorptionsmaximum bei 580 nm verschiebt sich und das zweite Absorptionsmaximum bei 625 nm sinkt in Folge der Komplexbildung. In den Fluoreszenzspektren der Kupfer-, Nickel- und Cobalt-Titrations tritt wie bei der Zink-Titration eine Emissionsverschiebung und ein Quencheffekt der Emissionsintensität durch Komplexbildung auf. Der Titrationsverlauf von **17** mit den zweiwertigen Ionen ist linear. Bei 1 eq M²⁺-Ionen in Lösung liegt der Fluorophor komplett gebunden vor (Tabelle 6.2).

	Absorption λ_{\max} .	Emission λ_{\max} .	Abnahme der Intensität an Emissionsmaximum
17 + Cu²⁺-Ionen	584 nm, 640 nm	626 nm	um 95 %
17 + Ni²⁺-Ionen	571 nm, 614 nm	630 nm	um 75 %
17 + Co²⁺-Ionen	609 nm, 659 nm	626 nm	um 75 %

Tabelle 6.2: Änderung der Absorptions- und Emissionseigenschaften der 17-M²⁺-Komplexe gegenüber der Verbindung 17.

6.2.4 Absorptions- und Emissionseigenschaften des Rutheniumkomplexes 19

Das Absorptionsspektrum des Bipyridin modifiziertes Farbstoffs **18** in MOPS-Puffer zeigt im sichtbaren Bereich zwei Maxima, welche bei 582 nm und 630 nm liegen. **18** emittiert im Rotbereich des Spektrums bei 657 nm und 699 nm. Der Rutheniumkomplex **19** weist hingegen drei Absorptionsmaxima bei 460 nm, 580 nm und 620 nm auf. Das Absorptionsmaximum bei 460 nm ist auf die [Ru(bpy)₃]²⁺-Einheit zurückzuführen. Die Emission des Rutheniumkomplexes **19** bei den Anregungswellenlängen 580 nm, 620 nm ähnelt der Fluoreszenz der Verbindung **18** (Abb. 6.17).

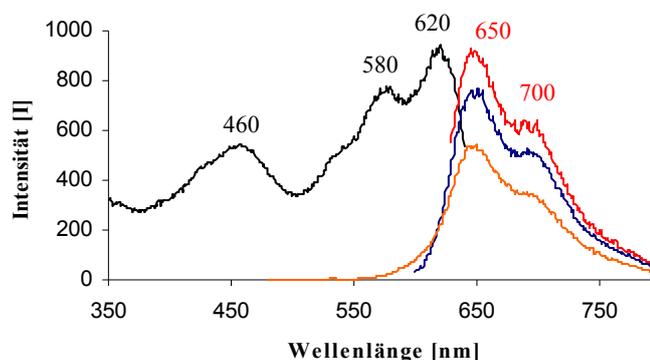


Abb.6.17: UV-Vis- und Fluoreszenzspektren einer 45 μM Lösung von **19** in Ethanol bei verschiedenen Anregungswellenlängen: Schwarze Linie (Absorption), rote Linie ($\lambda_{\text{ex}} = 620 \text{ nm}$), blaue Linie ($\lambda_{\text{ex}} = 580 \text{ nm}$), gelbe Linie ($\lambda_{\text{ex}} = 460 \text{ nm}$), PMT = 800 V.

Mit der Anregung bei 460 nm könnte ein *FRET* im Rutheniumkonjugat **19** stattfinden. Hierbei wird die Emissionsenergie der $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ - Einheit (Donor) auf das **18** Aminoanthrachinon übertragen. Diese Annahme wird durch Messungen der Emissionslebensdauern der jeweiligen Verbindungen unterstützt. $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ zeigt eine lange Fluoreszenzlebensdauer in μs -Bereich.^[92] Fluoreszenzlebensdauern wurden mit der Methode des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens an einem Fluoreszenzlebensdauerspektrometer Fluo Time 100 Compact (Picoquant, Berlin) bestimmt. Als Anregungslicht dienten LEDs (Light Emitting Diode) der Anregungswellenlängen PLS-450 und PLS-600. $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ weist eine Emissionslebensdauer von $\tau = 0,41 \mu\text{s}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$) und **13** von $\tau = 0,27 \text{ ns}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 600 \text{ nm}$) in einer 1:1 Ethanol/Wasser-Lösung auf. Das Konjugat zeigt hingegen zwei Emissionen mit den entsprechenden Zeiten $\tau_1 = 0,49 \mu\text{s}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$) mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,4 % und $\tau_2 = 3 \text{ ns}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$, 99,6 %).

6.2.5 Bestimmung der Singulett-Sauerstoff-Produktion des Rutheniumkonjugats **19**

In lebenden Zellen wirkt $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ phototoxisch. Die Phototoxizität des Komplexes wird durch die Bildung von Singulett-Sauerstoff bei Bestrahlung des Komplexes hervorgerufen.^[28, 29] Hierbei überträgt das elektronisch angeregte $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ seine Energie nach einem bimolekularen Mechanismus an den Triplett-Sauerstoff unter Bildung von Singulett-Sauerstoff.

In vitro kann Singulett-Sauerstoff über die Oxidation von 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) zu 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) quantifiziert werden. DCFH weist bei der Anregungswellenlänge 503 nm keine Emission bei 523 nm auf. Bei Reaktion mit Singulett-Sauerstoff wird DCF generiert und dessen Fluoreszenz bei 523 nm detektiert.^[93] Als potentielle Erzeuger von Singulett-Sauerstoff wurden $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, **19** und **13** mit DCFH inkubiert und mit blauem Licht ($\lambda_{\text{em.}} = 400\text{-}520 \text{ nm}$) bzw. mit rotem Licht ($\lambda_{\text{em.}} = 630\text{-}800 \text{ nm}$) bestrahlt und jeweils die Emissionen bei 523 nm in Abhängigkeit von der Zeit detektiert (Abb.6.18).

Bei Bestrahlung mit blauem Licht bildet $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ die größte Menge an Singulett-Sauerstoff. Im Vergleich ist die Bildung von Singulett-Sauerstoff durch das Rutheniumkonjugat **19** und **13** deutlich geringer. Bei Bestrahlung mit rotem Licht ist die Effizienz der Singulett-Sauerstoffproduktion der jeweiligen Verbindungen schwächer als bei Bestrahlung mit blauem Licht. Hierbei bildet **13** die größte Menge der reaktiven Sauerstoffspezies.

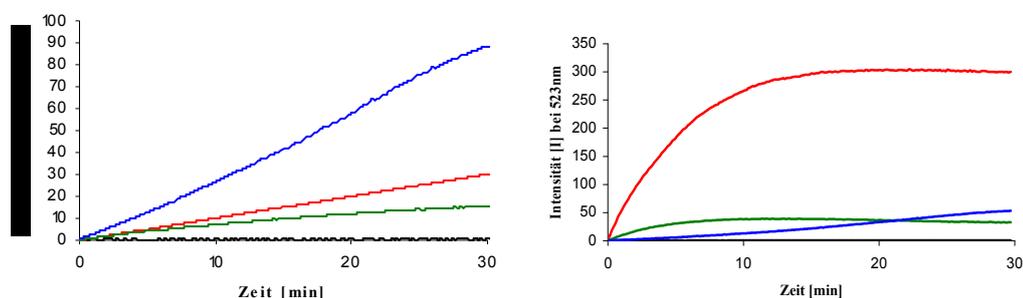


Abb.6.18: Quantifizierung von Singulett-Sauerstoff durch Oxidation von DCFH zu DCF; Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Zeit. Bestrahlung mit rotem Licht (links) bzw. mit blauem Licht (rechts). 1 μM DCFH, 10 μM Ru-Komplexe und 10 μM **13**, pH 7,0 (MOPS-Puffer), $\lambda_{\text{ex.}} = 503\text{nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 523\text{nm}$, PMT 450 V: Schwarze Linie (Kontrolle ohne Sensibilisator), blaue Linie (**13**), grüne Linie (**19**), rote Linie ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$).

6.3 Anwendungen der Fluoreszenzfarbstoffe und ihrer Konjugate für das zelluläre *Imaging*

6.3.1 Selektive Visualisierung zellulärer Substrukturen

Das Diaminoanthrachinon DRAQ5 hat eine hohe Affinität zu zellulärer DNS. DRAQ5 kann sehr schnell und effizient (min) durch die Plasmamembran der lebenden Zellen diffundieren und in den Zellkern gelangen. Die Interkalation von DRAQ5 in die DNS ist irreversibel.^[6, 7, 8] Weitere Vertreter für selektive Markierungen von bestimmten Organellen in lebenden Zellen stellen die Aminoanthrachinon-Farbstoffe **13**, **15**, **3** und **12** dar. Die ersten drei Farbstoffe visualisieren in lebenden Zellen die Plasmamembran und den *Nuclear Envelope* (Zellkernmembran, endoplasmatisches Retikulum) während Verbindung **12**, die strukturell mit DRAQ5 verwandt ist, sich im Zellkern anreichert. Im Vergleich zu den erwähnten Farbstoffen zeigen **4**, **11** und **10** nur geringe *in vivo* Selektivität für bestimmte Organellen bzw. Kompartimente. Diese Farbstoffe verteilen sich eher unspezifisch im Cytoplasma der lebenden Zellen. Alle CLSM-Detektionen fanden mit einer Laserlinie von 633 nm und 100 % Laserintensität statt, sofern im Text nicht anders erwähnt. Die Aufnahmen wurden mit einem 63 \times /1,32 HC \times PL APO Öl-Objektiv durchgeführt. Das Detektionsfenster wurde im Bereich von 650 nm bis 830 nm gehalten.

Verbindung 13:

Bei der Anwendung von **13** auf die humanen Zelllinien HeLa und LnCAP lässt sich zeigen, dass der Farbstoff schon bei geringen Konzentrationen und kurzen Inkubationszeiten Membranen selektiv, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* markiert. Sehr gut zu erkennende Kompartimente sind die Cytoplasmamembran, die Membranen des Endoplasmatischen Retikulums, sowie die Zellkernmembran (Abb.6.19). Verbindung **13** diffundiert nicht in den Zellkern.

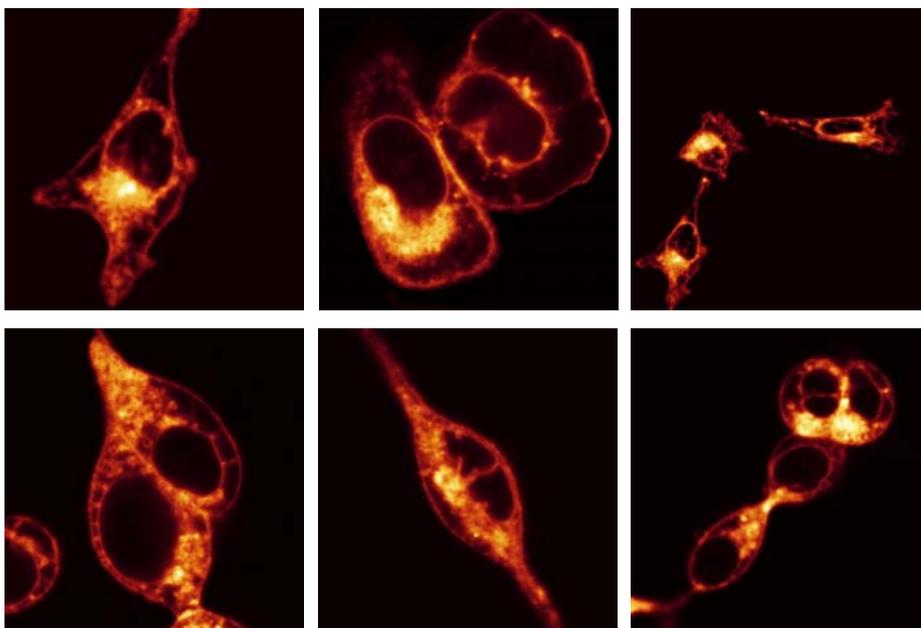


Abb.6.19: CLSM-Aufnahmen von lebenden HeLa- (oben) und LnCAP-Zellen (unten) inkubiert mit 5 μ M **13** in HEPES-Puffer.

Die Wechselwirkung von **13** mit den Membranen könnte durch das unpolare Anthrachinongrundgerüst und durch die hydrophobe C₆-Seitenkette hervorgerufen werden. Die Protonierung der Aminofunktion an der Seitenkette unter physiologischen Bedingungen könnte die Assoziation des Farbstoffes mit den Phospholipiden der Membranen unterstützen. Das Färbemuster von **13** konnte auch noch 15 Stunden nach Inkubation der HeLa-Zellen detektiert werden (Abb.6.20).

Die Anwendung von **13** ist nicht auf kultivierte Humanzellen beschränkt. Membranen von menschlichen Gewebeschnitten (Abb.6.21), Pflanzenzellen (Abb.6.22) und nicht infektiösen HI-Viren (Abb.6.22) werden mit **13** visualisiert.

13 markiert in Tabakzellen hauptsächlich die Zellwand, Plasmamembran und die Vakuolmembranen (Abb.6.22). Die Diffusionsgeschwindigkeit von **13** in Pflanzenzellen ist gegenüber humaner Zellen aufgrund der starren Zellwand

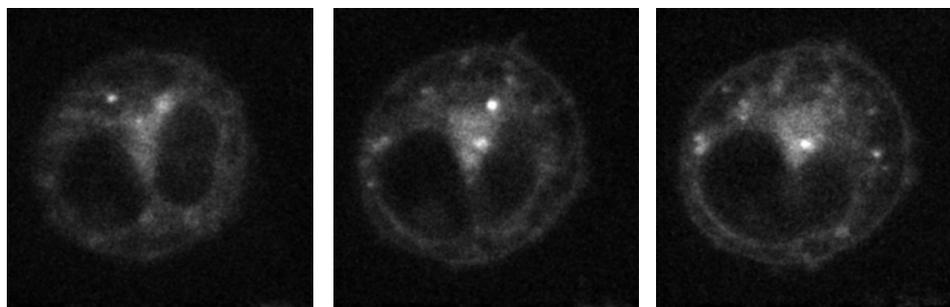


Abb.6.20: Dreidimensionale CLSM-Aufnahmen einer HeLa-Zelle während der Zellteilung; inkubiert mit 5 μM **13** und anschließender 15 stündiger Kultivierung der Zelle unter physiologischen Bedingungen.

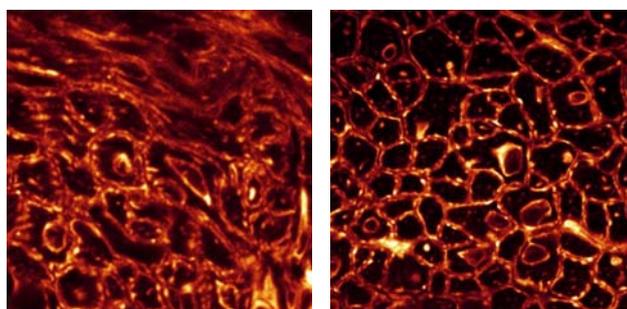


Abb.6.21: CLSM-Aufnahmen von menschlichen Dünndarmgewebeschnitten inkubiert mit 10 μM **13** bei RT für 3min: Native Muskelzellen (links), formaldehyd fixierte Muskelzellen (rechts).

vermindert. Die Inkubationszeiten betragen zwischen 15 und 30 min. Im Vergleich dazu werden die kommerziellen FM-Farbstoffe um eine optimale Detektion von Vakuolmembranen zu erreichen 6 bis 24 h auf Pflanzenzellen inkubiert.^[94]

Weiterhin ist die Detektion von HI-Viren durch Verbindung **13** möglich. In Abbildung 6.23 sind die kleinen HI-Viren (100 nm) noch als Punkte zu erkennen.

Verbindung **3** und **15**:

Die Fluorophore **3** und **15** weisen eine ähnliche *in vivo* Selektivität wie **13** auf. Mit beiden Fluorophoren ist die Detektion von Membranbereichen in lebenden Zellen möglich. Die Diffusion von **3** in die Zellen ist im Vergleich zu **13** und **15** langsamer. Zu Beginn der Inkubation lagert sich der Farbstoff hauptsächlich an die Plasmamembran und diffundiert dann ins Zellinnere. Abbildungen 6.23 bis 6.25 zeigen CLSM-Aufnahmen von diversen, lebenden oder fixierten Zelllinien, die mit **15** und **3** markiert wurden.

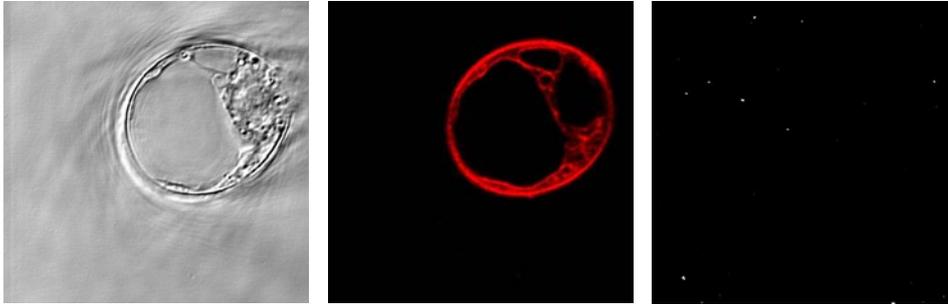


Abb.6.22: DIC-Aufnahme (links) von einer lebenden WT-MDB-Zelle und der dazugehörige CLSM-Aufnahme (mitte); gefärbt mit $10\ \mu\text{M}$ **13** bei RT, für 15 min. Rechts CLSM-Aufnahme von nicht infektiösen HI-Viren, markiert mit $50\ \mu\text{M}$ **13** bei RT für 10 min.

langsamer. Zu Beginn der Inkubation lagert sich der Farbstoff hauptsächlich an die Plasmamembran und diffundiert dann ins Zellinnere. Abbildungen 6.23 bis 6.25 zeigen CLSM-Aufnahmen von diversen, lebenden oder fixierten Zelllinien, die mit **15** und **3** markiert wurden.

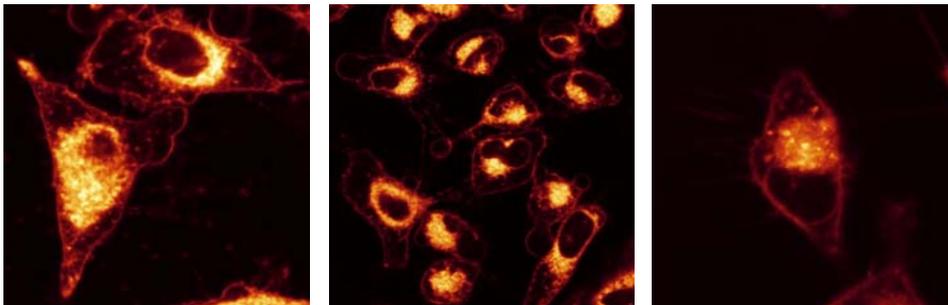


Abb.6.23: CLSM-Aufnahmen von lebenden HeLa-Zellen inkubiert mit $7,5\ \mu\text{M}$ **15** (links und mitte) und $10\ \mu\text{M}$ **3** (rechts).

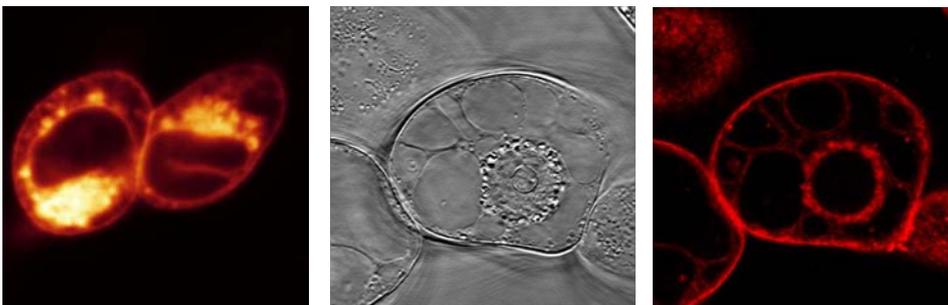


Abb.6.24: CLSM-Aufnahme von lebenden LnCAP-Zellen inkubiert mit $7,5\ \mu\text{M}$ **15** (links) und DIC- (mitte) bzw. CLSM-Aufnahme (rechts) von WT-MDB-Zellen mit $10\ \mu\text{M}$ **15** (rechts).

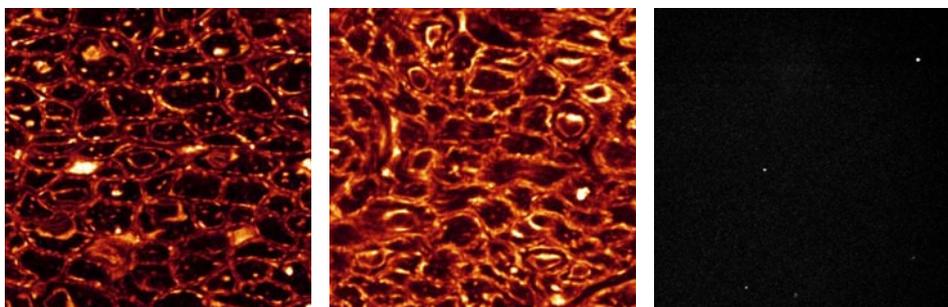


Abb.6.25: CLSM-Aufnahmen von menschlichen Dünndarmgewebeschnitten (links: nativ; mitte: Formaldehyd-fixiert) inkubiert mit 10 μM **15** bei RT für 3 min. Rechts CLSM-Detektion von HI-Viren gefärbt mit 50 μM **15** bei RT für 10 min.

Verbindung 12:

Verbindung **12** weist in lebenden humanen und pflanzlichen Zellen eine hohe Affinität zum Zellkern auf, wobei der Farbstoff bei den Pflanzenzellen auch die starre Zellwand markiert (Abb.6.27). Trotz der strukturellen Verwandtschaft entspricht das Markierungsmuster von **12** im Zellkern nicht der von DRAQ5 (Abb.6.26).

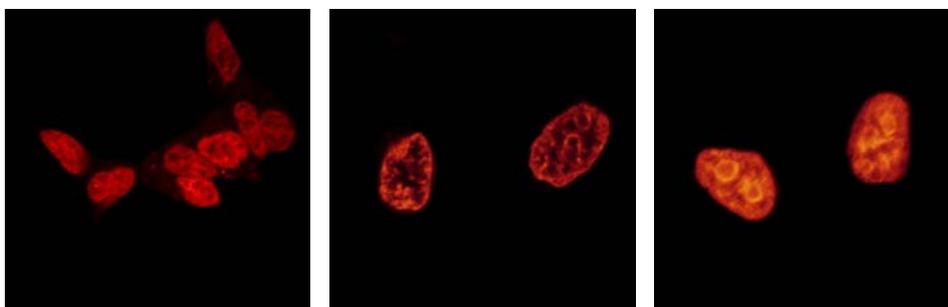


Abb.6.26: CLSM-Aufnahmen von lebenden LnCAP- (links) und HeLa-Zellen (mitte) gefärbt mit 10 μM **12**. Rechts CLSM-Aufnahme von HeLa-Zellen inkubiert mit 10 μM DRAQ5.

Verbindung **12** lokalisiert im Zellkern in der Peripherie der Nucleoli, während DRAQ5 die Nucleoli bevorzugt. Im Zellkern-Färbemuster von **12** sind bestimmte Strukturen zu erkennen, die mit den kommerziellen Interkalationsfarbstoffen wie z.B. DAPI und Hoechst33342 nicht beobachtet werden. **12** könnte eine hohe Affinität zu den Proteinen des Chromatins besitzen. Weiterhin nimmt die Photostabilität des Fluorophors verglichen mit DRAQ5 und **13** ab, möglicherweise bedingt durch die Dialkylsubstitution der arylgebundenen Aminogruppe.

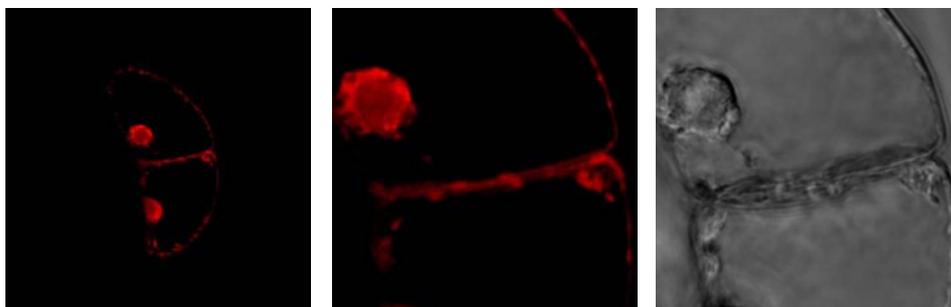


Abb.6.27: CLSM-Aufnahmen von lebenden BY2-Zellen (links und mitte) gefärbt mit 10 μM **12**. Rechts zeigt die zum mittleren Bild gehörende DIC-Aufnahme.

Die Aufnahme von **12** in den Zellkern könnte über einen aktiven Transport stattfinden. In fixierten HeLa-Zellen kann der Farbstoff die Zellkernmembran nicht effektiv durchdringen und verteilt sich unspezifisch im Cytoplasma, hauptsächlich im Bereich des *Nuclear Envelopes* (Abb.6.28).

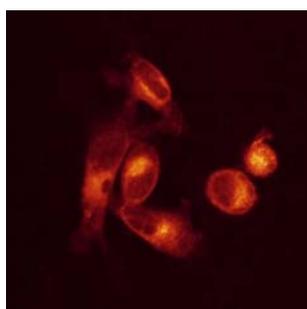


Abb.6.28: CLSM-Aufnahme von fixierten HeLa-Zellen inkubiert mit 10 μM **12**.

Verbindung 4, 10, 11:

Die Fluorophore **4**, **10** und **11** zeigen eine weniger ausgeprägte Selektivität für bestimmte Organellen in lebenden Zellen. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit zu DRAQ5 ist der monosubstituierte Farbstoff **4** nicht kernselektiv. Verbindung **4** diffundiert sehr schnell durch die Zellkernmembran und bildet überall in der Zelle Aggregate. Die Markierung des Fluorophors konzentriert sich vor allem im *Nuclear Envelope*, im Zellkern und der Plasmamembran (Abb.6.29).

Verbindung **10** und **11** verteilen sich recht homogen im Cytoplasma, und der Zellkern wird schwach angefärbt (Abb. 6.30).

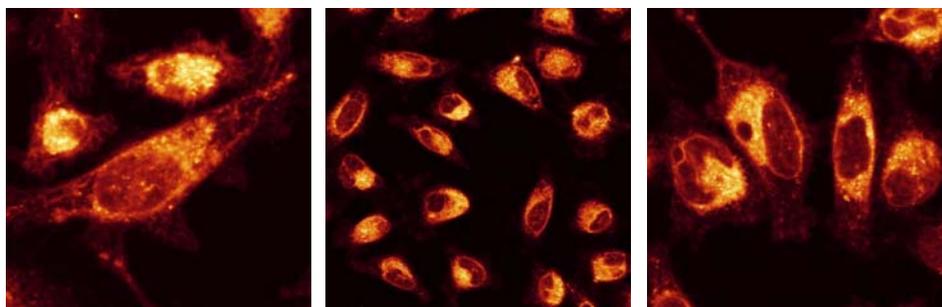


Abb.6.29: CLSM-Aufnahmen von lebenden HeLa-Zellen gefärbt mit 5 μM **4**. Laserlinie: 561 nm, Laserintensität: 100 %.

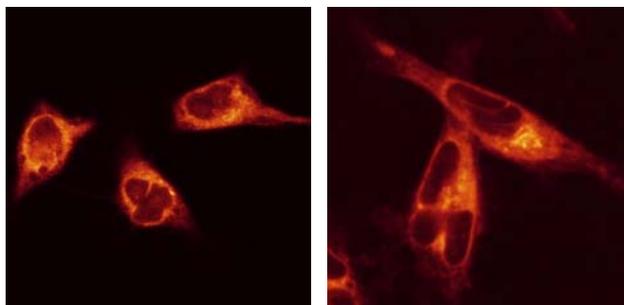


Abb.6.30: CLSM-Aufnahmen von lebenden HeLa-Zellen gefärbt mit 10 μM **11** (links) und mit 5 μM **10** (rechts). Laserlinie: 561 nm, Laserintensität: 100 %.

6.3.2 Bestätigung der Membranselektivität von **13** und **15** durch Kolokalisation mit anderen Farbstoffen

Die Ergebnisse der *in vivo* Färbungen legen nahe, dass die Fluorophore **13** und **15** mit den Membranen der Zellen assoziieren. Zur Überprüfung dieser Aussage wurden Kolokalisationsexperimente mit *WGA-FITC* (Fluoresceinisothiocyanat) und *DIOC₆* (3,3'-Dihexyloxycarbocyaniniodid) durchgeführt. *Wheat-germ-agglutinin* (WGA) ist ein Glycoprotein (Lectin), das an spezifische Glykokonjugate wie *N*-Acetylneuraminsäure, *N*-Acetylglucosamin, Membranglycoproteine, Chitin, Knorpel, Glucosaminglycane, Glycolipide und Glycoproteine mit *N*-Acetylneuraminsäureresten bindet. Letztere befinden sich in den Membransystemen.^[44, 45] Das Protein ist jedoch auf den *in vitro* Gebrauch eingeschränkt. An lebenden Zellen kann nur die Plasmamembran nachgewiesen werden, da das Proteinfarbstoffkonjugat diese nicht durchdringen kann. An fixierten Zellen markieren *WGA*-Konjugate auch innere Membranen.^[44,45] Hierzu wurden die

HeLa- und LnCAP-Zellen mit den jeweiligen Fluorophoren *in vivo* inkubiert, danach fixiert und mit *WGA-FITC* angefärbt. Mit CLSM wird die jeweilige Fluoreszenz in zwei verschiedenen Wellenbereichen detektiert (Abb. 6.31 und Abb. 6.32).

Kolokalisation (gelbe Bereiche) ist deutlich zu erkennen, allerdings reichern sich **13** und **15** im Bereich des *Nuclear Envelopes* deutlich stärker als *WGA-FITC*.

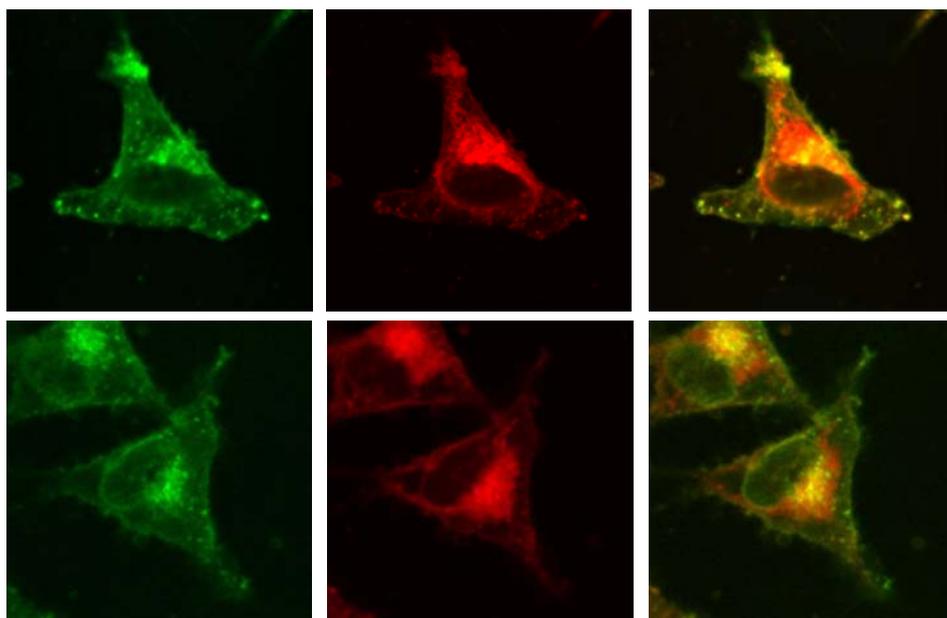


Abb.6.31: CLSM-Aufnahmen von fixierten HeLa-Zellen gefärbt mit *WGA-FITC* (links, Laserlinie 488 nm, Detektionsfenster 500-550 nm), mit **13** (mitte oben, Laserlinie 633 nm, Detektionsfenster 650-830 nm) und mit **15** (mitte unten). Die rechten Aufnahmen zeigen die Überlagerung beider Kanäle.

Die Assoziation von **13** mit dem Endoplasmatischen Retikulum wurde durch *in vivo* Kolokalisation mit DIOC_6 bestätigt (Abb.6.33). DIOC_6 ist ein Dialkylcarbocyaninfarbstoff, der zwei C_6 -Alkylketten trägt. DIOC_6 ist im Vergleich zu anderen DI-Farbstoffen membranpermeabel und markiert vor allem, wenn es in geringen Konzentrationen ($0,1\text{-}0,5\ \mu\text{M}$) und mit kurzer Inkubation (1-5 min) auf die Zellen appliziert wird, die Mitochondrien. Erst bei höheren Konzentrationen findet die Assoziation des Fluorophors mit dem Endoplasmatischen Retikulum statt.^[95] In den Bereichen des *Nuclear Envelopes* wird eine Kolokalisation der beiden Fluorophore **13** und DIOC_6 beobachtet. Die beiden Fluorophore visualisieren das Endoplasmatische Retikulum

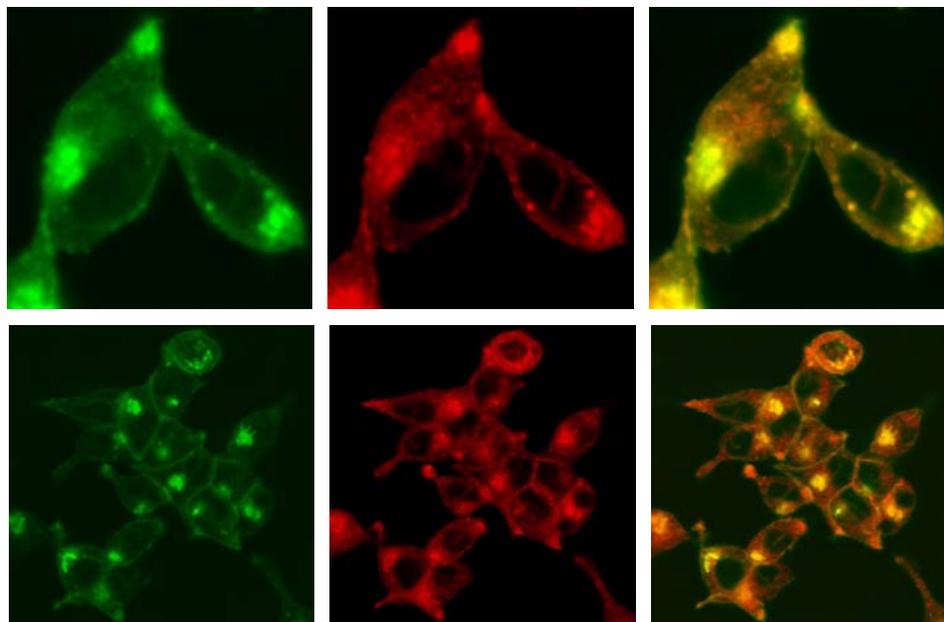


Abb.6.32: CLSM-Aufnahmen von fixierten LnCAP-Zellen gefärbt mit *WGA-FITC* (links, Laserlinie 488 nm, Detektionsfenster 500-550 nm), mit **13** (mitte oben, Laserlinie 633 nm, Detektionsfenster 650-830 nm) und mit **15** (mitte unten). Die rechte Aufnahmen zeigen die Überlagerung beider Kanäle.

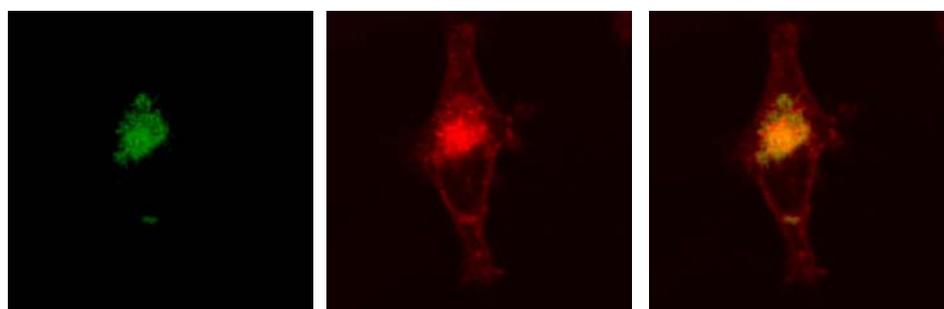


Abb.6.33: CLSM-Aufnahmen einer lebenden HeLa-Zelle gefärbt mit 1 μM DIOC_6 (links, Laserlinie 488 nm, Detektionsfenster 500-550 nm), mit 10 μM **13** (mitte, Laserlinie 633 nm, Detektionsfenster 650-830 nm). Die rechte Aufnahme zeigt die Überlagerung beider Kanäle.

6.3.3 Bestimmung der Zytotoxizitäten von 13 und 15

Eine Anwendung für das zelluläre Imaging setzt eine höchstens geringe Zytotoxizität voraus. Hierfür wurden Proliferationsexperimente mit den Fluoro-

phoren **13** und **15** bei HeLa- und LnCAP-Zellen durchgeführt. Proliferationsreihen analysieren die Teilungsrate der Zellen und liefern Rückschlüsse auf die Vitalität.

Aus den Diagrammen 6.34 mit den Aminoanthrachinon-Farbstoffen wird deutlich, dass beide Verbindungen in den Arbeitskonzentrationen zwischen 5 μM und 10 μM das Wachstum der HeLa-Zellen kaum beeinträchtigen. Ab einer 15 μM Konzentration von **15** wird die Zellteilung stark gehemmt, und der Farbstoff wirkt toxisch. Aus den Proliferationsreihen mit den LnCAP-Zellen konnten ähnliche Ergebnisse erhalten werden.

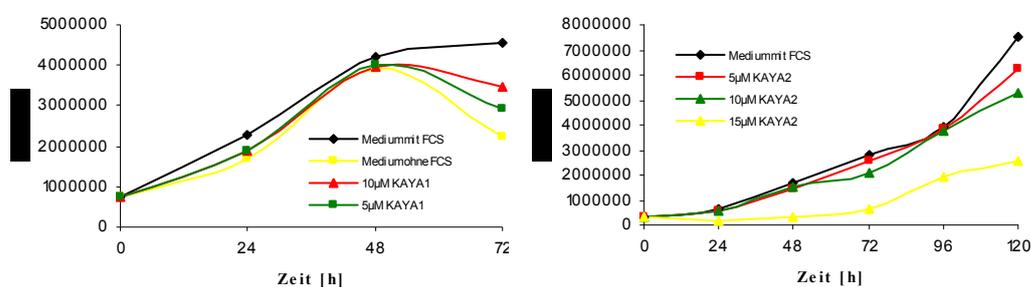


Abb.6.34: Proliferationsreihen von HeLa-Zellen inkubiert mit unterschiedlichen Konzentrationen von **13** (links) und **15** (rechts). Bestimmung der Zellzahl alle 24 h (Neubauerzählkammer).

6.3.4 Vergleich der Photostabilität von **15** und DID

Eine hohe Photostabilität der Fluorophore spielt für deren Einsatz in der Fluoreszenzmikroskopie eine sehr wichtige Rolle.^[96, 97] Durch den Einsatz von photostabilen Fluorophoren ist es möglich, die Emission der Verbindungen über einen längeren Zeitraum zu beobachten, um z. B. Stoffwechselprozesse in lebenden Zellen analysieren zu können.

Die Photostabilität von **15** und DID wurde verglichen. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit den jeweiligen Verbindungen inkubiert und mit dem CLSM alle 10 sec. auf einer xy-Ebene für 5 min belichtet (Abb.6.35).

DID markiert selektiv die Plasmamembranen lebender Zellen und wird als „photostabiler“ Fluorophor vermarktet.^[98, 99] Bereits nach 3 min (18 mal) Bestrahlen ist die Emission von DID jedoch ca. um die Hälfte gesunken, und am Ende des Bestrahlens ist fast keine Fluoreszenz zu detektieren, während die Fluoreszenzintensität von **15** nicht merklich abnimmt.

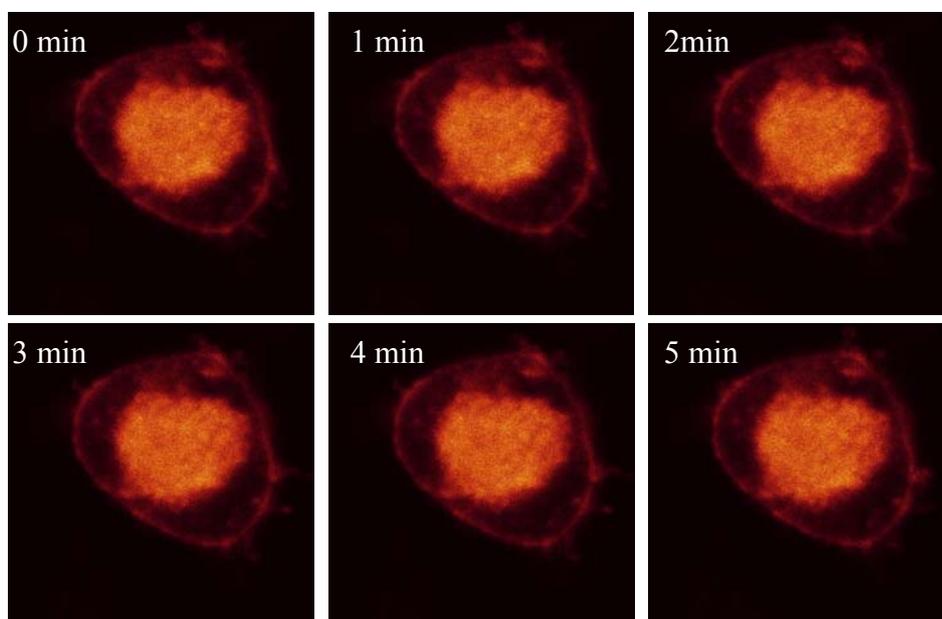


Abb.6.35: CLSM-Zeitaufnahmen (jede Minute) einer lebenden HeLa-Zelle gefärbt mit $7,5 \mu\text{M}$ **15** (Laserlinie 633 nm 100 %, Detektionsfenster 650-830 nm, PMT 540, Zoom 6,4, $I = 9,46 \text{ mW/cm}^2$, Detektionsdauer 5 min).

6.3.5 Einsatz von **12**, **13** und **19** in der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie

Die Bedeutung hochauflösender Fluoreszenzmikroskopietechniken für die biologische Grundlagenforschung nimmt rasch zu. Im Vergleich zu den konventionellen Fluoreszenzmikroskopen (CLSM) kann mit den neuen Fluoreszenzmikroskopiemethoden (4pi, STED, SMI, PALM usw.) die axiale Auflösung verbessert werden.^[97, 100] Dementsprechend werden in Zellen fluoreszenzmarkierte Strukturen oder Organellen besser sichtbar. Ein wesentlicher Nachteil bestimmter Mikroskopietechniken ist, dass für die Fluoreszenzdetektion hohe Laserintensitäten (z.B. bei STED und 4pi TypA) nötig sind. Solche Detektionstechniken sind auf photostabile Verbindungen beschränkt.

Aufgrund der sehr hohen Photostabilität eignen sich die Aminoanthrachinon-Fluorophore auch für solche Anwendungen. Markierungen mit **12**, **13** und **19** wurden eingesetzt für 4pi TypA und TypC Mikroskopie, STED-Mikroskopie, SMI-Vertico.

4pi-Detektionen TypC:

Abbildung 6.36 zeigt die 4pi-Detektion von fixierten, mit **13** gefärbten HeLa-Zellen im Einphotonen-Modus aus einer xy-Ebene. Die Plasma- und die Zellkernmembran sind deutlich zu erkennen.

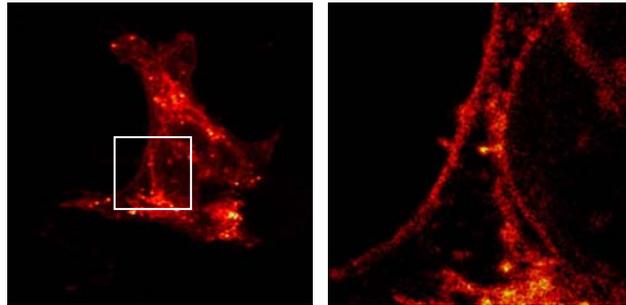


Abb.6.36: 4pi-Detektionen einer fixierten HeLa-Zelle gefärbt mit 5 μM **13** (Laserlinie 633 nm 100 %, Detektionsfenster 650-850 nm, 63 \times /1,2 HCX PL APO Wasser-Objektiv, PMT 590). Rechts: Ausschnittsvergrößerung.

4pi-Detektionen TypA:

4pi-Detektionen liefern Bilder mit stärkeren Kontrasten und besserer Auflösung als die Standard Detektionen mit einem CLSM. Abbildung 6.37 zeigt eine 4pi-Detektion im 2-Photonen Modus und eine CLSM-Aufnahme aus einer xz-Ebene eines vergrößerten Vesikels einer HeLa-Zelle, die mit **19** inkubiert wurde.

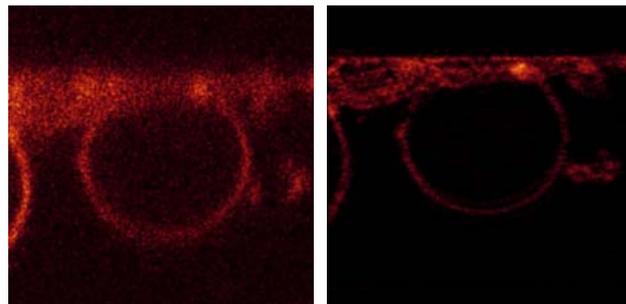


Abb.6.37: CLSM- (links) und 4pi-Detektion (rechts) einer fixierten HeLa-Zelle gefärbt mit 10 μM **19** (links: Laserlinie 488 nm 93 %, 100 \times /1,4 HCX PL APO Öl-Objektiv, Zoom 9,8, Pinhole 0,65; rechts: Laserlinie 790 nm, 100 \times /1,4 HCX PL APO Öl-Objektiv, Zoom 9,8, Pinhole 0,65).

Weiterhin erkennt man bei der 4pi-Detektion die typischen *Side-loops*, die durch Interferenz der beiden Objektive entstehen. Trotz einer Punkt-*Deconvolution* ist es schwierig die *side-loops* „wegzurechnen“, was zu einer Fehldeutung von Signalen führen kann.

STED-Detektion:

Bei der STED-Methode wird durch eine stimulierte Fluoreszenzemission der Probe im Randbereich die Anregungs-PSF vor der eigentlichen Fluoreszenzdetektion verringert und dementsprechend die Auflösung verbessert. Dieses Mikroskopiesystem ist auf photostabile Verbindungen, die lange Fluoreszenzlebensdauern (μs) aufweisen, beschränkt, da zusätzlich zum Anregungsstrahl ein zweiter, gepulster und rotverschobener Laserstrahl in die Probe eingestrahlt wird. STED-Aufnahmen wurden von mit **13** gefärbten HeLa-Zellen gemacht (Abb.6.38). Der Fluorophor wurde zuerst mit der Laserlinie 633 nm ($35 \mu\text{W}$) angeregt und die Emission des Farbstoffs wurde mit der Laserlinie 750 nm (130 mW) stimuliert.

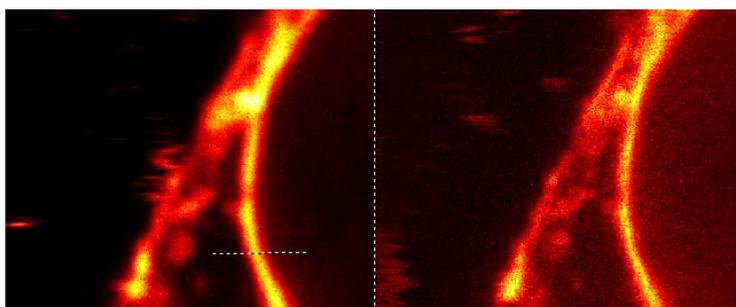


Abb.6.38: STED-Detektion einer fixierten HeLa-Zelle gefärbt mit $5 \mu\text{M}$ **13** (rechts erste Anregung und links stimulierte Emission).

13 zeigt eine sehr gute ca. 95 % ige STED-Effizienz. Mit konventionellen, photostabilen Fluorophoren erreicht man ca. 98 %. Mit STED ist es schwierig verbesserte Auflösungen bei der Detektion von gestreckten, dreidimensionalen Strukturen zu erreichen, da die stimulierte Emission über einen großen Bereich detektiert wird. Die Methode eignet sich vor allem für kleine, punktförmige Objekte.

SMI-Vertico-Detektionen:

Bei einem SMI wird im Unterschied zu den oben aufgeführten Mikroskopiemethoden die Emission der Fluoreszenzfarbstoffe über ein Weitfeldmikroskop mit einer CCD-Kamera detektiert. CCD-Kameras sind im Vergleich zu den Rasterein-

heiten der CLSM empfindlicher. Weiterhin verbessert diese Technik die Auflösung in der axialen Ebene, wobei die laterale Auflösung vernachlässigt wird.^[68] Ähnlich wie die STED-Technik eignet sie sich vor allem für die Größenmessung kleiner Objekte.

In den CLSM-Aufnahmen von **12** (Kapitel 6. 3.1) in lebenden HeLa-Zellen waren bestimmte Strukturen im Zellkern der Zellen zu erkennen. Durch SMI-Detektion werden diese Strukturen besser aufgelöst (Abb.6.39).

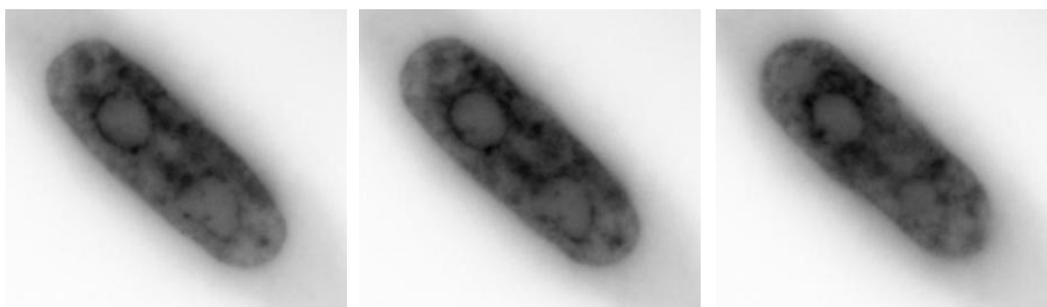


Abb.6.39: Dreidimensionale SMI-Detektion einer fixierten HeLa-Zelle gefärbt mit 10 μM **12** (Laserlinie 561 nm). Abgebildet sind unterschiedliche xyz-Ebenen.

6.3.6 Versuche zur Einsatz von **16** als Halo Tag-Liganden

Die kommerzielle HaloTag-Technologie ist eine Methode um selektive Proteinmarkierungen in lebenden Zellen zu realisieren. Die Vorteile dieser Technologie gegenüber der etablierten, gentechnischen Markierung mit fluoreszierenden Proteinen basieren auf der Variabilität der synthetischen Fluoreszenzfarbstoffe, die mit einem Chloralkan-Linker modifiziert werden und selektiv von Enzymen gebunden werden, welche gentechnisch mit dem Zielprotein verknüpft sind.^[46]

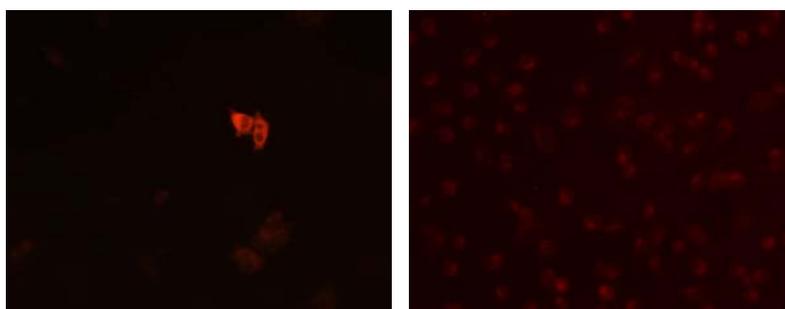


Abb.6.40: Fluoreszenzaufnahmen von lebenden HeLa-Zellen, in denen das Protein p65 nach der HaloTag-Methode markiert ist. Links TMR-HaloTag, rechts **16**.

In einer Kooperation mit der Firma Promega wurde der **16**, das im nahinfraroten Bereich des Spektrums fluoresziert, synthetisiert und HeLa-Zellen, die mit dem HaloTag-Protein p65 transfiziert wurden, damit inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Tetramethylrhodamin-HaloTag verwendet. Die gewünschten Ergebnisse wurden nur mit der Tetramethylrhodamin-Markierung erzielt, nicht aber mit **16** (Abb.40). Möglicherweise ist für diese Anwendung die Fluoreszenz des Anthrachinonfarbstoffs zu schwach.

6.3.7 *In vivo* Bestimmung von Zn^{2+} -Ionen durch **17**

Für die Detektion von Zn^{2+} -Ionen in lebenden Zellen sind diverse fluoreszierende Zinksensoren bekannt, die jedoch meistens bei Wellenlängen < 650 nm emittieren.^[23, 24, 25] Die Emission von **17** liegt dagegen bei > 650 nm und damit nicht im Eigenfluoreszenzbereich der Zellen. Weitere Vorteile, die die Sonde mit sich bringt, sind die leichte Zugänglichkeit und die effektive Zellaufnahme. Zur qualitativen Zn^{2+} -Detektion wurden HeLa-Zellen mit **17** für 10 min behandelt und die Emission der Sonde für 15 min mit CLSM beobachtet. Anschließend wurden die Zellen mit einer ZnSO_4 -Lösung inkubiert und gleichzeitig die Emissionsänderung der Sonde mit CLSM für 15 min detektiert (Abb.6.41).

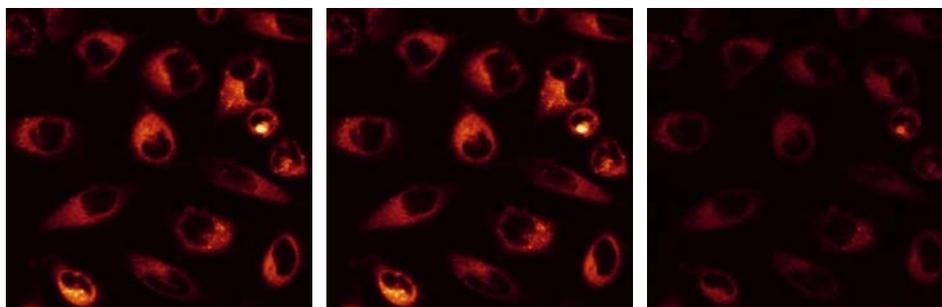


Abb.6.41: CLSM-Aufnahmen lebender HeLa-Zellen. Links: 10 μM **17**, am Anfang der Bestrahlung (Kontrolle); Mitte: 10 μM **17**, am Ende der Bestrahlung (Kontrolle); Rechts: 10 μM **17**, 150 μM ZnSO_4 , 15 μM Pyrithion, am Ende der Bestrahlung; Alle CLSM-Detektionen mit Laserlinie 633 nm 100 %, Detektionsfenster 650-830 nm, PMT 560, Zoom 1,9, Detektionsdauer 15 min.

Während der Zellaufnahme von ZnSO_4 ist ein stetiger Abfall der Emission des Sensors zu beobachten, der bei Kontrolle nicht zu beobachten ist. Bereits nach 15 min ist die Fluoreszenz der Sonde stark gesunken.

6.3.8 Visualisierung von Membranen mit einem Aminoanthrachinon-Proteinkonjugat

Die Spezifität der Fluoreszenzfarbstoffe kann durch Konjugationen an Proteine, die selektiv bestimmte Organellen, Proteine oder Substrukturen in fixierten Zellen erkennen, verbessert werden. Hierzu wurde ein *WGA-Aminoanthrachinon*-Biokonjugat entwickelt um spezifische Glykoproteine mit Sialinsäureresten, die sich im Membransystem der Zellen befinden, zu visualisieren.^[44, 45]

Die CLSM-Aufnahmen in Abbildung 6.42 vergleichen die Färbung von *WGA-Aminoanthrachinon* und von *WGA-FITC* in fixierten HeLa-Zellen. Beide Konjugate zeigen ähnliche Markierungsmuster. Die Intensität der Färbung ist jedoch mit *WGA-Aminoanthrachinon* wesentlich geringer, bedingt durch die schwächere Fluoreszenz des Aminoanthrachinons im Vergleich zu Fluorescein. Als *Label* für Markierungen mit Proteinen (z.B. Antikörper) erscheinen die Aminoanthrachinon-Farbstoffe eher ungeeignet.

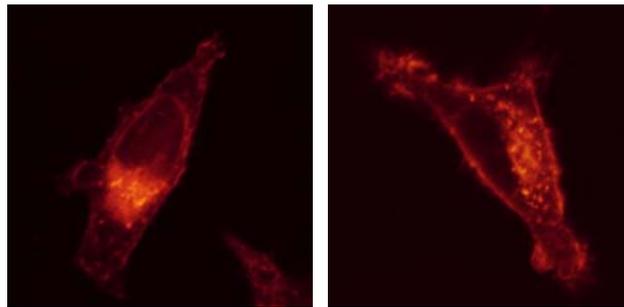


Abb.6.42: CLSM-Aufnahmen fixierter HeLa-Zellen gefärbt mit *WGA-Aminoanthrachinon* (links) und mit *WGA-FITC* (rechts). *WGA-Aminoanthrachinon*: Laserlinie 561 nm, Detektionsfenster 650-830 nm, Zoom 3,9, PMT 509; *WGA-FITC*: Laserlinie 488 nm, Detektionsfenster 500-550 nm, Zoom 4,5, PMT 327).

6.3.9 Spezifische Markierung der Zentromerregion von Chromosom 9 mit Farbstoff-PNS-Konjugaten

Carl Rabl und *Theodor Boveri* hatten bereits vor etwa hundert Jahren die Vorstellung formuliert, dass jedes Chromosom ein unbeschriebenes Territorium in einem tierischen Zellkern einnimmt.^[101] Der erste direkte Nachweis dieser Chromosomterritorien im Zellkern gelang erst Jahrzehnte später.^[102] Mittels Hybridisierung von gesamtgenomischer DNS in somatischen Hybrid-Zelllinien, welche ein

oder mehrere menschliche Chromosomen enthielten, wurde eine distinkte Organisation der Chromosomen in der Interphase nachgewiesen.^[101, 103]

Grundlage des heutigen Modells zur Beschreibung der Organisation des Zellkerns von Säugetieren ist, dass diese nicht zufällig ist. Die nicht zufällige Verteilung gilt für das Genom im Kern, für die Kernkompartimente sowie für die Kernproteine. Als Parameter zur Beschreibung der zwei- und dreidimensionalen Organisation von Strukturen im Kern wird die relative radiale Position herangezogen. Die radiale Position beschreibt die Lokalisation von Strukturen relativ zum Kernmittelpunkt oder zur Kernperipherie.^[102]

Zur quantitativen Bestimmung der relativen radialen Lage des dichtgepackten Zentromerbereichs von Chromosom 9 in humanen Zellen (HeLa) wurde zuerst die Spezifität der synthetisierten PNS-Sonden (TMR-PNS-Konjugat, Coumarin-PNS-Konjugat, **13**-PNS-Konjugat) über FISH-Experimente in der Metaphase mit der kommerziellen, Zentromer 9 spezifischen DNS-Sonde verglichen (Abb.6.43).

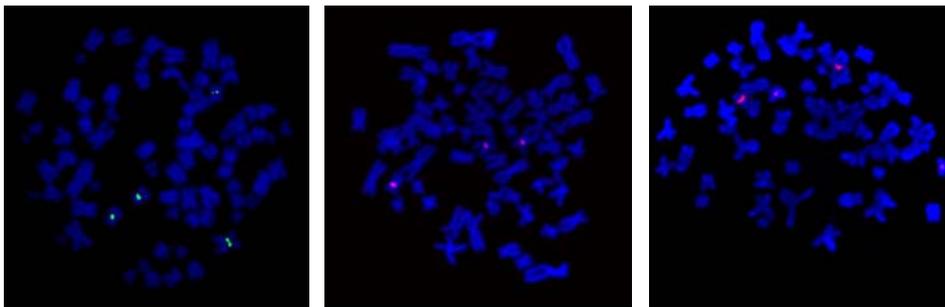


Abb.6.43: CLSM-Aufnahmen von Metaphasechromosomen von HeLa-Zellen nach Markierung mit Chromosom 9 spezifischen Farbstoff-PNS und DNS-spezifischen Konjugaten; (links, FITC-DNS-Konjugat; mitte, **13**-PNS-Konjugat; rechts, TMR-PNS-Konjugat).

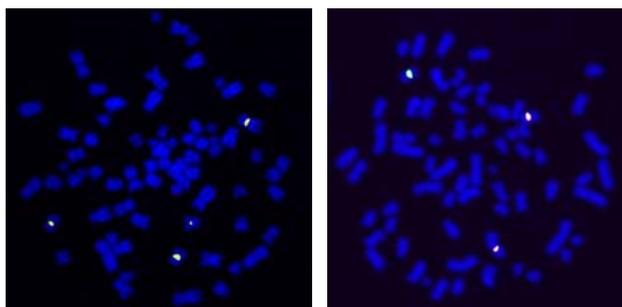


Abb.6.44: CLSM-Aufnahmen von Metaphasechromosomen von HeLa-Zellen (links, Kolokalisation von FITC-DNS-Konjugat mit TMR-PNS-Konjugat; rechts, Kolokalisation von TMR-PNS-Konjugat mit Coumarin-PNS-Konjugat).

Die FISH-Markierungen zeigen, dass das Chromosom 9 drei- oder vierfach in den HeLa-Zellkernen vorkommt. Diese Resultate wurden über weitere Hybridisierungen durch Kollokalisierungen der Sonden bestätigt (Abb.6.44).

Die Chromosomenzahl der verwendeten HeLa-Zellen variiert stark verglichen mit normalen eukaryotischen Zellen. Dies konnte man mit der Markierung des Zentromers des Metaphasechromosoms 9 feststellen. Um den Mittelwert der Hyperploidität der Chromosomen zu bestimmen, wurden 47 Metaphasen gezählt (Tabelle 6.3).

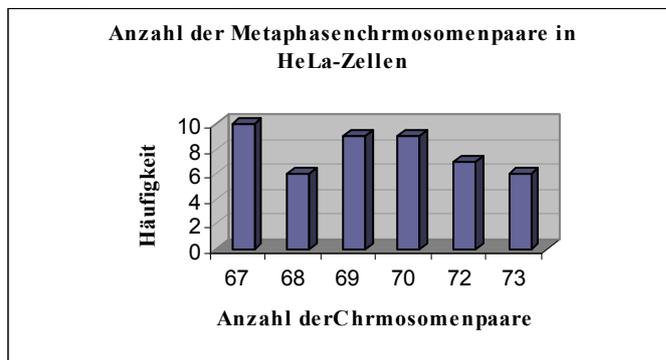


Tabelle 6.3: Balkendiagramm über die Häufigkeit der gezählten Metaphasechromosomenpaare.

Es zeigt sich, dass der Karyotyp der HeLa-Zelllinie triploid ist. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich der Karyotyp von HeLa Zellen bei der Kultivierung verändern kann. Die Triploidität des Karyotyps wird auf die normalen Chromosomenpaare bezogen. HeLa-Zellen können weitere Mutationen in den Chromosomen aufweisen, wie z. B. Deletionen, Insertionen, Inversionen und Translokationen. Deletionen in den Zentromerregionen könnten zu einem Verlust der repetitiven Sequenzen führen.^[104] Die Markierung der Zentromere des Chromosoms 9 in den Metaphasepräparationen zeigen, dass das Chromosom drei oder vier mal vorhanden ist. Um quantitative Aussagen zu machen, sollte ein *Multi Colour FISH*-Experiment mit den Chromosompräparationen durchgeführt werden. Die FISH-Experimente der Zentromerregion von Chromosom 9 in den Interphase-Zellkernen bestärken die Ergebnisse aus den Metaphasen-Markierungen (Abb.6.45).

Im nächsten Schritt wurde die Hybridisierung der PNS-Sonden *in vivo* etabliert. Hierbei wurden die Konjugate TMR-PNS und Coumarin-PNS in die Zellkerne mikroinjiziert, die Zellen für 30 min, 2 h, 24 h oder für 26 h unter physiologischen Bedingungen inkubiert und anschließend mit Formaldehyd fixiert. Es wurden 20 Zellkerne nach 2 h und 35 Zellkerne nach 26 h detektiert. Für die statistische Auswertung wurden die Aufnahmen nach 26 h mit dem TMR-PNS-Konjugat verwendet, da bei den Zellkernen der Zeitreihe nach 2 h noch der

Injektionsbereich zu sehen war und dieser die mathematische Auswertung stört. Die detektierten Punkte zeigten bestimmte Verteilungsmuster in den Zellkernen. Durch den Vergleich der Anzahl und Lage der Spots in den Zellkernen konnten Aussagen über die Zellzyklusphasen gemacht werden. In Abbildung 6.46 sind vier Markierungen zu erkennen, was auf eine G_1 -oder S-Phase hinweist. In der G_2 -Phase ist der Chromosomensatz verdoppelt. Die jeweiligen Sonden wurden injiziert und die Zellen nach zwei stündiger Inkubation fixiert.

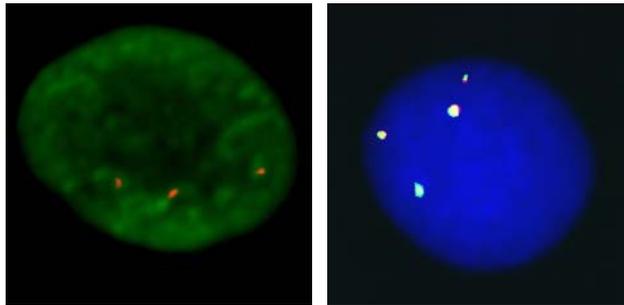


Abb.6.45: : CLSM-Aufnahmen von Interphasechromosomen von HeLa-Zellen nach Markierung mit Chromosom 9 spezifischen Farbstoff-PNS-Konjugaten (links, 13-PNS-Konjugat; rechts, Koloisation von TMR-PNS-Konjugat mit Coumarin-PNS-Konjuat).

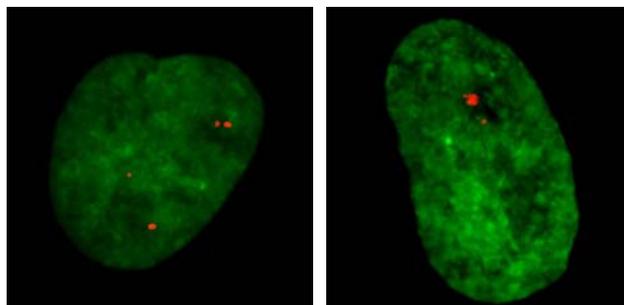


Abb.6.46: CLSM-Aufnahmen von TMR-PNS-Konjugat in Interphasechromosomen der fixierten HeLa-Zellen (links, G_1 -oder S-Phase; rechts, frühe G_2 -Phase).

Weiterhin wurde die Häufigkeit der detektierten Objekte (TMR-PNS-Konjugat) in 50 Zellkernen nach 30 min und nach 24 h Inkubation unter physiologischen Bedingungen mit anschließender Fixierung der Zellen bestimmt. Aus Tabelle 6.4 wird deutlich, dass nach 24 h die prozentuale Häufigkeit der Objektzahlen von 3 (32 %) und 4 (22 %) am größten ist. Nach 30 min Inkubation liegt die größte prozentuale Häufigkeit noch bei 1 (26 %) und 2 (20 %) Objekten.

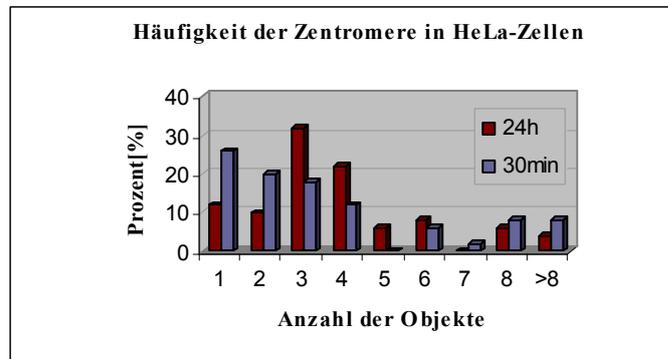


Tabelle 6.4: Balkendiagramme über die prozentuale Häufigkeiten der gezählten Objekte nach unterschiedlichen Inkubationszeiten der HeLa-Zellen.

Zum Nachweis, dass die detektierten Punkte in den Zellkernen keine Aggregate oder unspezifische Wechselwirkungen z.B. Assoziationen mit Proteinen sind, wurden die Konjugate TMR-PNS und Coumarin-PNS in die Kerne gleichzeitig injiziert und nach 24 h fixiert. In Abbildung 6.47 sind zwei Zellkerne gezeigt in denen die Kolokalisation der beiden Konjugate deutlich wird. Die gelben Markierungen zeigen die Kolokalisation der grünen Emission von Coumarin und der roten Emission von TMR.

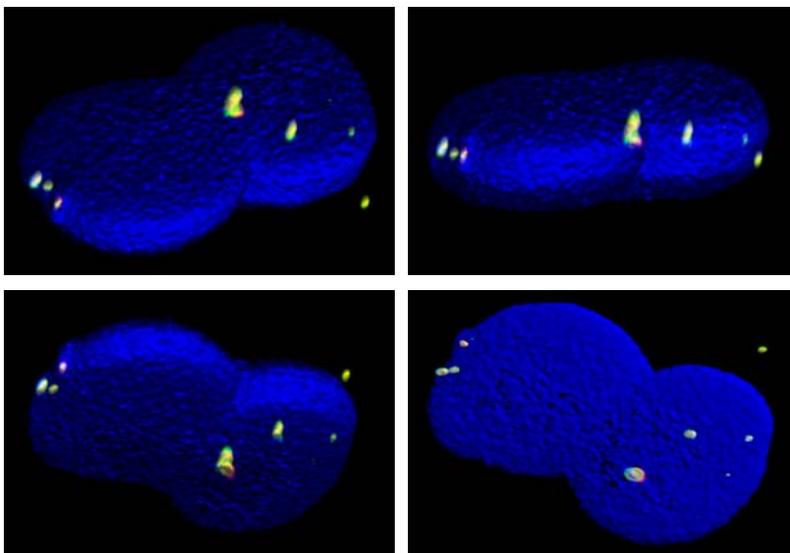


Abb.6.47: Kolokalisation von (gelb) TMR-PNS (rot) und Coumarin-PNS (grün) auf den Chromosom 9-Zentromer im Zellkern von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation *in vivo* und anschließender Fixierung mit Formaldehyd.

Im Unterschied sind bei der Wechselwirkung der Sonden in den Interphase-FISH-Experimenten die Punkte wesentlich größer (Abb.6.48). In Standard-FISH-Experimenten wird die Ziel-DNS denaturiert. Hierbei können die Konjugate leicht an die Einzelstrang Sequenzen binden, während bei *in vivo* Hybridisierungen die DNS der Zentromerregionen in den Zellzyklusphasen G₀, G₁, G₂ und M häufig als Doppelstrang-DNS vorliegt und mit diversen Replikationsproteinen wie z.B. CENP-Proteine assoziiert ist. Nur in der Synthese-Phase zu Beginn der Replikation der DNS liegen bestimmte Bereiche als Einzelstrang vor.

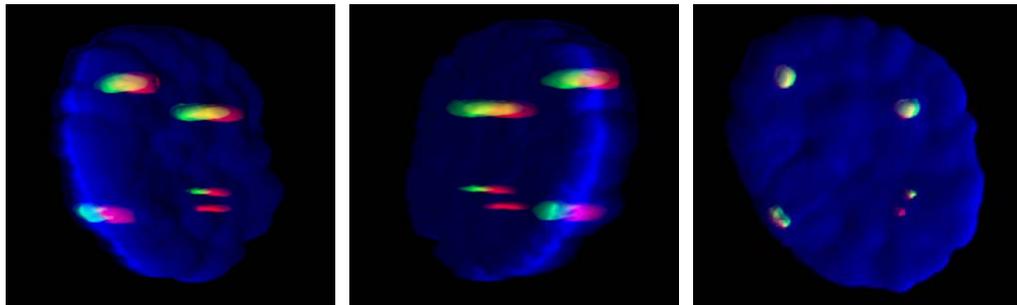


Abb.6.48: Kolokalisation von (gelb) TMR-PNS (rot) und Coumarin-PNS (grün) auf den Chromosom 9-Zentromer im Zellkern von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation *in vivo* und anschließender Fixierung mit Methanol/Eisessig.

Je nach Art der Fixierung kann sich die Struktur der Zellkerne verändern. Die größten strukturellen Veränderungen finden bei der Methanol/Eisessig-Fixierung statt. Die Zellkerne werden durch die Fixierung flacher, und die Morphologie der Oberfläche ist im Vergleich zu den Formaldehyd-fixierten Zellkernen stark verändert.

Zusätzlich wurden die Zentromerregionen auf ihre topologische Anordnung untersucht. Hierfür wurden die Radialverteilung der Zentromere relativ zum Zellkernschwerpunkt, die Distanz zwischen den Intensitätsschwerpunkten der markierten Zentromere und die normierten kumulativen Verteilungen berechnet.

Nach den statistischen Messwerten beträgt der Kernradius der HeLa-Zellen 10 μm . Betrachtet man die mittlere Distanz der Zentromere zum Kernmittelpunkt, so liegt diese zwischen dem 0.8- bis 0,98 fachen des Kernradius (Abb.6.49). Im Vergleich dazu liegen die Zentromerregionen des Chromosoms 9 in Lymphozyten nach Standard-FISH-Experimenten ebenfalls in diesem Bereich.

Die Häufigkeitsverteilung weist kurze absolute Distanzen zwischen den Intensitätsschwerpunkten der Objekte (Zentromer 9-Regionen untereinander) auf (Abb.6.50). Der häufigste Einzelwert liegt bei 1,8 μm .

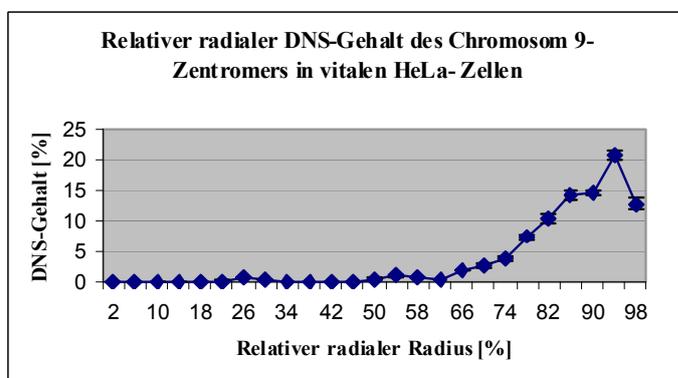


Abb.6.49: Auftragung der relativen Radialverteilung der Zentromere im Bezug auf den Zellkernschwerpunkt (= 0%).

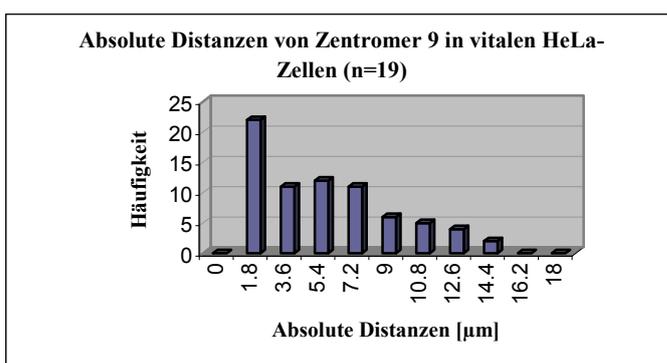


Abb.6.50: Häufigkeitsverteilung der absoluten Distanzen der Zentromere untereinander.

Aus den quantitativen Vital-daten wird deutlich, daß die HeLa-Zellen triploid sind, der Zellkern einen Radius von bis zu 10 µm aufweist und i.a. die Zentromere vom Chromosom 9 sehr dicht beieinander und in der Nähe der Zellkernmembran konserviert sind. Diese Resultate entsprechen den bekannten Zentromermarkierungen in fixierten Zellen (J.Solvei , persönliche Mitteilung).

6.3.10 Phototoxizitätsexperimente mit $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ und 19

$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ wird häufig als intrazelluläre Sauerstoffsonde eingesetzt. Ein wesentlicher Nachteil des Komplexes ist die erschwerte Zellpermeabilität. Bisher gibt es nur wenige Beispiele für Polypyridyl-Rutheniumkomplexe, die gut zellpermeabel sind, erreicht wird dies u.a. durch Liganden mit lipophilen Charakter.^[30]

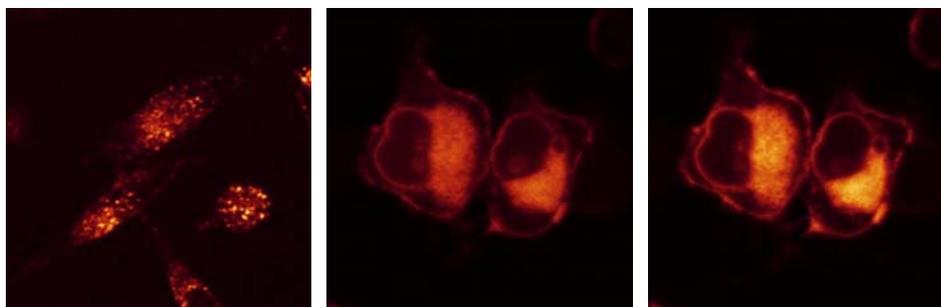


Abb.6.51: CLSM-Aufnahmen lebender HeLa-Zellen inkubiert mit den Ru-Konjugaten (links, 100 μM $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$, 6 h, $\lambda_{\text{ex.}} = 476$ nm, Detektionsfenster 650-830 nm; mitte, 10 μM **19**, 30 min, $\lambda_{\text{ex.}} = 476$ nm, Detektionsfenster 650-830 nm; rechts, 10 μM **19**, 30 min, $\lambda_{\text{ex.}} = 633$ nm, Detektionsfenster 650-830 nm).

Zellexperimente zeigen, dass der Komplex **19** in einer Konzentration von 10 μM innerhalb von 30 min von der Zelle effizient aufgenommen wird. Das Konjugat akkumuliert in der Plasma- bzw. Kernmembran und im Bereich des *Nuclear Envelopes* während $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ sich im Cytoplasma anreichert (Abb.6.51). Im Bereich des *Nuclear Envelopes* kolokalisiert **19** mit DIOC_6 .

Zur Untersuchung der Phototoxizität des Rutheniumkonjugats wurden die HeLa-Zellen mit dem Konjugat inkubiert und eine Stunde lang belichtet. Alle 15 Sekunden wurde zuerst ein DIC-Bild und direkt danach ein Fluoreszenzbild ($\lambda_{\text{ex}} = 476$ nm, $I = 1,5$ mW/cm^2 , PMT 650) aufgenommen. Abbildungen 6.52 zeigt die Start- und Enddetektionen.

Der Komplex zeigt eine sehr hohe Phototoxizität, die mit $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ nicht zu beobachten ist. Schon zu Beginn der Inkubation ändert sich bei Laserbelichtung die Morphologie der Zellen. Aus den DIC- und aus den Fluoreszenzaufnahmen erkennt man die verstärkte Bildung von Apoptosevesikeln und die Abschnürung dieser Vesikel sowie die Fragmentierung der Zellen.

Im nächsten Schritt wurde die Toxizität des Komplexes **19** anhand von Proliferationsexperimenten unter Lichtausschluss untersucht. Die Teilungsrate der Zellen wird in den Konzentrationsbereichen 5-15 μM nicht gehemmt. Die toxische Wirkung von **19** beruht auf also auf der Phototoxizität der Verbindung.

6.3.11 Quantifizierung der Zytotoxizität von **14**

Anthracycline, wie z.B. Mitoxantron oder Doxorubicin, werden in der Chemotherapie erfolgreich eingesetzt. Die Wirkmechanismen dieser Substanzen beruhen auf die Interkalation in die DNS oder auf der Hemmung der Topoisomerase.

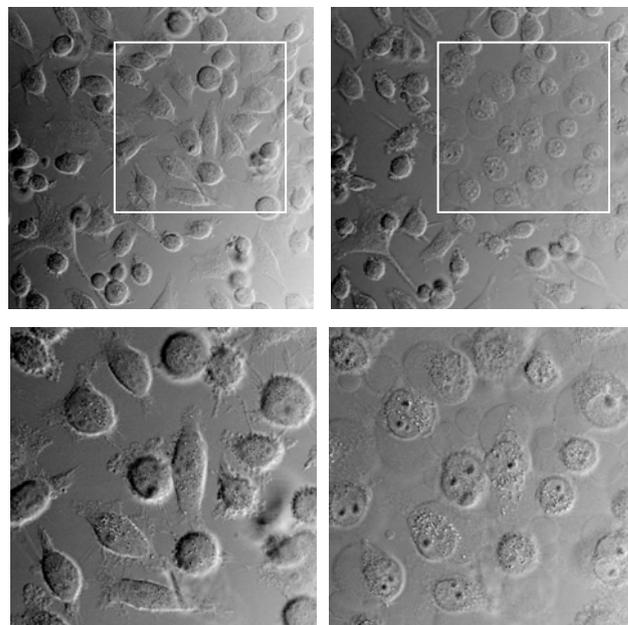


Abb.6.52: DIC-Aufnahmen lebender HeLa-Zellen inkubiert mit 10 μM , **19**, 30min. Oben: Übersichtsaufnahmen vor (links) und nach der Belichtung (rechts) der Zellen; unten: Belichtete Bereiche vor (links) und nach der Belichtung (rechts).

Der neu entwickelte Fluoreszenzfarbstoff **14** wirkt auf die Zellen im Vergleich zu den anderen Aminoanthrachinon-Farbstoffen besonders zytotoxisch.. Aus *in vivo* Zellmarkierungsexperimenten wird deutlich, dass der Farbstoff sich im Cytoplasma anreichert.

Die Quantifizierung der Zytotoxizität von **14** fand mit den Kits Cell Titer-Glo, Caspase-Glo 3/7 Assay, MultiTox-Glo Multiplex von der Firma Promega statt. Mit Hilfe von Cell Titer-Glo wird die Vitalität der HeLa-, LnCAP-, und VH7-Zellen quantifiziert (Abb.6.53). Apoptose- und Nekrosevorgänge werden durch die beiden anderen Assays bestimmt: Apoptose mit Caspase-Glo 3/7 Assay und Nekrose mit MultiTox-Glo Multiplex. Die Bestimmung der Vitalität durch Cell Titer-Glo erfolgt durch die indirekte Detektion von Adenosintriphosphat (ATP) über Luciferin und Luciferase.^[105] Erhöhte ATP-Produktion in lebenden Zellen ist ein Indiz für die Vitalität der Zellen. Die Detektion der Apoptose erfolgt durch die indirekte Bestimmung der Caspase3 und 7-Aktivität über Luciferin und Luciferase. Hierbei wird das mit der Peptidsequenz DEVD modifizierte Luciferin durch Caspase3 und -7 gespalten.^[106] Die Bestimmung der Nekrose erfolgt analog zum Caspase-Assay. Hierbei werden Proteasen, die durch Nekrosevorgänge akti-

viert sind, indirekt über das Substrat AAF-Luciferin detektiert.^[107]

HeLa-, LnCAP- und VH7-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von **14** inkubiert. Die Lumineszenzdetektion mit Caspase-Glo 3/7 Assay fand einen Tag lang alle 2 h und mit MultiTox-Glo Multiplex 12 h lang alle 2 h statt, während die Lumineszenz mit Cell Titer-Glo alle 2 h für 12 h und anschließend täglich für drei Tage gemessen wurde.

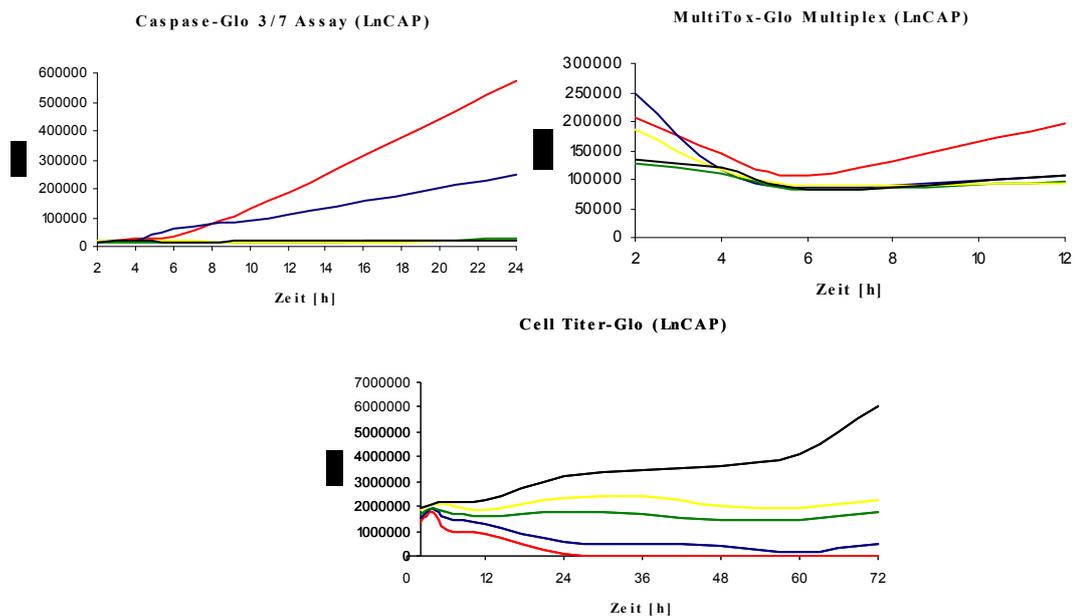


Abb.6.53: Detektion der Lumineszenz (RLU) von Luciferin mit Cell Titer-Glo, Caspase-Glo 3/7 Assay, MultiTox-Glo Multiplex bei unterschiedlichen Zeiten. LnCAP-Zellen inkubiert mit **14**: Rote Linie 7,5 μM , blaue Linie 5 μM , grüne Linie 2,5 μM , gelbe Linie 1 μM , schwarze Linie 0 μM (Kontrolle).

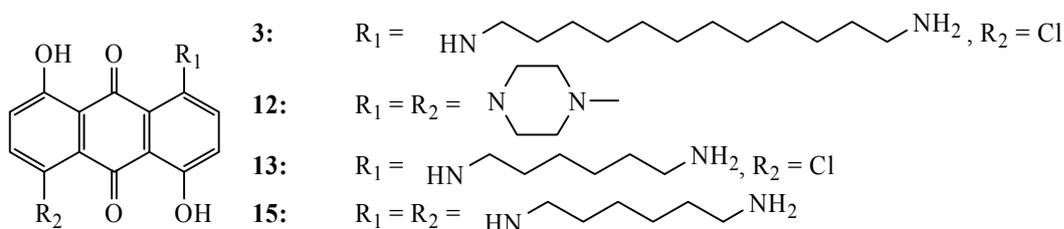
Bei einer Inkubationskonzentration von 5 μM **14** nimmt die Vitalität der Zellen (HeLa, LnCAP, VH7) stark ab. Ab einer Konzentration von 7,5 μM **14** sterben alle Zellen innerhalb weniger Stunden. Die Zytotoxizität von **14** beruht auf Apoptose. Bei allen Zelllinien werden durch die Inkubation mit **14** Caspase-Enzyme aktiviert. Nekrosevorgänge konnten nicht detektiert werden.

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden neue Aminoanthrachinon-Farbstoffe und ihre Biokonjugate dargestellt. Die Farbstoffe fluoreszieren im fernroten und nahinfraroten Bereich des optischen Spektrums. Da hier die biologische Hintergrundfluoreszenz gering ist, eignen sie sich gut für das zelluläre *Imaging* mit Fluoreszenzmikroskopie. In Abhängigkeit von der chemischen Struktur akkumulieren die Aminoanthrachinon-Fluorophore selektiv in subzellulären Kompartimenten, ermöglichen in Form ihrer Biokonjugate auch hochselektive Markierungen, sprechen auf biologisch wichtige Metallionen an oder wirken stark phototoxisch. Die wichtigsten neu entwickelten Sonden und ihre Anwendungen sind hier zusammengefasst:

- *In vivo*-selektive Fluoreszenzfarbstoffe

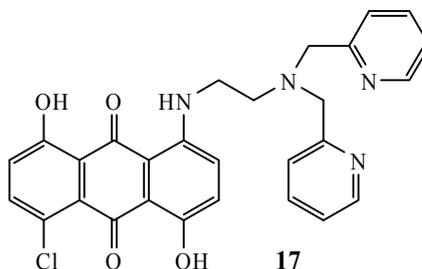
Die neu entwickelten Anthrachinonderivate **3**, **13** und **15** reichern sich selektiv in der Plasmamembran und dem *Nuclear Envelope* (Zellkernmembran, Endoplasmatisches Retikulum) lebender Zellen an, während Verbindung **12** eine hohe Affinität zum Zellkern aufweist.



Die leichte chemische Zugänglichkeit, die hohe chemische und hohe Photostabilität und die einfache Anwendung sind die wesentlichen Vorteile dieser Fluorophore im Vergleich zu kommerziellen *in vivo*-selektiven Fluoreszenzfarbstoffen. Die Fluorophore sind auch für die modernen hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopiemethoden (4pi, STED, SMI-Vertico) geeignet.

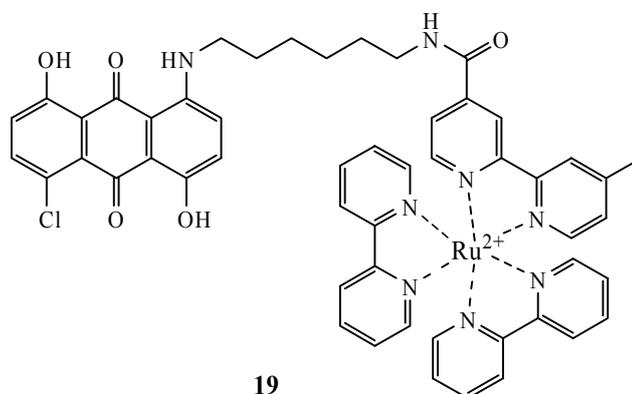
- Metallbindende Sonden

Zur fluorometrischen Bestimmung von intrazellulären Zn^{2+} -Ionen wurde **17** entwickelt.



Die qualitative Bestimmung der Zn^{2+} -Ionen erfolgte durch die Emissionsabnahme des nahinfrarot emittierenden Fluorophors infolge der Komplexbildung von Zn^{2+} -Ionen über die Bispicolylamineinheit. **17** absorbiert im Vergleich zu den bekannten Zinksensoren im roten Bereich des Spektrums, somit liegt die Emission der Sonde nicht im Eigenfluoreszenzbereich der Zellen. Weitere Vorteile, die die Sonde mit sich bringt, sind die leichte Zugänglichkeit und die effektive Zellaufnahme.

Aufgrund der zellulären, phototoxischen Eigenschaften von Trisbipyridylrutheniumkomplexen wurde ein mit **13** funktionalisierter Trisbipyridylrutheniumkomplex synthetisiert.

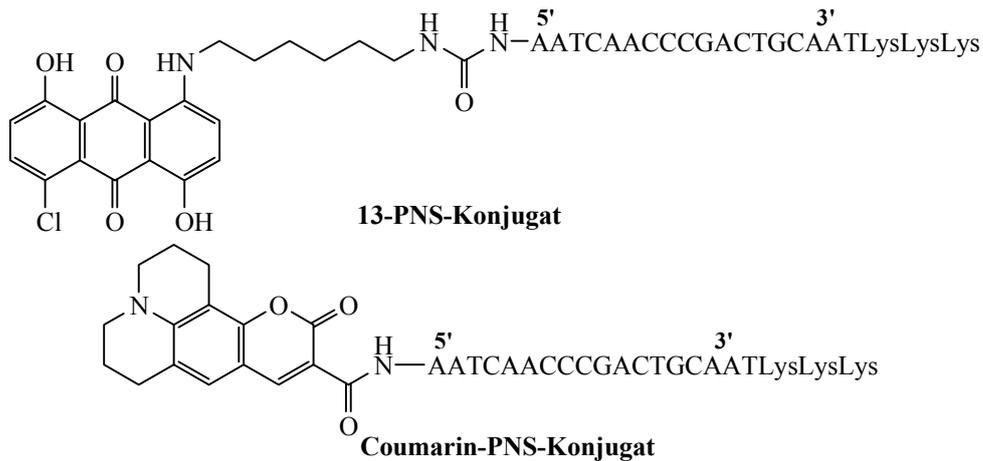


Das Konjugat zeigt im Vergleich zu $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ eine erhöhte Phototoxizität trotz geringerer Produktion von Singulett-Sauerstoff, eine erhöhte Zellpermeabilität und eine subzelluläre Verteilung, die vom Anthrachinon dirigiert wird.

- Biokonjugate (Protein- und Peptidnukleinsäurekonjugate)

Das *WGA*-Aminoanthrachinon-Biokonjugat stellt ein Beispiel aus dem Bereich der Immunofärbungen dar, um spezifische Glykoproteine mit Sialinsäureresten, die sich im Membransystem der Zellen befinden, zu visualisieren. In Folge der schwachen Emission des Fluorophors eignet sich das Fluorophor nur eingeschränkt zur Immunofluoreszenz Detektion.

Über sequenzspezifische DNS-Markierungen mit PNS-Farbstoffkonjugaten (TMR-PNS-Konjugat, Coumarin-PNS-Konjugat, **13**-PNS-Konjugat) wurde mit Hilfe von Fluoreszenz *in situ* Experimenten und mittels Mikroinjektionstechnik die topologische Anordnung der Zentromerregion von Chromosom 9 in Zellen bestimmt.



Hierbei wurden die relative Radialverteilung, sowie die absoluten Distanzen der Zentromere 9 quantitativ auf den Kerndurchmesser ermittelt.

- Zytotoxische Verbindungen

Zwei etablierte und bekannte Zytostatika auf Anthrachinonbasis sind Doxorubicin und Mitoxantron. Auch **14** zeigt eine hohe zytostatische Wirkung auf diverse Zellen. Die zelluläre Toxizität der Verbindung wurde mit Hilfe von indirekten Zytotoxizitätsassays quantifiziert. Die toxische Wirkung von **14** beruht auf Apoptose. Nekrosevorgänge wurden mit der Verbindung nicht beobachtet.

8 Literaturverzeichnis

- [1] <http://www.gfmu.de/artikel/berichte/floureszenz/index.html>
Stand: 14.05.08.
- [2] Trimark Publications LLC, *Microscopy Markets*. January **2005**.
- [3] R. Tsien et al., *Annu. Rev. Biochemistry*, **1998**, *67*, 509-544.
- [4] J. Share, *Colorants and Auxilliaris*, **2002**, 2. Edition.
- [5] B. Walter, *Lehrbuch der organischen Chemie*, **2004**, S. Hirzel, 24. Auflage.
- [6] P. J. Smith et al., **1999**, *WO 99/65992*.
- [7] P. J. Smith et al., *Cytometry*, **2000**, *40*, 280-291.
- [8] K. L. Njoh et al., *Cytometry*, **2006**, *96A*, 805-814.
- [9] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature*, **1974**, *248*, 765.
- [10] B. Alberts, *Molekularbiologie der Zelle*, **1995**, VCH.
- [11] L. Streyer, *Biochemie*, **1999**, Spektrum Verlag.
- [12] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature*, **1953**, *171*, 737-738.
- [13] R. Knippers, *Molekulare Genetik*, **1990**, Georg Thieme Verlag.
- [14] A. Ray, B. Nordén, *FASEB J.*, **2000**, *14*, 1041-1060.
- [15] P. E. Nielsen, M. Engholm, *Peptide Nucleic Acids: Protocolls and Applications*, **1999**, Horizon Scientific Press.
- [16] B. Armitage et al., *Nucl. Acid Res.*, **1998**, *26*, 715-720.
- [17] P. E Nielsen, *Acc. Chem. Res.*, **1999**, *32*, 624-630.
- [18] E. Uhlmann et al., *Angew. Chem.*, **1998**, *110*, 2954-2983.
- [19] H. J. Tanke, R. W. Dirks, *The EMBO Journal*, **2003**, *22*, 6631-6641.
- [20] E. Bishop, *Indicators*, **1972**, Pergamon London.
- [21] A. E. Kaifer, M. Gomez-Kaifer, *Supramolecular Electrochemistry*, VCH.
- [22] A. P. de Silva, *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 1515-1565.
- [23] T. Nagano et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 10650-10651.
- [24] T. Nagano et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 12399-12400.
- [25] C. J. Fahrni, T. V. O'Halloran, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 11448-11458.
- [26] Hollemann, Wiberg, *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, Walter de Gruyter, Berlin, **2007**, 102. Auflage.
- [27] M. A. J. Rodgers et al., *J. Phys. Chem.*, **1994**, *98*, 1145-1150.
- [28] M.-A. Mycek et al., *Optics Express*, **2006**, *14*, 4412-4426.
- [29] M.-A. Mycek et al., *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **2003**, *36*, 1689-1695.
- [30] C. A. Puckett, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 46-47.

- [31] J. W. Dobrucki, *J. Photochem. Photobio. B*, **2001**, *65*, 136-144.
- [32] J. Koeller, M. Eble, *Clinical pharmacy*, **1988**, *7*, 574-581.
- [33] B. M. Lippert, *Lasers in Surgery and Medicine*, **2004**, *34*, 391-397.
- [34] K. Reszka, *Biophysical Chemistry*, **1990**, 313-323.
- [35] W. Kaim, B. Schwederski, *Bioanorganische Chemie*, Teubner, Stuttgart, **2005**, 4. Auflage, 369-378.
- [36] B. K. Keppler et al., *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, *100*, 891-904.
- [37] B. K. Keppler, M. R. Berger, *Metal-Based Drugs*, **1996**, *3*, 15-23.
- [38] L.-N. Ji, *Metal-Based Drugs*, **2000**, *7*, 343-348.
- [39] M. Brindell et al., *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 7298-7304.
- [40] D. Nelson, M. Cox, *Lehninger Biochemie*, Springer, Berlin Heidelberg, **2005**, 3. Auflage.
- [41] G. Löffler, P. E. Petrides, P. C. Heinrich, *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, **2007**, 8. Auflage.
- [42] Neil A. Campbell, *Biologie*, Spektrum Akademischer Verlag.
- [43] Linder, *Allgemeine Biologie*, Schroedel Verlag.
- [44] M. Monsigny et al., *Eur. J. Biochem.* **1980**, *104*, 147-153.
- [45] C. S. Wright, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 14345-14352.
- [46] G. V. Los et al., *Cell Notes*, **2005**, *11*, 2-6.
- [47] M. Hausmann, C. Cremer, *Cellular Oncolgy*, **2004**, *26*, 119-124.
- [48] M.L. Pardue, J.G. Gall, *PNAS*, **1969**, *63*, 378-383.
- [49] A.L. Olins, D.E. Olins, *Science*, **1974**, *183*, 330-332.
- [50] J.T. Finch, A. Klug, *PNAS*, **1976**, *73*, 1897-1901.
- [51] C. Robert et al., *PNAS*, **1994**, *91*, 11621-11625.
- [52] J.W. Sedat et al., *J. Cell. Biol.*, **1994**, *125*, 1-10.
- [53] D. Slavov, et.al., *Gene*, **2000**, *247*, 215-232.
- [54] B. Alberts, *Molekularbiologie der Zelle*, **1995**, VCH.
- [55] K. Hengstenberg, *Dissertation*, Ruhr-Universität Bochum, **1999**.
- [56] J. Trapp, *Disseration*, Forschungszentrum Karlsruhe, **2002**.
- [57] http://www.ukammann.de/apoptose/Apoptose_historisch/apoptose_historisch.html. Stand: 19.05.08.
- [58] P. W. Artkins, *Physikalische Chemie*, **2001**, VCH.
- [59] B. Valeur, *Molecular Fluorescence*, **2002**, VCH, **2002**, 1. Auflage.
- [60] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, **1983**, Plenum Press, New York.
- [61] G Wedler, *Lehrbuch der physikalischen Chemie*, **2004**, VCH.
- [62] J. Huheey, E. Keiter, R. Keiter, *Anorganische Chemie*, **2003**, Walter de Gruyter, 3. Auflage.
- [63] M. Minsky et al., **1961**, *US Patent 3013467*.
- [64] P. Blom, G.J. Barkehoff, P. Barends, *J. Microsc.*, **1979**, *117*, 219-232.
- [65] T. Cremer, C. Cremer, *Microscopia Acta*, **1978**, *81*, 31-44.

- [66] J. Spatz, *Skript zur Vorlesung „Biophysikalische Chemie“*, Sommersemester **2004**, Mikroskopie.
- [67] H. Mathée, *Dissertation: Hochpräzisionsmikroskopie mit räumlicher strukturierter Beleuchtung und Zweiphotonenanregung*, **2006**.
- [68] C. Wagner, U. Spöri, C. Cremer, *Optik*, **2005**, 116, 15-21.
- [69] M. Schrader et al., *Biophys. Journal*, **1998**, 75, 1659-1668.
- [70] S. W. Hell, E. H. K. Stelzer, *Opt. Commun.*, **1992**, 93, 277-282.
- [71] S. W. Hell, E. H. K. Stelzer, *J. Opt. Soc. Am. A.*, **1992**, 9, 2159-2166.
- [72] S. W. Hell et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2000**, 97, 8206-8210.
- [73] T. A. Klar, E. Engel, S. W. Hell, *The American Physical Society*, **2001**, 64, 066613.
- [74] W. Ansorge, R. Pepperkok, *Biochem. Biophys. Meth.*, **1988**, 16, 283-292.
- [75] G. Minaschek, J. Bereiter-Hahn, G. Bertholdt, *Experimental Cell Research*, **1989**, 183, 434-442.
- [76] H. Römpp, *Römpp Basislexikon Chemie*, Thieme Verlag, **1998**, 10. Auflage.
- [77] R. Csuk et al., *Z. Naturforsch.*, **2004**, 60b, 89-98.
- [78] Z. Kaya, R. Krämer, **2008**, EP 1905801 A1.
- [79] C. F. H. Frame, G. F. Frame, C. V. Wilson, *Journal of Organic Chemistry*, **1941**, 6, 732-749.
- [80] K. Hanaoka et al., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2001**, 1840-1843.
- [81] S. R. Pully, L. S. Hegedus, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 9037-9047.
- [82] P. A. Tempest, S. D. Brown, R. W. Armstrong, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1996**, 35, 640-642.
- [83] G. Böhm et al., *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 39, 3819-3822.
- [84] S. Stein, *Dissertation: Quantifizierung der dreidimensionalen Mikroarchitektur von Genomelementen nach spezifischer Fluoreszenzmarkierung in fixierten und vitalen Zellen*, **2006**.
- [85] H. Y. Wang et al., **1997**, US Patent 5696157.
- [86] R. Kierat, *Dissertation: Synthese, Modifikation und biologische Anwendung fluoreszierender Xanthenfarbstoffe*, **2008**.
- [87] E. Benoist, J. Le Gal, *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 1483-1488.
- [88] H. M. I. Osborn et al., *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, 3, 4002-4010.
- [89] D. G. McCafferty et al., *Tetrahedron*, **1995**, 51, 1093-1106.
- [90] B. M. Peek et al., *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, 38, 114-123.
- [91] R. Sens, K. H. Drexhage, *Journal of Luminescence*, **1981**, 24, 709-712.
- [92] B. Jing, M. Zhang, T. Shen, *Org. Lett.*, **2003**, 5, 3709-3711.
- [93] R. P. Mason et al., *Free Radical Biology & Medicine*, **1999**, 27, 873-881.
- [94] S. Hasezawa, N. Kutsuna, *Plant Cell Physiol.*, **2002**, 43, 965-973.
- [95] R. Wright et al., *Cell Motil Cytoskeleton*, **1993**, 25, 111-128.
- [96] K. Kiyose, H. Kojima, T. Nagano, *Chem. Asian J.*, **2008**, 3, 506-515.

- [97] G. Yuval, B. J. Vermolan, I. T. Young, *Current Opinion in Biotechnology*, **2005**, *16*, 3-12.
- [98] M. G. Honig, R. I. Hume, *Journal of Cell Biology*, **1986**, *103*, 171-187.
- [99] M. G. Honig, R. I. Hume, *Trends in Neuroscience*, **1989**, *12*, 333-341.
- [100] R. Heintzmann, G. Ficuz, *Briefings in functional Genomics and Proteomics*, **2006**, *5*, 289-301.
- [101] M. Lang et al., *Hum. Genet.*, **1985**, *71*, 281-287.
- [102] S. Fakan et al., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **2006**, *18*, 307-316.
- [103] L. Manuellidis, *Human. Genet.*, **1985**, 288-293.
- [104] M. Macville et al., *Cancer Research*, **1999**, *59*, 141-150.
- [105] K. W. Wood, M. P. Hall, **1999**, *US Patent 6602677*.
- [106] S. H. Howell et al., **1993**, *US Patent 5583024*.
- [107] J. H. Zhang, T. D. Chung, K. Oldenburg, *J. Bio. Mol. Screen*, **1999**, *4*, 67-73.
- [108] T. Moriuchi, T. Watanabe, I. Ikeda et al., *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2001**, 277-287.
- [109] E. A. Perpète et al, *J. Chem. Theory Compt.*, **2006**, *2*, 434-440.
- [110] G. Cosa, K.-s. Focsaneanu, J.C. Scaiano, *Photochemistry and Photobiology*, **2001**, *73*, 585-599.

Erlahrung gemäß § 8 (3) b) und der 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 Prufungsvorhaben beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultat als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, den 05.09.2008

.....
Zuhal Kaya