

# **Sonden zur Quantifizierung des chelatisierbaren Eisens in lebenden Zellen**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im  
Fachbereich Chemie der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Rouven Oliver Schmalz  
aus Düsseldorf

Essen 2004

Referent:	Prof. Dr. Dr. h.c. Reiner Sustmann
Korreferent:	Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. Mathias Ulbricht
Datum der mündlichen Prüfung:	17.8.2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1999 bis Juni 2004 im Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen sowie im Institut für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen angefertigt. Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Reiner Sustmann

Für die Überlassung des interessanten Themas, die mir stets gewährte Unterstützung und die wertvollen Ratschläge während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot

danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats, für die anregenden Diskussionsbeiträge und das Einverständnis zur Durchführung zahlreicher Experimente am Institut für Physiologische Chemie.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern für die Kollegialität und das gute Arbeitsklima, insbesondere danke ich Frau Dr. D. Weisheit und Herrn Dr. W. Radunz für ihre unermüdliche Diskussionsbereitschaft sowie Herrn Dr. Hans-Gert Korth für die stets gewährte Hilfe.

Dank aussprechen möchte ich auch allen Mitgliedern des Institutes für Physiologische Chemie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die hervorragende Kooperation. Sehr herzlich möchte ich mich vor allem bei Frau Priv.-Doz. Dr. Ursula Rauen für die intensive Betreuung und Herrn Dr. Frank Petrat für die vielen Hilfestellungen im Rahmen der Arbeiten am Institut für Physiologische Chemie.

Danken möchte ich zudem den Herren Heinz Bandmann und Dr. Thorsten Schaller für die Anfertigung der NMR-Spektren und Herrn Werner Karow für die Anfertigung der Massenspektren sowie Herrn Willi Sicking für die Durchführung der Molecular-Modelling-Rechnung.

## Abkürzungsverzeichnis

8-OHdG	8-Hydroxyguanin
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
AOPA	10-(4-[(1,10-phenanthrolin-5-ylcarbamoylemethyl)- carbamoyle]-benzyl]-acridinorangebromid
ATP	Adenosintriphosphat
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DFO	Desferrioxamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DPD	2,2'-Dipyridyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
dGuo	2'-Deoxyguanosin
DMT1	<i>divalent metal transporter</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektronensprayionisation
ESR	Elektronenspinresonanz
FAB	<i>fast atom bombardment</i>
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinucleotid
FAPA	2-(5-amino-fluorescein)-N-(1,10-phenanthrolin-5-yl)-acetamid
HMM-DFO	hochmolekulares Desferrioxamin
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i>
HSAB	<i>hard and soft acids and bases</i> – Theorie der harten und weichen Säuren und Basen
IRE	<i>iron responsive elements</i>
IRP	<i>iron regulatory proteins</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LFSE	Ligandenfeldstabilisierungsenergie
MPLC	<i>medium performance liquid chromatography</i>

## II

MSDH	<i>O</i> -Methyl-serin-dodecylamin-hydrochlorid
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NBD-DFO	7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-desferrioxamin
nDNA	nukleäre Desoxyribonukleinsäure
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> - Kernresonanz
NQO	4-Nitrochinolinoxid
NRAMP2	<i>natural resistance-associated macrophage protein 2</i>
PI	Propidiumiodid
PIH	Pyridoxalisonicotinoylhydrazon
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acids</i>
ROS	reactive oxygen species
RP-18	reversed phase 18 (Umkehrphase mit C <sub>18</sub> -Ketten)
RDA	Rhodamin b-4-[(2,2'-dipyridin-5-yl)aminocarbonyl]-benzylester
RPA	Rhodamin b-4-[(1,10-phenanthrolin-5-yl)aminocarbonyl]-benzylester
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIH	Salicylaldehydisonicotinoylhydrazon
SOD	Superoxiddismutase

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Der Weg des Eisens</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Das Eisen in Komplexverbindungen</b>	<b>10</b>
<b>1.3 Das chelatisierbare Eisen und dessen Nachweis</b>	<b>12</b>
<b>1.4 Die oxidative Phosphorylierung</b>	<b>15</b>
<b>1.5 Reaktionen des Eisens in der Zelle</b>	<b>20</b>
<b>1.6 Die Mechanismen und Auswirkungen der eisenvermittelten Zellschädigungen durch Bildung und Veränderung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)</b>	<b>21</b>
1.6.1 Schädigungen der Lipide durch Peroxidation	24
1.6.2 Oxidative Proteinschädigung	25
1.6.3 Schädigung der Nukleinsäuren	26
1.6.4 Schädigungsprozesse unter Beteiligung des lysosomalen, chelatisierbaren Eisens	29
<b>1.7 Grundlagen der Fluoreszenz</b>	<b>31</b>
<b>1.8 Die fluoreszenzspektroskopische Messmethode</b>	<b>37</b>
<b>1.9 Fluoreszenzsonden zur Quantifizierung zytosolischen und mitochondrialen chelatisierbaren Eisens</b>	<b>40</b>
<b>2 PROBLEMSTELLUNG</b>	<b>47</b>
<b>3. ENTWICKLUNG DER EISENCHELATISIERENDEN FLUORESZENZSONDEN UND DEREN ZIELSTEUERUNG</b>	<b>49</b>
<b>3.1 Akkumulation der Fluoreszenzsonde im Zellkern</b>	<b>49</b>
<b>3.2 Akkumulation der Entquencher in den Mitochondrien</b>	<b>50</b>
<b>3.3 Akkumulation der Fluoreszenzsonde in den Lysosomen</b>	<b>50</b>

<b>3.4 Die eisenchelatisierende Untereinheit</b>	<b>50</b>
<b>3.5 Die fluoreszierende Untereinheit</b>	<b>51</b>
<b>4 SYNTHESE DER FLUORESZENZSONDEN UND DER ENTQUENCHER ZUM NACHWEIS VON EISEN IN MITOCHONDRIEN, LYSOSOMEN UND IM ZELLKERN</b>	<b>53</b>
<b>4.1 Synthese der aktivierten Chelatoruntereinheiten</b>	<b>53</b>
4.1.1 Synthese von 5-Nitro-1,10-Phenanthrolin ( <b>2</b> )	53
4.1.2 Synthese von 5-Amino-1,10-Phenanthrolin ( <b>3</b> )	54
4.1.3 Synthese von 2-Iod- <i>N</i> (-1,10-phenanthrolin-5-yl)acetamid ( <b>5</b> )	54
4.1.4 Synthese von 2-Brom- <i>N</i> (-1,10-phenanthrolin-5-yl)acetamid ( <b>6</b> )	55
<b>4.2 Synthese der kationischen Entquencher</b>	<b>56</b>
4.2.1 Synthese von Triethyl-1,10-phenanthrolin-5-ylcarbamoyl-methylammoniumiodid ( <b>7</b> )	56
4.2.2 Synthese von Tributyl-1,10-phenanthrolin-5-ylcarbamoyl-methylammoniumiodid ( <b>8</b> )	57
<b>4.3 Synthese der Fluoreszenzsonden auf der Basis von Acridinorange</b>	<b>58</b>
4.3.1 [(4-Brommethylbenzoyl)-oxy]-2,5-pyrrolydindion ( <b>10</b> )	59
4.3.2 [(4-Acridinorange-methylbenzoyl)oxy]-2,5-pyrrolydindion-bromid ( <b>12</b> )	60
4.3.3 2-Amino- <i>N</i> (-1,10-phenanthrolin-5-yl)acetamid ( <b>13</b> )	61
4.3.4 [(4-Acridinorangemethylbenzoyl)oxy]-5-amino-acetamid-1,10-phenanthrolin ( <b>14</b> )	63
<b>4.4 Synthese der Fluoreszenzsonden auf der Basis von Aminofluorescein</b>	<b>65</b>
4.4.1 2-(5-Amino-fluorescein)- <i>N</i> (-1,10-phenanthrolin-5-yl)acetamid ( <b>16</b> )	65
<b>4.5 Synthese der Fluoreszenzsonden auf der Basis von Aminofluoresceinethylester</b>	<b>68</b>

4.5.1 5-Aminoethylfluorescein ( <b>17</b> )	68
4.5.2 2-(5-Aminofluorescein-ethylester)- <i>N</i> -1,10-phenanthrolin-5-yl)-acetamid ( <b>18</b> )	69
4.5.3 4-Brommethyl-benzoylbromid ( <b>19</b> )	73
4.5.4 4-(Brommethyl)- <i>N</i> -(1,10-phenanthrolin-5-yl)benzamid ( <b>20</b> )	73
4.5.5 5-Amino-2-(3-oxo-6-[4-(1,10-phenanthrolin-5-ylcarbamoyl)-benzyl-oxy]-3 <i>H</i> -xanthen-9-yl)benzoesäureester ( <b>21</b> )	74
<b>5 EINSATZ DER FLUORESZENZSONDEN IM ZELLFREIEN SYSTEM</b>	<b>77</b>
<b>5.1 Das Fluoreszenzverhalten der Fluoreszenzsonde 14</b>	<b>77</b>
5.1.1 Absorptions-/Emissionsspektrum der Fluoreszenzsonde <b>14</b>	77
5.1.2 pH-Wert-abhängiges Emissionsspektrum der Fluoreszenzsonde <b>14</b>	78
5.1.3 Emissionsspektrum der Fluoreszenzsonde <b>14</b> in Abhängigkeit von Eisen(II)-ionen	79
<b>5.2 Das Fluoreszenzverhalten der Fluoreszenzsonde 16</b>	<b>81</b>
5.2.1 Absorptions-/Emissionsspektrum der Fluoreszenzsonde <b>16</b>	81
5.2.2 pH-Wert-abhängiges Emissionsspektrum der Fluoreszenzsonde <b>16</b>	82
5.2.3 Emissionsspektrum der Fluoreszenzsonde <b>16</b> in Abhängigkeit von Eisen(II)-ionen	84
<b>5.3 Vorgang der Fluoreszenzlöschung durch Fe<sup>2+</sup>-Ionen</b>	<b>85</b>
<b>5.4 Linearität der Kalibrierungen der Fluoreszenzintensität der Sonden 14 und 16 als Funktion der Konzentration und mögliche Störfaktoren</b>	<b>87</b>
5.4.1 Kalibrierung der Fluoreszenzsonde <b>14</b>	89
5.4.2 Kalibrierung der Fluoreszenzsonde <b>16</b>	92
<b>6 UNTERSUCHUNGEN DER FLUORESZENZSONDEN IN DER ZELLE</b>	<b>93</b>
<b>6.1 Die Akkumulation der Fluoreszenzsonden in den Zellkom-</b>	

<b>partimenten</b>	<b>93</b>
6.1.1 Intrazelluläre Verteilung der Fluoreszenzsonde	14 93
6.1.2 Intrazelluläre Verteilung der Fluoreszenzsonde	16 99
<b>7 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>101</b>
<b>8 AUSBLICK</b>	<b>104</b>
<b>9 EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>107</b>
<b>9.1 Allgemeine Arbeitstechnik – Arbeiten unter Schutzgas</b>	<b>107</b>
<b>9.2 Instrumentelle Analytik</b>	<b>107</b>
9.2.1 NMR - Spektren	107
9.2.2 Elementaranalysen	107
9.2.3 Massenspektren	108
9.2.4 Schmelzpunkte	108
9.2.5 IR - Spektren	108
9.2.6 Fluoreszenzspektren	108
9.2.7 AAS - Spektren	108
9.2.8 pH - Werte	109
9.2.9 UV/VIS - Spektren	109
9.2.10 <i>Ex-situ</i> Bestimmungen	109
<b>9.3 Instrumentelle Präparation</b>	<b>110</b>
<b>9.4 Materialien zur Synthese</b>	<b>110</b>
<b>9.5 Trocknen der Lösungsmittel</b>	<b>111</b>
<b>9.6 Materialien für die zellbiologische Nutzung</b>	<b>112</b>
<b>9.7 Versuchstiere</b>	<b>113</b>
<b>9.8 Synthese der Fluoreszenzfarbstoffe und der Entquencher</b>	<b>114</b>
9.8.1 Darstellung von 5-Nitro-1,10-phenanthrolin <sup>[144]</sup> (2)	114
9.8.2 Darstellung von 5-Amino-1,10-phenanthrolin <sup>[145]</sup> (3)	115



## VII

9.8.3 Darstellung von 2-Iod- <i>N</i> -(1,10-phenanthrolin-5-yl)acetamid <sup>[146]</sup> <b>(5)</b>	117
9.8.4 Darstellung von Triethyl-1,10-phenanthrolin-5-ylcarbamoyl- methyllummoniumiodid <b>(7)</b>	119
9.8.5 Darstellung von 2-Brom- <i>N</i> -(1-10-phenanthrolin-5-yl)acetamid <sup>[11]</sup> <b>(6)</b>	119
9.8.6 Darstellung von Tributyl-1,10-phenanthrolin-5-ylcarbamoyl- methyllummoniumbromid <b>(8)</b>	123
9.8.7 Darstellung von 2-Amino- <i>N</i> -(1,10-phenanthrolin-5-yl)acetamid <b>(13)</b>	126
9.8.8 Darstellung von [(4-Brommethylbenzoyl)oxy]-2,5-pyrrolydin- dion <sup>[147]</sup> <b>(10)</b>	129
9.8.9 Darstellung von 10-[4-(2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yloxy(carbonyl)- benzyl]-acridinorangebromid <b>(12)</b>	130
9.8.10 Darstellung von 10-(4-[(1,10-phenanthrolin-5- ylcarbamoylmethyl)-carbamoyl]-benzyl]-acridinorangebromid <b>(14)</b>	133
9.8.11 Darstellung von 2-(5-amino-fluorescein)- <i>N</i> -(1,10-phenanthrolin- 5-yl)acetamid <b>(16)</b>	137
9.8.12 Darstellung von 5-Amino-ethylfluorescein <b>(17)</b>	140
9.8.13 Darstellung von 2-(5-amino-fluorescein-ethylester)- <i>N</i> -(1,10- phenanthrolin-5-yl)acetamid <b>(18)</b>	143
9.8.14 Darstellung von 4-(Brommethyl)-benzoylbromid <sup>[149]</sup> (BBB, 19)	146
9.8.15 Darstellung von 4-(Brommethyl)- <i>N</i> -(1,10-phenanthrolin-5- yl)benzamid <sup>[11]</sup> <b>(20)</b>	147
9.8.16 Darstellung von 5-Amino-2-(3-oxo-6-[4-([1,10]phenanthrolin-5- ylcarbamoyl)-benzyloxy]-3 <i>h</i> -xanthen-9-yl)benzoesäureester <b>(21)</b>	149
<b>9.9 Durchführung der zellfreien Messungen der Fluoreszenzsonden</b>	<b>152</b>
9.9.1 Entfernung der kontaminierenden Schwermetalle aus den verwendeten Medien	152
9.9.2 Die Fluoreszenzanalyse bei Anwesenheit und Abwesenheit von	

## VIII

Fe(II)	152
9.9.3 Herstellung der Eisen-Stammlösungen	153
<b>9.10 Die Fluoreszenzsonden im zellulären System</b>	<b>154</b>
9.10.1 Zellpräparation und Zellkultivierung	154
9.10.2 Präparation und Kultivierung der Rattenhepatozyten	154
9.10.3 Kultivierung der Rattenleberendothelzellen	154
9.10.4 Die Bestimmung der subzellulären Verteilung der Fluoreszenzsonden	155
<b>11 LITERATUR</b>	<b>156</b>

## 1 Einleitung

Eisen ist das häufigste Übergangsmetall, nach Aluminium das zweithäufigste Metall und mit 5% Eisengehalt der Erdkruste das vierthäufigste Element überhaupt.<sup>[1]</sup> Bis auf wenige prokaryotische Lebewesen benötigen alle Lebewesen Eisen als essentielles Spurenelement. Eisen ist an Funktionsproteine gebunden und übernimmt dort vielfältige Aufgaben beim oxidativen Metabolismus. Eisen besitzt aber auch ein erhebliches zellschädigendes Potential, da durch die katalytische Wirkung von Eisen unter anderem das Hydroxylradikal entsteht und/oder ähnlich reaktive Fe-O-Verbindungen, welche für eine Vielzahl von Zellschädigungen und wahrscheinlich sogar für das Altern und somit für den „natürlichen“ Tod von Lebewesen mitverantwortlich sind. Eisen wird daher intrazellulär nur in sehr begrenztem Umfang, etwa zu 1 % des gesamten zellulären Eisens im Körper<sup>[2-8]</sup>, in „freier“, chelatisierbarer Form vom Körper zur Verfügung gestellt. Dieses „chelatisierbare Eisen“ ist unter anderem an niedermolekulare Liganden mit (verglichen mit Funktionsproteinen) relativ niedrigen Komplexbildungskonstanten gebunden und steht somit der Zelle für den Einbau in Funktionsproteine zur Verfügung. Eisen, welches nicht direkt für diesen Zweck zur Verfügung stehen muss, wird in dem Eisenspeicherprotein Ferritin gespeichert.

Das chelatisierbare Eisen steht auf Grund seines zytotoxischen Potentials im Mittelpunkt dieser Arbeit. Ist man früher davon ausgegangen, dass es nur einen zytosolischen Pool chelatisierbaren Eisens gibt<sup>[9, 10]</sup>, ist seit kurzer Zeit ein mitochondrialer Pool quantifiziert worden<sup>[11, 12]</sup>, der möglicherweise die Hauptquelle für Hydroxylradikale darstellt.<sup>[13]</sup> Auch die Quantifizierung des Pools chelatisierbaren Eisens in anderen Zellkompartimenten ist von großer Wichtigkeit. So ist der Pool des Zellkerns wegen der Gefährdung der DNA durch Hydroxylradikale von Interesse, ebenso der Eisenpool des Lysosoms, wo einige Gruppen die Hauptquelle chelatisierbaren Eisens vermuten.<sup>[14-17]</sup> Das Mittel der Wahl zur Quantifizierung des chelatisierbaren Eisens ist die Anwendung von spezifischen Fluoreszenzsonden, deren Design, Synthese und Anwendung im biologischen

System in dem jeweiligen zu untersuchenden Zellkompartiment Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

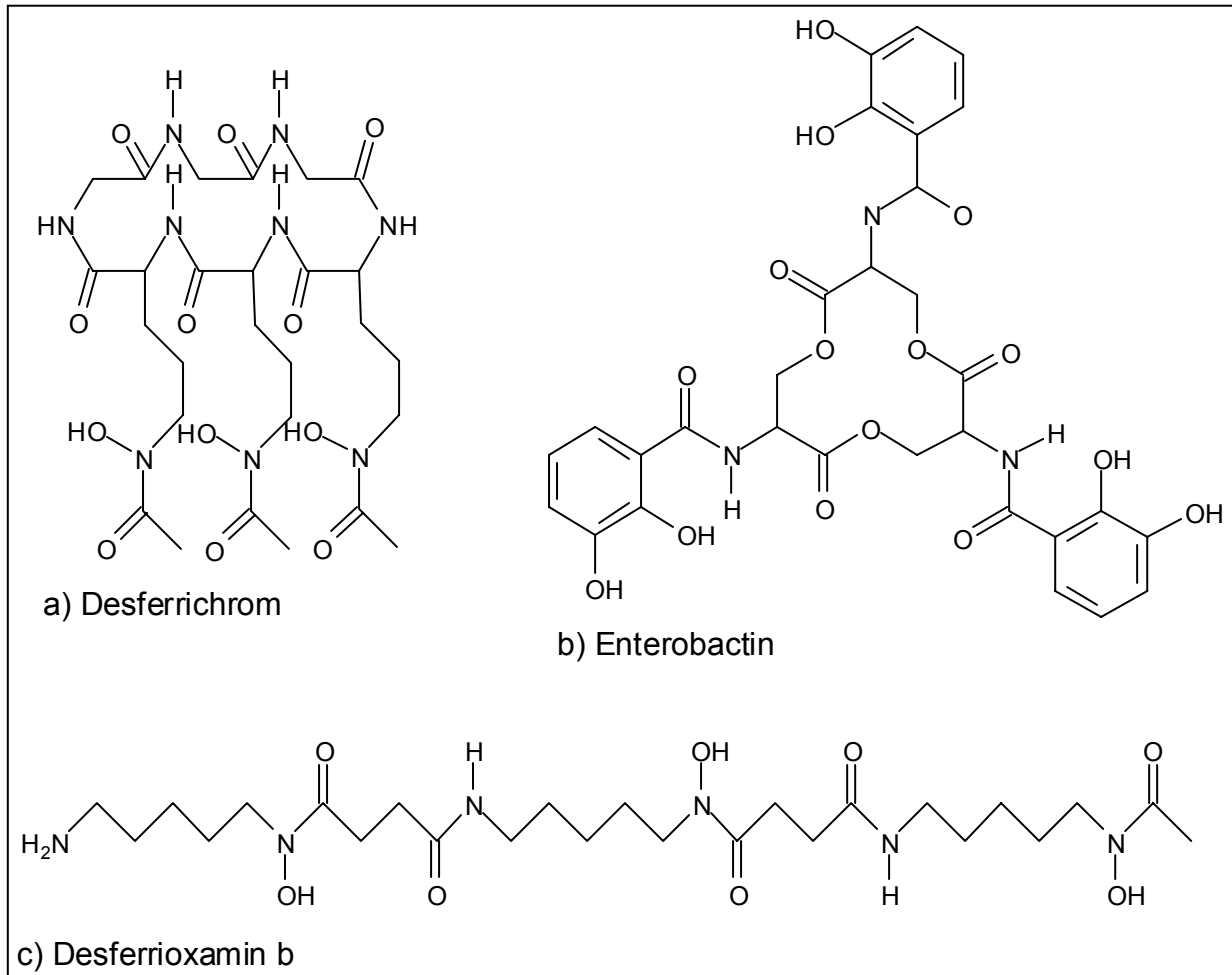
### 1.1 Der Weg des Eisens

Trotz der Häufigkeit des Eisens in der Erdkruste ist seine Verfügbarkeit nicht immer einfach. So besteht der rostrote Boden von Oahu Island (Hawaii) zu 20% aus Eisen. Dennoch ist für die dort wachsenden Pflanzen kein Eisen verfügbar, so leiden die dortigen Ananasstauden unter Eisenmangel. Durch Gegenwart von Mangandioxid und das Fehlen organischer Reduktionsmittel wird das dortige Eisen in der Oxidationsstufe +III gehalten und ist somit nicht für die Pflanzen verfügbar. In geographischen Regionen, in denen das Gestein hauptsächlich aus Kalkstein und Dolomit besteht und alkalisch ist, ist Eisen(II) für Pflanzen ebenfalls schwer zugänglich. Diese Phänomene beruhen darauf, dass sowohl  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , als auch  $\text{Fe}(\text{OH})_2$  sehr kleine Löslichkeitsprodukte ( $K_L^{\text{II}} = 2 \times 10^{-15} \text{ mol}^3 \text{ l}^{-3}$ ;  $K_L^{\text{III}} = 2 \times 10^{-39} \text{ mol}^4 \text{ l}^{-4}$ ) haben. Bei neutralem und basischen pH-Werten ist Eisen(III) praktisch unlöslich und steht für Organismen nicht zur Verfügung. Gärtner und Landwirte greifen unter solchen Bedingungen zu EDTA, welches mit Eisen einen Chelatkomplex bildet, der von den Pflanzen aufgenommen werden kann.<sup>[1]</sup> Einige Pflanzen haben im Laufe der Evolution die Fähigkeit entwickelt, an den Wurzelspitzen verschiedene chelatbildende organische Säuren abzusondern, die das Eisen löslich machen, so dass es aufgenommen werden kann.

Aerobe Mikroorganismen verfügen für gewöhnlich über Siderophore (Abb.1). Diese sind mehrzählige Liganden mit molekularen Massen von 500 – 1000 g/mol. Siderophore sind in der Lage, Eisen(III) zu lösen und zu transportieren. Sie werden nach ihrer Molekülstruktur und ihrer Fähigkeit, Eisen als Chelat zu binden, in Ferrichrome, Ferrioxamine und Enterobactine unterteilt.

Durch viele potentielle Ligand-Atome entstehen sehr leicht ungewöhnlich stabile, oktaedrische *high-spin*-Komplexe des Eisen(III). Sie sind stabil genug, das Eisen innerhalb der Bakterien zu transportieren, aber auch la-

bil genug, das Eisen an ihrem Zielort zu übertragen. Tris-chelate neigen dazu, kugelförmige Komplexe zu bilden. Der übrige Teil des Siderophor-Moleküls besteht aus einem symmetrischen hydrophilen Rest, der



**Abb. 1:** Bekannte Siderophore.

wahrscheinlich bei dem Transport durch die Zellmembran hilft.<sup>[1]</sup>

Da höher entwickelte Lebewesen wie der Mensch kein hochentwickeltes Eisen-Sequestrierungssystem besitzen, sind sie auf eine adäquate Eisenzufuhr durch die Nahrung angewiesen. Die intestinale Eisenabsorption ist beim Menschen sehr ineffektiv. Häm-Eisen wird vom menschlichen Körper sehr viel besser aufgenommen, als nicht Häm-gebundenes Eisen, da sich im Duodenum (oberer Teil des Gastrointestinal-Trakts) spezifische Häm-Bindungsstellen hoher Affinität befinden.<sup>[18]</sup> Dies hat zur Folge dass 500 – 600 Millionen Menschen an einer Eisenmangelanämie leiden, da vor allem in den Entwicklungsländern eine überwiegend pflanzliche Ernährung vorherrscht<sup>[19]</sup>. Fleisch enthält große Mengen Hämoglobin, Myoglobin und Cy-

tochrome, wobei Häm-Eisen sehr viel leichter aufgenommen wird als andere Darreichungsformen. Die Eisenmangelanämie stellt somit die weltweit häufigste Mangelerkrankung dar.<sup>[20]</sup>

Mit etwa 35 - 45 mg Eisen je Kilogramm Körpergewicht<sup>[21]</sup> ist es das mengenmäßig häufigste essentielle Spurenelement im zellulären Metabolismus und für das Wachstum des Menschen. Es liegt zu 70% in Form von Hämoglobin, zu 19 % in Ferritin und Hämosiderin als Depoteisen gespeichert und zu 11 % in verschiedenen Enzymen vor. So liegt es also zu etwa vier Fünfteln in aktiver Form als „Funktionseisen“ vor. Nur etwa 0.1% des Eisens im Körper liegt im humanen Serum in „transportabler“ Form vor.

Der Körper besitzt keinen Mechanismus zur Ausscheidung von Eisen und der Bedarf an Eisen ist – abgesehen von Frauen in der Schwangerschaft – außerordentlich gering. Ein bis zwei Milligramm Eisen, die pro Tag hauptsächlich durch Schweiß und Urin abgegeben werden, müssen für eine funktionierende Eisenhomöostase wieder aufgenommen werden. Dies kann durch verschiedene Wege geschehen.

Die Aufnahme des Eisens geschieht sowohl für Häm-Eisen, als auch für nicht Häm-gebundenes Eisen im Darm, wobei die Aufnahme nicht Häm-gebundenen Eisens gering ist. Es wird im ersten Teil des Duodenums durch intestinale Epithelzellen aufgenommen, wo es durch den niedrigen pH-Wert gelöst und durch Ferrireduktasen und Ascorbinsäure zu Eisen(II) reduziert wird.<sup>[21]</sup>

Bei nicht-intestinalen Zellen existiert eine rezeptorvermittelte Aufnahme: Zum Transport des Eisens innerhalb des Organismus werden die verschiedensten komplexierenden Stoffe benutzt. In höheren Tieren ist dies Transferrin. Im Transferrin sind zwei  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen gebunden. Typisch ist die weitere Bindung eines geeigneten Anions, meistens Carbonat oder Bicarbonat. Das Protein selbst, das Apo-Transferrin, hat ein Molekulargewicht von 80 kD, die Bruttokomplexbildungskonstante liegt bei  $\log K = 21$ . Die Eisensättigung liegt unter physiologischen Bedingungen bei 30%.<sup>[22-25]</sup>

Mit Hilfe der Transferrine findet auch der Eisentransport zu den Zellen statt, in denen die Synthese anderer eisenhaltiger Verbindungen wie Hä-

moglobin und der Cytochrome stattfindet. Transferrine höherer Tiere haben meist größere Stabilitätskonstanten als Siderophore von Bakterien. So zeigt sich außer dem Transport von Eisen eine weitere Verwendung von Transferrinen: Das Protein im Eiklar enthält bis zu 16% des Transferrins Conalbumin, ohne dass man eine Funktion als Eisentransporteur feststellen konnte. So ist es aufgrund der Unterlegenheit der bakteriellen Siderophore gegenüber dem Transferrin wahrscheinlich, dass Conalbumin als antibakterielles Agens wirkt; die Bakterien unterliegen in Gegenwart von Conalbumin einem Eisen-Mangel.

Das beim Menschen in der Muttermilch vorkommende Lactoferrin scheint das wirksamste antibakterielle Transferrin zu sein, so dass mit Muttermilch ernährte Säuglinge unter anderem deswegen vor bestimmten Infektionskrankheiten weitgehend geschützt sind. Um ihre Fähigkeit, Eisen zu binden, zu behalten, müssen die Milchproteine im Magen des Kindes 90 Minuten intakt bleiben und unverändert in den Dünndarm übergehen. Dieser antibakterielle Schutz durch die Bildung von Eisenchelaten scheint viel allgemeiner zu sein, als bisher vermutet.<sup>[26]</sup>

Zelloberflächen-Rezeptoren für Transferrin bringen das Protein mit dem daran gebundenen Eisen in der Ferri-Form ( $\text{Fe}^{3+}$ ) durch rezeptorvermittelte Endozytose<sup>[27]</sup> in frühe Endosomen, wobei sich Transferrinrezeptoren auf allen sich teilenden Zellen befinden. Bei der Endozytose wird das aufzunehmende Material von einem kleinen Teil der Plasmamembran eingehüllt, der sich zunächst einstülpt und dann abschnürt. Es entstehen hierbei frühe Endosomen. Das Eisen löst sich aufgrund des dort vorherrschenden niedrigen pH-Werts von  $\text{pH} \approx 6$  vom Transferrin, da durch konformationelle Änderungen dessen Affinität zum Eisen sinkt. Der im Endosom vorliegende pH-Wert wird durch in der Endosomenmembran liegende ATP-getriebene Protonenpumpen, die  $\text{H}^+$ -Ionen aus dem Zytosol in das Lysosomemlumen befördern, erreicht. Das vom Eisen befreite Protein, das Apo-Transferrin, bleibt am Rezeptor gebunden, da durch die konformationelle Änderung gleichzeitig deren Assoziation gestärkt wird<sup>[22, 28]</sup>. Mit diesem Rezeptor wird das Apotransferrin zur Plasmamembran gebracht, wo

es im höheren pH-Wert der extrazellulären Flüssigkeit vom Rezeptor dissoziiert und sich wieder ins Plasma begibt. Hierbei verschmilzt das Endosom wieder mit der Plasmamembran. Das Apotransferrin pendelt also zwischen der extrazellulären Flüssigkeit und dem Endosomenkompartiment hin und her<sup>[22-25]</sup>.

Endosomen werden auch ins Zellinnere transportiert. Dort werden sie zu späten Endosomen und schließlich durch Fusion mit vom *trans*-Golgi-Netz stammenden, mit Hydrolase gefüllten Transportvesikeln sowie durch ständige Membranrückgewinnung und zunehmende Ansäuerung bis zu einem pH-Wert von etwa fünf zu Lysosomen, die sich von Endosomen auch stark in ihrer Proteinzusammensetzung unterscheiden.

Es existiert eine alternative Theorie der Beziehung zwischen frühen und späten Endosomen, wonach beides getrennte, dauerhafte Kompartimente sind. Der Transport zwischen diesen beiden Kompartimenten könnte dann über ein dynamisches Röhrensystem erfolgen oder Teile des frühen Endosoms würden sich abschnüren und weiter im Zellinneren mit späten Endosomen verschmelzen.<sup>[27]</sup>

Lysosomen sind angefüllt mit etwa 40 Arten hydrolysierender Enzyme, wie Proteasen, Nucleasen und Glykosidasen, für die kontrollierte intrazelluläre Verdauung von Makromolekülen. Das Aktivitätsoptimum für diese Enzyme liegt bei  $\text{pH} \approx 5$ . Sie benötigen deshalb einen niedrigen pH-Wert in diesem Zellkompartiment. Die Hydrolasen können also bei Zerstörung der lysosomalen Membran oder deren Undichtigkeit weniger Schaden im intrazellulären Raum bei  $\text{pH} = 7.2$  anrichten.<sup>[27]</sup>

Das Eisen, das im Endosom an der *cis*-Seite endosomaler Membranproteine, möglicherweise<sup>[29]</sup> durch Oxidoreduktase vermittelt zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert wurde, wird nun - durch den divalenten Metalltransporter NRAMP2/DMT1<sup>1</sup> vermittelt - durch einen aktiven, protonengekoppelten Transport aus dem Endosom ins Zytosol befördert.<sup>[21]</sup> Es wird somit dem Pool chelatisierbaren Eisens, auf den später genauer eingegangen wird, zugeführt. Dort liegt

---

<sup>1</sup> NRAMP2 (natural resistance-associated macrophage protein 2)/DMT1 (divalent metal transporter 1)



das Eisen nach allgemein vorherrschender Meinung weiterhin in Form von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen vor.<sup>[6, 7, 30, 31]</sup>

Die für Transferrin beschriebene Endozytose läuft in ähnlicher Form auch für andere Makromoleküle und für größere Partikel wie z. B. Bakterien, Zelltrümmer oder kleinste Fremdkörper als Phagozytose bei speziellen Phagozyten<sup>2</sup> ab. Lysosomen haben in allen Zelltypen als Aufgabe die Beseitigung überflüssiger Zellbestandteile, was als Autophagie bezeichnet wird. Beispielsweise beträgt die durchschnittliche Lebensdauer eines Mitochondriums in der Leberzelle ungefähr zehn Tage. Am Ende dieser Lebensdauer wird dieses Organell – wie auch andere Organellen – von Membranen eingeschlossen, die vom Endoplasmatischen Reticulum stammen. Hierbei entsteht ein Autophagosom, welches mit einem Lysosom oder einem späten Endosom verschmilzt. Dies hat auch Auswirkungen auf den Eisenhaushalt innerhalb der Zelle.

Der größte Teil des aus Endosomen und möglicherweise auch den Lysosomen freigesetzten Eisens wird in Funktionsproteine eingebaut oder zunächst gespeichert. Da die Speicherung von Eisen in Form eines Komplexes wie Transferrin oder gar Hämoglobin unrentabel ist, haben höhere Tiere mit der Speicherung als Ferritin, bzw. als aus Ferritin hervorgehendem Abbauprodukt Hämosiderin, eine einfachere Methode entwickelt. Hämosiderin ist im Gegensatz zum hydrophilen Ferritin hydrophob; seine unlöslichen Aggregate sind massive Cluster, die von einer Membran umgeben sind. Sie werden als eisenbeladene sekundäre Lysosomen, so genannte Siderosomen beschrieben<sup>[32]</sup>. Hämosiderin kommt beim Menschen in normalem Gewebe in geringem Maße vor, akkumuliert allerdings bei Eisenüberschuss<sup>[33]</sup>. Hämosiderin wird als lysosomales Abbauprodukt des Ferritins angesehen.<sup>[34]</sup>

Ferritin ist ein großes Protein mit einem Kern aus Eisen(III)-hydroxid-Teilchen mit einem Durchmesser von etwa 7 nm. Apo-Ferritin (die Proteinhülle) besitzt eine Molekülmasse von etwa 480 kD und besteht aus 24

---

<sup>2</sup> Bei Wirbeltieren umschließen Makrophagen und Neutrophile ihre Beute und bilden so ein Phagosom, das mit einem Lysosom verschmilzt.

Untereinheiten von L(ight)- und H(eavy)-Ferritin. Die Isoferritine in den verschiedenen Organen besitzen unterschiedliche relative Mengen der Untereinheiten vom reinen H-Typ (H-reiche Ferritine befinden sich im Herzen, in roten Blutzellen, Lymphozyten und Monozyten), die eher für die Detoxifikation zuständig<sup>[35]</sup> sind, bis zum reinen L-Typ, wobei L-reiche Ferritine eher für eine Langzeitspeicherung verantwortlich sind. L-Ferritin ist für die Eisenkernbildung im Ferritin verantwortlich, die H-Typ-Untereinheit besitzt die für die Aufnahme von  $\text{Fe}^{2+}$  nötige Ferroxidase-Aktivität und ist für die rasche Aufnahme des Eisens als  $\text{Fe}^{3+}$  verantwortlich<sup>[36]</sup>. Das  $\text{Fe}^{2+}$  bindet an das Ferroxidase-Zentrum, mittels einer Interaktion mit Sauerstoff wird es zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert und bildet nach dem Wechsel in die Kavität durch Aggregation den Eisenkern.

Im eisenhaltigen, polymeren Kern, der bis zu 4500 Atome enthält<sup>[37]</sup> und der dann zu 34% an Eisen gesättigt ist (die normale Sättigung liegt bei 20%<sup>[18]</sup>), befinden sich neben den Hydroxo- auch Phosphat-Gruppen.

Ferritin kann auch eine weitere Funktion wahrnehmen, nämlich den Schutz der DNA. H-Typ-reiches Ferritin wurde in den Zellkernen von Hühner-Corneal-Epithelzellen<sup>[38, 39]</sup>, humaner K 562 Zelllinien<sup>[40]</sup> und humaner Astrozytoma-Tumorzellen<sup>[41]</sup> nachgewiesen. Die Präsenz von Ferritin in den Zellkernen der Corneal-Epithelzellen schützte die DNA vor Schaden durch UV-Strahlung<sup>[39]</sup>. Im Fall der Tumorzellen wurde ein aktiver Transport des H-Typ-reichen Ferritins in den Zellkern nachgewiesen. Dieses Ferritin war mit der DNA assoziiert. Der Schutz der DNA durch Ferritin vor eiseninduziertem, oxidativen Schaden wurde in vitro und in Zellkultur gezeigt. Durch das Ferritin wurde die Fähigkeit des Eisens, die Entstehung von Molekülen zu katalysieren, welche oxidativen Schaden verursachen, herabgesetzt.

Für Ferritin in den Kernen von Hepatozyten wurde allerdings auch eine katalytische Wirkung des Ferritins bei der Entstehung von Hydroxylradikalen, deren schädliche Wirkung zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert wird, vermutet<sup>[42]</sup>.

Ferritin bildet im biologischen System einen Eisenspeicher, aus dem Eisen

bei Bedarf freigesetzt werden kann.

Kommt es durch einen erhöhten Eisenverbrauch oder eine unzureichende Eisenaufnahme aus der Nahrung zu einem intrazellulären Eisenmangel und zu einer Verringerung der Konzentration des chelatisierbaren Eisens im zellulären Pool, führt dies zu einer Verminderung der Eisenbindung durch die sogenannten Eisen-bindenden Proteine IRP (**I**ron **R**egulatory **P**roteins). Diese binden daraufhin an so genannte eisenregulierende Elemente IRE (**I**ron **R**esponsive **E**lements), welche definierte Abschnitte sowohl der Transferrinrezeptor-mRNA als auch der Ferritin-mRNA sind. Dieser Vorgang blockiert die Translation der Ferritin-mRNA, die Translation der mRNA des Transferrinrezeptors wird durch Inhibierung des Abbaus der Transferrinrezeptor-mRNA gesteigert, was dazu führt, dass die Zelle nun mehr Transferrin-Rezeptor bildet und dadurch mehr Transferrin-Eisen aufnehmen kann<sup>[43]</sup>. Der umgekehrte Weg läuft über eine vermehrte Bindung von Eisen an die IRPs. Dies führt zu einer verminderten Bindung der IRPs an die IREs, was bei einer zu hohen Konzentration an chelatisierbarem Eisen in der Zelle zu einer verminderten Aufnahme an Transferrin-Eisen führt<sup>[44]</sup>. Der Mechanismus der Eisenfreisetzung aus Ferritin ist unbekannt, ebenso ist es unbekannt, ob Eisen aus Hämosiderin freigesetzt werden kann. Bekannt ist allerdings eine Eisenfreisetzung aus Ferritin durch „reduzierenden Stress“, der durch Superoxid-Radikalanionen erzeugt werden kann, oder durch Proteolyse unter pathologischen Bedingungen<sup>[4, 5, 8]</sup>. Auch hier ist der Mechanismus nur zum Teil bekannt.

## 1.2 Das Eisen in Komplexverbindungen

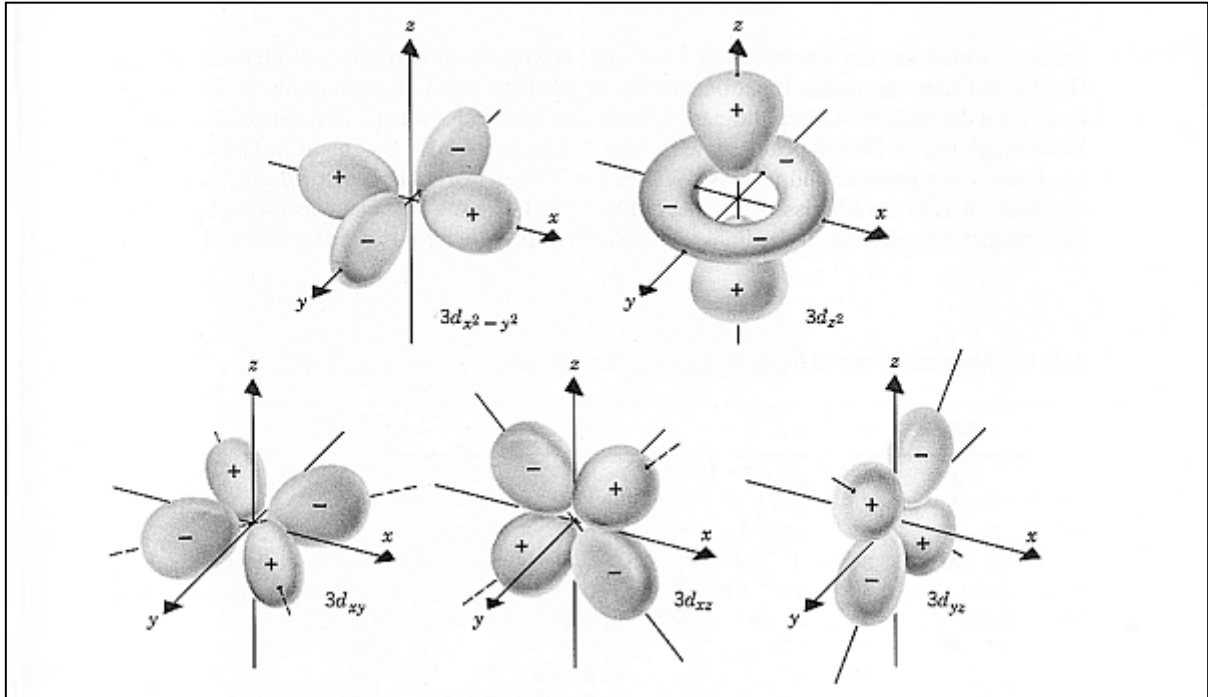
Eisen befindet sich im Periodensystem in der achten Nebengruppe und gehört zu den sogenannten d-Block-Elementen. Es besitzt 8 Valenzelektronen, die sich im Grundzustand alle in den entarteten 3d Orbitalen befinden. Das im reduktiven Milieu der Zelle etablierte  $\text{Fe}^{2+}$ -Ion besitzt demnach noch 6 Valenzelektronen, welche sich ebenfalls im Grundzustand in den d-Orbitalen befinden und somit eine  $d^6$  Konfiguration bilden. Nach der 18-Elektronen-Regel streben Übergangsmetalle eine vollständige Füllung der Orbitale an, ein s-Orbital, drei p-Orbitale und fünf d-Orbitale nehmen hierbei 18 Elektronen auf. Hierzu benötigt Eisen(II) 6 Elektronenpaare. Das Eisen wird also sechsfach koordiniert, was einem Oktaeder und somit einer Annäherung der Liganden in Richtung der Koordinatenachsen entspricht. Dies führt nach der Ligandenfeldtheorie dazu, dass die fünf vorher entarteten d-Orbitale (siehe Abb. 2) nun nicht mehr entartet sind. Sie werden aufgrund der interelektronischen Abstoßung mit dem Ligandenfeld alle energetisch angehoben. Im kugelsymmetrischen Feld würden alle Orbitale um den gleichen Betrag angehoben, aufgrund der Oktaederanordnung und der jeweiligen Symmetrie des betreffenden Orbitals werden das  $3d_{xy}$ -,  $3d_{xz}$ - und das  $3d_{yz}$ -Orbital (3-fach entartet), welche zwischen den Koordinatenachsen liegen, energetisch weniger angehoben ( $t_{2g}$ -Symmetrie); hingegen werden das  $3d_{x^2-y^2}$ - und das  $3d_z^2$ -Orbital, welche längs der Koordinatenachsen liegen, stärker angehoben (2-fach entartet,  $e_g$ -Symmetrie).<sup>[45]</sup>

Die drei  $t_{2g}$ -Orbitale liegen immer - auf Grund des Schwerpunktsatzes - um  $4 Dq$  oder  $0.4\Delta$  günstiger als alle Orbitale im kugelsymmetrischen Feld liegen würden, die beiden  $e_g$  - Orbitale liegen immer  $0.6\Delta$ , oder  $6 Dq$  ungünstiger, als die Orbitale im kugelsymmetrischen Feld liegen würden.

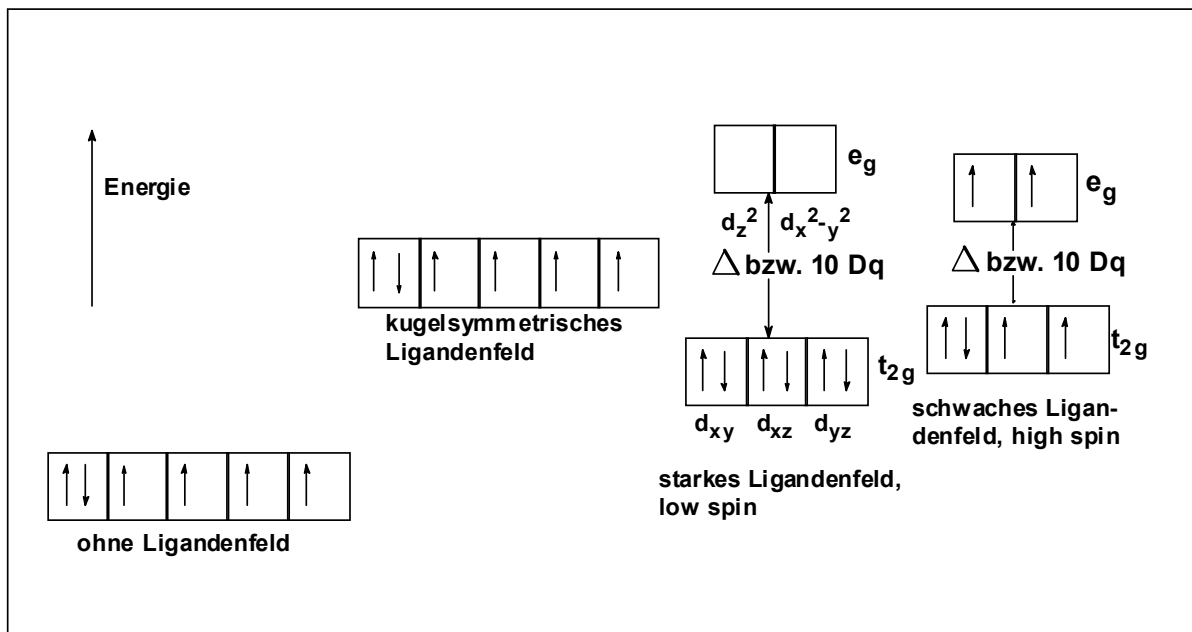
Der in Abb. 3 beschriebene Unterschied zwischen den beiden Orbitalgruppen beträgt also  $\Delta$  oder  $10 Dq^3$ .

---

<sup>3</sup>  $10 Dq$  berechnen sich nach  $10 Dq = f_L \times g_M$  mit  $f_L =$  Ligandabhängiger Feldfaktor mit dimensionslosen Werten von 0.7 bis 1.7 f und  $g_M =$  „g-Faktor“ in  $10^3 \text{ cm}^{-1}$ .



**Abb. 2:** Valenzorbitale der d-Block-Elemente (Bild entnommen aus Lit. [45])



**Abb. 3:** Elektronenverteilung bei oktaedrischen *high-spin* und *low spin* - Komplexen.

Die Lage der jeweiligen Liganden in der spektrochemischen Reihe zeigt die relative Größe dieser sogenannten Ligandenfeldstabilisierungsenergie (LFSE) an. Ist diese Ligandenfeldstabilisierungsenergie größer als die zugehörige Spinpaarungsenergie, spricht man von *low-spin* Komplexen, ist sie niedriger, spricht man von *high-spin*-Komplexen, welche paramagnetisch sind. Elektronektivere Liganden bieten ein schwächeres Ligandenfeld, die Art der Bindung besitzt eher ionischen Charakter. Man spricht hierbei auch von *outer-sphere*-Komplexen. Ferriin beispielsweise,  $\text{Fe}(\text{phen})_3$  ist ein *low-spin*- oder auch *inner-sphere*-Komplex. Der in der spektrochemischen Reihe weit oben stehende Ligand 1,10-Phenanthrolin, ein zweizähniger Chelator, bietet eine LFSE, die selbst beim eher zu *outer-sphere*-Komplexen neigenden Eisen (II) die Spinpaarungsenergie mehr als kompensiert. Es handelt sich um eine Bindung mit überwiegend kovalentem Charakter, wobei dieser Bindungstyp generell als koordinative Bindung bezeichnet wird.<sup>[46]</sup>

### 1.3 Das chelatisierbare Eisen und dessen Nachweis

In der Zelle liegt das Eisen nicht nur an Funktionsproteine und im Ferritin gebunden vor, es existiert auch ein Eisenübergangspool. Man spricht von „freiem“, „niedermolekularem“, „redox-aktivem“ und „katalytisch aktivem“ Eisen. Der Begriff, der am besten den Übergangspool beschreibt, ist „chelatisierbares“ Eisen. Es handelt sich hierbei um keine statische Größe, sondern um ein streng reguliertes Gleichgewicht.

Die bisherigen quantitativen Nachweise dieses chelatisierbaren Eisens lassen sich in disruptive und nicht-disruptive Methoden unterteilen: bei den disruptiven Methoden werden Zellen homogenisiert (mechanisch) oder lysiert (chemisch), es folgen HPLC-Trennverfahren<sup>[3, 5]</sup>, spektrophotometrische<sup>[47]</sup> Nachweise eines Komplexes mit z.B. Phenanthrolin, Ultrafiltration (mit anschließendem Bleomycin-Assay)<sup>[48, 49]</sup>, ESR- oder AAS-Methoden<sup>[47, 50]</sup>. Hierbei ist die Unterscheidung zwischen chelatisierbaren und Speichereisen schwierig, da durch das intensive Einwirken auf die Zelle durch deren Zerstörung eine Situation für die Zelle entsteht, die Einfluss

auf den Eisenhaushalt haben kann. Eisen kann auch bei abgestorbenen Zellen durch aktivierte Proteasen aus Ferritin abgebaut werden.

Die nicht-disruptiven Methoden unterscheidet man in avital und vital. Auch mit der avital angewandten ESR-Spektroskopie erfasst man nur paramagnetisches Eisen (hauptsächlich Fe(III), aber auch high-spin Fe(II)). Bei vital angewandten Radioaktivmethoden wird das chelatisierbare Eisen gegen  $^{55}\text{Fe}$  oder  $^{59}\text{Fe}$  ausgetauscht<sup>[8]</sup>; hierbei trägt extrazelluläres, der Zelle anhaftendes Eisen zur Masse bei und die Austauschzeit ist schwer einzuschätzen. Fluoreszenzspektroskopische Methoden haben den Vorteil, wenig invasiv zu sein und eine hohe Empfindlichkeit aufzuweisen.<sup>[6, 7, 10, 51]</sup>

Die subzelluläre Verteilung, sowie die Einflussfaktoren auf das zelluläre chelatisierbare Eisen sind noch nicht vollständig geklärt. Man ging bis vor wenigen Jahren allgemein lediglich von einem cytosolischen Pool chelatisierbaren Eisens aus.<sup>[9, 10]</sup> Es gibt indirekte und mittlerweile auch direkte Hinweise auf Eisenpools auch in anderen Kompartimenten, wie den Mitochondrien.

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Phengreen SK<sup>™</sup> wurde das chelatisierbare Eisen in Hepatozyten von Ratten quantifiziert. Dort lag die Konzentration chelatisierbaren Eisens bei  $5.8 \pm 2.6 \mu\text{M}$  im Zytosol und bei mindestens  $4.8 \mu\text{M}$  für die Mitochondrien. Für den Zellkern lag die Konzentration bei  $6.6 \pm 2.9 \mu\text{M}$ . Für Leberendothelzellen von Ratten wurden diese Werte noch übertroffen: beim Zytosol lag die Konzentration chelatisierbaren Eisens bei  $7.3 \pm 2.6 \mu\text{M}$ , für den Kern bei  $11.8 \pm 3.9 \mu\text{M}$  und für das Mitochondrium bei  $9.2 \pm 2.7 \mu\text{M}$ . In einer kleinen Subpopulation der Endosomen und Lysosomen betrug die Konzentration an chelatisierbarem Eisen sogar  $16 \pm 4 \mu\text{M}$ , wobei zu beachten ist, dass die jeweilige Eisenkonzentration in den jeweiligen Kompartimenten je nach Zell- und Umweltsituation stark variieren kann.<sup>[51]</sup>

Es sprechen auch der Einbau von Eisen(II) in Protoporphyrin IX als letzter Schritt der Hämsynthese und der Einbau von Eisen(II) in eisenhaltige, mitochondriale Proteine für einen mitochondrialen Eisenpool. Ebenso sprechen weitere Indizien für einen lysosomalen Pool chelatisierbaren Eisens.

Durch Autophagozytose aufgenommene Mitochondrien sowie aufgenommenes Ferritin führen zu einem hohen Gesamteisengehalt im Lysosom. Von diesem Gesamteisen kommt es vermutlich zu einer Abgabe von chelatisierbarem Eisen ins Zytosol.<sup>[52-54]</sup> Es liegt also nahe, dass sich auch im Lysosom ein eigener Pool chelatisierbaren Eisens befindet. Erhöht man den pH-Wert des Lysosoms durch Zugabe von Ammoniumchlorid ins Zellmedium –  $\text{NH}_4^+$  ist nicht membranpermeabel, deshalb passiert ausschließlich das zu ihm im Gleichgewicht stehende Ammoniakmolekül  $\text{NH}_3$  die lysosomale Membran, wird dort beim dort vorherrschenden niedrigen pH-Wert protoniert, kann als Ammonium das Lysosom nicht mehr verlassen und erhöht so den pH-Wert innerhalb des Lysosoms – auf etwa  $\text{pH} = 6$ , kommt es zu einer Verhinderung des intralysosomalen Abbaus der eisenhaltigen Metalloproteine durch die spezialisierten lysosomalen Proteasen, deren pH-Optimum bei etwa  $\text{pH} = 4 - 5$  liegt.<sup>[55]</sup> Als Folge einer solchen Vorgehensweise wurde eine Senkung des Pools chelatisierbaren Eisens im Lysosom, der wahrscheinlich als Quelle chelatisierbaren Eisens der Zelle dient, vermutet, da die Behandlung mit Ammoniumchlorid nach einer Inkubationszeit von vier Stunden, die benötigt wird um das Ammoniumchlorid in die Lysosomen gelangen zu lassen und einer Nachinkubationszeit von zwei Stunden, um eine Ammoniakbeladung nur der Lysosomen, nicht aber der Endosomen zu erreichen, einen starken Schutz gegen oxidationsinduzierten Zelltod nach Wasserstoffperoxidzugabe bietet. Eine Inkubationszeit von 15 Minuten zeigt diesen Schutz nicht. Zugabe von sogenannten „spin-traps“ zum ESR-spektroskopischen Nachweis von Hydroxylradikalen zeigten bei der Probe, die für vier Stunden mit Ammoniumchlorid inkubiert wurde, keine nachweisbaren Addukte der „spin-traps“ mit Hydroxylradikalen. Dieselben Beobachtungen lassen sich machen, wenn statt Ammoniumchlorid Desferrioxamin (DFO, Desferrioxamin (Abb.1) wird auch Desferal<sup>®</sup> genannt und besitzt eine Bruttokomplexbildungskonstante  $\log\beta(\text{Fe}^{3+})$  von 30.6 und eine Bruttokomplexbildungskonstante  $\log\beta(\text{Fe}^{2+})$  von 10.3)<sup>[56]</sup> zugegeben wird; hierbei wird nicht die Freisetzung chelatisierbaren Eisens verhindert, sondern das freigesetzte Eisen, das dem che-



latisierbaren Eisenpool zugeführt wird, wird chelatisiert und steht für Reaktionen mit Wasserstoffperoxid nicht mehr zur Verfügung.<sup>[55]</sup> DFO soll durch Endozytose in die Zelle gelangen, um sie zu schützen<sup>[57]</sup> und DFO soll laut Cable *et al.* nicht ins Zytosol<sup>[14]</sup> gelangen (diese Aussagen wurden in der Literatur<sup>[7]</sup> widerlegt), was die Wichtigkeit des endosomalen und des lysosomalen chelatisierbaren Eisens bei der oxidativen Schädigung von Zellen unterstreichen soll. Einige Forscher gehen davon aus, dass lysosomales Eisen eine Schlüsselrolle bei der oxidativen Zellschädigung spielt.<sup>[14-17]</sup>

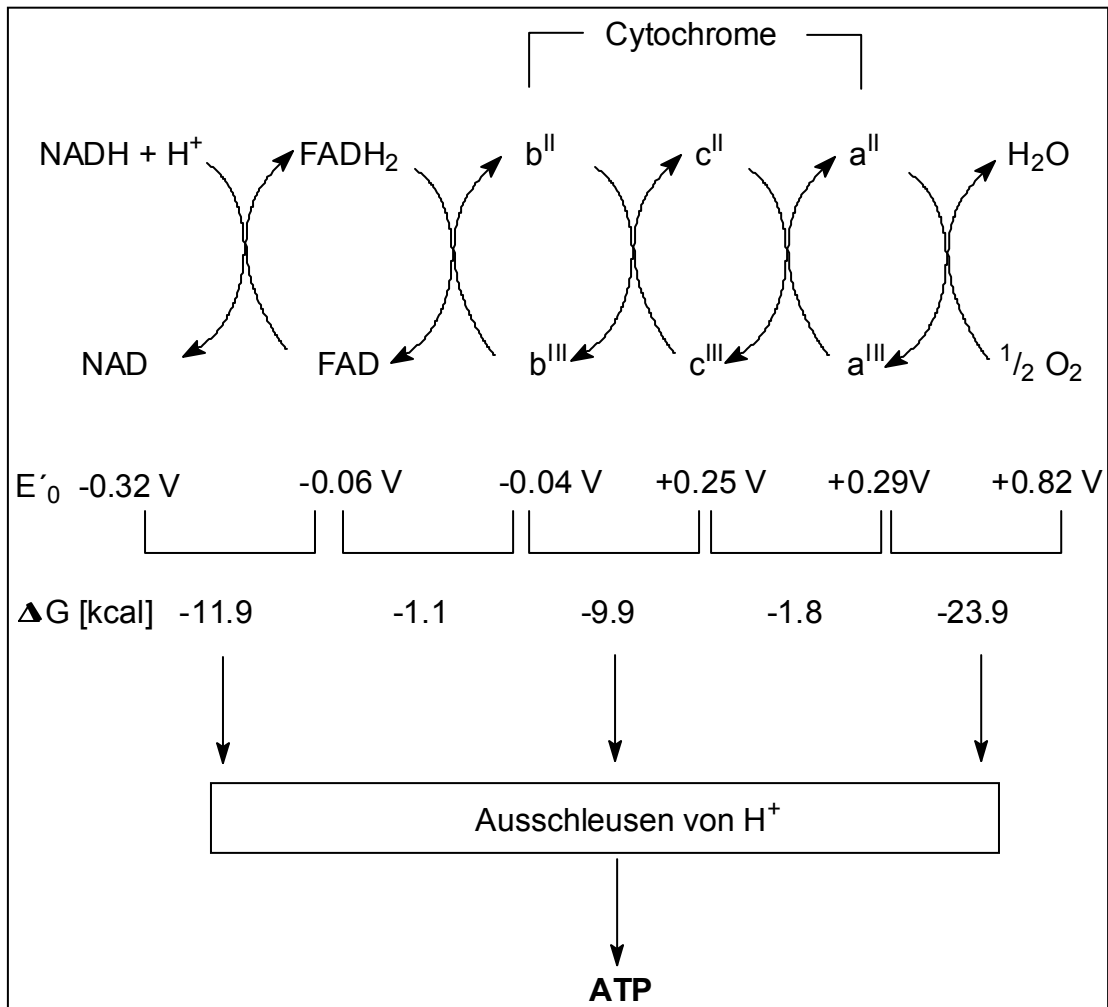
Das eisenbindende Siderophor Desferal wird in der Medizin als Medikament bestimmter Formen humaner Eisenspeicherkrankheiten verwendet. Alle sechs Koordinationstellen des Eisens werden besetzt, eisenkatalysierte Redoxreaktionen sind somit für das chelatisierte Metallkation nicht möglich. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die Eisenchelatisierung durch DFO zu einer dosisabhängigen Inhibierung der Zellproliferation führt.<sup>[57]</sup> Des Weiteren wurde eine irreversible Schädigung der Dopaminfunktion bei Ratten mit Eisenmangel während der neonatalen Periode nachgewiesen.<sup>[58]</sup>

#### **1.4 Die oxidative Phosphorylierung**

Um die schädlichen Wirkungen des Eisens zu verstehen, muss man zunächst den Weg des Sauerstoffs in der Zelle betrachten, der sich als Paradoxon darstellt. Zum einen ist Sauerstoff absolut notwendig für aerobes Leben (also für fast alle auf der Erde vorkommenden Lebewesen, von einigen Mikroorganismen abgesehen), andererseits ist er durch seine hohe Reaktivität an schädigenden Prozessen beteiligt.

Der in der Atmosphäre molekular vorkommende Sauerstoff wird für die bei aeroben Lebewesen als Hauptenergielieferant genutzte oxidative Phosphorylierung benötigt, die in der mitochondrialen Atmungskette abläuft. Die hierfür benötigten Reduktionsmittel, Nicotinamidadenindinucleotid (NADH) und Flavinadenindinucleotid (FADH<sub>2</sub>), die Moleküle mit jeweils einem Elektronenpaar großen Reduktionspotentials sind, entstehen in der

mitochondrialen Matrix im Anschluss an die Glykolyse im Zytosol (bei der das für die oxidative Phosphorylierung wichtige Pyruvat entsteht), der Fettsäureoxidation und im Citratzyklus.



**Abb. 4:** Übersicht der Atmungskette

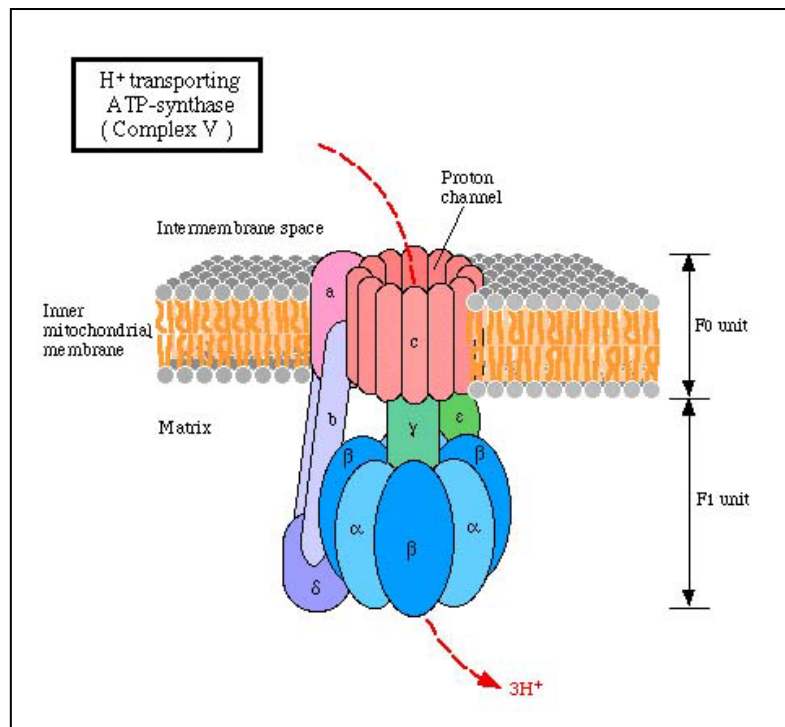
NADH und  $\text{FADH}_2$  reduzieren den aufgenommenen Luftsauerstoff über eine Reihe von Elektronencarriern. Die bei diesem Redoxvorgang freiwerdende Energie wird für die ATP-Synthese benutzt. Dieser Vorgang ist die „oxidative Phosphorylierung“ und findet bei Eukaryoten in der inneren Membran der Mitochondrien, die an die mitochondriale Matrix angrenzt, statt. Die ATP-Synthese ist durch einen Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran mit dem Elektronenfluss durch drei asymmetrisch orientierte Transmembrankomplexe vom NADH oder  $\text{FADH}_2$  zum  $\text{O}_2$

gekoppelt (Abb. 4).<sup>[59]</sup> Hierbei werden Protonen aus der Mitochondrienmatrix hinausgepumpt, so dass ein Membranpotential entsteht. ATP wird beim Zurückfließen der Protonen in die Mitochondrienmatrix gebildet; der Komplex wird als „ATP-Synthase“ bezeichnet. Das grundlegende Prinzip ist die Übertragung freier Energie durch Protonengradienten.<sup>[60]</sup>

Die zuvor erwähnten Elektronencarrier sind die Enzymkomplexe der Atmungskette. Es werden zunächst Elektronen vom NADH auf die prosthetische FMN-(Flavin-mono-nucleotid)-gruppe der NADH-Q-Reduktase (Komplex I), die auch Eisen-Schwefelzentren enthält, übertragen, um anschließend Ubichinon zu Ubichinol zu reduzieren, wobei im Komplex II Succinat zu Fumarat oxidiert wird und hierbei ebenfalls als Reduktionsmittel für Ubichinon dient.

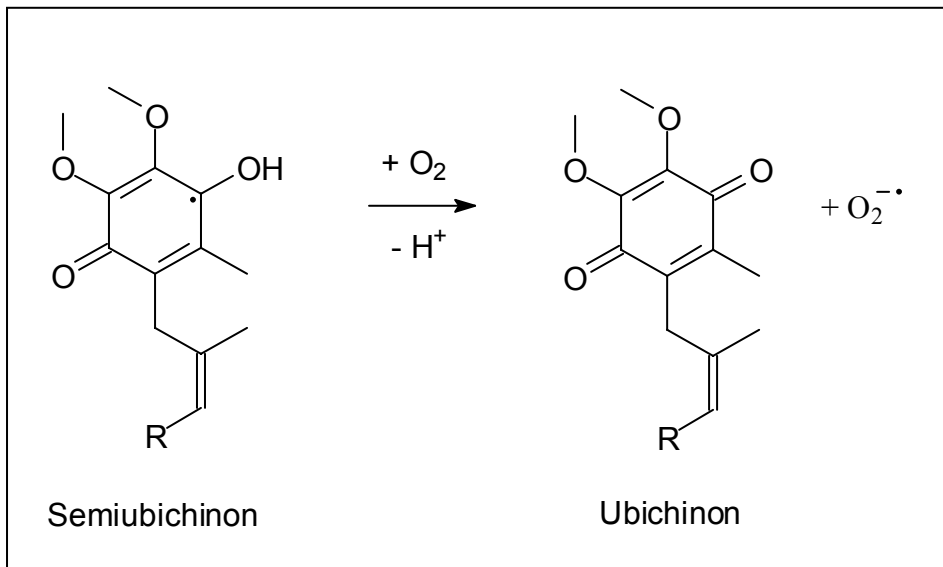
Im Anschluss daran wird dieser hochbewegliche, hydrophobe *carrier* durch den Komplex III (Cytochrom-Reduktase), der unter anderem aus den Cytochromen b und  $c_1$  sowie einem Fe-S-Zentrum besteht, oxidiert. Beim nächsten Komplex dient Cytochrom c, ein wasserlösliches peripheres Membranprotein, wie Cytochrom Q (Ubichinon) ein beweglicher Elektronencarrier, als Elektronenüberträger von der Cytochrom-Reduktase zur Cytochromoxidase, dem Komplex IV, der neben den Cytochromen a und  $a_3$  auch zwei Kupferionen enthält. Komplex I, II und IV sind in der Lage, Protonen von der Matrix- zur Zytosolseite zu pumpen (es entsteht ein  $\Delta\text{pH}$  von etwa 1) und es wird ATP mittels zurückfließender Protonen durch die ATP-Synthase synthetisiert (Abb.5)<sup>[59]</sup>.

Hierbei ist es von Bedeutung, dass durch die Ausbildung eines pH-Gradienten ein Ladungsgradient mit einem Membranpotential von etwa 150 mV erzeugt wird,<sup>[61]</sup> der durch den ATP-Synthase-Komplex genutzt wird.<sup>[60]</sup>



**Abb. 5:** Die ATP-Synthase (Bild entnommen aus Lit. [60])

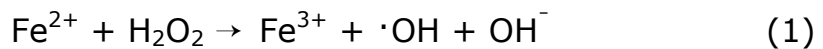
Bei all diesen Redoxreaktionen, bei denen letztendlich molekularer Sauerstoff zu in Wasser gebundenem Sauerstoff reduziert wird, kommt es zwangsläufig zu Nebenreaktionen. Eine dieser unerwünschten Nebenreaktionen ist die direkte Übertragung eines einzelnen Elektrons auf ein Sauerstoffmolekül, wobei das Superoxidradikalanion entsteht. Etwa 1-2% der Elektronen gehen der mitochondrialen Transportkette auf diese Weise „verloren“. Hauptquelle für dieses Anion scheint das in der Atmungskette im Komplex III intermediär auftauchende Semiubichinon (Abb. 6) zu sein.<sup>[62]</sup> Dieser Elektronenverlust ist in den meisten Zellen verantwortlich für etwa 90% des entstehenden reaktiven Sauerstoffs.<sup>[63]</sup>



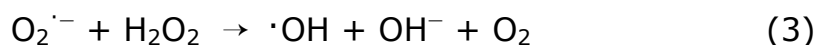
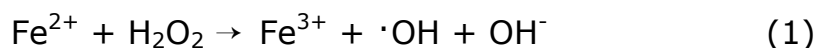
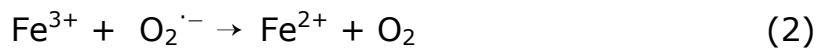
**Abb. 6:** Generierung des Superoxidradikal-Anions durch Semiubichinon in der mitochondrialen Atmungskette.

## 1.5 Reaktionen des Eisens in der Zelle

Die pathologisch bedeutsamste Reaktion des Eisens in der Zelle ist die „Fenton-Reaktion“.



In der Zelle läuft diese Reaktion unter Beteiligung des dort vorhandenen (in Nebenreaktionen der oxidativen Phosphorylierung gebildeten) Superoxidradikals  $\text{O}_2^{\cdot-}$  als Teilreaktion ab und ergibt sich mit Teilgleichung (2), in der das Eisen(II) durch das Superoxid zurückgebildet wird, zur „Haber-Weiss-Reaktion“ (3)<sup>[64]</sup>

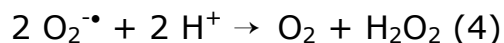


Diese Reaktion (3), welche in deutlich geringerem Maße auch durch andere Metallkationen wie  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Ti}^{3+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  katalysiert wird,<sup>[65]</sup> ist in der Zelle die Hauptquelle der generierten Hydroxylradikale. Es wurde mehrfach nachgewiesen, dass Reaktion (3) in nennenswertem Umfang nur katalysiert abläuft.<sup>[66-69]</sup>

Das Superoxidradikalanion, Wasserstoffperoxid und das Hydroxylradikal gehören – zusammen mit dem Singulett-Sauerstoff  $^1\text{O}_2$ , dem Stickstoffmonoxid  $\text{NO}\cdot$  und dem Peroxynitrit  $\text{ONOO}^-$  – zu den wichtigsten biologischen „reaktiven Sauerstoffspezies“ („ROS“, *reactive oxygen species*).

Die Herkunft des in der Haber-Weiss-Reaktion bedeutsamen Superoxidradikalanions ist (neben dem bereits in Abb. 4 beschriebenen nicht-enzymatischen Weg durch die Semiubichinon-Verbindung der mitochondrialen Atmungskette) eine durch NADPH-Oxidase, Xanthin-Oxidase und ähnliche Enzyme eingeleitete Ein-Elektronen-Reduktion des Triplett-Sauerstoffs  $^3\text{O}_2$ , dem Grundzustand des molekularen Sauerstoffs.<sup>[70]</sup> Es existieren somit zahlreiche Herkunftsmöglichkeiten für das Superoxidradikalanion, wobei in den meisten Zellen die mitochondriale Atmungskette

die bedeutendste ist.<sup>[71]</sup> Obwohl die Synthese des Superoxidradikalanions auch gezielt stattfinden kann (in Granulozyten werden durch den, mittels membrangebundener Enzymkomplexe der NADPH-Oxidase katalysierten, Transfer eines Elektrons von cytosolischem NADPH auf extrazellulären Sauerstoff im Verlauf des „*respiratory burst*“ gebildete Superoxidradikalanionen zur gezielten Bakterienabwehr benutzt<sup>[43]</sup>), ist dieses zu den „ROS“ gehörende Molekül potentiell schädlich. Es entsteht in der Haber-Weiss-Reaktion daraus das Hydroxylradikal. Daher existiert ein körpereigenes Abwehrsystem; Superoxiddismutasen (SOD) katalysieren enzymatisch die Umwandlung des Superoxidradikalanions in Wasserstoffperoxid und (Triplet)-Sauerstoff.<sup>[72]</sup>



## **1.6 Die Mechanismen und Auswirkungen der eisenvermittelten Zellschädigungen durch Bildung und Veränderung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)**

Molekularer Sauerstoff tritt auf der Erde erst seit etwa einer Milliarde Jahren auf. Mit dem Auftreten Photosynthese treibender Lebewesen wurde molekularer Sauerstoff schnell zu einem Hauptbestandteil der Atmosphäre. Der Hauptgrund dafür, dass dieser nicht alle biologische Materie einfach oxidiert, liegt an einer Eigenart dieses Moleküls: es liegt im Grundzustand in einem Triplettzustand mit ungepaarten Elektronen vor. Die Inversionszeit ist lang gegen die Kontaktzeit mit Redoxpartnern, die in einem Singulettgrundzustand vorliegen.

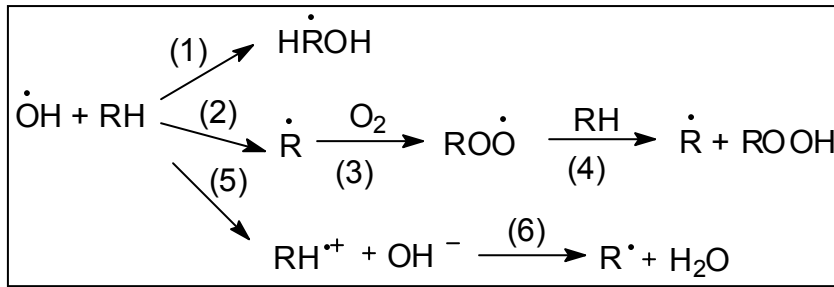
Es liegen in der Zelle aber neben  $^3\text{O}_2$  auch ROS vor. Neben den genannten Herkunftsmöglichkeiten ist eine weitere Quelle des Superoxidanions die Oxidation der Ferrohämgruppe ( $\text{Fe}^{2+}$ ) im Hämoglobin zum Ferrihäm ( $\text{Fe}^{3+}$ ) durch  $\text{O}_2$ . Aus Gründen der Ökonomie der Ressourcen existieren zahlreiche Schutzmechanismen gegen diese ROS. Das Superoxidradikal-Anion wird durch die Superoxiddismutase (SOD) abgebaut, Wasserstoffperoxid wird durch Katalase zu Wasser und Triplett-Sauerstoff abgebaut.

Es scheint, dass unter normalen physiologischen Bedingungen genügend protektive Enzyme und andere schützende Moleküle in einer Zelle synthetisiert werden. Dies bedeutet, dass unter den Bedingungen hohen oxidativen Stresses entweder eine adaptive Antwort erfolgen muss oder oxidativer Schaden auftritt. Es existiert ein Gleichgewicht zwischen der anti-oxidativen Kapazität und den zahlreichen pro-oxidativen Faktoren,<sup>[73]</sup> bei dem allerdings meist die pro-oxidativen Kräfte leicht überwiegen, da eine zeitliche Verzögerung durch die Bildung der anti-oxidativen Moleküle entsteht. Kommt es gar zu einem massiven Anstieg der oxidativen Spezies in sehr kurzer Zeit, kann es zu einer „Überwältigung“ des anti-oxidativen Systems kommen; dieses kann zu ernsthaften pathologischen Konsequenzen führen. So kann die Exposition von 1 ppm Ozon für zwei Stunden größeren permanenten Schaden verursachen als die Exposition von Triplett-sauerstoff über viele Jahre.

Wie bereits erwähnt, ist die Bildung von ROS nicht immer unerwünscht: Leukozyten töten Bakterien und Tumorzellen durch Bildung des Superoxidradikalanions. Das bereits erwähnte Hydroxylradikal reagiert mit der Mehrzahl sogar (nahezu) diffusionskontrolliert mit nahezu jeder Art von Molekül über verschiedene Mechanismen. Durch diese hohe Reaktivität ist dieses Molekül auch schwer nachzuweisen. Man kann davon ausgehen, dass die Anzahl der gebildeten Hydroxylradikale annähernd gleich der Anzahl der Reaktionen mit Biomolekülen ist. Die Konzentration an freiem Hydroxylradikal in der Zelle ist daher sehr gering (in den meisten Fällen nicht mehr als etwa  $10^{-11}$  M).<sup>[74]</sup>

In wässriger Lösung von Biomolekülen kommt es zu Additionsreaktionen (Abb. 7, Reaktion 1) und Wasserstoffatomabstraktionen (Reaktion 2), teilweise gefolgt von O<sub>2</sub>-Additionen (Reaktion 3), welche wiederum Wasserstoffatome anderer Biomoleküle abstrahieren (Reaktion 4).<sup>[74]</sup> Eine weitere Reaktion ist der direkte Elektronentransfer von Biomolekülen auf das Hydroxylradikal (Reaktion 5) mit anschließender Protonenübertragung vom radikalischen Biomolekül auf das Hydroxylion (Reaktion 6).





**Abb. 7:** Typische Reaktionen des Hydroxylradikals

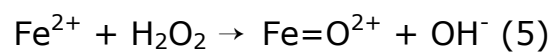
Die Weiterführung der Reaktionskette ist ein Grund dafür, dass die durch das Hydroxylradikal erzeugten Schäden trotz seiner hohen Reaktivität in großer Entfernung von dessen Generierung und vom Entstehungspunkt seiner Initialreaktionsprodukte auftreten können.

In der komplexen Umgebung eines Zellinneren spielen jedoch Oberflächenbegebenheiten der Organellen, elektrische Ladungen und Bindungseigenschaften der Proteine, Membranen, Nukleinsäuren und anderer Biomoleküle ebenso eine wichtige Rolle bei Ausmaß und Natur dieser Schäden wie das Vorkommen der bereits erwähnten Übergangsmetalle und deren Chemie. So müssen Eisen(III) und Kupfer(II) erst ihrerseits – durch beispielsweise Ascorbinsäure, niedermolekulare Sulfhydryle<sup>[75]</sup> oder Xenobiotica, wie Paraquat<sup>[76]</sup> – reduziert werden um aus Wasserstoffperoxid Hydroxylradikale zu generieren. Die Reduktion von Eisen an bestimmten Stellen selbst könnte bereits nach bislang ungeklärtem Mechanismus zu Schäden führen,<sup>[74]</sup> aber in den meisten Fällen scheint Wasserstoffperoxid unabdingbar zu sein. Die Bindung des Metallkations an bestimmte Stellen scheint hierbei durch die dortige Entstehung des Hydroxylradikals den Schädigungsort vorzugeben.

Es existiert eine, der über das Hydroxylradikal vermittelten oxidativen Schädigung widersprechende Theorie. Sie wird unter anderem darauf begründet, dass die oxidative Schädigung von Biomolekülen nicht immer durch zugesetzte Hydroxylradikalfänger verhindert werden kann.<sup>[77]</sup> Dies kann aber auch damit erklärt werden, dass für eine hundertprozentige Wahrscheinlichkeit des vollständigen Abfangens aller Hydroxylradikale die

Konzentration des Radikalfängers am Entstehungsort der Hydroxylradikale, die diffusionskontrolliert mit jeglicher Art von Biomolekül reagieren, unrealistisch groß sein müsste.<sup>[9]</sup>

Ein weiteres Argument gegen die Theorie der Schädigung über das Hydroxylradikal ist die Tatsache, dass auch ein Zusatz von Katalase nicht in jedem Fall eine inhibierende Wirkung zeigt. Dies geschah im Falle einer nicht durch Katalase inhibierten Lipidperoxidation. Es wurde die Kinetik von mikrosomalen oder liposomalen Peroxidationen in Gegenwart von Eisen(II)- und/oder Eisen(III)-Salzen mit dem Ergebnis untersucht, dass diese Reaktion auch durch einen  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -Sauerstoffkomplex gestartet werden kann.<sup>[78]</sup> Andere Autoren kamen sogar zu dem Schluss, dass Eisen-zentrierte Radikale (Ferryl- oder Perferryl-Radikale) zumindest im Falle der Lipidschädigung und der Destabilisierung von lysosomalen Membranen als erheblich wahrscheinlicher anzunehmen sind als Hydroxylradikale.<sup>[79]</sup> In diesen Ferrylen würde das Eisen die formale Oxidationsstufe  $\text{Fe}^{+IV}$  annehmen.<sup>[80, 81]</sup>



In jedem Falle war das Vorhandensein von Eisen unabdingbar.

### 1.6.1 SCHÄDIGUNGEN DER LIPIDE DURCH PEROXIDATION

Die Lipide der Membran, welche Doppelbindungen besitzen – insbesondere mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA, **polyunsaturated fatty acids**), sind am zugänglichsten für oxidative Schädigungen durch Hydroxylradikale.<sup>[82]</sup> Diese Peroxidationen an ungesättigten Fettsäureresten laufen unkatalysiert ab, werden aber auch durch endogene Membranproteine katalysiert.<sup>[82, 83]</sup> Diese Reaktionen laufen nach den Reaktionsgleichungen (1-4) ab, deren weitere Produkte sind beispielsweise zyklische Endoperoxide<sup>[84]</sup>, welche Änderungen in der Membranstruktur bewirken. Diese wird zumeist starrer, die Aktivität einiger essentieller Membranproteine wie der Na/K-ATPase verändert sich und damit die Ionenpumprate.

Zwei definierte Endprodukte dieser Lipidperoxidation sind Malondialdehyd

und 4-Hydroxynonenal. Beiden Molekülen wird aufgrund ihrer bekannten Reaktion mit kritischen Biomolekülen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung einiger pathologischer Befunde zugewiesen. Speziell für Malondialdehyd ist die Reaktion mit Nukleinsäuren nachgewiesen,<sup>[85]</sup> was zur Cancerogenese führen kann. Für 4-Hydroxynonenal wird die Reaktion mit LDL (*low density lipoprotein*) vermutet, was unter anderem als beitragender Prozess zur Arteriosklerose diskutiert wird.

Die Schädigung lysosomaler Membranen kann den moderaten Zufluss lysosomaler hydrolysierender Enzyme zur Folge haben. Dies kann unter anderem eine Apoptose der Zelle und die Aktivierung der Kaspase-Kaskade zur Folge haben. Im Falle eines Zusammenbruchs lysosomaler Membranen mit einer Freisetzung entsprechend höherer Mengen an hydrolytisch wirkenden Enzymen hat dies meist die Nekrose der entsprechende Zelle zur Folge.<sup>[16, 17, 86]</sup>

Bei Ratten führte die orale Beladung mit Eisencarbonylen zur Lipidperoxidation. Die hepatischen Konzentrationen, die zur Schädigung führten, waren ein Drittel bis ein Halb so hoch wie die Konzentrationen, die zu mikrosomaler Lipidperoxidation führten,<sup>[87, 88]</sup> was auf eine erhöhte Anfälligkeit mitochondrialer PUFA hinweist.

### 1.6.2 OXIDATIVE PROTEINSCHÄDIGUNG

Der Angriff von ROS auf Proteine kann zu vielen möglichen Produkten führen. Hierbei wird unter anderem ein Prozess vermutet, der durch kontinuierliche ROS-Zufuhr die Schädigungen vorantreibt.<sup>[89]</sup> Es beginnt mit ortsspezifischen Läsionen wie dem Verlust von Histidinresten, der Einführung von Carbonylgruppen durch oxidative Desaminierung und die Bildung von proteinzentrierten Alkyl-, Alkoxyperoxy- und Alkoxyradikalen und führt über Fragmentierungen zu Querverknüpfungen der Proteine untereinander (beispielsweise über Bityrosinbrücken) oder mit anderen Zellkomponenten.<sup>[90]</sup>

Es ist wahrscheinlich, dass feine Veränderungen in spezifischen Proteinen signifikante biologische Konsequenzen haben. So führt beispielsweise die

Oxidation eines aktiven Aminosäurerestes des  $\alpha_1$ -Proteaseinhibitors zu dessen Inaktivierung. Somit kommt es zu einer stärkeren Aktivierung normalerweise hauptsächlich inaktiver Proteasen, was zu Zellschäden und letztendlich zu einem Lungenemphysem führen kann.<sup>[91]</sup>

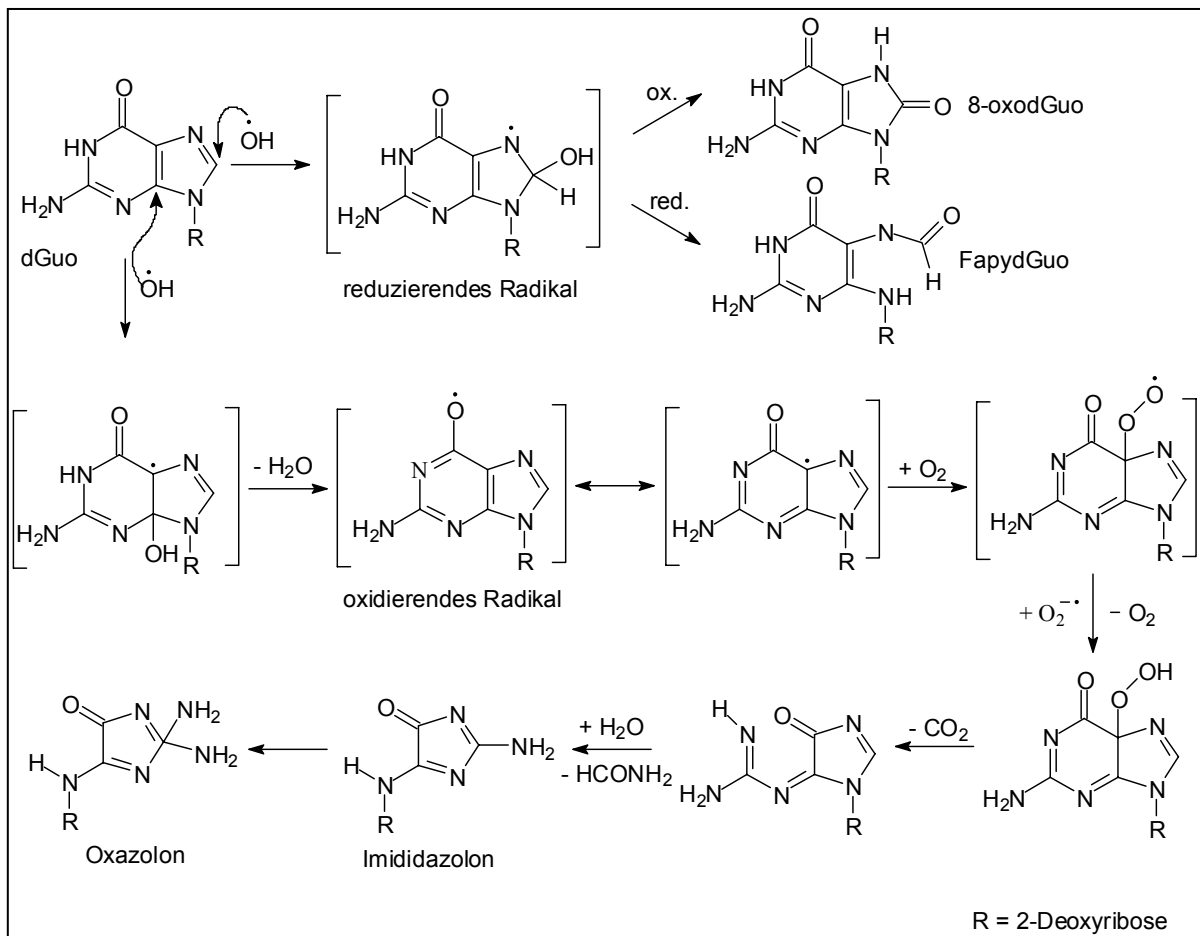
Eine Aminosäureeinheit der Glutaminsynthase führt bei Oxidation ebenfalls zu deren Inaktivierung. Dies kann zu einer Glutamatkonzentrationserhöhung führen. Glutamat ist ein bekanntes Neurotoxin;<sup>[92]</sup> dies könnte zu den Schäden beitragen, die bei einem Schlaganfall auftreten.

### 1.6.3 SCHÄDIGUNG DER NUKLEINSÄUREN

Die Schäden, die durch Oxidation der Nukleinsäuren auftreten, lassen sich in zwei Grundformen unterteilen: Strangbrüche und Produkte aufgrund von Modifikationen der Basen.<sup>[93]</sup> Superoxid erzeugt ebenso wie das Hydroxylradikal Strangbrüche,<sup>[94]</sup> indem es die Ribosen angreift, möglicherweise an den 3' - und an 4' - Positionen.<sup>[93]</sup> Dies ist die wohl häufigste Einzelläsion und muss durch entsprechende Enzyme repariert werden, damit die Zelle weiterhin normal funktionieren kann. Hierbei kann es zum Fehleinbau von Basen kommen.

Bei der Oxidation von Basenresten sind die Bildungen von mindestens 60 DNA-Basen-Läsionen bekannt,<sup>[95, 96]</sup> unter anderem die drei Modifikationsprodukte 8-Hydroxyguanin (8-OHdG), 5-Hydroxymethyluracil und Thyminglykol,<sup>[93]</sup> wobei das Auftreten von 8-OHdG in der DNA auch durch Einwirkung von Singulett-Sauerstoff (z.B. durch Methylenblau und Licht) bekannt ist.<sup>[97]</sup>

8-Hydroxyguanin spielt unter anderem eine Rolle bei der Karzinogenese.<sup>[93]</sup> So treten bei bekannten Karzinogenen, wie 4-Nitrochinolinoxid (NQO) oder bei ionisierender Strahlung 8-OHdG auf;<sup>[98]</sup> im Falle von NQO treten 8-OHdG und NQO-Addukte im Verhältnis von eins zu drei auf. Behandlung von Ratten mit  $\text{KBrO}_3$ , von dem bekannt ist, dass es Nierentumore erzeugt, rief eine große Menge 8-OHdG in der DNA des Zielgewebes hervor.<sup>[99]</sup> Dies sind nur einige wenige der Indizien für eine krebsinduzierende Wirkung des 8-Hydroxyguanins.



**Abb. 8:** Reaktion des Hydroxylradikals mit der Base 2'-Deoxyguanosin.<sup>[100]</sup>

Abb. 8 zeigt die Einwirkung von Hydroxylradikalen auf die Base 2'-Deoxyguanosin (dGUO) und die daraus entstehenden primären Radikale, zu denen auch 8-Hydroxyguanin (8-OHdG) zählt, in Abb. 8 als reduzierendes Radikal bezeichnet. Diese reagieren in der dargestellten Form weiter zu den verschiedenen Endprodukten. Die der Abbildung zugrunde liegenden Untersuchungen wurden allerdings in Abwesenheit eines reduktiven Milieus durchgeführt.<sup>[100]</sup>

Die Initiation von Krebs durch Hydroxylradikale wird durch weitere Indizien angezeigt. Teflonscheiben, oder andere Gegenstände, die unter die Haut von Tieren implantiert werden, führen zur dortigen Entstehung von Krebs. Leukozyten versuchen erfolglos, die Scheiben mit großen Mengen ROS anzugreifen und zu zerstören; selbiges geschieht bei Asbestfa-

sern.<sup>[101]</sup> Ionisierende Strahlung führt ebenfalls zur Entstehung von DNA-Schäden und auch zur Entstehung von ROS,<sup>[93]</sup> was in kausalem Zusammenhang stehen könnte. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass spezielle Eisenbindungsstellen an der DNA nachgewiesen wurden.<sup>[102]</sup> Es ist noch nicht bekannt, ob die Hydroxylradikale durch an diese Bindungsstellen mit der DNA assoziiertes Eisen (oder auch Kupfer) auch wirklich dort entstehen, wo dann auch die DNA-Schädigung stattfindet.<sup>[44, 103-105]</sup> Hierbei würde das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Molekül durch zelluläre Membranen bis zum DNA-gebundenen Eisen diffundieren und sofort nach der durch die Fenton-Reaktion (1) stattgefundenen ·OH-Bildung die DNA schädigen.

Ein besonderes Augenmerk muss hier auf die mitochondriale DNA, die mtDNA gelegt werden. Die ringförmigen DNA-Moleküle scheinen erheblich empfindlicher zu sein als die „normale“ DNA, welche sich im Zellkern befindet. Die Mutationsrate liegt in Säugetieren bei mtDNA etwa 5-15-mal höher als bei Kern-DNA;<sup>[106-110]</sup> bei sehr geringem Fluss exogen entstehenden Wasserstoffperoxids kommt es im Falle der DNA-Schädigung ausschließlich zu einer mtDNA-Schädigung. Dies kann mehrere Ursachen haben. Zum einen kann das Mitochondrium selbst ROS generieren. Zum anderen kann der Gehalt chelatisierbaren Eisens in Mitochondrien höher liegen als im Zellkern.<sup>[111]</sup> Neben einer höheren ROS-Bildungsrate kann es aber auch an einem schwächeren Schutz gegen ROS liegen. Dies wäre zum einen ein Mangel an - vor oxidativem Schaden bewahrenden - Histonen, zum anderen langsamere und ineffektivere Reparaturmechanismen, was von der Art der jeweiligen Schädigung abhängt.<sup>[112]</sup> Besonders gravierend ist die Tatsache, dass der totale Betrag der mtDNA-Schädigung mit dem Alter des Lebewesens ansteigt, neue Schädigungen bauen auf alten Schäden auf, wobei die Gesamtmenge an mtDNA konstant bleibt.<sup>[113, 114]</sup> Dies führt dazu, dass sich im Skelettmuskel älterer Menschen kaum noch PCR-Produkte voller Länge finden.<sup>[113-115]</sup>

Es stellt sich die Frage, wie mtDNA-Mutationen zum funktionellen Ausfall von Organen wie dem Herzen führen können. Es zeigt sich, dass bei einigen Individuen, bei denen 50% der mtDNA eine bestimmte Mutation einer

Krankheit in sich trug, dies zu keinerlei Symptomen führte. Sobald der Anteil der mutierten Gene auf 70 - 80% des Krankheitskomplexes anstieg – oft waren sowohl Nervensystem als auch Muskeln wie das Herz involviert – tauchten plötzlich Symptome einer Krankheit auf. Dies scheint der kritische Punkt zu sein.<sup>[116, 117]</sup>

Darüber hinaus werden Mutationen der mtDNA auch bei einer Vielzahl neurodegenerativer Erkrankungen diskutiert. Dazu zählen die Parkinsonsche Krankheit, Morbus Huntington, die Alzheimer Krankheit<sup>[118, 119]</sup> und die verschiedenen Ataxien, welchen eine Störung von Muskelbewegungen gemein ist.

Es gibt indirekte Hinweise für die Wichtigkeit der Eisenakkumulation im generellen Alterungsprozess selbst. So kann die Lebensspanne von *Drosophila melanogaster* durch Inhibierung der Eisenabsorption bis über 20% verlängert werden.<sup>[120]</sup> Ähnliche Beobachtungen konnten bei Hausfliegen, die mit dem Chelator Diethyldithiocarbamat versorgt wurden, gemacht werden.<sup>[120]</sup> Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse kann man den pathologischen Effekt des Eisenüberschusses als beschleunigte Alterung interpretieren.

#### 1.6.4 SCHÄDIGUNGSPROZESSE UNTER BETEILIGUNG DES LYSOSOMALEN, CHELATISIERBAREN EISENS

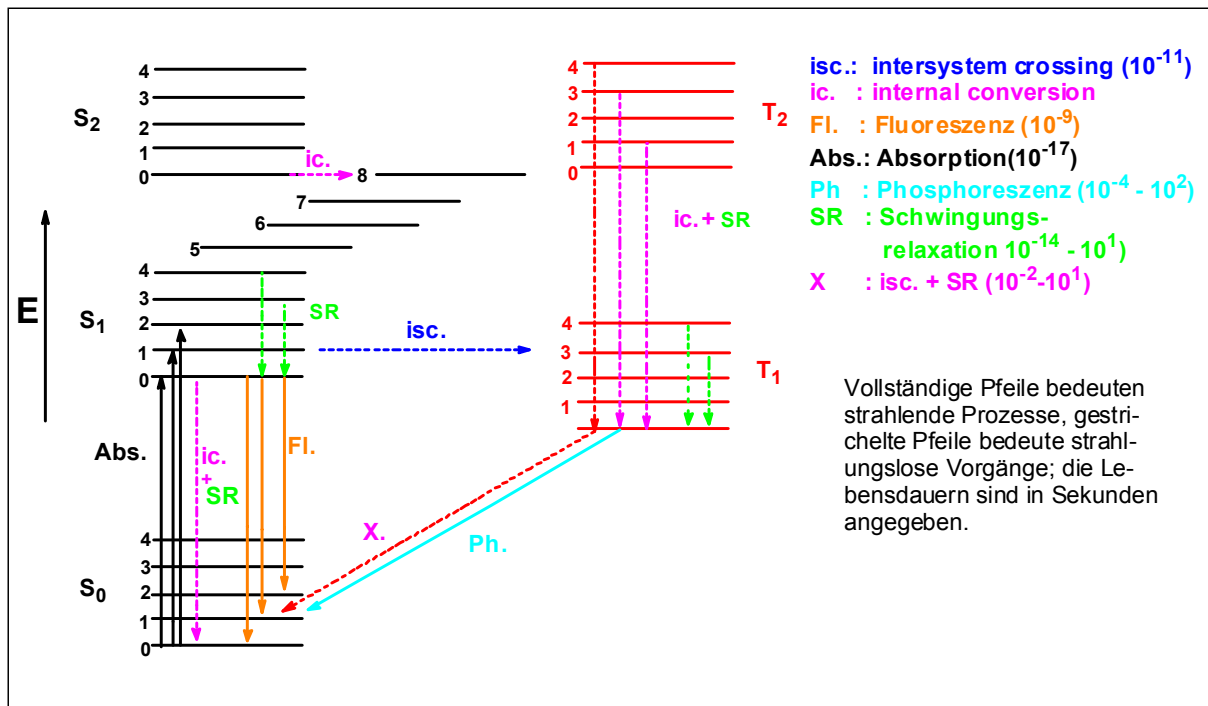
Bei oxidativem Stress durch erhöhte Wasserstoffperoxidkonzentrationen kommt es im sauren vakuolischen System der Endosomen und der Lysosomen zu Schädigungen der Organellmembranen. Diese beruhen auf Reaktionen nach den in 1.6.1 beschriebenen Typen, die mit Übergangsmetallkatalysierten Fenton-Reaktionen beginnen und peroxidativ die Membran destabilisieren. Moderate Schädigung der Membran kann zur Apoptose führen, ein größerer Schaden zur Nekrose. In beiden Fällen kommt es zum einen zu einem Verlust an hydrolytischen Enzymen und zum anderem zu einem Ausfließen chelatisierbaren Eisens.<sup>[15, 121]</sup> Die Schädigungen der Lysosomen können als erster Schritt zu einer oxidativen Schädigung der

nDNA führen.<sup>[55, 57]</sup> Vor diesem Hintergrund wurde der Mechanismus dieser Kaskade untersucht. Um eine entscheidende Wirkung der ins Zytosol gelangten Hydrolasen auszuschließen, wurden durch Zugabe des lysosomotropen Detergens *O*-Methyl-serin-dodecylamin-hydrochlorid (MSDH) Hydrolasen aus den Lysosomen dem Zytosol zugeführt. Dies zeigte, dass ausschließlich Membranschädigungen durch oxidativen Stress zur Apoptose, bzw. zur Nekrose führten. Es zeigten sich auch kaum frühe nDNA-Schädigungen. Sowohl die Apoptose, als auch die Nekrose konnten durch Zugabe des Eisenchelators DFO unterbunden werden, der die metallkatalysierte Fenton-Reaktion durch Inaktivierung des chelatisierbaren Eisens unterbindet. DFO wird wahrscheinlich nicht nur über den Endozytoseweg aufgenommen und verbleibt möglicherweise nicht im lysosomalen Kompartiment.<sup>[15, 52]</sup> Um sicherzustellen, dass dieser Schutz von DFO ausgeht, welches sich im Lysosom befindet, wurde ein HMM-DFO-Komplex (hochmolekulares DFO, welches an ein hydroxyethyliertes Stärkerückgrat gekuppelt wurde) mit einer molekularen Masse von etwa 75 kDa anstelle des niedermolekularen DFO benutzt. Neutrale Komplexe hoher Masse werden per Flüssigphasen-Endozytose aufgenommen. Das modifizierte Stärkerückgrat verbleibt unabgebaut im Lysosom. Diese Vorgehensweise führt ebenfalls zu einem Schutz vor Zellschädigungen durch oxidativen Stress. Die Beobachtung, dass die meisten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten nDNA-Schäden durch das Chelatisieren hauptsächlich des Eisens im endosomalen- und lysosomalen Kompartiment verhindert werden können, lässt die Vermutung zu, dass dieses Kompartiment eine Grundvoraussetzung für diese Art der Schädigung ist. Diese Untersuchung ist ein Indiz für die Wichtigkeit des lysosomalen Eisens für intrazelluläre Schädigungsprozesse.



## 1.7 Grundlagen der Fluoreszenz

Auf Grund der geringen Invasivität und der hohen Empfindlichkeit ist die Fluoreszenzmikroskopie die Methode der Wahl zur Quantifizierung chelatisierbaren Eisens in lebenden Zellen. Um das chelatisierbare Eisen diskreter Zellkompartimente zu quantifizieren, ist ausschließlich diese Methode geeignet



**Abb. 9:** Jablonski-Termschema einiger strahlender und strahlungsloser Prozesse bei Fluoreszenzfarbstoffen.

Abb. 9 zeigt die Absorption eines Lichtquants (Photon) zu einem elektronisch angeregten Zustand (bez. mit  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$  usw.) mit den verschiedenen Schwingungszuständen.<sup>[122]</sup> Normalerweise findet Absorption nur vom Schwingungsgrundzustand des elektronischen Grundzustandes in die verschiedenen Schwingungszustände der elektronisch angeregten Zustände statt. Eine Ausnahme sind heiße Banden. Da sich aber bei Raumtemperatur 99% der Moleküle im Schwingungsgrundzustand des elektronischen Grundzustandes befinden, sind diese bei Temperaturen auch um  $37^\circ\text{C}$  kaum sichtbar.

Emission findet normalerweise nur vom Schwingungsgrundzustand des

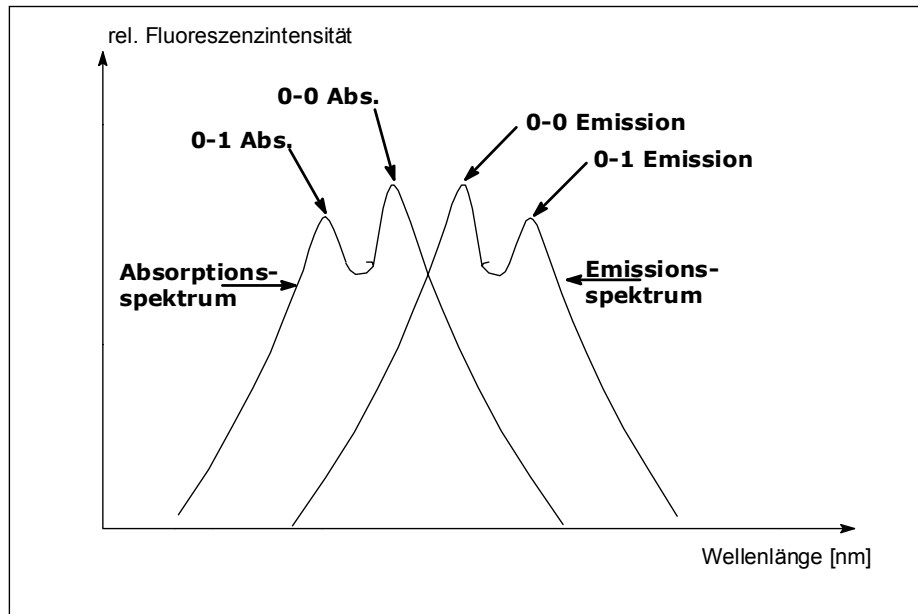
ersten elektronisch angeregten Zustands in die verschiedenen Schwingungszustände des elektronischen Grundzustandes statt (Ausnahme: Azulen vom Schwingungsgrundzustand des zweiten angeregten Zustands zum Schwingungsgrundzustand des elektronische Grundzustandes).

Man sieht im Absorptionsspektrum die verschiedenen Übergänge  $0 \rightarrow 0$ ,  $0 \rightarrow 1$ ,  $0 \rightarrow 2$  usw., im Emissionsspektrum ebenso. Von höheren elektronisch angeregten Zuständen aus findet man *internal conversion*, einen strahlungslosen Übergang ohne Energieabgabe in energetisch gleichwertige hohe Schwingungsniveaus niedriger elektronisch angeregter Niveaus. Vom Schwingungsgrundzustand des  $S_1$  zu  $S_0$  ist aufgrund der größeren Termabstände eine *internal conversion* benachteiligt, was Fluoreszenz überhaupt erst möglich macht.

Innerhalb eines elektronisch angeregten Zustandes findet man die Schwingungsrelaxation. Durch intermolekulare Stöße konvertiert das Molekül in niedrigere Schwingungsniveaus innerhalb der jeweiligen elektronisch angeregten Zustände. Die Energie wird als Translations- oder Schwingungsenergie übernommen.

Weil die Schwingungszustände in den verschiedenen elektronisch angeregten Zuständen die gleiche Struktur zeigen, sind Absorptions- und Emissionsspektrum spiegelsymmetrisch (Abb. 10) und zeigen die Stokes-Verschiebung, bei der die Emission in den langwelligen Bereich verschoben ist; auch der  $0 \rightarrow 0$  Übergang bei der Emission kann ins Langwellige verschoben sein.<sup>[122]</sup>

Dies kann zum einen an Reabsorptionseffekten liegen, wobei der kurzwellige Anteil herausgefiltert wird und der Peak der Bande ins Langwellige verschoben wird. Zum anderen können die angeregten Zustände ein stärkeres Dipolmoment auf Grund starker Beteiligung der zwitterionischen Strukturen aufweisen. Polare Lösungsmittel orientieren sich um, die Energie des Anregungszustandes sinkt während der Anregung ab und die Energiedifferenz zum Grundzustand sinkt ab.



**Abb. 10:** Vereinfachtes Absorptions- und Emissionsspektrum eines Fluoreszenzfarbstoffes.

Von den elektronisch angeregten Zuständen kann es auch zu *intersystem crossing* kommen. Hierbei wird ein metastabiler Triplettzustand erreicht, für den aus Symmetriegründen ein Übergangsverbot für den Strahlungsübergang in den Grundzustand gilt. Die Lebensdauer ist also erheblich höher als für den ersten elektronisch angeregten Zustand. Für einen Strahlungsübergang in den Grundzustand spricht man von Phosphoreszenz.

Fluoreszenz tritt nur bei anorganischen Ionen der Übergangsmetalle und der seltenen Erden, sowie bei organischen Verbindungen, die  $\pi$ -Elektronen enthalten, auf. Um zu erklären, welche Stoffe fluoreszieren und welche nicht, muss man die Konkurrenzreaktionen der Fluoreszenz betrachten. Dies sind, neben der Phosphoreszenz, strahlungslose Deaktivierungen der Anregungszustände. Von deren Wahrscheinlichkeit, und somit Geschwindigkeit, hängt die Fluoreszenz ab. Hierbei gibt es inter- und intramolekulare Prozesse. Zuerst aufgezeigt sind die Prozesse, die vom Fluorophor selbst abhängen:

**„loose bolt“ – Effekt:** hierbei führen Torsionsschwingungen zum strahlungslosen Abfließen der elektronischen Anregungsenergie an die Umge-

bung. Bei ebenen Konjugationssystemen fehlt die Möglichkeit zu derartigen Schwingungen.

**Prädissoziation:** es müssen schwache Bindungen existieren, deren Trennungsenergie unterhalb der betreffenden Anregungsenergie liegt. Dies trifft bei organischen Verbindungen hauptsächlich für Nitro-, Carboxyl-, -SH-Gruppen und Halogenide als Substituenten im fluoreszierenden aromatischen System zu. Fluoreszenz wird nur deswegen ausschließlich bei Verbindungen mit  $\pi$ -Elektronensystem beobachtet, weil diese neben der besonders geringen Energie für die Anregung ein so stabiles Bindungssystem haben, dass eine Dissoziation mittels der Anregungsenergie nicht möglich ist.

**Konzentrations-, bzw. Eigenlöschung:** Bildung von Dimeren (ab ca.  $10^{-4}$  M), deren Anregungszustände fluoreszenzunfähig sind, da von ihnen ein niedrigerer metastabiler Zustand strahlungslos erreicht werden kann. Es wird durch die Anregungsenergie ein elektronisch angeregter Singulettzustand erreicht. Bei einigen Molekülen wird von dort aus durch *intersystem crossing* ein metastabiler Triplettzustand erreicht. Von diesem bestehen Übergangsverbote für den direkten Strahlungsübergang in den Grundzustand, so dass zu der stattfindenden Phosphoreszenz konkurrierende, strahlungslose Desaktivierungsprozesse aufgrund der längeren Verweilzeit erfolgreicher konkurrieren können.

Neben den Eigenlöschungen gibt es auch die Fremdlöschungen.

**I. Statische Fremdlöschung** (ähnlich der Eigenlöschung):

a) Reversible Bildung fluoreszenzunfähiger Assoziate vor der Anregung durch Schwermetallionen, welche die Spin/Bahn-Kopplung erhöhen, somit *intersystem crossing* wahrscheinlicher machen und es somit zu einer Triplettbegünstigung kommt (Schweratomeffekt).

b) Andere Fremdstoffe (bes. geeignet Halogenidionen/halogenierte Verbindungen, die wahrscheinlich Bindungen spalten).

**II. Dynamische Fremdlöschung:** Erst im angeregten Zustand kommt es zu Wechselwirkungen mit Fremdmolekülen. Es kommt zu reversiblen, bimolekularen Reaktionen, die häufig Redoxprozesse beinhalten.

**III. FRET** (Fluorescence resonance energy transfer): Die Anregungsenergie wird auf einen Fremdstoff (bis 100 Å entfernt) übertragen, dessen Anregungszustand eine ähnliche Energie besitzt. Dieser kann seine Anregungsenergie strahlungslos abgeben oder selbst fluoreszieren („sensibilisierte Fluoreszenz“).

Die Konkurrenzreaktionen der Fluoreszenz führen zu einer Verminderung der Quantenausbeute  $\Phi_F$ , durch die die Fluoreszenzfähigkeit quantifiziert wird. Sie ist definiert als Quotient der Anzahl der emittierten durch die Anzahl der absorbierten Photonen.

$$\Phi_F = \frac{\text{Zahl der emittierten Photonen}}{\text{Zahl der absorbierten Photonen}} \quad (6)$$

Über eine bekannte Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_F$  eines Moleküls, einer gemessenen Fluoreszenz  $F$  einer Lösung dieses Moleküls und der Intensität des eingestrahlten Lichts  $I_0$  lässt sich direkt die Konzentration der Lösung berechnen; die Intensität der Fluoreszenz  $F$  der Lösung ist proportional der Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_F$  und der Intensität  $I_a$  des absorbierten Lichts, wobei  $I_a$  die Differenz der Intensität  $I_0$  des eingestrahlten Lichts und der Intensität  $I_t$  des durchgelassenen Lichts ist. Das Lambert-Beer'sche Gesetz setzt  $I_t$  und  $I_0$  ins Verhältnis, so dass man zur Gleichung für die direkte Konzentrationsberechnung aus der Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_F$  und der Intensität  $I_0$  des eingestrahlten Lichts kommt:

$$F = \Phi_F I_a, \quad \text{mit } I_a = I_0 - I_t \quad (7)$$

$$F = \Phi_F (I_0 - I_t), \quad \text{mit } I_t = I_0 10^{-\varepsilon cd} \quad (8)$$

$$F = \Phi_F I_0 (1 - 10^{-\varepsilon cd}), \quad (9)$$

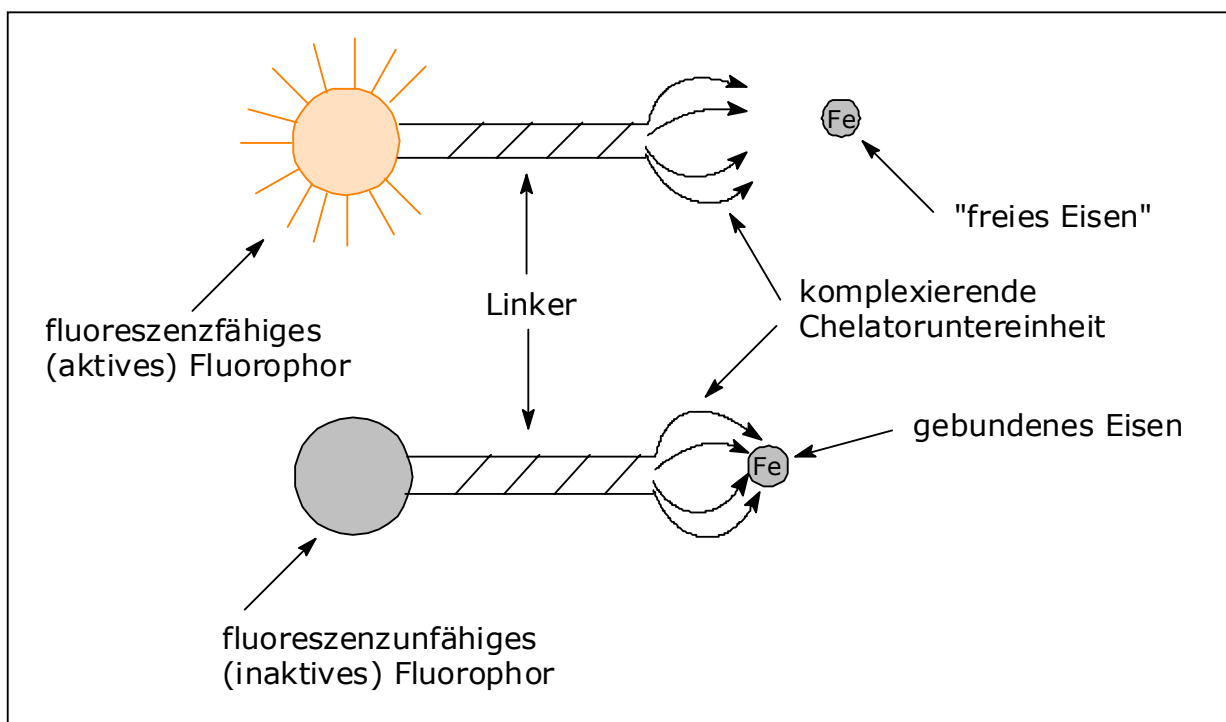
mit  $\varepsilon$  = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient ( $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $c$  = Konzentration des Stoffes ( $\text{mol L}^{-1}$ ) und  $d$  = Schichtdicke der durchstrahlten Lösung (cm).<sup>[122]</sup>

Wichtige Moleküle, die die genannten Bedingungen für Fluoreszenz beson-

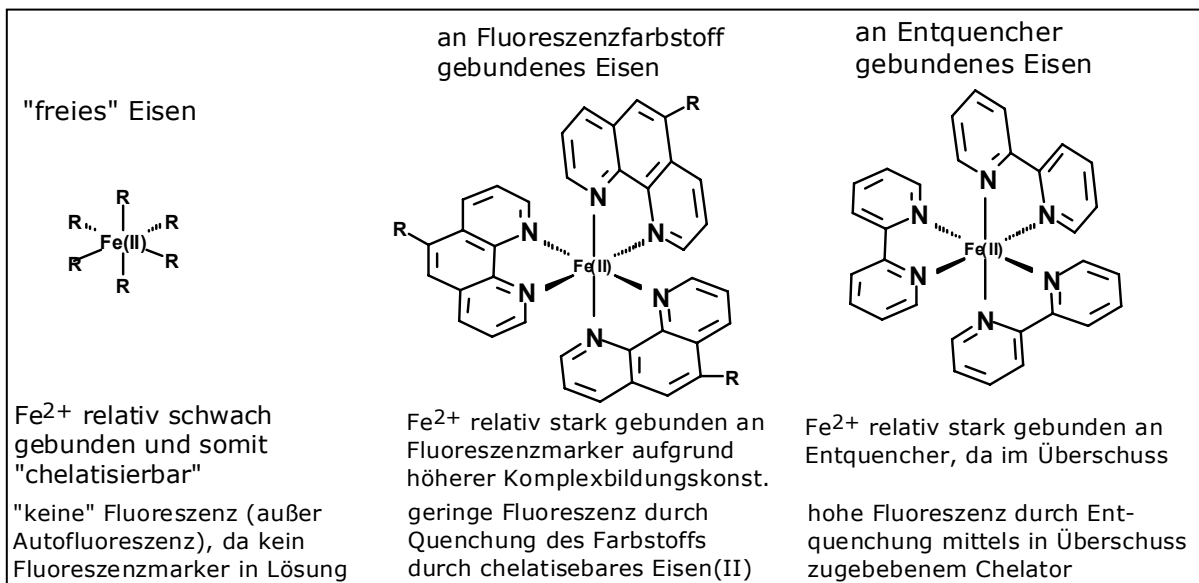
ders gut erfüllen, enthalten die Xanthen-Gruppe bei Fluorescein und Rhodamin, sowie die Acridingruppe bei Acridinorange. Diese Molekülgruppen zeichnen sich durch einen visuell sichtbaren  $\pi\text{-}\pi^*$ -Übergang aus, sie strahlen im sichtbaren Bereich.

## 1.8 Die fluoreszenzspektroskopische Messmethode

Die bisher verwendeten fluoreszenzspektroskopischen Methoden zur Quantifizierung chelatisierbaren Eisens in vitalen Zellen basieren auf der partiellen Löschung der Fluoreszenz einer in die Zelle – bzw. das Zellkompartiment – gebrachten Fluoreszenzsonde durch die Bildung eines nicht mehr zur Fluoreszenz befähigten Komplexes mit dem dort vorhandenen chelatisierbaren Eisen. Diese Quenchung der Fluoreszenz basiert auf dem Schweratomeffekt. Hierbei wird reversibel ein Assoziat mit einem Schweratom, in diesem Fall dem  $\text{Fe}^{2+}$ -Ion, gebildet (Abb. 11). Dieses Assoziat besitzt eine höhere Spin-Bahn-Kopplung als die Fluoreszenzsonde allein, hierdurch wird das Spinverbot aufgehoben und somit das *intersystem crossing* zum Triplettzustand wahrscheinlicher. Da dieser eine längere Lebensdauer als ein angeregter Singulettzustand besitzt, ist die Wahrscheinlichkeit eines strahlungslosen Überganges in den elektronischen Grundzustand wahrscheinlicher. So wird insgesamt die Besetzung des ersten angeregten Singulettzustandes und damit die Grundvoraussetzung für eine Fluoreszenz unwahrscheinlicher. Dies hat zur Folge, dass die Fluoreszenzquantenausbeute drastisch sinkt.<sup>[123, 124]</sup>



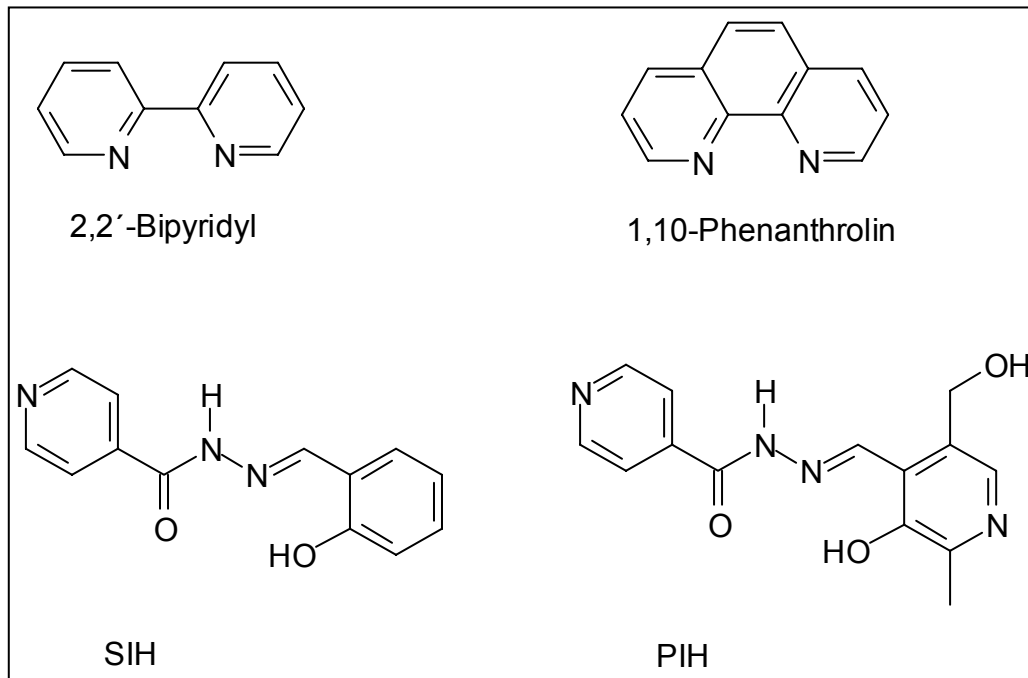
**Abb. 11:** Funktionsweise einer Fluoreszenzsonde.



**Abb. 12:** Messprinzip der fluoreszenzspektroskopischen Methode.

Man verwendet einen Überschuss der Fluoreszenzsonde, um eine Restfluoreszenz durch weiterhin vorhandene freie Moleküle der Sonde zu erhalten. Dies ist für die Quantifizierung wichtig, da der Indikator nicht limitierend sein darf. Setzt man nun einen großen Überschuss eines nicht fluoreszierenden Eisenchelators, den sogenannten Entquencher zu, erhält man annähernd die Gesamtfluoreszenz der - in Abhängigkeit von den beteiligten Komplexbildungskonstanten - nun wieder ungebundenen Fluoreszenzsonde (Abb. 12). Diesen Vorgang nennt man „Entquenchung“, der resultierende Fluoreszenzanstieg ist proportional der Menge des chelatisierbaren Eisens und kann anhand einer zu erstellenden Kalibrierungsgerade quantifiziert werden. Diese Entquencher sind membrangängige Eisenchelatoren wie beispielsweise die zweizähligen Liganden 2,2'-Bipyridyl mit einer Komplexbildungskonstante von  $\log\beta_3(\text{Fe}^{2+}) = 17.4^{[125]}$  und 1,10-Phenanthrolin mit einer Komplexbildungskonstante von  $\log\beta_3(\text{Fe}^{2+}) = 21.3^{[126]}$ . Geeignete dreizählige Liganden (siehe Abb. 13) sind **Salicylaldehydiso-nicotinoylhydrazon** (SIH) mit einer Komplexbildungskonstanten von  $\log\beta_2(\text{Fe}^{2+}) = 56.0^{[127]}$  und **Pyridoxalisonicotinoylhydrazon** (PIH) mit einer Komplexbildungskonstante von  $\log\beta_2(\text{Fe}^{2+}) = 34.0^{[127]}$





**Abb. 13:** Entquencher bei den Messungen.

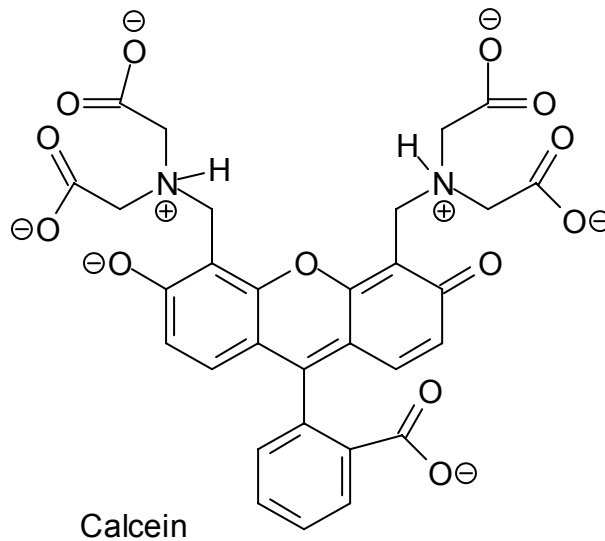
Will man nun die Konzentration des chelatisierbaren Eisens anhand der Entquenchung kalibrieren, kann dies *in situ* oder *ex situ* geschehen. Eine *in situ*-Kalibrierung<sup>[30, 128]</sup> bedeutet eine vollständige Äquilibrierung einer definierten extrazellulären Konzentration chelatisierbaren Eisens im Zellüberstand mit der intrazellulären Konzentration, die dann zu der intrazellulären Fluoreszenz ins Verhältnis gesetzt wird. Diese Methode hat zwar den Vorteil, dass das tatsächliche intrazelluläre Milieu der jeweiligen Zelle unter den jeweiligen Inkubationsbedingungen berücksichtigt wird, sie hat aber den Nachteil, dass es durch das Vorhandensein größerer Mengen natürlicher, intrazellulärer Liganden zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes über der Plasmamembran kommt, Eisen von außerhalb akkumuliert intrazellulär. Ein weiteres Problem ist die oft unterschiedliche Wirkung der eingesetzten Ionophore in verschiedenen Zelltypen.<sup>[7]</sup> Die *ex situ*-Kalibrierung kennt diese Probleme nicht, um sie anwenden zu können, müssen die Fluoreszenzsonden allerdings eine konstante Bindungsstöchiometrie des  $\text{Fe}^{2+}$ /Chelator-Komplexes über den gesamten während der Messungen ausgenutzten Konzentrationsbereich aufweisen. Der Einfluss

der Schichtdicke muss bei dieser Art der Kalibrierung für die Messung messtechnisch ausgeschlossen werden. Dies ist bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie der Fall. Bei dieser erst kürzlich eingeführten Art der Bildaufnahme wird die Fluoreszenzintensität eines bestimmten Ausschnittes eines zu beobachtenden Volumens konstanter Schichtdicke bestimmt. Der *ex situ* bestimmten Kalibrierungsgeraden der Fluoreszenz eines Indikators kann also direkt die Fluoreszenzintensität eines zu quantifizierenden Zellkompartimentvolumens zugeordnet werden.

### **1.9 Fluoreszenzsonden zur Quantifizierung zytosolischen und mitochondrialen chelatisierbaren Eisens**

Die Quantifizierung chelatisierbaren Eisens im biologischen System auf der Basis von fluoreszierenden Chelatoren begann Anfang der neunziger Jahre. Man verwendete die natürlichen Siderophore wie das bereits beschriebene Desferrioxamin (auch Desferal® oder DFO genannt) als chelatisierende Untereinheit. Diese ist sechszählig und besetzt somit alle freien Koordinationsstellen des Eisens (die Bindungsstöchiometrie ist also 1:1), wobei DFO selektiv  $\text{Fe}^{3+}$  mit einer Komplexbildungskonstante von  $\log \beta (\text{Fe}^{3+}) = 30.6$  bindet.<sup>[56, 129]</sup> Andere in Zellen in relevanter Konzentration enthaltene Metallkationen besitzen erheblich niedrigere Komplexbildungskonstanten mit DFO. Die Fluoreszenzsonden dieses Typs besitzen keine spezifische Zielsteuerung; sie akkumulieren nicht in den Zellen, sondern verteilen sich allein diffusionskontrolliert durch die Zellmembran innerhalb und außerhalb der Zelle. Da sie mit der gleichen Wahrscheinlichkeit die Zelle wieder verlassen, mit der sie in die Zelle gelangen, ist eine Beladung mit dieser Sonde nicht möglich. Einige dieser Fluoreszenzsonden wie beispielsweise das 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-desferrioxamin<sup>[130]</sup> (NBD-DFO) zeigen bei einigen Zelltypen zytotoxische Eigenschaften und mobilisieren Eisenionen aus Ferritin.<sup>[131]</sup> Zudem sind Chelatoren auf DFO-Basis durch ihre hohe Komplexbildungskonstante sehr schwer zu „entquenchen“. Diese Fluoreszenzsonden konnten also nur ein erster Schritt zu neuen Typen sein, die in Zellmessungen einsetzbar waren. So wurde wenige Jahre später der

Fluoreszenzindikator Calcein als Sonde eingesetzt und auf diesem basierend eine Messmethode aufgebaut.<sup>[10, 30, 128]</sup>

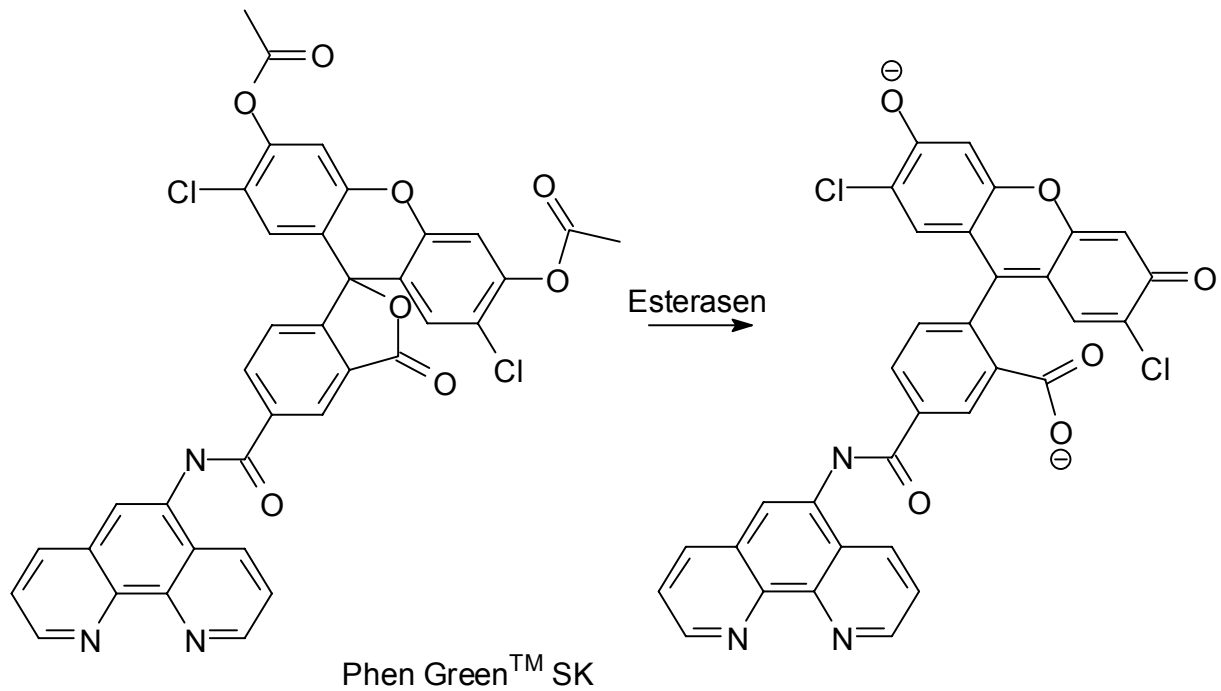


Diese Fluoreszenzsonde ist in der abgebildeten Form nicht membranpermeabel. Die Zellen werden mit einem mehrfach veresterten Derivat, dem nicht fluoreszierenden Calcein-Acetoxy-methylester, beladen. Sobald dieser membranpermeable, relativ lipophile, Ester durch die Zellmembran in die Zelle diffundiert ist, spalten zelleigene Esterasen (die Art des Esters wurde so gewählt, dass zelleigene Esterasen „kompatibel“ sind) die Estergruppen ab und es entsteht bei physiologischem pH-Wert die abgebildete sechsfach negativ und zweifach positiv geladene Form.<sup>[132]</sup> Diese ist nahezu membranimpermeabel und zur Fluoreszenz in visuellem Wellenlängenbereich befähigt. Diese Art der Zielsteuerung führt durch rasche Esterasetätigkeit dazu, dass das Molekül in manchen Zellen, wie beispielsweise Hepatozyten, so schnell in eine membranimpermeable Form gebracht wird, dass auch die Membranen von Organellen wie den Mitochondrien oder den Lysosomen nicht mehr passiert werden können und die Fluoreszenzsonde deshalb fast ausschließlich ins Zytosol und (wohl durch die Kernporen) in den Zellkern gelangt und dort auch akkumuliert (in kultivierten Rattenhepatozyten sind dies  $89.1 \pm 6.0$  % der Gesamtzellkonzentration an Calcein),<sup>[6]</sup> da es die Zellmembran in dieser Form auch nicht wieder in die umgekehrte Richtung in das extrazelluläre Medium passieren kann. Die

fluoreszierende Untereinheit in dieser Fluoreszenzsonde ist das Fluorescein, die chelatisierende Komponente ist ein dem EDTA (**E**thylendi**a**min-**t**etra**e**ssigsäure) ähnliches System, das über die fluoreszierende Untereinheit „gespannt“ ist. Für diesen also nur im Zytosol und im Zellkern zur Quantifizierung chelatisierbaren Eisens einsetzbaren Fluoreszenzindikator ist für  $\text{Fe}^{2+}$  eine Stöchiometrie von 1:1 und eine Komplexbildungskonstante von  $\log \beta$  von ungefähr 14, für  $\text{Fe}^{3+}$  eine Komplexbildungskonstante von  $\log \beta$  von ungefähr 24 bei gleicher Stöchiometrie angegeben.<sup>[30]</sup>

Auf Grund der relativ geringen Komplexbildungskonstante der Fluoreszenzsonde konkurriert diese mit zelleigenen organischen Chelatoren um das chelatisierbare Eisen. Auf Grund dessen und als Folge der 1:1-Stöchiometrie ist die Calcein-Messmethode nicht sehr sensitiv und weist zudem Schwierigkeiten bei der Kalibrierung auf.<sup>[7]</sup> Eine weitere Evolution war also erforderlich, welche durch die Verwendung des neuen Fluoreszenzfarbstoffes Phen Green<sup>TM</sup> SK erreicht wurde.

Auch bei diesem Fluoreszenzfarbstoff läuft die Zielführung über - durch Esterasen - zu spaltende Estergruppen, in diesem Falle ein Diacetat; auch bei Phen Green<sup>TM</sup> SK ist die veresterte Form nicht fluoreszenzfähig, allerdings kommt es bei diesem Farbstoff im Gegensatz zu Calcein zu einer - wenn auch ungleichmäßigen - Verteilung der Fluoreszenzsonde über die gesamte Zelle. Es komplexiert  $\text{Fe}^{2+}$  auf Grund der höheren Komplexbildungskonstante von  $\log \beta_3 = 21.3$  für  $\text{Fe}^{2+}/1,10\text{-Phenanthrolin}$ <sup>[126]</sup> immer im stöchiometrischen Verhältnis von 3:1, da der Chelator hierbei nicht mit den in der Zelle vorhandenen niedermolekularen Liganden konkurriert, an denen das chelatisierbare Eisen ohne Zugabe eines zusätzlichen Chelators schwächer gebunden vorliegt; der Komplex ist im Gegensatz zum Calcein-Eisen-Komplex redox-inaktiv. Eisen(III) wird erheblich schwächer mit einer Komplexbildungskonstante von  $\log \beta_3 = 14.1$  für  $\text{Fe}^{3+}$  gebunden.<sup>[133]</sup>



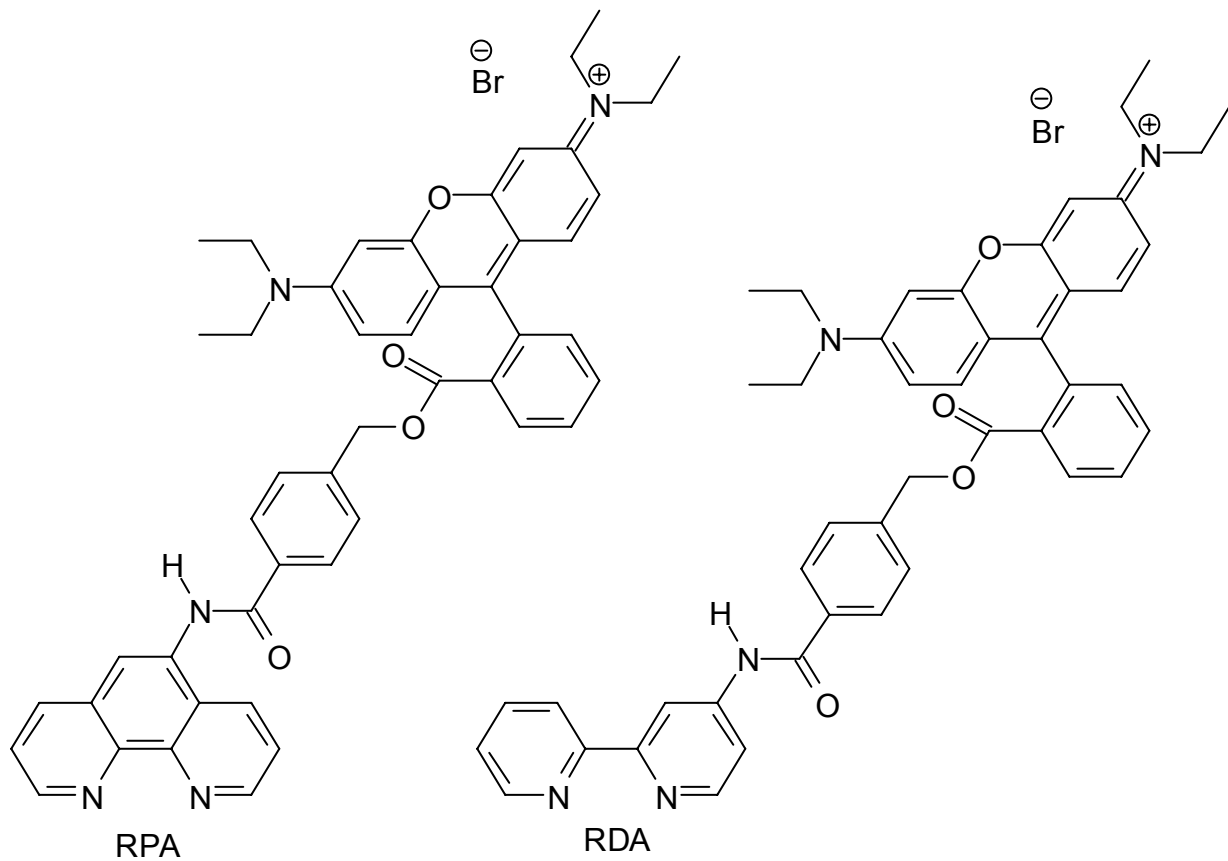
Mit dieser Fluoreszenzsonde wurden Messungen mittels konventioneller digitaler Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt, bei denen zum einen erfolgreich das chelatisierbare Eisen in Hepatozyten, Leberendothelzellen und K562-Erythroleukämiezellen quantifiziert werden konnte, und zum anderen wurde auch eine Erhöhung der Konzentration chelatisierbaren Eisens durch den membranpermeablen  $\text{Fe}^{3+}/8$ -Hydroxychinolin-Komplex, beziehungsweise eine Senkung des chelatisierbaren Eisenpools durch den als Siderophor bei Bakterien bekannten Eisenchelator Desferrioxamin (DFO, Desferal®) in den beobachteten Zellen selbst nachgewiesen.<sup>[7]</sup> Der Einsatz der bereits erwähnten konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie brachte eine Reihe von Vorteilen. Neben den bereits erwähnten Vorteilen erreicht man eine deutlich verbesserte räumliche Auflösung.<sup>[7]</sup> Mit dieser Messmethode basierend auf der neuen Fluoreszenzsonde Phen Green™ SK war es erstmals möglich, den Pool chelatisierenden Eisens bei heterogenen Zellpopulationen zu quantifizieren. Diese Heterogenität kann durch Beladungsunterschiede mit der Fluoreszenzsonde entstehen, aber auch durch unterschiedliche Eisenkonzentrationen bei den Zellen untereinander. Die mit dieser Messmethode erhaltenen intrazellulären Eisenkonzentrationen

nen liegen im allgemeinen um den Faktor 3-10 über den aus den Calcein-Messungen erhaltenen Werte (bei kultivierten Rattenhepatozyten ist dies  $5.0 \pm 2.0 \mu\text{M}$  zu  $0.6 \pm 1.2 \mu\text{M}$ ) für die intrazelluläre Konzentration chelatisierbaren Eisens. Dies ist wohl auf die geringere Komplexbildungskonstante des Calceins im Vergleich zu Phen Green<sup>TM</sup> SK zurückzuführen, die dazu führt, dass mit Calcein nicht der gesamte Pool chelatisierbaren Eisens komplexiert wird; ebenso ist diese Diskrepanz auf die unterschiedliche Verteilung der beiden Fluoreszenzsonden innerhalb der Zelle zurückzuführen. Die Komplexbildungskonstante der jeweiligen Fluoreszenzsonde hat also auf Grund der unterschiedlichen, miteinander konkurrierenden potentiellen Liganden für das chelatisierbare Eisen in der Zelle mit ihren sehr unterschiedlichen Bindungseigenschaften einen großen Einfluss auf die Quantifizierung des chelatisierbaren Eisens.

Die Eignung der Fluoreszenzsonde zur Quantifizierung chelatisierbaren Eisens in einzelnen Zellkompartimenten muss jedoch als sehr eingeschränkt angesehen werden. Es wurden zwar diesbezügliche Messungen durchgeführt<sup>[51]</sup> und qualitativ zeigten diese Messungen auch Pools chelatisierbaren Eisens für verschiedene Zellkompartimente an, die Quantifizierungen sind nur sehr eingeschränkt nutzbar. Im Falle der Lysosomen beispielsweise konnte auf Grund der geringen Größe der Lysosomen in den untersuchten Zellen deren Eisenanteil nicht quantifiziert werden. Die Identifizierung einzelner Lysosomen gelang nur nach einer Doppelfärbung mit Phengreen<sup>TM</sup> SK und mit Acridinorange. Nach dem Zusatz von Acridinorange war jedoch auf Grund der starken Fluoreszenz des Acridinorange, welches das Phengreen<sup>TM</sup> SK - Signal überlappte, eine Quantifizierung nicht mehr möglich. Die Mitochondrien und der Kern ließen sich nicht stark genug beladen, um einen ausreichend großen Überschuss an Fluoreszenzsonde für eine exakte Quantifizierung zu gewährleisten.

Für die Mitochondrien wurden kürzlich neue Fluoreszenzsonden entwickelt und mit Erfolg in einer Messmethode etabliert, RPA (**R**hodamin B-4-[(1,10-**p**henathrolin-5-yl)**a**minocarbonyl]benzylester) und RDA (**R**hodamin B-4-[(2,2'-**d**ipyridin-5-yl)**a**minocarbonyl]benzylester).<sup>[11, 12, 134]</sup> Die

Zielsteuerung dieser Sonden verlief über einen anderen Weg. Die Moleküle wurden hierbei nicht innerhalb der Zellen durch Esterasen gespalten, sondern waren kationisch, aber doch lipophil genug für die Membranpermeabilität. Diese Art der Zielsteuerung ermöglicht der Sonde auch innerhalb der Zelle potentiell beliebig viele Membrandurchgänge, so dass sie auch innerhalb der Zellkompartimente die Membranen von Organellen durchdringen kann. Im Falle des Mitochondriums führt dessen negatives Membranpotential jedoch dazu, dass die Sonde dort „gefangen“ ist, die Sonde akkumuliert dort sehr spezifisch.



Im Falle des Fluoreszenzfarbstoffes RPA wurde in Mitochondrien kultivierter Rattenhepatozyten eine mittlere Konzentration chelatisierbaren Eisens von  $16.0 \pm 1.9 \mu\text{M}$  gefunden, im Fall von RDA betrug diese  $17.0 \pm 1.0 \mu\text{M}$ . Die fast gleichen Messergebnisse trotz der unterschiedliche Bruttokomplexbildungskonstanten der jeweiligen Fluoreszenzsonde mit  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen ( $\log \beta_3$  für 1,10-Phenanthrolin/ $\text{Fe}^{2+} = 21.3^{[126]}$  bei RPA zu  $\log \beta_3$  für 2,2'-

Bipyridyl/Fe<sup>2+</sup> = 17.4<sup>[125]</sup> bei RDA) zeigen, dass dort keine Konkurrenzsituation mit den in der Zelle vorliegenden eisenbindenden Liganden vorliegt. Die Quantifizierbarkeit chelatisierbaren Eisens spezifisch für Mitochondrien erlaubte Anwendungen bei pathobiochemischen Fragestellungen. So wurde die Rolle mitochondrialen chelatisierbaren Eisens bei der Zellschädigung durch Hypothermie untersucht.<sup>[11, 134]</sup>



## 2 Problemstellung

Die Quantifizierung chelatisierbaren Eisens in Zellkompartimenten war bis zur Entwicklung von Fluoreszenzsonden – abgesehen von Radioaktivmethoden – auf avitale Zellen beschränkt.<sup>[135-137]</sup> Alle diese bisher verwendeten Methoden (inklusive der Radioaktivmethoden) sind aus den in der Einleitung genannten Gründen sehr ungenau, die Menge chelatisierbaren Eisens war in den verschiedenen Zellkompartimenten also bisher schlecht charakterisiert.<sup>[3-5, 8, 47-50]</sup>

In den letzten Jahren wurde eine Methode zur Eisenbestimmung eingeführt<sup>[51]</sup>, die auf der Messung der Fluoreszenz eisenchelatisierender Sonden mittels quantitativer Laser-Scanning-Mikroskopie basiert. Hierbei wurde Phengreen<sup>TM</sup> SK vor allem im Zytosol und im Kern vitaler Zellen verwandt. Da dieser eine unzureichende Akkumulation innerhalb der mitochondrialen Matrix, sowie eine unvorteilhafte Verteilung auch in anderen Zellkompartimenten aufwies, wurden mit RPA und RDA zwei spezifische Fluoreszenzsonden für Mitochondrien entwickelt, auf deren Basis die weiteren Synthesen beruhen.<sup>[11, 12]</sup>

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Eisen(II)-Ionenchelatisierende Entquencher und Fluoreszenzsonden spezifisch für verschiedene Kompartimente eukaryotischer Zellen synthetisiert werden. Die Entquencher waren für den Einsatz in Mitochondrien konzipiert.

Bei den Fluoreszenzsonden sollten die beiden Kompartimente Zellkern und das saure vakuolische System der Endosomen und der Lysosomen untersucht werden. Bei diesen beiden Kompartimente ist deswegen eine Quantifizierbarkeit des chelatisierbaren Eisens unter anderem so wichtig, da deren Pools chelatisierbaren Eisens eine entscheidende Rolle bei der Schädigung der nukleären DNA spielen. Der vermutete Zusammenhang zwischen dem lysosomalen Eisenpool, oxidativer Lipidschädigung des Lysosoms und anschließender oxidativer nDNA-Schädigung ist in Punkt 1.6.4 beschrieben. Eine weitere Aufklärung dieses Zusammenhangs und eine präzise Quantifizierung der Eisenpools dieser Kompartimente sind wichtig. Das Hauptaugenmerk bei den Fluoreszenzsonden lag auf den Planungen

und Durchführungen der Synthesen der Sonden und die Überprüfung der Verwendbarkeit bei den Kompartimenten Zellkern und Lysosom. Es waren hierfür geeignete Chelatoren und Fluorophore auszuwählen, in geeigneter Form zu derivatisieren und sie letztendlich miteinander so zu verknüpfen, dass spezifische Fluoreszenzsonden erhalten werden, mit deren Hilfe Erfahrungen für quantitative Messungen im Zellkern und im Lysosom gesammelt werden können und die Problematik solcher Messungen verdeutlicht werden kann.

Da die Fluoreszenzsonden *in vitro*, d.h. in lebenden Zellen, eingesetzt und vermessen werden sollten, war - neben einer genügenden Akkumulation im jeweiligen Kompartiment, einer geeigneten Komplexbildungskonstante mit Eisen(II), dem Vorhandensein einer Quenchbarkeit durch Eisen(II) und für die Messbedingungen geeignete Absorptions- und Emissionsmaxima - eine möglichst geringe Toxizität unter den verwendeten Messbedingungen zu erreichen.

Nach der erfolgreichen Synthese sollte die Verteilung der Fluoreszenzsonden in die unterschiedlichen Kompartimente verschiedener Zelltypen sowie die Quenchbarkeit/Entquenchbarkeit in diesen Kompartimenten überprüft werden.

Auf den in dieser Arbeit durchgeführten Studien sollen die Anwendungen zur Quantifizierung des chelatisierbaren Eisens in Zellen basieren und Grundlage sein für die Entwicklung weiterer spezifischer Sonden für die Kompartimente Zellkern und Lysosom.

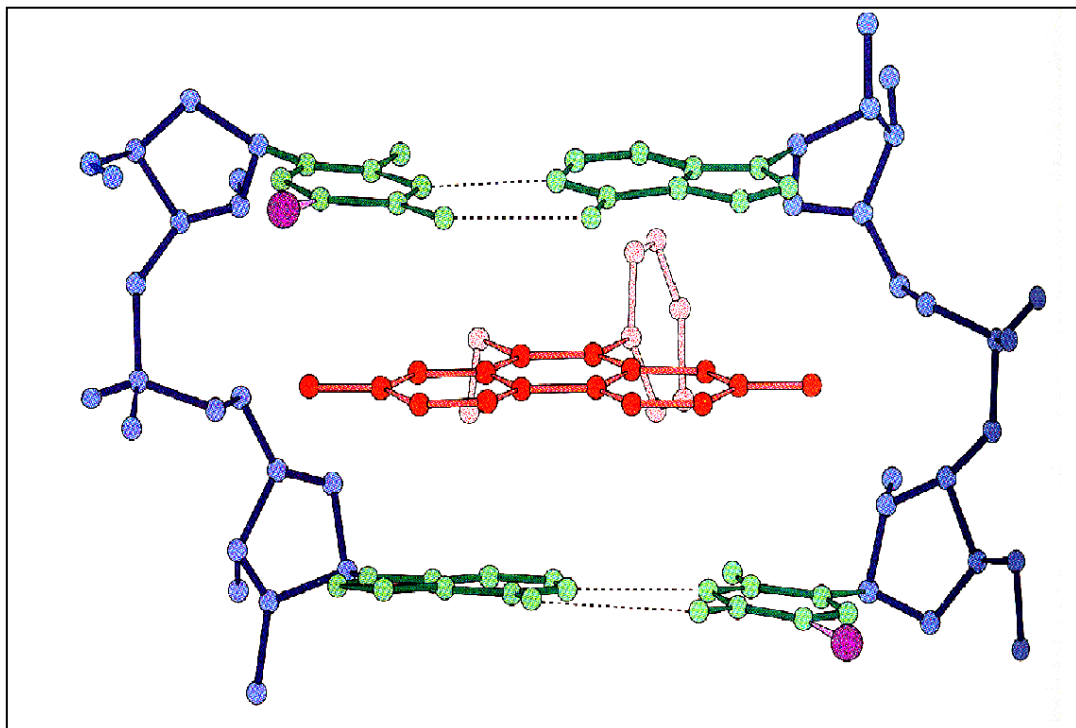
### 3. Entwicklung der eisenchelatisierenden Fluoreszenzsonden und deren Zielsteuerung

Eisenchelatisierende Fluoreszenzsonden sind im allgemeinen aufgebaut aus einer Chelatoruntereinheit, die an das entsprechende Metallkation bindet, einem Fluorophor, dessen Fluoreszenz bei der Bindung an die chelatisierende Untereinheit gequenchet wird, und einem Linker, der die beiden funktionellen Untereinheiten miteinander verbindet. Des weiteren muss die Sonde eine ausreichende Lipophilie zum Membrandurchtritt besitzen und eine entsprechende Zielsteuerung aufweisen.

#### 3.1 Akkumulation der Fluoreszenzsonde im Zellkern

Man spricht von Interkalation, wenn sich meist flache, aromatische Moleküle in die DNA einschieben, indem sie sich zwischen den Basenpaaren der DNA stapeln (Abb. 15).

Das Molekül interkaliert, ohne mit den Wasserstoffbrücken der Watson-Crick Paare zu interferieren.<sup>[138]</sup>



**Abb. 14:** Interkalator zwischen den Basenpaaren der DNA. (Das Bild wurde aus Lit. [138] übernommen.)

### 3.2 Akkumulation der Entquencher in den Mitochondrien

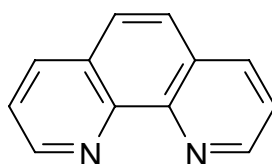
Das negative Membranpotential des Mitochondriums soll ausgenutzt werden, um die Entquencher dort akkumulieren zu lassen. Dies wird durch die Synthese eines – vom umgebenden pH-Wert unabhängig – permanent kationischen Moleküls erreicht, das durch Coulomb-Anziehung mit dem anionischen Milieu wechselwirkt. Der Entquencher soll durch Diffusion in den Matrixraum gelangen.

### 3.3 Akkumulation der Fluoreszenzsonde in den Lysosomen

Lysosomen zeichnen sich durch einen pH-Wert von 4.5 - 5 aus, im Zytosol dagegen herrscht ein pH-Wert von 7.1 bis 7.2. Eine lysosomale Fluoreszenzsonde sollte im Zytosol überwiegend neutral in basischer Form vorliegen. In dieser Form wird dem Molekül aufgrund der bei neutralen Molekülen größeren Lipophilie ein Membrandurchtritt ins Lysosom ermöglicht. Dort werden diese Moleküle aufgrund der erhöhten Protonenkonzentration protoniert und liegen somit überwiegend in kationischer, membranimpermeabler Form vor. Somit sollte die aus einem solchen Fluorophor synthetisierte Fluoreszenzsonde im Lysosom akkumulieren. Um diese spezifische Eigenschaft auszunutzen, muss die Fluoreszenzsonde in diesem pH-Bereich ausreichend protonierbar sein.

### 3.4 Die eisenchelatisierende Untereinheit

Der  $\text{Fe}^{2+}$ -Chelator 1,10-Phenanthrolin besitzt eine Bruttokomplexbildungskonstante von  $\log\beta_3 = 21.3^{[126]}$  mit  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen, was eine vollständige Erfassung des gesamten chelatisierenden Eisenpools gewährleisten sollte, da dieses Eisen wahrscheinlich mit deutlich kleineren Komplexbildungskonstanten an niedermolekulare Liganden gebunden ist.



1,10-Phenanthrolin

Diese Liganden besitzen Bruttokomplexbildungskonstanten bis zu  $\log\beta_2 = 11.85$  für den Komplex aus Citrat mit  $\text{Fe}^{3+}$ .<sup>[139]</sup> Aminosäuren besitzen mit einer Bruttokomplexbildungskonstanten von  $\log\beta_3 = 10.43$ <sup>[140]</sup> für Histidin bis zu einer Bruttokomplexbildungskonstanten von  $\log\beta_3 = 4.5$ <sup>[141]</sup> für Lysin/ $\text{Fe}^{2+}$  deutlich darunterliegende Werte, Eisen zu binden. Das Eisen aus den Speicherproteinen wird deswegen nicht miterfasst, da diese Komplexe kinetisch sehr inert sind und Komplexbildungskonstanten von  $\log\beta_3 > 20$  besitzen.

Ligand	Komplex $K$	lg $K$	T (°C)
Citrat <sup>[139]</sup>	$\text{Fe}^{3+} [\text{FeL}]/[\text{Fe}][\text{L}]$	11.85	25
Histidin <sup>[140]</sup>	$\text{Fe}^{2+} [\text{FeL}_2]/[\text{Fe}][\text{L}]^2$	10.41	25
Glycin <sup>[141]</sup>	$\text{Fe}^{2+} [\text{FeL}_2]/[\text{Fe}][\text{L}]^2$	7.8	20
Tryptophan <sup>[141]</sup>	$\text{Fe}^{2+} [\text{FeL}_2]/[\text{Fe}][\text{L}]^2$	7.6	20
Phenylalanin <sup>[141]</sup>	$\text{Fe}^{2+} [\text{FeL}_2]/[\text{Fe}][\text{L}]^2$	6.3	20
Lysin <sup>[141]</sup>	$\text{Fe}^{2+} [\text{FeL}]/[\text{Fe}][\text{L}]$	4.5	20

**Tab. 1:** Biologisch relevante Eisen-Komplexe, die aus chelatisierbarem Eisen und zellulär vorkommenden Liganden gebildet werden können.

Die deutlich unterschiedlichen Komplexbildungskonstanten unterschiedlicher Liganden zu Eisen(II) und Eisen(III) hängen mit der Beschaffenheit der bindenden Atome der Chelatoren zusammen, die der HSAB-(**h**ard and **s**oft **a**cids and **b**ases) Theorie nach Pearson gehorchen. Demnach lässt sich dreiwertiges Eisen besser von sauerstoffhaltigen Liganden und zweiwertiges Eisen besser von Stickstoffhaltigen Liganden komplexieren.<sup>[142]</sup>

### 3.5 Die fluoreszierende Untereinheit

Die Fluoreszenzfarbstoffe sollten kommerziell in leicht derivatisierbarer Form vorliegen und die jeweilige Zielsteuerung vorgeben. Die Absorptionswellenlänge des Fluorophors sollte hoch genug sein, um zum einen die

Zelle nicht zu stark zu schädigen, das heißt, es sollten im Laufe einer Messung möglichst wenige Zellen - infolge durch das eingestrahlte Licht eingeleiteter Prozesse - absterben und so die Messung verfälschen, zum anderen zerfallen Fluoreszenzfarbstoffe mit sinkender Einstrahlungswellenlänge durch die damit steigende Energie schneller; dieses Phänomen bezeichnet man als *photobleaching*. Das emittierte Licht sollte sichtbar sein und nach Möglichkeit nicht zu nah an den Eigenemissionen der Zellbestandteile liegen (Hintergrundfluoreszenz), die von verschiedenen Molekülen emittiert wird: Proteine, die im Bereich von 280 nm absorbieren, emittieren bei etwa 320 – 350 nm, wogegen NAD(P)H bei einer Absorption von 340 nm bei 450 nm emittiert. Flavine absorbieren bei 450 nm und emittieren bei 515 nm.<sup>[143]</sup> Lösungen, die Proteine oder kolloidal gelöste Teilchen enthalten, weisen zudem ein weiteres Problem auf: die Lichtstreuung. Rayleigh- und Tyndall-Streuung zeigen die gleiche Wellenlänge wie das Einstrahlungslicht, Raman-Streuung bis 50 nm bathochrom verschobenes Licht. Des Weiteren sollte eine ausreichende Quantenausbeute in wässrigem Medium gewährleistet sein.

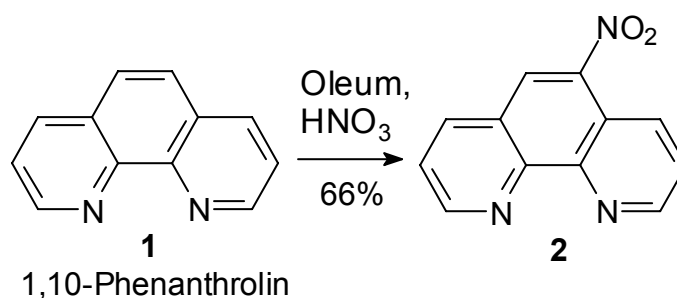
## 4 Synthese der Fluoreszenzsonden und der Entquencher zum Nachweis von Eisen in Mitochondrien, Lysosomen und im Zellkern

### 4.1 Synthese der aktivierten Chelatoruntereinheiten

Grundsätzlich werden zur Synthese von Sonden die Chelatoren und – falls nötig – Fluorophore, bzw. Zielsteuerungskomponenten in der Form derivatisiert, dass die nachfolgenden Kupplungsreaktionen mit dem Linker ermöglicht werden. Als Basis für die in dieser Arbeit entwickelten Synthesen dienen die literaturbekannten Verbindungen Phengreen™ SK und RPA. Als chelatisierende Untereinheit dient hier das Phenanthrolin.

#### 4.1.1 SYNTHESE VON 5-NITRO-1,10-PHENANTHROLIN (**2**)

Zur Darstellung des 5-Nitro-1,10-Phenanthrolins (**2**) nach Smith *et al.*<sup>[144]</sup> wurde 1,10-Phenanthrolin-monohydrat (**1**) Nitriersäure ausgesetzt. Der elektrophile Angriff erfolgte ausschließlich in 5-Position.

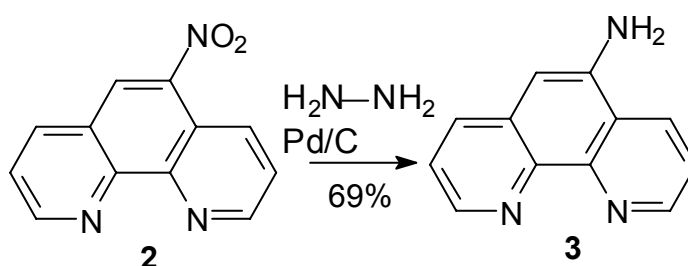


Es wurde zunächst Oleum (25% SO<sub>3</sub>) zu Edukt **1** getropft, gefolgt von 70 %iger Salpetersäure. Die Reaktion verläuft exotherm. Da die in der Literatur angegeben 162°C nicht erreicht wurden (120°C), wurde abweichend von der Literaturvorschrift, nach der Zugabe der Salpetersäure noch 30 min. unter Rückfluss erhitzt. Nach der Isolation des Rohprodukts durch Filtration und Entfernung der flüchtigen Verunreinigungen im Vakuum wurde das Produkt **2** durch Umkristallisation aus Ethanol in reiner Form erhalten. Charakterisiert wurde das literaturbekannte Produkt **2**

durch ein  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum.

#### 4.1.2 SYNTHESE VON 5-AMINO-1,10-PHENANTHROLIN (**3**)

Die Reduktion zum 5-Amino-1,10-phenanthrolin (**3**) wurde nach Lecomte *et al.*<sup>[145]</sup> unter Verwendung von Hydrazin-monohydrat als Wasserstofflieferant und Palladium (10% auf Aktivkohle) als Katalysator durchgeführt. Hierbei entstanden neben **3** nur Wasser und molekularer Stickstoff als Produkte bei einer recht hohen Ausbeute von etwa 70%, was dem als kanzerogen eingestuften Hydrazin den Vorzug zu Cyclohexen als Reduktionsmittel gab. Ein weiterer Vorteil der Reaktion mit Hydrazin ist die Indikation des Reaktionsendes durch nachlassende  $\text{N}_2$ -Entwicklung.



Nach Einengen der Lösung im Vakuum und Abfiltration des Niederschlages wurde das reine Produkt **3** durch Entfernen der flüchtigen Substanzen im Vakuum erhalten und die literaturbekannte Substanz durch ein  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum charakterisiert.

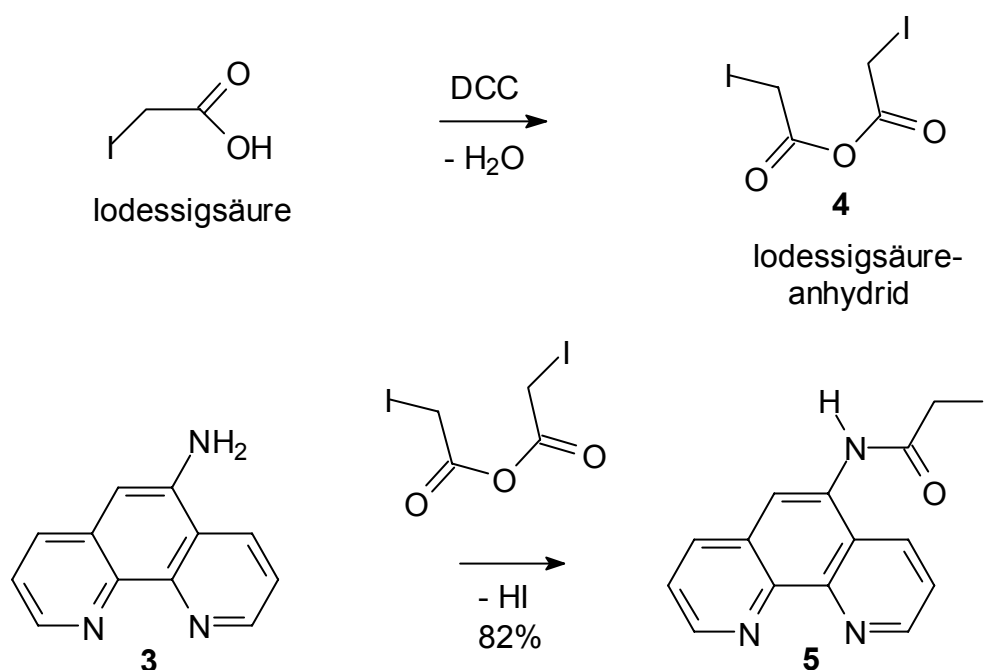
#### 4.1.3 SYNTHESE VON 2-IOD-N(-1,10-PHENANTHROLIN-5-YL)ACETAMID (**5**)

Um eine Halogenfunktion einzufügen, wurde zunächst aus Iodessigsäure unter Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) bei Raumtemperatur in Ethylacetat unter Argon im ausgeizten Rundkolben das Anhydrid **4** gebildet. Nach Abfiltrieren des entstandenen Dicyclohexylharnstoffs wurde das Filtrat vom Lösungsmittel befreit und so Iodessigsäureanhydrid (**4**) erhalten. Dieses wurde unverzüglich in Acetonitril zu einer Suspension aus – der nun der Kupplung zugänglichen Chelatoruntereinheit - 5-Amino-1,10-phenanthrolin (**3**) ebenfalls unter Argon in Acetonitril gegeben und



bei Raumtemperatur für 15 h gerührt. Es fiel das Hydroiodid (eines der Ringstickstoffatome wird protoniert, es wird für die Reaktion also keine Hilfsbase benötigt) der Verbindung **5** aus, welches somit dem Reaktionsgleichgewicht entzogen wurde. Das durch Waschen mit Natriumhydrogencarbonatlösung deprotonierte Produkt war 2-Iod-*N*(-1,10-phenanthrolin-5-yl)acetamid (**5**), die gesamte Reaktion wurde nach Chen *et al.*<sup>[146]</sup> durchgeführt.

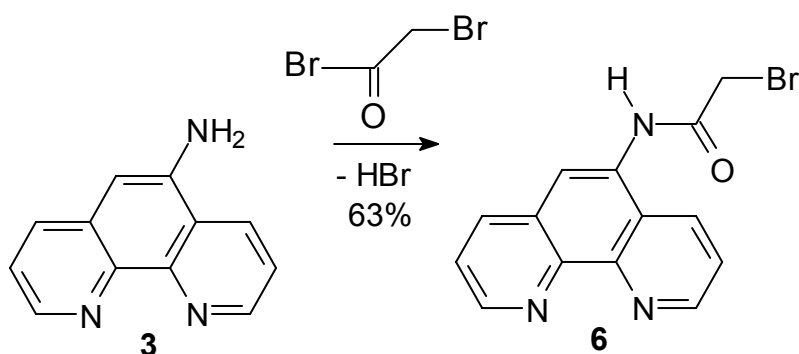
Das literaturbekannte Iodessigsäureanhydrid **4** wurde nicht charakterisiert, da es zu reaktiv für eine NMR-spektroskopische Untersuchung ist. Das ebenfalls literaturbekannte Produkt **5** wurde mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie charakterisiert.



#### 4.1.4 SYNTHESE VON 2-BROM-*N*(-1,10-PHENANTHROLIN-5-YL)ACETAMID (**7**)

5-Amino-1,10-phenanthroline wurde analog der Synthese von Verbindung **5** mit dem Linker Bromacetyl bromid verknüpft, indem die beiden Edukte in trockenem Acetonitril unter Argon bei Raumtemperatur gerührt wurden. Es wurde während der Reaktion auch hier keine zusätzliche Basenzugabe

benötigt, da das Reaktionsgleichgewicht durch das Ausfallen des Produktes 2-Brom-*N*(-1,10-phenanthrolin-5-yl)acetamid<sup>[11]</sup> (**7**) als Hydrobromid auf die Seite des Produktes verschoben wurde. Auch dieses Produkt wurde durch basische Aufarbeitung isoliert, indem es zur Entfernung des Bromwasserstoffs mit 5%iger wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen wurde. Flüchtige Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, eine Charakterisierung des literaturbekannten Produktes fand durch ein <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum statt. Hierbei ist die Methylengruppe im Vergleich zu Produkt **5** um etwa 0.2 ppm ins Tieffeld verschoben, die restlichen Protonen liegen bei etwa gleicher chemischer Verschiebung.



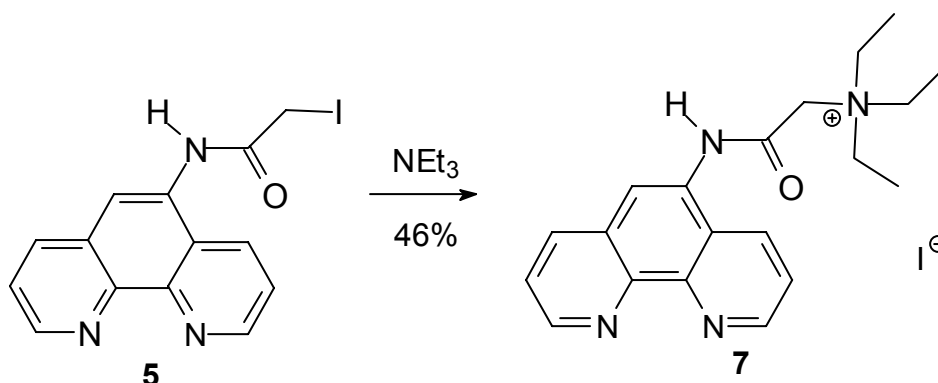
## 4.2 Synthese der kationischen Entquencher

### 4.2.1 SYNTHESE VON TRIETHYL-1,10-PHENANTHROLIN-5-YLCARBAMOYL-METHYLAMMONIUMIODID (**7**)

Die Synthese der kationischen Entquencher erfolgte durch Reaktion mit Trialkylaminen. Triethyl-1,10-phenanthroline-5-ylcarbamoylemethylammoniumiodid (**7**) wurde durch Kupplung von Triethylamin mit 2-Iod-*N*(-1,10-phenanthroline-5-yl)acetamid (**5**) in 46%iger Ausbeute dargestellt, indem **5** für 30 h in Dichlormethan mit Triethylamin unter Argon bei Siedetemperatur gerührt wurde. Hierbei fungierte das in großem Überschuss zugeetzte Triethylamin auch als Base.

Das Rohprodukt ließ sich durch Entfernung der flüchtigen Komponenten im Vakuum erhalten, die Reinigung erfolgte durch Ausfällen mit Diethyl-

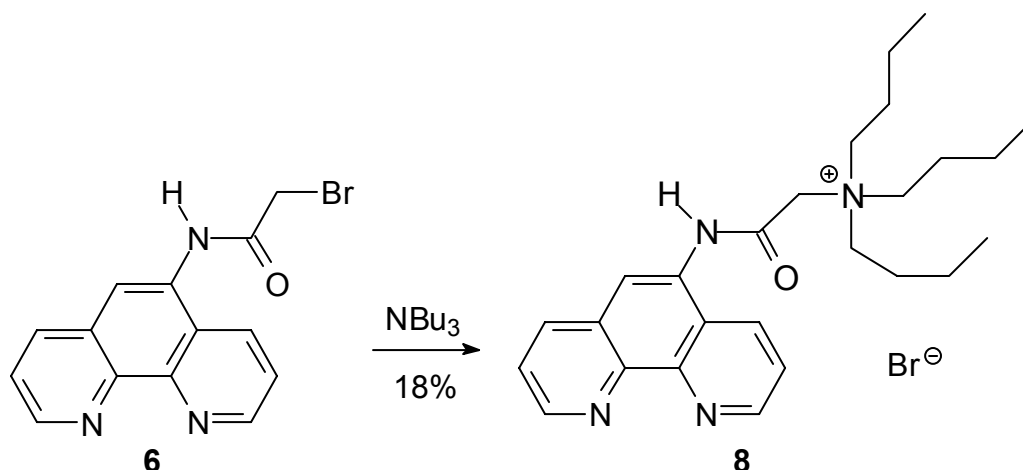
ether aus einer Chloroformlösung.



Charakterisiert wurde das Produkt vollständig per Schmelzpunktbestimmung, IR-Spektrum, ESI-Fein-Massenbestimmung,  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum. Charakteristisch waren die chemische Verschiebung der Methylengruppe an der Carbonylgruppe des Amids, die im Vergleich zum Edukt **5** um etwa 0.4 ppm ins Tieffeld verschoben war, und die drei Ethylgruppen im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum. Im  $^1\text{H}$ -NMR waren nur geringe Verschmutzungen zu erkennen.

#### 4.2.2 SYNTHESE VON TRIBUTYL-1,10-PHENANTHROLIN-5-YLCARBAMOYL-METHYLAMMONIUMIODID (**8**)

Analog verlief die Reaktion von 2-Brom-*N*-(1,10-phenanthrolin-5-yl)acetamid (**6**) mit Tributylamin in 18%iger Ausbeute zum Tributyl-1,10-phenanthrolin-5-ylcarbamoyle-methylammoniumbromid (**8**). Auch hier fand die Charakterisierung vollständig per Schmelzpunktbestimmung, IR-Spektrum, ESI-Fein-Massenbestimmung,  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum statt. Charakteristisch waren hierbei die Signale der Butylgruppen im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum. Es waren keinerlei Verunreinigungen zu erkennen.



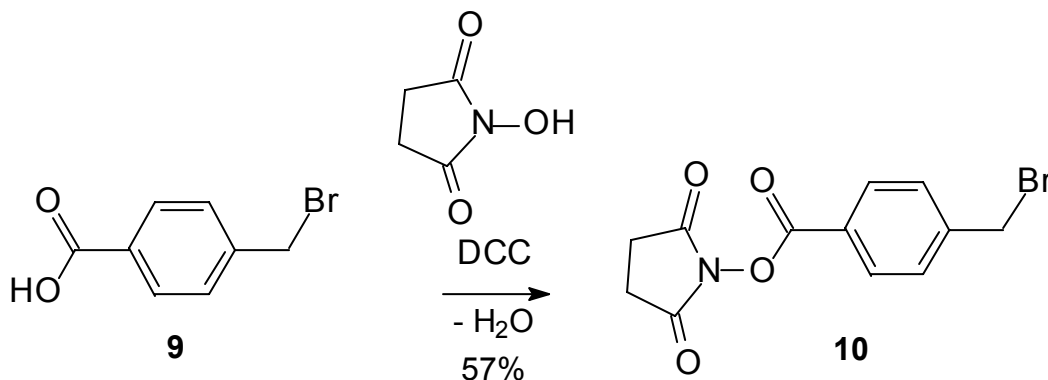
### 4.3 Synthese der Fluoreszenzsonden auf der Basis von Acridinorange

Ausgehend von der kommerziell erhältlichen, freien Base des Acridinorange, dem 3,6-Bis-(dimethylamino)-acridin (**11**) sollte an 9-Position der Ringstickstoff durch nukleophile Addition eines Alkylhalogenids das Fluorophor zum einen an den Linker gekuppelt werden und zum anderen der Ringstickstoff eine permanente, positive Ladung erhalten, die er sonst nur in protonierter Form, das heißt in saurem Milieu besitzt. Versuche, Bromacetylbromid, bzw. 2-Brom-*N*-(1,10-phenanthrolin-5-yl)acetamid (**6**) über die Menschutkin-Reaktion direkt an 3,6-Bis-(dimethylamino)-acridin (**11**) zu koppeln, schlugen fehl, da zum einen die Reaktivität der Halogenalkylgruppe nicht ausreichte, um den Ringstickstoff der Acridin Komponente durch eine Menschutkin-Reaktion zu quarternisieren. Zum anderen wären die Ringstickstoffatome des Phenanthrolingerüsts nukleophil angegriffen worden, wenn die Reaktivität der Halogenalkangruppe für eine Menschutkin-Reaktion ausgereicht hätte. Ein Syntheseversuch mit Bromacetylbromid war deswegen nicht in Betracht gezogen worden, da 5-Amino-1,10-Phenanthrolin (**3**) ausschließlich mit Säurehalogeniden oder -anhydriden reagiert. Aufgrund der höheren Reaktivität der Säurehalogenidgruppe im Vergleich zur Halogenalkylgruppe hätte aber jene mit dem Ringstickstoff der Acridin Gruppe reagiert und für eine Umsetzung mit der

Aminogruppe des Aminophenanthrolins nicht mehr zur Verfügung gestanden. So musste der Angriff des Ringstickstoffs der Acridinkomponente durch einen anderen Linker geschehen, der wiederum neben der Halogenalkylgruppe mit einer weiteren funktionellen Gruppe als Ankerstelle für das Aminophenanthrolin ausgestattet sein musste; diese musste so beschaffen sein, dass sie mit einem primären, aromatischen Amin reagiert (Aminofunktion des Aminophenanthrolins), nicht aber mit einem Ringstickstoff im Acridingerüst. Die Wahl fiel auf einen aktivierten Ester, den Succinidylester, dessen zweite funktionelle Gruppe eine Halogenalkyl-Gruppe sein sollte.

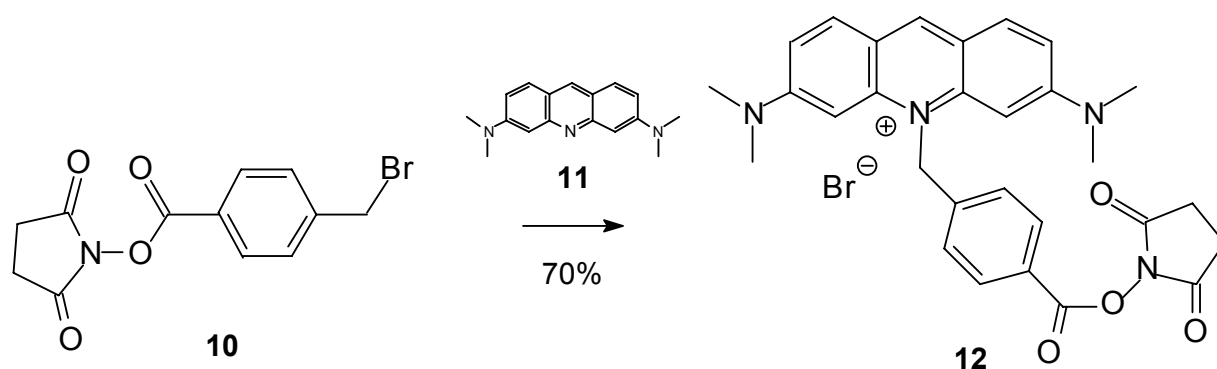
#### 4.3.1 [(4-BROMMETHYLBENZOYL)-OXY]-2,5-PYRROLYDINDION (**10**)

[(4-Brommethylbenzoyl)-oxy]-2,5-pyrrolydindion (**10**) ging aus der Kuppelung von 4-(Brom-methyl)-benzoesäure (**9**) mit *N*-Hydroxysuccinimid nach der Methode von Litak *et al.*<sup>[147]</sup> hervor, wobei DCC als Hilfsreagenz zur Steigerung der Reaktivität der Säuregruppe diente. Die Edukte wurden über Nacht bei Raumtemperatur unter Argon in trockenem Dioxan gerührt. Das durch Filtration erhaltene Filtrat, welches Produkt **10** enthält, wurde, nach Entfernung der flüchtigen Verunreinigungen im Vakuum, aus Ethanol umkristallisiert; Ausbeuteverluste durch Umesterung wurden hierbei in Kauf genommen.



### 4.3.2 [(4-ACRIDINORANGE-METHYLBENZOYL)OXY]-2,5-PYRROLYDINDION-BROMID (**12**)

Der Linker (**10**) eignete sich für eine Menshutkin-Kupplung am Ringstickstoff des 3,6-Bis-(dimethylamino)-acridin (**11**). Das hieraus in 70%iger Ausbeute entstehende Produkt war [(4-Acridinorange-methylbenzoyl)-oxy]-2,5-pyrrolydindion-bromid (**12**). Vor der Durchführung der Reaktion musste die freie Base des Acridinorange (**11**) gereinigt werden, da sie kommerziell in 70%iger Reinheit erhältlich war. Sie wurde über Nacht in einer Soxhletapparatur mit Toluol extrahiert und anschließend mit Chloroform durch *flash*-Chromatographie in einer Säule an Aluminiumoxid (neutral) von Verunreinigungen befreit. Lösungsmittelreste wurden im Vakuum entfernt.



Die beiden Edukte **10** und **11** wurden für 72 h unter Argon bei Siedetemperatur in Dioxan gerührt, wobei sich ein Niederschlag bildete. Nach Erkalten der Suspension wurde dieser Niederschlag durch Zentrifugation isoliert und flüchtige Bestandteile im Vakuum entfernt.

Es wurden zahlreiche Versuche zur Optimierung dieser Reaktion durchgeführt und anhand von  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren überprüft. Wählte man den Anteil an **10** in der Reaktionsmischung im Vergleich zu Edukt **11** höher oder niedriger, als 1.18:1 (**10:11**) (gewählte Faktoren: 1.00, 1.10, 1.18, 1.73, 2.59, 3.00 und 10.0), oder wählte man eine geringere Reaktionszeit als 72 h (überprüft wurden 12 h, 24 h und 48 h), war der Anteil von Produkt **12** im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum im Vergleich zu den Verunreinigungen in Form nicht umgesetzter Edukte **10** und **11** niedriger. Wählte man ein an-

deres Lösungsmittel als Dioxan (Chloroform, Ethylacetat, Toluol oder Xylol), fand keine Umsetzung statt. Eduktreste in Form von **10** wurden durch Digerieren mit Dioxan entfernt, Edukt **11** wurde hierdurch nicht entfernt, war also als Verunreinigung weiterhin vorhanden.

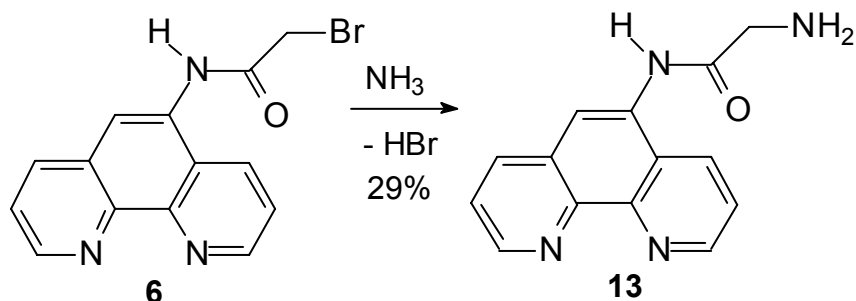
Weitere Reinigungsversuche zur Entfernung von **11** durch Digerieren mit verschiedenen Lösungsmitteln (Chloroform, Wasser, Toluol) waren deswegen nicht erfolgreich, weil die Löslichkeitsunterschiede der beiden Substanzen **11** und **12** gering waren und daher sowohl im Rückstand, als auch in der Lösung das gleiche Verhältnis vorlag.

Chromatographische Trennungen an Kieselgel, Aluminiumoxid oder Fluorsil gelangen nicht, weil die Succinidylestergruppe des Produkts **12** zu reaktiv war und mit den freien Hydroxylgruppen des Aluminiumoxids bzw. des Kieselgels reagierte. Es lief also nicht mit dem Laufmittel ( $R_f = 0$ ) und ließ sich mit keinem Lösungsmittel wieder in Lösung bringen. Eine Trennung an RP-18-Säulenmaterial durch *medium pressure liquid chromatography* (MPLC) führte zum saubereren Produkt **12**. Das Rohprodukt **12** wurde als gesättigte methanolische Lösung in den Injektor der MPLC-Anlage eingespritzt. Als Laufmittel wurde Methanol/Acetonitril im Verhältnis von 1:1 (v/v) gewählt. Das Produkt **12** lief als erste Fraktion über die Säule, Edukt **11** verteilte sich hinter dem Produkt unspezifisch über die gesamte Säule. Weder Edukt **11**, noch andere Verunreinigungen fanden sich im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Produktes **12**. Produkt **12** wurde vollständig per Schmelzpunktbestimmung, IR-Spektrum, ESI-Feinmassenbestimmung,  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum charakterisiert.

#### 4.3.3 2-AMINO-*N*(-1,10-PHENANTHROLIN-5-YL)ACETAMID (**13**)

Der aktivierte Ester des Linkers sollte dazu benutzt werden, an das Aminophenanthrolin zu koppeln. Dies scheiterte an der zu geringen Reaktivität der arylischen Aminofunktion, die nur mit Säurehalogeniden und Säureanhydriden reagiert. Es musste ein reaktiveres Amin in Gestalt einer Alkylaminogruppe eingefügt werden. Hierzu bot sich zwar auch die Umset-

zung des 2-Brom-*N*(-1,10-phenanthrolin-5-yl)acetamid (**6**) mit Ethylendi-amin an, mehr Erfolg aufgrund des geringeren Reinigungsaufwandes versprach allerdings die Aminolyse mit Ammoniak.



Edukt **6** wurde in 25%iger wässriger Ammoniaklösung suspendiert und DMF bis zur vollständigen Auflösung des Edukts zugetropft. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurden flüchtige Komponenten im Vakuum entfernt. Der Feststoff wurde in 5%iger, wässriger Kaliumcarbonatlösung gelöst und mit Chloroform extrahiert, um das reine Amin zu erhalten. Sowohl Bromwasserstoff, welcher als Hydrobromid des Produkts **13** vorliegt, als auch ein Großteil des enthaltenen DMFs wurden hierbei entfernt. Anschließend wurde aus bidestilliertem Wasser umkristallisiert, um das verbleibende DMF zu entfernen. Das hierbei in 29%iger Ausbeute synthetisierte 2-Amino-*N*(-1,10-phenanthroline-5-yl)acetamid (**13**) eignete sich auf Grund der höheren Reaktivität der Aminofunktion zur Umsetzung mit dem aktivierten Ester des Fluorophors.

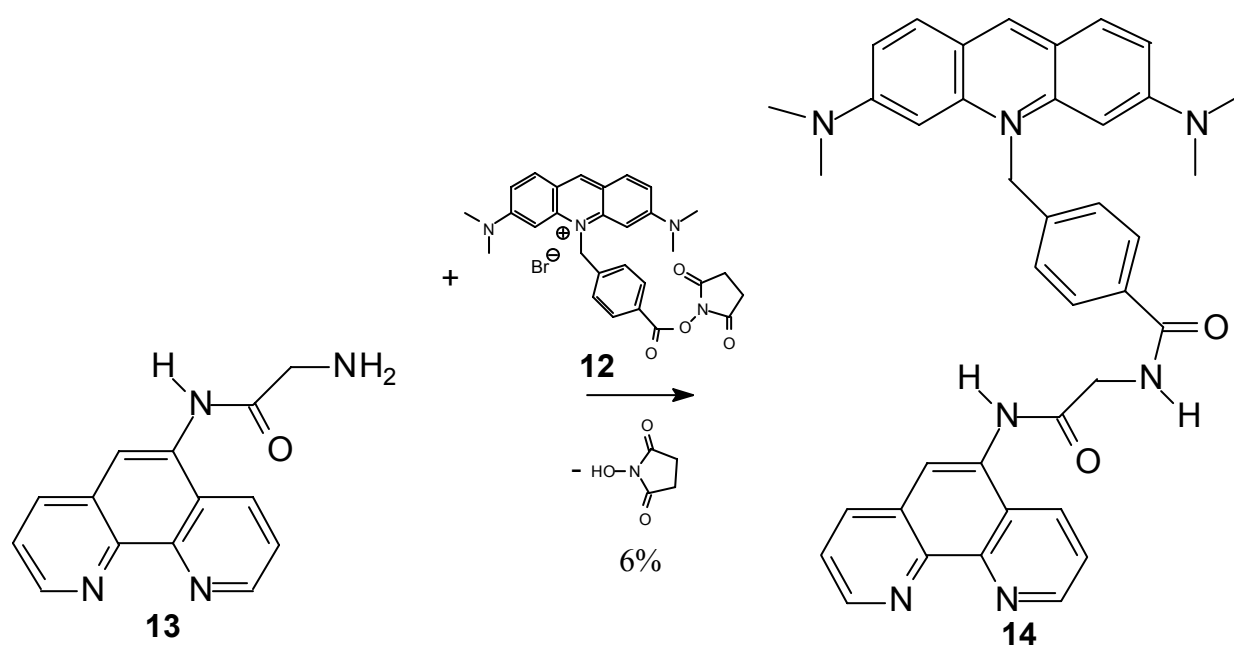
Produkt **13** wurde vollständig per Schmelzpunktbestimmung, IR-Spektrum, ESI-Fein-Massenbestimmung, <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum charakterisiert. Sowohl die Verschiebung der Protonen der Methylengruppe um 0.7 ppm ins Hochfeld im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum im Vergleich zu Edukt **6**, als auch die Signale der Protonen der Aminogruppe bei 1.86 ppm sind hierbei charakteristisch.



#### 4.3.4 [(4-ACRIDINORANGEMETHYLBENZOYL)OXY]-5-AMINO-ACETAMID-1,10-PHENANTHROLIN (**14**)

Eine Kupplung der beiden Funktionskomponenten durch einen nukleophilen Angriff der aliphatischen Aminofunktion des aktivierten Chelators am Succinidylester des aktivierten Fluorophors führte zur gewünschten Verbindung [(4-Acridinorangemethylbenzoyl)oxy]-5-Amino-acetamid-1,10-phenanthrolin (**14**).

Edukt **13** und ein 1.5-facher Überschuss an Edukt **12** wurden über Nacht bei Raumtemperatur unter Argon in trockenem Chloroform gerührt. Das aktivierte Fluorophor [(4-Acridinorangemethyl-benzoyl)oxy]-2,5-pyrrolydindion-bromid (**12**) wurde zuvor aufgrund des hohen Reinigungsaufwandes und dem daraus geringen resultierenden Nutzen nicht vom verbleibenden Edukt 3,6-Bis-(dimethylamino)-acridin (**11**) getrennt. Bei der Umsetzung mit 2-Amino-*N*-(1,10-phenanthrolin-5-yl)acetamid (**13**) fiel das gewünschte Produkt aus, die Verunreinigung 3,6-Bis-(dimethylamino)-acridin (**11**) verblieb in Lösung. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugation isoliert, das Rohprodukt im Vakuum von flüchtigen Komponenten befreit.

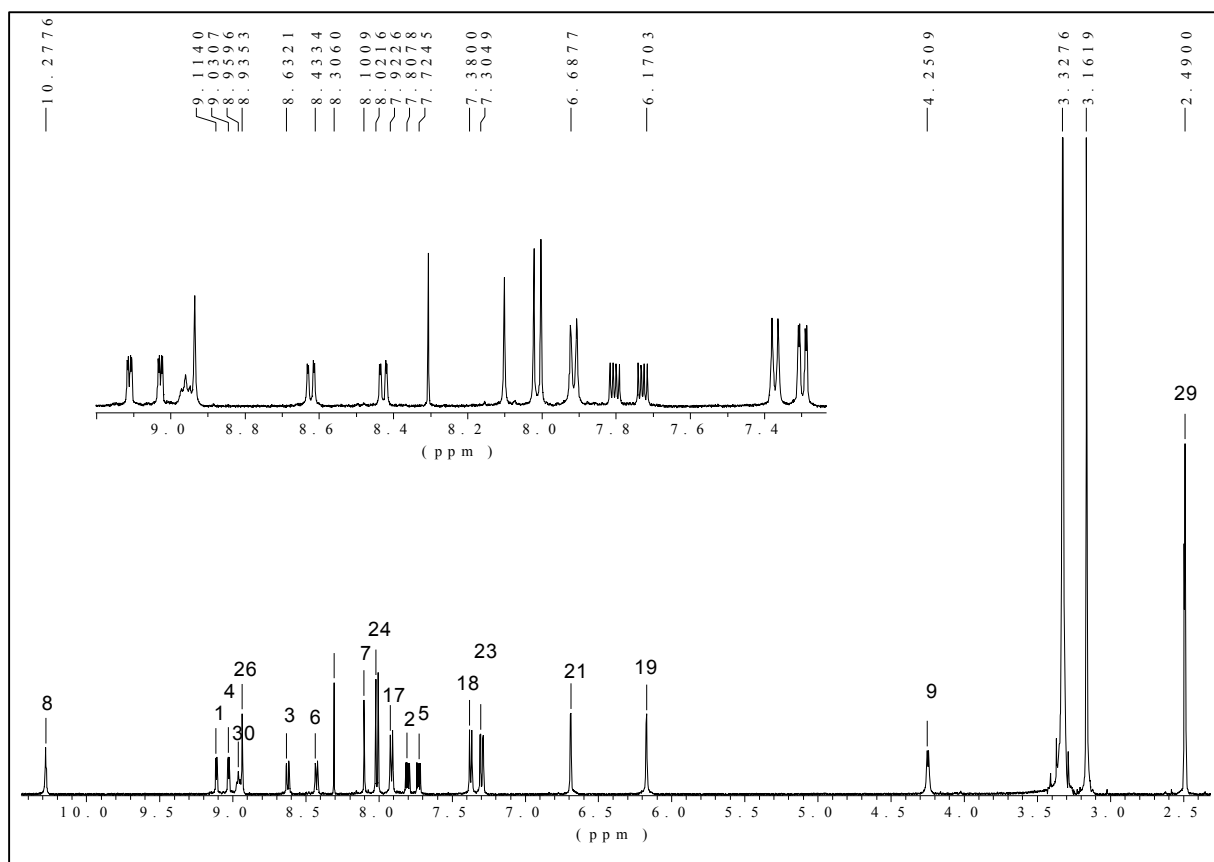


Die Verunreinigung in Form von Edukt **12** wurde durch Umkristallisation von Rohprodukt **14** entfernt. Hierzu wurde das Rohprodukt **14** in eine

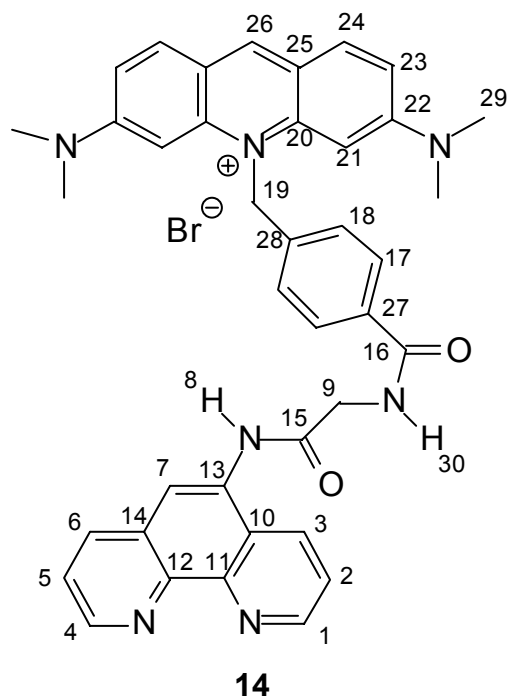
Soxhlethülse gegeben und mit Chloroform extrahiert. Das Produkt kristallisierte sauber im Vorlagekolben aus. Eine konventionelle Umkristallisation aus Chloroform war auf Grund der sehr geringen Löslichkeit des Produkts **14** nicht möglich, auch aus anderen Lösungsmitteln war eine Umkristallisation nicht möglich.

Die Ausbeute lag aufgrund des hohen Reinigungsaufwandes bei der Umkristallisation durch eine Soxhletapparatur bei nur 6%.

Produkt **14** wurde vollständig per Schmelzpunktbestimmung, IR-Spektrum, ESI-Fein-Massenbestimmung,  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum charakterisiert. Die Ergebnisse der Elementaranalyse zeigten beim C-, H-, N-Gehalt der Probe eine Verunreinigung von 1.1 Wassermolekülen je **14** – Molekül. Die ESI-Fein-Massenbestimmung zeigte den Molekülpeak. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigt eine leichte Verunreinigung durch Chloroform bei 8.3 ppm.



**Abb. 15:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Verbindung **14** in  $\text{CDCl}_3$



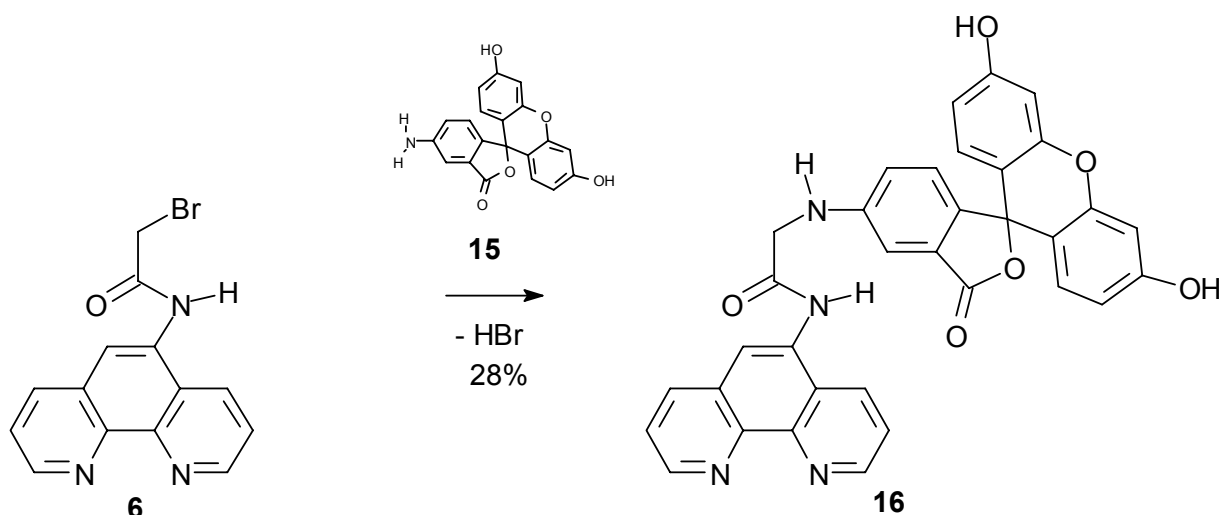
#### 4.4 Synthese der Fluoreszenzsonden auf der Basis von Aminofluorescein

##### 4.4.1 2-(5-AMINO-FLUORESCEIN)-*N*-(1,10-PHENANTHROLIN-5-YL)ACETAMID (**16**)

Eine weitere Fluoreszenzsonde sollte für den Einsatz in Lysosomen synthetisiert werden. Das gewählte Fluorophor war Fluorescein. Dieses ist kommerziell auch als 5-Aminofluorescein (**15**) erhältlich und wurde aus zwei Gründen gewählt; zum einen ist die Aminogruppe die Angriffstelle für die Kupplung mit dem Chelator **6**, dessen für die Kupplung maßgebliche Stelle die Alkylbromidfunktion ist. Zum anderen ist die neu entstehende, sekundäre Aminofunktion basisch.

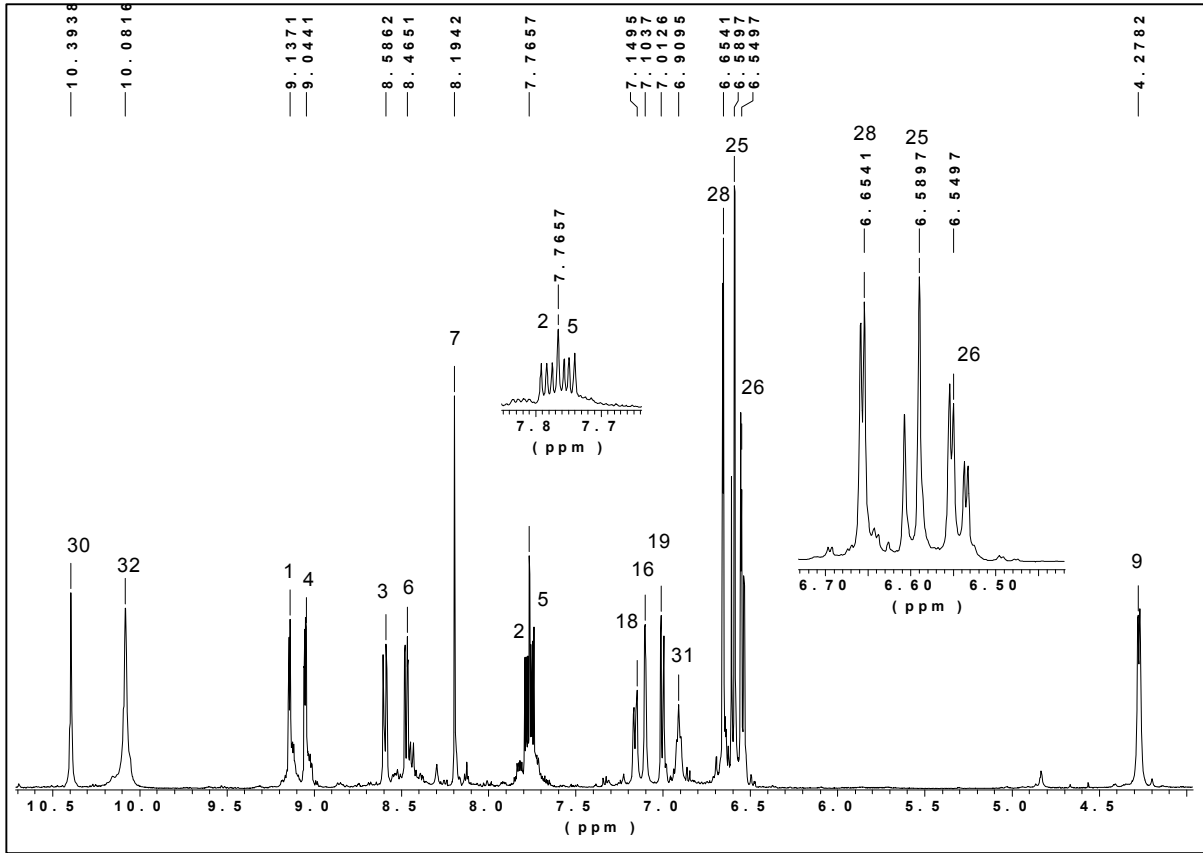
5-Aminofluorescein (**15**) wurde mit 2-Brom-*N*-(1,10-phenanthrolin-5-yl)acetamid (**6**) umgesetzt. Die Reaktion zum Produkt 2-(5-Aminofluorescein)-*N*-(1,10-phenanthrolin-5-yl)acetamid (**16**) wurde ohne Hilfsbase und ohne Temperaturerhöhung in trockenem DMF unter Argon durchgeführt, nachdem sowohl der Einsatz von Kaliumcarbonat bei Raumtemperatur, als auch die Durchführung der Reaktion ohne Hilfsbase bei 80°C zu einer Schwarzfärbung der Reaktionsmischung, begleitet vom Zer-

fall der Edukte, welcher NMR-spektroskopisch nachgewiesen wurde, führte. Zugabe von Aminbasen würde zur nukleophilen Substitution des Halogens unter Bildung eines quartären Ammoniumsalzes führen, analog der Synthese der beiden kationischen Entquencher **7** und **8**.

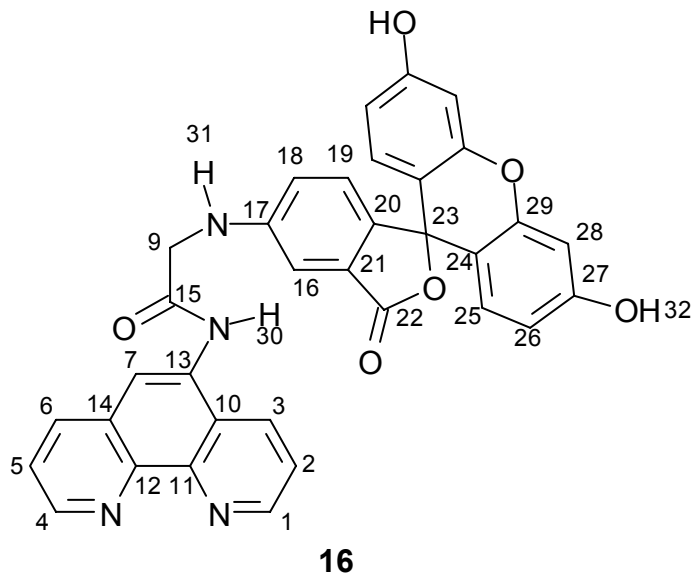


In reiner Form wurde **16** durch Umkristallisation aus Methanol und Diethylether unter Verwendung eines Kristallisationspilzes erhalten. Hierzu wurde das Rohprodukt **16** in Methanol gelöst und in einen Rundkolben gegeben. Der Kristallisationspilz wurde mit Diethylether beladen, auf den Rundkolben gesteckt und bei Raumtemperatur erschütterungsfrei gelagert. Ein Kristallisationspilz zeichnet sich dadurch aus, dass er das enthaltene Lösungsmittel auf eine große Fläche verteilt, der Austausch mit der Gasphase also groß ist. Diethylether gelangt in die methanolische Phase im Rundkolben und führt zur „sanften“ Auskristallisation des Produktes, im optimalen Fall als Einkristall. In diesem Fall führte diese Form der Umkristallisation nicht zu Einkristallen, das Produkt fiel als Film an der Innenseite des Rundkolbens sauber aus.

Produkt **16** wurde vollständig per Schmelzpunktbestimmung, IR-Spektrum, ESI-Fein-Massenbestimmung,  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum charakterisiert. Die ESI-Fein-Massenbestimmung zeigte den Molekülpeak. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigt leichte Verunreinigungen zwischen 7.8 und 9.1 ppm, deren Ursprung nicht bekannt ist.



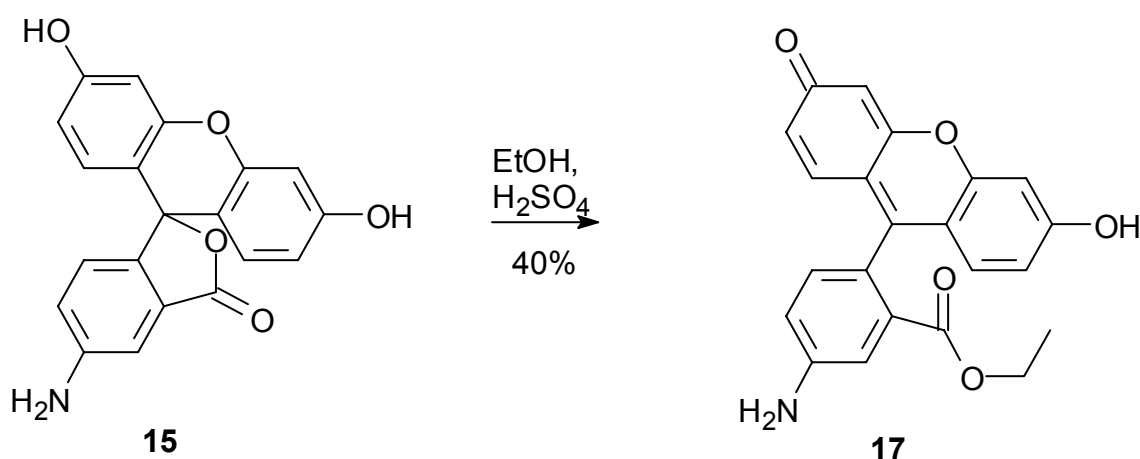
**Abb. 16:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Verbindung **16** in  $\text{DMSO-d}_6$



## 4.5 Synthese der Fluoreszenzsonden auf der Basis von Aminofluoresceinethylester

### 4.5.1 5-AMINOETHYLFLUORESCEIN (**17**)

In einer weiteren Synthese wurde die Säuregruppe des 5-Aminofluoresceins (**15**) zunächst mit Ethanol schwefelsauer verestert, um an der späteren Fluoreszenzsonde keine protonierbare Gruppe neben der Aminofunktion zu besitzen, welche beim niedrigem pH-Wert des Lysosoms durch Deprotonierung der Carboxylgruppe dazu führen würde, dass die Fluoreszenzsonde neutral wäre und nicht, wie geplant kationisch ist.

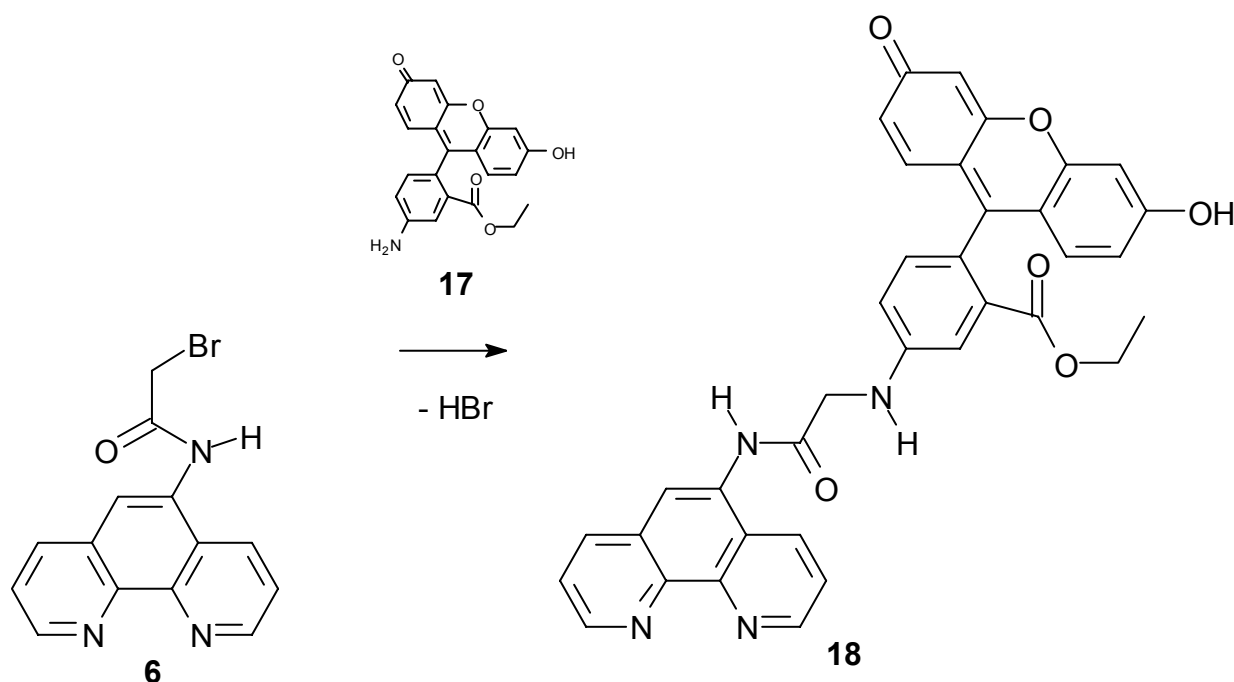


Die Veresterung der Säuregruppe gelang ausschließlich unter drastischen Bedingungen; es wurden in Anlehnung an die literaturbekannte Veresterung des Fluoresceins nach Feuerstein *et al.*<sup>[148]</sup> auf einen Massenanteil Edukt 1.5 Anteile Schwefelsäure und zwei Anteile Ethanol zugegeben und 16 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach der Isolation des Rohproduktes 5-Aminoethylfluorescein (**17**) durch Zentrifugation und anschließendem Digerieren mit bidestilliertem Wasser im Ultraschallbad wurde es säulenchromatographisch an neutralem Aluminiumoxid und Aceton/H<sub>2</sub>O (5:1; v/v) gereinigt. Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt, das Produkt **17** fiel sauber aus der Lösung aus, Lösungsmittelreste wurden in einer Trockenpistole an Phosphor(V)-oxid bei 100°C im Vakuum entfernt. Produkt **17** wurde vollständig per Schmelzpunktbestimmung, IR-Spektrum, ESI-Fein-Massenbestimmung, <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum und

Elementaranalyse charakterisiert. Die ermittelten C-, H-, N-Gehalte der Elementaranalyse lagen innerhalb der Toleranzen von 0.3% Abweichung. Die ESI-Fein-Massenbestimmung zeigte den Molekülpeak. Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt keine Verunreinigungen. Charakteristisch ist das Triplett-signal des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums der Methylgruppe des Ethylesters bei 0.80 ppm. Die Intensität dieses Signals im Verhältnis zu den restlichen Signalen indiziert eine vollständige Veresterung der Carboxylgruppe.

#### 4.5.2 2-(5-AMINOFLOURESCEIN-ETHYLESTER)-*N*-1,10-PHENANTHROLIN-5-YL)-ACETAMID (**18**)

Bei der nachfolgenden Synthese des Fluoreszenzfarbstoffes 2-(5-Aminofluorescein-ethylester)-*N*-1,10-phenanthrolin-5-yl)acetamid (**18**) wurden die Edukte, Fluorophor **17** und die chelatisierende Untereinheit **6**, in trockenem Acetonitril bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Es wurde ein leichter Überschuss an Edukt **17** von 1.17/1 gewählt. Dieser wurde gewählt, weil so erreicht wurde, dass im Rohprodukt das Edukt **6** als einzige Verunreinigung vorlag. Andere Mischungsverhältnisse, auch ein großer Überschuss an Edukt **6** führten nicht zu einem vollständigen Verbrauch des Edukts **17**, andererseits führte ein kleiner Überschuss an **17** zum Verschwinden der Signale des Edukts **6** im  $^1\text{H-NMR}$ -Rohproduktspektrum.



Die Reinigung des Produkts 2-(5-Aminofluorescein-ethylester)-*N*-1,10-phenanthrolin-5-yl)acetamid (**18**) erwies sich als schwierig.

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Rohproduktes zeigte neben Spuren von DMF ein **17/18**- (Edukt/Produkt) Verhältnis von 1:3 (die Berechnung des Edukt/Produkt-Verhältnisses erfolgte durch Integration des charakteristischen mittleren Peaks des Triplets der mit 31 bezeichneten Protonen der Ethylestergruppe im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum).

Es folgten Umkristallisationsversuche. Es wurde aus bidestilliertem Wasser umkristallisiert. Wurde die Temperatur der Mischung längere Zeit auf  $100^\circ\text{C}$  gehalten, fiel das Edukt/Produkt-Verhältnis auf unter 1:1. Versuche, bei denen das Lösungsmittel nur für 30 Sekunden zum Sieden gebracht wurde, führte bis zu einer Anreicherung des Produktes auf ein Edukt/Produkt-Verhältnis von 1:6.

Wurde **18** in Ethanol gelöst, so dass eine gesättigte Lösung entstand und darüber ein mit Diethylether befüllter Kristallisationspilz angebracht, führte dies zu einem Edukt/Produkt-Verhältnis von 1:8.

Es wurden ausgiebige chromatographische Reinigungsversuche unternommen. Am gebräuchlichsten und einfachsten zu handhaben sind Kieselgel oder Aluminiumoxid, daher wurde mit diesen stationären Phasen begonnen, wobei sich aber zeigte, dass das zu reinigende Produkt bei allen verwendeten Laufmitteln von Hexan bis Methanol (sowie zahlreiche Gemische aus diesen) jeweils einen  $R_f$ -Wert von null zeigte. Digerieren der stationären Phase – auch Rühren unter Rückfluss mit DMF- führte nicht zum Lösen des Produktes aus der stationären Phase.

Aus diesen Gründen wurde RP-18-Säulenmaterial zu Trennversuchen benutzt. Ein Laufmittelgemisch mit recht hohem Wassergehalt wurde gewählt, da wasserarme Laufmittelgemische eine sehr schlechte Trennwirkung bei dem vorliegenden Trennproblem zeigten. Letztlich zeigte ein Methanol/Wasser-Gemisch in der Zusammensetzung 2:1 bei den Dünnschichtchromatographischen Voruntersuchungen die beste Trennwirkung. Dies ließ sich jedoch nicht auf die Säulenchromatographie übertragen, wo eine Zusammensetzung Methanol/Wasser von 1:1 die beste Trennwir-

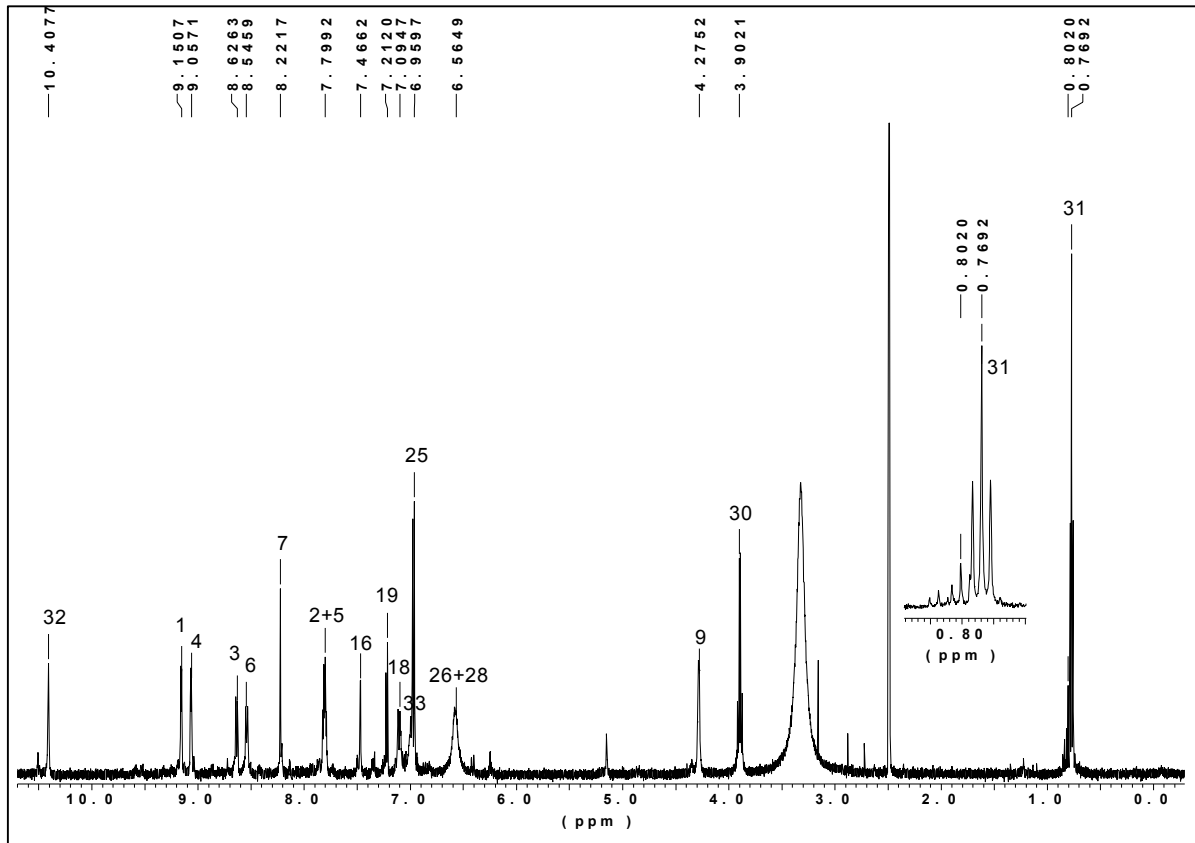


kung zeigte, die aber nach zahlreichen Versuchen immer noch zu schlecht war, um genügend große Mengen sauberen Produktes zu erhalten, um sie einer weiteren Charakterisierung zuzuführen.

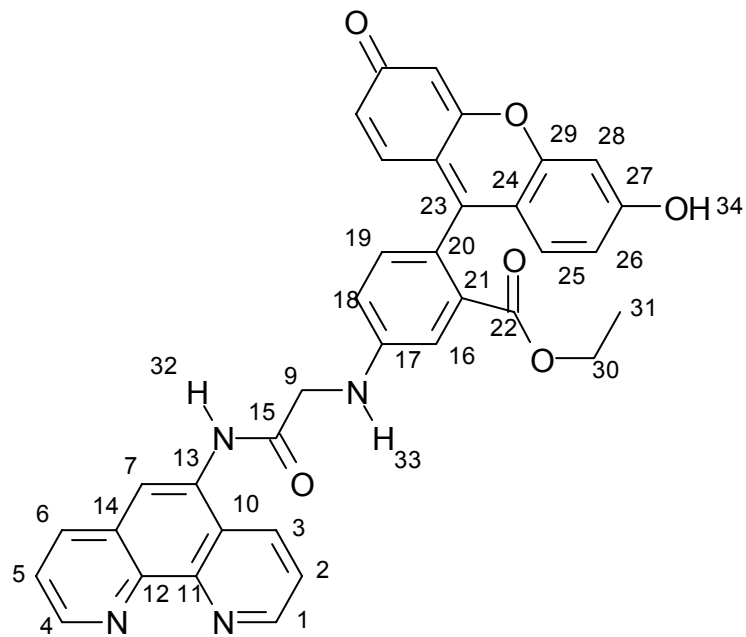
Der Einsatz einer MPLC-Anlage führte auch nach Laufmittelverhältnisvariationen und immer geringer werdenden Beladungsmengen zu keinerlei Trennung.

Der Versuch, die guten dünnenschichtchromatographischen (DC) Trennungen auf die präparative Ebene mit manuell hergestellten DC-Glasplatten der Größen 20 x 20 cm, bzw. 12 x 11 cm zu übertragen, scheiterte zunächst bei der Verwendung einfachen Säulenmaterials, welches aufgeschlemmt und auf eine - mit Spülmittellösung und Aceton gereinigten und entfetteten - Glasplatte der Dimensionen 20 x 20 cm gegossen wurde. Es war keinerlei Trenneffekt zu erkennen.

Es wurde 13% Gips - bezogen auf die Masse des RP-18-Säulenmaterials - zu dem RP-18-Material dazugegeben und ausgiebig gemörsert. Das Pulver wurde mit Methanol/Wasser (10:1) aufgeschlemmt und auf eine gereinigte und entfettete Glasplatte, die vorher auf 12 x 11 cm geschnitten wurde, gegeben. Nach einer halben Stunde Trocknen an der Luft bei Raumtemperatur wurde die Platte für 14 h in einen auf 80°C vorgeheizten Trockenschrank gegeben. Die erste Platte der Dimension 12 x 11 cm wurde mit 6.00 mg in 3.00 mL Methanol und anschliessend eine zweite Platte mit 4.00 mg **18** Rohprodukt in 2.00 mL Methanol beladen, was aufgrund einer Überladung der jeweiligen Platte zu keiner Trennung führte. Die dritte Platte wurde mit einer Lösung aus 1 mg Rohprodukt **18** in 1 mL Methanol beladen. Die Trennung sah visuell sehr gut aus, ein angefertigtes <sup>1</sup>H-NMR Spektrum war durch die zu geringe Konzentration an Produkt **18** nicht für eine Auswertung geeignet. Eine präparative dünnenschichtchromatographische Trennung kam also auf Grund der geringen Menge an Produkt nicht in Frage. Eine präparative Reinigung entfiel somit, da Trennmethode, mit denen sich genügend große Mengen an Produkt **18** reinigen ließen, nicht zur Verfügung standen.



**Abb. 17:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Verbindung **18** in  $\text{DMSO-d}_6$

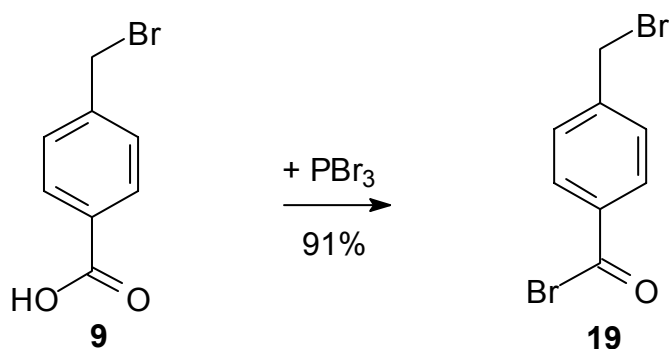


**18**

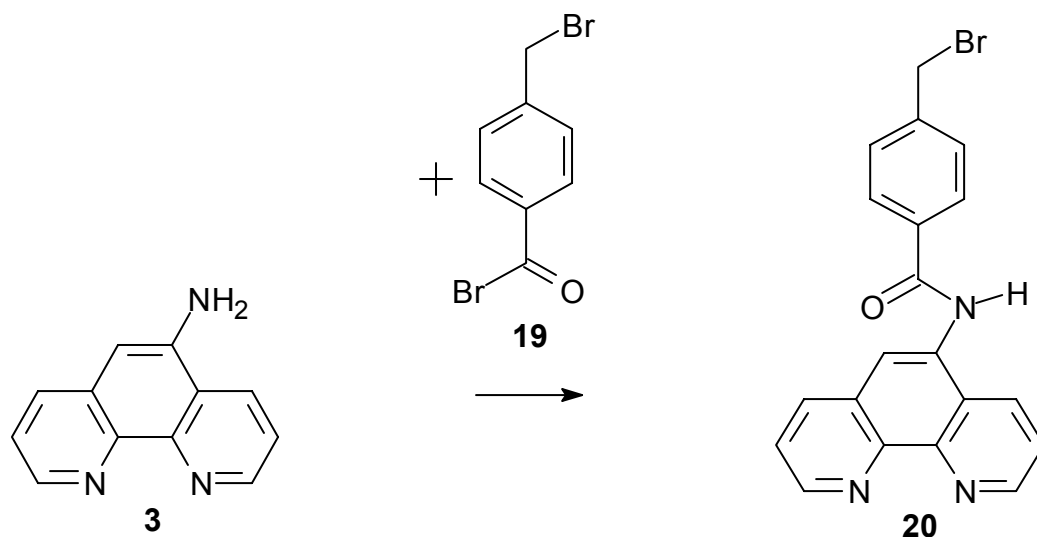
4.5.3 4-BROMMETHYL-BENZOYLBROMID (**19**)

Auf Grund der Probleme bei der Reinigung von Fluoreszenzsonde **18** wurde die Struktur des Linkers variiert, indem er um eine Phenylengruppe erweitert wurde. Dessen benzylisches Brom weist zum einen Reaktivitätsunterschiede zu dem des Bromacetylbromids auf, so dass die Reaktion möglicherweise höhere Ausbeuten aufweist; zum anderen könnte sich das Produkt leichter reinigen lassen.

Der Linker 4-Brommethyl-benzoylbromid (**19**) wurde nach Solas *et al.*<sup>[149]</sup> aus der kommerziell erhältlichen 4-Brommethylbenzoesäure (**9**) hergestellt, die in Phosphortribromid unter Rückfluss umgesetzt wurde. Nach der Reinigung des Rohproduktes durch Lösen in Toluol, Abfiltrieren der unlöslichen Verunreinigungen und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum, wurde auf Grund der hohen Reaktivität des Linkers dieser ohne weitere Charakterisierung den nachfolgenden Reaktionen zugeführt.

4.5.4 4-(BROMMETHYL)-N-(1,10-PHENANTHROLIN-5-YL)BENZAMID (**20**)

Mit 4-(Brommethyl)-N-(1,10-phenanthrolin-5-yl)benzamid (**20**), welches nach der Methode von Weisheit<sup>[11]</sup> synthetisiert wurde, konnte analog der Synthese von Chelatoruntereinheit **6** ein weiterer Chelator auf 1,10-Phenanthrolinbasis erhalten werden. 5-Amino-1,10-phenanthrolin wurde mit Linker **19** als Suspension in trockenem Acetonitril unter Argon bei Raumtemperatur gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Acetonitril, Wasser und 5%iger Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und im Exsikkator über Phosphor(V)-oxid getrocknet.

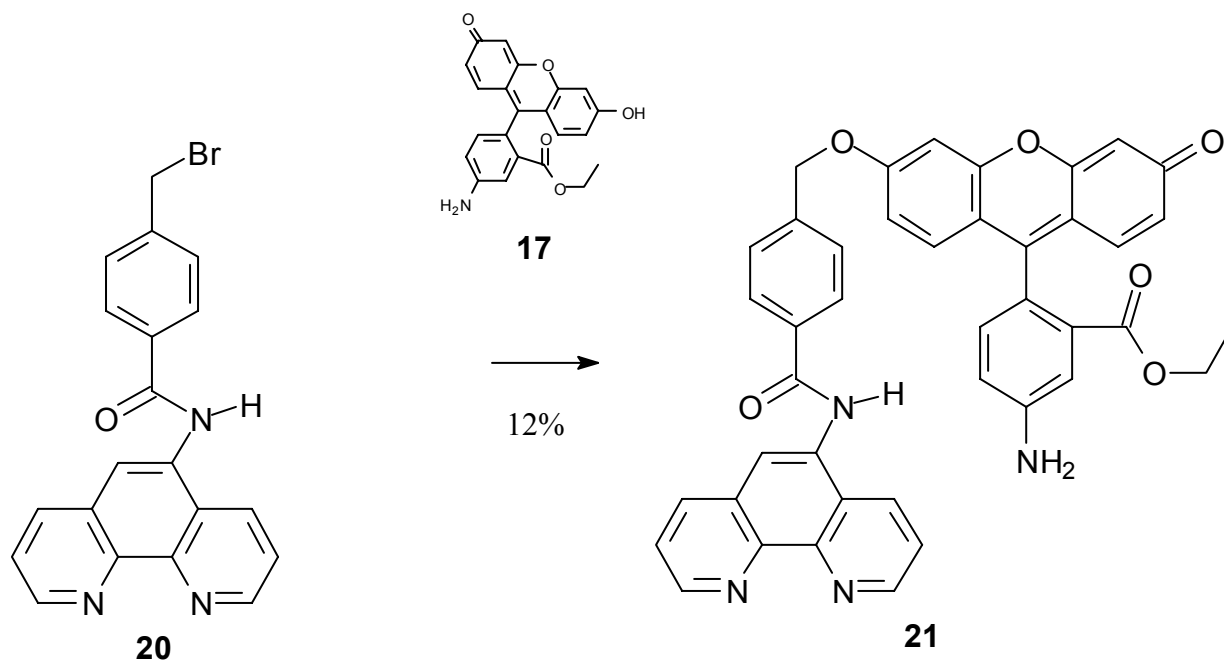


Das literaturbekannte Produkt **20** wurde durch ein  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum identifiziert.

#### 4.5.5 5-AMINO-2-(3-OXO-6-[4-(1,10-PHENANTHROLIN-5-YLCARBAMOYL)-BENZYL-OXY]-3H-XANTHEN-9-Y)BENZOE SäUREESTER (**21**)

Eine weitere Fluoreszenzsonde mit Fluorescein als Fluorophor sollte aus den Edukten **17** und **20** hergestellt werden. Hierzu wurden zunächst beide Edukte in äquimolarem Verhältnis in DMF gerührt. Da auch nach 72 h bei einer Temperatur von  $100^\circ\text{C}$  kein Umsatz erfolgte, was sich anhand von hochaufgelösten ESI-MS-Spektren überprüfen ließ, wurde mit Natriumcarbonat eine Hilfsbase zugesetzt. Mit einem 50%-igen Überschuss an **20** ließ sich das Fluorophor **17** vollständig umsetzen.

Das saubere Produkt wurde säulenchromatographisch an basischem Aluminiumoxid mit dem Laufmittelgemisch Chloroform/n-Hexan/Ethanol (10:4:1 v/v/v) erhalten, das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

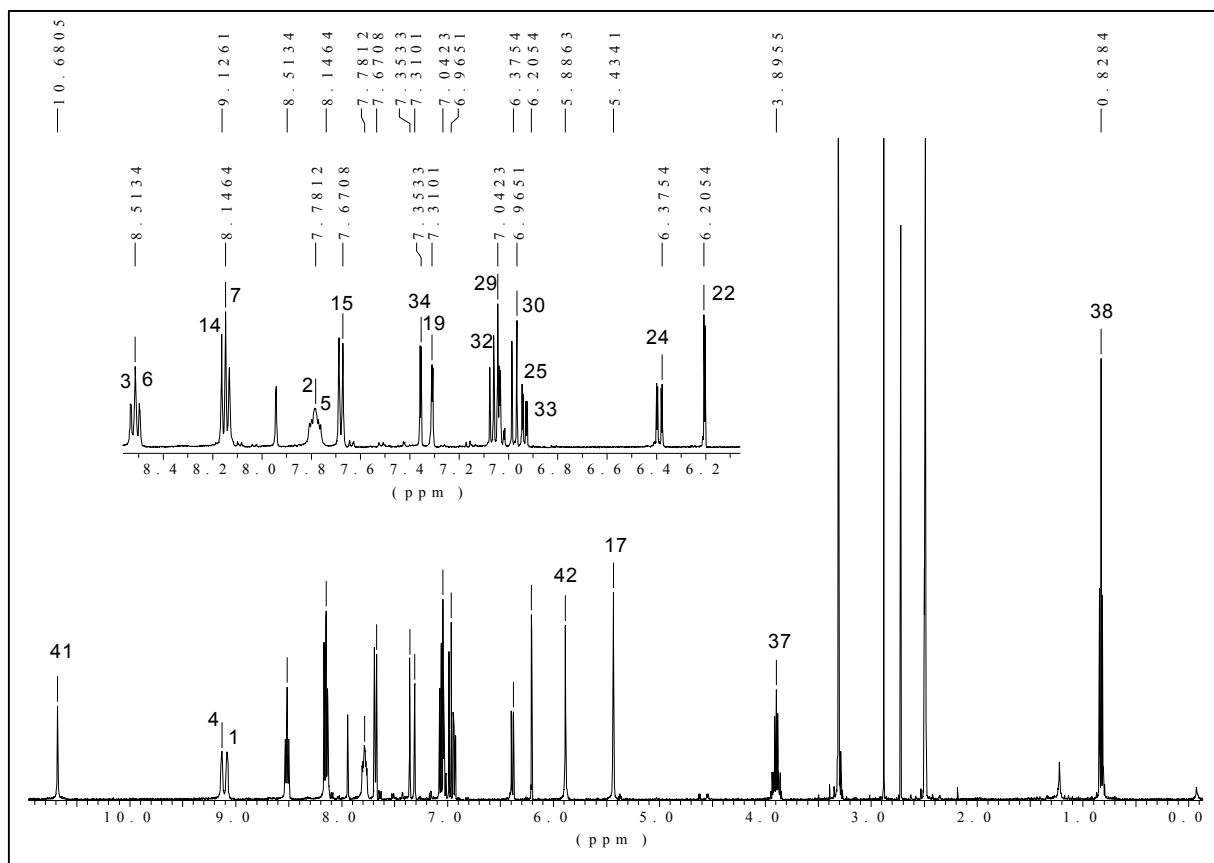


Das Produkt 5-Amino-2-(3-oxo-6-[4-(1,10phenanthrolin-5-ylcarbamoyl)-benzyloxy]-3H-xanthen-9-y)benzoesäureester (**21**) war nicht zu einer sichtbaren Fluoreszenz fähig, da die Kupplung nicht - wie gewünscht - an der Aminofunktion des Fluorophors stattfand, sondern an der Hydroxylgruppe des fluorophoren Systems, dessen delokalisiertes  $\pi$ -System dadurch verändert wurde.

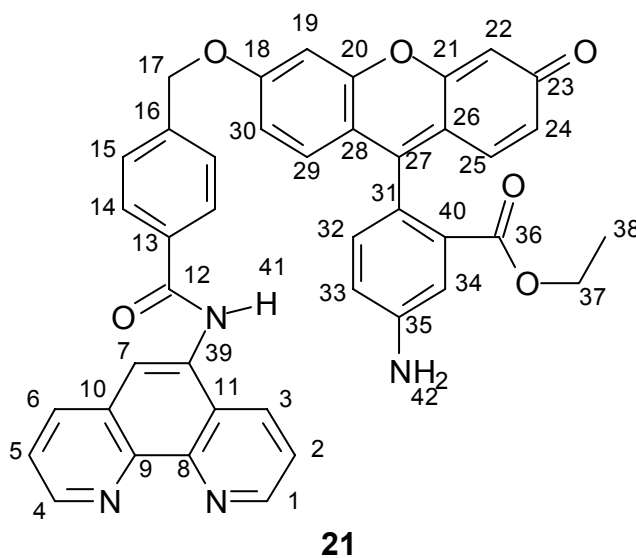
Produkt **21** wurde vollständig per Schmelzpunktbestimmung, IR-Spektrum, ESI-Fein-Massenbestimmung,  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum charakterisiert. Die ESI-Fein-Massenbestimmung zeigte den Molekülpeak. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigt außer Spuren von DMF, die sich im Vakuum nicht entfernen ließen, keine Verunreinigungen.

Die Kupplung am fluorophoren System wurde durch das Integral des Signals der mit 42 bezeichneten Protonen der Aminogruppe bei einer chemischen Verschiebung von 5.88 ppm gezeigt, welches eindeutig aus zwei Protonen gebildet wird (also nicht der Ort der Kupplung sein kann). Des weiteren sind die mit 18, 19 und 30 bezeichneten Kohlenstoffatome nicht mehr äquivalent den Kohlenstoffatome 22, 23 und 24 im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum. Dies ist der Fall bei einem Molekül, das an dem mit 18 bezeichneten Kohlenstoffatom eine phenolische Hydroxylgruppe trägt. Des dessen Proton zeigt eine Tautomerie mit der Carbonylgruppe an dem mit 23

bezeichneten Kohlenstoffatom, welche diese beiden Kohlenstoffatome im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum äquivalent erscheinen lässt. Diese Tautomerie findet bei Molekül **21** nicht statt, da keine Hydroxylgruppe, sondern ein Ether vorliegt.



**Abb. 18:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Verbindung **21** in  $\text{DMSO-d}_6$



## 5 Einsatz der Fluoreszenzsonden im zellfreien System

Die Eisenchelatoren wurden zunächst im zellfreien System auf ihre UV/Vis-Absorptionen und ihre fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften untersucht. Dies geschah sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit von Fe(II)-Ionen und in Abhängigkeit vom pH-Wert. Des Weiteren wurde die Bindungsstöchiometrie der Sonden mit Fe(II) untersucht. Alle Messlösungen wurden mit dem Schwermetallkomplexbildnerharz Chelex 100 behandelt, da vorhandene Schwermetallionen die Ergebnisse verfälschen würden.

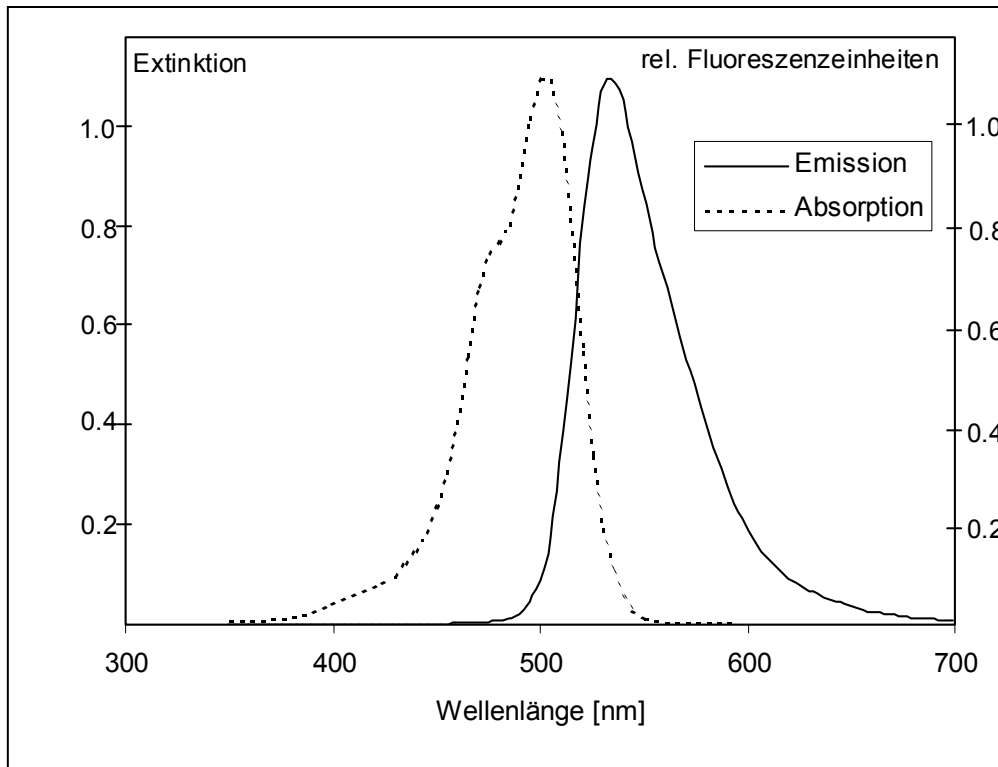
Diese Untersuchungen waren die Grundlage für die späteren Untersuchungen in lebenden Zellen und die dafür benötigten ex-situ-Kalibrierungen.

### 5.1 Das Fluoreszenzverhalten der Fluoreszenzsonde 14

#### 5.1.1 ABSORPTIONS-/EMISSIONSSPEKTRUM DER FLUORESZENZSONDE 14

Zunächst wurden die Absorptions-/Emissionsspektren der unbeeinflussten Fluoreszenzsonde **14** untersucht (Abb. 19).

Die maximale Emission zeigte die Fluoreszenzsonde bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{exc}} = 499 \text{ nm}$ . Die maximale Fluoreszenzintensität der Fluoreszenzsonde **14** liegt bei  $\lambda_{\text{em}} = 533 \text{ nm}$ .



**Abb. 19:** Absorptions- und Emissionsspektrum der Fluoreszenzsonde **14** in Tris-Puffer bei pH 7.2 und 0.18% SDS. Die Anregungswellenlänge für das Emissionsspektrum betrug  $\lambda_{\text{exc}} = 499$  nm. Die Emissionswellenlänge für das Anregungsspektrum lag bei  $\lambda_{\text{em}} = 543$  nm.

### 5.1.2 pH-WERT-ABHÄNGIGES EMISSIONSSPEKTRUM DER FLUORESCENZSONDE **14**

Um dem pH-Wert des jeweiligen Zellkompartiments zu entsprechen, wurden die wässrigen Lösungen gepuffert; die pH-Werte der Messlösungen lagen ganzzahlig zwischen pH = 4 und pH = 10. Die Fluoreszenzspektren wurden unter Zugabe des Lösungsvermittlers Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgenommen. Diese führten nicht zu einer Änderung der Absorptions-/Fluoreszenzspektren. Ohne Zusatz von SDS war die Löslichkeit der Fluoreszenzsonden bei den gewählten Konzentrationen von 5.00 bis 100  $\mu\text{M}$  in wässriger Lösung zu gering; es wurde die geringstmögliche Menge an SDS gewählt, die dazu führte, dass die Sonde vollständig gelöst war (0.18%), so dass die kritische Mizellenkonzentration von 8.00 mM (0.23%) für SDS



unterschritten wurde und Beeinträchtigungen der Messungen ausgeschlossen werden konnten.

Die Absorptions- und Emissionsspektren der Fluoreszenzsonde **14** zeigten keine Abhängigkeit vom pH-Wert der Messlösung im untersuchten pH-Bereich.

Die Fluoreszenzsonde **14** hat zwar zwei protonierbare Dimethylamino-Gruppen, deren  $pK_B$ -Wert jedoch möglicherweise auf Grund der bereits vorhandenen, permanenten, positiven Ladung am Ringstickstoff des Fluorophors so niedrig ist, dass in diesem Fall im untersuchten pH-Bereich keine weitere Protonierung stattfinden würde. Dies wäre eine Erklärung dafür, dass die Absorptions- und Emissionsspektren keine pH-Abhängigkeit zeigten.

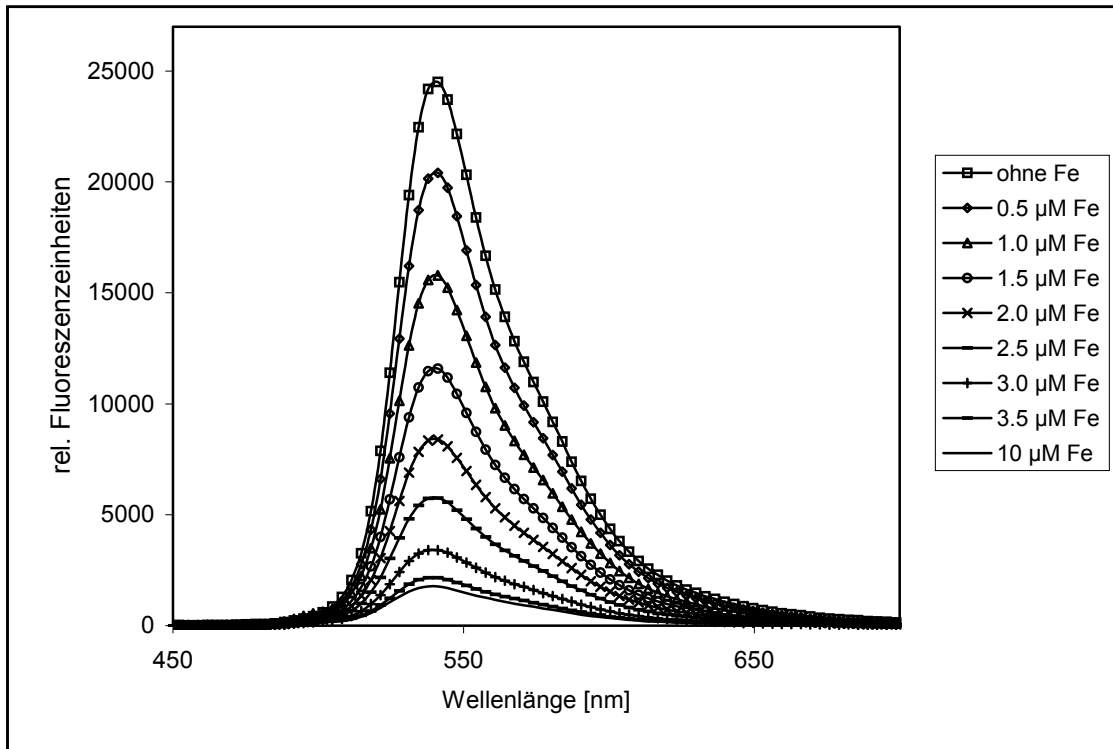
### 5.1.3 EMISSIONSSPEKTRUM DER FLUORESZENZSONDE **14** IN ABHÄNGIGKEIT VON EISEN(II)-IONEN

Mohr'sches Salz (Eisen(II)ammoniumsulfat,  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  /Trinatriumcitrat) wurde als wässrige Lösung der Fluoreszenzsondenlösung stufenweise zugesetzt, was zu keiner Verschiebung des Fluoreszenzintensitätsmaximums führte. Mohr'sches Salz zeichnet sich durch seine Beständigkeit gegen Luftsauerstoff aus. Trotzdem wurden die Messungen stets unter Gegenwart eines großen Ascorbinsäureüberschusses durchgeführt, um zu gewährleisten, dass das vorhandene Eisen stets in der Oxidationsstufe +II vorliegt und nicht durch Luftsauerstoff zu Eisen(III) oxidiert wird.

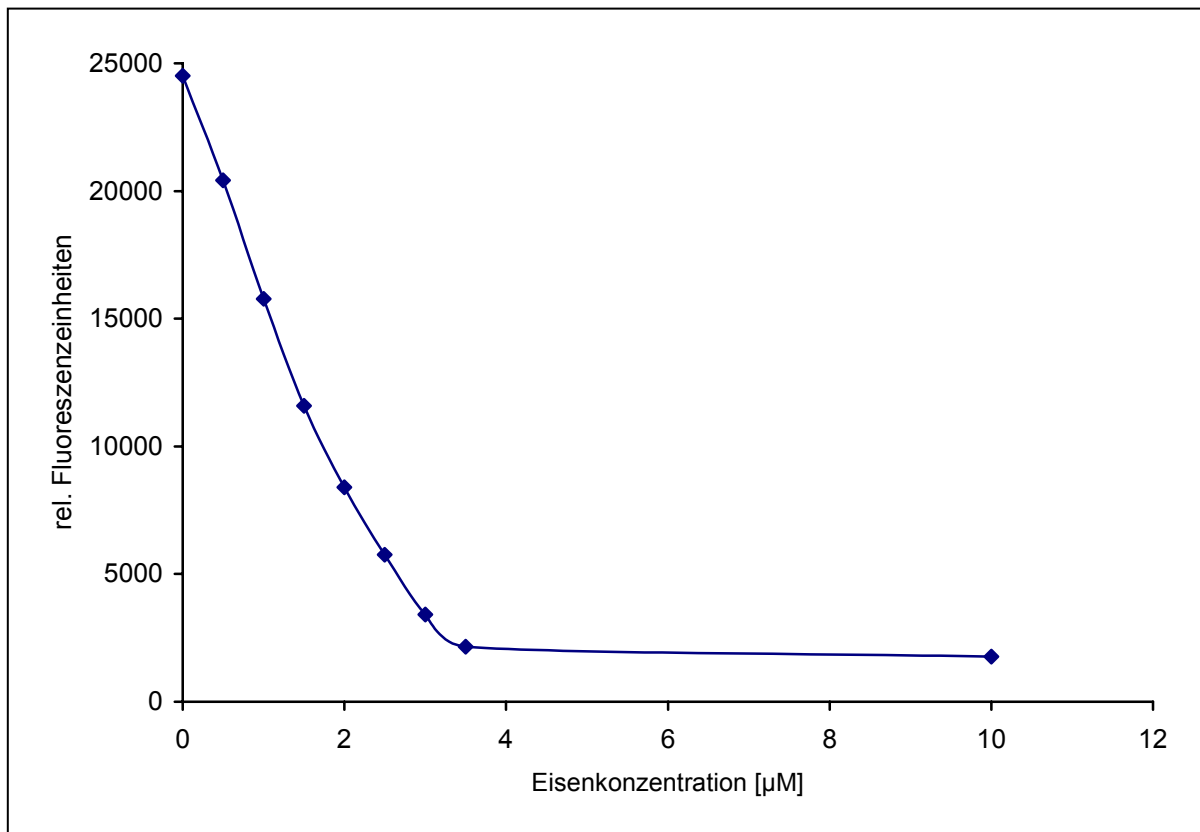
Abb. 20 zeigt die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität der Fluoreszenzsonde **14** von der jeweils in der Messlösung vorhandenen Eisenkonzentration. Der Abfall der Fluoreszenz verläuft, wie erwartet linear bis zum Erreichen des stöchiometrischen Verhältnisses von 3:1 (Fluoreszenzsonde: Eisen). Dieser Verlauf wird verdeutlicht durch Abb. 21, bei der das Maximum der Fluoreszenzintensität der jeweiligen Kurve bei einer Wellenlänge von 543 nm aufgezeigt ist.

Abb. 21 zeigt deutlich den annähernd linearen Verlauf der Abhängigkeit

der Fluoreszenzintensität der Sonde **14** von der Eisenkonzentration. Ab einer Konzentration von  $3.3 \mu\text{M}$  Eisen tritt kein weiterer Abfall der Fluoreszenzintensität mehr auf. Es liegt also eine 3:1 Stöchiometrie von Fluoreszenzsonde zu Eisen ( $10 \mu\text{M}$  Fluoreszenzsonde **14** zu  $3.3 \mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$ ) vor. Die Fluoreszenz der Sonde wird annähernd vollständig gelöscht.



**Abb. 20:** Das eisenkonzentrationsabhängiges Emissionsspektrum von **14** bei einer Fluoreszenzsondenkonzentration von  $10 \mu\text{M}$  in Tris-gepufferter Lösung bei pH 7.2 und bei 0.18% SDS. Die Anregungswellenlänge betrug  $\lambda_{\text{exc}} = 499 \text{ nm}$ .

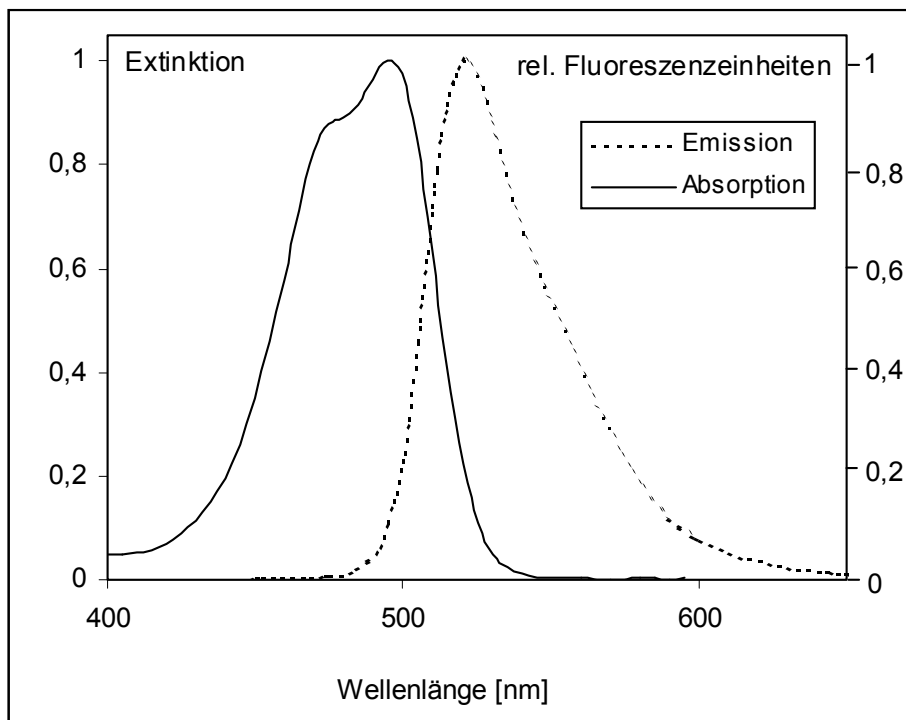


**Abb. 21:** Die Fluoreszenzintensität von **14** in linearer Abhängigkeit von der Eisenkonzentration. **14** liegt bei einer Konzentration von 10 µM vor, die Lösung ist Tris-gepuffert bei pH 7.2 und mit 0.18% SDS versetzt. Die Anregungswellenlänge war  $\lambda_{\text{exc}} = 499 \text{ nm}$ .

## 5.2 Das Fluoreszenzverhalten der Fluoreszenzsonde **16**

### 5.2.1 ABSORPTIONS-/EMISSIONSSPEKTRUM DER FLUORESZENZSONDE **16**

Abb. 22 zeigt das Absorptions-/Emissionsspektrum der Fluoreszenzsonde **16** bei pH = 7.2 in Tris/HCl-gepuffelter Lösung. Die maximale Absorption liegt bei  $\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$ , die maximale Fluoreszenzintensität bei  $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$ .



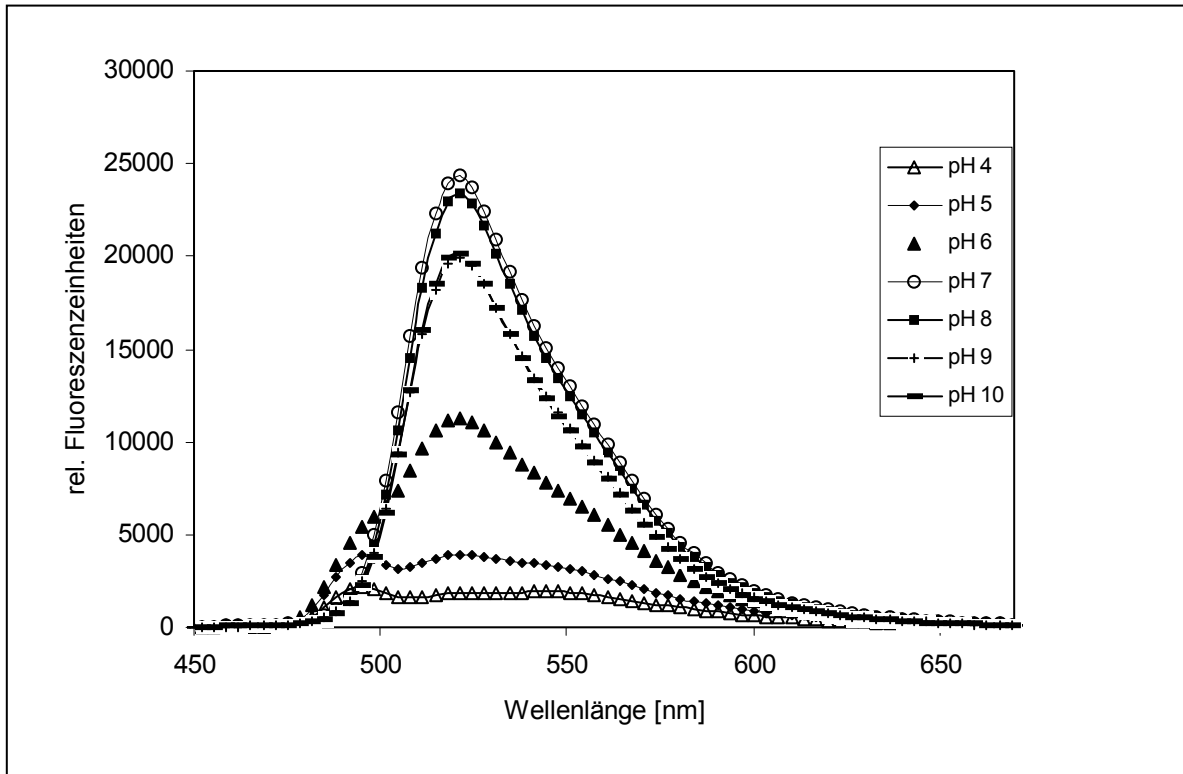
**Abb. 22:** Absorptions- und Emissionsspektrum der Fluoreszenzsonde **16** in Tris-Puffer bei pH 7.2 und 0.18% SDS. Die Anregungswellenlänge für das Emissionsspektrum betrug  $\lambda_{\text{exc}} = 495$  nm. Die Emissionswellenlänge für das Anregungsspektrum lag bei  $\lambda_{\text{em}} = 525$  nm.

### 5.2.2 pH-WERT-ABHÄNGIGES EMISSIONSSPEKTRUM DER FLUORESCENZSONDE **16**

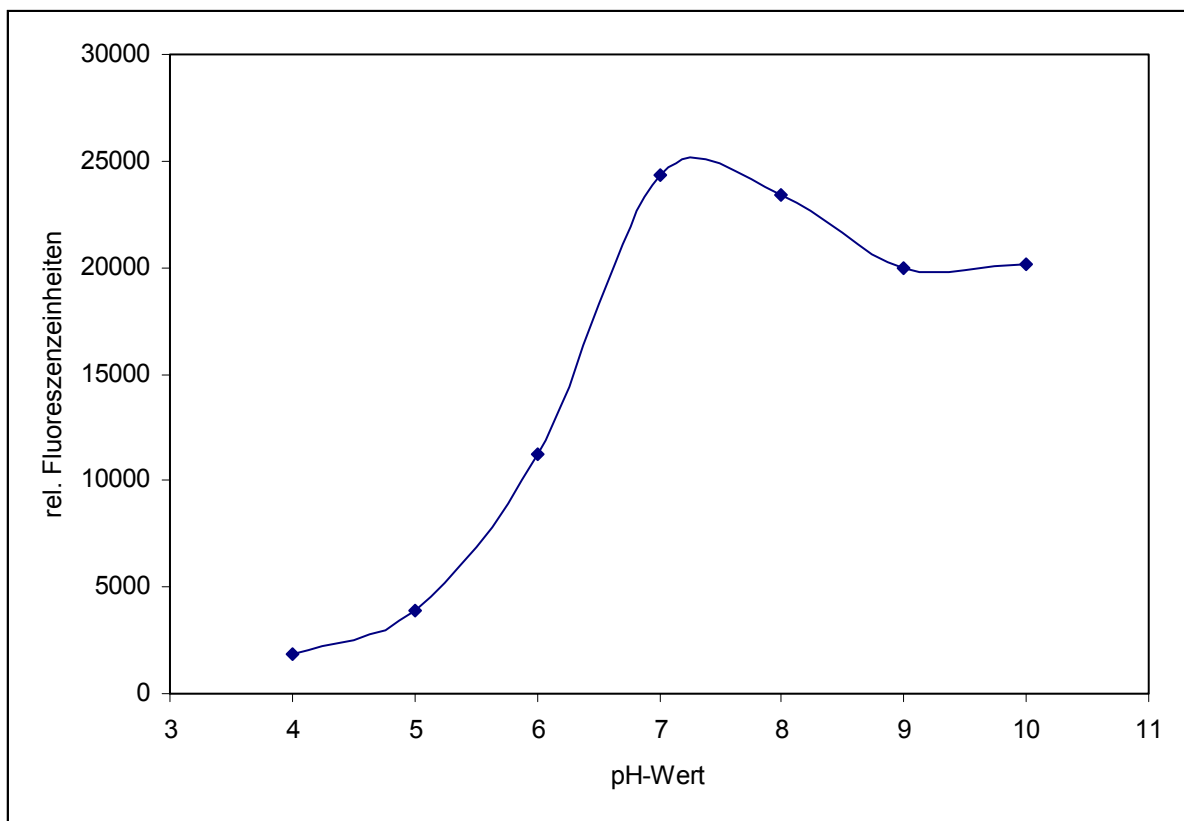
Auch bei diesen Messungen lagen die pH-Werte der Messlösungen ganzzahlig zwischen pH = 4 und pH = 10. Die Fluoreszenzspektren wurden unter Zugabe von 0.18% des Lösungsvermittlers Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgenommen.

Die Fluoreszenzsonde **16** zeigte eine starke pH-Abhängigkeit (Abb. 23). Fluoreszenzsonde **16** kann in zwei tautomeren Formen vorliegen. Die offene Form (als Säureanion) liegt bevorzugt bei Protonenunterschuss, also in hohen pH-Wert vor. Die geschlossene Form überwiegt bei niedrigen pH-Werten. Nur bei der offenen Form liegt ein fluoreszenzfähiges System vor, die Fluoreszenzintensität sinkt also mit sinkendem pH-Wert.

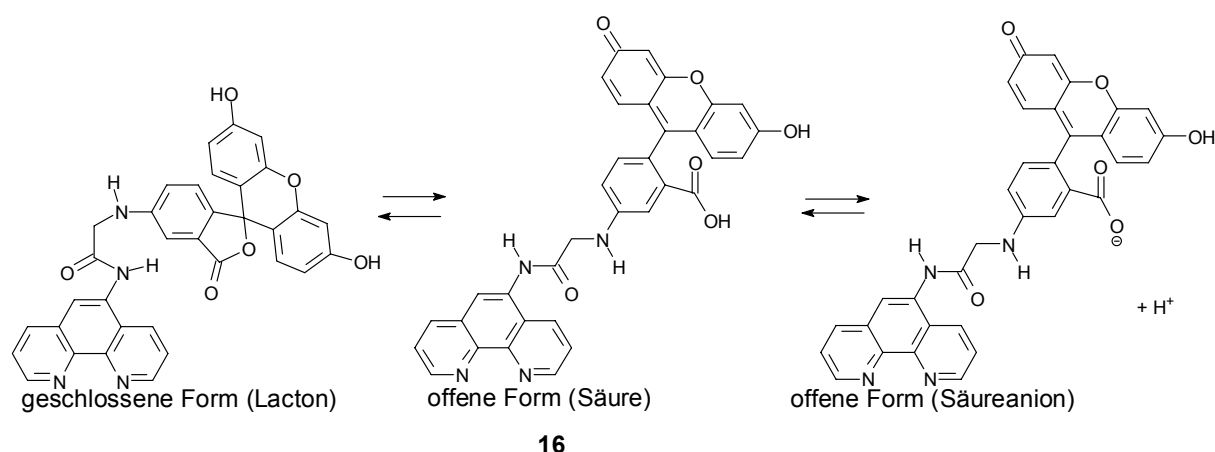
Dies wird verdeutlicht durch die Fluoreszenzspektren in Abb. 23 und Abb. 24.



**Abb. 23:** pH-Wert-abhängige Messung der Fluoreszenzspektren von **16** in gepufferter Lösung des jeweiligen pH-Werts. Die Anregungswellenlänge lag bei  $\lambda_{\text{exc}} = 495$  nm.



**Abb. 24:** Fluoreszenzintensität der Fluoreszenzsonde **16** einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{exc}} = 495$  nm und einer Emissionswellenlänge von  $\lambda_{\text{em}} = 524.6$  nm in Abhängigkeit vom pH-Wert der Messlösung.



In Abb. 24 steigt die Fluoreszenzintensität der Fluoreszenzsonde **16** bis zu einem pH-Wert von 7 mit steigendem pH-Wert stark an. Hierbei ergibt sich der erste Wendepunkt der Kurve bei etwa  $\text{pH} = 6.3$  aus der Gleichgewichtskonstanten der Tautomerie dieses Moleküls zwischen Lactonform und offener Form und dem  $\text{pK}_s$ -Wert der Carboxylgruppe des Moleküls **16**. Diese beiden Vorgänge, die Tautomerie des Moleküls und die Deprotonierung der Carboxylgruppe, hängen zusammen. Die Tautomerie ist stark vom pH-Wert der Lösung abhängig, da die offene Form bei höheren pH-Werten leichter deprotoniert werden kann und die Carboxylatform nicht im tautomeren Gleichgewicht mit der Lactonform steht.

### 5.2.3 EMISSIONSSPEKTRUM DER FLUORESZENZSONDE **16** IN ABHÄNGIGKEIT VON EISEN(II)-IONEN

Die Untersuchung der Stöchiometrie der Fluoreszenzsonde **16** ergab keine lineare Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Eisenkonzentration der jeweiligen Messlösung. Bis zu einem Verhältnis von 1:1 bei einem pH-Wert von 7.00 und einer Fluoreszenzsondenkonzentration von  $10.0 \mu\text{M}$  an **16** zeigte sich keine signifikante Änderung der Fluoreszenzintensität der Messlösung.

### 5.3 Vorgang der Fluoreszenzlöschung durch $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen

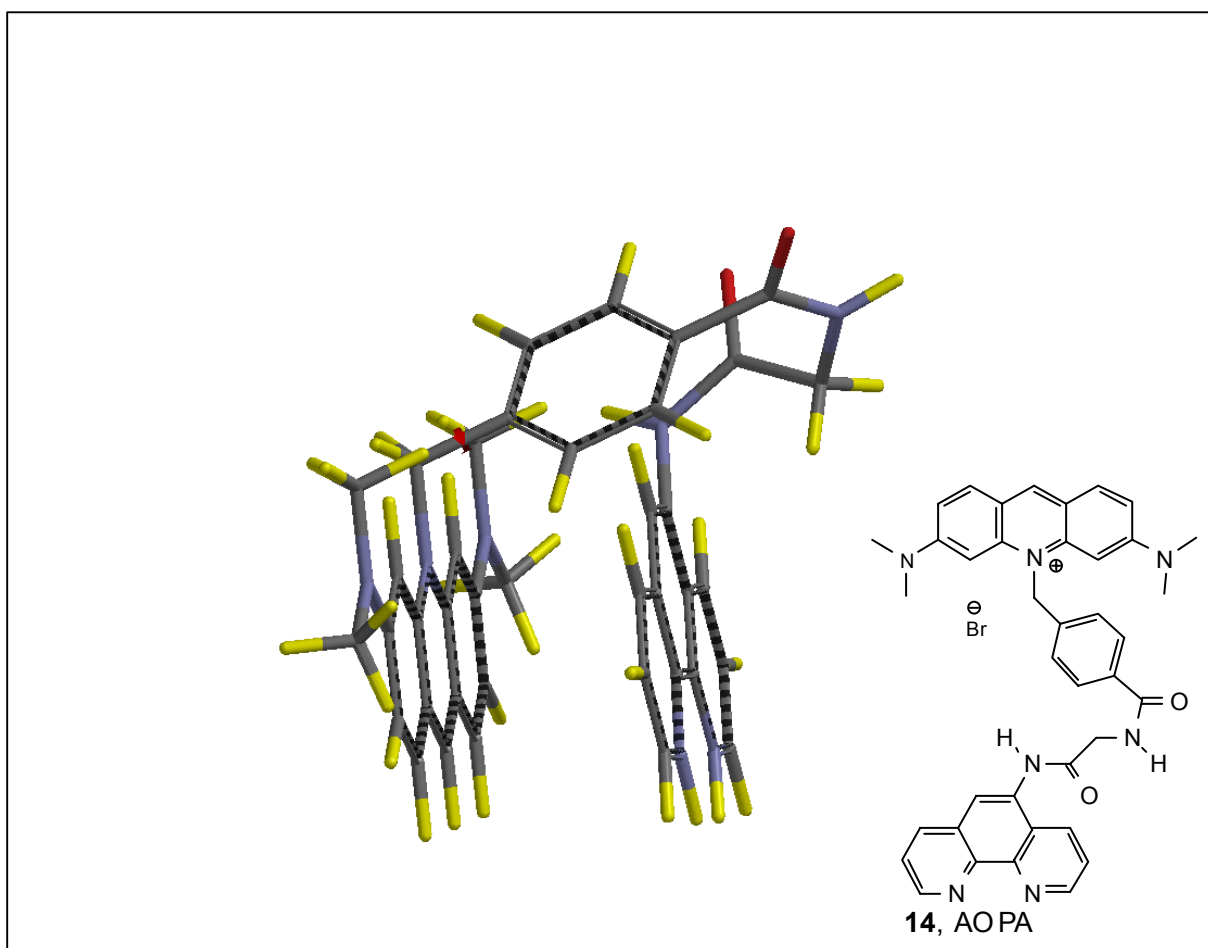
Da die chelatisierende Einheit 1,10-Phenanthrolin eine Bruttokomplexbildungskonstante von  $\log\beta_3 = 21.3^{[126]}$  mit  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen besitzt, muss man ab einer Eisenkonzentration von etwa  $3.33 \mu\text{M}$  bei einer Fluoreszenzsondenkonzentration von  $10 \mu\text{M}$  von einer vollständigen Komplexierung ausgehen. Dass es hierbei im chemischen System bei Fluoreszenzsonde **16** nicht zu einer Quenchung der Fluoreszenz kommt, könnte daran liegen, dass der Schweratomeffekt bei diesem Molekül nicht von der chelatisierenden Untereinheit zum fluorophoren System übertragen wird.

Dies kann über zwei Mechanismen geschehen. Die Fluoreszenz könnte über eine Konjugation des  $\pi$ -Systems, die den Schweratomeffekt von der chelatisierenden Untereinheit zum fluorophoren System überträgt, gequenchet werden. In diesem Falle wäre der Linker der Fluoreszenzsonde **14** dazu befähigt und die Fluoreszenzsonde **16** zu dieser Übertragung nicht befähigt, möglicherweise durch die Methylengruppe an Kohlenstoff 9 (siehe 8.7.11) im Linker des Moleküls **16**. Gegen diesen Weg spricht das Vorhandensein von zwei Methylengruppen im Linker der Fluoreszenzsonde **14**, welche 3:1-Stöchiometrie bei der Quenchung mit  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen zeigt.

Der andere Weg ist die Übertragung des Schweratomeffekts bei einer räumlichen Nähe des fluorophoren Systems zur chelatisierenden Untereinheit, welche an das Eisen gebunden ist, möglicherweise eine gestapelte Anordnung der beiden  $\pi$ -Systeme der aromatischen Systeme des Phenanthrolins und des Fluorophors. Ein ähnliches Phänomen ist literaturbekannt bei 2',7'-Dichlorfluorescein, bei dem die Konformation des Moleküls vom Fluorophor zu zwei quencheden Stickstoffatomen von Bedeutung ist. Diese sind je nach Konformation kooperativ und reversibel zu einer Quenchung des Fluorophors befähigt. Ändert man die Konformation dieser beiden Stickstoffatome zum Fluorophor, zeigt dieses eine Fluoreszenz.<sup>[150]</sup>

Abb. 25 zeigt die mögliche Konformation der Fluoreszenzsonde **14**, bei der eine Übertragung des Schweratomeffekts von der chelatisierenden Untereinheit, welche an ein  $\text{Fe}^{2+}$ -Ion gebunden ist, zum Fluorophor möglich

scheint. Die delokalisierten  $\pi$ -Systeme der beiden trizyklischen, aromatischen Systeme liegen hierbei genau übereinander. Diese Anordnung ist trotz der starren Phenylengruppe und der beiden starren Amidgruppen des Linkers möglich. Dies beruht hauptsächlich auf der freien Drehbarkeit um die Bindungsachsen der beiden Methylengruppen. Es ist auch von Bedeutung, dass der Linker neben der ausreichenden Flexibilität auch eine ausreichende Länge für eine solche Faltung aufweist. Das Molekül **16** ist zu einer solchen Faltung nicht in der Lage. Zum einen ist der Linker insgesamt kürzer und zum anderen besitzt er nur eine Methylengruppe, um deren Bindungsachsen eine freie Drehbarkeit möglich ist.



**Abb. 25:** Die Fluoreszenzsonde AOPA (**14**) in der bei der Fluoreszenzquenchung durch  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen wahrscheinlichen Konformation.

Die gezeigte Konformation wurde manuell ermittelt, da bei der Berech-



nung mit dem Programm „MacroModel 6.5“ ohne  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen die beiden dann freien Elektronenpaare der Ringstickstoffatome des Phenanthrolins einen starken Einfluss auf die Konformation nehmen. Berechnungen mit durch diese Ringstickstoffatome komplexierten Eisen(II)-Ionen waren nicht möglich, da Eisen mit diesem Programm nicht berechnet werden kann.

#### **5.4 Linearität der Kalibrierungen der Fluoreszenzintensität der Sonden 14 und 16 als Funktion der Konzentration und mögliche Störfaktoren**

Um den durch das Eisen(II) erzeugten Fluoreszenzabfall und somit die Eisen(II)-Konzentration zu quantifizieren ist eine Kalibrierung nötig, da aus der Fluoreszenzintensität nicht direkt eine Konzentration errechenbar ist. Um aus den hierbei erhaltenen Fluoreszenzintensitäten Eisenkonzentrationen bestimmen zu können, wird eine *ex situ*-Kalibrierung durchgeführt: Man bestimmt die Fluoreszenzintensität des freien Chelators; diese ist maximal, da keine Komplexbildung durch Eisen(II)-Ionen erfolgen kann. Gibt man nun schrittweise Eisen(II) in Form einer wässrigen Lösung des Mohr'schen Salzes zu, erhält man eine Kalibrierungsgerade. Hierzu muss gewährleistet sein, dass die Abhängigkeit zwischen Fluoreszenzintensität und Fluoreszenzfarbstoffkonzentration linear ist. Dies ist nur der Fall, wenn die Extinktion  $E$  (mit  $E = \varepsilon cd$ , wobei  $\varepsilon$  der molare dekadische Extinktionskoeffizient ist) kleiner als 0.01 ist, da dann der Faktor  $10^{-\varepsilon cd}$  deutlich größer ist als 1. Für diesen Fall wird die 1 vernachlässigt und es gilt:

$$F = \Phi_F I_0 (1 - 10^{-\varepsilon cd}) \rightarrow F = 2.3 \Phi_F I_0 \varepsilon cd \quad (\text{für } E \leq 0.01) \quad (11)$$

Diese Gleichung<sup>[122]</sup> beschreibt eine lineare Funktion, so dass die Kalibrierung in diesem Extinktionsbereich eine Gerade ergibt. Diese geringe Extinktion erreicht man durch eine geringe Konzentration  $c$  und vor allem eine geringe Schichtdicke  $d$ , welche durch das konfokale System des ver-

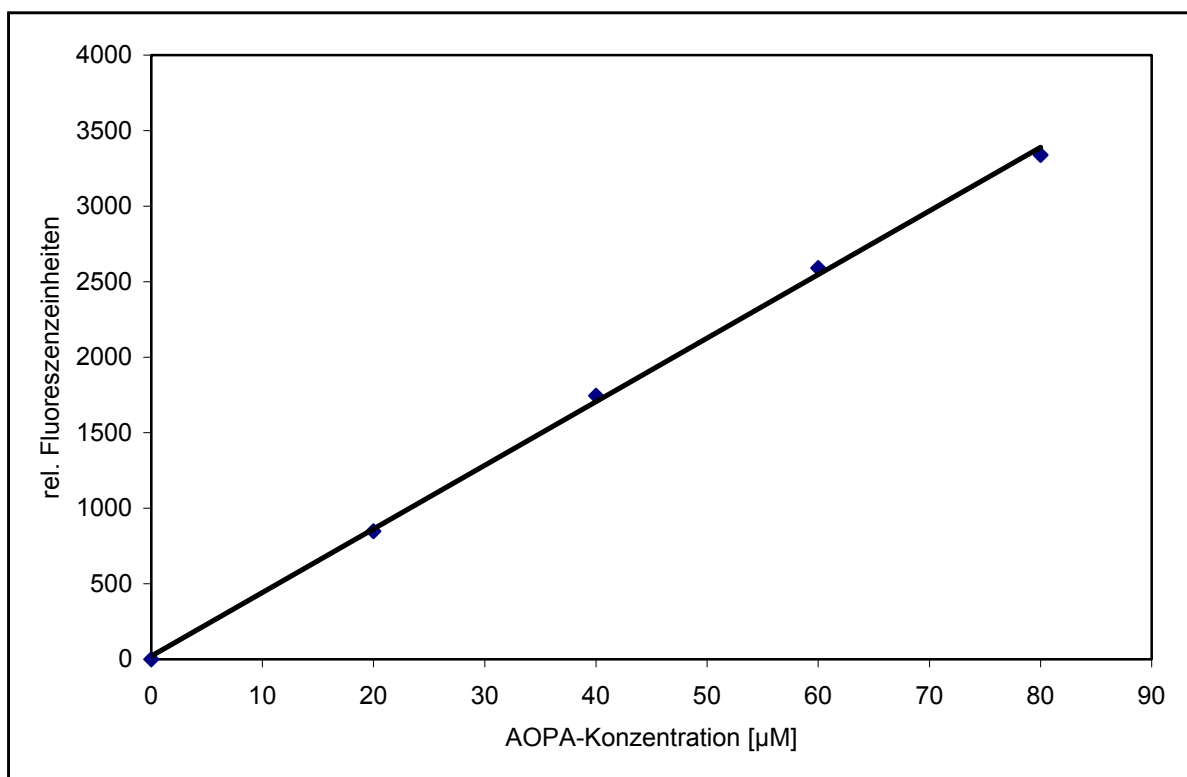
wendeten Laser-Scanning-Mikroskopes erreicht wird. Sowohl die geringe Konzentration, als auch die geringe Schichtdicke führen zu dem positiven Nebeneffekt, dass die Selbstquenchung durch Reabsorption eines bereits von einem Fluoreszenzsondenmolekül emittierten Photons gering gehalten wird. Auch das bereits beschriebene Phänomen der Konzentrationslöschung wird durch eine geringe Farbstoffkonzentration minimiert, so dass die Linearität der Kalibrierung gewährleistet bleibt. Dieses wurde mittels Kalibrierungsmessungen überprüft

Auch die Kalibrierungsmessungen wurden in Tris/HCl gepufferter Lösung bei einem pH-Wert von 7.2 und bei einer Temperatur von 37°C mittels quantitativer, konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie durchgeführt.

Es wurden die gleichen Mikroskop-, Laser- und Detektoreinstellungen sowie die gleiche Schichtdicke gewählt wie bei den zellulären Messungen (siehe unten).

#### 5.4.1 KALIBRIERUNG DER FLUORESZENZSONDE **14**

Abb. 26 zeigt den linearen Verlauf der Fluoreszenzintensität der Fluoreszenzsonden **14** bis zu einer Konzentration von 80  $\mu\text{M}$ . In diesem Bereich kommt also eine Eigenlöschung der Fluoreszenzsondenmoleküle nicht zum Tragen. Bei Fluoreszenzsonde **14** war eine lineare Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Konzentration des Farbstoffs bei den überprüften, relevanten Bedingungen gegeben.



**Abb. 26:** Lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität der Sonde **14** von der Konzentration des Farbstoffs bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ , die Emissionswellenlänge lag bei  $\lambda_{\text{em}} \geq 505 \text{ nm}$ . Gemessen wurde in Tris/HCl bei pH 7.2 mit 0.18% SDS bei 37°C. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

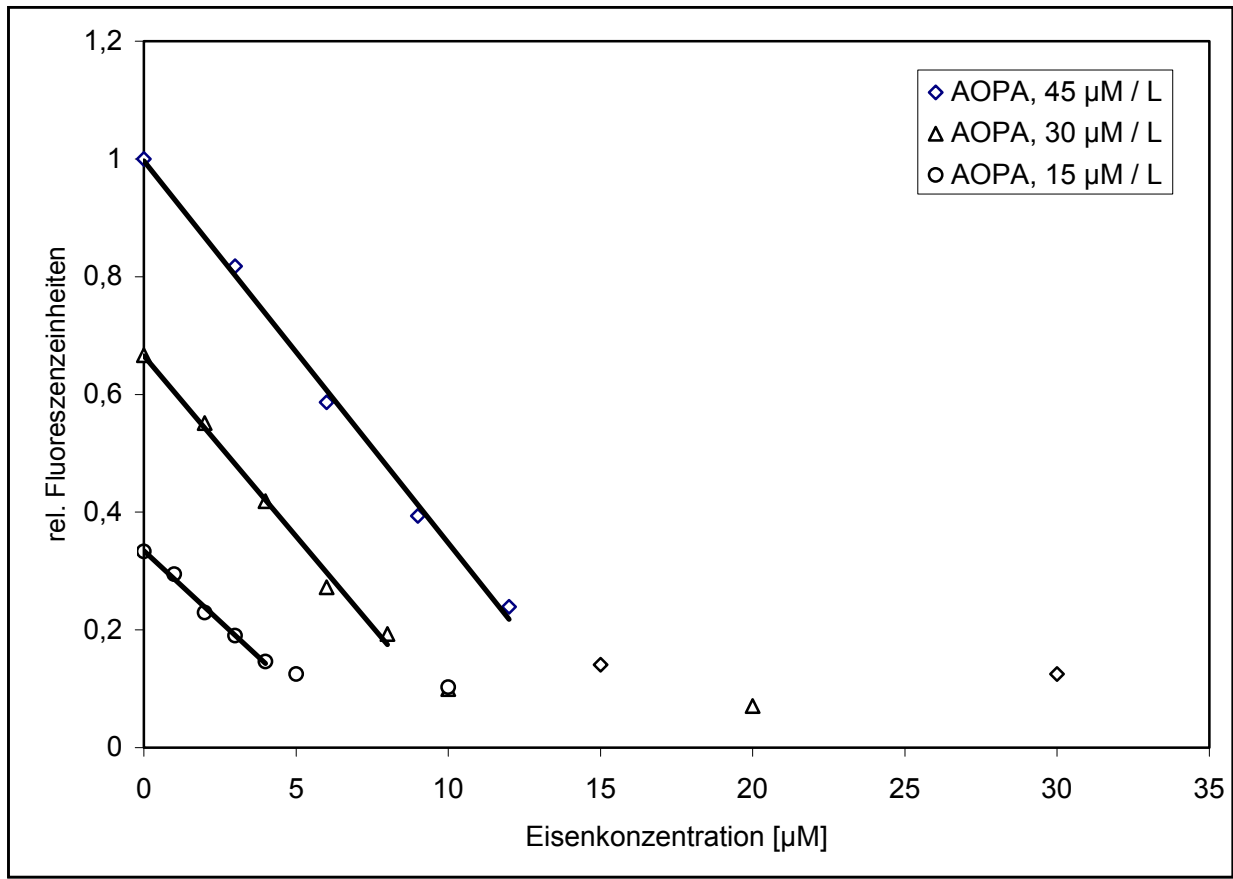
Die Überprüfung der Konstanz der Bindungsstöchiometrie zwischen Eisen(II)-Ionen und dem jeweiligen Chelator von 3:1 wurde ebenfalls in Tris/HCl gepufferter Lösung bei 37°C und einem pH-Wert von 7.2 durchgeführt. Eisen(II)-Ionen in Form einer wässrigen Lösung aus Mohr'schem

Salz wurde zu den Farbstofflösungen der relevanten, im jeweiligen Zellkompartiment nach der Akkumulation vorherrschenden Konzentrationen titriert. Mit konstanter Anregungswellenlänge wurde die Fluoreszenzintensität der Lösungen nach wenigen Minuten quantifiziert, da solche Komplexbildungen innerhalb weniger Sekunden ablaufen, d. h. ein vollständiger Umsatz zum Eisen(II)-Chelator-Komplex war somit gewährleistet.

Für die Fluoreszenzsonde **14** gilt eine - für 1,10-Phenanthrolin übliche - 3:1-Stöchiometrie bezüglich Eisen(II)-Ionen; bei einem molaren Verhältnis von 3 Teilen Chelator zu einem Molekül Eisen(II) ist der Fluoreszenzfarbstoff vollständig bei jeder gewählten Farbstoffkonzentration gequenchet. Die Struktur dieses Komplexes ist daher oktaedrisch.

Abb. 27 zeigt diese 3:1-Stöchiometrie auch bei der Kalibrierung am Laser-Scanning-Mikroskop bei unterschiedlich Fluoreszenzsondenkonzentrationen.

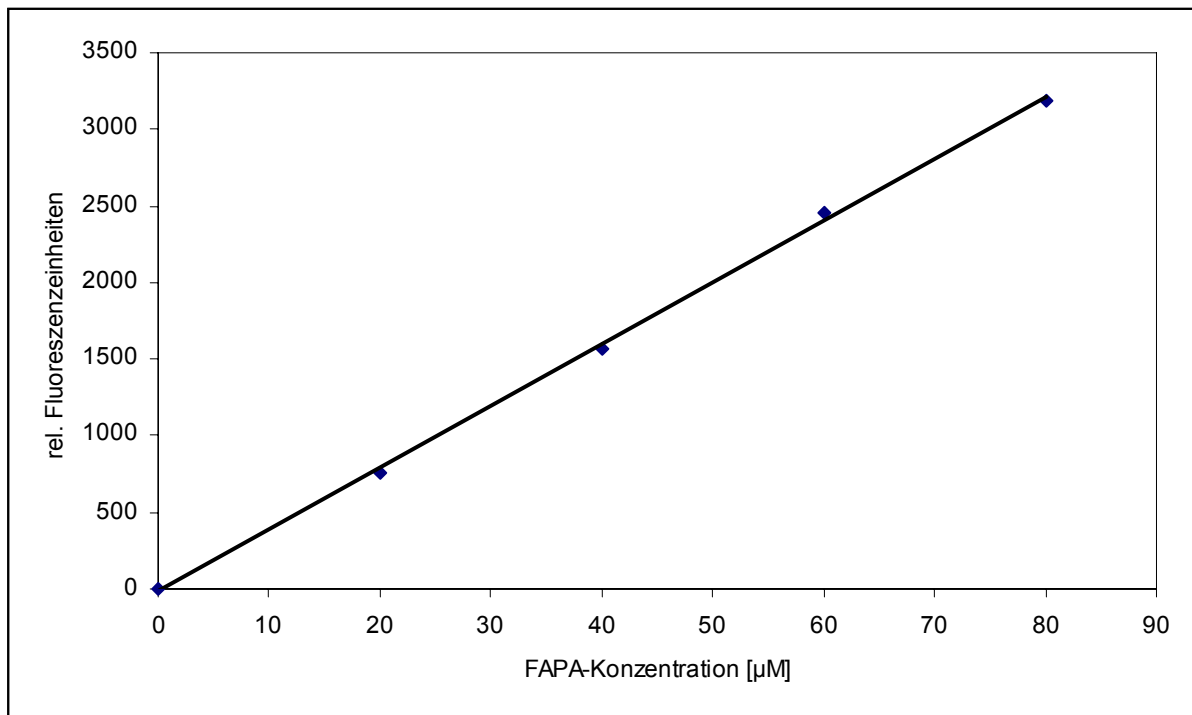
Zur Überprüfung der Bindungsstöchiometrie verwendet man die halbmaximale Fluoreszenzintensität der Fluoreszenzsonde **14** (siehe Abb. 27). Von diesem Punkt auf der jeweiligen Geraden fällt man das Lot auf die Abszisse und erhält dort den tatsächlichen Wert der Eisen(II)-konzentration, der für die halbmaximale Quenchung benötigt wird. Diesen vergleicht man mit den theoretischen Werten für eine halbmaximale Quenchung, dies ist auf Grund der 3:1-Stöchiometrie ein Sechstel der Farbstoffkonzentration. Der gemessene Wert beträgt bei einer Farbstoffkonzentration von 45  $\mu\text{M}$  7.6  $\mu\text{M Fe}^{2+}$  (Theorie 7.5  $\mu\text{M Fe}^{2+}$ ). Bei einer Konzentration an **14** von 30  $\mu\text{M}$  5.3  $\mu\text{M Fe}^{2+}$  (Theorie 5.0  $\mu\text{M Fe}^{2+}$ ) und bei einer Farbstoffkonzentration von 15  $\mu\text{M}$  2.3  $\mu\text{M Fe}^{2+}$  (Theorie 2.5  $\mu\text{M Fe}^{2+}$ ).



**Abb. 27:** *Ex situ*-Kalibrierung der Fluoreszenzsonde **14** mit  $\text{Fe}^{2+}$  in Tris/HCl-gepufferter Lösung bei  $\text{pH} = 7.2$  mit 0.18% SDS bei  $37^\circ\text{C}$  am Laser-Scanning-Mikroskop bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ , die Emissionswellenlänge lag bei  $\lambda_{\text{em}} \geq 505 \text{ nm}$

#### 5.4.2 KALIBRIERUNG DER FLUORESZENZSONDE **16**

Abb. 28 zeigt den linearen Verlauf der Fluoreszenzintensität der Fluoreszenzsonden **16** bis zu einer Konzentration von 80  $\mu\text{M}$ . Auch bei dieser Fluoreszenzsonde kommt in diesem Bereich eine Eigenlöschung der Fluoreszenzsondenmoleküle nicht zum Tragen. Bei Fluoreszenzsonde **16** war eine lineare Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Konzentration des Farbstoffs bei den überprüften, relevanten Bedingungen gegeben.



**Abb. 28:** Lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität der Sonde **16** von der Konzentration des Farbstoffs bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ , die Emissionswellenlänge lag bei  $\lambda_{\text{em}} \geq 505 \text{ nm}$ . Gemessen wurde in Tris/HCl bei pH 7.2 mit 0.18% SDS bei 37°C. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

## 6 Untersuchungen der Fluoreszenzsonden in der Zelle

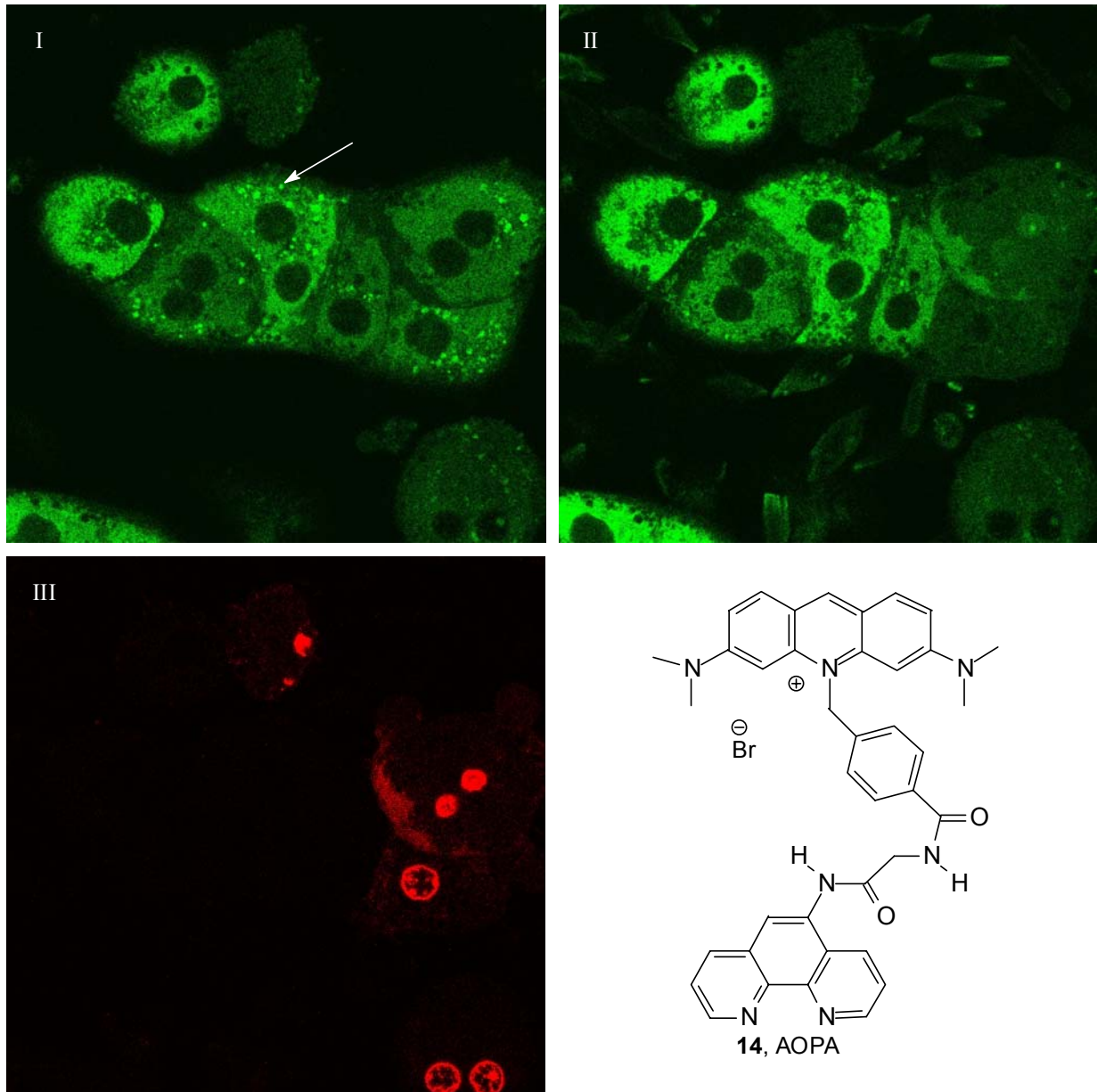
Die folgenden Untersuchungen zur subzellulären Verteilung der Fluoreszenzsonden und zum quantitativen Nachweis chelatisierbaren Eisens innerhalb des - der Akkumulation der Sonden - entsprechenden Zellkompartiments fanden an Hepatozyten und Leberendothelzellen von Ratten statt. In Analogie zur Methode von Petrat *et al.* kam hierbei die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie zum Einsatz.

### 6.1 Die Akkumulation der Fluoreszenzsonden in den Zellkompartimenten

Es wurde die Verteilung der Fluoreszenzsonden auf subzellulärer Ebene vitaler Zellen untersucht, wobei das Ziel bei der Entwicklung eines solchen Farbstoffes ist, dass dieser nach Möglichkeit selektiv in nur einem diskreten Zellkompartiment in ausreichender Endkonzentration akkumuliert. Das Lokalisationsverhalten des jeweiligen Farbstoffes lässt sich optisch verfolgen. Um eine maximale und nur durch die Verteilung der Fluoreszenzsonde beeinflusste (und nicht von der jeweiligen Eisenkonzentration des entsprechenden Zellkompartiments abhängige) Fluoreszenzintensität zu erreichen, wurde deren eisenkonzentrationsabhängige Fluoreszenzquenchung mittels Zugabe eines Entquencher aufgehoben. Benutzt wurden die Entquencher PIH, 2,2'-Dipyridyl (DPD) und 1,10-Phenanthrolin. PIH besitzt eine Bruttokomplexbildungskonstante von  $\log \beta_2 (\text{Fe}^{2+}) = 34.0$  bei pH 7.4, ist nicht toxisch und ausreichend lipophil für Membrandurchtritte.

#### 6.1.1 INTRAZELLULÄRE VERTEILUNG DER FLUORESZENZSONDE **14**

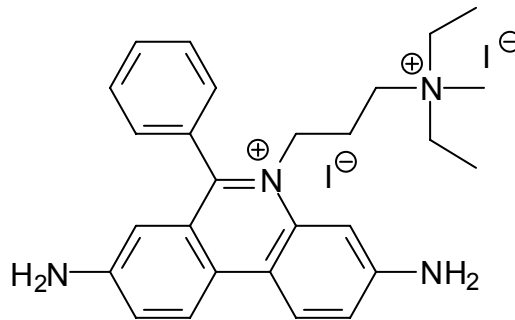
Zur Untersuchung der subzellulären Verteilung wurden Rattenhepatozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff **14** beladen um mit dem Entquencher PIH die maximale Fluoreszenz zu finden.



**Abb. 29:** Intrazelluläre Verteilung von **14** in kultivierten Rattenhepatozyten. Es ist eine Akkumulation in den Mitochondrien und (vor Entquenchung in Bild I) möglicherweise den Lysosomen (Pfeil) zu erkennen. Aufnahme I (30 min Inkubationszeit, 20 min Nachinkubation, 10.0  $\mu\text{M}$  Beladungskonzentration, HBSS, 37°C,  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 505 \text{ nm}$ ) zeigt die Fluoreszenz der Fluoreszenzsonde **14**, Aufnahme II zeigt die Fluoreszenz von AOPA, nachdem mit PIH entquenchet wurde (Beladungszeit 30 min, gleiche Einstellungen wie II). In Bild III ( $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 560 \text{ nm}$ ) ist nach Beladung mit Propidiumiodid (5  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , Beladungszeit 5 min) zu erkennen, dass die Belastung mit dem Indikator und/oder dem Laserlicht zum Absterben einiger Zellen geführt hat (rechte Bildhälfte).

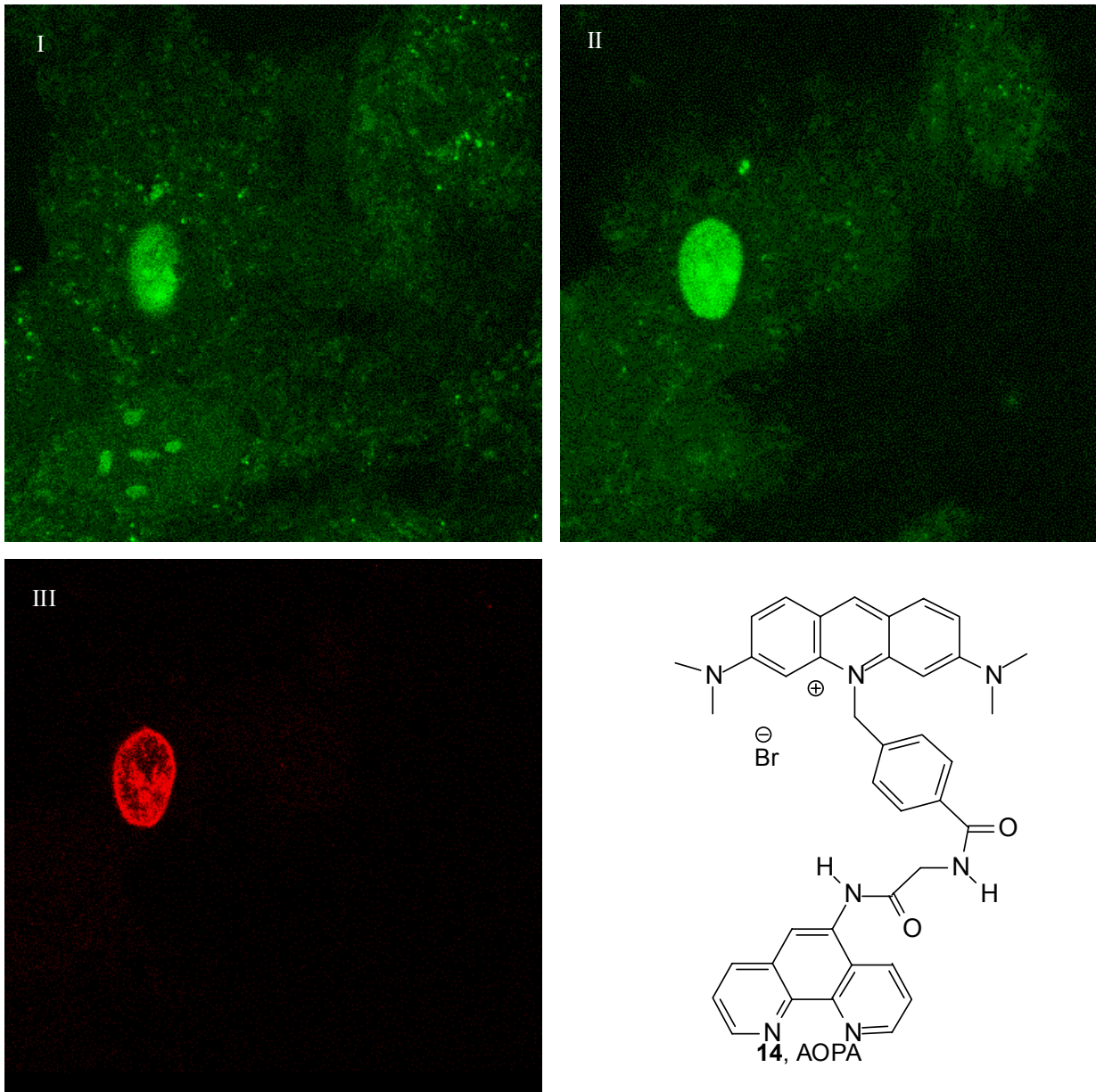


Bei dieser Vorgehensweise war zu erkennen, dass hauptsächlich die Mitochondrien angefärbt wurden, aber auch einige Lysosomen und geringfügig auch die Zellkerne (Abb. 29). Starben Zellen, so stieg die Fluoreszenz von **14** der betroffenen Kerne um ein Vielfaches an.



Propidiumiodid

Dies wurde durch Beladung mit dem Farbstoff Propidiumiodid (PI) überprüft, der ausschließlich in Kernen toter Zellen akkumuliert, da er bei lebendigen Zellen nicht durch die Plasmamembran in die Zelle und somit auch nicht in die Zellkerne gelangen kann. Die Erklärung für das Akkumulationsverhalten der Fluoreszenzsonde **14** liegt in dessen Struktur: durch die positive Ladung am Ringstickstoff des Acridingerüsts wird das Molekül durch das stark negative Membranpotential der Mitochondrienmembran von diesen aktiv angezogen. Diese Anziehung und die anschließende Akkumulation sind vermutlich so stark, dass nur noch ein kleiner Anteil der **14** - Moleküle in den Kern gelangen können. Im Kern können die Moleküle aufgrund der Interkalationseigenschaften der Acridinorangeuntereinheit zwar auch akkumulieren, der Anteil dieser Moleküle ist jedoch klein gegen den Anteil der Moleküle, die in den Mitochondrien akkumulieren. Stirbt eine Zelle bei den Untersuchungen, verlieren die Mitochondrien bei einem frühen Stadium des Zelltods ihr Membranpotential. Die dort vorhandenen Moleküle lecken aus und können nun im Kern akkumulieren, was zu einem starken Anstieg der Fluoreszenzintensität in diesem Kompartiment bei toten Hepatozyten führt (siehe Abb. 30).



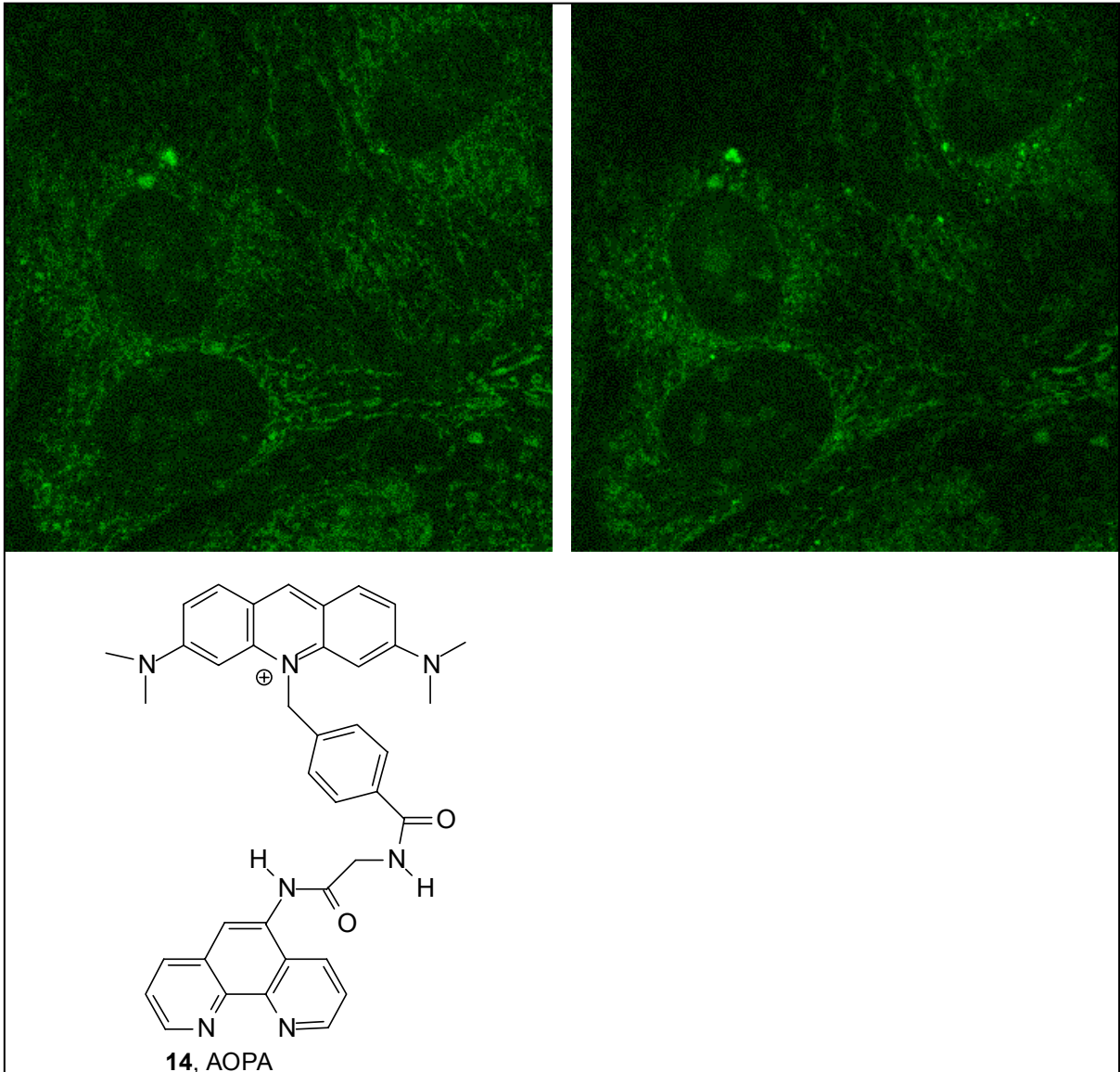
**Abb. 30:** Intrazelluläre Verteilung von **14** in kultivierten Rattenhepatozyten. Es ist die Akkumulation im Zellkern einer sterbenden Zelle zu erkennen. Die Aufnahmen I und II (30 min Inkubationszeit, 15 min. Nachinkubation, 10.0  $\mu\text{M}$  Beladungskonzentration, HBSS, 37°C,  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 505 \text{ nm}$ ) zeigt die zunehmende Fluoreszenz der Fluoreszenzsonde **14** im Zellkern. In Bild III ist nach Beladung mit Propidiumiodid (Beladungszeit 5 min,  $\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 560 \text{ nm}$ ) zu erkennen, dass es sich bei dem dort rotgefärbten Objekt wirklich um den Kern einer toten Zelle handelt.

Durch die ungünstige Verteilung in den Zellen erscheint eine Anwendung in pathobiochemischen Fragestellungen wenig sinnvoll.

Dieser Sachverhalt zeigt ein generelles Problem beim Design von Fluoreszenzsonden für den Zellkern: wählt man zur Zielsteuerung eine Untereinheit, welche in der DNA interkalieren soll, so benötigt diese vermutlich eine positive Ladung. Zum einen wird diese Ladung zur elektrostatischen Wechselwirkung mit dem anionischen Phosphatrückgrat der DNA benötigt, zum anderen, um mit dem HOMO der Purinbasen ein neues, ausgedehntes HOMO zu bilden. Positive Moleküle akkumulieren aber auch auf Grund des negativen Membranpotentials der Mitochondrien in diesem Kompartiment. Eine mögliche Lösung dieses Problems wäre der Einsatz eines zwitterionischen Moleküls oder der Einsatz eines *minor groove binders*, anstelle eines Interkalators.

Die Akkumulation der Fluoreszenzsonde in Lysosomen wird möglicherweise durch die Dimethylaminogruppen der Acridinorangeuntereinheit der Sonde bewirkt. Diese sind für gewöhnlich relativ basisch und müssten also für eine starke Akkumulation in den Lysosomen sorgen.

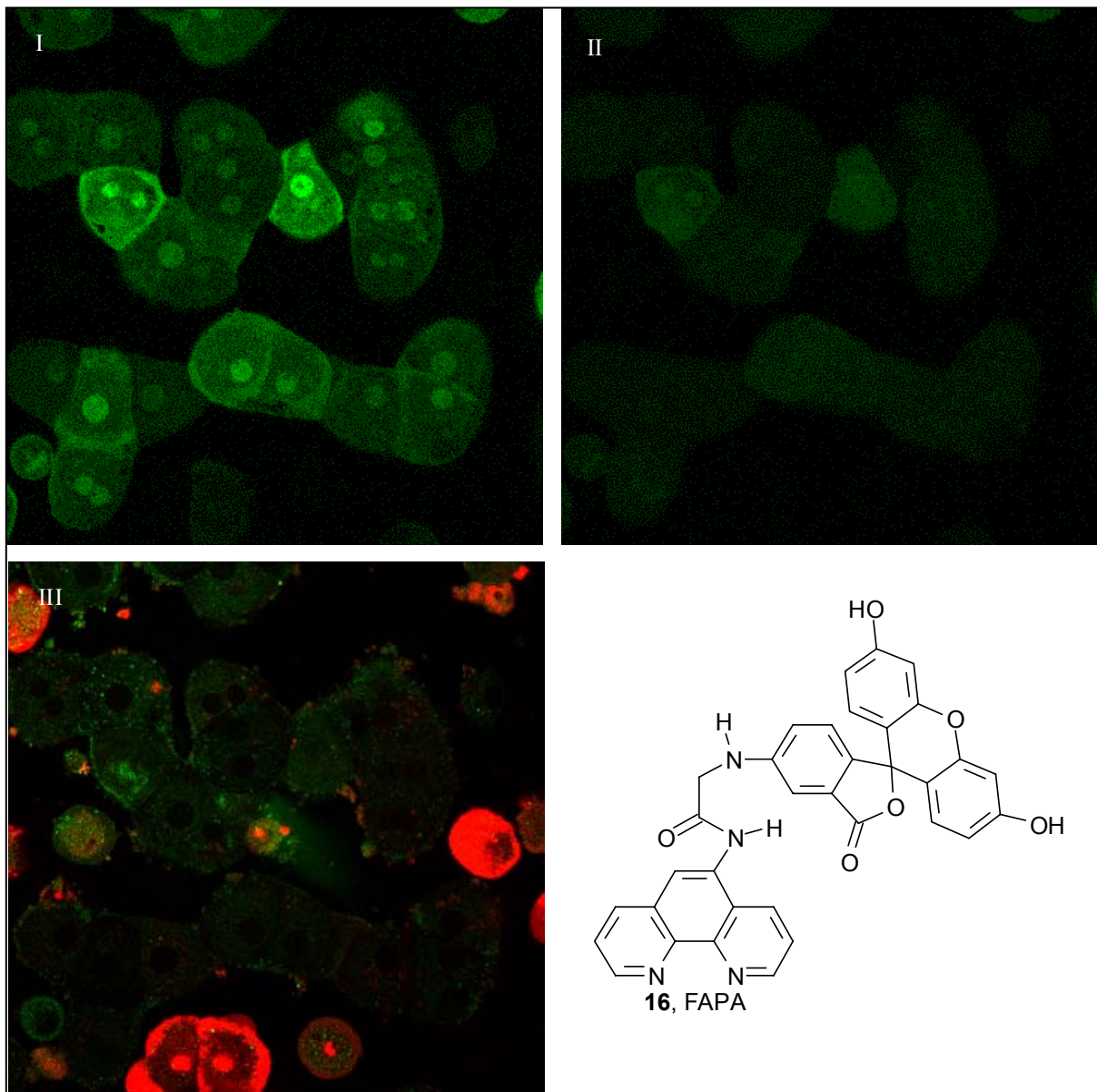
Abb. 31 zeigt die Lokalisation der Sonde **14** in Endothelzellen. Auch hier ist der Farbstoff hauptsächlich in den Mitochondrien und in einigen Lysosomen lokalisiert. Bei diesen Zellen sind allerdings auch die Zellkerne, insbesondere die Nucleoli lebender Zellen mit intaktem mitochondrialen Membranpotential gefärbt. Dieses Phänomen kann damit erklärt werden, dass Hepatozyten reicher an Mitochondrien sind, so dass die geringere Anzahl an Mitochondrien in den Endothelzellen eine geringere Konkurrenz zum Zellkern bedeutet. Somit gelangt bei den Endothelzellen ein größerer Anteil der Fluoreszenzsonde in den Zellkern.



**Abb. 31:** Intrazelluläre Verteilung von **14** in kultivierten Rattenleberendothelzellen. Es ist die Akkumulation in den Mitochondrien, den Lysosomen und den Zellkernen zu erkennen. Aufnahme I (30 min Inkubationszeit, 20 min Nachinkubation, 10.0  $\mu\text{M}$  Beladungskonzentration, HBSS, 37°C,  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 505 \text{ nm}$ ) zeigt die Fluoreszenz der Fluoreszenzsonde AOPA (**14**), Aufnahme II zeigt die Fluoreszenz, nachdem mit DPD entquencht wurde (Beladungszeit 30 min).

### 6.1.2 INTRAZELLULÄRE VERTEILUNG DER FLUORESZENZSONDE **16**

Fluoreszenzsonde **16** wurde konzipiert, um sich in den Lysosomen anzureichern. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein. Ohne die Zugabe des Entquenchers DPD ist eine Lokalisation der freien Sonde **16** bei Hepatozyten hauptsächlich im Zytosol und in den Zellkernen zu finden (Abb. 32).



**Abb. 32:** Intrazelluläre Verteilung von **16** in kultivierten Rattenhepatozyten. Es ist die Akkumulation im Zytosol und im Zellkern zu erkennen. Aufnahme I (30 min Inkubationszeit, 20 min Nachinkubation, 10.0  $\mu\text{M}$  Beladungskonzentration, HBSS, 37°C,  $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} \geq 505 \text{ nm}$ ) zeigt die Fluoreszenz der Fluoreszenzsonde, Aufnahme II zeigt die Fluoreszenz von **16**, nachdem mit DPD entquencht wurde (Beladungszeit 10 min). In Bild III ist zu nach Beladung mit Propidiumiodid (Beladungszeit 5 min) zu erkennen, dass die diffuse FAPA-Fluoreszenz nicht von toten Zellen stammt (Bildrand).

Bemerkenswert ist, dass nach dem Entquenchen der Fluoreszenz die erzielbare Gesamtfluoreszenz sinkt. Die Ursache ist unbekannt.

Auch die Fluoreszenz im Zellkern sinkt bei dem Vorgang der Entquenchung. Um zu zeigen, dass die Effekte nicht darauf beruhen, dass die entsprechenden Zellen während der Untersuchungen sterben, wurden Aufnahmen nach Beladung der Zellen mit Propidiumiodid gemacht (Abb. 32, III). Diese Aufnahmen zeigen, dass abgestorbene Zellen keine Fluoreszenz der Sonde **16** mehr zeigen und dass die Zellen in Abb. 32 (II) nicht tot sind.

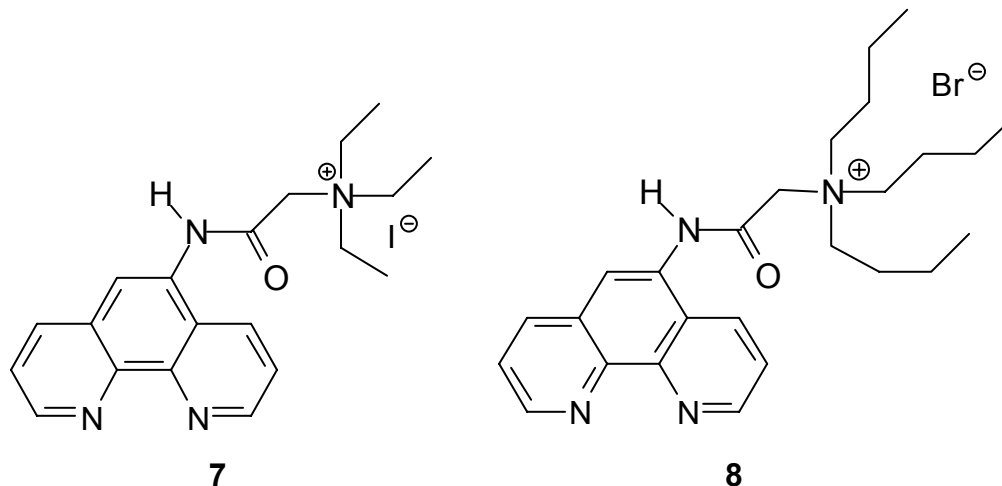
Der Einsatz von **16** in Endothelzellen zeigte keine Fluoreszenz, auch nicht nach Entquenchung mit DPD oder 1,10-Phenanthrolin.

Die Fluoreszenzsonde ist auf Grund dieser Ergebnisse und auch auf Grund der Ergebnisse der pH-Wert-abhängigen Messungen und der stöchiometrischen Messungen mit  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen im chemischen System nicht zur Anwendung in quantitativen Untersuchungen geeignet. Es ist aber zu bemerken, dass **16** im biologischen System vollständig mit  $\text{Fe}^{2+}$ /8-Hydroxychinolin quencherbar war.

Dieses erste Ergebnis zeigt, dass eine sinnvolle Anwendung in pathobiochemischen Fragestellungen nicht zu erwarten ist.

## 7 Zusammenfassung

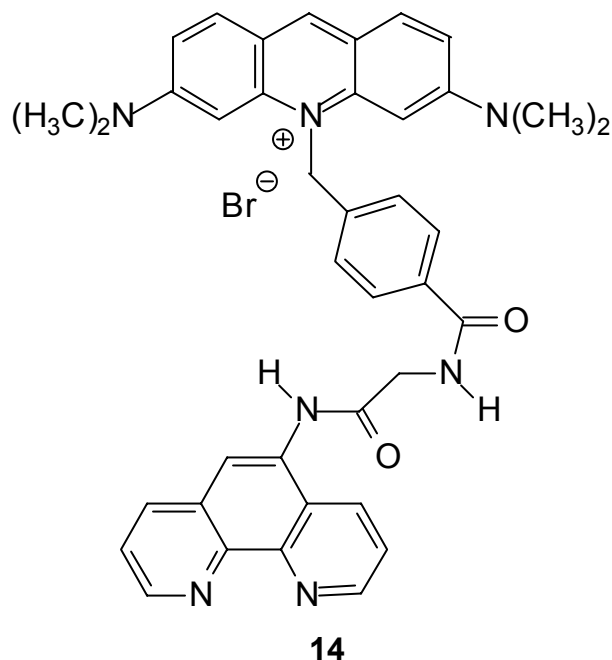
Die ersten im Laufe dieser Arbeit synthetisierten Zielmoleküle waren zwei kationische Entquencher, **7** und **8**.



Sie wurden synthetisiert, um bereits zugängliche, mitochondrienspezifische Fluoreszenzsonden zu entquenchen. Die Moleküle **7** und **8** akkumulierten nicht in Mitochondrien. Hierdurch wurde gezeigt, dass für eine Membranpermeabilität die positive Ladung mesomer verteilt sein muss.

Es wurde gezeigt, dass Pyridin und Acridin zu unreaktiv für eine Kupplung mit **6** sind.

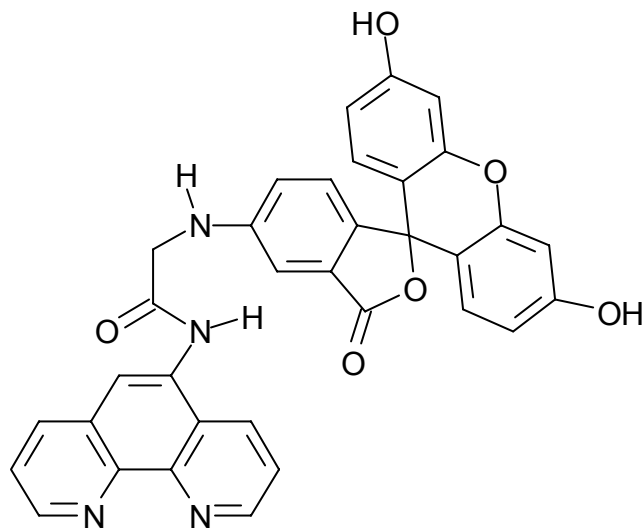
Auch die nächste Synthese verlief über Aminophenanthrolin **3**, welches an **13** - einen kationischen, aktivierten Ester, der auch über eine Menschutkin-Reaktion hergestellt wurde - über eine  $S_N2$  Reaktion gekuppelt werden sollte.



Dies war nicht erfolgreich, da die Aminofunktion des Aminophenanthrolins zu unreaktiv ist. So wurde der Syntheseweg über eine Aminolyse des Bromacetamids **6** zum Alkylamin **13** gewählt und erfolgreich durchgeführt. Molekül **13** wurde mit **12** zu **14** gekuppelt.

Die Zellversuche zeigten in Hepatozyten und in Endothelzellen eine eher unspezifische Akkumulation in den Mitochondrien und in Lysosomen. Des Weiteren akkumulierte der Farbstoff in Kernen toter Zellen, welche - in nicht unbeträchtlicher Zahl - durch Bestrahlung mit Laserlicht der Wellenlänge 488 nm eine Apoptose durchliefen. Die Kerne lebender Zellen wurden kaum angefärbt.

Für den Fluoreszenzindikator **16** wurde als Fluorophor das Fluorescein gewählt.

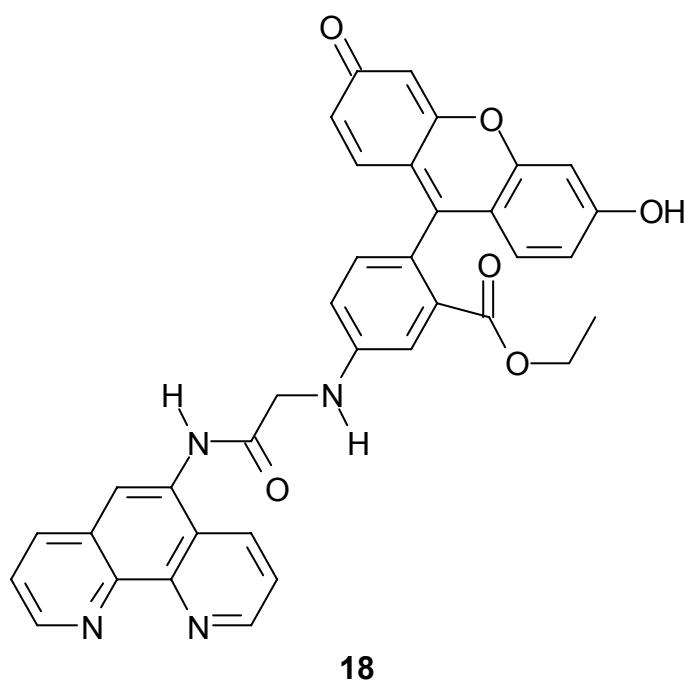
**16**

Zellversuche zeigten eine Verteilung in den Zellkern und ins Zytosol. Die Fluoreszenz war stark pH-abhängig. Eine Überprüfung der 3:1 - Stöchiometrie ergab, dass die Fluoreszenzsonde im chemischen System nicht stöchiometrisch durch Eisen quencherbar ist. Der bei Fluoreszenzsonde **16** verwendete Linker ist wahrscheinlich ungeeignet für die Synthese von Fluoreszenzsonden zum quantitativen Nachweis von Eisen.

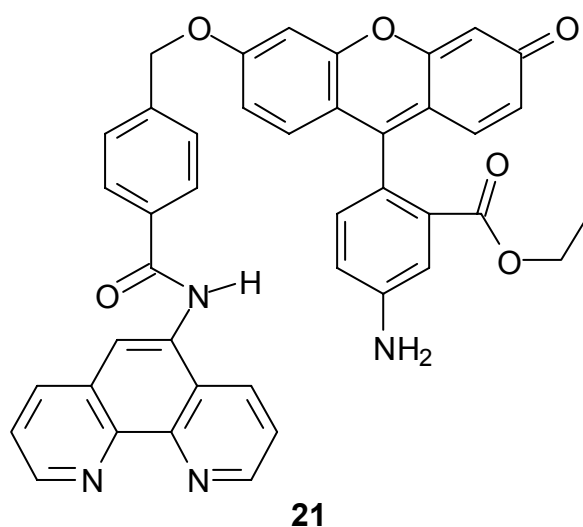
Um eine pH-unabhängige Fluoreszenzintensität zu erreichen und um die Akkumulation in den Lysosomen zu verbessern, wurde - ausgehend von 5-Aminofluorescein - die Säuregruppe mit Schwefelsäure / Ethanol zur



Verbindung **17** verestert. Somit liegt nur noch eine Form des Stoffes vor, nämlich die fluoreszenzfähige, offene Form. Die Verbindung 5-Aminoethylfluorescein **17** wurde für die Synthese der Fluoreszenzsonde 5-Ethylfluorescein-5-aminoacetamid-1,10-phenanthrolin **18** eingesetzt. Diese Sonde war in einem vertretbaren Aufwand nur in 90%iger Reinheit zu erhalten. Da dieses Produkt in zellulären Versuchen an Hepatozyten nur diffus im Zytosol akkumulierte, wurde von weiteren Reinigungen abgesehen.



Eine andere Variante dieser Fluoreszenzsonde mit einem anderen Linker (eine zusätzliche Phenylengruppe) sollte die Fluoreszenzsonde **21** werden.



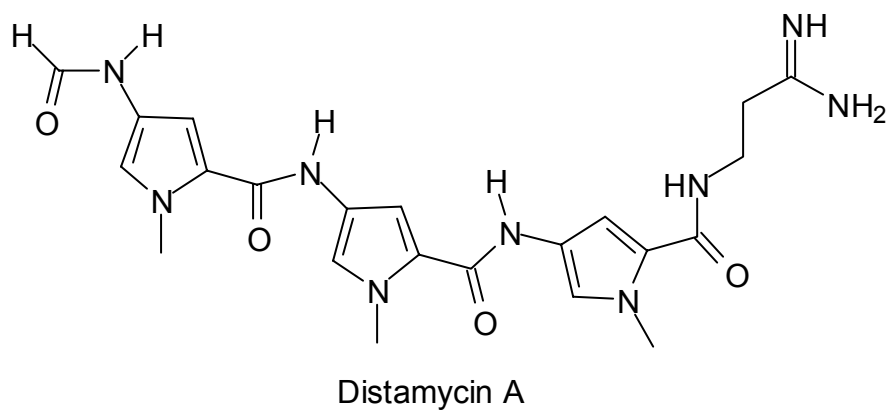
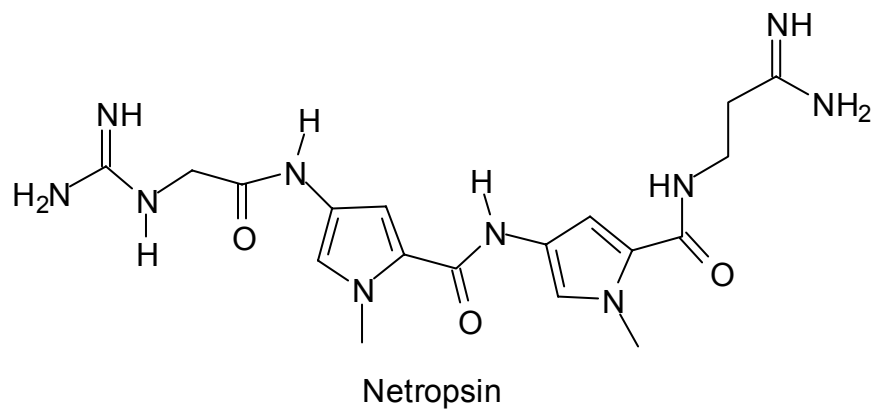
Sie wurde aus dem Chelator 4-(Brommethyl)-*N*-(1,10-phenanthrolin-5-yl)benzamid (**19**) und 5-Aminoethylfluorescein **15** hergestellt. Die Charakterisierung per NMR-Spektroskopie zeigte allerdings, dass die Kupplung nicht, wie gewünscht, an der Aminogruppe des Fluorophors (**15**) stattfand, sondern an dessen Hydroxylgruppe. Eine Fluoreszenz des Stoffes trat somit auf Grund der Störung des fluorophoren Systems nicht auf.

## 8 Ausblick

Die in dieser Arbeit synthetisierten Fluoreszenzsonden stellen die ersten Schritte auf dem Weg zu Fluoreszenzsonden dar, die spezifisch in den Kompartimenten Zellkern und Lysosom akkumulieren sollten.

Ausgehend von den in der vorliegenden Arbeit gemachten Synthesen, lassen sich einige vielversprechende Wege zur Darstellung neuer Fluoreszenzsonden skizzieren.

Das Problem der Akkumulation der Interkalatoren in den Mitochondrien, statt in den Zellkernen, könnte auf zwei Arten gelöst werden. Zum einen könnte man ein zwitterionisches Molekül synthetisieren, bei dem eine negative Ladung die für eine Interkalation benötigte positive Ladung kompensieren würde. Das Molekül interkaliert wegen der positiven Ladung in der DNA, eine Akkumulation in den Mitochondrien wäre auf Grund der Neutralität des Moleküls nicht wahrscheinlich. Eine weitere Möglichkeit wäre die Zielsteuerung zur DNA mittels eines „*minor groove binders*“, wie zum Beispiel Netropsin oder Distamycin A. Dieser müsste keine positive Ladung tragen und würde somit auch nicht in den Mitochondrien akkumulieren.

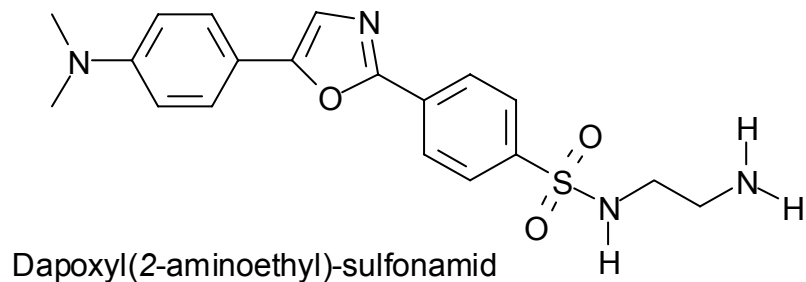


Die Akkumulation in den Lysosomen beruht wahrscheinlich auf der Basizität der Dimethylaminogruppen der Acridinorangeuntereinheit. Da diese für das fluorophore System des Acridinorange von Bedeutung sind, müsste auf den Einsatz von Acridinorange für den Einsatz im Zellkern verzichtet werden.

Bei der lysosomalen Fluoreszenzsonde **16** zeigen sich drei große Probleme: sie akkumuliert nicht spezifisch in Lysosomen, sie zeigt keine Quenchung der Fluoreszenz im stöchiometrischen Verhältnis von 3:1 (Fluoreszenzindikator: Fe<sup>2+</sup>) und ihre Fluoreszenzintensität ist auf Grund der Tautomerie von Lactonform zur offenen Form ausgesprochen abhängig vom pH - Wert der Messlösung.

Aus diesen Problemen lassen sich einige Erkenntnisse ziehen. Ist man bisher davon ausgegangen, dass die Beschaffenheit des Linkers lediglich einen unerwünschten Einfluss auf die Bindungsstöchiometrie der Fluoreszenzsonde mit  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen und damit auf Kalibrierbarkeit der Quenchung haben kann<sup>4</sup>, so zeigt der Linker bei **16**, dass die Struktur des Linkers auch einen unerwünschten Einfluss auf die Quenchbarkeit der Fluoreszenzsonde selbst haben kann.

Die schlechte Zielsteuerung könnte sowohl bei der Fluoreszenzsonde **16**, als auch bei **18** an der geringen Basizität der sekundären Aminofunktionen liegen. Bekannte lysosomale Farbstoffe, wie das Dapoxyl(2-aminoethyl)-sulfonamid, weisen eine endständige Dimethylaminofunktion auf. Zukünftige lysosomale Farbstoffe sollten also dieses als Element für die Zielsteuerung enthalten.



---

<sup>4</sup> Bei der „Vorläufer-Verbindung“ des RPA, bei der die Phenylengruppe des Linkers noch nicht vorhanden war, zeigte sich eine Stöchiometrie mit  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen, die in Abhängigkeit von der Konzentration der Fluoreszenzsonde zwischen 2 : 1 und 3 : 1 (Sonde :  $\text{Fe}^{2+}$ ) lag.

## 9 Experimenteller Teil

### 9.1 Allgemeine Arbeitstechnik – Arbeiten unter Schutzgas

Da einige der verwendeten Chemikalien feuchtigkeits- bzw. sauerstoffempfindlich waren, mussten deren Umsetzungen respektive deren Synthesen unter Inertgasatmosphäre durchgeführt werden. Als Schutzgas für diese Synthesen wurde Argon 5.0 (Reinheit 99.999%) der Firma Messer Griesheim eingesetzt. Entnommen wurde das Argon einer festinstallierten Trocknungsanlage, die jeweils 50 cm lange Säulen mit Kaliumhydroxid, Phosphor(V)-oxid mit Feuchtigkeitsindikator Sicapent und Kieselgel zur Trocknung enthielt. Zur Entfernung von Sauerstoffspuren diente ein mittels Heizspirale aufgeheizter Kat R311 (BASF). Die verwendeten Apparaturen wurden mittels einer Ölpumpe (0.25 hPa) evakuiert, mit einem Bunsenbrenner ausgeheizt und nach dem Abkühlen mit Argon beschickt.

### 9.2 Instrumentelle Analytik

#### 9.2.1 NMR - SPEKTREN

Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ - Kernresonanzspektren wurden mit den Geräten Gemini XL 200 der Firma Varian (Darmstadt, Deutschland) oder DRX 500 der Firma Bruker (Rheinstetten, Deutschland) erstellt. Die Aufnahme der zweidimensionalen NMR-Spektren erfolgte mit dem DRX-500 Spektrometer. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben. Als interner Standard dienten die undeuterten Anteile der verwendeten deuterten Lösungsmittel. Neben den konventionellen  $^{13}\text{C}$ -Spektren wurden DEPT135- und DEPT90-Spektren zur Produktcharakterisierung verwendet.

#### 9.2.2 ELEMENTARANALYSEN

Die C-, H-, N-Elementaranalysen wurden im mikroanalytischen Labor der Universität Duisburg-Essen mit einem Element Analyser 1010 CHNSO der Firma Carlo Erba (Mailand, Italien) durchgeführt.

### 9.2.3 MASSENSPEKTREN

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte in der Niederauflösung zum einen mit einem Sektorfeld-Massenspektrometer VG Pro Spec 3000 der Firma Fisons Instruments (Manchester, Grossbritannien). Die Proben wurden im Direkteinlasssystem zugeführt, die Ionisierungen erfolgten teilweise per Elektronenstoßionisation (EI, 70 eV) und teilweise per Fast Atom Bombardment (FAB, 40 kV, Cäsiumkanone, Matrixmaterialien waren 3-Nitrobenzylalkohol oder Glycerin). Zum anderen wurde für die Niederauflösung das Gerät Bio TOF II der Firma Bruker (Ionisation per Elektronenspray-Ionisation, ESI) (Boston, USA) verwendet. Dieses Gerät wurde auch für die hochaufgelösten Massenspektren eingesetzt; hierbei wurde das Signal des Isotopenmusters mit der geringsten Masse verwendet.

### 9.2.4 SCHMELZPUNKTE

Die Schmelzpunktbestimmung wurde mit dem Gerät 510 der Firma Büchi (Flawil, Schweiz) oder unter Verwendung eines Mikroskop Heiztisches der Firma Reichert Thermovar (Wien, Österreich) durchgeführt; die Werte sind unkorrigiert angegeben.

### 9.2.5 IR - SPEKTREN

Die Aufnahme der Infrarot-Spektren erfolgte mit dem FT-IR-Spektrometer FTS 135 der Firma Bio-Rad (Cambridge, USA). Die Messungen erfolgten als KBr-Verreibungen in Reflektion.

### 9.2.6 FLUORESZENZSPEKTREN

Die Fluoreszenzspektren wurden mittels eines Fluoroscans FL 3095 Geräts der Firma J&M (Aalen, Deutschland) erhalten.

### 9.2.7 AAS - SPEKTREN

Die quantitativen Bestimmungen der Eisen- und Kupferionen erfolgten

mittels Atomabsorptionsspektroskopie, die im Institut für Arbeitsmedizin des Universitätsklinikums Essen mit dem Atomabsorptionsspektrometer 4100 ZL der Firma Perkin Elmer (Überlingen, Deutschland) durchgeführt wurden.

#### 9.2.8 PH - WERTE

Die pH-Werte wurden mit dem pH-Meter 765 Calimatic der Firma Knick (Berlin, Deutschland) ermittelt.

#### 9.2.9 UV/VIS - SPEKTREN

Mit den Geräten Cary 219 der Firma Varian (Darmstadt, Deutschland) und Spectralys der Firma J&M (Aalen, Deutschland) wurden die Ultraviolett/Visuell-spektroskopischen Messungen durchgeführt.

#### 9.2.10 *EX-SITU* BESTIMMUNGEN

Die *ex-situ* Bestimmungen und die intrazellulären Fluoreszenzspektroskopischen Messungen wurden mit einem Laser-Scanning-Mikroskop, dem inversen Mikroskop Axiovert 100 M mit LSM Laser-Scanning-Modul der Firma Zeiss (Oberkochen, Deutschland) durchgeführt, welches mit einem Argon- und einem Helium/Neon-Laser ausgerüstet ist. Der Argon-Laser hatte eine Leistung von 6.75 mW (45 % der Maximalleistung) und wurde für die Anregung bei  $\lambda_{exc.} = 488 \text{ nm}$  genutzt. Der Helium/Neon-Laser mit 1 mW Ausgangsleistung (100% der Maximalleistung) wurde für die Anregung bei  $\lambda_{exc.} = 543 \text{ nm}$  eingesetzt. Als Objektive mit numerischer Apertur wurden das 63x NA 1.40 Plan-Apochromat/Oil bzw. das 20x LD-Achroplan 0.4 Ph2 der Firma Zeiss eingesetzt. Als Emissionsfilter dienten Longpassfilter mit  $\lambda_{em.} \geq 585 \text{ nm}$  oder  $\lambda_{em.} \geq 560 \text{ nm}$  sowie ein Filter mit  $\lambda_{em.} \geq 505 - 530 \text{ nm}$ . Die für die Messungen benutzten Pentz-Kammern wurden in der Werkstatt der Institutsgruppe I des Universitätsklinikums Essen hergestellt. Temperiert wurden diese mit einem elektrisch heizbaren Mikroskoptisch der Firma Zeiss (Oberkochen, Deutschland). Alle Messun-

gen wurden im „*expert mode*“ der LSM 510-Software durchgeführt. Um bei qualitativen und quantitativen Fluoreszenzmessungen eine optimale Messung innerhalb des Detektorbereiches erreichen zu können, wurden die verschiedenen Parameter Laserleistung, Detector Gain, Pinhole, Scan Time, Amplifying Gain, Auflösung und Numbers of Scan für jede Messung in das jeweilige Optimum variiert. Für vergleichende Messungen mussten die Parameter so eingestellt werden, dass sie für alle Messungen den besten Kompromiss bedeuteten. Für qualitative Fluoreszenzmessungen eignen sich eher lange Scan-Zeiten, eine bestmögliche Auflösung, hohe Laserleistungen und Zoomfaktoren. Bei quantitativen Fluoreszenzmessungen musste die photochemische Schädigung des Farbstoffes und der Zellen berücksichtigt werden.

### **9.3 Instrumentelle Präparation**

Die präparative Stofftrennung per MPLC wurde mit der Kronlab HD 2-400 / 55041 mit angeschlossenem Kronlab UV-VIS 2.5 Spektrometer durchgeführt.

### **9.4 Materialien zur Synthese**

1,10-Phenanthrolin und Dimethylformamid wurden von der Firma Acros-Organics (Geel, Belgien) erhalten, Hydrazin Monohydrat, Palladium auf Aktivkohle (10% Pd), Natriumhydrogencarbonat, Natriumhydroxid, Celite und Kaliumcarbonat von Fluka (Buchs, Schweiz), Wasserstoffperoxid (30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Dicyclohexylcarbodiimid, Bromacetyl bromid, *N*-Hydroxysuccinimid und Triethylamin wurden von der Firma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen, Magnesium- und Natriumsulfat, Oleum (25% freies Schwefeltrioxid) und konzentrierte Schwefelsäure wurden von der Firma Riedel de Haen (Seelze, Deutschland) bezogen. Die Lösungsmittel Tetrahydrofuran und Diethylether stammen von J.T. Baker (Deventer, Niederlande), Toluol von Fisher Scientific (Leics, Großbritannien), Dichlormethan, Chloroform und 1,4-Dioxan von SDS (Peypin, Frankreich), Acetonitril von Biosolve LTD (Valkenswaard,



nitril von Biosolve LTD (Valkenswaard, Niederlande), Ethanol und Methanol von Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Ethylacetat von Applichem (Darmstadt, Deutschland). Die analytische Dünnschichtchromatographie wurde unter Verwendung von kommerziell erhältlichen DC-Platten mit Fluoreszenzindikator auf neutralem oder auf basischem Aluminiumoxid 60 F<sub>254</sub> der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) oder auf RP-18 Material der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)(RP-18W/UV<sub>254</sub>) durchgeführt. Neutrales und basisches Aluminiumoxid für die Säulenchromatographie wurden von der Firma Fluka (Buchs, Schweiz) erhalten. Präparative DC-Platten mit RP-18 Material der Firma Macherey-Nagel (RP-18, 40-63  $\mu\text{m}$ ) wurden erstellt, indem 13% Calciumsulfat bezogen auf die verwendete Menge RP-18 Material gemörsert, zugegeben und mit Methanol aufgeschlemmt wurden. Nach dem Trocknen im Trockenschrank bei 80°C konnten die Glasplatten für die präparative Dünnschichtchromatographie verwendet werden.

## 9.5 Trocknen der Lösungsmittel

Alle verwendeten Lösungsmittel besaßen p. A. Qualität. Zur Feintrocknung wurde Acetonitril zehn Stunden über Calciumhydrid unter Rückfluss erhitzt und anschliessend destilliert. Dimethylformamid wurde durch Destillation und anschließende Filtration über neutralem Aluminiumoxid absolutiert. 1,4-Dioxan wurde mit Natrium zum Sieden erhitzt, bis sich aus dem zugesetzten Indikator *p*-Phenylbenzophenon das violett gefärbte Ketylradikal gebildet hatte. Anschließend wurde destilliert. Ethanol wurde pro Liter mit 7.00 g Natrium und 27.5 g Phthalsäurediethylester versetzt, zwei Stunden erhitzt und danach destilliert.

Die so gewonnen, trockenen Lösungsmittel wurden über Molekularsieb und unter Argon aufbewahrt.

Die verwendeten deuterierten Lösungsmittel CDCl<sub>3</sub> und DMSO-*d*<sub>6</sub> wurden über Molekularsieb getrocknet und aufbewahrt.

## 9.6 Materialien für die zellbiologische Nutzung

Von der Firma Gibco (Eggenstein, Deutschland) wurde das Leibovitz L-15 Medium und RPMI 1640 Medium bezogen, Penizillin/Streptomycin von PAA Laboratories (Linz/ Österreich), Fibronectin von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Deutschland), Kollagen (type R), Dexamethason, Rinderserumalbumin und Gentamycin von Serva (Heidelberg, Deutschland), Dimethylsulfoxid (DMSO) und Trinatrium Dihydrat von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland). Das fötale Kälberserum, Eisen(II)ammoniumsulfat Hexahydrat, Eisen(III)chlorid, 8-Hydroxychinolin, Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA), L-Glutamin, Kollagenase, Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) und Propidiumiodid von Sigma (Taufkirchen, Deutschland), Chelex 100 (Polystyrol-divinylbenzolinodiacetat), Glukose, Glutathion und Ascorbinsäure von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) und die Salze Mangan(II)chlorid, Nickel(II)sulfat, Kupfer(II)chlorid, Kobalt(II)chlorid, Zink(II)chlorid und Kupfer(I)chlorid wurden von der Firma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 wurde von der Firma Molecular Probes Europa BV (Leiden, Niederlande) erhalten. Prof. Dr. P. Ponka vom Lady Davis Institute for Medical Research (Montreal, Kanada) stellte uns freundlicherweise den Entquencher Pyridoxalisonicotinoylhydrazon (PIH) zur Verfügung. Die Falcon Zellkulturflaschen und Falcon 6-well Zellkulturschalen wurden bei der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) gekauft, Eppendorf-Cups von Sarstedt (Nürnberg, Deutschland) und Glas-Deckplättchen wurden von Assistent (Sondheim/Rhön, Deutschland) bezogen.

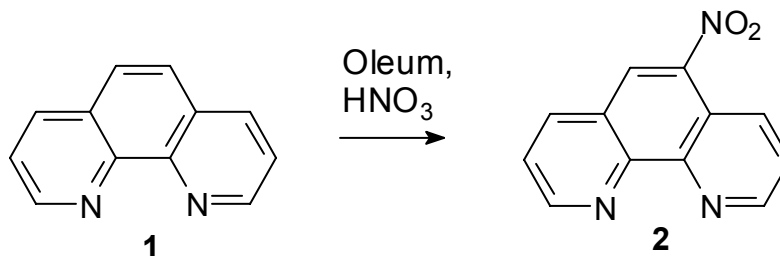
Hank 's balanced salt solution (HBSS, pH 7.35) wurde als wässrige Lösung hergestellt: 137 mM NaCl, 5.36 mM KCl, 1.26 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.49 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.41 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25.0 mM 2[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure (HEPES), die genannten Stoffe stammten von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland)

## **9.7 Versuchstiere**

Die verwendeten Hepatozyten wurden männlichen Ratten des Wistar-Stammes (180-350 g) des Zentralen Tierlaboratoriums Essen entnommen. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen - dies entspricht einer Temperatur von  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $55 \pm 5\%$ , einem konstanten Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden, Standardfutter und Wasser *ad libitum* gehalten. Dies geschah in Übereinstimmung mit den geltenden Tierschutzgesetzen.

## 9.8 Synthese der Fluoreszenzfarbstoffe und der Entquencher

### 9.8.1 DARSTELLUNG VON 5-NITRO-1,10-PHENANTHROLIN<sup>[144]</sup> (**2**)

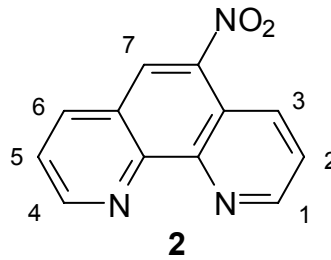


1,10-Phenanthroline-Hydrat (**1**, 25.0 g, 0.126 mol) wurde vorgelegt und schnell 125 mL Oleum (25% SO<sub>3</sub>) zugetropft, wobei eine Temperatur von 120 °C erreicht wurde. Sofort wurden zu der heißen, braunen Lösung 67 mL 70%ige HNO<sub>3</sub> zugetropft. Es wurde 30 min unter Rückfluss erhitzt, um eine vollständige Umsetzung zu erreichen. Die Lösung wurde unter Rühren auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Suspension wurde auf zwei kg Eis gegossen. Nach dem Schmelzen des Eises wurde mit 30%iger NaOH neutralisiert. Der unlösliche Rückstand wurde über eine D2-Glasfritte unter Wasserstrahlvakuum abgesaugt und mehrmals mit kaltem Wasser gewaschen. Das Rohprodukt **2** wurde aus 80 mL Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 18.9 g (84.1 mmol; 66 %) 5-Nitro-1,10-phenanthroline (**2**)

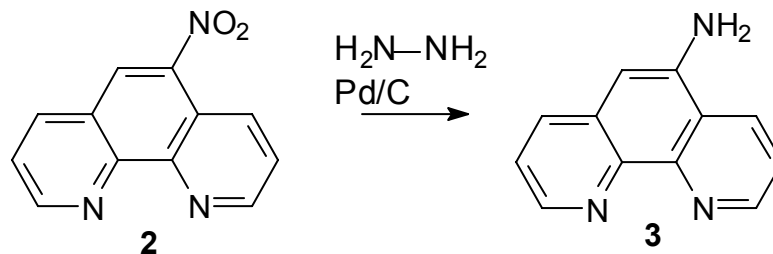
Schmelzpunkt: 196°C (Lit. [141]: 197-198°C)

Charakterisierung:



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 9.28 (dd, <sup>3</sup>J(1-H, 2-H) = 4.4 Hz, <sup>4</sup>J(1-H, 3-H) = 1.8 Hz, 1H, 1-H); 9.23 (dd, <sup>3</sup>J(4-H, 5-H) = 4.3 Hz, <sup>4</sup>J(4-H, 6-H) = 1.7 Hz, 1H, 4-H); 9.01 (s, 1H, 7-H); 8.87 (dd, <sup>3</sup>J(3-H, 2-H) = 8.6 Hz, <sup>4</sup>J(3-H, 1-H) = 1.8 Hz, 1H, 3-H); 8.76 (dd, <sup>3</sup>J(6-H, 5-H) = 8.2 Hz, <sup>4</sup>J(6-H, 4-H) = 1.7 Hz, 1H, 6-H); 7.96 (dd, <sup>3</sup>J(2-H, 3-H) = 8.6 Hz, <sup>3</sup>J(2-H, 1-H) = 4.4 Hz, 1H, 2-H); 7.93 (dd, <sup>3</sup>J(5-H, 6-H) = 8.2 Hz, <sup>3</sup>J(5-H, 4-H) = 4.3 Hz, 1H, 5-H).

### 9.8.2 DARSTELLUNG VON 5-AMINO-1,10-PHENANTHROLIN<sup>[145]</sup> (**3**)



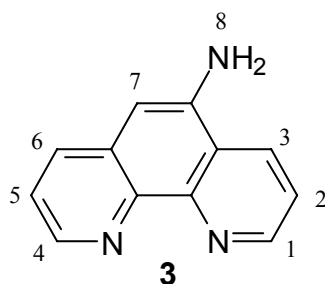
5-Nitro-1,10-phenanthroline (**2**, 10.0 g, 44.4 mmol) wurde in 500 mL Ethanol unter Argonatmosphäre vorgelegt, 2.00 g Palladium auf Aktivkohle (10.0% Pd) im Inertgasgegenstrom dazugegeben. 10.0 mL Hydrazinhydrat wurden in 100 mL Ethanol gegeben und zum Reaktionsgemisch getropft, welches anschließend für 5 h bei 80°C gerührt wurde. Das Pd/C wurde entfernt, indem über Celite/Seesand (10 cm/ 1cm) filtriert wurde. Das Filtrat wurde mittels Rotationsverdampfer bis auf 100 mL eingeeengt und mit kaltem Wasser versetzt bis das Produkt ausgefallen war. Dieses wurde über einen Büchnertrichter abfiltriert und für 5 h Stunden am Öl-

pumpenvakuum (0.25 hPa) von Lösungsmittelresten befreit.

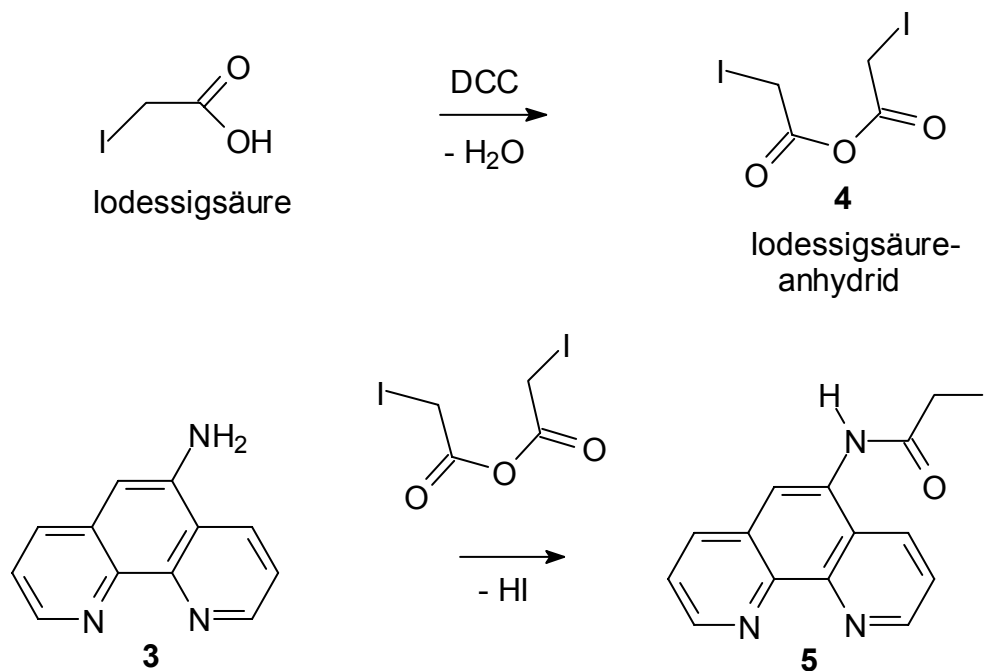
Ausbeute: 5.95 g (30.5 mmol; 69%) 5-Amino-1,10-phenanthrolin ( **2** )

Schmelzpunkt: 262°C (Lit. [148] : 259-260°C)

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.04 (dd,  $^3\text{J}(1\text{-H}, 2\text{-H}) = 4.2$  Hz,  $^4\text{J}(1\text{-H}, 3\text{-H}) = 1.5$  Hz, 1H, 1-H); 8.67 (dd,  $^3\text{J}(4\text{-H}, 5\text{-H}) = 4.3$  Hz,  $^4\text{J}(4\text{-H}, 6\text{-H}) = 1.7$  Hz, 1H, 4-H); 8.66 (dd,  $^3\text{J}(6\text{-H}, 5\text{-H}) = 8.1$  Hz,  $^4\text{J}(6\text{-H}, 4\text{-H}) = 1.7$  Hz, 1H, 6-H); 8.03 (dd,  $^3\text{J}(3\text{-H}, 2\text{-H}) = 8.3$  Hz,  $^4\text{J}(3\text{-H}, 1\text{-H}) = 1.5$  Hz, 1H, 3-H); 7.72 (dd,  $^3\text{J}(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 8.3$  Hz,  $^3\text{J}(2\text{-H}, 1\text{-H}) = 4.2$  Hz, 1H, 2-H); 7.50 (dd,  $^3\text{J}(5\text{-H}, 6\text{-H}) = 8.1$  Hz;  $^3\text{J}(5\text{-H}, 4\text{-H}) = 4.3$  Hz, 1H, 5-H); 6.85 (s, 1H, 7-H); 6.13 (s, 2H, 8-H).

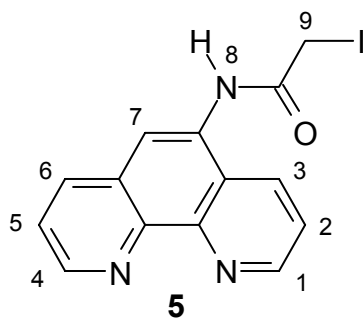
9.8.3 DARSTELLUNG VON 2-IOD-*N*-(1,10-PHENANTHROLIN-5-YL)ACETAMID<sup>[146]</sup> (**5**)

5.58 g (30.0 mmol) Iodessigsäure wurden mit 2.79 g (13.0 mmol) DCC in 90 mL trockenem Ethylacetat gelöst und für 3 h bei Raumtemperatur im ausgeheizten Kolben gerührt. Das entstehende Nebenprodukt wurde abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der aus Iodessigsäureanhydrid (**4**) bestehende Rückstand wurde in 45 mL Acetonitril gelöst und zu einer Suspension aus 0.89 g (4.5 mmol) 5-Amino-1,10-phenanthrolin (**3**) in 60 mL trockenem Acetonitril getropft. Die Reaktionsmischung wurde für 15 h bei Raumtemperatur gerührt; das ausgefallene Rohprodukt wird durch Zentrifugation isoliert und mit 5%iger Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Getrocknet wurde das Produkt am Ölpumpenvakuum bei 0.25 hPa für 20 h über Phosphorpentoxid.

Schmelzpunkt: 224°C (Zers.)

Ausbeute: 1.35 g (24.6 mmol; 82%) 2-Iod-*N*-(1,10-phenanthroline-5-yl)acetamid (**5**)

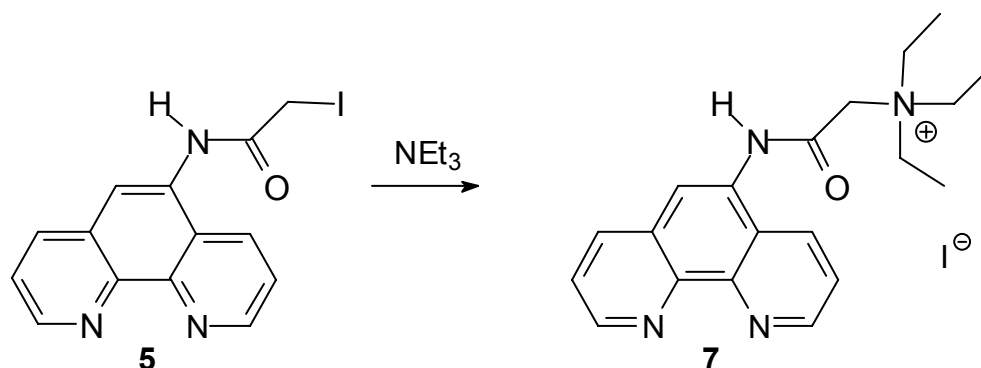
Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 10.50 (s, 1H, 8-H); 9.10 (dd,  $^3\text{J}(1\text{-H}, 2\text{-H}) = 4.2$  Hz,  $^4\text{J}(1\text{-H}, 3\text{-H}) = 1.2$  Hz, 1H, 1-H); 9.00 (dd,  $^3\text{J}(4\text{-H}, 5\text{-H}) = 4.2$  Hz,  $^4\text{J}(4\text{-H}, 6\text{-H}) = 1.4$  Hz, 1H, 4-H); 8.60 (dd,  $^3\text{J}(3\text{-H}, 2\text{-H}) = 8.4$  Hz,  $^4\text{J}(3\text{-H}, 1\text{-H}) = 1.2$  Hz, 1H, 3-H); 8.45 (dd,  $^3\text{J}(6\text{-H}, 5\text{-H}) = 8.0$  Hz,  $^4\text{J}(6\text{-H}, 4\text{-H}) = 1.4$  Hz, 1H, 6-H); 8.15 (s, 1H, 7-H); 7.85 (dd,  $^3\text{J}(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 8.4$  Hz,  $^3\text{J}(2\text{-H}, 1\text{-H}) = 4.2$  Hz, 1H, 2-H); 7.70 (dd,  $^3\text{J}(5\text{-H}, 6\text{-H}) = 8.0$  Hz;  $^3\text{J}(5\text{-H}, 4\text{-H}) = 4.2$  Hz, 1H, 5-H); 4.05 (s, 2H, 9-H).



9.8.4 DARSTELLUNG VON TRIETHYL-1,10-PHENANTHROLIN-5-YLCARBAMOYL-METHYLAMMONIUMIODID (**7**)

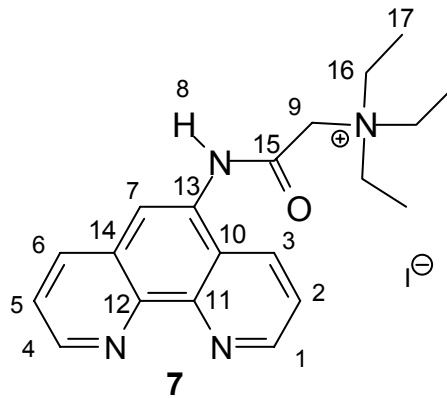


2-Iod-*N*-(1,10-phenanthroline-5-yl)acetamid (**5**, 1.02 g, 2.20 mmol) wurde in 700 mL Dichlormethan gegeben. Durch die Zugabe von 0.95  $\mu$ L Triethylamin (684 mg, 6.76 mmol) wurde das Edukt in Lösung gebracht. Nach einer Reaktionszeit von 30 h unter Rückfluss unter Argon wurden das Lösungsmittel und flüchtige Komponenten erst mittels Rotationsverdampfer und dann im Ölpumpenvakuum (0.25 hPa) entfernt. Das Rohprodukt wurde in 70 mL Chloroform gelöst und mit 100 mL Diethylether versetzt. Hierbei fiel langsam das Produkt aus. Dieses Rohprodukt wurde dreimal für 15 min mit Dioxan im Ultraschallbad bei Raumtemperatur digeriert. Das Lösungsmittel wurde nach Zentrifugation abdekantiert und der erhaltene Feststoff für 6 Stunden im Ölpumpenvakuum (0.25 hPa) bei 70°C von Lösungsmittelresten befreit.

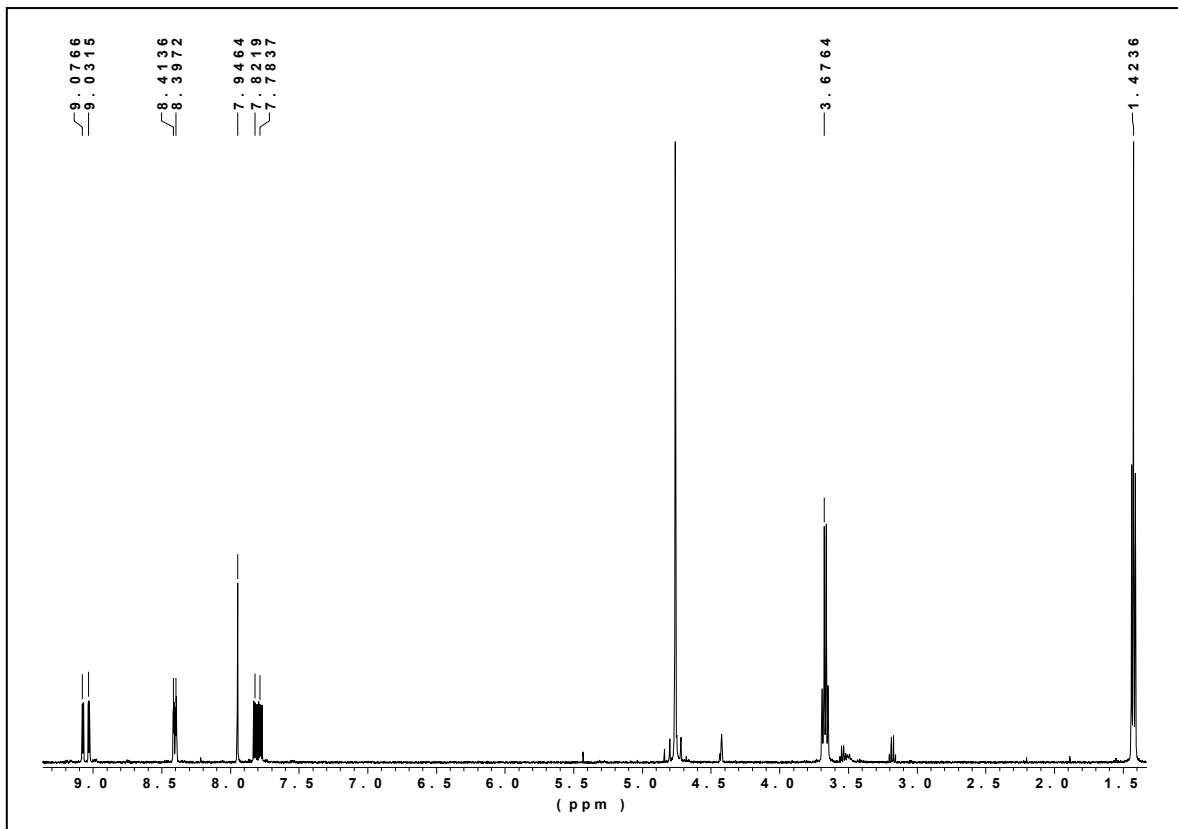
Ausbeute: 0.47 g (1.01 mmol; 46%) an Triethyl-1,10-phenanthroline-5-ylcarbamoyl-methylammoniumiodid (**7**)

Schmelzpunkt: 138°C (Zer.)

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.07 (dd,  $^3\text{J}(1\text{-H}, 2\text{-H}) = 4.4$  Hz,  $^4\text{J}(1\text{-H}, 3\text{-H}) = 1.6$  Hz, 1H, 1-H); 9.03 (dd,  $^3\text{J}(4\text{-H}, 5\text{-H}) = 4.5$  Hz,  $^4\text{J}(4\text{-H}, 6\text{-H}) = 1.7$  Hz, 1H, 4-H); 8.40 (dd,  $^3\text{J}(3\text{-H}, 2\text{-H}) = 8.4$  Hz,  $^4\text{J}(3\text{-H}, 1\text{-H}) = 1.6$  Hz, 1H, 3-H); 8.40 (dd,  $^3\text{J}(6\text{-H}, 5\text{-H}) = 8.3$  Hz,  $^4\text{J}(6\text{-H}, 4\text{-H}) = 1.7$  Hz, 1H, 6-H); 7.79 (s, 1H, 7-H); 7.82 (dd,  $^3\text{J}(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 8.4$  Hz,  $^3\text{J}(2\text{-H}, 1\text{-H}) = 4.4$  Hz, 1H, 2-H); 7.78 (dd,  $^3\text{J}(5\text{-H}, 6\text{-H}) = 8.3$  Hz;  $^3\text{J}(5\text{-H}, 4\text{-H}) = 4.5$  Hz, 1H, 5-H); 4.42 (s, 2H, 9-H); 3.66 (q,  $^3\text{J}(16\text{-H}, 17\text{-H}) = 7.3$  Hz, 6H, 16-H; 1.42 (t,  $^3\text{J}(17\text{-H}, 16\text{-H}) = 7.3$  Hz, 9H, 17-H).



**Abb. 33:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **7** in  $\text{D}_2\text{O}$

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 163.27 (15-C), 150.15 (4-C), 149.87 (1-C), 145,75 (11-C), 144.06 (12-C), 136.04 (3-C), 131.37 (6-C), 129.95 (13-C), 127.72 (14-C), 124.36 (10-C), 123.74 (2-C), 123.05 (5-C), 121.35 (7-C), 56.16 (9-C), 54.16 (16-C), 7.55 (17-C).

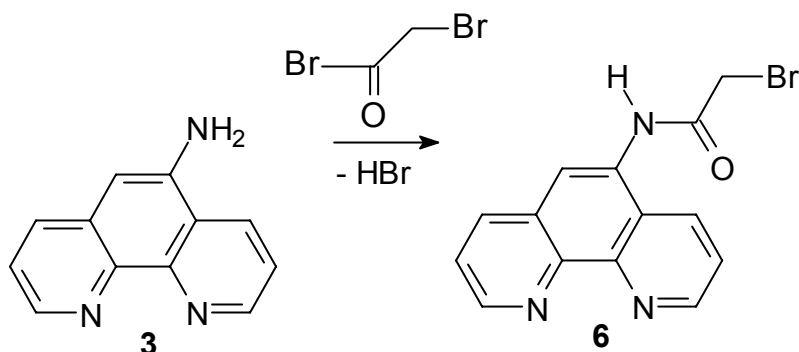
IR (KBr-Verreibung):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3436 (w,  $\nu(\text{N-CH}_2)$ ), 3153 (w,  $\nu(\text{NH})$ ), 2983 (m,  $\nu(\text{CH}_{\text{Aryl}})$ ), 1693 (s,  $\nu(\text{CO}_{\text{Amid}})$ ), 1537 (s,  $\delta(\text{NH}_{\text{Amid}})$ ), 1480, 1422 (s,  $\nu(\text{CC}_{\text{Aryl}})$ ).

HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Methanol):

berechnet: (für  $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}$ ): 337,2008

gefunden: 337.2023

Abweichung: 4.4 ppm.

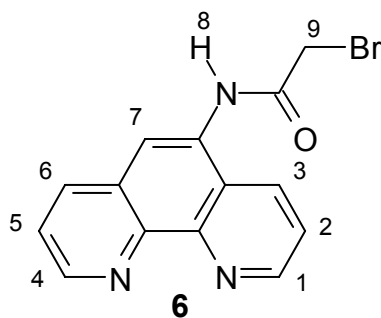
9.8.5 DARSTELLUNG VON 2-BROM-*N*-(1,10-PHENANTHROLIN-5-YL)ACETAMID<sup>[11]</sup> (**6**)

5-Amino-1,10-phenanthrolin (**3**, 12.0 g, 61.5 mmol) wurde in 450 mL frisch getrocknetes Acetonitril (über Kalziumhydrid destilliert) gegeben. 10.8 mL (25.0 g, 124 mmol) Bromoacetyl bromid wurden in 180 mL ebenfalls frisch getrocknetes Acetonitril gegeben und über 30 min zugetropft. Die Suspension wurde über Nacht bei RT gerührt. Es wurde über eine D4-Glasfritte filtriert und sukzessive mit 5%iger wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und mit Wasser gewaschen. Zur Trocknung wurde für 6 h Stunden ein Ölpumpenvakuum (0.25 hPa) angelegt.

Ausbeute: 12.2 g (38.7 mmol; 63%) 2-Brom-*N*-(1,10-phenanthrolin-5-yl)acetamid (**6**)

Schmelzpunkt: 230 °C (Zer.)

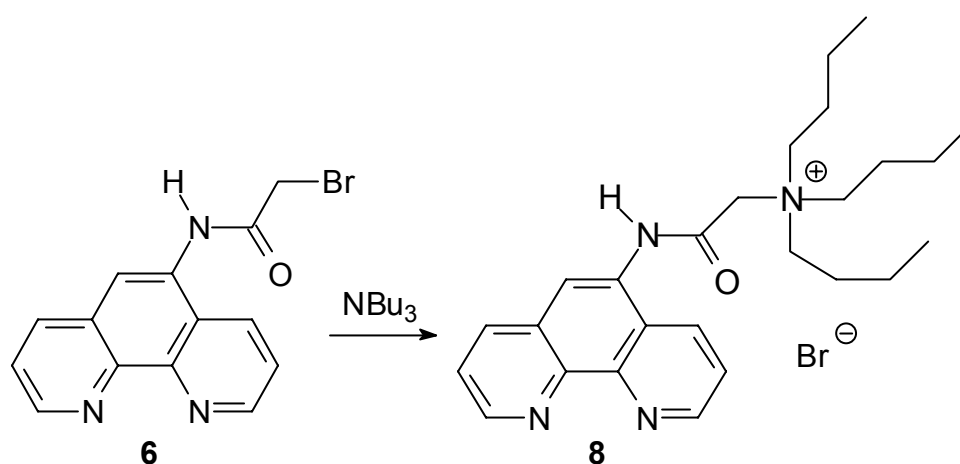
Charakterisierung:



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 10.58 (s, 1H, 8-H); 9.14 (dd, <sup>3</sup>J(1-H, 2-H) = 4.2 Hz, <sup>4</sup>J(1-H, 3-H) = 1.2 Hz, 1H, 1-H); 9.05 (dd, <sup>3</sup>J(4-H,

5-H) = 4.2 Hz,  $^4J(4\text{-H}, 6\text{-H}) = 1.4$  Hz, 1H, 4-H); 8.62 (dd,  $^3J(3\text{-H}, 2\text{-H}) = 8.4$  Hz,  $^4J(3\text{-H}, 1\text{-H}) = 1.2$  Hz, 1H, 3-H); 8.50 (dd,  $^3J(6\text{-H}, 5\text{-H}) = 8.0$  Hz,  $^4J(6\text{-H}, 4\text{-H}) = 1.4$  Hz, 1H, 6-H); 8.18 (s, 1H, 7-H); 7.85 (dd,  $^3J(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 8.4$  Hz,  $^3J(2\text{-H}, 1\text{-H}) = 4.2$  Hz, 1H, 2-H); 7.76 (dd,  $^3J(5\text{-H}, 6\text{-H}) = 8.0$  Hz;  $^3J(5\text{-H}, 4\text{-H}) = 4.2$  Hz, 1H, 5-H; 4.28 (s, 2H, 9-H).

#### 9.8.6 DARSTELLUNG VON TRIBUTYL-1,10-PHENANTHROLIN-5-YLCARBAMOYL-METHYLAMMONIUMBROMID (**8**)

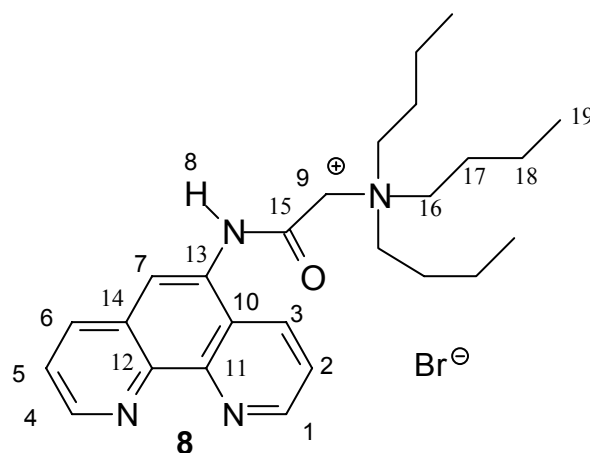


2-Brom-*N*-(1,10-phenanthrolin-5-yl)acetamid (**6**, 1.32 g, 2.64 mmol) wurde in 120 mL trockenem Chloroform gelöst. Es wurde Tributylamin (2.0 mL, 1.55 g, 8.38 mmol) zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 32 h unter Rückfluss wurden das Lösungsmittel und flüchtige Komponenten erst mittels Rotations-Verdampfer und anschließend in einem Ölpumpenvakuum (0.25 hPa) entfernt. Das Rohprodukt wurde in 20 mL Chloroform gelöst und langsam zu 80 mL Diethylether getropft, so dass das Produkt ausfiel. Dieses Rohprodukt wurde dreimal mit Diethylether für 15 Minuten im Ultraschallbad bei Raumtemperatur digeriert. Der Überstand wurde jeweils nach Zentrifugieren abdekantiert. Der Feststoff wurde in einem Ölpumpenvakuum (0.25 hPa) von Lösungsmittelresten befreit.

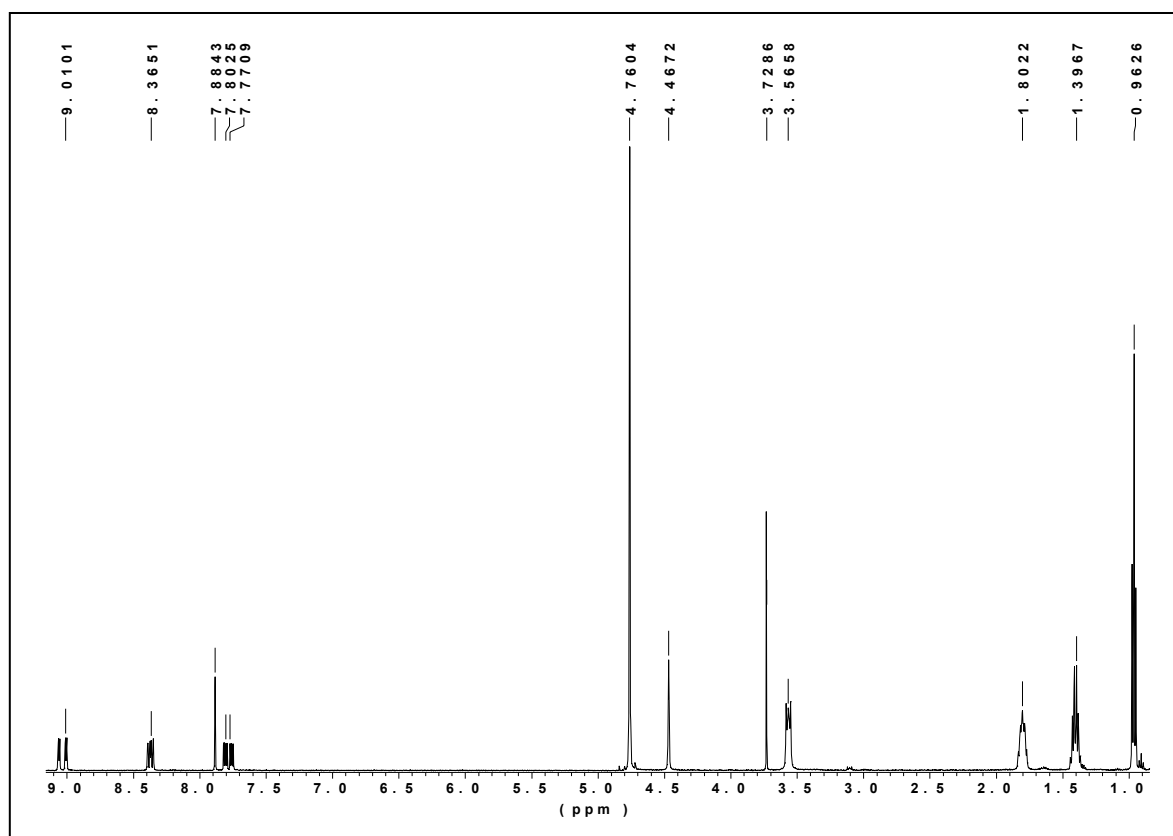
Schmelzpunkt: 177°C (Zer.)

Ausbeute: 240 mg (0.478 mmol; 18%) an Tributyl-1,10-phenanthrolin-5-ylcarbamoyl-methylammoniumbromid (**8**)

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.06 (dd,  $^3\text{J}(1\text{-H}, 2\text{-H}) = 4.4$  Hz,  $^4\text{J}(1\text{-H}, 3\text{-H}) = 1.4$  Hz, 1H, 1-H); 9.01 (dd,  $^3\text{J}(4\text{-H}, 5\text{-H}) = 4.5$  Hz,  $^4\text{J}(4\text{-H}, 6\text{-H}) = 1.5$  Hz, 1H, 4-H); 8.38 (dd,  $^3\text{J}(3\text{-H}, 2\text{-H}) = 8.3$  Hz,  $^4\text{J}(3\text{-H}, 1\text{-H}) = 1.4$  Hz, 1H, 3-H); 8.36 (dd,  $^3\text{J}(6\text{-H}, 5\text{-H}) = 8.3$  Hz,  $^4\text{J}(6\text{-H}, 4\text{-H}) = 1.5$  Hz, 1H, 6-H); 7.88 (s, 1H, 7-H); 7.81 (dd,  $^3\text{J}(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 8.5$  Hz,  $^3\text{J}(2\text{-H}, 1\text{-H}) = 4.4$  Hz, 1H, 2-H); 7.76 (dd,  $^3\text{J}(5\text{-H}, 6\text{-H}) = 8.3$  Hz;  $^3\text{J}(5\text{-H}, 4\text{-H}) = 4.5$  Hz, 1H, 5-H); 4.46 (s, 2H, 9-H); 3.56 (m, 6H, 16-H); 1.81 (m, 6H, 17-H), 1.44 (m, 6H, 18-H); 0.97 (t,  $^3\text{J}(17\text{-H}, 16\text{-H}) = 7.3$  Hz, 9H, 19-H).



**Abb. 34:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **8** in  $\text{D}_2\text{O}$

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 167.34 (15-C), 152.66 (1-C), 151.69 (4-C), 145.76 (12-C), 144.17 (13-C), 134.91 (3-C), 132.04 (11-C), 130.48 (6-C), 127.54 (14-C), 127.02 (10-C), 126.93 (2-C), 126.85 (7-C), 125.67 (5-C), 62.89 (9-C), 60.16 (16-C), 26.24 (17-C), 21.85 (18-C), 15.43 (19-C).

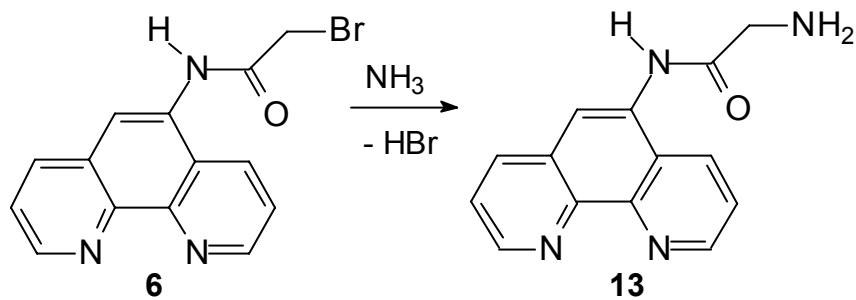
IR (KBr-Verreibung):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3406 (w,  $\nu(\text{N-CH}_2)$ ), 3150 (w,  $\nu(\text{NH})$ ), 2962, 2936, 2875 (m,  $\nu(\text{CH}_{\text{Aryl}})$ ), 1693 (s,  $\nu(\text{CO}_{\text{Amid}})$ ), 1537 (s,  $\delta(\text{NH}_{\text{Amid}})$ ), 1469, 1422 (s,  $\nu(\text{CC}_{\text{Aryl}})$ ).

HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Methanol):

berechnet: (für  $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}$ ): 421.2962

gefunden: 421.2967

Abweichung: 2.1 ppm

9.8.7 DARSTELLUNG VON 2-AMINO-*N*-(1,10-PHENANTHROLIN-5-YL)ACETAMID (**13**)

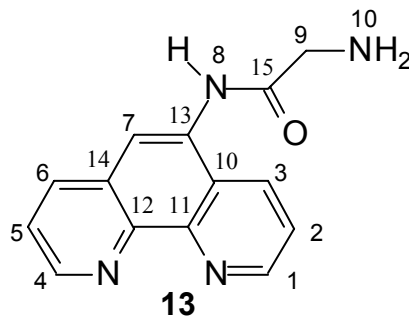
5-Bromacetamid-1,10-phenanthrolin (**6**, 0.90 g, 2.85 mmol) wurde in 60.0 mL 25%ige wässrige Ammoniaklösung gegeben. Die Suspension wurde mit 96.0 mL DMF versetzt, bis man eine klare Lösung erhielt. Nach Rühren über Nacht wurden die Lösungsmittel bei 70°C am Rotationsverdampfer entfernt, Lösungsmittelreste für 4 h Stunden im Ölpumpenvakuum (0,25 hPa). Der erhaltene beigefarbene Feststoff wurde in 10.0 mL 5%iger, wässriger Kaliumcarbonatlösung gelöst, um den Bromwasserstoff, der als Hydrobromid mit der aliphatischen Aminofunktion assoziiert vorliegt, zu entfernen. Es wurde viermal mit 10.0 mL Chloroform extrahiert. Das organische Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt **13** (396 mg), in dem noch DMF enthalten war, wurde aus 15.0 mL Wasser bei 2 min Hitze-Einwirkung umkristallisiert, wobei das Gemisch nicht über 80°C erhitzt wurde. Das nach dem Abzentrifugieren noch enthaltene Wasser wurde in einer Trockenpistole über Phosphor(V)-oxid in einem Ölpumpenvakuum von 0.25 hPa und 127°C über sechs Stunden entfernt.

Ausbeute: 206 mg (0.82 mmol; 29%) an 2-Amino-*N*-(1,10-phenanthroline-5-yl)acetamid (**13**)

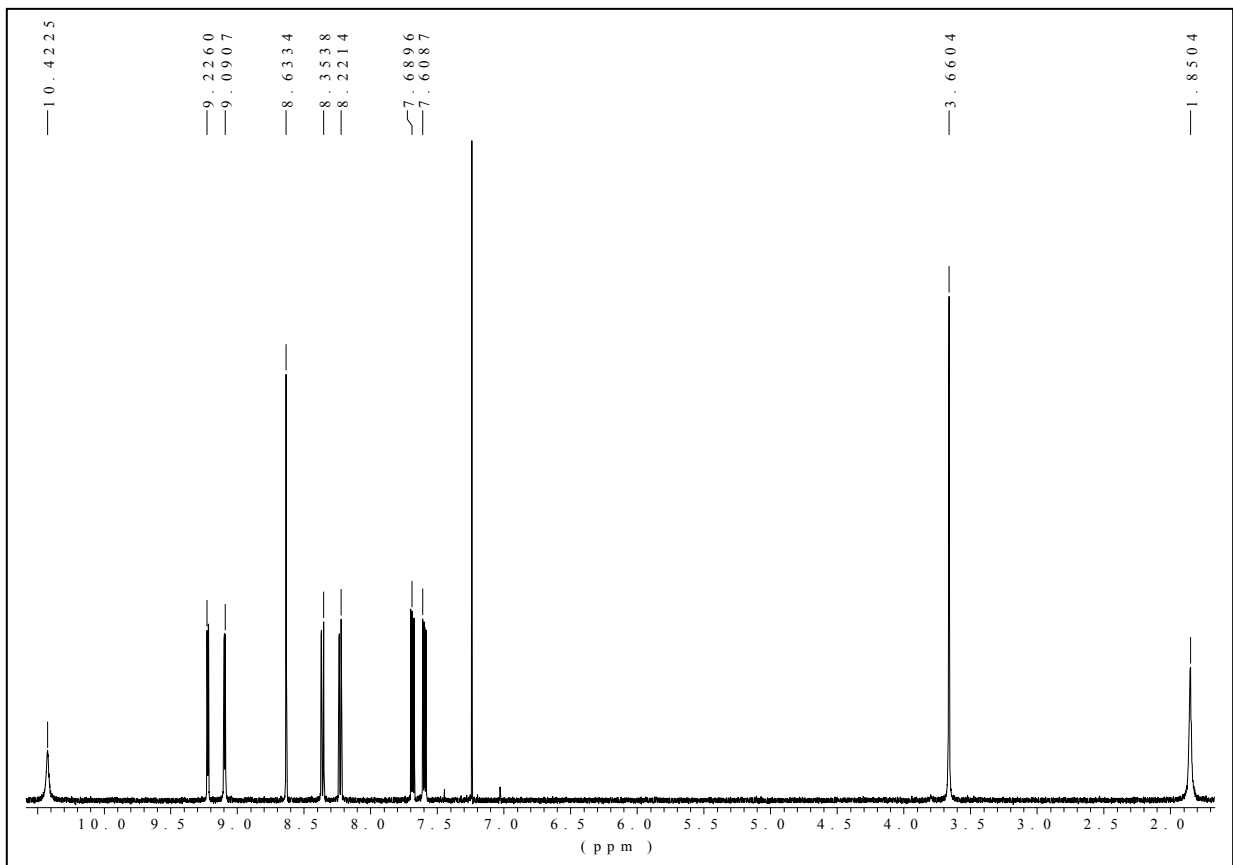
Schmelzpunkt: 186°C (Zer.)



Charakterisierung:



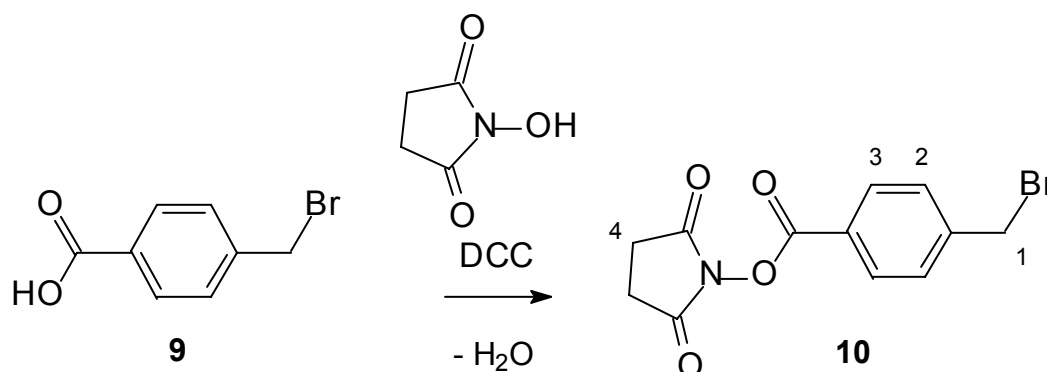
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 10.42 (s, 1H, 8-H); 9.22 (dd,  $^3\text{J}(1\text{-H}, 2\text{-H}) = 4.3$  Hz,  $4\text{J}(1\text{-H}, 3\text{-H}) = 1.5$  Hz, 1H, 1-H); 9.09 (dd,  $3\text{J}(4\text{-H}, 5\text{-H}) = 4.3$  Hz,  $4\text{J}(4\text{-H}, 6\text{-H}) = 1.8$  Hz, 1H, 4-H); 8.63 (s, 1H, 7-H); 8.36 (dd,  $3\text{J}(3\text{-H}, 2\text{-H}) = 8.4$  Hz,  $4\text{J}(3\text{-H}, 1\text{-H}) = 1.5$  Hz, 1H, 3-H); 8.23 (dd,  $3\text{J}(6\text{-H}, 5\text{-H}) = 8.1$  Hz,  $4\text{J}(6\text{-H}, 4\text{-H}) = 1.8$  Hz, 1H, 6-H); 7.69 (dd,  $3\text{J}(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 8.4$  Hz,  $3\text{J}(2\text{-H}, 1\text{-H}) = 4.3$  Hz, 1H, 2-H); 7.60 (dd,  $3\text{J}(5\text{-H}, 6\text{-H}) = 8.1$  Hz;  $3\text{J}(5\text{-H}, 4\text{-H}) = 4.3$  Hz, 1H, 5-H); 3.67 (s, 2H, 9-H); 1.86 (s, 2H, 10-H).



**Abb. 35:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **13** in  $\text{CDCl}_3$



9.8.8 DARSTELLUNG VON [(4-BROMMETHYLBENZOYL)OXY]-2,5-PYRROLYDINDION<sup>[147]</sup>  
**(10)**



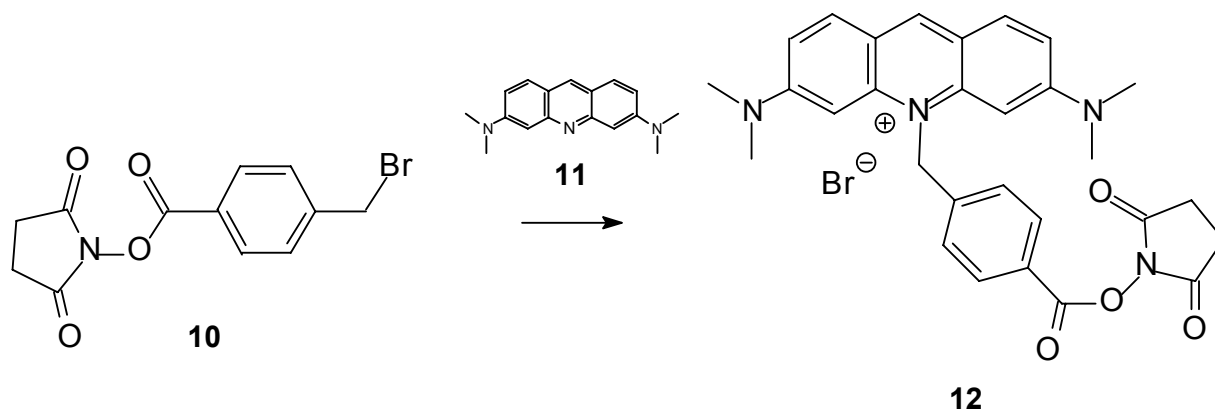
Eine Mischung aus 13.4 g (62.0 mmol) 4-(Brommethyl)-benzoesäure (**9**), 7.40 g (62.0 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid und 12.6 g (62.0 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid wurden in 200 mL Dioxan (p.A., über Molekularsieb 4 Å getrocknet) über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde filtriert und mit 100 mL Dioxan nachgewaschen. Das Rohprodukt (19.2 g) wurde zunächst mittels Rotationsverdampfer und anschließend im Ölpumpenvakuum vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Produkt wurde aus 300 mL Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 11.2 g (35.6 mmol; 57%) an [(4-Brommethylbenzoyl)oxy]-2,5-pyrrolydindion (**10**)

Schmelzpunkt: 149-151°C (Lit. [4]:150-153°C)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.09 (d, <sup>3</sup>J(3-H, 2-H) = 8.3 Hz, 2H, 3-H); 7.51 (d, <sup>3</sup>J(2-H, 3-H) = 8.3 Hz, 2H, 2-H); 4.48 (s, 2H, 1-H); 2.89 (s, 4H, 4-H)

9.8.9 DARSTELLUNG VON 10-[4-(2,5-DIOXO-PYRROLIDIN-1-YLOXY(CARBONYL)-BENZYL]-ACRIDINORANGEBROMID (**12**)



Vor der Durchführung der Reaktion musste die freie Base des Acridinorange (**11**) gereinigt werden, da sie kommerziell in 70%-iger Reinheit erhältlich war. Sie wurde über Nacht in einer Soxhletapparatur mit Toluol extrahiert und anschließend mit Chloroform durch *flash*-Chromatographie in einer Säule (5\*40 cm, Aluminiumoxid neutral) von Verunreinigungen befreit.

Die Reaktion fand in einer ausgeheizten Apparatur unter Argonatmosphäre und unter Lichtausschluss statt. 1.46 g (5.50 mmol) freie Base des Acridinorange (**11**) wurden mit 2.04 g (6.49 mmol) an Verbindung **10** in 120 mL Dioxan (getrocknet über Molekularsieb 4 Å) gelöst. Es fiel nach wenigen Minuten bereits ein orangefarbener bis roter Feststoff aus. Das Reaktionsgemisch wurde drei Tage unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde zentrifugiert, der Rückstand enthielt 70 Molprozent (84 Massenprozent) des gewünschten Produktes, wobei der Rest nicht umgesetzte Acridinorange-Base war. Eine Reinigung fand durch mehrfaches Digerieren mit Dioxan und erneutes Zentrifugieren statt. Hierdurch wurden Reste an Verbindung **10** aus dem Produkt entfernt. Dioxan wurde bei RT im Ölpumpenvakuum (0.25 hPa) entfernt.

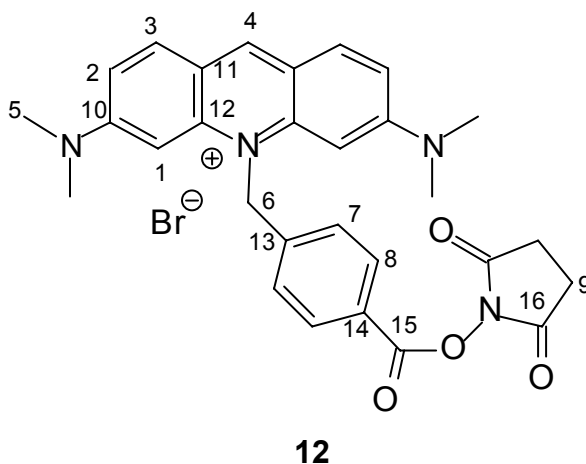
Dieses verunreinigte Produkt wurde für die weitere Umsetzung eingesetzt.

Ausbeute: 2.65 g verunreinigte Verbindung **12** (bei 84% Reinheit  $\geq$  2.23 g (3.86 mmol) reine Verbindung **12**, 70% Ausbeute an 10-[4-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yloxy(carbonyl)-benzyl]-acridinorangebromid (**12**))

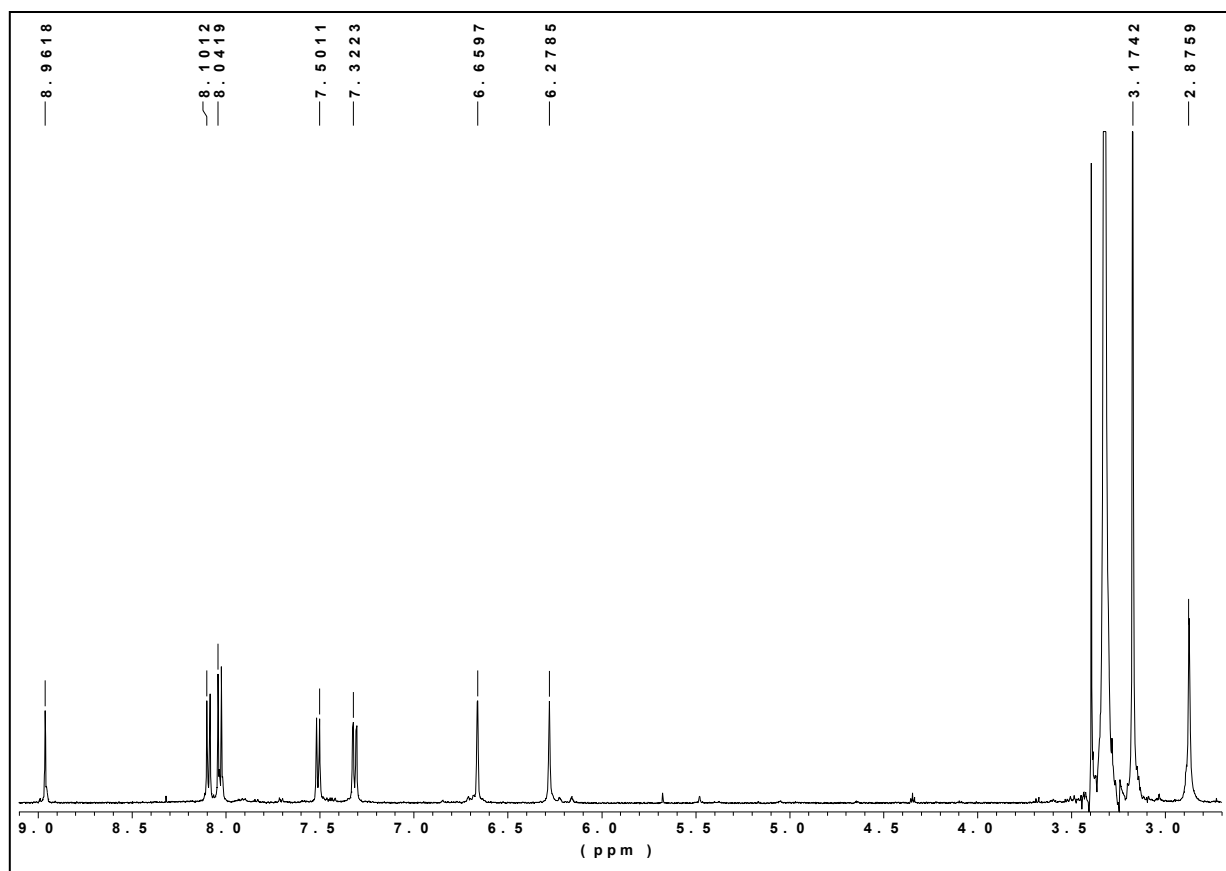
Für die Charakterisierung wurde das Produkt durch präparative Chromatographie mit einer RP-18-Säule in einer MPLC-Anlage (20 x 3 cm Säulengröße, 10 mL/min Durchflussgeschwindigkeit) gereinigt. Als Laufmittelgemisch wurde Methanol/Acetonitril in einer Zusammensetzung von 1:1 (v/v) gewählt. Das Produkt bildete die erste Fraktion, das Edukt **11** verteilte sich über die gesamte Säule. Es wurden hierzu 10 mg Rohprodukt in 2.00 mL Methanol gelöst.

Ausbeute: 4.80 mg (8.31  $\mu$ mol; 33.6%) Ausbeute an 10-[4-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yloxy(carbonyl)-benzyl]-acridinorangebromid (**12**)

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.77 (s, 1H, 4-H); 8.02 (d,  $^3J(7\text{-H}, 8\text{-H}) = 7.8$  Hz, 2H, 7-H); 7.89 (d,  $^3J(3\text{-H}, 2\text{-H}) = 9.3$  Hz, 2H, 3-H); 7.58 (d,  $^3J(8\text{-H}, 7\text{-H}) = 8.5$  Hz, 2H, 8-H); 6.92 (dd,  $^3J(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 9.3$  Hz,  $^3J(2\text{-H}, 1\text{-H}) = 1.9$  Hz, 2H, 2-H); 6.55 (s, 2H, 6-H); 6.52 (d,  $^3J(1\text{-H}, 2\text{-H}) = 1.9$  Hz, 2H, 1-H); 3.17 (s, 12H, 5-H); 2.87 (s, 4H, 9-H)



**Abb. 36:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **12** in  $\text{CDCl}_2$

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 169.15 (16-C), 161.36 (15-C), 155.56 (12-C), 143.55 (4-C), 143.04 (13-C), 141.77 (10-C), 133.30 (8-C), 130.66 (3-C), 127.12 (7-C), 124.51 (14-C), 116.77 (11-C), 113.79 (2-C), 92.25 (1-C), 67.04 (6-C), 40.90 (5-C), 25.65 (9-C).

IR (KBr-Verreibung):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3504, 3430 (w,  $\nu(\text{N-CH}_3)$ ), 3050, 2929, 2812 (m,  $\nu(\text{CH}_{\text{Aryl}})$ ), 1768, 1736 (m,  $\nu(\text{CO}_{\text{Imid}})$ ).

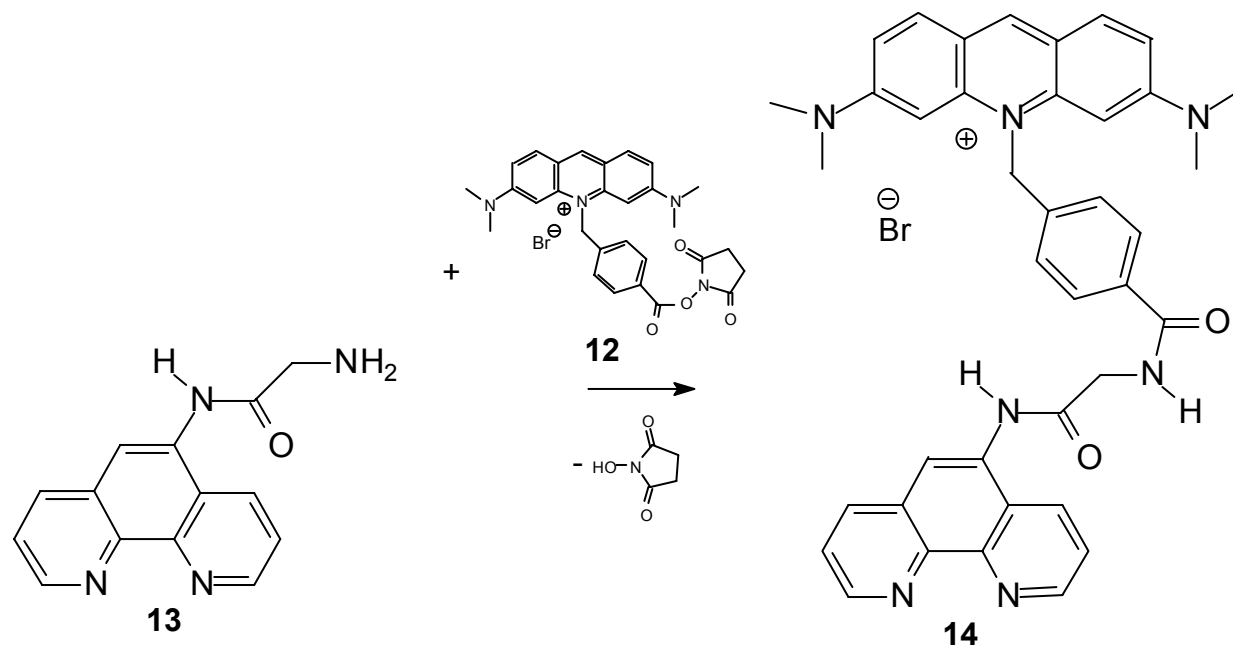
HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Methanol):

berechnet: (für  $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}$ ): 497.2183

gefunden: 497.2211

Abweichung: 5.6 ppm

9.8.10 DARSTELLUNG VON 10-(4-[(1,10-PHENANTHROLIN-5-YLCARBAMOYL METHYL)-CARBAMOYL]-BENZYL)-ACRIDINORANGEBROMID (**14**)



Verbindung **13** (178 mg, 0.71 mmol) wurde unter Argon und unter Lichtausschluss in eine ausgeheizte Apparatur gegeben. Ein 1.5-facher Überschuss an Verbindung **13** (726.0 mg Rohprodukt, entspricht 610 mg reiner Verbindung **13**) wurde zugesetzt. In 100 mL, über Molekularsieb 4 Å getrocknetem, Chloroform wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, wobei ein Niederschlag entstand. Anschließend wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Feststoff mit Chloroform digeriert. Nach Zentrifugation und Abdekantieren des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt an der Ölpumpe (0.25 hPa) von Lösungsmittelresten befreit.

Die Reinigung erfolgte chromatographisch an deaktiviertem Aluminiumoxid (Aktivitätsstufe II, 10% Wasser). Hierbei wurden 413 mg an Rohprodukt **14** in 100 mL Methanol im Ultraschallbad gelöst und am Rotationsverdampfer auf 20 mL eingengt. Es wurden 60.0 g deaktiviertes, basisches Aluminiumoxid auf eine Säule mit 4 cm Durchmesser gegeben und ein Laufmittelgemisch einer Zusammensetzung aus Methanol/Ethylacetat von 2:1 (v/v) benutzt.

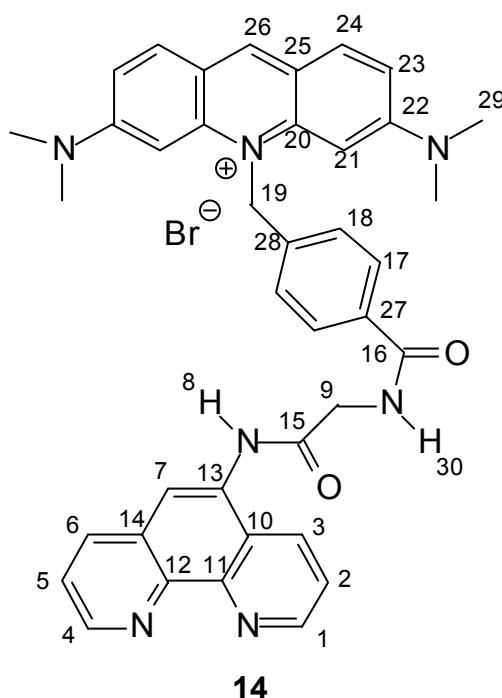
Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer und in einem Ölpumpenvakuum (0.25 hPa) von Lösungsmittelresten befreit und viermal mit Diethylether im Ultraschallbad digeriert.

Eine gründlichere Möglichkeit der Reinigung ist die Extraktion über eine Soxhletapparatur. 100 mg Rohprodukt wurden in die Soxhlethülse gegeben. Als Extraktionsmittel wurde Chloroform benutzt, sowohl Edukt, als auch Produkt werden hierbei gelöst, das Produkt kristallisiert am Rand des Vorlagekolbens sauber aus.

Ausbeute: 32.0 mg (44.8  $\mu\text{mol}$ ; 6%) an 10-(4-[(1,10-phenanthrolin-5-ylcarbamoylmethyl)-carbamoyl]-benzyl)-acridinorangebromid (**14**)

Schmelzpunkt : 230°C (Zer.)

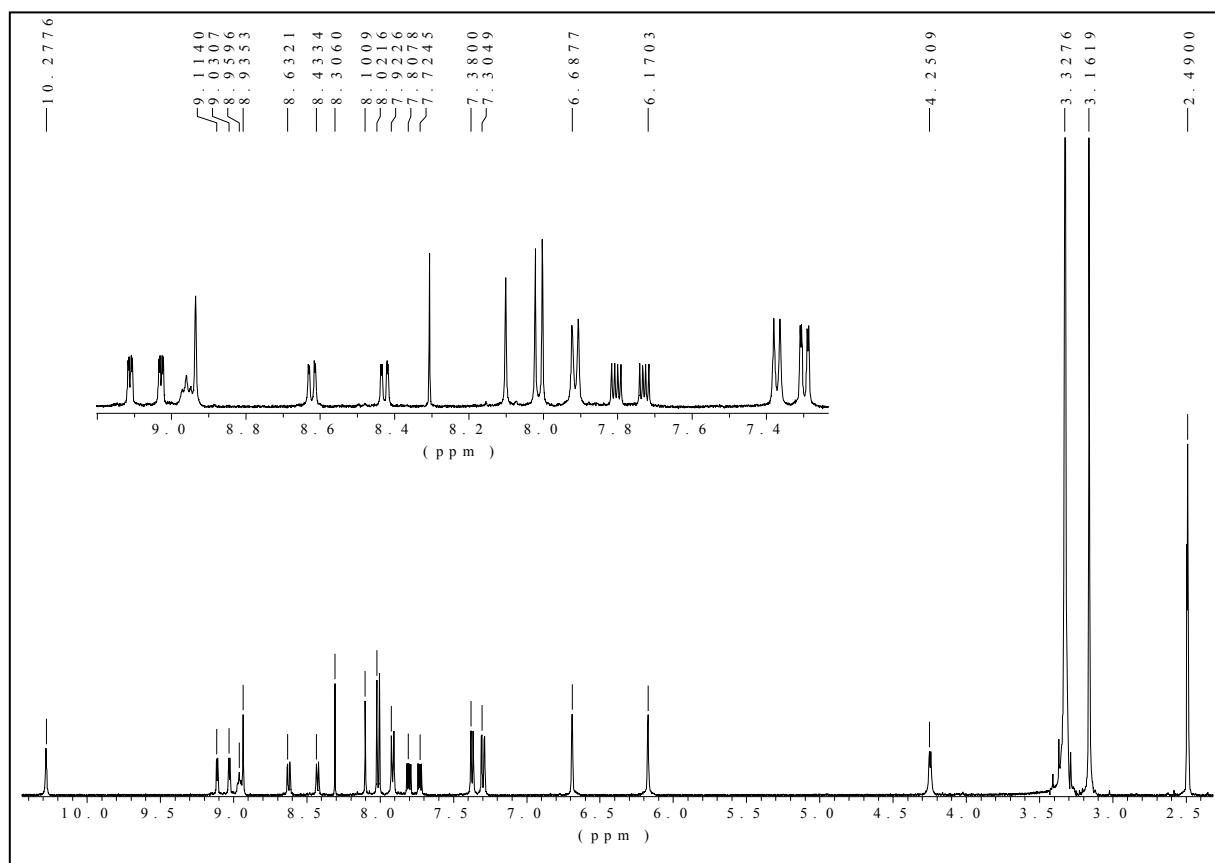
Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO  $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 10.25 (s, 1H, 8-H); 9.08 (dd,  $^3J(1\text{-H}, 2\text{-H}) = 4.1$  Hz,  $^4J(1\text{-H}, 3\text{-H}) = 1.5$  Hz, 1H, 1-H); 9.00 (dd,  $^3J(4\text{-H}, 5\text{-H}) = 4.1$  Hz,  $^4J(4\text{-H}, 6\text{-H}) = 1.5$  Hz, 1H, 4-H); 8.93 (t,  $^3J(30\text{-H},$



9-H) = 5.6 Hz, 1H, 30-H); 8.91 (s, 1H, 17-H); 8.60 (dd,  $^3J(3\text{-H}, 2\text{-H}) = 1.5$  Hz,  $^4J(3\text{-H}, 1\text{-H}) = 8.4$  Hz, 1H, 3-H); 8.40 (dd,  $^3J(6\text{-H}, 5\text{-H}) = 1.5$  Hz,  $^4J(6\text{-H}, 4\text{-H}) = 8.0$  Hz, 1H, 6-H); 8.07 (s, 1H, 7-H); 7.99 (d,  $^3J(24\text{-H}, 23\text{-H}) = 9.4$  Hz, 2H, 24-H); 7.88 (d,  $^3J(17\text{-H}, 18\text{-H}) = 8.3$  Hz, 2H, 17-H); 7.78 (dd,  $^3J(2\text{-H}, 1\text{-H}) = 4.1$  Hz,  $^3J(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 8.4$  Hz, 1H, 2-H); 7.70 (dd,  $^3J(5\text{-H}, 4\text{-H}) = 4.1$  Hz,  $^3J(5\text{-H}, 6\text{-H}) = 8.0$  Hz, 1H, 5-H); 7.34 (d,  $^3J(18\text{-H}, 17\text{-H}) = 8.3$  Hz, 2H, 18-H); 7.27 (dd,  $^3J(23\text{-H}, 24\text{-H}) = 9.4$  Hz,  $^4J(23\text{-H}, 21\text{-H}) = 2.0$  Hz, 2H, 23-H); 6.67 (d,  $^4J(21\text{-H}, 23\text{-H}) = 2.0$  Hz, 2H, 21-H); 6.15 (s, 2H, 19-H); 4.25 (d,  $^3J(9\text{-H}, 30\text{-H}) = 5.6$  Hz, 2H, 9-H); 3.14 (s, 12H, 18-H).



**Abb. 37:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **14** in  $\text{CDCl}_3$

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 169.15 (15-C), 166.38 (16-C), 155.56 (22-C), 149.88 (1-C), 149.41 (4-C), 145.79 (11-C), 143.52 (26-C), 143.07 (20-C), 138.47 (28-C), 135.79 (6-C), 133.30 (27-C),

133.16 (24-C), 131.81 (3-C), 131.61 (14-C), 128.11 (17-C), 126.40 (18-C), 124.80 (10-C), 123.57 (5-C), 122.81 (2-C), 120.40 (7-C), 116.62 (25-C), 114.48 (23-C), 93.21 (21-C), 50.40 (19-C), 43.31 (9-C), 41.11 (29-C).

IR (KBr-Verreibung):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3404 (w,  $\nu(\text{N-CH}_3)$ ), 3230 (w,  $\nu(\text{NH})$ ), 1599 (s,  $\nu(\text{CH}_{\text{Aryl}})$ ).

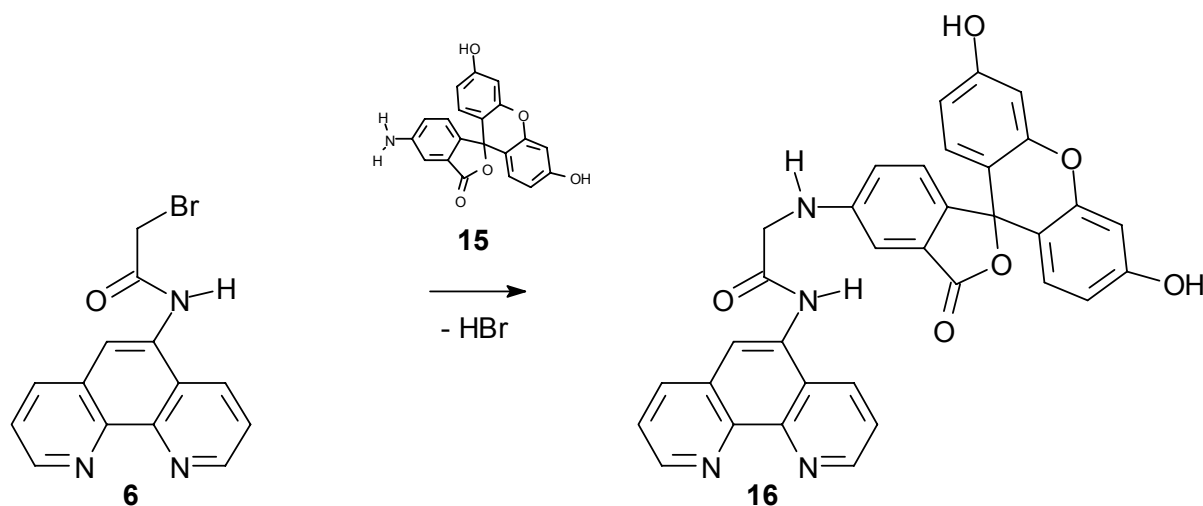
HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Methanol):

berechnet: (für  $\text{C}_{39}\text{H}_{36}\text{N}_7\text{O}_2$ ): 634.2925

gefunden: 634.2898

Abweichung: 4.2 ppm

### 9.8.11 DARSTELLUNG VON 2-(5-AMINO-FLUORESCEIN)-*N*-(1,10-PHENANTHROLIN-5-YL)ACETAMID (**16**)



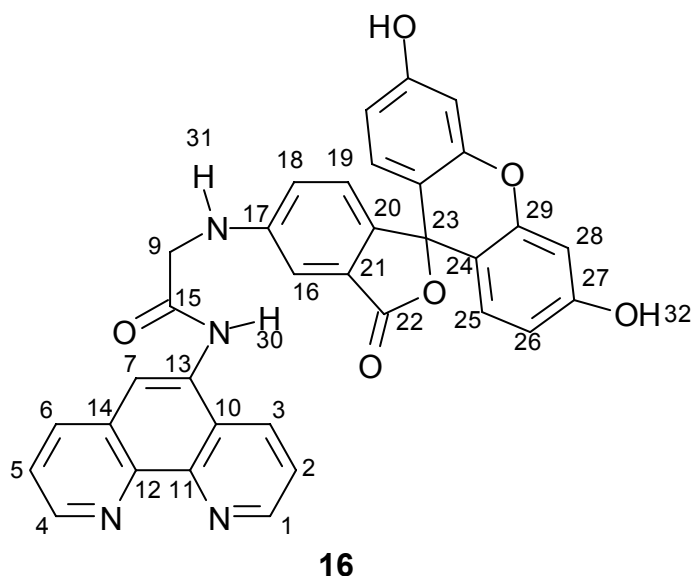
820 mg (2.36 mmol) 5-Aminofluorescein (**15**) und 747 mg (2.36 mmol) an Verbindung **6** wurden in 150 mL trockenem (Molekularsieb 4Å) DMF über 16 h bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre im ausgeheizten 250 mL Kolben gerührt. Abdampfung des Lösungsmittels bei 30°C und einem Ölpumpenvakuum von 0.25 hPa führte zu einem hellbraunen Harz, welches nach dreimaligem Digerieren für 10 min mit bidestilliertem Wasser im Ultraschallbad mit jeweils anschließender Zentrifugation und Abdampfen des Überstandes zu einem hellbraunen Pulver führte.

Abschließende Entfernung des Wassers fand bei einer Temperatur von 100°C und einem Ölpumpenvakuum von 0.25 hPa über Phosphor(V)-oxid statt. 10.0 mg dieses Rohprodukts wurden in 5.00 mL Methanol gelöst. An diesen Kolben wurde ein „Kristallisationspilz“, welcher mit 8.00 mL Diethylether gefüllt war, angebracht. Nach 6 Wochen bei Raumtemperatur bildete sich ein gelber Film an der Glaswand. Dieser Film war das gereinigte Produkt.

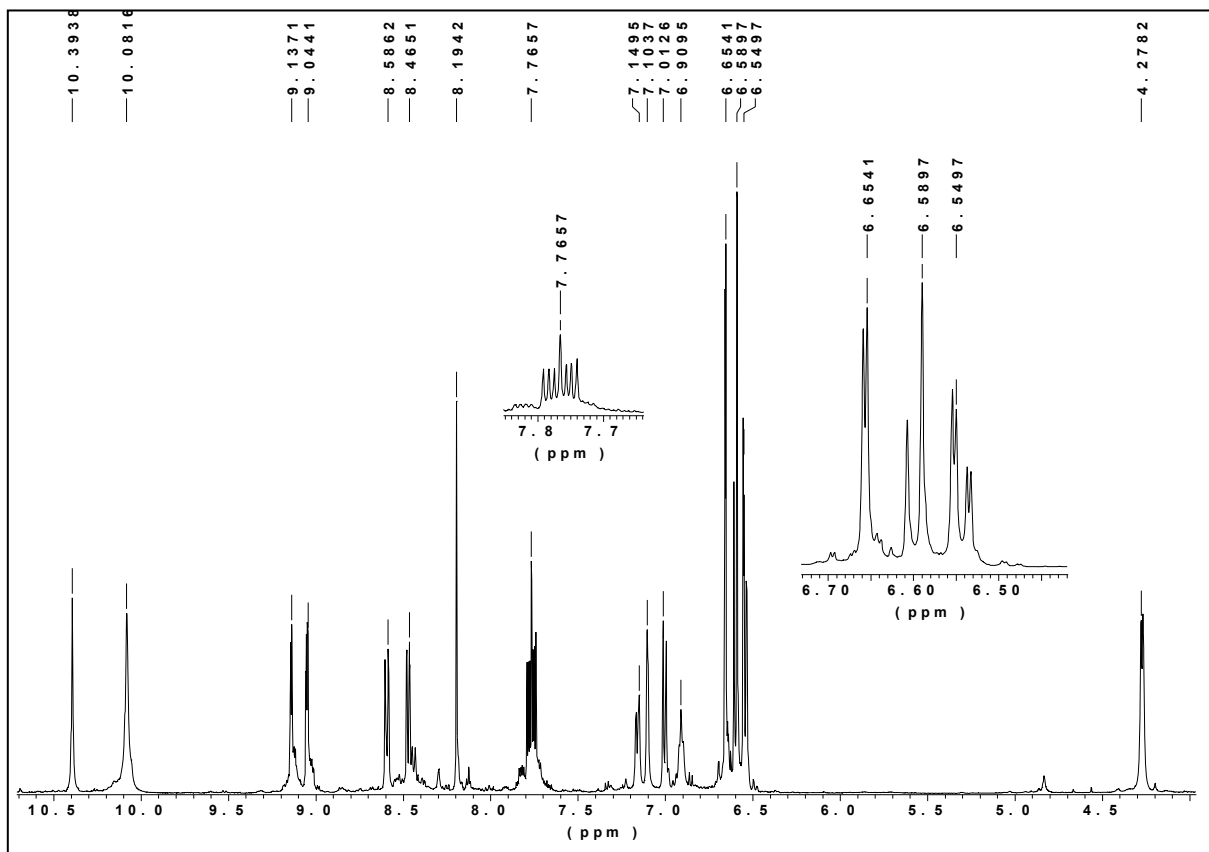
Ausbeute: 5.30 mg (9.10  $\mu$ mol; 28%) an 2-(5-amino-fluorescein)-*N*-(1,10-phenanthroline-5-yl)-acetamid (**16**).

Schmelzpunkt: 230°C (Zers.)

Charakterisierung:



H-NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 10.39 (s, 1H, 30-H); 10.08 (s, 2H, 32-H); 9.14 (dd,  $^3J(1\text{-H}, 2\text{-H}) = 4.4$  Hz,  $^4J(1\text{H}, 3\text{-H}) = 1.6$  Hz, 1H, 1-H); 9.05 (dd,  $^3J(4\text{-H}, 5\text{-H}) = 4.9$  Hz,  $^4J(4\text{-H}, 6\text{-H}) = 1.7$  Hz, 1H, 4-H); 8.59 (dd,  $^3J(3\text{-H}, 2\text{-H}) = 8.4$  Hz,  $^4J(3\text{-H}, 1\text{-H}) = 1.6$  Hz, 1H, 3-H); 8.47 (dd,  $^3J(6\text{-H}, 5\text{-H}) = 8.2$  Hz,  $^4J(6\text{-H}, 4\text{-H}) = 1.7$  Hz, 1H, 6-H); 8.19 (s, 1H, 7-H); 7.78 (dd,  $^3J(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 8.4$  Hz,  $^3J(2\text{-H}, 1\text{-H}) = 4.4$  Hz, 1H, 2-H); 7.75 (dd,  $^3J(5\text{-H}, 6\text{-H}) = 8.2$  Hz,  $^3J(5\text{-H}, 4\text{-H}) = 4.9$  Hz, 1H, 5-H); 7.17 (dd,  $^3J(18\text{-H}, 19\text{-H}) = 8.4$  Hz,  $^4J(18\text{-H}, 16\text{-H}) = 1.5$  Hz, 1H, 18-H); 7.10 (d,  $^4J(16\text{-H}, 18\text{-H}) = 1.5$  Hz, 1H, 16-H); 7.00 (d,  $^3J(19\text{-H}, 18\text{-H}) = 8.4$  Hz, 1H, 19-H); 6.91 (t,  $^3J(31\text{-H}, 9\text{-H}) = 5.83$  Hz, 1H, 31-H); 6.66 (d,  $^4J(28\text{-H}, 26\text{-H}) = 2.3$  Hz, 1H, 28-H); 6.54 (d,  $^3J(25\text{-H}, 26\text{-H}) = 8.6$  Hz, 2H, 25-H); 6.54 (dd,  $^3J(26\text{-H}, 25\text{-H}) = 8.6$  Hz,  $^4J(26\text{-H}, 28\text{-H}) = 2.3$  Hz, 2H, 26-H); 4.27 (d,  $^3J(9\text{-H}, 31\text{-H}) = 5.83$  Hz, 2H, 9-H).



**Abb. 38:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **16** in  $\text{DMSO-d}_6$

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 170.25 (15-C), 169.56 (22-C), 159.37 (29-C), 152.05 (23-C), 150.13 (1-C o. 12-C), 150.08 (1-C o. 12-C), 149.62 (4-C), 145.93 (10-C), 143.96 (14-C), 140.68 (17-C), 130.03 (6-C), 131.71 (3-C), 131.48 (11-C), 129.03 (25-C), 128.11 (21-C), 127.55 (20-C), 124.87 (13-C), 124.32 (19-C), 123.78 (5-C), 122.92 (2-C), 121.47 (18-C), 120.66 (7-C), 112.54 (26-C), 110.57 (27-C), 104.00 (16-C), 102.28 (28-C), 82.92 (24-C), 46.89 (9-C).

IR (KBr-Verreibung):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3356 (w,  $\nu(\text{OH})$ ), 3230, 3100 (m,  $\nu(\text{NH})$ ), 2962, 2936, 2875 (m,  $\nu(\text{CH}_{\text{Aryl}})$ ), 1693 (s,  $\nu(\text{CO}_{\text{Amid}})$ ), 1605 (m,  $\nu(\text{CC}_{\text{Aryl}})$ ), 1504, 1467 (m,  $\delta(\text{NH}_{\text{Amin}})$ ), 1113 (s,  $\delta(\text{OH})$ ).

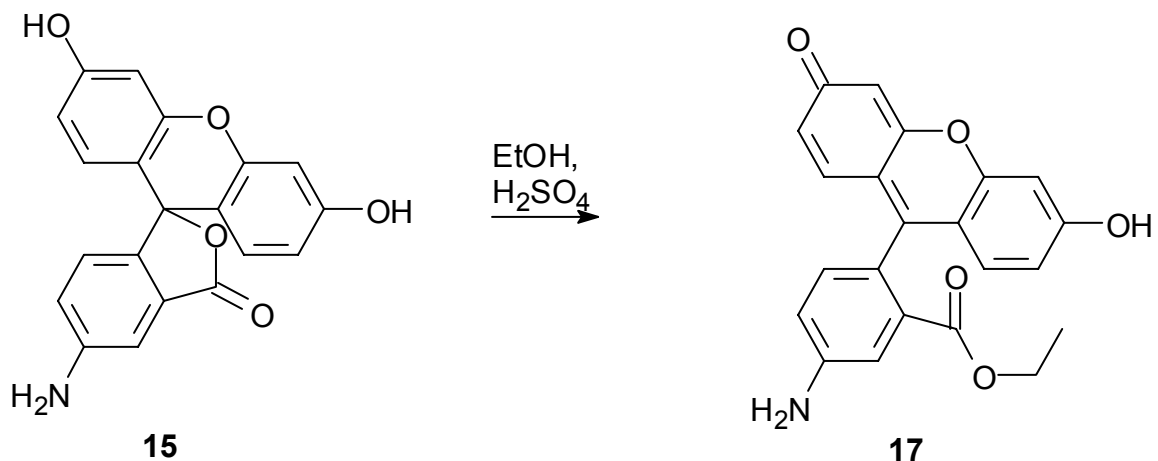
HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Methanol):

berechnet: (für  $C_{34}H_{22}N_4NaO_6$ ,  $MNa^+$ ): 605.1440

gefunden: 605.1432

Abweichung: 1.3 ppm

### 9.8.12 DARSTELLUNG VON 5-AMINO-ETHYLFLUORESCEIN (**17**)



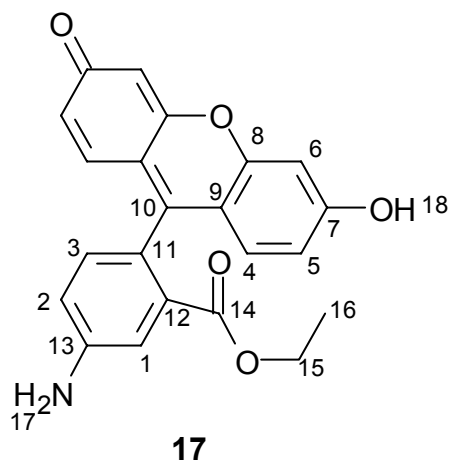
330 mg 5-Aminofluorescein (**15**) wurden in 720 mg Ethanol und 500 mg Schwefelsäure (konz., p. A.) in der Hitze gelöst und 16 h unter Rückfluss erhitzt. Diese Lösung wurde heiss zu 2 g Eis gegeben und der Niederschlag abzentrifugiert. Der grünlich-gelbe Niederschlag wurde dreimal mit Wasser im Ultraschallbad digeriert und jeweils abzentrifugiert.

Gereinigt wurde das Produkt chromatographisch an neutralem Aluminiumoxid mit dem Laufmittel Aceton/Wasser 5:1 (v/v), wobei die stationäre Phase 3.5 cm hoch in einer Säule mit einem Innendurchmesser von 1.5 cm eingefüllt wurde. Das Produkt **17** befand sich in der ersten Fraktion. Das Eluat wurde bis auf drei mL am Rotationsverdampfer eingeeengt. Aus der wässrigen Lösung fiel das Produkt sauber aus. Getrocknet wurde das hellrote Produkt in einer Trockenpistole an Phosphor(V)-oxid bei einer Temperatur von 100°C im Ölpumpenvakuum von 0.25 hPa.

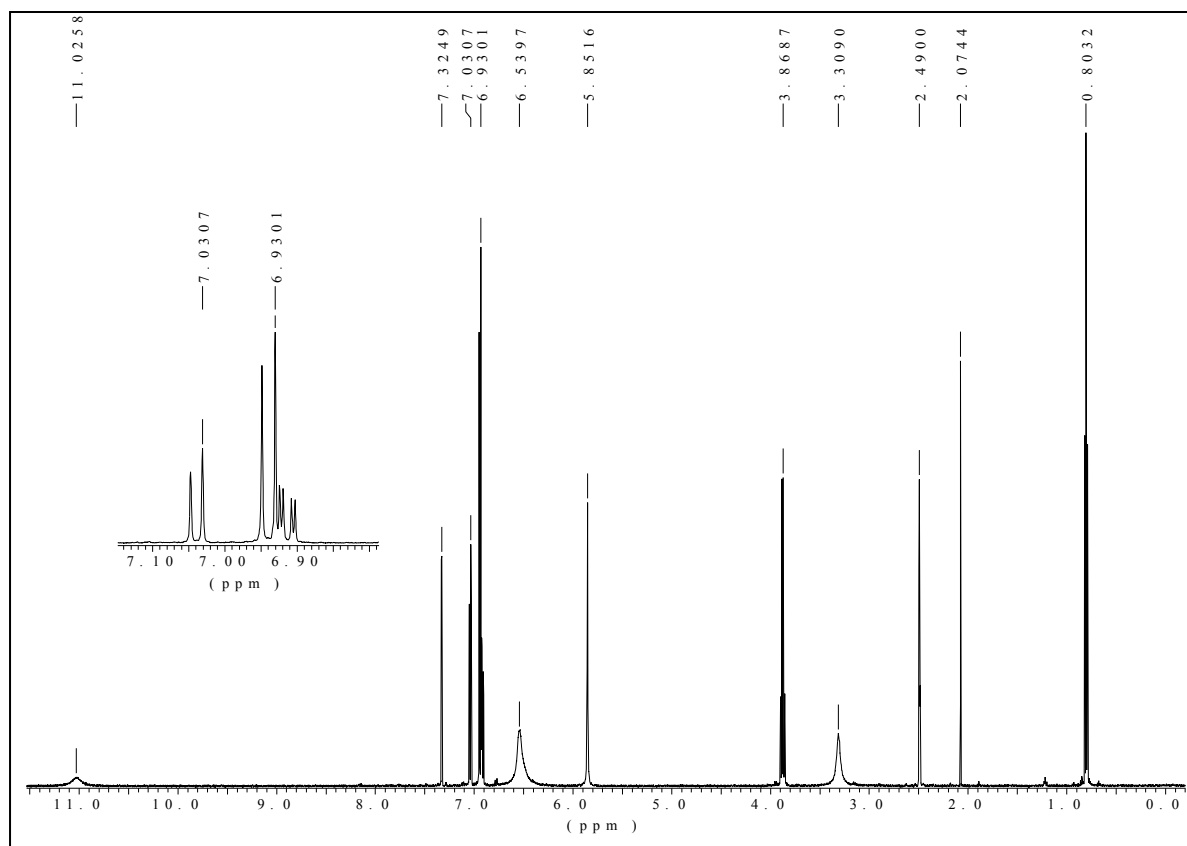
Ausbeute: 356 mg (0.95 mmol; 40%) an 5-Amino-ethylfluorescein (**17**)

Schmelzpunkt: 195°C (Zers.)

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 11.03 (s, 1H, 18-H); 7.33 (d,  $^4\text{J}(1\text{-H}, 2\text{-H}) = 2.3$  Hz, 1H, 1-H); 7.05 (d,  $^3\text{J}(3\text{-H}, 2\text{-H}) = 8.2$  Hz, 1H, 3-H); 6.95 (dd,  $^3\text{J}(5\text{-H}, 4\text{-H}) = 9.3$  Hz,  $^4\text{J}(5\text{-H}, 6\text{-H}) = 1.8$  Hz, 2H, 5-H); 6.92 (dd,  $^3\text{J}(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 8.2$  Hz,  $^4\text{J}(2\text{-H}, 1\text{-H}) = 2.3$  Hz, 1H, 2-H); 6.49 (d,  $^3\text{J}(4\text{-H}, 5\text{-H}) = 9.3$  Hz, 2H, 6-H); 6.46 (d,  $^3\text{J}(6\text{-H}, 5\text{-H}) = 1.8$  Hz, 2H, 6-H); 5.86 (s, 2H, 17-H); 3.88 (q,  $^3\text{J}(15\text{-H}, 16\text{-H}) = 7.1$  Hz, 2H, 15-H); 0.80 (t,  $^4\text{J}(16\text{-H}, 15\text{-H}) = 7.1$  Hz, 3H, 16-H).



**Abb. 39:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **17** in  $\text{DMSO-d}_6$

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 165.63 (14-C), 156.19 (8-C), 152.20 (13-C), 149.98 (12-C), 131.34 (3-C), 131.01 (11-C), 130.21 (5-C), 121.30 (7-C), 119.40 (10-C), 116.30 (2-C), 115.00 (9-C), 114.84 (1-C), 103.00 (6-C, 4-C), 60.43 (15-C), 13.27 (16-C).

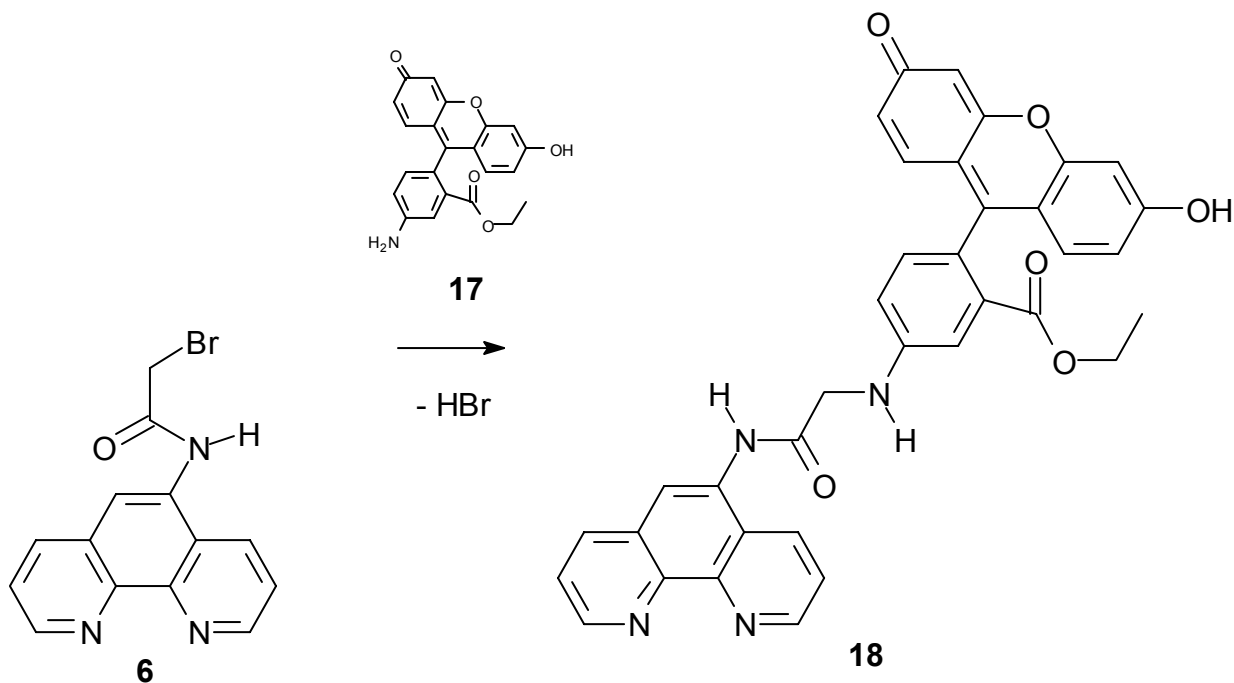
IR (KBr-Verreibung):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3445 (m,  $\nu(\text{OH})$ ), 3333, 3214 (m,  $\nu(\text{NH}_2)$ ), 1695 (s,  $\nu(\text{CO}_{\text{Amid}})$ ), 1605 (m,  $\nu(\text{CC}_{\text{Aryl}})$ ), 1444 (m,  $\delta(\text{NH}_{\text{Amin}})$ ), 1106 (s,  $\delta(\text{OH})$ ).

HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Methanol):

berechnet: (für $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{NO}_5$ , $\text{MH}^+$ ):	376.1185
gefunden:	376.1181
Abweichung:	1.1 ppm



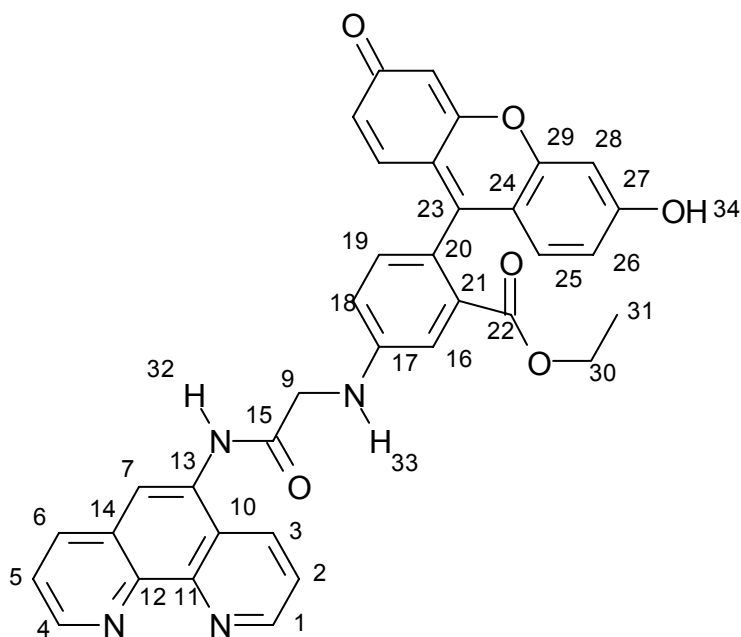
9.8.13 DARSTELLUNG VON 2-(5-AMINO-FLUORESCEIN-ETHYLESTER)-*N*-(1,10-PHENANTHROLIN-5-YL)ACETAMID (**18**)



574 mg (1.53 mmol) an Verbindung **17** und 414 mg (1.31 mmol) an Verbindung **6** wurden in 100 mL - über Molekularsieb 4Å getrocknetem - DMF für 72 h bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre im ausgeheizten 250 mL Rundkolben gerührt. Die von Beginn an rote Lösung wurde mit der Zeit dunkler. Das Giessen auf 650 mL Diethylether nach beendeter Reaktion führte zu einem mittelbraunen Niederschlag, welcher nach Abkühlen auf  $-10^{\circ}\text{C}$  durch Abdekantieren und anschließender Abzentrifugation isoliert wurde. Trocknung bei  $25^{\circ}\text{C}$  und einem Ölpumpenvakuum von 0.25 hPa führte zu einem roten, pulverigen Rohprodukt. Dieses Rohprodukt wurde dreimal mit bidestilliertem Wasser im Ultraschallbad bei Raumtemperatur für 15 min digeriert.

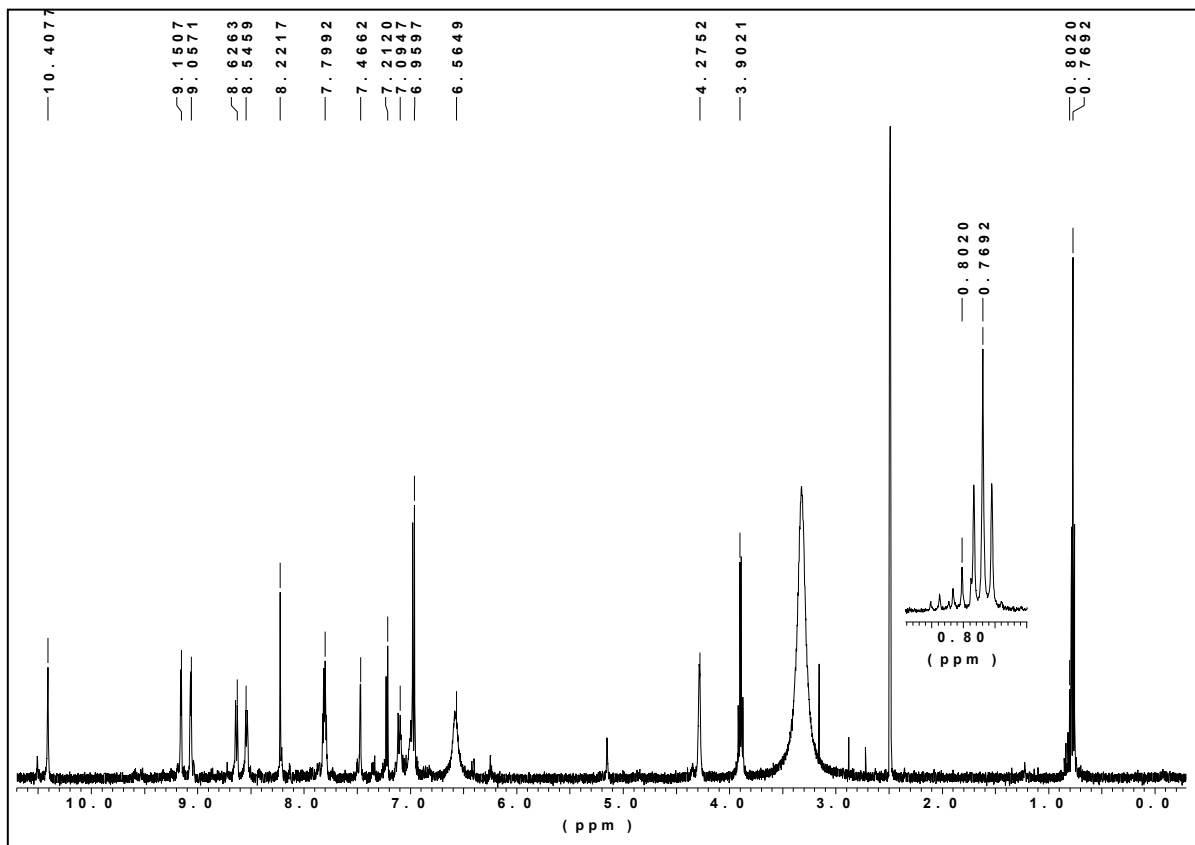
Ausbeute: 360 mg (0.69 mmol; 45%) an 2-(5-amino-fluorescein-ethylester)-*N*-(1,10-phenanthroline-5-yl)acetamid (**18**) Rohprodukt

Charakterisierung:



18

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 10.50 (s, 1H, 32-H); 9.16 (dd,  $^3\text{J}(1\text{-H}, 2\text{-H}) = 4.3$  Hz,  $^4\text{J}(1\text{H}, 3\text{-H}) = 1.6$  Hz, 1H, 1-H); 9.06 (dd,  $^3\text{J}(4\text{-H}, 5\text{-H}) = 4.9$  Hz,  $^4\text{J}(4\text{-H}, 6\text{-H}) = 1.7$  Hz, 1H, 4-H); 8.63 (dd,  $^3\text{J}(3\text{-H}, 2\text{-H}) = 8.4$  Hz,  $^4\text{J}(3\text{-H}, 1\text{-H}) = 1.6$  Hz, 1H, 3-H); 8.54 (dd,  $^3\text{J}(6\text{-H}, 5\text{-H}) = 8.2$  Hz,  $^4\text{J}(6\text{-H}, 4\text{-H}) = 1.7$  Hz, 1H, 6-H); 8.22 (s, 1H, 7-H); 7.81 (dd,  $^3\text{J}(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 8.4$  Hz,  $^4\text{J}(2\text{-H}, 1\text{-H}) = 4.3$  Hz, 1H, 8-H); 7.79 (dd,  $^3\text{J}(5\text{-H}, 6\text{-H}) = 8.2$  Hz,  $^4\text{J}(5\text{-H}, 4\text{-H}) = 4.9$  Hz, 1H, 5-H); 7.47 (d,  $^4\text{J}(16\text{-H}, 18\text{-H}) = 2.1$  Hz, 1H, 16-H); 7.22 (d,  $^3\text{J}(19\text{-H}, 18\text{-H}) = 8.4$  Hz, 1H, 19-H); 7.11 (dd,  $^3\text{J}(18\text{-H}, 19\text{-H}) = 8.4$  Hz,  $^4\text{J}(18\text{-H}, 16\text{-H}) = 2.1$  Hz, 1H, 18-H); 7.00 (d,  $^3\text{J}(33\text{-H}, 9\text{-H}) = 3.0$  Hz, 2H, 33-H); 6.97 (d,  $^3\text{J}(25\text{-H}, 26\text{-H}) = 8.0$  Hz, 2H, 25-H); 6.67 - 6.44 (m, 4H, 26-H, 28-H); 4.28 (d,  $^3\text{J}(9\text{-H}, 33\text{-H}) = 3.0$  Hz, 2H, 9-H); 3.89 (q,  $^3\text{J}(30\text{-H}, 31\text{-H}) = 7.1$  Hz, 2H, 30-H); 0.77 (t,  $^4\text{J}(31\text{-H}, 30\text{-H}) = 7.1$  Hz, 3H, 31-H);



**Abb. 40:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **18** in  $\text{DMSO-d}_6$

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 169.42 (15-C), 165.71 (22-C), 151.75 (29-C), 150.02 (1-C), 149.48 (4-C), 149.37 (21), 145.85 (10-C), 143.90 (14-C), 135.87 (6-C), 131.66 (3-C), 131.45 (9-C o. 11-C), 131.37 (9-C o. 11-C), 131.18 (12-C), 131.02 (20-C), 128.00 (26-C), 124.79 (13-C), 123.63 (5-C), 122.74 (2-C), 120.57 (7-C), 120.19 (17-C), 119.37 (27-C), 116.97 (23-C), 115.63 (18-C), 114.87 (24-C), 113.63 (16-C), 60.62 (30-C), 45.57 (9-C), 13.24 (31-C).

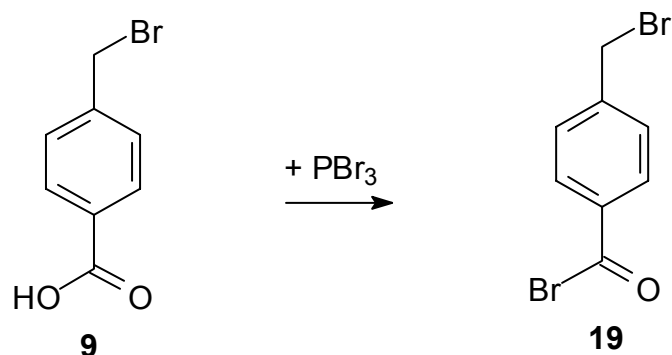
HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Methanol):

berechnet: (für  $\text{C}_{36}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_6$ ,  $\text{MH}^+$ ): 611.1925

gefunden: 611.1948

Abweichung: 3.7 ppm

IR (KBr-Verreibung):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3371 (w,  $\nu(\text{OH})$ ), 3230 (w,  $\nu(\text{NH})$ ), 3050, 2950 (m,  $\nu(\text{CH}_{\text{Aryl}})$ ), 1712 (m,  $\nu(\text{CO}_{\text{Ester}})$ ), 1594 (m,  $\nu(\text{CC}_{\text{Aryl}})$ ), 1511, 1468 (m,  $\delta(\text{NH}_{\text{Amin}})$ ), 1113 (s,  $\delta(\text{OH})$ ).

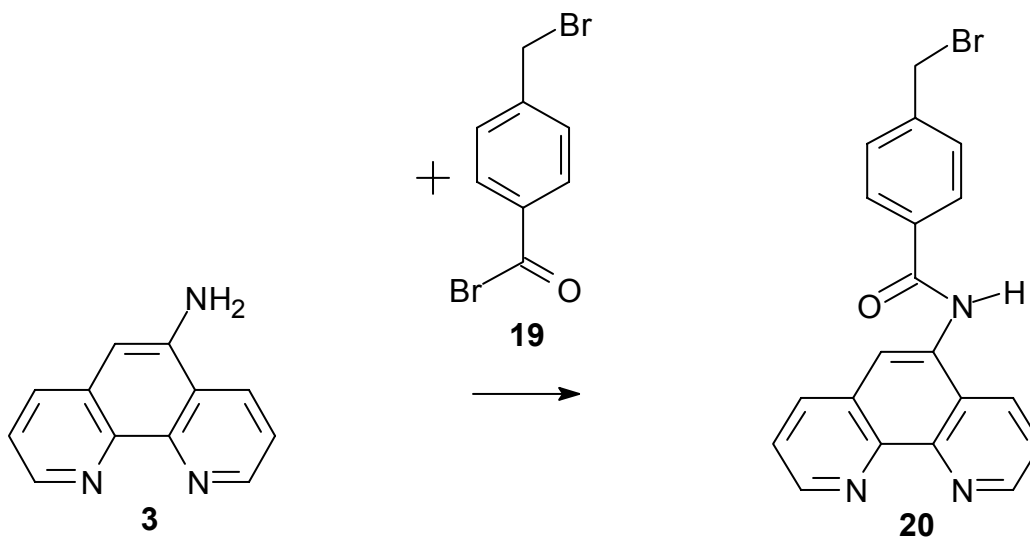
9.8.14 DARSTELLUNG VON 4-(BROMMETHYL)-BENZOYLBROMID<sup>[149]</sup> (BBB, 19)

5.0 g (23.5 mmol) 4-Bromomethyl-benzoesäure (**9**) wurden in 15.0 mL (0.16 mmol) Phosphortribromid für 5 h unter Rückfluss gerührt. Der orangefarbene Niederschlag wurde von der hellgelben, viskosen Lösung abdekantiert. Flüchtige Bestandteile der Lösung wurden im Ölpumpenvakuum von 0.25 hPa und einer Temperatur von 50 °C abkondensiert. Der gelbe Rückstand wurde in 50.0 mL Toluol aufgenommen, unlösliche Bestandteile unter Schutzgas abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum entfernt.

Da das Produkt nicht stabil genug für eine NMR-spektroskopische Untersuchung ist, musste auf diese verzichtet werden.

Ausbeute: 6.01 g (21.9 mmol; 93%) an 4-(Bromomethyl)-benzoylbromid (**19**)

9.8.15 DARSTELLUNG VON 4-(BROMMETHYL)-*N*-(1,10-PHENANTHROLIN-5-YL)BENZAMID<sup>[11]</sup> (**20**)

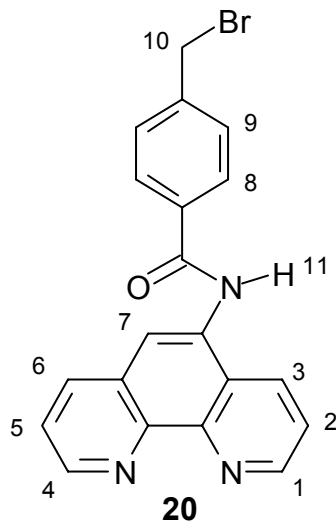


1.30 g (6.70 mmol) 5-Amino-1,10-phenanthroline (**3**) wurde in 100 mL absolutes Acetonitril gegeben. Zu der Suspension wurde eine Lösung aus 2.39 g (8.60 mmol) 4-Bromomethyl-benzoylbromid (**19**) in 50.0 mL trockenem Acetonitril zugetropft. Nach 20 h Rühren bei Raumtemperatur wurde der entstandene, orangefarbene Niederschlag über eine D4-Glasfritte abfiltriert. Der Feststoff wurde sukzessive mit einmal 10.0 mL Acetonitril, zweimal mit je 20.0 mL 5%iger, wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung aufgeschlämmt und abfiltriert, anschließend wurde zweimal mit je 20.0 mL Wasser gewaschen. Der beigefarbene Feststoff (**20**) wurde im Exsikkator über Phosphor(V)-oxid getrocknet.

Ausbeute: 1.01 g (5.70 mmol; 85%) an 4-(Bromomethyl)-*N*-(1,10-Phenanthroline-5-yl)benzamid (**20**)

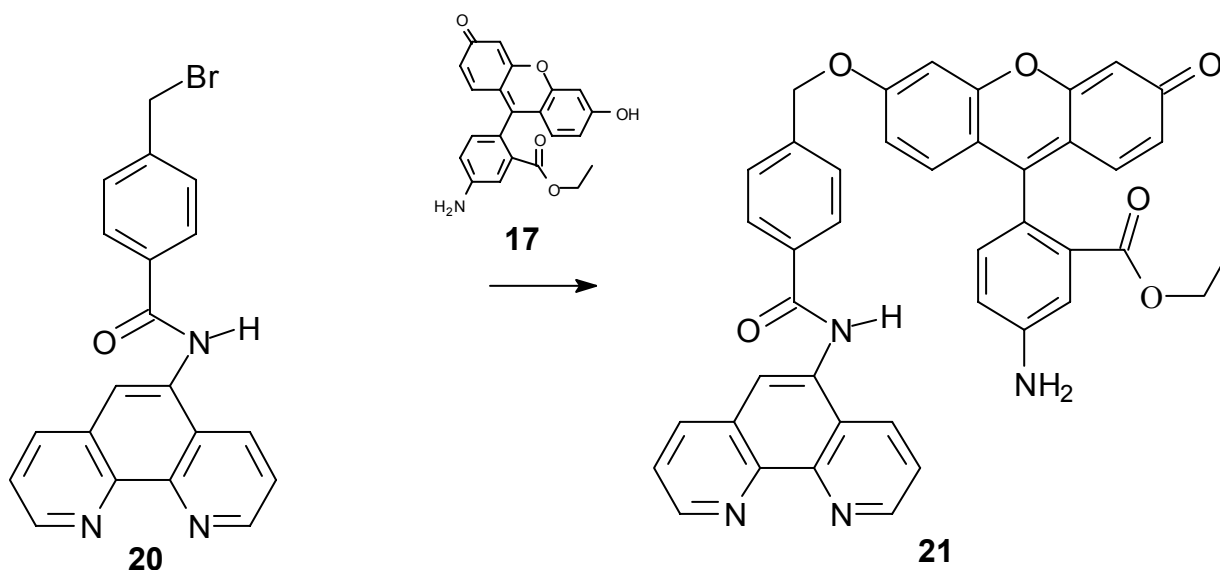
Schmelzpunkt: 228 °C (Zers.)

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 11.00 (s, 1H, 11-H); 9.31 (dd,  $^3\text{J}(4\text{-H}, 5\text{-H}) = 4.6$  Hz,  $^4\text{J}(4\text{-H}, 6\text{-H}) = 1.1$  Hz, 1H, 4-H); 9.25 (dd,  $^3\text{J}(1\text{-H}, 2\text{-H}) = 4.9$  Hz,  $^4\text{J}(1\text{-H}, 3\text{-H}) = 1.3$  Hz, 1H, 1-H); 9.10 (dd,  $^3\text{J}(3\text{-H}, 2\text{-H}) = 8.2$  Hz,  $^4\text{J}(3\text{-H}, 1\text{-H}) = 1.0$  Hz, 1H, 3-H); 8.98 (dd,  $^3\text{J}(6\text{-H}, 5\text{-H}) = 8.5$  Hz,  $^4\text{J}(6\text{-H}, 4\text{-H}) = 1.1$  Hz, 1H, 6-H); 8.49 (s, 1H, 7-H); 8.20 (dd,  $^3\text{J}(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 8.2$  Hz,  $^3\text{J}(2\text{-H}, 1\text{-H}) = 5.0$  Hz, 1H, 2-H); 8.14 – 8.17 (m,  $^3\text{J}(8\text{-H}, 9\text{-H}) = 8.3$  Hz, 3H, 5-H, 8-H), 7.68 (d,  $^3\text{J}(9\text{-H}, 8\text{-H}) = 8.3$  Hz, 2H, 9-H); 4.82 (s, 2H, 10-H).

9.8.16 DARSTELLUNG VON 5-AMINO-2-(3-OXO-6-[4-([1,10]PHENANTHROLIN-5-YLCARBAMOYL)-BENZYLOXY]-3H-XANTHEN-9-YL)BENZOEÄUREESTER (**21**)



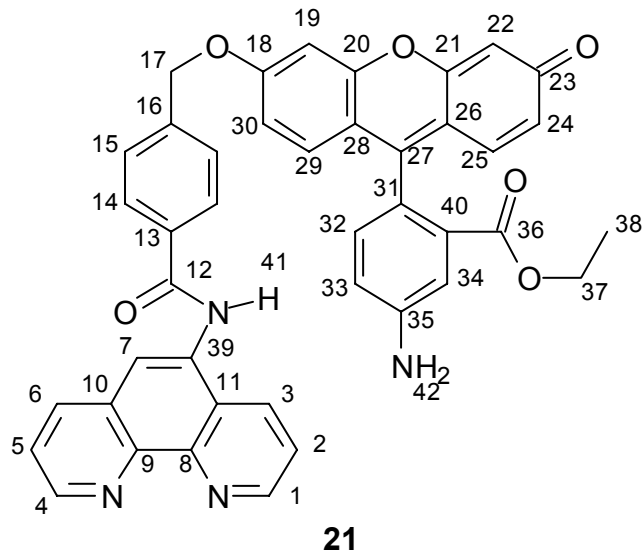
216 mg (576  $\mu\text{mol}$ ) an Verbindung **17**, 338 mg (876  $\mu\text{mol}$ ) an Verbindung **20** und 8.00 g (75.5 mmol) Natriumcarbonat (wasserfrei) wurden in 100 mL - über Molekularsieb  $4\text{\AA}$  getrocknetem - DMF für 72 h bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre im ausgeheizten 250 mL Rundkolben gerührt. Das Reaktionsende der von Beginn an orangefarbenen Lösung wurde per ESI-MS kontrolliert. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer auf ein Volumen von 4.00 mL eingengt und durch Giessen auf 16.0 mL Diethylether ein brauner Niederschlag ausgefällt, der durch Abzentrifugation isoliert wurde. Trocknung bei  $25^\circ\text{C}$  im Ölpumpenvakuum von 0.25 hPa führte zu einem roten, pulverigem Rohprodukt. Dieses Rohprodukt wurde zweimal mit Wasser im Ultraschallbad für 15 min digeriert. Die Rohausbeute lag bei 170 mg (247  $\mu\text{mol}$ , 43%).

30 mg (43.7  $\mu\text{mol}$ ) dieses Rohprodukts wurden säulenchromatographisch an basischem Aluminiumoxid (150 g) getrennt. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Dichlormethan/*n*-Hexan/Ethanol (10:4:1, v/v/v) verwendet.

Ausbeute: 8.2 mg (12.0  $\mu\text{mol}$ , 12%) an 5-Amino-2-(3-oxo-6-[4-([1,10]phenanthrolin-5-ylcarbamoyl)-benzyloxy]-3h-xanthen-9-yl)benzoe-

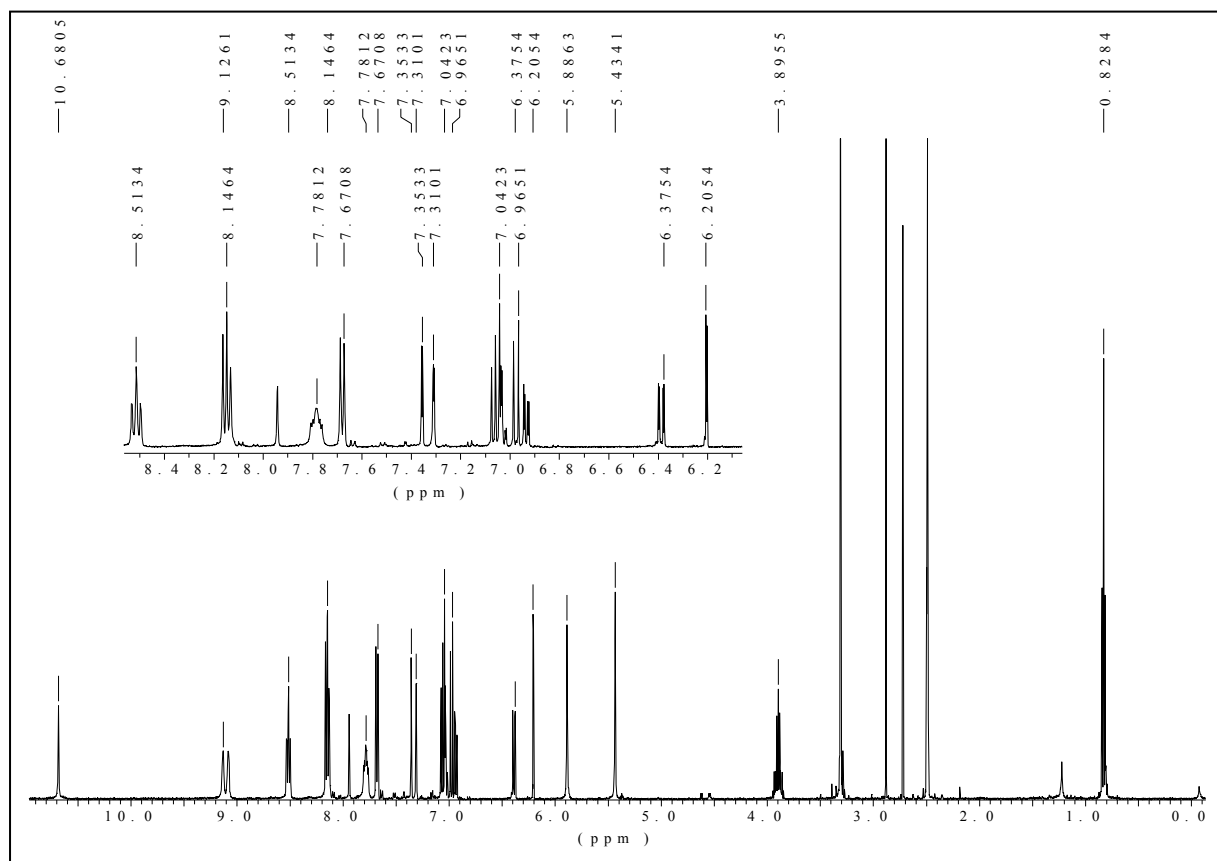
säureester (**21**).

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 10.68 (s, 1H, 41-H); 9.13 (d,  $^3\text{J}(4\text{-H}, 5\text{-H}) = 3.1$  Hz, 1H, 4-H); 9.08 (d,  $^3\text{J}(1\text{-H}, 2\text{-H}) = 3.1$  Hz, 1H, 1-H); 8.52 (d,  $^3\text{J}(3\text{-H}, 2\text{-H}) = 9.0$  Hz, 1H, 3-H); 8.50 (d,  $^3\text{J}(6\text{-H}, 5\text{-H}) = 9.0$  Hz, 1H, 6-H); 8.15 (d,  $^3\text{J}(14\text{-H}, 15\text{-H}) = 8.2$  Hz, 2H, 14-H); 8.13 (s, 1H, 7-H); 7.82 – 7.74 (m,  $^3\text{J}(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 9.0$  Hz,  $^3\text{J}(5\text{-H}, 4\text{-H}) = 3.1$  Hz, 2H, 2-H, 5-H); 7.68 (d,  $^3\text{J}(15\text{-H}, 14\text{-H}) = 8.2$  Hz, 2H, 15-H); 7.36 (d,  $^4\text{J}(34\text{-H}, 33\text{-H}) = 2.4$  Hz, 1H, 34-H); 7.31 (d,  $^4\text{J}(19\text{-H}, 30\text{-H}) = 2.0$  Hz, 1H, 19-H); 7.07 (d,  $^3\text{J}(32\text{-H}, 33\text{-H}) = 8.2$  Hz, 1H, 32-H); 7.05 – 7.01 (m,  $^4\text{J}(30\text{-H}, 19\text{-H}) = 2.0$  Hz, 2H, 19-H, 30-H); 6.97 (d,  $^3\text{J}(25\text{-H}, 24\text{-H}) = 9.7$  Hz, 1H, 25-H); 6.93 (dd,  $^3\text{J}(33\text{-H}, 32\text{-H}) = 8.3$  Hz,  $^4\text{J}(33\text{-H}, 32\text{-H}) = 2.4$  Hz, 1H, 33-H); 6.39 (dd,  $^3\text{J}(24\text{-H}, 25\text{-H}) = 9.7$  Hz,  $^4\text{J}(24\text{-H}, 22\text{-H}) = 2.0$  Hz, 1H, 24-H); 6.20 (d,  $^3\text{J}(22\text{-H}, 24\text{-H}) = 2.0$  Hz, 1H, 22-H); 5.88 (s, 2H, 42-H); 5.43 (s, 2H, 17-H); 3.94-3.85 (m,  $^3\text{J}(37\text{-H}, 38\text{-H}) = 7.2$  Hz, 2H, 37-H); 0.83 (t,  $^4\text{J}(38\text{-H}, 37\text{-H}) = 7.2$  Hz, 3H, 38-H).





**Abb. 41:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **21** in  $\text{DMSO-d}_6$

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 183.81 (23-C), 166.25 (21-C), 165.57 (36-C), 162.42 (18-C), 158.50 (21-C), 153.46 (20-C), 151.65 (26-C), 150.11 (1-C), 149.93 (4-C), 149.72 (39-C), 145.87 (9-C), 144.33 (10-C), 140.07 (13-C), 135.94 (6-C), 133.79 (16-C), 132.34 (3-C), 132.05 (8-C), 131.39 (32-C), 130.94 (31-C), 130.85 (25-C), 129.29 (30-C), 128.98 (24-C), 128.19 (14-C), 127.91 (27-C), 127.59 (15-C), 125.68 (11-C), 123.56 (2-C), 122.93 (5-C), 122.72 (7-C), 119.17 (35-C), 117.18 (26-C), 117.01 (33-C), 115.39 (28-C), 114.91 (34-C), 113.95 (29-C), 104.30 (22-C), 101.41 (19-C), 69.49 (17-C), 60.51 (37-C), 13.35 (38-C).

HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Methanol):

berechnet: (für  $\text{C}_{42}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{NaO}_6$ ,  $\text{MH}^+$ ): 709.2058

gefunden: 709.2099

Abweichung: 5.7 ppm

IR (KBr-Verreibung):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3235 (w,  $\nu$ (NH<sub>2</sub>)), 3020, 2950 (m,  $\nu$ (CH<sub>Aryl</sub>)), 1713 (m,  $\nu$ (CO<sub>Ester</sub>)), 1595 (s,  $\nu$ (CC<sub>Aryl</sub>)), 1479 (m,  $\delta$ (NH<sub>Amin</sub>)).

## 9.9 Durchführung der zellfreien Messungen der Fluoreszenzsonden

### 9.9.1 ENTFERNUNG DER KONTAMINIERENDEN SCHWERMETALLE AUS DEN VERWENDETEN MEDIEN

Um eine exakte Quantifizierbarkeit zu gewährleisten muss eine Schwermetallkontamination ausgeschlossen werden. Dies geschieht mittels einer modifizierten Standardmethode<sup>[151]</sup> durch Zugabe des Schwermetallkomplexbildnerharzes Chelex 100 zu allen verwendeten Medien. 50.0 mL der zu behandelnden Lösung wurden in einem Falcon-Röhrchen entsprechenden Volumens mit 2.00 g Chelex 100 versetzt und das verschlossene Gefäß bei 4°C für mindestens acht Stunden an der Schüttelmaschine gut geschüttelt. Die Suspension ist im Kühlraum unter Lichtausschluss über mehrere Wochen lagerfähig; einsatzfähig wurde sie durch Abdekantieren des Komplexbildnerharzes mit anschließender pH-Wert-Einstellung, da Chelex 100 den pH-Wert der damit behandelten Lösung erhöht. Die erforderliche Senkung des pH-Wertes geschah in der Regel mit 6.00 M Salzsäure. Da nicht alle Schwermetallionen durch diese Prozedur entfernt werden können, wurde die verbliebene Restkontamination exemplarisch für das einfache, gepufferte Medium (10.0 mM Tris/HCl, 2.00 mM Ascorbinsäure, 0.18% w/v SDS, pH = 7.2) mittels AAS bestimmt, wobei die Mittelwerte bei 2.1 µg/L Eisen und 2.4 µg/L Kupfer bei einer Restkontamination von etwa 2 µg/L lagen.

### 9.9.2 DIE FLUORESZENZANALYSE BEI ANWESENHEIT UND ABWESENHEIT VON FE(II)

Es wurden 1.00 mM Stammlösungen der potentiellen Fluoreszenzsonden **14** und **16** in DMSO angefertigt. Diese Lösungen wurden aliquotiert und waren bei - 30°C und Dunkelheit über mehrere Wochen lagerfähig. Aus diesen Stammlösungen wurden die 10.0 µM gepufferten, schwermetallar-

men Indikatorlösungen hergestellt. Um zu gewährleisten, dass bei Eisenzugabe dieses ausschließlich als  $\text{Fe}^{2+}$  vorliegt muss ein Reduktionsmittel vorhanden sein. Da dies keinen Einfluss auf die Fluoreszenz haben darf, wurde auch bei eisenfreien Messungen vor der pH-Wert Einstellung Ascorbinsäure bis zur Endkonzentration von 2.00 mM zugegeben. Anschließend wurden diese Indikatorlösungen auf einen pH-Wert von 7.2 eingestellt und mit 0.18% SDS versetzt. Die Messungen erfolgten eisenfrei und anschließend erfolgte für die Fluoreszenzsonde **14** die sukzessive Zugabe einer  $\text{Fe}^{2+}$ -Stammlösung mit den Endkonzentrationen 0.00, 0.50, 1.00, 1.50, 2.50, 3.50 und 10.0  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  bei einer Fluoreszenzsondenkonzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Durchgeführt wurden diese Fluoreszenzmessungen am Fluoreszenzspektrometer Fluoroscan FL 3095 in Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 1.00 cm. Die Emissionsspektren wurden mit der Anregungswellenlänge, die dem Absorptionsmaximum des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes entsprach, bei einer Temperatur von 22°C aufgenommen. Für die Fluoreszenzsonde **16** wurde bei einer Sondenkonzentration von 10.0  $\mu\text{M}$  die gleichen Eisenkonzentrationen gewählt. Die Untersuchungen am Laser-Scanning-Mikroskop wurden entsprechend der höheren Fluoreszenzsondenkonzentrationen mit höheren Eisenkonzentrationen durchgeführt.

### 9.9.3 HERSTELLUNG DER EISEN-STAMMLÖSUNGEN

29.4 mg Trinatriumcitrat Dihydrat wurden in 10.0 mL bidestilliertem Wasser gelöst und 39.2 mg  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$  Hexahydrat (Mohr'sches Salz) zugesetzt. 100  $\mu\text{L}$  dieser 10 mM  $\text{Fe}^{2+}$ -Stammlösung wurden zu einer Lösung aus 3.52 mg Ascorbinsäure in 900  $\mu\text{L}$  bidestilliertem Wasser gegeben. Nach einer Inkubationszeit zwischen 30 und 120 Minuten wurden die Eisenstammlösungen für die Fluoreszenzmessungen inklusive der *ex situ*-Messungen verwendet. Es handelte sich hierbei um Lösungen mit den Endkonzentrationen 1.00 mM  $\text{Fe}^{2+}$ , 1.00 mM Citrat und 20 mM Ascorbinsäure.

## 9.10 Die Fluoreszenzsonden im zellulären System

### 9.10.1 ZELLPRÄPARATION UND ZELLKULTIVIERUNG

Sowohl die Präparation als auch die Kultivierung der Zellen wurde freundlicherweise von Frau Birgit Lammers und Frau Nathalie Boschenkov (Institut für Physiologische Chemie, Universitätsklinikum Essen) durchgeführt.

### 9.10.2 PRÄPARATION UND KULTIVIERUNG DER RATTENHEPATOZYTEN

Nach der von de Groot *et al.*<sup>[152]</sup> beschriebenen Methode wurden die Hepatozyten isoliert. Auf kollagenbeschichtete Deckgläschen mit einer Oberfläche von 6.20 cm<sup>2</sup> wurden die für die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen vorgesehenen Hepatozyten mit einer Dichte von  $1.70 \cdot 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> (ermittelt mit einer Neubauer-Zählkammer, Brand, Wertheim/Main, Deutschland) in Zellkultur-Petrischalen eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte in L-15 Medium und wurde ergänzt durch fötales Kälberserum (5.0%), L-Glutamin (2.0 mM), Glukose (8.3 mM), Rinderserumalbumin (0.1%), Natriumhydrogencarbonat (14.3 mM), Gentamycin (50 µg/mL) und Dexamethason (1.0 µM) bei einer Temperatur von 37°C unter einer Atmosphäre von 5.00% CO<sub>2</sub> und 95% Raumluft mit einer Luftfeuchtigkeit von 100% in einem Brutschrank (Modell 6000, Heraeus, Hanau, Deutschland). Die Zellen wurden 2 Stunden nach dem Einsetzen mit HBSS gewaschen und für weitere 20 – 24 Stunden kultiviert um sie dann im Experiment zu benutzen.

### 9.10.3 KULTIVIERUNG DER RATTENLEBERENDOTHELZELLEN

Aus einer Zelllinie der Leber männlicher Ratten des Wistar-Stammes etablierte<sup>[153]</sup> Leberendothelzellen wurden in RPMI 1640-Medium, welches ergänzt wurde mit fötalem Kälberserum (20%), L-Glutamin (2.0 mM), Penicillin/Streptomycin (50 µg/mL ⇒ 50 U/mL) und Dexametheson (1.0 µM), bei einem pH-Wert von 7.35 kultiviert. Durch Trypsinisierung wurden Subkulturen gewonnen. Die Zellen wurden nach dem 1:3 - Splitten auf

fibronektin-beschichteten Deckgläschen mit einer Oberfläche von 6.20 cm<sup>2</sup> in Zellkulturschalen eingesetzt, um sie zwei Tage nach der Subkultivierung im Experiment zu benutzen.

#### 9.10.4 DIE BESTIMMUNG DER SUBZELLULÄREN VERTEILUNG DER FLUORESZENZSONDEN

Die Rattenhepatozyten wurden grundsätzlich 20 -24 Stunden nach der Zellisolation in den Experimenten eingesetzt. Zur Bestimmung der subzellulären Verteilung der Fluoreszenzindikatoren **14** und **16** wurden Deckgläschen mit adhärenenten Hepatozyten in Pentz-Kammern eingeschraubt und die Zellen zweimal mit je 2.00 mL HBSS (37°C) vorsichtig gewaschen und anschließend in der Dunkelkammer mit einem der Indikatoren **14** oder **16** für 30 min beladen.

## 11 Literatur

- [1] E. H. Huheey, *Anorganische Chemie - Prinzipien von Struktur und Reaktivität*, Walter der Gruyter, Berlin, New York, **1988**.
- [2] C. M. Lindner, M. Mulligan, D. Henley, Elsevier Science, Amsterdam, **1983**.
- [3] J. D. Gower, G. Healing, C. J. Green, *Anal. Biochem.* **1989**, *180*, 126.
- [4] R. Baliga, N. Ueda, S. V. Shah, *Biochemical Journal* **1993**, *291*, 901.
- [5] K. R. Öllinger, K., *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 23707.
- [6] F. Petrat, U. Rauen, H. de Groot, *Hepatology* **1999**, *29*, 1171.
- [7] F. Petrat, H. de Groot, U. Rauen, *Arch. Biochem. Biophys* **2000**, *376*, 74.
- [8] F. Petrat, H. de Groot, R. Sustmann, U. Rauen, *Biol. Chem.* **2002**, *383*, 489.
- [9] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 1.
- [10] W. Breuer, S. Epszteijn, Z. I. Cabantchik, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 24209.
- [11] D. Weisheit, *Dissertation*, Essen, **2003**.
- [12] F. Petrat, D. Weisheit, M. Lensen, H. de Groot, R. Sustmann, U. Rauen, *Biochem. J.* **2002**, *362 (Pt.1)*, 137.
- [13] D. Wallace, *Ment. Retard. Dev. Disabil.* **2001**, *7*, 158.
- [14] H. Cable, J. B. Lloyd, *J. Pharm. Pharmacol.* **1999**, *51*, 131.
- [15] F. Antunes, E. Cadenas, U. T. Brunk, *Biochem. J.* **2001**, *356*, 549.
- [16] U. T. Brunk, J. Neuzil, J. W. Eaton, *Redox Rep.* **2001**, *6*, 91.
- [17] W. Li, X. Yuan, G. Nordgren, *FEBS Letters* **2000**, *470*, 35.
- [18] R. Crichton, *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism*, John Wiley & Sons, LTD, Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapur, Toronto, **2001**.
- [19] H. Tapiero, L. Gate, K. D. Tew, *Biomed. Pharmacother.* **2001**, *55*, 324.
- [20] <http://www.eiseninfo.de/festoffw.htm>, **2004**.
- [21] M. Tabuchi, T. Yoshimori, K. Yamaguchi, T. Yashida, F. Kishi, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 22220.
- [22] A. Dautry-Varsat, A. Ciechanover, H. F. Lodish, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 2258.
- [23] R. D. Klausner, G. Ashwell, J. van Renswoude, J. B. Harford, K. R. Bridges, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 2263.
- [24] E. H. Morgan, *Biochem. Biophys. Acta* **1983**, *762*, 498.
- [25] P. Ponka, C. N. Lok, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **1999**, *31*, 1117.
- [26] A. Bezkorovainy, *Biochemistry of Nonheme Iron*, Plenum Press, New York, **1980**.
- [27] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, *Molekularbiologie der Zelle*, 3. Auflage ed., VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, Weinheim, New York, Cambridge, Tokyo, **1995**.
- [28] K. Rao, J. van Renswoude, C. van Kempf, R. D. Klausner, *FEBS Letters* **1983**, *160*, 213.
- [29] M.-T. Nunez, V. Gaete, J. A. Watkins, J. Glass, *J. Biol. Chem.* **1990**,

- 265, 6688.
- [30] W. Breuer, S. Epsztejn, P. Millgram, Z. I. Cabantchik, *Am. J. Physiol.* **1995**, 268, C1354.
- [31] D. M. de Silva, C. C. Aswith, J. Kaplan, *Physiol. Rev.* **1996**, 76, 31.
- [32] T. C. Iancu, *Ultrastruc. Pathol.* **1989**, 13, 573.
- [33] C. Seldon, M. Owen, J. M. P. Hopkins, T. J. Peters, *Br. J. Haematol.* **1980**, 44, 593.
- [34] G. W. Richter, *Lab. Invest.* **1984**, 50, 26.
- [35] V. Picard, S. Epsztein, P. Santambrogio, Z. I. Cabantchik, C. Beaumont, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 15382.
- [36] D. M. Lawson, A. Treffry, P. J. Artymiuk, *FEBS Letters* **1989**, 254, 207.
- [37] P. Aisen, I. Listowsky, *Ann. Rev. Biochem.* **1980**, 49, 989.
- [38] C. X. Cai, D. E. Birk, T. F. Linsenmayer, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 12831.
- [39] C. X. Cai, D. E. Birk, T. F. Linsenmayer, *Mol. Biol. Cell* **1998**, 9, 1037.
- [40] D. Pountney, G. Trugnan, M. Bourgeois, C. Beaumont, *J. Cell Sci.* **1999**, 112, 825.
- [41] K. J. Thompson, M. G. Fried, Z. Ye, *Journal of Cell Science* **2002**, 115, 2165.
- [42] A. G. Smith, P. Carthew, J. E. Francis, K. Ingebrigtsen, *Hepatology* **1990**, 12, 1399.
- [43] G. Löffler, P. E. Petrides, 6. Auflage ed., Springer-Verlag Berlin, Berlin, Heidelberg, New York, **1998**.
- [44] J.-B. Galey, *Adv. Pharmacol.* **1997**, 38, 167.
- [45] R. Blume, [www.chemieunterricht.de/dc2/komplexe/kf-lf-th.htm](http://www.chemieunterricht.de/dc2/komplexe/kf-lf-th.htm).
- [46] E. H. Huheey, *Anorganische Chemie - Prinzipien von Struktur und Reaktivität*, Walter de Gruyter, Berlin, New York, **1988**.
- [47] D. Y. Yegorov, A. V. Kozlov, O. A. Azizova, *Free Radical Biology & Medicine* **1993**, 15, 565.
- [48] J. M. C. Gutteridge, D. A. Rowley, B. Halliwell, *Biochem. J.* **1981**, 199, 263.
- [49] J. M. C. Gutteridge, Y. Hou, *Free Radic. Res. Commun.* **1986**, 2, 143.
- [50] P. Nielsen, J. Düllmann, U. Wulfhekel, H. C. Heinrich, *Int. J. Biochem.* **1993**, 25, 223.
- [51] F. Petrat, H. de Groot, U. Rauen, *Biochem. J.* **2001**, 356, 61.
- [52] K. Öllinger, U. T. Brunk, *Free Radical Biology & Medicine* **1995**, 19, 565.
- [53] U. T. Brunk, H. Zhang, H. Dalen, K. Öllinger, *Free Radical Biology & Medicine* **1995**, 19, 813.
- [54] H. L. Persson, K. J. Nilsson, U. T. Brunk, *Redox Rep.* **2001**, 6, 57.
- [55] Z. Yu, H. L. Persson, J. W. Eaton, *Free Radical Biology & Medicine* **2003**, 34, 1234.
- [56] H. Boukhalifa, A. L. Crumbliss, *Biometals* **2002**, 15, 325.
- [57] P.-T. Doulias, S. Christoforidis, U. Brunk, *Free Radical Biology & Medicine* **2003**, 35, 719.

- [58] J. Beard, K. M. Erikson, B. C. Jones, *Journal of Nutrition* **2003**, *133*, 1174.
- [59] <http://fachberatung-biologie.de/Themen/dissimilat/seitendiss/dissbiochem4atm.htm>.
- [60] L. Stryer, *Biochemie*, 2 korr. Nachdruck der 3. Auflage ed., Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1994**.
- [61] A. Berkaloﬀ, J. Bourguet, P. Farvard, N. Farvard, J. C. LaCroix, *Die Zelle - Biologie und Physiologie*, Vieweg-Verlag, Braunschweig, **1990**.
- [62] E. F. Elstner, *Der Sauerstoff*, BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, **1990**.
- [63] J. F. Turrens, A. Alexandre, A. L. Lehninger, *Arch. Biochem. Biophys* **1985**, *237*, 408.
- [64] R. Crichton, *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism*, 2. Auflage ed., John Wiley & Sons, Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapur, Toronto, **2001**.
- [65] W. H. Koppenol, *Free Radical Biology & Medicine* **1993**, *15*, 645.
- [66] A. Rigo, R. Stevenato, A. Finazzi-Agro, *FEBS Letters* **1977**, *80 (I)*, 130.
- [67] C. Ferradini, J. Foos, C. Houee, J. Pucheault, *Photochem. Photobiol.* **1978**, *28*, 697.
- [68] W. H. Melhuish, H. C. Sutton, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1978**, 970.
- [69] J. Weinstein, B. H. J. Bielski, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 58.
- [70] E. Cadenas, A. Boveris, C. I. Ragan, A. O. Stoppani, *Arch. Biochem. Biophys* **1977**, *180*, 248.
- [71] B. Chance, H. Sies, A. Boveris, *Physiol. Rev.* **1979**, *59*, 527.
- [72] C. Deby, R. Goutier, *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *39*, 399.
- [73] H. Sies, *Oxidative Stress*, Academic, Orlando, Florida, **1986**.
- [74] R. A. Floyd, *The FASEB Journal* **1990**, *4*, 2587.
- [75] M. Tien, J. R. Bucher, A. D. Aust, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1982**, *107*, 279.
- [76] C. E. Thomas, S. D. Aust, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 13064.
- [77] H. C. Sutton, G. F. Vile, C. C. Winterbourn, *Arch. Biochem. Biophys* **1987**, *256*, 462.
- [78] S. D. Aust, L. A. Morehouse, C. E. Thomas, *Free Radical Biology & Medicine* **1985**, *1*, 3.
- [79] J. W. Eaton, M. Qian, *Free Radical Biology & Medicine* **2002**, *32*, 833
- [80] W. C. Bray, M. H. Gorin, *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, *54*, 2124.
- [81] M. L. Kremer, *J. Phys. Chem.* **2003**, *107*, 1734.
- [82] J. L. Poyer, P. B. McCay, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 263.
- [83] P. Hochstein, L. Ernster, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1963**, *12*, 388.
- [84] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3. Auflage ed., Oxford University Press (Clarendon), Oxford, **2000**.
- [85] A. K. Basu, L. J. Marnett, *Cancer Res.* **1984**, *44*, 2848.
- [86] U. T. Brunk, I. Svensson, *Redox Rep.* **1999**, *4*, 3.



- [87] B. R. Bacon, G. M. Brittenham, A. S. Tavill, C. E. McLaren, C. H. Park, R. O. Recknagel, *Trans. Assoc. Am. Physicians* **1983**, 96, 146.
- [88] B. R. Bacon, A. S. Tavill, G. M. Brittenham, C. E. McLaren, R. O. Recknagel, *J. Clin. Invest* **1983**, 71, 429.
- [89] G. Minotti, S. D. Aust, *Chem. Phys. Lipids* **1987**, 44, 191.
- [90] E. R. Stadtman, R. L. Levine, *Ann. N. Y. Acad. Sci* **2000**, 899, 191.
- [91] D. Johnson, J. Travis, *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 4022.
- [92] C. N. Oliver, P. Stark-Reed, E. R. Stadtman, G. J. Liu, J. M. Carney, R. A. Floyd, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 5144.
- [93] R. A. Floyd, J. E. Schneider, *Membrane Lipid Oxidation, Vol. 1* (C. Vigo-Pelfrey, ed), C. R. C. Press, Boca Raton, Florida, **1990**.
- [94] K. Brawn, I. Fridovich, *Arch. Biochem. Biophys* **1981**, 206, 414.
- [95] S. Frelon, T. Douki, A. Favrier, *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, 16, 191.
- [96] J. Cadet, M. Berger, M. Douki, J.-L. Ravanat, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **1997**, 131, 1.
- [97] J.-L. Ravanat, S.-P. C., D. M. P., *Helv. Chim. Acta* **2001**, 84, 3702.
- [98] K. Kohda, M. Tada, H. Kasai, S. Nishimura, Y. Kawazoe, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1986**, 139, 626.
- [99] H. Kasai, S. Nishimura, Y. Kurokawa, Y. Hayashi, *Carcinogenesis* **1987**, 8, 1959.
- [100] T. Douki, S. Spinelli, J.-L. Ravanat, J. Cadet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, 1875.
- [101] H. Kasai, S. Nishimura, *Gann* **1984**, 75, 841.
- [102] E. S. Henle, H. Zhengxu, N. Tang, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 962.
- [103] R. Meneghini, *Free Radical Biology & Medicine* **1997**, 23, 783.
- [104] B. Halliwell, O. I. Aruoma, *FEBS Letters* **1991**, 281, 9.
- [105] M. Chevion, *Free Radical Biology & Medicine* **1988**, 1988, 27.
- [106] C. Richter, J. W. Park, B. N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 6465.
- [107] M. K. Shigenaga, T. M. Hagen, B. N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 10771.
- [108] T. H. Zastawny, M. Dabrowska, T. Jaskolski, M. Klimarczyk, L. Kulin-si, A. Koszela, *Free Radical Biology & Medicine* **1998**, 15, 722.
- [109] J. Hegler, D. Bittner, S. Boiteux, B. Epe, *Carcinogenesis* **1993**, 14, 2309.
- [110] W. M. Brown, M. George, A. C. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, 76, 1967.
- [111] F. M. Yakes, B. Van Houten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 514.
- [112] S. P. LeDoux, G. L. Wilson, E. J. Beecham, T. Stevnsner, K. Wassermann, V. A. Bohr, *Carcinogenesis* **1992**, 13, 1967.
- [113] C. M. Lee, R. Weindruch, M. Aiken, *Free Radical Biology & Medicine* **1997**, 22, 1259.
- [114] C. Zhang, A. Lee, V. W. Liu, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1999**, 254, 152.
- [115] S. A. Kovalenko, G. Kopsidas, J. M. Kelso, A. W. Linnane, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1997**, 232, 147.
- [116] D. C. Wallace, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 8739.

- [117] D. C. Wallace, *Science* **1999**, 283, 1482.
- [118] A. H. V. Shapira, *Biochem. Biophys. Acta* **1999**, 1410, 99.
- [119] A. H. V. Shapira, *Biochem. Biophys. Acta* **1999**, 1410, 159.
- [120] R. S. Sohal, K. J. Farmer, R. G. Allen, *Mech. Ageing Dev.* **1984**, 24, 175.
- [121] T. Kurz, A. Leake, T. von Zglinick, U. Brunk, *Biochem. J.* **2004**, 378, 1039.
- [122] M. Zander, *Fluorimetrie*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1981**.
- [123] P. R. Selvin, *Methods Enzymol.* **1995**, 246, 300.
- [124] W. Schmidt, *Optische Spektroskopie, Eine Einführung*, 2. Auflage ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [125] R. D. Alexander, D. H. Buisson, A. W. L. Dudeney, R. J. Irving, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* **1978**, 74, 1081.
- [126] G. Anderegg, *Helv. Chim. Acta* **1963**, 46, 2397.
- [127] L. M. Wis Vitolo, G. T. Hefter, B. W. Clare, J. Webb, *Inorganica Chimica Acta* **1990**, 170, 171.
- [128] S. Epsztein, O. Khaklon, H. Glickstein, W. Breuer, Z. I. Cabantchik, *Anal. Biochem.* **1997**, 248, 31.
- [129] S. Singh, H. Khodr, M. I. Taylor, R. C. Hider, *Biochem. Soc. Symp.* **1993**, 61, 127.
- [130] R. P. Haughland, *Handbook of Fluorescent Probes and research Chemicals*, 6. Auflage ed., Molecular Probes Inc., Eugene, OR, **1996**.
- [131] S. D. Lytton, B. Mester, J. Libman, A. Shanzer, Z. I. Cabantchik, *Anal. Biochem.* **1992**, 205, 326.
- [132] V. C. Chiu, D. H. Haynes, *Biophys. J.* **1977**, 18, 3.
- [133] R. M. M. Smith, A. E., *Critical Stability Constants*, Plenum Press, London, **1974-1989**.
- [134] U. Rauen, U. Kerkweg, D. Weisheit, F. Petrat, R. Sustmann, H. de Groot, *Free Radical Biology & Medicine* **2003**, 35, 1664.
- [135] D. Cecarelli, D. Gallessi, F. Giovanni, F. Ferrali, A. Masini, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1995**, 209, 53.
- [136] T. Flatmark, A. Tangeras, *Proteins of iron metabolism*, Grune & Stratton, New York, **1976**.
- [137] A. Tangeras, T. Flatmark, D. Bäckstöm, A. Ehrenberg, *Biochem. Biophys. Acta* **1980**, 589, 162.
- [138] UMT.EDU/MEDCHEM/TEACHING/MEDCHEM/MCLECT7.HTM.
- [139] R. E. Hamm, C. M. Shull, D. M. Grant, *J. Am. Hem. Soc.* **1954**, 76, 2111.
- [140] D. R. Williams, *J. Chem. Soc. A* **1970**, 1550.
- [141] A. Albert, *Biochem. J.* **1950**, 47, 531.
- [142] I. Fleming, *Grenzorbitale und Reaktionen organischer Verbindungen*, 2. Nachdruck der 1. Auflage ed., VCH-Verlag, Weinheim, **1990**.
- [143] A. N. Mayer, S., *Angewandte Chemie* **1994**, 106, 1097.
- [144] G. F. Smith, F. W. Cagle, *J. Org. Chem.* **1947**, 12, 781.
- [145] J.-P. Lecomte, A. Kirsch, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1993**, 89, 3261.

- [146] C. B. Chen, D. S. Sigman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 7147.
- [147] P. T. Litak, J. M. Kaufmann, *J. Heterocycl. Chem.* **1994**, *31*, 457.
- [148] W. Feuerstein, J. Wallach, *Chem. Ber.* **1901**, *34*, 2638.
- [149] D. Solas, R. Hale, D. Patel, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1537.
- [150] B. A. Sparano, P. S. Shatrughan, K. Koide, *Organic Letters* **2004**, *0*, A
- [151] P. J. Evans, B. Halliwell, *Methods Enzymol.* **1994**, *233*, 82.
- [152] H. de Groot, M. Brecht, *Hoppe-Seyler* **1991**, *372*, 35.
- [153] U. Rauen, M. Hanßen, W. Lauchart, H. D. Becker, H. de Groot, *Transplantation* **1993**, *55*, 469.



# DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT  
DUISBURG  
ESSEN

*Offen im Denken*

ub | universitäts  
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

**DOI:** 10.17185/duepublico/79089

**URN:** urn:nbn:de:hbz:465-20230928-153050-1

Alle Rechte vorbehalten.