

# Fluoreszente Sonden mit gesteigerter Signalintensität für die Lebendzell- Mikroskopie

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

"Doctor rerum naturalium"

der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm Chemie

der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

Florian Grimm

aus Halberstadt

Göttingen, 2021



## Betreuungsausschuss

Prof. Dr. Andreas Janshoff

Biophysikalische Chemie, Institut für  
Physikalische Chemie

Dr. Vladimir N. Belov

NanoBiophotonik, Max-Planck-Institut für  
Biophysikalische Chemie

## Mitglieder der Prüfungskommission

### Referent:

Prof. Dr. Andreas Janshoff

Biophysikalische Chemie, Institut für  
Physikalische Chemie

### Korreferent:

Dr. Vladimir N. Belov

NanoBiophotonik, Max-Planck-Institut für  
Biophysikalische Chemie

### Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Marina Bennati

Elektronenspinresonanz-Spektroskopie,  
Max-Planck-Institut für Biophysikalische  
Chemie

Apl. Prof. Dr. Alexander Egnér

Optische Nanoskopie, Institut für  
Nanophotonik

Prof. Dr. Silvio O. Rizzoli

Neuro- und Sensorische Physiologie,  
Universitätsklinikum Göttingen

Prof. Dr. Kai Tittmann

Molekulare Enzymologie, Schwann-  
Schleiden-Forschungszentrum

Tag der mündlichen Prüfung: Donnerstag der 03. Juni 2021

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	v
Tabellenverzeichnis .....	viii
Abkürzungsverzeichnis .....	ix
Abstract.....	- 1 -
Kurzbeschreibung .....	- 1 -
1 Vorwort.....	- 3 -
2 Einleitung.....	- 7 -
2.1 Markierungsstrategien einzelner Proteine innerhalb lebender Zellen und Organismen .....	- 8 -
2.1.1 Reaktive Protein-Tags .....	- 8 -
2.1.2 Molekulare fluoreszierenden Sonden für die Lebendzellmikroskopie.....	- 10 -
2.1.3 Unnatürliche Aminosäuren mit bioorthogonalen reaktiven Seitengruppen ....	- 13 -
2.2 Organische Fluorophore für die Lebendzellmikroskopie.....	- 15 -
2.3 Hochauflösende Mikroskopie – STED Mikroskopie .....	- 20 -
2.4 Ziel dieser Arbeit .....	- 24 -
3 Ergebnisse und Diskussion .....	- 27 -
3.1 Rhodamin-Spirolaktam Derivate für die Lebendzell-Mikroskopie.....	- 27 -
3.1.1 Synthese der TMR Spirolaktam-Derivate .....	- 28 -
3.1.2 Untersuchung der chemischen und photophysikalischen Eigenschaften der TMR Spirolaktam-Derivate.....	- 31 -
3.1.3 DNA-Sonden mit TMR-Spirolaktam-Derivaten für die Lebendzellfärbung ..	- 40 -

3.1.4	Einfluss von <i>N</i> -Amidsubstituenten auf die Eigenschaften der Sonden .....	- 48 -
3.1.5	Ausweitung der Tris-Spirolaktame auf eine weitere Farbstoffklasse .....	- 56 -
3.1.6	Aktin- und Tubulin-Sonden mit <i>4-TMR Tris</i> für die Lebendzell-Mikroskopie.....	- 63 -
3.1.7	Resümee der Ergebnisse .....	- 66 -
3.2	Pyridinhaltige Rhodamine .....	- 69 -
3.2.1	Synthese und Charakterisierung pyridinhaltiger Rhodamine .....	- 70 -
3.2.2	Synthese fluoreszierender Sonden und deren Einsatz in der Mikroskopie.....	- 73 -
3.2.3	Resümee der Ergebnisse .....	- 78 -
4	Zusammenfassung.....	- 79 -
5	Material und Methoden.....	- 81 -
5.1	Bestimmung photophysikalischer Eigenschaften der Farbstoffe.....	- 81 -
5.2	Bestimmung der $pK_{cycl}$ -Werte der Spirolactam-Derivate .....	- 81 -
5.3	Bestimmung der $D_{50}$ -Werte .....	- 82 -
5.4	Bestimmung der Fluorogenität .....	- 83 -
5.5	Bestimmung der Dissoziationskonstante $K_d$ .....	- 84 -
5.6	Aufbau des Konfokal- und STED-Mikroskops .....	- 84 -
5.7	Zellkultur, Immunfluoreszenz- und Lebendfärbung.....	- 85 -
5.8	Viabilitätstest .....	- 87 -
5.9	Bestimmung der optischen Auflösung mit der STED-Mikroskopie bei $565pR$ ..	- 87 -
5.10	Allgemeine Bemerkungen zur chemischen Synthese .....	- 88 -
5.11	Synthesen der TMR-Derivate .....	- 90 -
5.12	Synthese der TMR-Spirolactam-Derivate .....	- 94 -

5.13	Synthese des Carbopyronin-Spirolaktams 4-CP-H, N1 ( <i>4-610CP Tris</i> ).....	- 103 -
5.14	Synthese der TMR Modelsonden mit Methylamid als Pseudoligand .....	- 104 -
5.15	Synthese der DNA-Sonden.....	- 108 -
5.16	Synthese der Aktin-Sonde .....	- 116 -
5.17	Synthese der Tubulin-Sonden.....	- 119 -
5.18	Synthese der Lysosom-Sonde.....	- 122 -
5.19	Synthese der Mitochondrium-Sonde .....	- 125 -
5.20	Synthese der HaloTag-Sonde .....	- 126 -
6	NMR-Spektren.....	- 127 -
7	Literaturverzeichnis .....	- 138 -
8	Danksagung .....	- 149 -
	Lebenslauf .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.</b> Prinzip von Fusionsproteinen mit einem reaktiven Protein-Tag.....	- 9 -
<b>Abbildung 2.</b> Chemische Strukturen der Liganden, die nach der Kopplung an einen organischen Fluorophor zur Markierung von Proteinen und Organellen in lebenden Objekten verwendet werden können.....	- 12 -
<b>Abbildung 3.</b> Click-Chemie als Markierungs-Technologie.....	- 14 -
<b>Abbildung 4.</b> Zellpermeable organische Fluorophore.....	- 17 -
<b>Abbildung 5.</b> Drei Isomere eines organischen Farbstoffs.....	- 19 -
<b>Abbildung 6.</b> Prinzip der Konfokalmikroskopie.....	- 20 -
<b>Abbildung 7.</b> Prinzip der STED-Mikroskopie.....	- 22 -
<b>Abbildung 8.</b> Chemische Strukturen neuartiger membrangängiger Fluorophore.....	- 24 -
<b>Abbildung 9.</b> pH-Abhängigkeit der Spirolaktam-Derivate.....	- 31 -
<b>Abbildung 10.</b> Chemische Eigenschaften der TMR-Derivate mit einem Methylamid als Liganden-Imitation. ....	- 36 -
<b>Abbildung 11.</b> Bestimmung der Fluorogenität der sechs Sonden. ....	- 41 -
<b>Abbildung 12.</b> Mikroskopische Aufnahmen markierter DNA in Zellkern lebender Vero Zellen. ....	- 44 -
<b>Abbildung 13.</b> Mikroskopie-Aufnahmen fixierter Vero Zellen.....	- 46 -
<b>Abbildung 14.</b> Chemische Strukturen der beiden Spirolactam-Rhodamine 4-Rh-H, N5 ( <i>4-TMR tBu</i> ) und 4-Rh-H, N7 ( <i>4-TMR CN</i> ).....	- 47 -
<b>Abbildung 15.</b> Bestimmung der Dissoziationskonstanten.....	- 51 -
<b>Abbildung 16.</b> Zellfärbung genomischer DNA in lebenden Zellen mit DNA-Sonden. ....	- 51 -
<b>Abbildung 17.</b> Untersuchung der Viabilität von Vero-Zellen, die mit den vier DNA-Sonden über definierte Zeiträume behandelt wurden. Zellen.....	- 54 -

<b>Abbildung 18.</b> Analysen der freien und an Hoechst gebundenen Carbopyronine 4-610CP und 4-610CP Tris. ....	- 60 -
<b>Abbildung 19.</b> Markierung der Aktinnetzwerke in lebenden Vero Zellen.....	- 63 -
<b>Abbildung 20.</b> Fluoreszierende Sonden zur Markierung der Tubulinfilamente in lebenden Zellen.....	- 64 -
<b>Abbildung 21.</b> Photophysikalische Eigenschaften von 565pR.....	- 72 -
<b>Abbildung 22.</b> Konfokal- und STED-mikroskopische Aufnahmen des Kernporenproteins NUP98 markiert mit 565pR und die anschließende Bestimmung des Durchmessers der angefärbten Struktur. ....	- 73 -
<b>Abbildung 23.</b> Chemische Strukturen der fluoreszierenden Sonden bestehend aus dem Farbstoff 565pR, einem aliphatischen Linker und den Liganden Pepstatin A (Lysosom), (4-Carboxybutyl)-Triphenylphosphonium (Mitochondrium), Halo Tag Amin-O2 (Halo Tag Fusionsprotein) und Cabazitaxel (Tubulin).....	- 75 -
<b>Abbildung 24.</b> Mikroskopische Aufnahmen zellulärer Strukturen und Organellen in lebenden Objekten mit fluoreszierenden Sonden. ....	- 77 -



<b>Schema 1.</b> Synthese des Tetramethylrhodamins ( <i>TMR</i> ) aus Dimethylaminophenol und Trimellitsäureanhydrid Methylester.....	- 28 -
<b>Schema 2.</b> Synthese der Farbstoffe 4-Rh-H, O und 4-Rh-H, N1 aus 3,6-Dihydroxy-Xanthon (3-OH) und 3-Brom-Phthalsäureester (4). .....	- 29 -
<b>Schema 3.</b> Synthese der DNA-Sonden.....	- 40 -
<b>Schema 4.</b> Syntheseroute der Farbstoffe 4-CP, O ( <i>4-610CP</i> ) und 4-CP, N1 ( <i>4-610CP Tris</i> ) aus 2-Brom-5-methoxybenzoesäuremethylester (8), 4-Methoxybenzylzinkchlorid (9) und Di <i>t</i> Bu-3-bromphthalsäureester (4). .....	- 57 -
<b>Schema 5.</b> Synthese der zwei DNA Sonden mit einem Carbopyronin. ....	- 58 -
<b>Schema 6.</b> Syntheseroute zur Darstellung der Verbindungen 18-R.....	- 70 -

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.</b> Die Absorbtionsmaxima in [nm] sowie die durch Titrationskurven ermittelten $pK_{\text{cycl}}$ -Werte von 5-Rh-H, O und den Spirolaktam-Derivaten 5-Rh-H, NR sind aufgelistet. ....	- 32 -
<b>Tabelle 2.</b> Photophysikalische Eigenschaften der drei TMR-Isomere und ihrer Tris-Spirolaktame. ....	- 34 -
<b>Tabelle 3.</b> $pK_{\text{cycl}}$ -Werte und $D_{50}$ -Werte der TMR-Lakton und-Laktam Modelsonden. ....	- 37 -
<b>Tabelle 4.</b> Photophysikalische Eigenschaften der vier Sonden <i>4-TMR DNA</i> , <i>4-TMR Tris DNA</i> , <i>4-TMR tBu DNA</i> und <i>4-TMR CN DNA</i> . ....	- 48 -
<b>Tabelle 5.</b> Photophysikalische Charakterisierung der ungebundenen Farbstoffe. ....	- 59 -
<b>Tabelle 6.</b> Photophysikalische Eigenschaften der beiden Sonden <i>4-610CP DNA</i> und <i>4-610CP Tris DNA</i> . ....	- 61 -
<b>Tabelle 7.</b> Vergleichend sind die photophysikalischen Eigenschaften der Farbstoffe <b>5-H</b> und <b>5-F</b> den Farbstoffen <i>4-TMR</i> und <i>6-610CP</i> gegenübergestellt. ....	- 71 -

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
µM	Konzentration in µmol/L
µW	Mikrowatt
A	Absorptionsintensität
ACN	Acetonitril
A <sub>max</sub>	Intensität bei Absorptionsmaximum
BSA	Rinderserumalbumin, engl: <i>bovin serum albumin</i>
c	Konzentration
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
d	Duplett
DC	Dünnschichtchromatographie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl: <i>deoxyribonucleic acid</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA
equiv.	Equivalente, Equivalente
ESI	Elektronenspray Ionisation
Et <sub>3</sub> N	Triethylamin
F	Fluoreszenzintensität
FBS	Kälberserum, engl: <i>fetal bovin serum</i>
F <sub>max</sub>	Intensität bei Fluoreszenzmaximum
FWHM	Halbwertsbreite, engl: <i>full width at half maximum</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HCl	Salzsäure
hpDNA	<i>hairpin</i> DNA
HPLC	..... Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
HR-MS	Hochauflösende Massenspektrometrie, engl: <i>high resolution mass spectrometrie</i>
Hz	Hertz
J	Kopplungskonstante
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
KOH	Kaliumhydroxid
m	Multipllett
M	Konzentration in mol/L
<i>m/z</i>	Masse zu Ladung
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
mHz	Millihertz
mL	Milliliter
mM	Konzentration mmol/L
MS	Massenspektrum
mW	Milliwatt
N	Anzahl
NA	Numerische Apertur

NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natronlauge
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanz, engl: <i>nuclear magnetic resonance</i>
ns	Nanosekunden
NUP98	Kernporenprotein 98, engl: <i>nuclear porin 98</i>
Ø	Durchmesser
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
ppm	Teile pro Million, engl: <i>parts per million</i>
q	Quartett
QY	Quanten-Ausbeute, engl: <i>Quantum Yield</i>
s	Singulett
STED	stimulierte Emissions-Abregung, engl: <i>Stimulated Emission Depletion</i>
t	Triplett
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMSCl	tert-Butyldimethylsilylchlorid
TFA	Trifluoressigsäure, engl. <i>trifluoroacetic acid</i>
TMR	Tetramethylrhodamin
v/v	Volumenprozent
ε <sub>r</sub>	Dielektrizitätskonstante
λ	Wellenlänge in nm

# Abstract

In the past decades key findings in light microscopy has extended the possibilities of optical imaging methods. Imaging of living cells with a detailed visualization of proteins, structures and organelles has become one of the most important topics in this field.

Although, fluorescent proteins are frequently used for live cell microscopy, due to its beneficial properties organic fluorophores moved into scientific focus. Especially Rhodamines, Carbopyronines and Silicon containing Rhodamines (SiR) are cell permeable and can be combined with ligands or reactive groups forming fluorescent probes for state-of-the-art labeling methods.

Within this study strategies for creating organic fluorophores and small molecular probes with an improved fluorogenicity, enhanced target binding affinity, and suitable photophysical properties have been developed. In turn low amounts of probes are required for recording specific and bright images of living cells and tissues with confocal- and STED-microscopy.

# Kurzbeschreibung

In den letzten Jahrzehnten haben bedeutende Entwicklungen auf dem Gebiet der Licht-Mikroskopie die Möglichkeiten geschaffen, Proteine, Strukturen und Organellen detailliert in lebenden Zellen abzubilden.

Obwohl fluoreszierende Proteine häufig in der Lebendzell-Mikroskopie zum Einsatz kommen, wuchs in den letzten Jahren das Interesse an organischen Fluorophoren. Insbesondere Rhodamine, Carbopyronine und Silizium-Rhodamine (SiR) sind zellpermeabel und können, mit Liganden oder reaktiven Gruppen versehen, als fluoreszierende Sonden für modernste Markierungsstrategien genutzt werden.

Im Rahmen dieser Studie wurden Strategien zur Darstellung organischer Fluorophore und molekularer Sonden mit gesteigerter Fluorogenität, erhöhter Bindungsaffinität und geeigneten photophysikalischen Eigenschaften entwickelt. Hierdurch sind geringe Mengen der fluoreszierenden Sonden erforderlich, um die spezifisch markierten Strukturen in lebenden Zellen und Gewebe mit der Konfokal- und STED-Mikroskopie zu visualisieren.



# 1 Vorwort

Wissenschaftliche Beiträge in Fachzeitschriften mit naturwissenschaftlichem Fokus stützen teilweise ihre Erkenntnisse auf mikroskopische Abbildungen von Organismen, Gewebe oder einzelnen Zellen. Die Lichtmikroskopie ist eine der meistgenutzten optischen Verfahren in den Lebenswissenschaften zur Visualisierung von Objekten. Zwar wurde diese Technik immer weiter verfeinert und auf verschiedene Fragestellungen angepasst, so dass es Mikroskope für sehr spezifische Anforderungen gibt.<sup>1</sup> Jedoch hat sich das grundlegende Konzept eines Lichtmikroskops nur unwesentlich geändert. Vereinfacht ausgedrückt sorgen Objektiv und Okular dafür, dass die zu untersuchenden Objekte vergrößert abgebildet werden können. Durch die Etablierung fluoreszenzmikroskopischer Verfahren in naturwissenschaftlichen Laboren, wurde es in der biomedizinischen Forschung ermöglicht sehr gezielt einzelne Objekte innerhalb einer Zelle oder Gewebe zu analysieren.<sup>2</sup> Hierbei wird das Zielobjekt mit Fluorophoren markiert, lokalisiert und seine Lage zwischen anderen Objekten analysiert, sodass dessen räumliche Anordnung visualisiert werden kann.

Die Fluoreszenzmikroskopie wird als eine gering-invasive Methode betrachtet, die es erlaubt Zellen und Gewebe zu untersuchen, da einzig Lichtstrahlen durch die Probe geleitet und die durch Fluoreszenz emittierten Photonen detektiert werden.<sup>3</sup> Mit Blick auf die Probenpräparation zeigt sich jedoch, dass dieses Verfahren nicht immer minimal-invasiv ist, da zunächst die Zielobjekte markiert werden müssen. Bei indirekten Immunfärbungen müssen die Proben fixiert werden, bevor diese anschließend markiert werden können.<sup>4</sup> Hierdurch lassen sich nur Momentaufnahmen betrachten.

Jedoch wurden über die letzten Dekaden eine Reihe von Techniken entwickelt, die eine Beobachtung von Zielobjekten in lebenden Proben ermöglichen.<sup>5</sup> Eine der bedeutendsten Methoden für die Lebendzellmikroskopie ist der Einsatz von fluoreszierenden

Fusionsproteinen, welche durch die genetische Fusion eines Zielproteins mit einem Fluoreszenzprotein (FP) molekularbiologisch hergestellt werden.<sup>6</sup> Somit kann ein Zielprotein mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops in lebenden Zellen betrachtet und untersucht werden. Diese Entdeckung und der damit einhergehende Nutzen wurden von der Schwedischen Akademie der Wissenschaften 2008 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.<sup>7</sup>

Die molekularbiologische Erstellung eines solchen Fusionsproteins ist dank der CRISPR/Cas-Methode wesentlich einfacher geworden.<sup>8</sup> Allerdings dürfen die Anstrengungen, neue FPs zu entwickeln, um ihre Eigenschaften an wissenschaftliche Fragestellungen anzupassen, nicht unterschätzt werden.<sup>9</sup> Weiterhin muss geprüft werden, dass das FP die Eigenschaften des Zielproteins nicht verändert.<sup>10</sup> Dennoch, die Entdeckung des *green fluorescent protein* (GFP) war ein Meilenstein für viele Bereiche in den Lebenswissenschaften. Daher stellen FPs derzeit eine der bedeutendsten Methode dar, Proteine innerhalb lebender Zellen fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen.

Mit dem Einzug neuer hochauflösender Mikroskopie-Techniken kommen FPs jedoch an die Grenzen ihrer Anwendbarkeit.<sup>11</sup> Bei diesen neuen Verfahren, mit denen deutlich bessere Auflösungen erreicht werden, kommen sehr hohe Lichtintensitäten zum Einsatz.<sup>12</sup> FPs besitzen jedoch eine relativ geringere Photostabilität gegenüber organische Fluorophore.<sup>13</sup> Neue Markierungs-Strategien nutzen daher photostabile synthetische Fluorophore, mit denen Zielproteine innerhalb lebender Zellen visualisiert werden.<sup>14</sup>

Eine große Anzahl an organischen Farbstoffklassen kommt für die Fluoreszenzmikroskopie zum Einsatz.<sup>15</sup> Durch chemisches Wissen und Geschick lassen sich neue fluoreszierende Farbstoffe synthetisieren, die den kompletten spektralen Bereich des sichtbaren Lichtes ausfüllen.<sup>15b</sup> Für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie in der lebenden Probe sind solche organischen Farbstoffe in den Fokus der Wissenschaft gerückt, die sich durch eine gute Membrangängigkeit auszeichnen und gleichzeitig photophysikalische Eigenschaften für die



Einzelmolekülspektroskopie besitzen.<sup>16</sup> Die Anzahl an organischen Fluorophoren, die diese Eigenschaften aufweisen ist jedoch limitiert. Das Wissen, die Membrangängigkeit zu verbessern ist noch gering. Es bedarf daher weiterer Forschung, um neue organische Fluorophore für die Lebendzellmikroskopie zu entwickeln und deren Kompatibilität mit „Erkennungseinheiten“, den sogenannten Liganden, für spezifische Markierungen des Zielobjektes zu gewährleisten (s. u.).

In dieser Arbeit werden zwei Strategien vorgestellt, die es ermöglichen zellgängige organische Farbstoffe für die hochauflösende Mikroskopie zu entwickeln. Durch Modifikationen am Molekül-Grundgerüst wurde zum einen die Permeabilität der Farbstoffe erhöht und zum anderen die Fluorogenität (anstieg des Fluoreszenzsignals nach Bindung an das Zielprotein) und Bindeaffinität zum Zielobjekt verbessert, um so das Hintergrundsignal erheblich zu senken. Hierzu wurden die neuen organische Fluorophore synthetisch hergestellt, ihre photophysikalischen Eigenschaften charakterisiert und mit bestehenden, für die Lebendzellmikroskopie genutzten Farbstoffe verglichen. Weiterhin wurden molekulare Sonden synthetisiert, die aus einem Fluorophor und einem Liganden zusammengesetzt sind. Diese Sonden wurden genutzt, um Proteine in lebenden Proben spezifisch zu markieren und diese in konfokal- und STED-mikroskopischen Bildgebungsverfahren abzubilden. Neben *in vivo* Experimenten in kultivierten Säuger-Zellen wurden auch Gewebeproben genutzt, um spezifische Färbungen mit den neu entwickelten Fluorophoren zu untersuchen.



## 2 Einleitung

Ähnlich wie ein Füller ohne Tinte ist ein Fluoreszenzmikroskop ohne Farbstoff kaum nutzbar. Jedoch gibt es bedeutende wissenschaftliche Arbeiten aus den letzten Dekaden, die uns vermitteln, wie fluoreszierende Farbstoffe für modernste Methoden der Lichtmikroskopie entwickelt, hergestellt und genutzt werden können. In diesem Kapitel wird auf die zur Verfügung stehenden Möglichkeiten eingegangen, um Proteine in lebenden Zellen mit organischen Fluorophoren anzufärben. Zu Beginn wird ein Überblick über Markierungsstrategien, wie reaktive Protein-Tags (engl. *tag* für Markierungselement), kleine molekulare Sonden (Farbstoff-Linker-Ligand) und den Einbau unnatürlicher Aminosäuren mit bioorthogonaler reaktiver Gruppe in ein Zielprotein, gegeben. Die besonderen Eigenschaften, die organische Farbstoffe benötigen, um Membrangängig zu sein werden ebenso betrachtet, wie die Möglichkeiten diese Eigenschaften zu verbessern. Weiterhin wird verdeutlicht, warum FPs vor allem im Bereich der STED-Mikroskopie nur begrenzt zum Einsatz kommen und synthetische Fluorophore unabdingbar sind. Nachdem ein Überblick über gegenwertige Techniken und deren Einschränkungen aufgezeigt wurden, werden die zwei Strategien in dieser Arbeit vorgestellt, die zu einer Verbesserung der Fluorogenität und Bindeaffinität der molekularen Sonden führen und in den nachfolgenden Kapiteln genauer behandelt werden.

## 2.1 Markierungsstrategien einzelner Proteine innerhalb lebender Zellen und Organismen

In den letzten Jahrzehnten wurden einige Methoden beschrieben, um einzelne Proteine, Membranen, Nukleinsäuren und Organellen innerhalb lebender Zellen als auch im Gewebe und ganzen Organismen mithilfe eines organischen Fluorophors gezielt zu markieren und mikroskopisch zu visualisieren.<sup>17</sup> Im Folgenden wird an ausgewählten Beispielen beschrieben, welche Strategien dies ermöglichen.

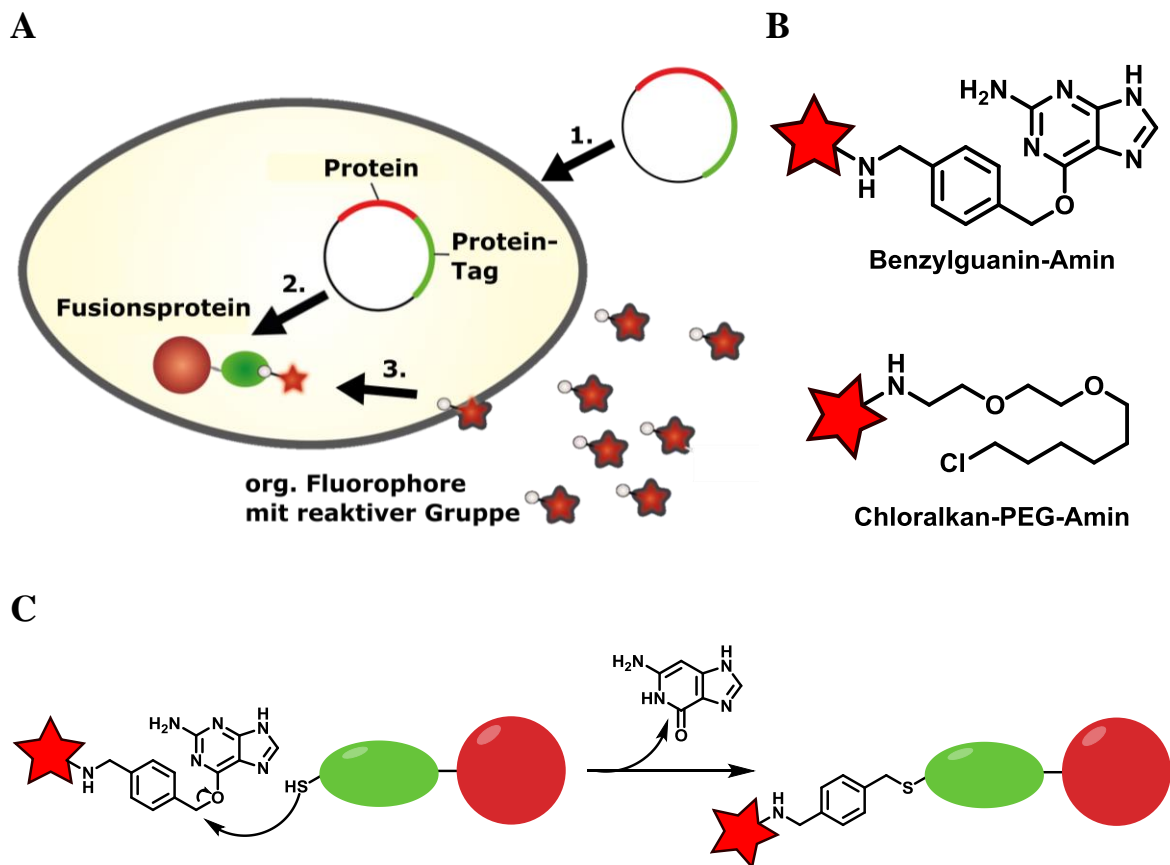
### 2.1.1 Reaktive Protein-Tags

Das Prinzip eines reaktiven Protein-Tags ähnelt dem des Einsatzes von FPs.<sup>17d</sup> Das Gen, welches ein modifiziertes Protein mit einer reaktionsfähigen Region kodiert, wird an das Gen für das zu untersuchende Protein fusioniert (Abbildung 1A). Dieses Genkonstrukt wird in Zellen eingebracht, wodurch die Zelle in der Lage ist, das kodierte Fusionsprotein durch transkriptionale und translationale Prozesse herzustellen. Anders als bei einem FP, fluoresziert der reaktive Protein-Tag jedoch nicht. Erst wenn eine „fluoreszierende Sonde“ (Farbstoff-Linker-Ligand; Abbildung 1C)<sup>18</sup> den Protein-Tag „erkennt“ und sich eine kovalente oder nicht-kovalente Bindung zwischen Ligand und Tag bildet, kann das zu untersuchende Protein selektiv visualisiert werden. Die fluoreszierende Sonde, die von außen zugegeben wird, muss die Zellmembran demnach passieren können.

Die bekanntesten Protein-Tags sind SNAP-Tag<sup>18a,18b</sup> und Halo-Tag<sup>18c</sup>. Beide basieren auf in der Natur vorkommendes Enzym, welche genetisch modifiziert wurden. Das SNAP-Tag Protein ist eine genetisch veränderte Variante der *O*-6-Alkylguanyltransferase (AGT), welches eine entscheidende Aufgabe in DNA-Reparaturprozessen übernimmt.<sup>19</sup> Alkyliertes Guanin wird von dem Enzym erkannt und die Alkylgruppe auf eine der Cysteine im AGT kovalent übertragen. Eine modifizierte Variante, das hAGT, erkennt Benzylguanin (Abbildung 1C).

Dieses Guaninderivat wird für die SNAP-Tag Markierung an einen organischen Farbstoff gekoppelt. In der enzymatischen Reaktion wird nun die Etherbindung zwischen Guanin und dem Benzolrest gespalten und die mit dem organischen Farbstoff gebundene Benzyl-Gruppe auf eines der Cysteine im hAGT übertragen.<sup>18a</sup>

Ein sehr ähnliches Prinzip wurde für das Halo-Tag Protein verfolgt.<sup>18c</sup> Eine modifizierte Halogenalkan-Dehalogenase<sup>20</sup> wird als Hydrolase verwendet, um das zu untersuchende Protein durch Fluorophore, die an einem  $\omega$ -Chloralkan gebunden sind, zu markieren. In einer nukleophilen Substitution tauscht das Chlorid gegen einen Aminosäurerest im Enzym aus. Für



**Abbildung 1.** Prinzip von Fusionsproteinen mit einem reaktiven Protein-Tag. In **A** ist schematisch dargestellt, wie ein zu untersuchendes Protein gezielt durch Protein-Tags markiert werden kann. Im 1. Schritt wird das Plasmid, auf dem sich das Gen des Proteins zusammen mit dem Gen für den Protein-Tag befindet, in die Zelle eingebracht, in die Zelle eingebracht. Im 2. Schritt wird durch die zelleigene Proteinbiosynthese das Fusionsprotein hergestellt. Von außen werden im 3. Schritt organische Fluorophore mit einer reaktiven Gruppe zugegeben, die in der Lage sind durch die Zellmembran zu diffundieren. In einer enzymatischen Reaktion bindet der organische Fluorophore kovalent an dem Protein-Tag. Die Erkennungseinheiten, die mit organischen Fluorophoren (rote Sterne) über eine Amidbindung gekoppelt werden können, sind in **B** dargestellt. Benzylguanin dient als Ligand für die Markierung eines SNAP-Tag Fusionsproteins, während das Chloralkan für die Markierung von Halo-Tag Proteinen genutzt wird. Beispielhaft ist in **C** die enzymatische Reaktion zwischen einem SNAP-Tag Protein und einem Benzylguanin gezeigt. Durch nucleophile Substitution eines freien Thiols im Protein-Tag kommt es zur Freisetzung des Guanins und kovalenten Bindung des organischen Fluorophors an den Protein-Tag.

eine Regeneration des Enzyms folgt im Wildtyp eine Hydrolyse. Diese ist in der modifizierten Varianten unterbunden, sodass das Alkan mit dem angefügten organischen Fluorophor kovalent am Halo-Tag Protein gebunden bleibt.

Diese Protein-Tags können nicht nur in der lebenden Zelle verwendet werden,<sup>21</sup> sondern auch in fixierten Proben.<sup>22</sup> Dies erweitert die Anwendungsmöglichkeiten erheblich, sodass auch Farbstoffe genutzt werden können, die nicht zellpermeabel sind, oder Proteine markiert werden können, für die es keine spezifischen Antikörper gibt und daher keine Immunfärbung möglich ist.

Allerdings sind diese Tags etwa ähnlich groß wie FPs: GFP hat eine Masse von 26,9 kDa,<sup>23</sup> der Halo-Tag hat eine Masse von 33,8 kDa;<sup>24</sup> Das SNAP-Tag hat mit 19,4 kDa<sup>25</sup> eine geringfügig kleinere Masse. In der hochauflösenden Mikroskopie sind nicht nur die technischen Anforderungen und die Farbstoffe ein limitierender Faktor für eine wesentlich verbesserte optische Auflösung, auch die Markierungsstrategie ist entscheidend.<sup>26</sup> Durch den Einsatz großer Protein-Tags kann die zu untersuchende Struktur unter Umständen vergrößert oder die native Konformation gestört werden. Dies würde fehlerhafte Abbildung des eigentlichen Objekts in der hochauflösenden Mikroskopie verursachen. Daher stehen neuere Techniken zur Verfügung, die auf kleinere molekulare Sonden und auf minimale Tags direkt am zu markierendem Protein zurückgreifen.<sup>27</sup>

### 2.1.2 Molekulare fluoreszierenden Sonden für die Lebendzellmikroskopie

Sowohl kleinere Moleküle als auch kurze lineare und zyklische Peptide können die Zellmembran passieren und sich in bestimmten Organellen anreichern oder mit Proteinen und Nukleinsäuren interagieren (Abbildung 2).<sup>28</sup> Diese Moleküle werden teilweise in der Medizin als Inhibitoren für verschiedene biochemische Prozesse verwendet.<sup>28b,28d,28e,28h</sup> Ein Vorteil ist, dass sie als Liganden genutzt und mit einem organischen Farbstoff versehen werden

können.<sup>27,29</sup> Als molekulare fluoreszierende Sonden sind sie in der Lage spezifisch mit dem Zielprotein innerhalb lebender Zellen zu interagieren. Dies ermöglicht eine weitere Strategie, Proteine, Strukturen oder Organellen über die Fluoreszenzmikroskopie zu visualisieren. Im Folgenden werden einige Beispiele für den Einsatz von molekularen Sonden aufgelistet.

**Markierung von Tubulinfilamenten:** Taxane kommen in Pflanzen wie der Eibe vor und binden an  $\beta$ -Tubulin,<sup>28c-e</sup> wodurch der Abbau von Tubulinfilamenten in der Zelle gehemmt wird. Während der Mitose wird der Abbau des Spindelapparates verhindert und die Zellteilung unterbrochen. Durch dieses Eingreifen in die Zellteilung können Taxane in der Krebstherapie verwendet werden. In sehr geringen Konzentrationen können sie allerdings auch als Liganden mit einem Fluorophor eingesetzt werden, um so das Tubulin-Zytoskelett zu markieren.<sup>29b,30</sup> Dies wurde erfolgreich mit *Docetaxel*,<sup>29b,30a</sup> *Cabazitaxel*,<sup>29b,30b</sup> und *Larotaxel*<sup>29b</sup> in Verbindung mit diversen Farbstoffen gezeigt.

**Markierung von Aktinfilamenten:** *Jasplakinolid* ist ein zyklisches Peptid, welches die Polymerisation von Aktinfilamenten induziert.<sup>28h</sup> Über das primäre Amin der Lysin-Seitengruppe in einem modifiziertes *Jasplakinolid* kann ein organischer Farbstoff angefügt werden.<sup>31</sup> Diese Sonde ist in der Lage Aktinfilamente in lebenden aber auch fixierten Zellen zu markieren.<sup>30,32</sup>

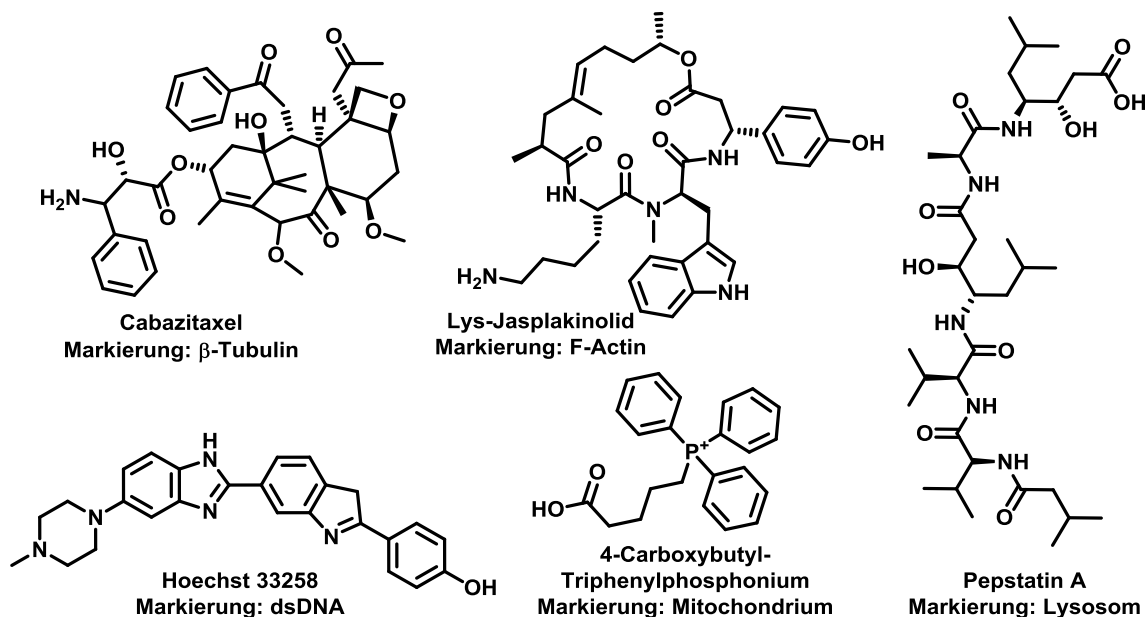
**Markierung von DNA:** Für die Markierung doppelsträngiger DNA in lebenden Objekten werden Hoechst-Derivate verwendet.<sup>28f,28g</sup> *Hoechst 33258* ist ein aus zwei Benzimidazole aufgebautes kleines Molekül, welches sich in die *minor groove* doppelsträngiger DNA einlagert. Vor allem Adenin- und Thymin-Reiche Basensequenzen dienen als Interaktionspartner.<sup>33</sup> Entgegen der anfänglichen Vermutung, dass vor allem Wasserstoffbrückenbindungen zu einer stabilen Einlagerung des Moleküls in die *Minor-Groove* führen, sind es eher hydrophobe Effekte.<sup>34</sup> Das Absorptionsspektrum von *Hoechst 33258* befindet sich im UV-Bereich. Für eine Langzeitaufnahme unter Anregung von UV-Licht kann

dies zu phototoxischen Effekten innerhalb der Zelle führen. Um dies zu umgehen, wird Hoechst als DNA-Bindedomäne verwendet. Mit einem weiteren, an Hoechst gebundenen Farbstoff, der eine hohe Quantenausbeute besitzt und ein rotverschobenes Absorptions- und Emissionsspektrum aufweist, können Schäden durch dauerhafte UV-Bestrahlung vermieden werden.<sup>35</sup>

**Markierung von Mitochondrien:** Das kationische, lipophile Triphenylphosphonium lagert sich durch das Membranpotential in die innere Mitochondrienmembran ein. Es wird daher oft verwendet, um mit einem organischen Fluorophor eine Sonde zu bilden, welche die mitochondriale Matrix markiert.<sup>36</sup>

**Markierung von Lysosomen:** *Pepstatin A* ist ein lineares Peptid und inhibiert Endopeptidasen. Die Asparatyl-Protease Cathepsin D ist innerhalb der Lysosome lokalisiert.<sup>37</sup> Wird *Pepstatin A* mit einem organischen Farbstoff versehen, interagiert diese Sonde mit Cathepsin D und markiert das Lysosom.<sup>38</sup>

Durch ihre molekulare Dimension von wenigen Nanometern können diese Sonden in der hochauflösenden Mikroskopie nach der Markierung die tatsächliche Größe der analysierten



**Abbildung 2.** Chemische Strukturen der Liganden, die nach der Kopplung an einen organischen Fluorophor zur Markierung von Proteinen und Organellen in lebenden Objekten verwendet werden können.

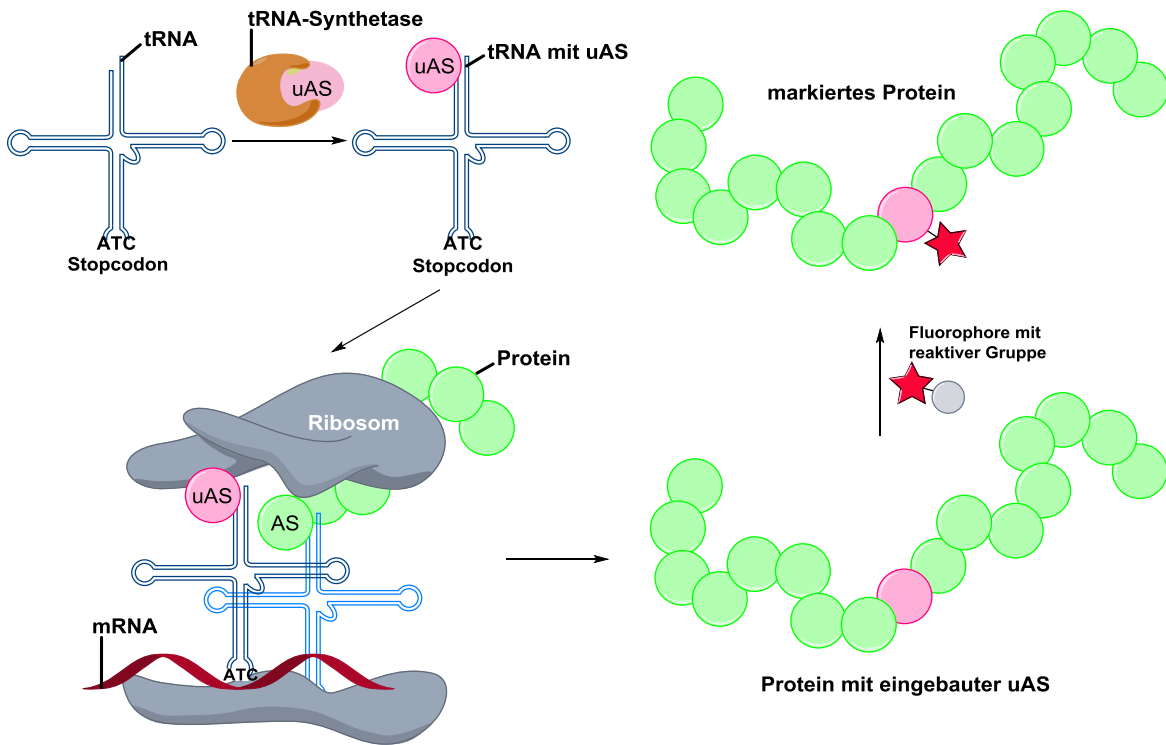
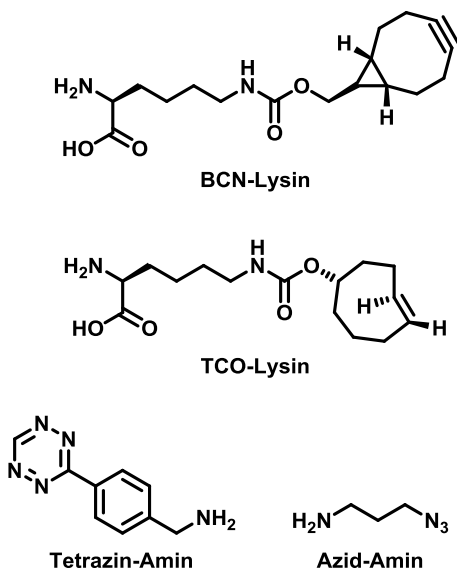
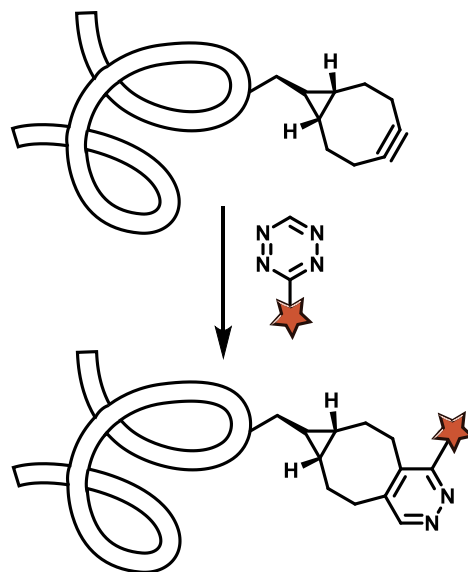


Struktur verbessert abbilden.<sup>27</sup> Obgleich viele der eingesetzten Liganden toxisch sind, zumindest aber Physiologie und Morphologie der Probe beeinflussen können,<sup>28h,39</sup> nehmen sie in geringen Konzentrationen nur wenig Einfluss auf das lebende Objekt. Hierzu benötigt es aber Farbstoffe, die einen Einsatz mit geringer Konzentration aufgrund ihrer besonderen photophysikalischen und chemischen Eigenschaften zulassen.<sup>40</sup>

### 2.1.3 Unnatürliche Aminosäuren mit bioorthogonalen reaktiven Seitengruppen

In den letzten Jahren wurde eine Strategie entwickelt, die es erlaubt Proteine direkt mit einem organischen Fluorophor kovalent zu markieren.<sup>41</sup> Gleichsam wie in den vorherigen beiden Strategien auch, wird pro Protein nur ein Fluorophor zur Markierung genutzt - ein bedeutender Punkt in der Einzelmolekülspektroskopie. Jedoch ist es die direkte Markierung des Proteins mit einem Fluorophor ohne weiterer Protein-Tags oder Liganden, die eine Aussage über die tatsächliche Größe der Struktur und Lage im Raum erlauben.

Damit eine unnatürliche Aminosäure (uAS) in die Proteinsequenz eingefügt werden kann, wird eine Triplet-Basenfolge im Gen des zu markierenden Proteins gegen eines der drei möglichen Stopcodons ausgetauscht.<sup>42</sup> Weiterhin wird die Zelle mit einer tRNA ausgestattet, die aufgrund ihres Basentriplets das Stopcodon erkennt. Eine genetisch veränderte tRNA-Synthetase ist in der Lage, die neue tRNA mit einer unnatürlichen Aminosäure zu beladen (Abbildung 3A).<sup>43</sup> Erhält die modifizierte Zelle Zugang zu der unnatürlichen Aminosäure, kann diese uAS mit Hilfe der tRNA-Synthetase auf die für das Stopcodon codierte tRNA beladen und so in die Aminosäuresequenz des Proteins eingebaut werden. Die Proteinbiosynthese wird fortgesetzt und ein Protein mit einer eingebauten unnatürlichen Aminosäure gebildet. Mehrere genetische Modifikation führten zu einer Vielzahl an tRNA-Synthetase, die unterschiedliche Aminosäuren mit in der Natur nicht vorkommenden Seitengruppen erkennen und an eine tRNA anlagern

**A****B****C**

**Abbildung 3.** Click-Chemie als Markierungs-Technologie. Unnatürlicher Aminosäuren (uAS) mit bioorthogonalen Seitengruppen als minimaler Tag für die Markierung eines Proteins mit organischen Fluorophoren. In **A** ist das Verfahren zum Einbau von uAS schematisch gezeigt. Eine modifizierte tRNA, die ein Stopcodon erkennt (Bsp. UAG), wird durch eine genetisch veränderte tRNA-Synthetase mit einer in der Natur nicht vorkommenden Aminosäure (AS) beladen. Während der Translation wird das Stopcodon von der modifizierten tRNA erkannt und die uAS in die Peptidsequenz eingebaut. Anschließend wird durch Zugabe eines organischen Fluorophors mit einer reaktiven Gruppe das Protein an der uAS markiert. Etablierte unnatürliche Aminosäuren in **B**, die von einer genetisch angepassten tRNA-Synthetase erkannt und auf eine tRNA übertragen werden sind Lysinderivate. Als bioorthogonale Gruppen werden gespannte Ringe, wie Cyclooctine (BCN: Bicyclo [6.1.0] nonin) und Cyclooctene (TCO: trans-Cycloocten) verwendet. Die reaktiven Seitengruppen an den organischen Fluorophoren sind Tetrazine und Azide. In **C** ist die inverse Diels-Alder Reaktion zwischen BCN und ein Tetrazin beispielhaft gezeigt. Diese läuft unter sehr milden Bedingungen und in wässrigem Medium mit einem fast vollständigen Umsatz ab.

können.<sup>44</sup>

Die Seitengruppen an den unnatürlichen Aminosäuren können beispielsweise reaktive Gruppen, lineare Alkine, Cyclooctine oder Cyclooctene sein. Vor allem gespannte, ungesättigte Ringe sind hochreaktiv gegenüber Azide und Tetrazine (Abbildung 3B).<sup>45</sup> Organische Fluorophore mit einem Azid oder Tetrazin reagieren spezifisch mit der Seitengruppe der unnatürlichen Aminosäure im modifizierten Protein.<sup>46</sup> Dies ermöglicht ein bioorthogonales System, um Fluorophore direkt an das zu untersuchende Protein kovalent zu binden. Die im Allgemeinen als *click chemistry* beschriebene Reaktion läuft unter sehr milden Bedingungen, bei Raumtemperatur, im wässrigen Medium und ohne den Einsatz von Katalysatoren ab (Abbildung 3C). Dies wird durch die *strain-promoted azide-alkyne cycloaddition* (SPIDAC) ermöglicht. So reagiert beispielsweise ein gespanntes Cycloocten mit einem Tetrazin in einer inversen Diels-Alder Reaktion, gefolgt von einer retro [4 + 2] -Cycloaddition.<sup>45b</sup>

Auch wenn diese Markierungstechnik erhebliches molekularbiologisches und genetisches Wissen voraussetzt und oft durch die niedrige Wasserlöslichkeit der uAS begrenzt wird, ermöglicht sie, photostabile organische Fluorophore direkt an das Zielprotein kovalent zu binden. Jedoch werden zellgängige Farbstoffe benötigt, mit denen sich durch hohe Quantenausbeute, Photostabilität und Fluorogentität das Protein im lebenden Objekt eindeutig lokalisieren und abbilden lässt.

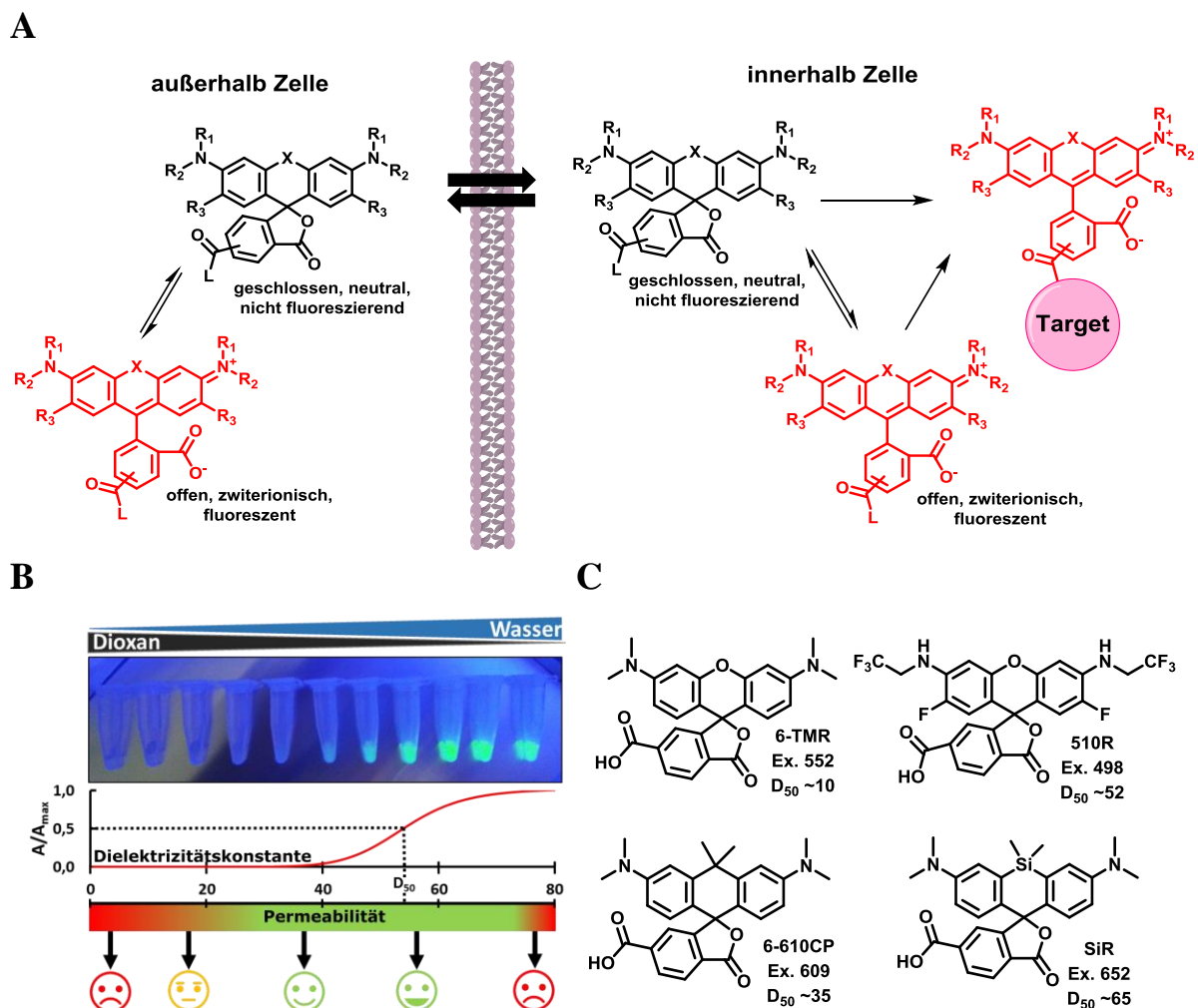
## 2.2 Organische Fluorophore für die Lebendzellmikroskopie

Ogleich mehrere Farbstoffklassen in der Fluoreszenzmikroskopie Anwendung finden,<sup>47</sup> wurden in den vergangenen Jahren hauptsächlich organische Farbstoffe mit einem Xanthen- (Rhodamine), Dihydroanthracen- (Carbopyronine) und Dihydrosilananthracen-Grundkörper (Silizium-Rhodamine) erfolgreich für die Markierung von Proteinen in lebenden Zellen

genutzt.<sup>48</sup> Generell finden diese Klassen an Farbstoffe immer noch ein breites Anwendungsspektrum in der Fluoreszenzmikroskopie, da sie sich durch gute Photostabilität, und hohe Quantenausbeute auszeichnen.<sup>49</sup> Weiterhin kann durch chemische Modifikationen das Anregungs- und Emissionsspektrum vom kurzwelligem bis hin zum langwelligen Bereich des sichtbaren Lichts abgedeckt werden.<sup>50</sup> Speziell für die Lebendzellmikroskopie zeichnen sich Rhodamine, Carbopyronine und Silizium-Rhodamine durch eine besondere Bindungsisomerie aus (Abbildung 4A).<sup>16</sup> In der sogenannten offenen Form sind diese Farbstoffe zwitterionisch und fluoreszierend. In der geschlossenen Form hingegen sind sie ungeladen und nicht fluoreszierend. Durch die Ausbildung eines Spirolaktons und den Übergang in die geschlossene Form, sind Rhodamine, Carbopyronine und Silizium-Rhodamine in der Lage durch die Zellmembran zu diffundieren.

In mehreren Studien wurde sich mit der Frage auseinandergesetzt, wie das Gleichgewicht zwischen der offenen, zwitterionischen und geschlossenen, zellgängigen Form angepasst werden kann, sodass eine hohe Membranpermeabilität gegeben wird und trotzdem ein hohes Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Hierzu wurden Xanthen-, Dihydroanthrazen- und Dihydrosilananthrazen-Farbstoffe entwickelt, die eine höhere Bereitschaft zeigen, ein Spirolaktonring auszubilden.<sup>48a,48b,48d,48g,48j,48k</sup> Rhodamine, Carbopyronine und Silizium-Rhodamine tragen am Benzolring in *ortho*-Position zum Xanthen eine Carboxylgruppe, wodurch die Ausbildung des Spirolaktons gegeben ist. Allerdings ist im wässrigen, polaren Medium die offene Form durch Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen stabilisiert.<sup>51</sup> In einem unpolaren, aprotischen Lösungsmittel ist die zwitterionische Form durch das Fehlen von Wasserstoffbrückenbindungen destabilisiert und es kommt zur Ausbildung des Spirolaktons.<sup>52</sup>

Dioxan ist mit einer Dielektrizitätskonstante  $\epsilon = 2$  sehr unpolar, Wasser mit  $\epsilon = 80$  dagegen sehr polar. In reinem Dioxan sind Rhodamine daher nicht fluoreszent, da der Spirolaktonring gebildet wird. Durch Zugabe von Wasser ändert sich die Polarität der Lösung und die zwitterionische offene Form wird durch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert (Abbildung 4B).<sup>52b</sup> Mit Absorptionsmessungen des Farbstoffs in verschiedenen Dioxan-Wasser-Lösungen kann der Wert für die Dielektrizitätskonstante des umgebenden



**Abbildung 4.** Zellpermeable organische Fluorophore. Rhodamine, Carbopyronine und Silizium-Rhodamine besitzen, wie in **A** gezeigt, ein Gleichgewicht zwischen der offenen, zwitterionischen und der geschlossenen, neutralen Form. Die neutrale Form ist in der Lage durch die Zellmembran zu diffundieren. Innerhalb der Zelle kann mit einem Liganden das Zielprotein markiert werden. Die Zellpermeabilität lässt sich über den  $D_{50}$ -Wert wie in **B** ermitteln. Farbstofflösungen mit verschiedenen Dioxan-zu-Wasser Verhältnissen werden absorptionsspektroskopisch analysiert. Der  $D_{50}$ -Wert gibt die Dielektrizitätskonstante der Lösung an, bei der die Hälfte der maximalen Absorptionsintensität erreicht wurde. Besitzen Farbstoffe einen geringen  $D_{50}$ -Wert, sind diese kaum in der Lage die geschlossene Form auszubilden und somit schlecht zellgängig. Hingegen ist die geschlossene Form bei Farbstoffen mit einem hohen  $D_{50}$ -Wert relativ stabil, sodass von einer guten Zellpermeabilität ausgegangen werden kann. Beispielfhaft sind in **C** Farbstoffe gezeigt, die mit einem geringen  $D_{50}$ -Wert eine ebenso schlechte Permeabilität zeigen (TMR) und Möglichkeiten, diesen Wert durch sowohl elektronenziehende Gruppen als auch Atome aus der Gruppe 14 des Perioden Systems der Elemente zu verbessern.

Lösungsmittels bestimmt werden, bei der die Hälfte der maximalen Absorptionsintensität erreicht wurde. Durch diese im Folgenden als  $D_{50}$ -Wert bezeichnete Größe kann analytisch festgestellt werden, wie stabil der Spirolaktonring im Rhodamin ist. Indirekt lässt sich daraus eine Tendenz über die Zellgängigkeit des Farbstoffs ableiten. Je höher der  $D_{50}$ -Wert, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung des Spirolaktons und desto stärker ist die Membranpermeabilität des Farbstoffs.<sup>48b</sup>

Beispielsweise besitzt *N,N,N',N'*-Tetramethyl-6-Carboxyrhodamin (6-*TMR*; Abbildung 4C) mit  $D_{50} \approx 10$  einen sehr geringen Wert.<sup>40</sup> Die Zellgängigkeit seiner Derivate ist daher ebenfalls relativ gering. Jedoch wurde in den vergangenen Jahren durch chemische Modifikationen am Rhodamingrundkörper untersucht, wie der  $D_{50}$ -Werte gesteigert werden kann.

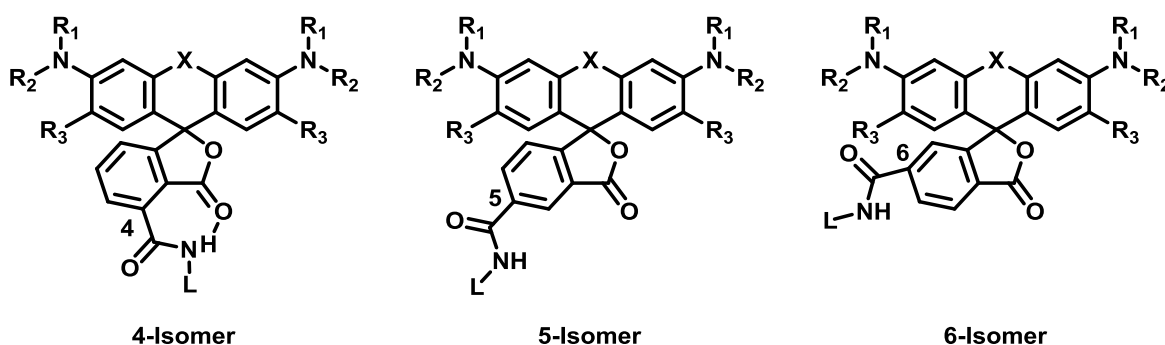
Werden die Aminomethyl-Gruppen teilweise durch elektronenziehende Gruppen ersetzt oder elektronenziehende Gruppen an den Xanthenring eingeführt, erhöht sich der elektrophile Charakter des Mesokohlenstoffs, der an der Bildung des Spirolaktons beteiligt ist. Dementsprechend erniedrigen Halogene wie Fluor direkt am Xanthen oder 2,2,2-Trifluorethyl-Gruppen am Xanthen-Amin die Elektronendichte, wodurch der  $D_{50}$ -Wert erheblich steigt.<sup>48k,50e</sup> Das Absorptions- und Emissionsspektrum von Rhodamin 510R (Abs. 498 nm) ist verglichen zu 6-*TMR* (Abs. 552 nm) durch das Einbringen der elektronenziehenden Gruppen stark blauverschoben.<sup>50e</sup> Gleichzeitig steigt der  $D_{50}$ -Wert auf über 50 an.<sup>30b</sup> Dies hat eine wesentlich bessere Zellpermeabilität zur Folge, was in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte.<sup>29a,30b</sup>

Weiterhin kann der Xanthen-Sauerstoff gegen ein Atom aus der 4. Hauptgruppe ausgetauscht werden. Das Sauerstoffatom bewirkt durch mesomere Effekte eine Delokalisierung der positiven Ladung im Fluorophor.<sup>48g</sup> Durch den Austausch eines Sauerstoffs mit einem Dimethyl-Kohlenstoff wird die positive Ladung am Mesokohlenstoff stabilisiert, wodurch die Ausbildung des Spirolaktons begünstigt wird. Das Carbopyronin 6-610CP hat damit einen  $D_{50}$ -Wert von über 35.<sup>48b</sup> Durch die zusätzliche Rotverschiebung des Absorptions- und

Emissionsspektrums wurde dieser Farbstoff für die Lebendzellmikroskopie mit diversen Markierungsstrategien erfolgreich verwendet.<sup>21b,32a,35b,40,48b,48c</sup>

Ein weiteres Atom aus der 4. Hauptgruppe, welches eine wesentliche Verbesserung der Zellpermeabilität zur Folge hat, ist Silizium. Mit Dimethylsilizium konnte ein *Silicon containing Rhodamine*, kurz *SiR*, als ein weiterer Farbstoff beschrieben werden, mit dem exzellente Ergebnisse in der Lebendzellmikroskopie erzielt wurden.<sup>21a,21b,29a,29b,30a,32b,35b</sup> Durch den hohen  $D_{50}$ -Wert von ca.  $65^{48b}$  und dem Absorptions- und Emissionsspektrum im infraroten Bereich des sichtbaren Lichts wird *SiR* als Referenz-Farbstoff an lebenden Proben verwendet.

In einigen Studien wurde gezeigt, dass verschiedene Regioisomere eines Rhodamins bzw. Carbopyronins die Markierung des Zielproteins beeinflussen können.<sup>35b,40</sup> Die zweite Carboxylgruppe am Benzolring, welche zur Kopplung an Liganden oder reaktiven Gruppen genutzt wird, kann an 3 verschiedenen Positionen eingebracht werden (Abbildung 5). Je nach Synthese kann der Kohlenstoff C4, C5 oder C6 im Benzolring die Carboxylgruppe tragen. Die Isomere werden demnach als Isomer 4, 5 und 6 bezeichnet. Die Kopplung der reaktiven Gruppen oder des Liganden erfolgt durch eine Amid-Bindung. Befindet sich das Amid in *ortho*-Position zum Spirolaktonring, kann durch die räumliche Nähe eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff und dem Proton am Stickstoff ausgebildet werden.<sup>40</sup> Durch diesen Nachbargruppen-Effekt wird mit Isomer 4 die geschlossene

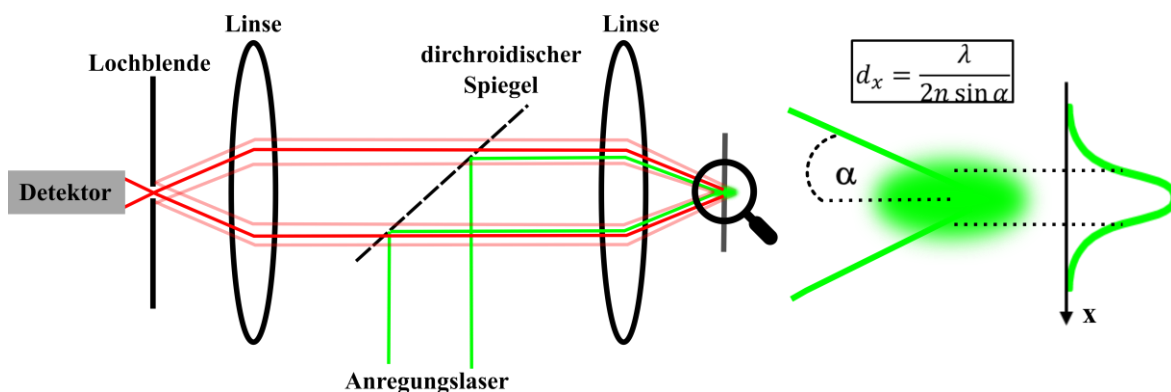


**Abbildung 5.** Drei Isomere eines organischen Farbstoffs. Die Bezeichnung der Isomere richtet sich nach der Position der Carboxylgruppe bzw. des Amids am jeweiligen Kohlenstoffatom im Benzolring. Durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zeigt Isomer 4 eine höhere Biokompatibilität als die vergleichenden Isomere 5 und 6.

Form des Rhodamins stabilisiert. Dieser Effekt ist bei Isomere 5 (*meta*-Position) und Isomer 6 (*para*-Position) durch die räumliche Distanz des Spirolaktonrings zum Amid nicht möglich.

### 2.3 Hochauflösende Mikroskopie – STED Mikroskopie

Ein Konfokal-Mikroskop nutzt für die Anregung fluoreszierender Moleküle Licht einer bestimmten Wellenlänge (Abbildung 6). Das Anregungslicht wird an einem dichroitischen Spiegel reflektiert und durch ein Objektiv geleitet. Hierbei wird der Strahl auf einen Punkt fokussiert. Über einen Scanner wird ein ausgewählter Bereich in der Probe mit dem Lichtpunkt abgerastert<sup>53</sup> und die sich im Lichtpunkt befindenden Fluorophore werden auf einen energiereicheren Zustand angeregt (Abbildung 7A). Nach einer gewissen Fluoreszenz-Lebenszeit im angeregten Zustand kehren die Fluorophore in den Grundzustand zurück. Hierbei emittieren sie Photonen.<sup>54</sup> Das energieärmere und somit rotverschobene emittierte Licht passiert das Objektiv und den dichroitischen Spiegel. Eine nachgeschaltete Lochblende blockiert emittierte Strahlung von Ebenen, die oberhalb und unterhalb der Fokusebene liegen.<sup>55</sup> Dieses Bauteil ist das Entscheidende in der konfokalen Mikroskopie. Hierdurch wird der Kontrast des späteren Bildes und die daraus zu gewinnenden Informationen wesentlich



**Abbildung 6.** Prinzip der Konfokalmikroskopie. Das Anregungslicht wird von dem dichroitischen Spiegel reflektiert und passiert das Objektiv, wodurch der Strahl auf eine Fokusebene in der Probe gebündelt wird. Fluorophore innerhalb dieses fokussierten Lichtpunkts werden angeregt und fluoreszieren. Das fluoreszierte Licht passiert das Objektiv und den dichroitischen Spiegel und gelangt durch eine Lochblende auf den Detektor. Fluoreszentes Signal von Ebenen oberhalb und unterhalb der Fokusebene werden durch die Lochblende blockiert. Die minimale Größe des fokussierten Lichtpunkts hat einen definierten Durchmesser. Diese hängt von der genutzten Wellenlänge, dem Brechungsindex des Mediums nach dem Objektiv und dem Austrittswinkel ab.



verbessert. Das Fluoreszenzsignal aus der Fokusebene wird letztlich von einem Detektor erfasst und das Bild in einem Computer aufgebaut.

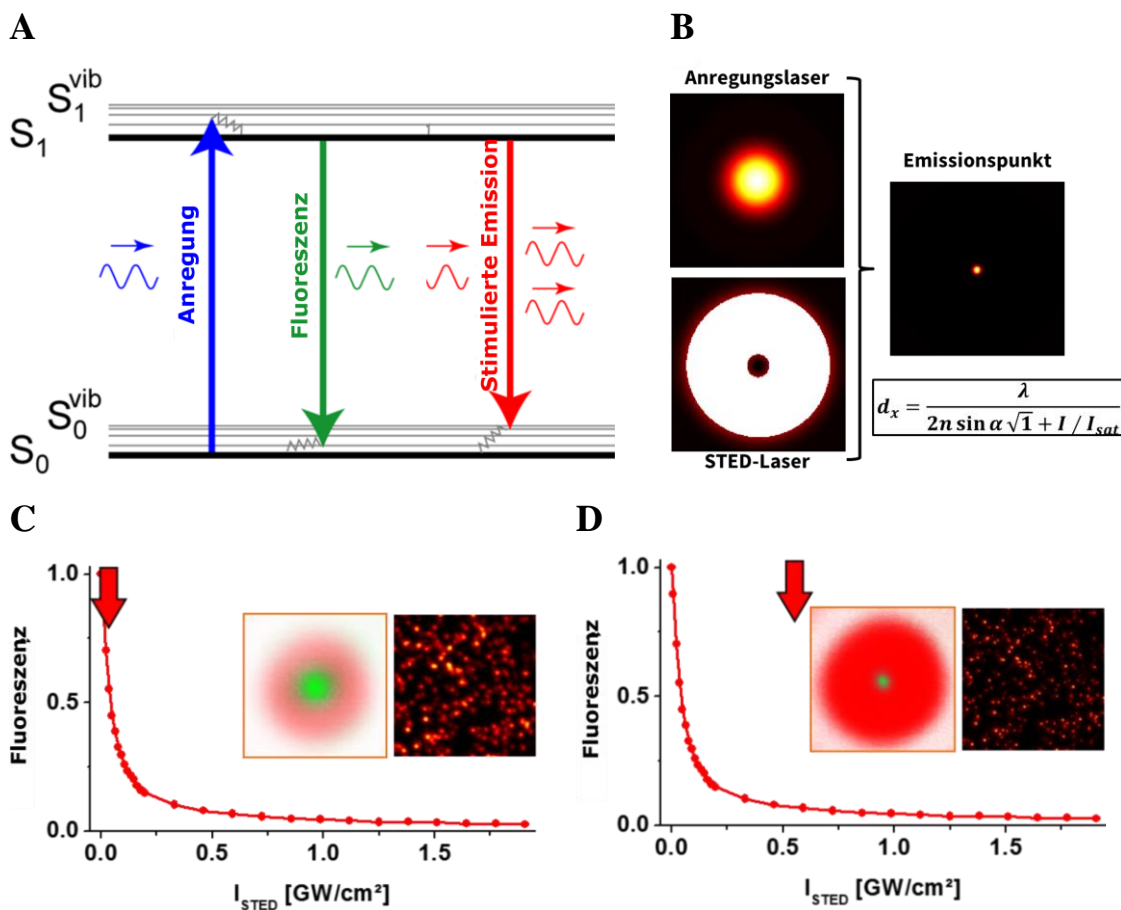
Die Auflösung eines konfokalen Mikroskops ist jedoch begrenzt. Der Durchmesser des Lichtpunktes, auf den der Laserstrahl fokussiert wird, kann nicht kleiner als etwa die Hälfte der genutzten Wellenlänge werden (Abbildung 6). Grund hierfür ist die Beugungsbegrenzung des Lichts. Ernst Abbe beschrieb erstmals die Einflüsse der genutzten Wellenlänge und der numerischen Apertur, die den Durchmesser des fokussierten Lichtpunkts beeinflussen in der folgenden Gleichung.<sup>56</sup>

$$d_x = d_y = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \quad (\text{Gl. 1})$$

Hierbei ist  $\lambda$  die genutzte Anregungswellenlänge in nm,  $n$  der Brechungsindex des Mediums, welches das Anregungslicht nach Austritt aus dem Objektiv passiert und  $\alpha$  der Öffnungswinkel zwischen Objektiv und Fokusebene. Die Anregungswellenlänge kann zwar klein gehalten und Refraktionsindex und Öffnungswinkel durch spezielle Medien und Objektive erhöht werden, aber durch physikalische und technische Limitationen kann der Durchmesser des fokussierten Laserpunkts nicht unendlich verkleinert werden. Alle Fluorophore in diesem Fokuspunkt werden gleichzeitig angeregt, sodass eine Separation der einzelnen Fluorophore im Fokus durch den Detektor nicht vorgenommen werden kann. Fluorophore die demnach räumlich näher sind als 200 - 250 nm werden als ein einziger fluoreszierender Punkt vom Detektor registriert. Dies ergibt letztlich eine Auflösungsgrenze von ca. 250 nm.

In allen hochauflösenden Mikroskopie-Techniken versucht man mit dem An- und Ausschalten der Fluorophore die oben beschriebene Auflösungsgrenze zu überwinden.<sup>57</sup> Mit der STED (engl. *Stimulated Emission Depletion*) -Mikroskopie wird eine optische Auflösung von weniger als 25 nm erreicht.<sup>57</sup> Verglichen mit der konventionellen Konfokal-Mikroskopie ist dies eine 10-fache Auflösungserhöhung.

Durch stimulierte Emission können durch den Anregungslaser aktivierte Fluorophore kontrolliert in den Grundzustand gebracht und die spontane Emission somit unterbunden werden (Abbildung 7A).<sup>58</sup> Hierzu wird ein zweiter Laserstrahl verwendet, der gegenüber des Anregungslaser rotverschoben ist. Weiterhin ist dieser sogenannten STED-Laser als Ring moduliert. In der Mitte ist die Lichtintensität Null, während in Richtung der Peripherie die Lichtintensität sehr stark ansteigt. So werden für die Anregung Laserleistungen im unteren Mikrowattbereich verwendet, die Laserleistung des STED-Lasers liegt jedoch im Milliwattbereich. Werden beide Strahlen, Anregungs- und STED-Laser, übereinandergelegt



**Abbildung 7.** Prinzip der STED-Mikroskopie. Wie in dem Jablonski Diagramm in **A** gezeigt, können Farbstoffe von Licht mit definierten Wellenlängen angeregt werden. Nach einer Fluoreszenz-Lebensdauer von wenigen Nanosekunden im angeregten Zustand, kehren diese spontan in den Grundzustand zurück und emittieren ein Photon (Fluoreszenz). Elektronen können mithilfe eines weiteren Laserstrahls gezwungen werden in den Grundzustand zurück zu kehren. Dieser Prozess ist als stimulierte Emission beschrieben. Die STED-Mikroskopie macht sich dieses Prinzip zu Nutze (**B**), indem ein Anregungslaser und der STED-Laser übereinandergelegt werden. Der STED-Laser ist dem Anregungslaser gegenüber rotverschoben und besitzt ein Ringmuster. Zwar werden Fluorophore von dem Anregungslaser weiterhin angeregt, jedoch fluoreszieren nur die Farbstoffe im Zentrum des Anregungslaser, während die Fluorophore in der Peripherie durch den STED-Laser zurück in den Grundzustand gezwungen werden. Die Auswirkungen auf die optische Auflösung sind in **C** und **D** gezeigt. Je höher die Strahlungsintensität des STED-Lasers ist, desto kleiner wird der Emissionspunkt und desto besser wird die optische Auflösung.

(Abbildung 7B), so werden zwar alle Fluorophore, die sich im Punkt des Anregungslasers befinden in einen höheren Energiezustand gebracht, jedoch werden die angeregten Fluorophore in der Peripherie durch den STED-Laser sofort kontrolliert in den Grundzustand geleitet. Das genutzte Detektionsfenster erlaubt es, dass nur die Fluorophore detektiert werden, die sich in der Mitte des Anregungslasers befinden und die Möglichkeit haben durch spontane Emission ein Photon auszusenden.<sup>58</sup> Der Durchmesser des Emissionspunkts hängt somit von der Intensität des STED-Lasers ab.

$$d_x = d_y = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + I_{STED}/I_{sat}}} \quad (\text{Gl.2})$$

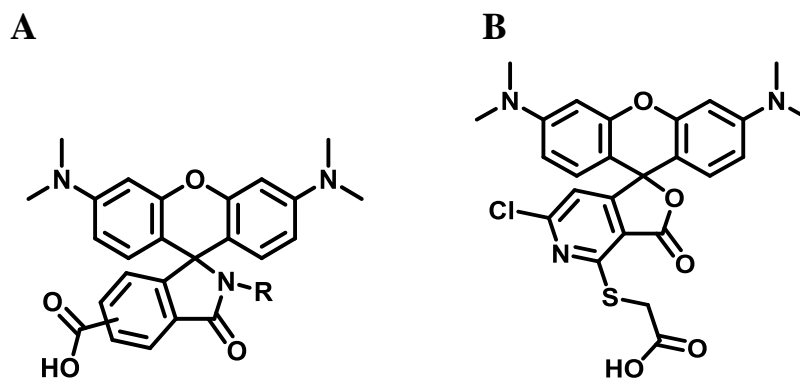
Je höher die Intensität des STED-Strahls  $I_{STED}$  ist, desto geringer wird der Durchmesser des Emissionspunkts und desto höher steigt die optische Auflösung (Abbildung 7C und D).

Während einer Messung verharren Anregungs- und STED-Laser mehrere Microsekunden an einer Stelle. In dieser Zeit iterieren Fluorophore zwischen Grund- und Anregungszustand hunderte Male. Daher sind Fluorophore mit erhöhter Photostabilität maßgebend für eine Abbildung des Objektes mit hoher optischer Auflösung.<sup>59</sup> Weiterhin benötigt es Fluorophore, die mit dem STED-Laser interagieren können und sich gezielt inaktivieren lassen.<sup>60</sup> Die hohe Photostabilität und ein besser anzupassendes Emissionsspektrum sind die Vorteile von organischen Fluorophoren gegenüber fluoreszierenden Proteinen in der STED-Mikroskopie.

## 2.4 Ziel dieser Arbeit

In den oberen Abschnitten wurden die Bedingungen für die hochauflösende Mikroskopie und die damit verbundenen Ansprüche an Fluorophoren und den Liganden und Tags beschrieben. Das Ziel dieser Arbeit ist es, neue Ansätze zu entwickeln, mit denen organische Fluorophore modifiziert werden können, um so ihre Zellpermeabilität, Fluorogenität und Bindeaffinität zu erhöhen. Dies soll mit den zur Verfügung stehenden Tags und molekularen Liganden an lebenden Objekten mithilfe der Konfokal- und STED-Mikroskopie analysiert werden. Zwei Strategien wurden hierzu untersucht.

1. Die Ausbildung des Spirolaktams geschieht zwischen einem elektrophilen Kohlenstoff und nucleophilen Sauerstoff. Im ersten hier bearbeiteten Projekt wurde der Sauerstoff der Carbonsäure gegen ein stärkeres Nucleophil, dem Stickstoff des Carbonsäureamids, ausgetauscht (Abbildung 8A), wodurch die Bildung der geschlossenen Form begünstigt wird. Durch elektronegebende, elektroneziehende und sterisch anspruchsvolle Substituenten am Stickstoff wurde untersucht, wie das Gleichgewicht zwischen offener und geschlossener Form beeinflusst werden kann, um so Rhodamin-Spirolactam-Derivate für die Anwendung in der Lebendzellmikroskopie zu optimieren.



**Abbildung 8.** Chemische Strukturen neuartiger membrangängiger Fluorophore. Verglichen mit einem Rhodamin-Spirolaktam ist der Rhodamin-Spirolaktam durch den Einsatz eines nucleophilen Stickstoffs stabiler (A). Durch verschiedene Amid-Substituenten **R** wurde untersucht, ob ein Gleichgewicht zwischen der offenen und geschlossenen Form beeinflusst und optimiert werden kann, sodass Spirolactame für die Lebendzellmikroskopie optimiert werden können. Durch die Änderung der Elektronendichteverteilung im Molekül **B** durch den Einbau eines Pyridin-Derivates in den Rhodamin-Grundkörper wird der Spirolaktamring stabilisiert. Durch Bindung an Liganden und reaktive Gruppen wurde untersucht, ob pyridinhaltige Rhodamine in der Lebendzellmikroskopie angewandt werden können.

2. Im Gegensatz zu den meisten Verfahren, die den polyzyklischen Teil des Xanthen-, Carbopyronin- oder Silizium-Rhodamin-Fluorophores modifizieren, wird im zweiten hier beschriebenen Ansatz der Benzolring gegen ein Pyridin ausgetauscht (Abbildung 8B). Dies führt zu einer Verschiebung der Elektronenverteilung, wodurch die Elektrophilie des Mesokohlenstoffs erhöht wird. Der Spirolaktonring wird dadurch stabilisiert, die Absorptions- und Emissionsspektren zeigen eine Rotverschiebung und die Permeabilität des Farbstoffs steigt.



## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Rhodamin-Spirolaktam Derivate für die Lebendzell-Mikroskopie

Rhodamin-Spirolaktam Derivate wurden vor allem in hochauflösenden Mikroskopie-Techniken mit einem stochastischen Ansatz (STORM, PALM)<sup>a</sup> genutzt, da sie sich durch einen ausgeprägten Dunkelzustand auszeichnen. Durch funktionelle Gruppen und mithilfe von kurzwelligem Lichtimpulsen lassen sich Spirolaktame aktivieren.<sup>61</sup> Weiterhin können diese zwischen einer inaktiven, geschlossen und einer aktiven, offenen Form spontan wechseln, sodass ein Blinkverhalten erzeugt wird.<sup>62</sup>

Im Gegensatz zu Rhodamin-Spirolakton Derivaten zeigen Rhodamin-Spirolaktam Derivate eine stärkere pH-Abhängigkeit. Unter basischen Bedingungen sorgt die intramolekulare Zyklisierung für die Ausbildung der geschlossenen, nicht fluoreszierenden Form, wodurch die Emission unterdrückt wird.

Dieser Abschnitt zeigt, dass durch sterische Effekte von funktionellen Gruppen am Stickstoff die intramolekulare Zyklisierung beeinflusst und hierdurch die Fluoreszenzaktivität der Spirolaktam-Derivate bis hinein in ein basisches Milieu verschoben wird. Spirolaktam-Derivate mit sterisch anspruchsvollen funktionellen Gruppen können daher für die Konfokal- und STED-Mikroskopie in lebenden Zellen genutzt werden. Durch erhöhte Bindeaffinität der Sonden zur Zielstruktur und ausgeprägte Fluorogenität der Spirolaktam-Derivate, wurden kontrastreiche Aufnahmen von spezifisch markierten Zielstrukturen erzielt.

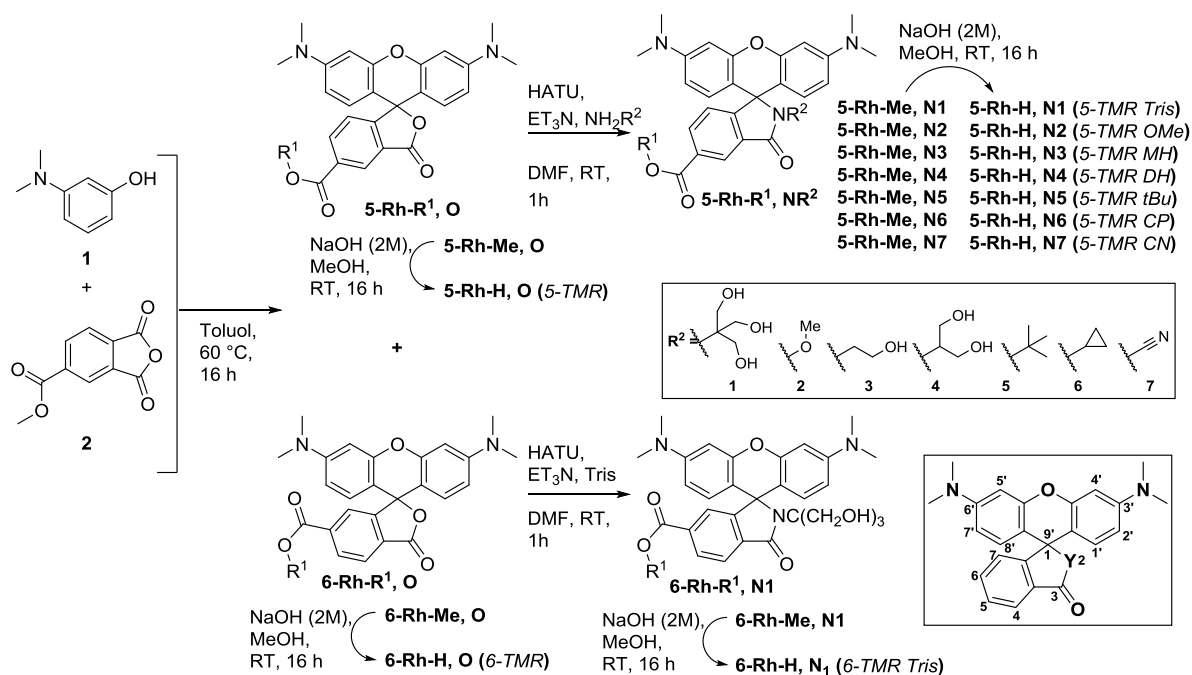
---

<sup>a</sup> STORM: engl. *stochastic optical reconstruction microscopy*  
PALM: engl. *photo activated localization microscopy*

### 3.1.1 Synthese der TMR Spirolaktam-Derivate

Der Rhodaminfarbstoff *N,N,N',N'*-Tetramethylrhodamin (*TMR*) wurde als Modellsystem genutzt, um die Auswirkungen verschiedener *N*-Amidsubstituenten auf die intramolekulare Zyklisierung und Markierung von Zielstrukturen in lebenden Zellen zu untersuchen. Hierzu wurden *TMR*-Isomere aus Dimethylaminophenol (**1**) und Trimellitsäureanhydrid Methyl ester (**2**) in einer Kondensationsreaktion in Toluol und bei 160 °C dargestellt (Schema 1). Die im Verhältnis von 2:1 (**5-Rh-Me, O** : **6-Rh-Me, O**) gebildeten Regioisomere weisen eine unterschiedliche Polarität auf und wurden chromatographisch getrennt und aufgereinigt.

Die beiden Farbstoffe wurden verwendet, um *TMR* Spirolaktam-Derivate mit verschiedenen *N*-Amidsubstituenten zu synthetisieren. Hierzu wurde die Lakton-Sauerstoffbrücke geöffnet und die Carbonsäure mit HATU (*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat) in trockenem DMF aktiviert (Schema 1). Nach Zugabe primärer Amine zu der Reaktionslösung wurden die Verbindungen **5-Rh-Me, NR** und **6-Rh-Me, N1** dargestellt.



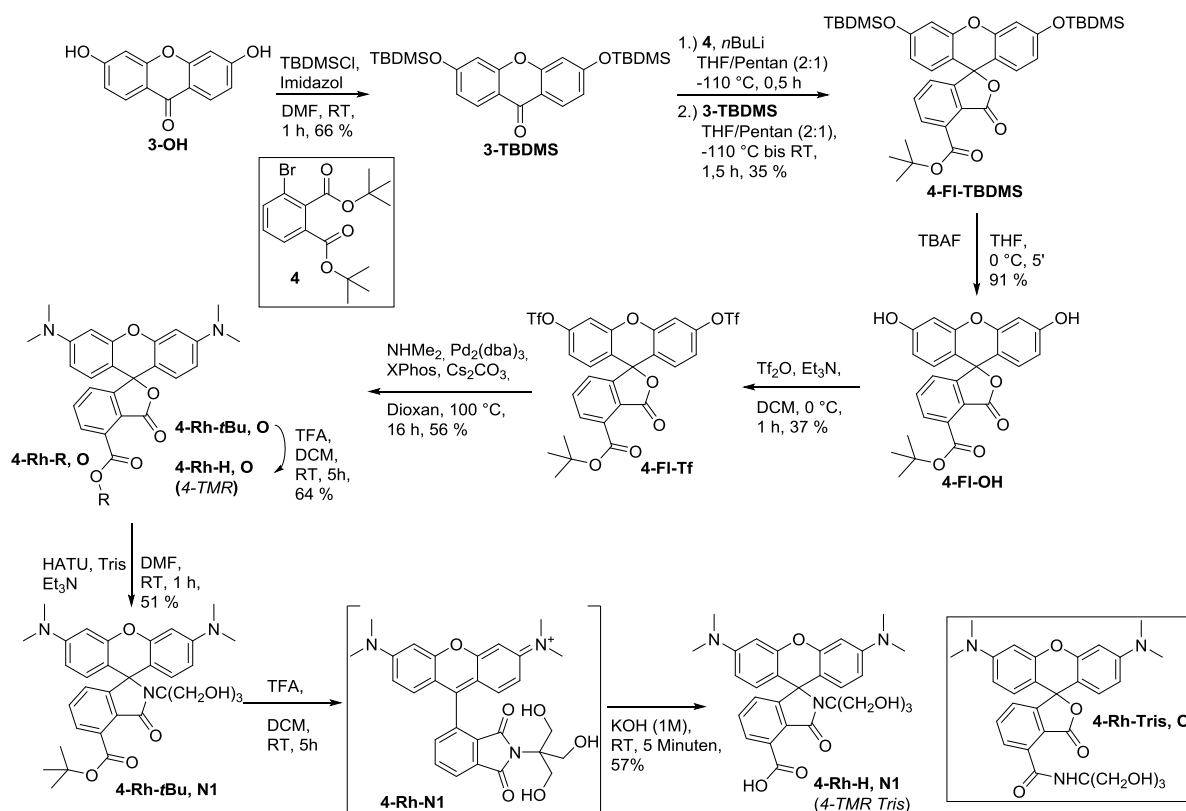
**Schema 1.** Synthese des Tetramethylrhodamins (*TMR*) aus Dimethylaminophenol und Trimellitsäureanhydrid Methyl ester. Durch Kondensationsreaktion und anschließender Hydrolyse des Methyl esters wurden die beiden Regioisomere *5-TMR* und *6-TMR* dargestellt. Vor der Verseifung der Methyl esterschutzgruppe wurden die Rhodamin-Lakton-Derivate durch primäre Amine mit verschiedenen funktionellen Gruppen zu einem Spirolaktam umgewandelt.



Nach basischer Hydrolyse und Aufreinigung mithilfe der semipräparativen HPLC wurden die TMR Spirolaktam-Derivate **5-Rh-H**, **NR** und **6-Rh-H**, **N1** isoliert.

In einer Studie von *J. Bucevičius et al.*<sup>40</sup> wurde kürzlich gezeigt, dass verschiedenen Regioisomere des Rhodaminfarbstoffs unterschiedlich stark zur Ausbildung der Spiroform tendieren. Daher wurden weiterhin **4-Rh-H**, **O** und **4-Rh-H**, **N1** synthetisiert und die Eigenschaften mit den Laktan- und Laktam-Derivaten **5-Rh-H**, **O** und **5-Rh-H**, **NR** als auch **6-Rh-H**, **O** und **6-Rh-H**, **N1** (Schema 1) verglichen. Während sich die Isomere 5 und 6 durch eine Kondensationsreaktion darstellen lassen, musste für Isomer 4 eine andere Syntheseroute verwendet werden (Schema 2).<sup>40</sup>

Zur Darstellung des Rhodamins **4-Rh-H**, **O** (**4-TMR**) dienten die Ausgangsverbindungen 3,6-Dihydroxyxanthon (**3-OH**) und 3-Bromphthalsäureester (**4**). Die Phenolgruppen von 3,6-Dihydroxyxanthon wurden mittels TBDMSCl geschützt (**3-TBDMS**). Durch einen Brom-



**Schema 2.** Synthese der Farbstoffe **4-Rh-H**, **O** und **4-Rh-H**, **N1** aus 3,6-Dihydroxy-Xanthon (**3-OH**) und 3-Brom-Phthalsäureester (**4**).

Lithium-Austausch in der Substanz **4** und anschließender Zugabe von **3-TBDMS** konnte eine C-C Bindungen zwischen dem lithierten Kohlenstoff und der Ketogruppe ausgebildet werden, sodass das Xanthen **4-FI-TBDMS** synthetisiert wurde. Nach Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppen unter Zugabe von TBAF, konnte das hieraus gebildete 4-*t*Bu-Fluorescein (**4-FI-OH**) über Triflormethansulfonsäureether für die weitere Substitution aktiviert werden (**4-FI-Tf**). Durch die Buchwald-Hartwig Reaktion wurden Dimethylamino-Gruppen eingeführt, sodass der Rhodaminfarbstoff als geschützter *tert*-Buthylester **4-Rh-*t*Bu, O** synthetisiert wurde. Durch Hydrolyse mit TFA wurde die *tert*-Butyl Schutzgruppe abgespalten, und **4-Rh-H, O** (*4-TMR*) isoliert.

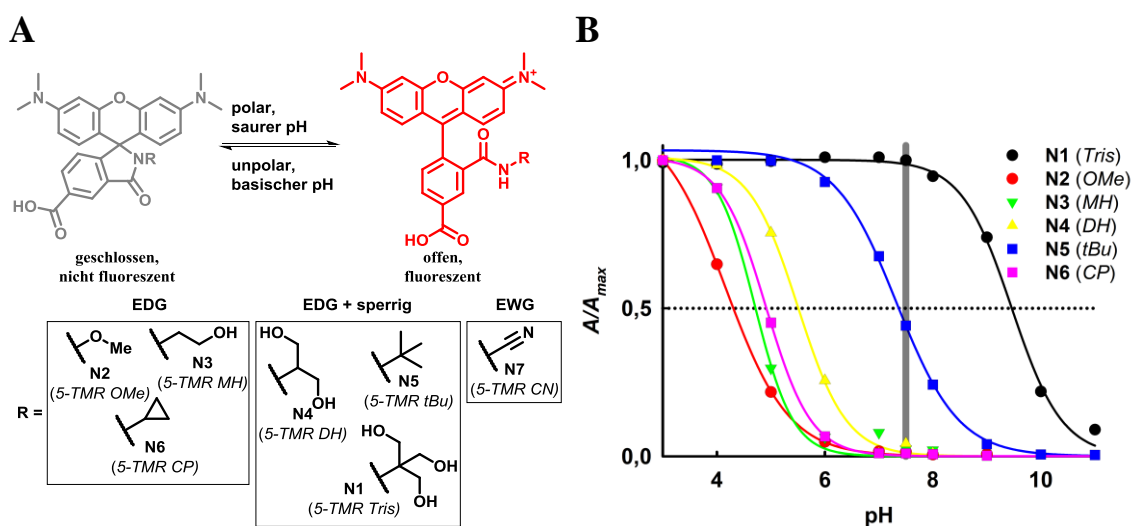
Ausgehend von **4-Rh-*t*Bu, O** wurde über den Einsatz von HATU, Tris-Amin und Et<sub>3</sub>N in trockenem DMF das Spirolaktam-Derivat **4-Rh-*t*Bu, N1** hergestellt. Die Abspaltung der *tert*-Butyl Schutzgruppe geschah unter Verwendung von TFA in DCM (1:4). In saurem Milieu bildet das Amid mit der entschützten Carboxylgruppe das Phthalimid **4-Rh-N1** aus. Durch Zugabe von Kaliumhydroxid wurde das Phthalimid hydrolysiert und das Produkt isoliert. Um zu überprüfen an welchem Carbonyl-Kohlenstoff die Hydrolyse stattfand, wurde die isolierte Substanz mit der Verbindung **4-Rh-Tris, O** (Schema 2) verglichen. Es zeigte sich, dass die Retentionszeit in der analytischen HPLC sich von **4-Rh-Tris, O**, unterschied. Dies belegt, dass nach Abspaltung der *tert*-Butyl Schutzgruppe und anschließender Hydrolyse mit Kaliumhydroxid die Substanz **4-Rh-H, N1** (*4-TMR Tris*) dargestellt wurde.

### 3.1.2 Untersuchung der chemischen und photophysikalischen Eigenschaften der TMR Spirolaktam-Derivate

#### pH-Abhängigkeit der Spirolaktam-Derivate

Das Gleichgewicht zwischen der offenen und geschlossenen Form bei Spirolaktam-Derivaten hängt von der Polarität der Lösung und von dem pH-Wert ab (Abbildung 9A). Die TMR Spirolaktam Derivate des Regioisomers 5 mit den verschiedenen funktionellen Gruppen wurden verwendet und deren Absorptionsspektren in einem pH Bereich zwischen pH 3 bis pH 11 aufgenommen. Die optischen Dichten der Absorptionsmaxima wurden gemittelt, normiert und in Abhängigkeit zum pH-Wert aufgetragen. Mithilfe der hieraus erhaltenen Titrationskurve wurde der  $pK_{cycl}$ -Wert für die Ausbildung des Spirolaktams bestimmt (Abbildung 9B).

Die  $pK_{cycl}$ -Werte der einzelnen TMR Spirolaktam-Derivate unterschieden sich stark voneinander (Abbildung 9B und Tabelle 1). Die Substanz **5-Rh-H**, **N2** (5-TMR OMe) mit dem *O*-Methylhydroxylamin als Baustein wies den geringsten  $pK$ -Wert von 4.2 auf. Aufgrund des  $\alpha$ -Effekts erhöhen die freien Elektronenpaare des Sauerstoffs die Elektrondichte innerhalb der



**Abbildung 9.** pH-Abhängigkeit der Spirolaktam-Derivate. In A sind die chemischen Strukturen der zwitterionischen, fluoreszierenden Form sowie der ungeladenen, nicht fluoreszierenden Form gezeigt. Die jeweiligen funktionellen Gruppen sind nach ihren elektronenziehenden (EWG) und elektronenengebenden (EDG) Effekten, mit und ohne sterische Beeinflussung geordnet. In B sind die Titrationskurven der jeweiligen Spirolaktam-Derivat **5-Rh-H**, **NR** gezeigt. Die normierten intensitäten der Absorptionsmaxima sind gegen die pH-Werte aufgetragen. Die gestrichelte Linie kreuzt den Wert im Titrationskurvenverlauf, bei der die Hälfte der maximalen Absorptionsintensität erreicht wurde und gibt den  $pK_{cycl}$  Wert wieder. Der grau hinterlegte Balken symbolisiert den physiologischen pH-Wert bei 7,5.

Amidbindung. Der nucleophile Charakter des Stickstoffatoms wird hierdurch gesteigert, wodurch auch bei niedrigen pH-Werten mit dem Mesokohlenstoffatom des Xanthens ein Spirolaktam ausgebildet wird.

In einem pH-Bereich zwischen 3 und 11 zeigte Rhodamin **5-Rh-H, N7** (*5-TMR CN*) keine Unterschiede in der Absorptionsintensität. In einer Arbeit von *H. Li et al.*<sup>63</sup> wurde gezeigt, dass Rhodamin B mit einer CONHCN-Gruppe einen *pK*-Wert von 2,6 aufweist. Jedoch steigt die Absorptionsintensität mit zunehmenden pH-Wert. Durch die elektronenziehende Cyanamid-Seitengruppe (EWG; engl. *electron withdrawing group*) wird das Spirolaktam destabilisiert.<sup>48j</sup> Dies erklärt die hohe Absorptionsintensität des *5-TMR CN* auch im neutralen und basischen Milieu.

Im Fall des Hydroxyethyls bei **5-Rh-H, N3** (*5-TMR MH*) wurde ein *pK<sub>cycl</sub>* Wert von 4,7 gemessen, ähnlich zu *5-TMR OMe*. Es ist bekannt, dass Alkylgruppen einen positiven induktiven Effekt aufweisen und wirken demnach elektronenschiebend.

Wenn jedoch das  $\alpha$ -Kohlenstoffatom der funktionellen Gruppe als tertiäres oder quartäres Zentrum vorliegt, wird der aliphatische Rest in seiner räumlichen Struktur größer. Dadurch stieg der *pK<sub>cycl</sub>* Wert unter den verglichenen aliphatischen Seitengruppen wie folgt an:

**Tabelle 1.** Die Absorptionsmaxima in [nm] sowie die durch Titrationskurven ermittelten *pK<sub>cycl</sub>*-Werte von **5-Rh-H, O** und den Spirolaktam-Derivaten **5-Rh-H, NR** sind aufgelistet.

Farbstoff	Abs <sub>max</sub> [nm]	<i>pK<sub>cycl</sub></i>
<b>5-Rh-H, O</b> ( <i>5-TMR</i> )	552	-
<b>5-Rh-H, N2</b> ( <i>5-TMR OMe</i> )	558 (pH 3)	4,2
<b>5-Rh-H, N3</b> ( <i>5-TMR MH</i> )	549 (pH 3)	4,7
<b>5-Rh-H, N6</b> ( <i>5-TMR CP</i> )	561 (pH 3)	4,9
<b>5-Rh-H, N4</b> ( <i>5-TMR DH</i> )	560 (pH 3)	5,5
<b>5-Rh-H, N5</b> ( <i>5-TMR tBu</i> )	556 (pH 7,4)	7,3
<b>5-Rh-H, N1</b> ( <i>5-TMR Tris</i> )	560 (pH 7,4)	9,4
<b>5-Rh-H, N7</b> ( <i>5-TMR CN</i> )	555 (pH 7,4)	-

**5-Rh-H, N3** (5-TMR MH) < **5-Rh-H, N4** (5-TMR DH) < **5-Rh-H, N5** (5-TMR tBu) < **5-Rh-H, N1** (5-TMR Tris).

Der Einfluss großer *N*-Alkylgruppen auf den *pK*-Wert wurde mit unterschiedlichen cyclischen Aliphaten bei Rhodaminen nachgewiesen. So zeigt die Studie von *C. Liu et al.* das Rhodamine, modifiziert mit Cyclopropylamin einen niedrigeren *pK*-Werte aufweisen, als Rhodamine die mit einem Cyclopentan- oder Cyclohexanamin modifiziert sind.<sup>64</sup>

In der Arbeit von *L. Yuan et al.* wurde dies ebenfalls bestätigt.<sup>65</sup> Ein Rhodamin mit einer Hydroxyethyl-Seitengruppe am Spirolaktam-Stickstoff besitzt einen niedrigeren *pK*-Wert (*pK* = 2,8) verglichen mit *para*-Hydroxyphenyl- (*pK* = 3,2) oder Naphthalin-Seitengruppen (*pK* = 3,3). Obwohl das Naphthalin zwar räumlich größer ist, ist der *pK*-Wert verglichen mit dem *N*-(*para*-Hydroxyphenyl)spirolaktam jedoch identisch. Den stärksten Effekt auf die Verschiebung des *pK*-Wertes in der genannten Studie hat jedoch Adamantan. Auf Grund sterischer Hindernisse verschiebt sich der *pK*-Wert auf 6,5.

Mit räumlich ausgedehnten funktionellen Gruppen am Stickstoff des Spirolaktam-Amins lässt sich die intramolekulare Zyklisierung beeinflussen. Dies erklärt, dass sich im physiologischen pH-Bereich **5-Rh-H, N5** (5-TMR tBu) teilweise in der zwitterionischen, fluoreszierenden Form befand. Das Einbringen von Hydroxidgruppen hatte einen weiteren starken Einfluss auf die Ausbildung der Spiroform. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die funktionelle Gruppe bei **5-Rh-H, N1** (5-TMR Tris) mit dem umgebenden Lösungsmittel interagiert. Neben der räumlichen Größe war dies ein weiterer Grund dafür, dass sich **5-Rh-H, N1** (5-TMR Tris) im physiologischen pH-Bereich vollständig in der offenen Form befand.

Elektronengebende funktionelle Gruppen (Methoxy) mit einem starken positiven mesomeren Effekt oder Gruppen mit kleinen Alkylresten (Cyclopropyl, Hydroxyethyl) mit einem negativen induktiven Effekt verstärkten den nucleophilen Charakter des *N*-Amids. Bei einem physiologischen pH-Wert wurde die intramolekulare Zyklisierung und Bildung des

Spirolaktams durch diese funktionellen Gruppen verstärkt. Für die Lebendzellmikroskopie waren Rhodamin-Laktame mit diesen Gruppen ungeeignet, da sie bei pH 7,5 nicht fluoreszierten.

Elektronenziehende Gruppen wie Cyanamid oder Gruppen wie *t*Bu- und Tris-Amid beeinträchtigen die Zyklisierung. Im physiologischen pH-Bereich lagen die TMR-Derivate mit diesen funktionellen Gruppen vollständig oder teilweise in der offenen, fluoreszierenden Form vor. Im weiteren Verlauf wurden die TMR Spirolaktam-Derivate mit einer Tris-Seitengruppen eingängiger untersucht, da diese aufgrund der hohen Fluoreszenzaktivität im physiologischen pH-Bereich und einer guten Wasserlöslichkeit attraktiv für die Fluoreszenzmikroskopie in der lebenden Probe erschienen.

### Photophysikalische Charakterisierung der TMR-Tris Derivate

Die photophysikalischen Eigenschaften der drei Regioisomeren von TMR-Tris wurden bestimmt und mit Literaturwerten<sup>40</sup> der TMR-Regioisomere verglichen (Tabelle 2). Aus den Absorptionsspektren konnte ein bathochromer Effekt um 9 - 10 nm erkannt werden, nachdem Tris-Amin in den Farbstoff eingebracht wurde. Die Verschiebung des Emissionsspektrums war

**Tabelle 2.** Photophysikalische Eigenschaften der drei TMR-Isomere und ihrer Tris-Spirolaktame.

	Abs <sub>max</sub> . [nm] ε [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	Em <sub>max</sub> [nm]	QY	τ [ns]
<b>4-Rh-H, O</b> ( <i>4-TMR</i> )*	551 (75000)	573	0,41	2,0
<b>5-Rh-H, O</b> ( <i>5-TMR</i> )*	550 (83000)	579	0,41	2,1
<b>6-Rh-H, O</b> ( <i>6-TMR</i> )*	550 (83300)	576	0,36	2,0
<b>4-Rh-H, N1</b> ( <i>4-TMR Tris</i> )	560 (40200)	578	0,35	2,2
<b>5-Rh-H, N1</b> ( <i>5-TMR Tris</i> )	560 (78200)	584	0,50	2,3
<b>6-Rh-H, N1</b> ( <i>6-TMR Tris</i> )	559 (61400)	583	0,33	2,1

Die Messungen wurden in PBS (pH = 7.5) durchgeführt. ε: Extinktionskoeffizient; QY: Quantenausbeute; τ: Fluoreszenz-Lebenszeit; \*: Daten aus Ref. [40].

schwächer und betrug 5 - 6 nm. Für andere Rhodamin-Derivate ist ebenfalls beschrieben, dass eine Rotverschiebung des Absorptions- und Emissionsspektrums um ca. 10 nm auftritt, nachdem ein primäres oder sekundäres Amin eingefügt wird.<sup>64,66</sup> Die Extinktionskoeffizienten waren für die TMR-Tris Farbstoffe geringer als bei TMR. Dies kann mit einer verstärkten Ausbildung des Spirolaktams gegenüber einer schwächeren Ausbildung des Spirolaktons im wässrigen Medium bei pH = 7,5 erklärt werden. Besonders gut zu erkennen war dies bei 4-TMR Tris. Hier war der Extinktionskoeffizient etwa um die Hälfte geringer als bei 4-TMR. Die Quantenausbeuten der TMR Tris Derivate unterschieden sich nur geringfügig zu denen der TMR Derivate. Einzig bei 5-TMR Tris war eine geringfügig höhere Quantenausbeute festzustellen. Einen nennenswerten Unterschied in der Fluoreszenzlebensdauer ließ sich unter den Farbstoffen nicht erkennen. Diese lag zwischen 2,0 und 2,3 ns.

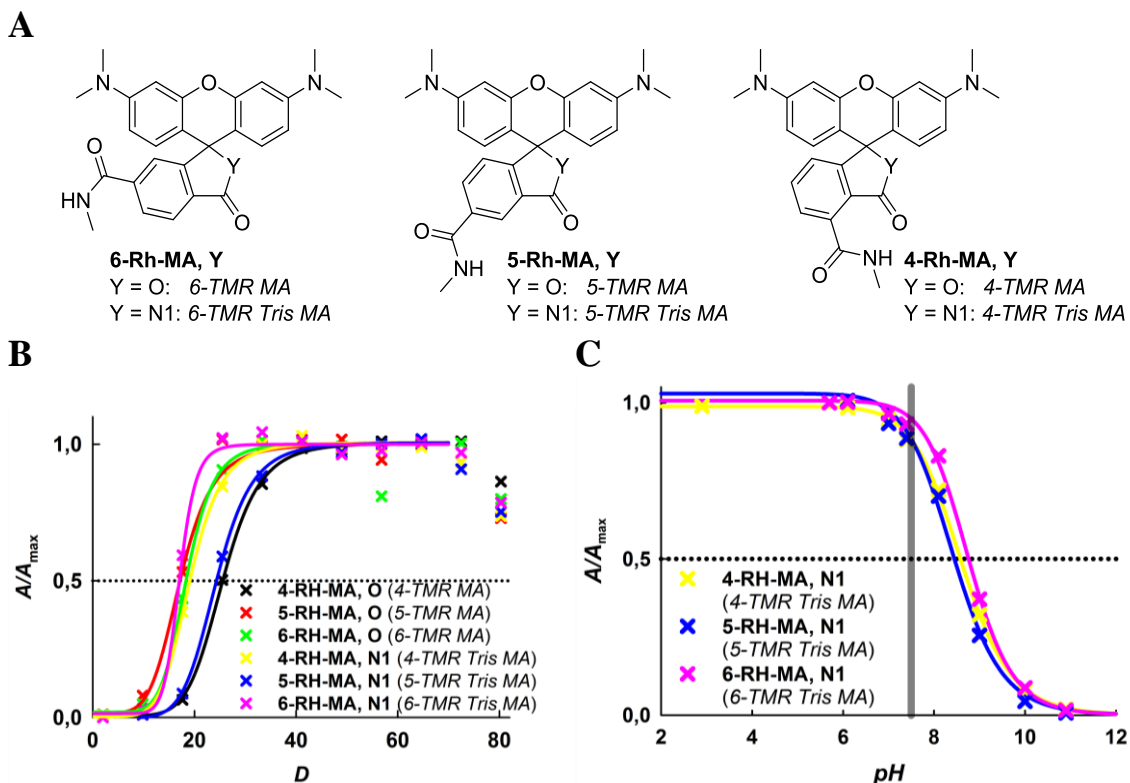
### **Bestimmung des $D_{50}$ - und $pK_{cycl}$ -Wertes regioisomerer Spirolaktone und Spirolaktame mithilfe einer Modelsonde**

Für die Darstellung von zellpermeablen fluoreszierenden Sonden werden Rhodamine über ihre freie Carboxylgruppe am C4-, C5- oder C6-Kohlenstoff im Phenylring an das freie Amin eines Liganden gekoppelt. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass diese Amidbindung den Spirolaktonring im Rhodamin durch eine Wasserstoffbrückenbindung stabilisieren kann.<sup>40</sup> Daher wurde in dieser Arbeit ein Methylamin als Pseudoligand an die jeweilige freie Carboxylgruppe gebunden, um so eine Sonde zu modellieren (Abbildung 10A).

In mehreren Studien ist ein Zusammenhang zwischen der Zellpermeabilität eines Rhodaminfarbstoffs und der möglichen Ausbildung eines Spirolaktons beschrieben.<sup>16,21a,40,48a,48b,48d,48j</sup> Je stärker die Ausbildung des Spirolaktons ist, desto wahrscheinlicher ist es, eine höhere Permeabilität des Farbstoffs zu beobachten.

Die mögliche Bildung der Spiro-Form eines Farbstoffs kann spektroskopisch untersucht werden. Die offene, fluoreszierende Form der Xanthenfarbstoffe ist durch die Bildung von Wasserstoffbrücken mit einem umgebenden polaren, protischen Medium stabilisiert.<sup>51,52b</sup> In einem unpolaren, aprotischen Lösungsmittel kommt es jedoch zur Zyklisierung und Entstehung der geschlossenen Form. Mit der Absorptionsspektroskopie wird untersucht, ob ab einer gewissen Lösungsmittelpolaritäten die Ausbildung der Spiro-Form bevorzugt ist.<sup>48b</sup>

Die Farbstoffe in Abbildung 10A wurden in verschiedenen Dioxan-Wasser Gemischen gelöst. Die gemessenen Absorptionsmaxima aus den entsprechenden Lösungen wurden gegen die jeweiligen Dielektrizitätskonstanten aufgetragen (Abbildung 10B). Aus dem sich ergebenden Kurvenverlauf wurde mithilfe der Hill-Gleichung<sup>48d</sup> die Dielektrizitätskonstante ermittelt, bei der die Hälfte der maximal möglichen Absorptionsintensität erreicht wurde (Tabelle 3). Je höher dieser so genannte  $D_{50}$ -Wert ist, desto wahrscheinlicher ist die Ausbildung der Spiro-



**Abbildung 10.** Chemische Eigenschaften der TMR-Derivate mit einem Methylamid als Liganden-Imitation. In **A** sind die chemischen Strukturen der TMR-Derivate gezeigt. Die Graphen in **B** zeigen die normierten Absorptionsintensitäten, aufgetragen gegen die Dielektrizitätskonstante der jeweiligen Dioxan-Wasser Lösung. Mithilfe eines Hill-Plots wurde der Kurvenverlauf entlang der Messpunkte extrapoliert. Die gestrichelte Linie kreuzt den Kurvenverlauf, bei der die Hälfte der maximalen Absorptionsintensität erreicht wurde. In **C** sind die Titrationskurven der drei TMR-Spirolaktam Regioisomere gezeigt. Die gestrichelte Linie kreuzt den Kurvenverlauf am  $pK_{cycl}$ -Wert. Der graue Balken markiert den physiologischen pH-Wert bei 7,5.



Form auch in wässrigem Medium.<sup>48b,48d,48h</sup> Daher konnte eine erste Einschätzung der Zellgängigkeit eines Rhodaminfarbstoffs anhand seines  $D_{50}$ -Wertes getroffen werden.

Es zeigte sich, dass *6-TMR MA* und *5-TMR MA* ähnlich niedrige  $D_{50}$ -Werte von 18,5 und 17,3 aufwiesen. *4-TMR MA* zeigte einen leicht höheren  $D_{50}$ -Wert von 25,6. Dies ist durch die stabilisierende Wirkung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonylsauerstoff des Spirolaktonrings und dem Proton der Amidbindung zu erklären. Ähnlich niedrige  $D_{50}$ -Werte sind in früheren Studien für die drei TMR Regioisomere **4-Rh-H, O**, **5-Rh-H, O** und **6-Rh-H, O** gebunden an ein Taxen (Liganden für die Tubulin-Markierung) gemessen wurden.<sup>40</sup> Taxene als große Liganden können jedoch Auswirkungen auf den  $D_{50}$ -Wert des Farbstoffs haben, sodass die Werte für die Tubulinsonden sich von den hier genutzte Modellsystem mit einem Methylamid leicht unterscheiden.

Zwischen den direkten Vergleichspartnern der Spirolaktam- und Spirolakton-Derivate zeigten *6-TMR MA* und *6-TMR Tris MA* keine Unterschiede in ihren  $D_{50}$ -Werten. Hingegen war bei *5-TMR Tris MA* ein deutlicher Anstieg des  $D_{50}$ -Wertes verglichen mit *5-TMR MA* zu erkennen. Generell kann dies durch die begünstigte intramolekulare Zyklisierung mit einem Stickstoff anstelle eines Sauerstoffs begründet werden und weiterhin durch fehlende sterische Hindernisse zwischen dem Methylamid und dem Xanthen-Gerüst bei Isomer 5. Dies erklärt für *5-TMR Tris MA* die Anhebung des  $D_{50}$ -Wertes. Überraschend war zu sehen, dass der  $D_{50}$ -Wert von *4-TMR*

**Tabelle 3.**  $pK_{cycl}$ -Werte und  $D_{50}$ -Werte der TMR-Lakton und-Laktam Modellsonden. Mit (\*)-Markierte Werte wurden vergleichend aus Ref. [40] verwendet.

Farbstoff	$pK_{cycl}$	$D_{50}$
<b>4-Rh-MA, O</b> ( <i>4-TMR MA</i> )	-	25,6 (23,4)*
<b>4-Rh-MA, N1</b> ( <i>4-TMR Tris MA</i> )	8,6	19,2
<b>5-Rh-MA, O</b> ( <i>5-TMR MA</i> )	-	17,3 (12,3)*
<b>5-Rh-MA, N1</b> ( <i>5-TMR Tris MA</i> )	8,4	24,4
<b>6-Rh-MA, O</b> ( <i>6-TMR MA</i> )	-	18,5 (13,1)*
<b>6-Rh-MA, N1</b> ( <i>6-TMR Tris MA</i> )	8,8	17,6

*Tris MA* niedriger war als von *4-TMR MA*. Möglicherweise können die Hydroxylgruppen des Trisamids bei *4-TMR Tris MA* mit dem Methylamid wechselwirken, sodass es zu einer Schwächung der intramolekularen Zyklisierung kam.

Abbildung 10B zeigt einen Rückgang der Absorptionsintensität bei hohen Wasseranteilen ( $D = 80$ ). Grund hierfür war eine verschlechterte Löslichkeit der Farbstoffe mit abnehmendem Anteil des organischen Lösungsmittels. Gleiches wurde für Sonden mit Rhodaminfarbstoffen in anderen Studien beobachtet.<sup>48b,48h</sup>

Zusammenfassend konnte allerdings keine drastische Veränderung des  $D_{50}$ -Wertes von TMR Tris Derivaten verglichen mit den TMR Derivaten beobachtet werden.

Weiterhin wurden für die pH-abhängigen *TMR Tris MA* Spirolaktam-Derivate die  $pK$ -Werte für die intramolekulare Zyklisierung mithilfe einer pH-Titration bestimmt. Wie in Abbildung 10C zu sehen ist, unterschieden sich die  $pK_{cycl}$ -Werte unter den Isomeren nur geringfügig. Sie lagen zwischen den pH-Werten von 8,4 und 8,8 (Abbildung 10C, Tabelle 3). Jedoch bewirkt das Methylamid eine generelle Verschiebung des  $pK_{cycl}$ -Wertes. Dieser lag für *5-TMR Tris* bei einem pH-Wert von 9,4 (Tabelle 1). Nach Einbringen des Methylamins sank der  $pK_{cycl}$ -Wert bei *5-TMR Tris MA* auf einen pH-Wert von 8,4. In der Graphik in Abbildung 10C ist gut zu erkennen, dass sich in den Titrationskurven der TMR-Tris Modellsonden der physiologische pH-Wert im Beginn des Umschlagsbereiches befand.

Das Methylamid bewirkte demnach eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen der offenen und der geschlossenen Form der TMR Tris Isomere. Die intramolekulare Zyklisierung zum Spirolaktam unter physiologischen Bedingungen wurde damit wahrscheinlicher. Etwa 10 % der Molekülpopulation von **(4/5/6)-Rh-MA, N1** befanden sich bei einem physiologischen pH-Wert in der geschlossenen Form. Mit diesem Ergebnis wurde eine erhöhte Membranpermeabilität für Sonden mit Spirolaktam-Derivaten verglichen zu Spirolaktam-Derivaten angenommen. In weiteren Experimenten wurden die gewonnenen Erkenntnisse

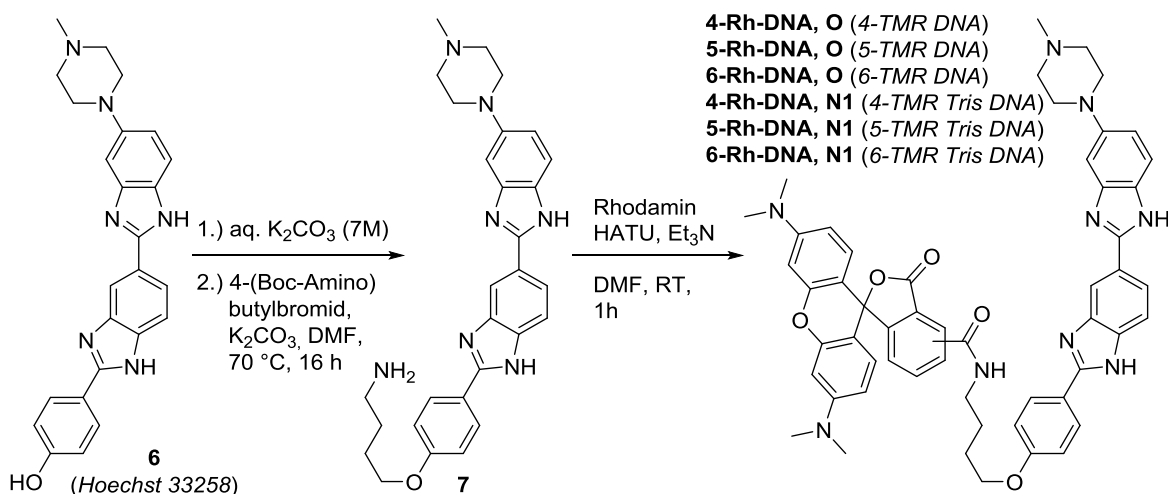
mithilfe der Modelsonden genutzt und auf fluoreszierende Sonden für die Markierung doppelsträngiger DNA übertragen.

### 3.1.3 DNA-Sonden mit TMR-Spirolaktam-Derivaten für die Lebendzellfärbung

Ausgehend von den chemischen Eigenschaften der TMR Tris Rhodamine wurde getestet, ob TMR Spirolaktame gebunden an einen Liganden eine stärkere Zellgängigkeit gegenüber den TMR Spirolaktonen zeigen. Daher wurden die Farbstoffe **4/5/6-Rh, O** und **4/5/6-Rh, N1** an das Molekül *Hoechst 33258* gebunden, um doppelsträngige DNA (dsDNA) zu markieren (Schema 3). Eine DNA-Sonde, bestehend aus *Hoechst 33258* als DNA-Bindedomäne, gekoppelt über einen aliphatischen Linker an einen organischen Fluorophor, wurde bereits in mehreren Studien erstellt und in der Lebendzellmikroskopie angewendet.<sup>35,67</sup>

#### Herstellung der DNA-Sonden

*Hoechst 33258* (**6**) wurde genutzt, um an den Phenylrest über eine Etherbindung ein Aminobutyl einzubringen (**7**) (Schema 3). Dieser kurze C4-Linker dient mit seinem primären Amin zur Kopplung an den Carboxylrest am Fluorophor. Durch Aktivierung dieses Carboxylrestes wurden über die Ausbildung einer Amidbindung die sechs DNA-Sonden **4/5/6-Rh-DNA, Y** synthetisiert.

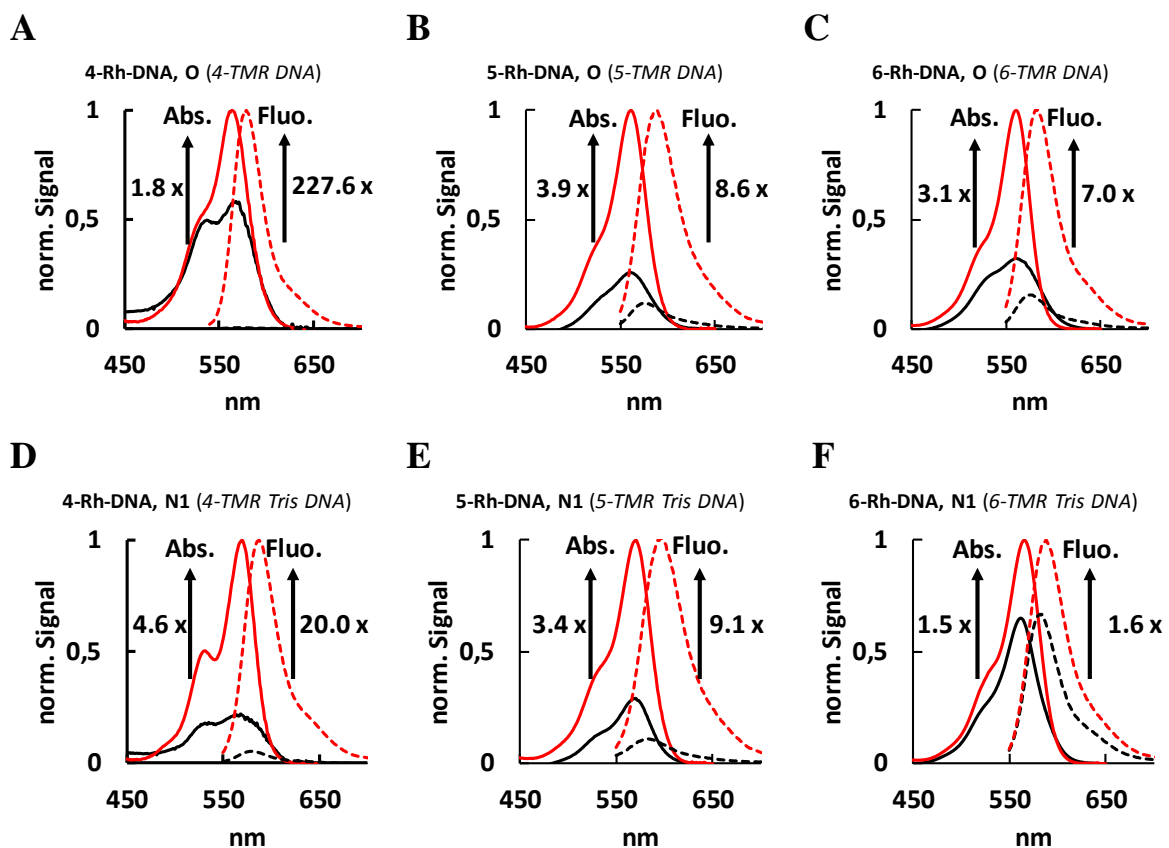


**Schema 3.** Synthese der DNA-Sonden. Nach einbringen eines Aminobutyl-Linkers über eine Etherbindung an die DNA Bindedomäne *Hoechst 33258*, konnte diese an Xanthenfarbstoffe gebunden werden.

## Fluorogenität der DNA-Sonden

Ein Farbstoff zeigt fluorogenes Verhalten, wenn sich nach einem definierten Ereignis die Intensität des Fluoreszenzsignals ändert. Eine fluorogene Antwort kann beispielsweise durch enzymatische Reaktionen, Änderung des pH-Werts der umgebenden Lösung, Interaktion mit einem weiteren Molekül oder chemische Umlagerung hervorgerufen werden.<sup>68</sup> Im Prinzip kann sich das Fluoreszenzsignal nach einem solchen Ereignis sowohl erhöhen als auch senken.

Für die Untersuchung des fluorogenen Verhaltens der in dieser Arbeit beschriebenen DNA-Sonden, wurden diese sowohl in PBS<sup>b</sup>, als auch in einer Lösung aus 1 mg/ml Fischsperma DNA



**Abbildung 11.** Bestimmung der Fluorogenität der sechs Sonden. In A bis F sind normalisierte Absorptions- (durchgezogene Linien) und Emissionsspektren (gestrichelte Linien) der jeweiligen Sonden in PBS (schwarze Linien) und in einer Lösung mit 1 mg/ml Fischsperma DNA in PBS (rote Linien) dargestellt. Die Absorptionsspektren wurden in einem Bereich von 350 nm bis 800 nm aufgenommen. Für das Emissionsspektrum wurden die Sonden bei 540 nm angeregt und das Fluoreszenzsignal im Bereich von 550 nm bis 800 nm detektiert.

<sup>b</sup> Im weiteren Verlauf bezieht sich PBS auf eine wässrige phosphatgepufferte Salzlösung deren pH-Wert bei 7,4 liegt.

in PBS gelöst. Es wurden pro Sonde und Lösung das Absorptions- und Emissionsspektrum aufgenommen.

In Abbildung 11 ist bei allen sechs Sonden zu erkennen, dass nach Zugabe der DNA die Intensität des Absorptions- und Emissionsmaximums stieg und weiterhin eine leichte Rotverschiebung des Fluoreszenzspektrums zwischen 7 und 12 nm eintrat.

Es wurde davon ausgegangen, dass der Anstieg der Fluoreszenzintensität und die Rotverschiebung des Emissionsspektrums nach Zugabe isolierter DNA durch eine Unterbrechung des Ligand-Farbstoff Kontakts zwischen Hoechst und dem Rhodamin hervorgerufen wurde. Anfangs interagiert der Farbstoff mit dem hydrophoben *Hoechst 33258*,<sup>34</sup> wodurch das Fluoreszenzsignal des Rhodamins unterdrückt wurde.<sup>35b,69</sup> Lagert sich *Hoechst 33258* in die *minor groove*<sup>c</sup> der DNA ein, wurde ein statisches Quenchen des Rhodaminfarbstoffs durch *Hoechst 33258* unterbunden und die Fluoreszenzintensität stieg.<sup>35b,35c,40</sup> Gleichzeitig stieg die Polarität der direkten Umgebung am Rhodamin, wodurch eine Rotverschiebung des Emissionsspektrums eintrat.

Unter den DNA-Sonden ohne Tris-Gruppe am Fluorophor zeigte *4-TMR DNA* das stärkste fluorogene Verhalten. Die Fluoreszenzintensität stieg nach Zugabe isolierter DNA um mehr als das 220-fache an. Dies bestätigen die Ergebnisse aus einer vorangegangenen Studie von *J. Bucevičius et al.*<sup>40</sup>

Ebenso wie bei den Sonden **4/5/6-Rh-DNA, O** war bei **4/5/6-Rh-DNA, N1** der Anstieg der Absorption und Fluoreszenz nach Zugabe isolierter DNA abhängig vom gewählten Regioisomer. So war ein verstärkter Anstieg der Absorptions- und Fluoreszenzintensität in der Reihenfolge **6-Rh-DNA, N1** < **5-Rh-DNA, N1** < **4-Rh-DNA, N1** zu erkennen. Nach Zugabe

---

<sup>c</sup> Die beiden DNA-Einzelstränge, die sich zu einem Doppelstrang zusammenlagern, bilden eine Helix aus. Hierbei entstehen Positionen, an denen die Nukleinbasen frei zugänglich liegen. Bei diesen sogenannten Furchen wird zwischen der kleinen Furche (*minor groove*) und der großen Furche (*major groove*) unterschieden.

isolierter DNA stieg bei **4-Rh-DNA, N1** (*4-TMR Tris DNA*) die Absorptionsintensität um den Faktor 4,6 und das Fluoreszenzsignal um den Faktor 20 an.

### **Mikroskopische Charakterisierung der DNA-Sonden in lebenden Zellen**

Vero Zellen wurde mit den Sonden (Schema 3) in einer 1,0  $\mu\text{M}$  Färbelösung inkubiert, um die DNA im Zellkern zu markieren. Wie die meisten Epithelzellen besitzen auch Vero Zellen eine Vielzahl an Effluxpumpen.<sup>30a</sup> Diese sind in der Lage toxische Stoffe aus dem Cytoplasma zu entfernen. Durch Zugabe von Verapamil können diese Pumpen gehemmt werden, wodurch der Transport der DNA-Sonden aus der Zelle verhindert wird.<sup>70</sup> Nach 1 h Inkubationszeit bei 37 °C wurden die Zellen ohne weitere Waschschriffe auf einen Objektträger in Zellmedium eingebettet. Unmittelbar im Anschluss wurden die Zellen an einem Konfokalmikroskop, ausgestattet mit einem 561 nm Anregungslaser, analysiert.

Für alle 6 Sonden lässt sich mit Blick auf die Mikroskopie-Aufnahmen zeigen, dass eine spezifische Färbung der DNA im Zellkern erreicht wurde (Abbildung 12A). Der Einsatz von Verapamil war entscheidend für eine intensivere Färbung. Markierungen der DNA ohne Zugabe von Verapamil zeigten deutlich geringere Intensitäten bei gleicher Laserleistung.

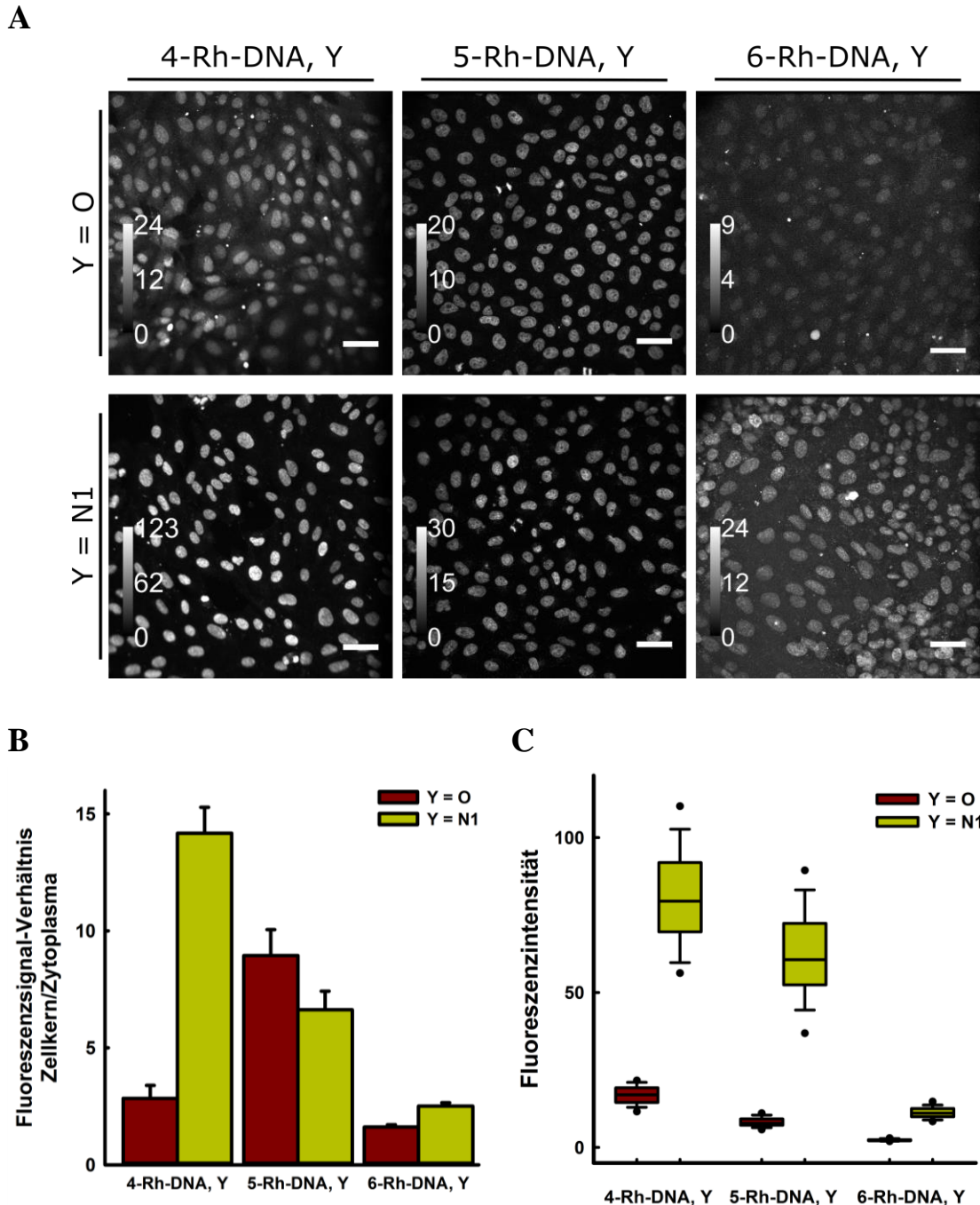
Weiterhin ließ sich ein Unterschied zwischen den Regioisomeren feststellen. Die Fluoreszenzintensität stieg in der Reihenfolge **6-Rh-DNA, Y < 5-Rh-DNA, Y < 4-Rh-DNA, Y** an (Y = O, N1). Allerdings wiesen Zellkerne, die mit einem Spirolaktam-Derivat angefärbt wurden, eine erhöhte Fluoreszenzintensität auf.

Die Mikroskopie-Aufnahmen wurden eingehender auf das Signal-zu-Hintergrund Verhältnis und die Intensität des Fluoreszenzsignals analysiert. Für jede Sonde wurden mehr als 50 Messpunkte<sup>d</sup> zur Bestimmung der Signalintensität im Zellkern und im Zytoplasma gesetzt.

---

<sup>d</sup> Ein Messpunkt bezieht sich auf eine Fläche von 4 x 4 Pixeln. Hierbei wurden pro Zelle mehrere Messpunkte im Zellkern bzw. Zytoplasma gesetzt.

Vergleichend zeigte sich, dass die Sonden mit Regioisomer 6 Farbstoffen sowohl das schwächste Signal-zu-Hintergrundverhältnis (Abbildung 12B) als auch das geringste Fluoreszenzsignal im Zellkern (Abbildung 12C) aufwiesen. Es wurde in einer Studie beschrieben, dass DNA-Sonden mit TMR- Regioisomeren 5 und 6 an unterschiedlichen



**Abbildung 12.** Mikroskopische Aufnahmen markierter DNA in Zellkern lebender Vero Zellen. In **A** sind Aufnahmen markierter DNA in Vero Zellen zu sehen, angefärbt mit den DNA-Sonden in einer 1,0  $\mu$ M Färbelösungen. Effluxpumpen wurden mit Verapamil (10  $\mu$ M) inaktivieren. Die gefärbten Zellen wurden an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop, ausgestattet mit einem 20 x Luftobjektiv und 561 nm Laser, analysiert. Maßstabskala: 100  $\mu$ m. In **B** ist das Verhältniss der Fluoreszenzintensitäten im Zellkern zu Zytoplasma für jede DNA-Sonde dargestellt. In **C** sind die gemessenen Fluoreszenzintensitäten in den Zellkernen gezeigt. Die Fluoreszenzintensität wurde aus über 50 Messpunkten pro Sonde ermittelt



Regionen in der DNA binden.<sup>35b</sup> Durch experimentell bestimmte Dissoziationskonstanten der DNA-Sonden zur dsDNA und mathematische Modelle möglicher Interaktionen der Sonden mit dsDNA, haben die Autoren nachgewiesen, dass sich Sonden mit Rhodaminen des Regioisomers 5 in die *minor groove* einlagern. Hingegen interagieren DNA-Sonden mit einem Regioisomere 6 sowohl mit der *minor groove* als auch mit der *major groove*. Die Interaktion der Sonden mit der *major groove* sorgt für chemische Konformationen, die eine geringere Quantenausbeute verursacht. Hierdurch wird bei Sonden mit Regioisomer 6 Farbstoffen ein schwächeres Fluoreszenzsignal nach Bindung an eine DNA detektiert.<sup>35b</sup>

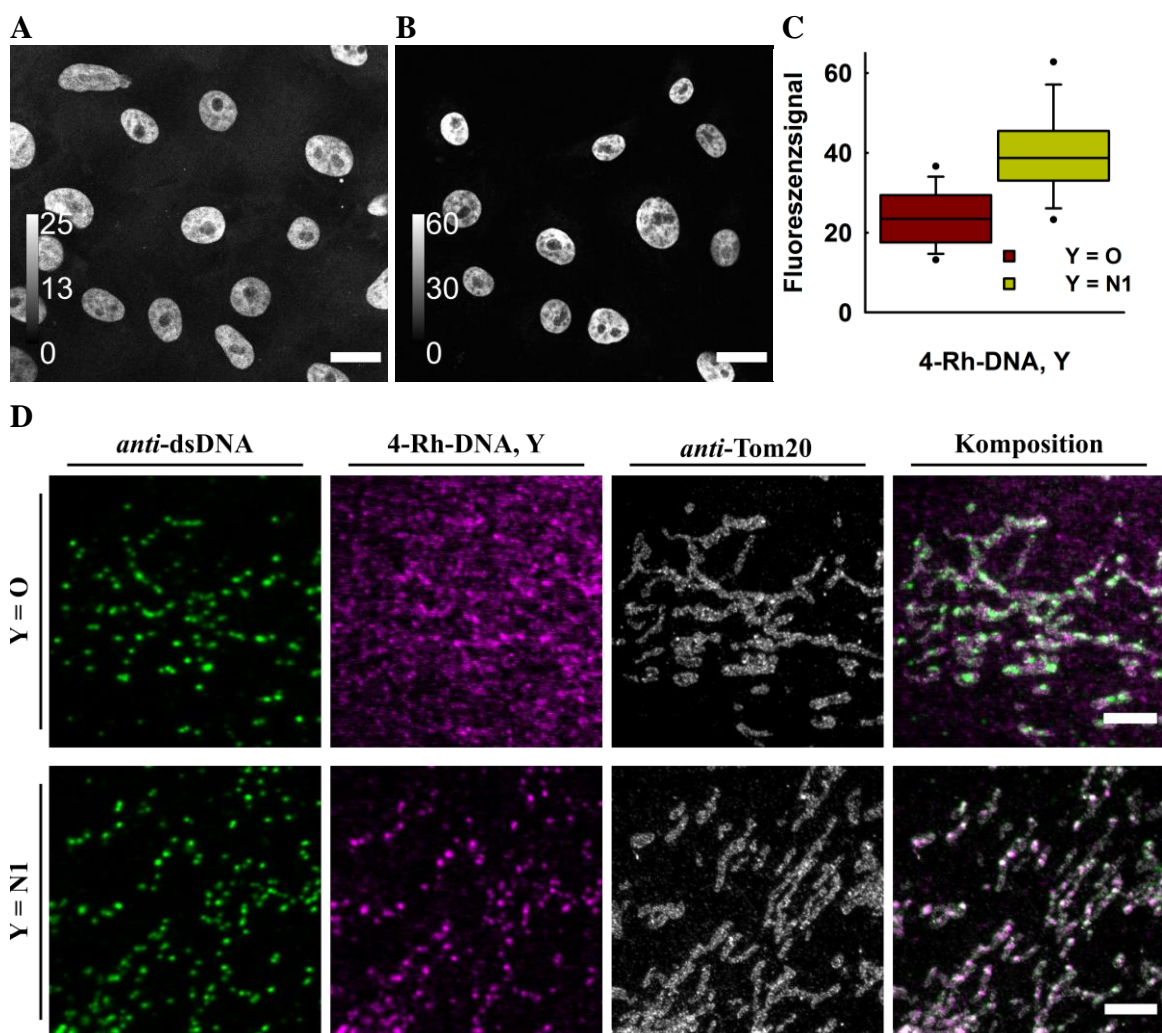
**4-Rh-DNA, O** zeigt das höchste Fluoreszenzsignal unter den drei Spirolakton-Sonden (Abbildung 12A und C). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass **4-Rh-DNA, O** eine höhere Bindeaffinität zur DNA besitzt als **5-Rh-DNA, O**.<sup>40</sup> Dies führt zu einem stärkeren Fluoreszenzsignal der markierten Zielstruktur. Das Signal-zu-Hintergrund Verhältnis bei **4-Rh-DNA, O** ist jedoch geringer als bei **5-Rh-DNA, O**. Durch eine verbesserte Biokompatibilität<sup>40</sup> von Sonden mit Isomer-4 Rhodaminen kann die Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  zu hoch eingesetzt wurden sein, so dass unspezifische Signale bei der Färbung mit **4-Rh-DNA, O** im Zytoplasma zu erhöhten Hintergrundsignalen führten.

Die drei DNA-Sonden mit einem Tris-Rhodamin wiesen ein ähnliches Verhalten bezogen auf das Fluoreszenzsignal im Zellkern auf. Die detektierte Fluoreszenzintensität in den Zellkernen nimmt in der Reihenfolge **6-Rh-DNA, N1** < **5-Rh-DNA, N1** < **4-Rh-DNA, N1** zu. Jedoch lagen die Fluoreszenzintensitäten der Tris-haltigen Sonden weit über denen der Sonden mit einem Spirolakton-Rhodamin (Abbildung 12A und C). In Abbildung 10C wurde gezeigt, dass die Modelsonden **4/5/6-Rh-MA, N1** mit einem Methylamid als Pseudoligand bei physiologischen pH anteilig in der geschlossenen Form existieren. Dies wurde als Hinweis gewertet, dass eine höhere Membranpermeabilität gegeben ist und kann eine Erklärung für den

Effekt der höheren Fluoreszenzintensität mit Tris-Spirolaktam Sonden gegenüber Spirolakton Sonden in Zellkernen lebender Vero Zellen sein.

Wie auch schon in den Mikroskopie-Aufnahmen zu erkennen ist, wurde das beste Signal-zu-Hintergrundverhältnis als auch die stärkste Fluoreszenzintensitäten in den Zellkernen mit **4-Rh-DNA, N1** (*4-TMR Tris DNA*) erzielt.

Fixierte und permeabilisierte Vero Zellen, deren DNA nachträglich mit der Sonde **4-Rh-DNA, N1** (*4-TMR Tris DNA*) gefärbt wurde, wiesen eine 2-Fach höhere Signalintensität



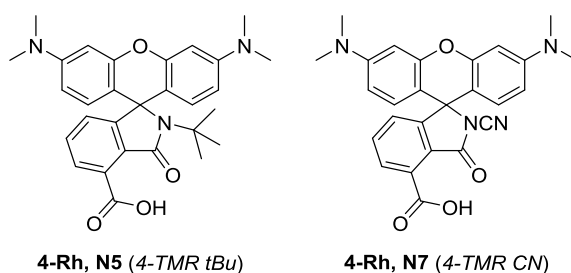
**Abbildung 13.** Mikroskopie-Aufnahmen fixierter Vero Zellen. **A** und **B** zeigen markierte dsDNA in Zellkernen fixierter Vero Zellen. In **A** wurden die Zellen mit der Sonde **4-Rh-DNA, O** und in **B** mit **4-Rh-DNA, N1** markiert. Aufgenommen wurden die Abbildungen an einem Konfokalmirkoskop mit einem 561 nm Anregungslaser und einem 60 x Ölobjektiv. Maßstabsskala: 20  $\mu$ m. In **C** sind die Fluoreszenzsignale, gemessen in den Zellkernen mit  $N \geq 150$  Messpunkten pro Sonde dargestellt. In **D** sind konfokale Aufnahmen mitochondrialer DNA gezeigt, markiert mit *abberior* STAR GREEN gekoppelt an einem anti-dsDNA Antikörper (grün) und den Sonden **4-Rh-DNA, Y** (magenta). Die Untereinheit des mitochondrialen Import-Rezeptors wurde mit einem *anti-Tom20* Antikörper und *abberior* STAR RED markiert (grau) und mit der STED-Mikroskopie abgebildet. Die Aufnahmen wurden an einem STED-Mikroskop mit einem 60 x Ölobjektiv und 488 nm, 561 nm und 640 nm Anregungslasern und 775 nm STED-Laser aufgenommen. Maßstabsskala: 2  $\mu$ m.

auf, verglichen zu Zellkernen, die mit der Sonde **4-Rh-DNA, O** (*4-TMR DNA*) markiert wurden (Abbildung 13A – C). Eine gesteigerte Zellpermeabilität der Spirolaktam-Sonde kann hierbei nicht als Erklärung angeführt werden. Es wurde daher vermutet, dass bei **4-Rh-DNA, N1** (*4-TMR Tris DNA*) ebenso eine erhöhte Bindeaffinität gegenüber der DNA die hohe Signalintensität im Zellkern begründet.

Weiterhin konnte in Mikroskopie-Aufnahmen von fixierten Vero Zellen, die mit **4-Rh-DNA, N1** (*4-TMR Tris DNA*) gefärbt wurden, mtDNA in den Mitochondrien detektiert werden (Abbildung 13D). Die durch **4-Rh-DNA, N1** markierte mtDNA wurde mit einer Antikörperfärbung gegen dsDNA Co-lokalisiert. Bei **4-Rh-DNA, O** (*4-TMR DNA*) konnte dies nicht beobachtet werden.

Die Markierung mitochondrialer DNA ist anspruchsvoll, da diese lockerer gepackt ist als genomische DNA. Hierdurch ist die Dichte an Bindungsstellen in der Zielstruktur geringer, wodurch eine reduzierte Anzahl an Fluorophoren zwangsläufig zu einer schwächeren Fluoreszenzintensität führen und aufgrund von Hintergrundsignalen diese schwieriger zu detektieren ist.<sup>71</sup> Eine höhere Bindungsaffinität kann erklären, dass mit **4-Rh-DNA, N1** dennoch mtDNA in fixierten Zellen visualisiert wurde.

Um den Einfluss der *N*-Amidsubstituenten auf Fluorogenität und Bindeaffinität zur Zielstruktur zu analysieren, wurden weitere DNA-Sonden mit den Farbstoffen **4-Rh-H, N5** (*4-TMR tBu*) und **4-Rh-H, N7** (*4-TMR CN*) genutzt (Abbildung 14) und mit *4-TMR DNA*<sup>40</sup> und *4-TMR Tris DNA* verglichen.



**Abbildung 14.** Chemische Strukturen der beiden Spirolactam-Rhodamine **4-Rh-H, N5** (*4-TMR tBu*) und **4-Rh-H, N7** (*4-TMR CN*).

### 3.1.4 Einfluss von *N*-Amidsubstituenten auf die Eigenschaften der Sonden

Die Photophysikalischen Eigenschaften der DNA Sonden **4-Rh-DNA, O** (*4-TMR DNA*), **4-Rh-DNA, N1** (*4-TMR Tris DNA*), **4-Rh-DNA, N5** (*4-TMR tBu DNA*) und **4-Rh-DNA, N7** (*4-TMR CN DNA*) wurden untereinander verglichen, um einen möglichen Einfluss der funktionellen Gruppen am Spirolactam-Stickstoff auf Fluorogenität und Bindeaffinität zu untersuchen.

#### **Einfluss der *N*-Amidsubstituenten im Spirolaktam auf deren Fluorogenität**

Bei den vier DNA-Sonden steigt nach Zugabe der isolierten DNA sowohl der Extinktionskoeffizient als auch die Quantenausbeute an (Tabelle 4). Dies hat zu Folge, dass die Fluoreszenz nach Zugabe doppelsträngiger DNA stark anstieg. Weiterhin verschiebt sich das Emissionsspektrum in den roten Bereich, wobei die Verschiebung bei den Spirolaktam-Derivaten stärker ausfällt als bei dem Spirolakton-Derivat.

Jedoch ist der Anstieg des Fluoreszenzsignals bei Sonden mit einem Spirolaktam-Rhodamin geringer als der Anstieg bei *4-TMR DNA* (Tabelle 4). Dies deutet darauf hin, dass die Fluoreszenz bei Spirolactam-Rhodaminen durch Hoechst nicht so stark unterdrückt wird, wie bei *4-TMR*.

**Tabelle 4.** Photophysikalische Eigenschaften der vier Sonden *4-TMR DNA*, *4-TMR Tris DNA*, *4-TMR tBu DNA* und *4-TMR CN DNA*.  $\epsilon$  = Extinktionskoeffizient; QY = absolute Quantenausbeute;  $F_0$  = Fluoreszenzintensitätsmaximum der Sonde in PBS,  $F_{DNA}$  = Fluoreszenzintensitätsmaximum der Sonde in PBS mit 1 mg/ml genomischer DNA;  $K_d$ : Dissoziationskonstante, gemessen bei einer Sonden-Konzentration von 1  $\mu$ M

Farbstoff	Abs.max [nm] ( $\epsilon$ [ $M^{-1} cm^{-1}$ ])		Em.max [nm]	QY	$F_{DNA}/F_0$	$K_d$ [ $\mu$ M]
	Vor DNA-Zugabe	Nach DNA-Zugabe				
<b>4-Rh-DNA, O</b> ( <i>4-TMR DNA</i> )	553 (9100)	553 (15700)	578 <sup>a</sup> /579 <sup>b</sup>	n.a. <sup>a</sup> /0,29 <sup>b</sup>	208,7	12,4
<b>4-Rh-DNA, N1</b> ( <i>4-TMR Tris DNA</i> )	568 (4600)	570 (21200)	588 <sup>a</sup> /594 <sup>b</sup>	0,25 <sup>a</sup> /0,32 <sup>b</sup>	20	0,7
<b>4-Rh-DNA, N5</b> ( <i>4-TMR tBu DNA</i> )	570 (2600)	566 (4100)	569 <sup>a</sup> /583 <sup>b</sup>	0,01 <sup>a</sup> /0,16 <sup>b</sup>	71,4	n.a.
<b>4-Rh-DNA, N7</b> ( <i>4-TMR CN DNA</i> )	570 (9900)	568 (13200)	575 <sup>a</sup> /579 <sup>b</sup>	0,04 <sup>a</sup> /0,09 <sup>b</sup>	2,6	7,3

a: gemessen in PBS; b: gemessen in PBS mit 1 mg/ml genomischer DNA.

Im Fall der Sonde *4-TMR tBu DNA* war eine Intensitätserhöhung des Fluoreszenzmaximums um mehr als das 70-fache zu beobachten. Unter den DNA-Sonden mit einem Spirolactam-Rhodamin war dies die stärkste beobachtete Änderung der Fluoreszenzintensität. Dies kann mit einem geringen  $pK_{\text{cycl}}$ -Wert (Tabelle 1) begründet werden. Dies erklärt ebenfalls die schwächere Änderung der Fluoreszenzintensität bei *4-TMR Tris DNA* nach Zugabe isolierter DNA, da der  $pK_{\text{cycl}}$ -Wert höher liegt als bei *4-TMR tBu DNA*. Weiterhin wurde bei Rhodamin-Spirolaktamen mit einem Cyanamid als funktionelle Gruppe keine pH-Abhängigkeit festgestellt. Dies kann das schwache fluorogene Verhalten der DNA-Sonde *4-TMR CN DNA* begründen.

Es soll darauf hingewiesen werden, dass *4-TMR tBu DNA* einen sehr geringen Extinktionskoeffizienten aufwies, der nach Zugabe isolierter DNA niedrig blieb. Diese Beobachtung steht im direkten Zusammenhang mit dem geringen  $pK_{\text{cycl}}$ -Wert. Im physiologischen pH-Bereich liegen durchschnittlich die meisten Fluorophore von *4-TMR tBu DNA* auch nach Bindung an die DNA in der geschlossenen Form vor. Daher weist diese Sonde auch eine geringe Quantenausbeute von 16 % nach Zugabe isolierter DNA auf.

Obleich ein niedriger  $pK_{\text{cycl}}$ -Wert die Fluorogenität erhöht, wirkte sich ein zu geringer  $pK_{\text{cycl}}$ -Wert negativ auf die Signalintensität der DNA-Sonde im physiologischen pH-Bereich aus.

### **Bindeaffinität der DNA-Sonden**

Weiterhin wurde untersucht, ob Spirolactam-Seitengruppen die Bindeaffinität zur DNA verändern. In einem DNA-Affinitätstest wurden daher die Dissoziationskonstanten  $K_d$  bestimmt. *Hoechst 33258* lagert sich in Adenin-Thymin reiche Sequenzen in der DNA ein. Daher wurde zur Bestimmung des  $K_d$ -Werts eine DNA in Haarnadelstruktur (hpDNA, engl. *hairpin DNA*) verwendet, die innerhalb der 12 Basenpaare die Erkennungssequenz AATT trägt (Abbildung 15A).<sup>35d</sup> Es ist bekannt, dass *Hoechst 33258* in einem 1:1 Verhältnis an diese

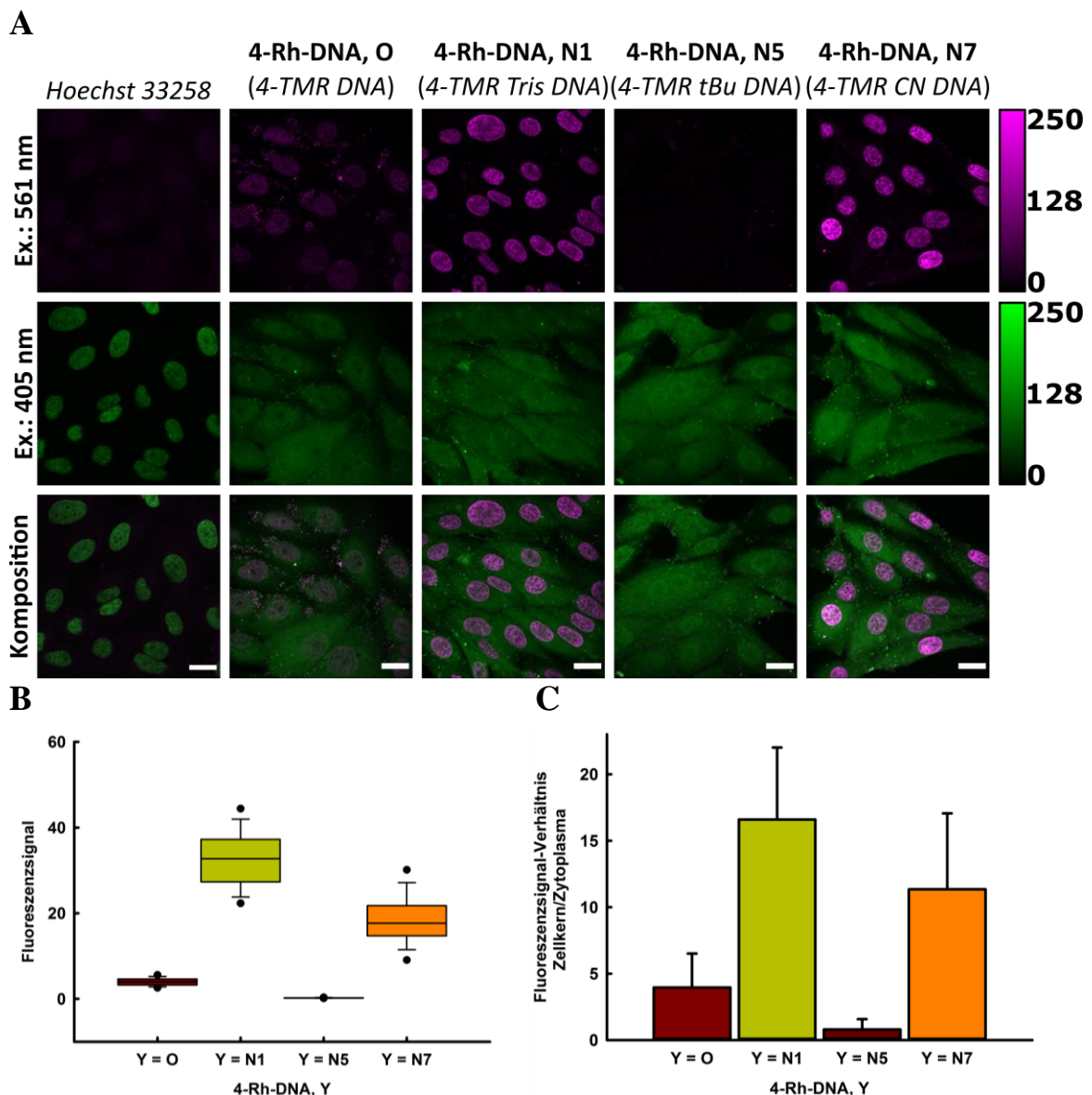
Sequenz bindet.<sup>72</sup> Durch mögliche intramolekulare Interaktionen wird die Fluoreszenz des Rhodaminfarbstoffs von Hoechst unterdrückt (Abbildung 15A). Daher steigt während einer Titration die Fluoreszenz des Farbstoffs, je mehr DNA zur Lösung gegeben wird. Durch die Auftragung des Fluoreszenzsignals der Sonden gegen die hpDNA-Konzentration in der Lösung wurde die Dissoziationskonstante bestimmt (Abbildung 15B).

Die Dissoziationskonstante für die Sonde *4-TMR DNA* ( $K_d = 12,4 \mu\text{M}$ ) war höher, verglichen mit den Sonden *4-TMR Tris DNA* ( $K_d = 0,7 \mu\text{M}$ ) und *4-TMR CN DNA* ( $K_d = 7,3 \mu\text{M}$ ). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Spirolaktame zu einer stabileren Bindung an die Zielstruktur beitragen. Die Fluoreszenzintensität von *4-TMR tBu DNA* war zu gering, sodass für diesen Versuchsansatz keine Daten erhoben werden konnten.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse aus diesem Abschnitt, dass die Tris-Seitengruppe in der DNA-Sonde sich verstärkend auf die Bindungsstabilität auswirkt. Dies wird gestützt durch eine Studie, die zeigt, dass ein Spirolaktam-Rhodamin mit einer Tris-Seitengruppe in der Lage ist, Zellkerne in den Wurzelzellen von *Allium cepa* zu markieren.<sup>73</sup> Der dort beschriebene Farbstoff war an keinen Liganden gebunden. Die Tris-Seitengruppe hat demnach einen großen Einfluss auf die Sonde bezüglich ihrer Stabilität gegenüber dsDNA. Neben der DNA-Bindedomäne *Hoechst 33258* kann demnach der Rhodamin-Farbstoff durch das Tris-Amid ebenso mit der DNA interagieren, was zu einem stabilisierenden Effekt führt.

## Mikroskopische Charakterisierung der DNA-Spirolaktam Sonden

Vero Zellen wurden mit den vier Sonden **4-Rh-DNA, O** (*4-TMR DNA*), **4-Rh-DNA, N1** (*4-TMR Tris DNA*), **4-Rh-DNA, N5** (*4-TMR tBu DNA*) und **4-Rh-DNA, N7** (*4-TMR CN DNA*) angefärbt. In einer 0,1  $\mu\text{M}$  Färbelösungen unter Zugabe von Verapamil (10  $\mu\text{M}$ ) in Zellwachstumsmedium wurden die Zellen eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die markierten



**Abbildung 16.** Zellfärbung genomischer DNA in lebenden Zellen mit DNA-Sonden. In **A** sind konfokalmikroskopische Aufnahmen markierter genomischer DNA in Vero Zellen abgebildet. Die hier verwendeten Sonden sind *Hoechst 33258*, *4-TMR DNA*, *4-TMR Tris DNA*, *4-TMR CN DNA* und *4-TMR tBu DNA*. Angeregt wurden die Sonden mit einem 561 nm Laser (Anregung TMR-Derivate) und einem 405 nm Laser (Anregung *Hoechst 33258*). **B** zeigt die Fluoreszenzsignale, gemessen in den Zellkernen mit  $N \geq 300$  Messpunkten pro Sonde. **C** zeigt das Verhältnis des Fluoreszenzsignals von Zellkern zu Zytoplasma bei einer Anregung mit 561 nm. Vero Zellen wurden für diesen Versuch in einer 0,1  $\mu\text{M}$  Färbelösung und unter Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Verapamil inkubiert. Aufgenommen wurden die Zellen mit einem 60 x Ölobjektiv. Maßstabsskala: 20  $\mu\text{m}$ .

Zellen wurden an einem Konfokalmikroskop, ausgestattet mit einem 60 x Ölobjektiv und einem 405 nm und 561 nm Anregungslaser, untersucht (Abbildung 16A).

Die Fluoreszenzintensitäten der Zellkerne waren je nach eingesetzter DNA-Sonde unterschiedlich hoch. Interessant war, dass scheinbar mit *4-TMR tBu DNA* die DNA nicht erfolgreich markiert werden konnte, da kein Fluoreszenzsignal des Rhodamin-Farbstoffs detektiert wurde. Die DNA-Bindedomäne Hoechst kann ebenfalls als Fluorophor genutzt werden, da es Licht im UV-Bereich absorbiert und nach Bindung an die DNA das Fluoreszenzsignal um das 30-fache ansteigt.<sup>74</sup> Daher wurden die Sonden sowohl mit 561 nm (Absorption von TMR-Derivaten) als auch mit 405 nm (Absorption von Hoechst) angeregt. Überraschend war, dass bei den Sonden **4-Rh-DNA, O**, **4-Rh-DNA, N1**, **4-Rh-DNA, N5** und **4-Rh-DNA, N7** ein Fluoreszenzsignal von Hoechst nicht nur im Zellkern, sondern in der gesamten Zelle detektiert wurde. Reines *Hoechst 33258* jedoch färbte spezifisch die DNA im Zellkern der Vero Zellen. Es wurde daher angenommen, dass Aufgrund der TMR Derivate und des aliphatischen C4-Linkers zwischen der Bindedomäne *Hoechst 33258* und den TMR Derivaten die DNA-Sonden sich verstärkt in Plasmamembranen einlagern. Dies kann die hohe Fluoreszenzintensität außerhalb des Zellkerns erklären.

Dennoch, die Anregung bei 405 nm zeigt, dass es der Sonde *4-TMR tBu DNA* möglich ist, die Zellmembran zu passieren und ebenso die DNA als Zielstruktur zu markieren. Hingegen scheint der  $pK_{\text{cycl}}$ -Wert von *4-TMR tBu* zu niedrig zu sein, sodass der Farbstoff im physiologischen pH-Bereich fast ausschließlich in der geschlossenen Form vorlag. Dies führte zu einer drastisch gesunkenen Fluoreszenzintensität.

Die Analyse von mehr als 300 Messpunkten pro Sonde zeigte, dass die Fluoreszenzintensität im Zellkern markiert mit **4-Rh-DNA, N7** (*4-TMR CN DNA*) wesentlich höher war als bei Zellkernen, die mit **4-Rh-DNA, O** (*4-TMR DNA*) markiert wurden (Abbildung 16B). Obwohl die Fluorogenität von *4-TMR CN DNA* geringer war als die von *4-TMR DNA* (Tabelle 4), war



das Verhältnis von Signal im Zellkern zum Signal im Cytoplasma wesentlich höher (Abbildung 16C). Dies kann möglicherweise mit der erhöhten Bindeaffinität der Sonde **4-Rh-DNA, N7** (*4-TMR CN DNA*) gegenüber doppelsträngiger DNA erklärt werden.

*4-TMR Tris DNA* zeigte aufgrund des höheren  $pK_{\text{cycl}}$ -Wertes, verglichen mit *4-TMR tBu DNA* höher Fluoreszenzintensitäten und aufgrund der hohen Bindungsstabilität verglichen mit *4-TMR DNA* und *4-TMR CN DNA* ein verbessertes Signalverhältnis zwischen Zellkern und Zytoplasma in den mikroskopischen Aufnahmen.

### **Auswirkungen der Sonden auf die Viabilität von Zellen**

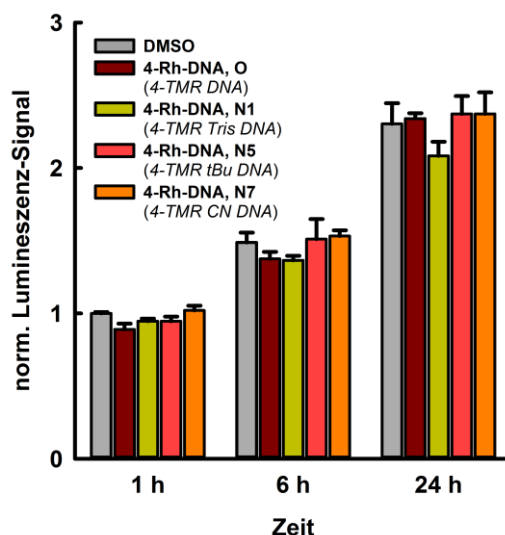
Wenn die Konzentration der Sonden durch mögliche Einlagerung in den Zellen steigt, kann dies metabolische Prozesse stören und toxisch wirken. Daher wurde mit einem Viabilitätstest untersucht, ob die Sonden zu einer Verlangsamung des Zellwachstums führen können.

Vero Zellen wurden mit den Sonden *4-TMR DNA*, *4-TMR Tris DNA*, *4-TMR tBu DNA* und *4-TMR CN DNA* behandelt. Hierbei wurden Konzentrationen zwischen  $10^{-2}$   $\mu\text{M}$  und  $10^1$   $\mu\text{M}$  verwendet und die Zellen für 24 h bei 37 °C inkubiert. Um die Viabilität der Zellen zu untersuchen, diente ATP als Indikator. Ist die metabolische Aktivität von Zellen gering, wird vergleichsweise weniger ATP in den Zellen anzufinden sein als bei Zellen, die eine hohe Aktivität zeigen. Über eine indirekte Messung der ATP-Menge im Zell-Lysat wurde die metabolische Aktivität zwischen Zellen verglichen, die mit den DNA-Sonden inkubiert wurden und denen, die unbehandelt waren. Nach definierten Inkubationszeiten der Zellen mit den DNA-Sonden von 1 h, 6 h und 24 h wurde die relative ATP-Menge indirekt über eine Lumineszenz-Messung bestimmt. Für die quantitative Analyse wurden die Zellen aufgeschlossen und das Zell-Lysat mit Luciferin und einer modifizierten Luciferase versetzt (Experiment durchgeführt von Frau Dr. T. Oswald und Frau A. Rübeling, Abt. biophysikalische Chemie, Georg-August-Universität). Die ATP-abhängige Luciferase kann in einer

Oxidationsreaktion die Substanz Luciferin in die lumineszente Verbindung Oxyluciferin umwandeln. Die ausgelesene Lumineszenz-Intensität spiegelt die Menge an ATP in dem Lysat wider.

Das Experiment zeigte deutlich, dass die Viabilität der Vero Zellen nicht abnimmt, wenn diese den DNA-Sonden ausgesetzt waren (Abbildung 17). Im Gegenteil, selbst bei hoher Konzentration der DNA-Sonden von 10  $\mu\text{M}$  war die detektierte Intensität ausgehend von Oxiluciferin und somit die vorhandene Menge an ATP im Zell-Lysat ähnlich hoch wie bei den Kontrollproben. Nach 24 Stunden hatte sich sowohl bei der Kontrollprobe als auch unter Verwendung der DNA-Sonden die ATP-Konzentration in dem Medium verdoppelt. Für die hier untersuchten Vero Zellen konnte nicht beobachtet werden, dass die Sonden metabolische Prozesse beeinflussen.

Jedoch wurde in einer Studie gezeigt, dass REC:myc Zellen, die für 12 Tage der Substanz *Hoechst 33258* ausgesetzt waren, ab einer Konzentration von 0,04  $\mu\text{M}$  eine höhere Mortalität zeigen.<sup>75</sup> In einer weiteren Studie wurde anhand des Silizium-Rhodamins *SiR* gekoppelt an



**Abbildung 17.** Untersuchung der Viabilität von Vero-Zellen, die mit den vier DNA-Sonden über definierte Zeiträume behandelt wurden. Das Diagramm zeigt den Einfluss der Sonden *4-TMR DNA*, *4-TMR Tris DNA*, *4-TMR tBu DNA* und *4-TMR CN DNA* auf die Viabilität der Zellen. Hierbei dient die quantitative Analyse von ATP als direkter Indikator für die relative Anzahl metabolisch aktiver Zellen. Die eingesetzte Sonden-Konzentration betrug 10  $\mu\text{M}$ . Als Kontrolle wurde reines DMSO ohne gelöste DNA-Sonde zu den Zellen gegeben.

*Hoechst 33258* die Auswirkung auf das Zellwachstum ermittelt. Es zeigt sich, dass die Sonde in einer Konzentration von weit über 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt werden kann, ohne ein erhöhtes Zellsterben zu registrieren, jedoch die Geschwindigkeit der Zellteilung dramatisch reduziert wird. Bei Konzentrationen der Sonde *SiR-DNA* oberhalb von 0,25  $\mu\text{M}$  verharrten U2OS Zellen und PRE1 Zellen länger in der G2-Phase als die Kontrollzellen.<sup>39c</sup> Daher wurde angenommen, dass die Interaktion von Hoechst mit der DNA als DNA-Schaden wahrgenommen und so der Zellzyklus verlangsamt wird.

Dennoch konnte durch eine hohe Fluorogenität und Bindeaffinität die Konzentration der DNA-Sonden *4-TMR Tris DNA* stark verringert werden. Bei einer Inkubationszeit von 16 h waren Konzentration von 10 nM ausreichend, um kontrastreiche Mikroskopie-Aufnahmen mit *4-TMR Tris DNA* zu erzielen. Dies kann dazu beitragen, Zellschäden oder Änderungen in Morphologie und Physiologie in der Zelle zu reduzieren.

### 3.1.5 Ausweitung der Tris-Spirolaktame auf eine weitere Farbstoffklasse

*4-TMR Tris DNA* weist im Vergleich zu *4-TMR DNA* eine gesteigerten Bindeaffinität zur dsDNA auf. Diese Strategie wurde nun auf eine zweite Klasse von zellpermeablen Farbstoffen übertragen. Carbopyronine kommen in der Lebendzellmikroskopie verstärkt zum Einsatz. Der Austausch des Xanthen-Sauerstoffs gegen ein Dimethylkohlenstoff bewirkt neben einer Rotverschiebung des Absorptions- und Emissionsspektrums auch eine erhöhte Zellpermeabilität.<sup>48b,48d,48g</sup>

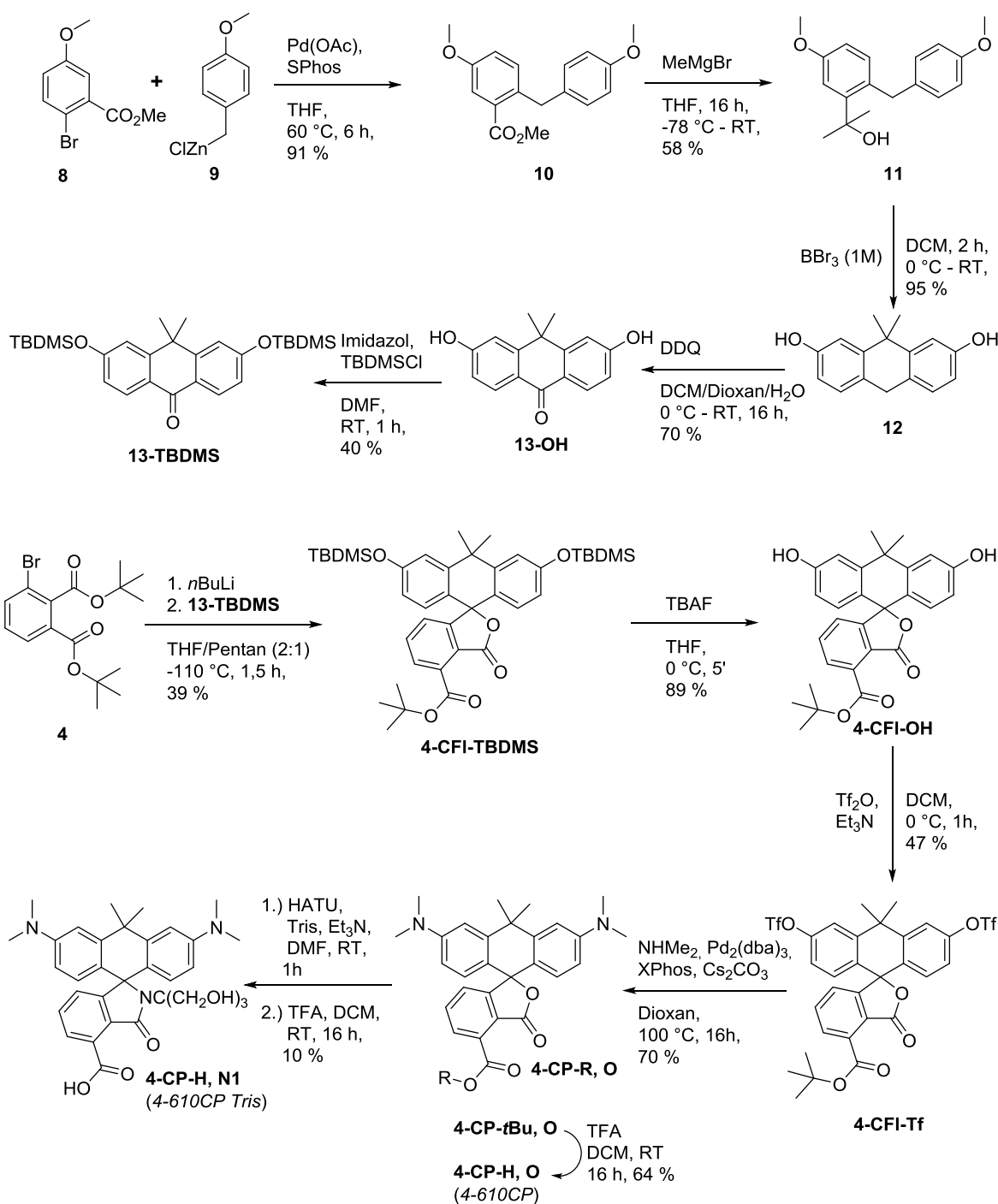
Im Folgenden wurde untersucht, ob die hier entwickelte Strategie auf weitere Farbstoffe wie Carbopyronine übertragbar ist. Die Carbopyronine wurden synthetisiert und an Hoechst-Amin gebunden. Die beiden Sonden **4-CP-DNA, O** (*4-610CP DNA*) und **4-CP-DNA, N1** (*4-610CP Tris DNA*) wurden vergleichend untersucht.

#### Synthese der Carbopyronine und DNA-Sonden

In Schema 4 ist die Syntheserouten zur Darstellung der beiden Carbopyronine gezeigt. In einer Suzuki-Kreuzkupplungsreaktion wurde der Methylester **10** aus den Ausgangssubstanzen 2-Brom-5-methoxybenzoesäuremethylester (**8**) und 4-Methoxybenzylzinkchlorid (**9**) dargestellt. Nach der Reduktion des Methylesters in einer Grignard-Reaktion zu dem tertiären Alkohol **11**, kam es durch den Ringschluss mithilfe von Bortribromid zur Ausbildung des Carboxanthens **12**. Die Oxidierung durch DDQ zu dem Carboxanthon **13-OH** und anschließende Umsetzung mit TBDMSCl ergab den Präkursor **13-TBDMS**.

Nach Halogen-Metall-Austausch in Di-*t*Bu-3-bromphthalsäureester (**4**) und anschließender langsamer Zugabe von **13-TBDMS** kam es zur Ausbildung einer C-C-Bindung zwischen dem Keto-Kohlenstoff und dem Lithiumkohlenstoff und hierdurch zur Bildung von **4-CFI-TBDMS**. Nach Abspaltung der Schutzgruppe mit TBAF zum Carbofluorescein **4-CFI-OH** und anschließender Aktivierung der Hydroxyphenylgruppen mit

Trifluormethansulfonsäureanhydrid zu **4-CFI-Tf**, konnten in einer Buchwald-Hartwig Reaktion *N,N*-Dimethylaminogruppen eingeführt und das Carbopyronin **4-CP-tBu, O** dargestellt werden. Die Lakton-Carboxylgruppe wurde mit HATU aktiviert und Tris-Amin über eine Amidbindung eingebracht (**4-CP-tBu, N1**). Jedoch war die Umsetzung zum Produkt in



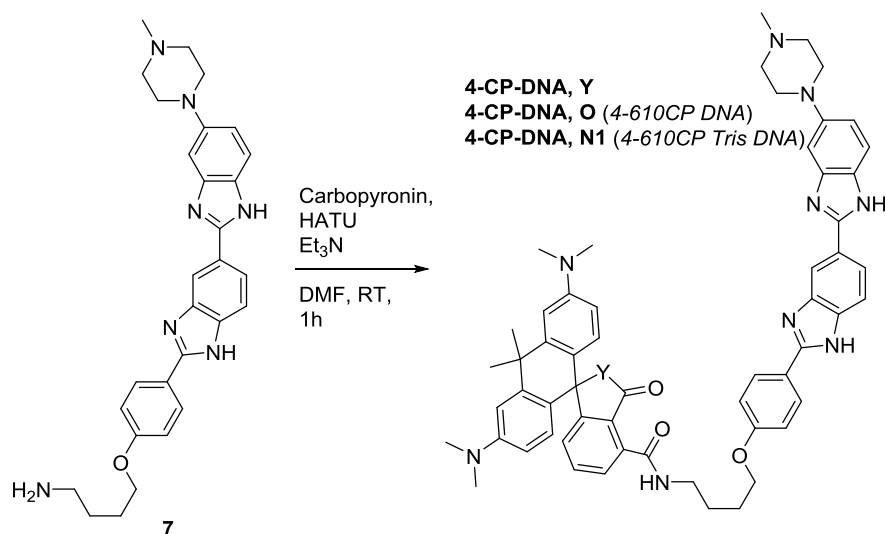
**Schema 4.** Syntheseroute der Farbstoffe **4-CP, O** (*4-610CP*) und **4-CP, N1** (*4-610CP Tris*) aus 2-Brom-5-methoxybenzoesäuremethylester (**8**), 4-Methoxybenzylzinkchlorid (**9**) und Di*t*Bu-3-bromphthalsäureester (**4**).

dieser Reaktion sehr gering. Ein Grund kann das stabile Lakton sein, welches sich durch HATU nur schwer aktivieren lässt. Die anschließende „saure“ Spaltung des *tert*-Buthylesters zu den beiden Verbindungen **4-CP-*t*Bu, O** und **4-CP-*t*Bu, N1** ergaben die Carbopyronine **4-CP-H, O** (*4-610CP*) und **4-CP-H, N1** (*4-610CP Tris*).

Nach Aktivierung der freien C4-Carboxylgruppe der beiden oben genannten Carbopyronine, wurden unter Verwendung der DNA-Bindedomäne Hoechst-C4-Amin (**7**) die DNA-Sonden **4-CP-DNA, O** (*4-610CP DNA*) und **4-CP-DNA, N1** (*4-610CP Tris DNA*) synthetisiert (Schema 5).

### Untersuchung der physikalischen und chemischen Eigenschaften der freien und an Hoechst gebundenen Carbopyronine

Zunächst wurde der Farbstoffe **4-CP-H, N1** (*4-610CP Tris*) charakterisiert und dessen Eigenschaften mit den Literaturwerten von **4-CP-H, O** (*4-610CP*)<sup>40</sup> verglichen. Die Daten der Absorptions- und Emissionsmaxima sowie Extinktionskoeffizient, Fluoreszenz-Lebensdauer und Quantenausbeute sind in Tabelle 5 gezeigt. Ähnlich wie bei den Rhodaminen, war eine bathochrome Verschiebung im Absorptionsspektrum nach Einführung der Tris-Gruppe zu registrieren. Lag das Absorptionsmaximum von **4-CP-H, O** bei 611 nm, so verschob es sich



**Schema 5.** Synthese der zwei DNA Sonden mit einem Carbopyronin. Über eine Amidbindung konnten die Farbstoffe **4-CP-DNA, O** (*4-610CP*) und **4-CP-DNA, N1** (*4-610CP Tris*) an Hoechst-C4-Amin (**7**) gebunden werden.

bei **4-CP-H, N1** um 9 nm in den roten Wellenlängenbereich. Jedoch war eine Veränderung des Emissionsmaximums nicht beobachtet wurden. Folglich wurde der Stokes-Shift bei **4-CP-H, N1** geringer, verglichen zum Carbopyronin **4-CP-H, O**.

Ähnlich wie bei den TMR-Spirolaktam Analogen zeigte **4-CP-H, N1 (4-610CP Tris)** eine Abhängigkeit des Absorptionsmaximums zum pH-Wert. Für den ungebundenen Farbstoff **4-CP-H, N1** wurde ein  $pK_{cycl}$ -Wert von 8,0 gemessen (Tabelle 5). Aus vorangestellten Experimenten wurde gezeigt, dass das TMR Spirolaktam-Derivat mit einem Tris-Amid einen  $pK_{cycl}$ -Wert von 9,4 besitzt (Tabelle 1). Der Unterschied der  $pK_{cycl}$ -Werte zwischen dem Spirolaktam des Rhodamins und des Carbopyronins lässt sich durch den Austausch des Xanthen-Sauerstoffs mit Dimethylkohlenstoff erklären. Hierdurch kommt es zu mesomere Effekte, die das Gleichgewicht zwischen der offenen und der geschlossenen Form des Farbstoffs verschieben und die intramolekulare Zyklisierung zum Spirolaktam unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlicher machen.<sup>48b</sup>

Der Extinktionskoeffizient des Tris-haltigen Carbopyronins **4-CP-H, N1 (4-610CP Tris)** gemessen in PBS lag bei  $3600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und war damit wesentlich geringer als bei **4-CP-H, O (4-610CP)**. Auch dies ist mit der hohen pH-Abhängigkeit **4-CP-H, N1 (4-610CP Tris)** zu begründen.

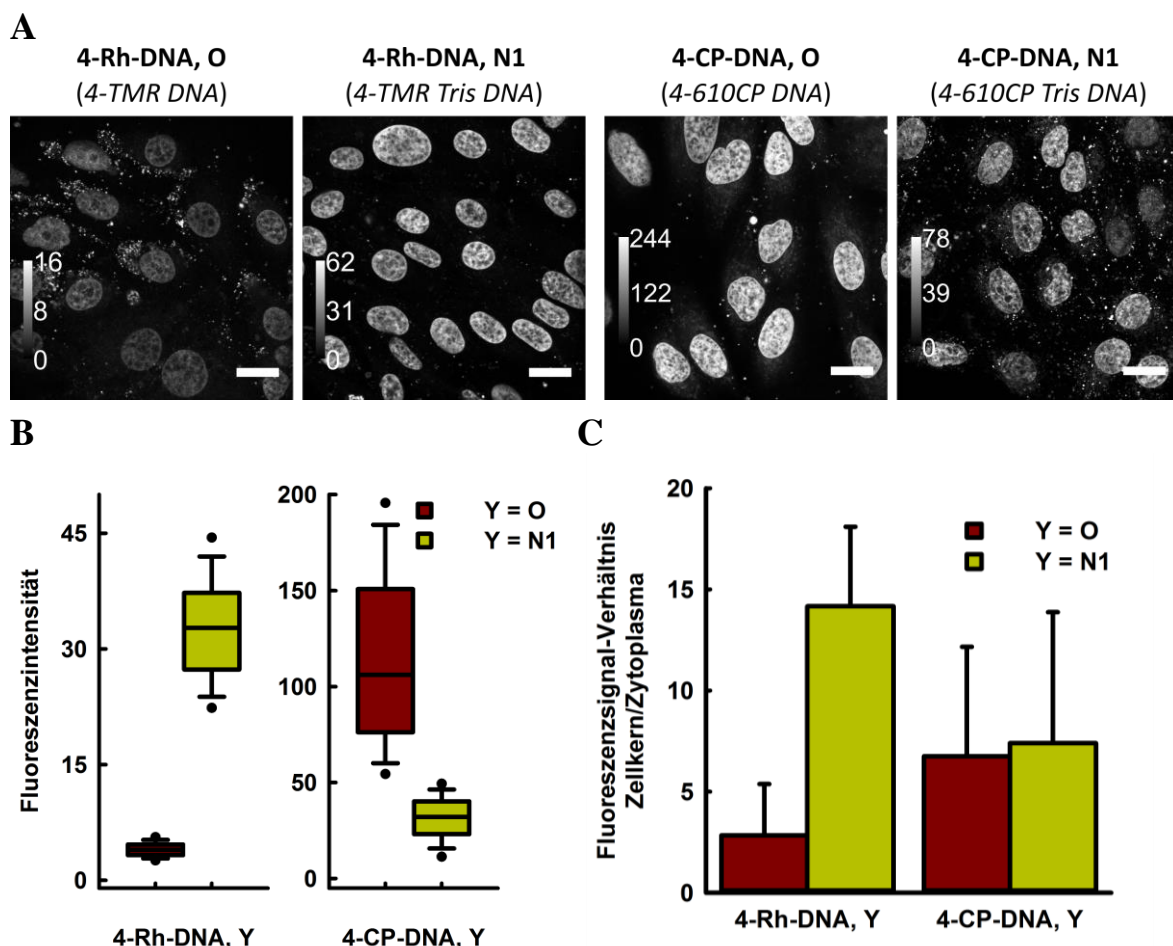
Die beiden im roten Wellenlängenbereich absorbierenden DNA-Sonden *4-610CP DNA* und *4-610CP Tris DNA* wurden verwendet, um genomische DNA in lebenden Vero Zellen zu

**Tabelle 5.** Photophysikalische Charakterisierung der ungebundenen Farbstoffe. Alle Daten wurden in PBS erhoben.  $\epsilon$ : Extinktionskoeffizient; QY Quantenausbeute;  $\tau$ : Fluoreszenz-Lebenszeit. Daten von **4-CP, O** wurden Ref. [40] entnommen.

	$Abs_{max}$ [nm] ( $\epsilon$ [ $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ])	$Em_{max}$ [nm]	QY	$\tau$ [ns]	$pK_{cycl}$
<b>4-CP-H, O</b> (4-610CP)	611 (101400)	636	0,5	3,1	-
<b>4-CP-H, N1</b> (4-610CP Tris)	620 (3600)	636	0,5	3,0	8,0

markieren. Hierfür wurden die Zellen, ähnlich wie bei den DNA-Sonden mit TMR-Farbstoffen in einer 0,1  $\mu\text{M}$  Färbelösung mit Verapamil für jeweils 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

In Abbildung 18A ist zu erkennen, dass spezifische Färbungen der genomischen DNA mit den Carbopyronin-tragenden Sonden erhalten wurden. Für einen Vergleich wurden die Ergebnisse aus den Mikroskopieaufnahmen von **4-Rh-DNA, O** (*4-TMR DNA*) und **4-Rh-DNA, N1** (*4-TMR Tris DNA*) herangezogen. Bei gleicher Leistung des Anregungslasers wurden mit der DNA-Sonde **4-CP-DNA, O** (*4-610CP DNA*) wesentlich stärkere Fluoreszenzsignale detektiert als mit **4-CP-DNA, N1** (*4-610CP Tris DNA*). Dies stand im Gegensatz zu den Mikroskopieaufnahmen mit **4-Rh-DNA, O** (*4-TMR DNA*) und **4-Rh-DNA, N1** (*4-TMR Tris DNA*). Es wurden Fluoreszenzintensitäts-Messungen von über 300 Messpunkten der



**Abbildung 18.** Analysen der freien und an Hoechst gebundenen Carbopyronine *4-610CP* und *4-610CP Tris*. In **A** sind konfokalmikroskopische Aufnahmen markierter genomischer DNA in lebenden Vero Zellen abgebildet. Die hier verwendeten Sonden sind *4-610CP DNA* und *4-610CP Tris DNA*, sowie *4-TMR DNA* und *4-TMR Tris DNA*. Angeregt wurden die Sonden mit einem 640 nm Laser (Carbopyronine) und einem 561 nm Laser (TMR). Aufgenommen wurden die Zellen mit einem 60 x Öljektiv. Maßstabsskala: 20  $\mu\text{m}$ . In **B** sind die Fluoreszenzsignale in den Zellkernen mit  $N \geq 300$  Messpunkten pro Sonde gezeigt. **C** zeigt das Verhältnis des Fluoreszenzsignals von Zellkern zu Zytoplasma.



angefärbten genomischen DNA im Zellkern durchgeführt. Abbildung 18B stellt die Fluoreszenzsignale dar. Es zeigt sich, dass die Fluoreszenzintensität der DNA-Sonde mit **4-CP-DNA, N1** (*4-610CP Tris DNA*) etwa 4-mal geringer war verglichen zu **4-CP-DNA, O** (*4-610CP DNA*). Hingegen wies die DNA Sonde **4-Rh-DNA, N1** (*4-TMR Tris DNA*) ein etwa 8-fach höheres Signal auf als die Sonde **4-Rh-DNA, O** (*4-TMR DNA*). Aufgrund des ersetzten Xanthensauerstoffs mit einem Dimethylkohlenstoff, kommt es zu einer Verlagerung der positiven Ladung im polyzyklischen System. Hierdurch ist die Ausbildung des Spirolaktams bei *4-610CP Tris* stärker als bei den Rhodamin-Analogen *4-TMR Tris*. Dies führt zu einem geringeren  $pK_{cycl}$ -Wert, wodurch bei einem physiologischen pH-Wert die Fluoreszenzintensität drastisch verringert wird.

Dies wird durch die Ergebnisse der spektroskopischen Messungen, die in Tabelle 6 aufgeführt sind, unterstützt. Der Extinktionskoeffizient der DNA-Sonde *4-610CP Tris DNA* ist nach Zugabe isolierter DNA geringer als bei der Sonde *4-610CP DNA*. Ebenso steigt die Quantenausbeute bei *4-610CP Tris DNA* nicht so stark an. Zusammen führt dies zu einer geringeren Fluoreszenzintensität bei *4-610CP Tris DNA* als bei *4-610CP DNA*. Gleiches wurde in einem der oberen Abschnitte für *4-TMR tBu DNA* beschrieben, der sich durch einen noch geringeren  $pK_{cycl}$ -Wert auszeichnet und dessen Fluoreszenzsignal sich kaum detektieren ließ. Hingegen ähnelte das Verhältnis zwischen Fluoreszenzsignal im Zellkern und Signal im Cytoplasma bei der Sonde **4-CP-DNA, N1** (*4-610CP Tris DNA*) dem der Sonde **4-CP-DNA, O**

**Tabelle 6.** Photophysikalische Eigenschaften der beiden Sonden *4-610CP DNA* und *4-610CP Tris DNA*.  $\epsilon$  = Extinktionskoeffizient; QY = absolute Quantenausbeute;  $F_0$  = Fluoreszenzintensitätsmaximum der Sonde in PBS,  $F_{DNA}$  = Fluoreszenzintensitätsmaximum der Sonde in PBS mit 1 mg/ml genomischer DNA

Farbstoff	Abs. <sub>max</sub> [nm] ( $\epsilon$ [ $M^{-1} cm^{-1}$ ])		Em. <sub>max</sub> [nm]	QY	$F_{DNA}/F_0$
	Vor DNA-Zugabe	Nach DNA-Zugabe			
<b>4-CP-DNA, O</b> ( <i>4-610CP DNA</i> )	632 (16800)	624 (23100)	634 <sup>a</sup> /636 <sup>b</sup>	0,10 <sup>a</sup> /0,38 <sup>b</sup>	8,6
<b>4-CP-DNA, N1</b> ( <i>4-610CP Tris DNA</i> )	624 (1500)	624 (10200)	637 <sup>a</sup> /640 <sup>b</sup>	0,16 <sup>a</sup> /0,28 <sup>b</sup>	4,9

a: gemessen in PBS; b: gemessen in PBS mit 1 mg/ml genomischer DNA.

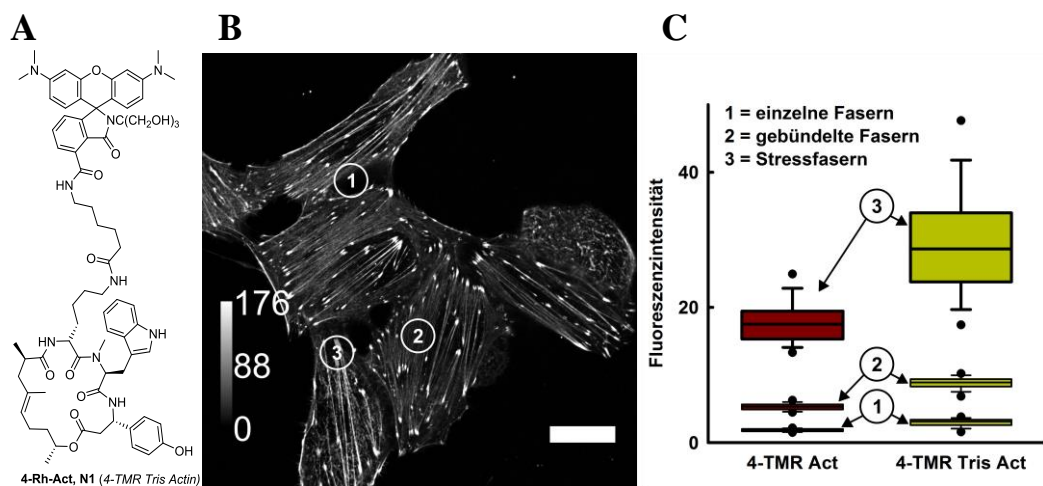
(*4-610CP DNA*) (Abbildung 18C). Jedoch zeigten Fluorogenitäts-Messungen (Tabelle 6), dass die Fluoreszenz nach Zugabe isolierter DNA bei *4-610CP DNA* stärker ansteigt als bei *4-610CP Tris DNA*. Es ist anzunehmen, dass die Tris-Gruppe einen verstärkenden Effekt auf die Bindungsaffinität zur DNA ausübt. Verglichen zu *4-610CP DNA* wurde daher mit *4-610CP Tris DNA* ein ähnliches Zellkern-zu-Zytoplasma Verhältnis erreicht, obgleich die Fluorogenität geringer ist.

Durch den Austausch der Tris-Gruppe bei **4-CP-H, N1** (*4-610CP Tris*) mit größeren funktionellen Gruppen am Spirolaktam-Amid könnten die sterischen Hindernisse erhöht werden. Hierdurch könnte der  $pK_{\text{cycl}}$ -Wert in einen basischen Bereich geschoben werden und dies zu einer Verbesserung der Fluoreszenzintensität beitragen.

### 3.1.6 Aktin- und Tubulin-Sonden mit 4-TMR Tris für die Lebendzell-Mikroskopie

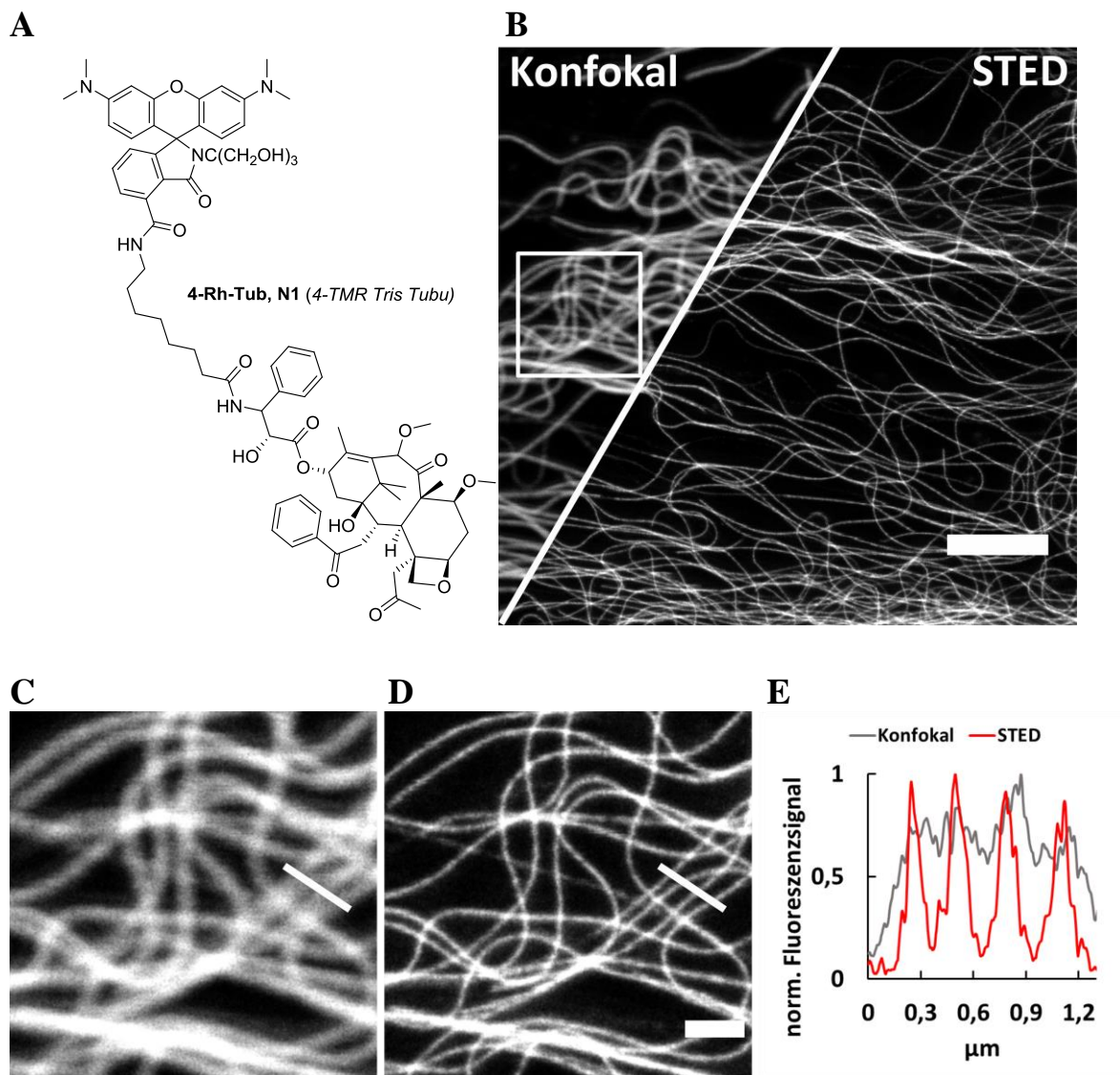
Die Analyse der TMR-Spirolakton- und TMR-Spirolaktam-DNA-Sonden hat gezeigt, dass 4-TMR Tris DNA ein hohes Fluoreszenzsignal und Signal-zu-Hintergrund Verhältnis aufgrund einer gesteigerten Bindeaffinität aufweist. In diesem Abschnitt wird gezeigt, wie 4-TMR Tris auch für weitere Sonden genutzt wurde. Hierzu wurde der Farbstoff an Cabazitaxel und an ein modifiziertes Jasplakinolid über einen aliphatischen Linker gebunden.

Das Aktinnetzwerk von lebenden Vero Zellen wurde in einer 0,5  $\mu\text{M}$  Färbelösung und unter Verwendung von 10  $\mu\text{M}$  Verapamil mit der Sonde **4-Rh-Act, N1** (4-TMR Tris Actin) (Abbildung 19A) markiert. In Abbildung 19B ist das Aktinnetzwerk von Vero Zellen gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Färbung spezifisch war und ein gutes Signal-zu-Hintergrund Verhältnis bestand.



**Abbildung 19.** Markierung der Aktinnetzwerke in lebenden Vero Zellen. In **A** ist die chemischen Strukturen der Aktinsonde **4-Rh-Act, N1** (4-TMR Tris Actin) gezeigt. Die Bindedomäne für F-Aktin ist ein modifiziertes Jasplakinolid. Die konfokalmikroskopische Aufnahme in **B** zeigt das Aktinnetzwerk von lebenden Vero Zellen, die mit der Sonde 4-TMR Tris Actin markiert wurden. Die Konzentration betrug 0,5  $\mu\text{M}$  und die Inkubationszeit 1 h. Maßstabsskala: 20  $\mu\text{m}$ . Die durch Kreise und Ziffern markierten Regionen zeigen Bereiche, in den einzelne Fasern (1), gebündelte Fasern (2) und Stressfasern (3) zu sehen sind. Diese Bereiche wurden unterschieden und deren Fluoreszenzintensitäten in **C** ermittelt. Hierzu wurden gemittelte Intensitäten aus über 70 Messpunkte (250 x 250 Pixel) in einem Box-Plot Diagramm aufgetragen und mit der Sonde 4-TMR Act verglichen. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem 60x Öljektiv und einem 561 nm Anregungslaser erstellt.

Die Fluoreszenzintensität der markierten Aktinstrukturen wurde gemessen und mit der Sonde **4-Rh-Act, O** (*4-TMR Actin*) verglichen (Abbildung 19C). Für eine vergleichbare Aussage der Signalstärke wurden drei unterschiedliche Bereiche innerhalb der Zelle ausgewählt. Es wurden in jeweils über 70 Messpunkte (250 × 250 Pixel) die Fluoreszenzintensitäten einzelner Fasern (1), gebündelter Fasern (2) und Stressfasern (3) bestimmt. Es wurde gezeigt, dass die Fluoreszenzintensitäten der markierten Aktin-Strukturen mit *4-TMR Tris Actin* höher sind als



**Abbildung 20.** Fluoreszierende Sonden zur Markierung der Tubulinfilamente in lebenden Zellen. In **A** ist die Struktur der Tubulinsonde *4-TMR Tris Tubu* gezeigt. Die Bindedomäne für Tubulin ist das Taxen Cabazitaxel. In **B** sind Tubulinfilamente humaner Fibroblasten abgebildet. Die lebenden Zellen wurden in einer 0,5  $\mu\text{M}$  Färbelösung mit der Sonde *4-TMR Tris Tubu* markiert. Linksseitig ist die konfokalmikroskopische und rechtsseitig die hochauflösende STED-Aufnahme zusehen. Maßstabsskala: 5  $\mu\text{m}$ . In **C** und **D** ist ein Bereich aus **B** vergrößert gezeigt (weißer Kasten). **C** zeigt das konfokalmikroskopische Bild und **D** das STED-Bild. Maßstabsskala: 1  $\mu\text{m}$ . Graphik **E** zeigt die Linienprofile über mehrere Tubulinfilamente eines ausgewählten Bereiches aus **C** und **D** (weiße Linie). Das Linienprofil in hellgrau zeigt die Signalintensitäten aus **C** und das Linienprofil in rot zeigt die Signalintensitäten aus **D**. Der Bereich erstreckt sich über 1,3  $\mu\text{m}$  Länge. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem 60x Ölobjektiv erstellt. Genutzt wurde ein STED-Mikroskop ausgestattet mit einem 561 nm Anregungslaser und einem 775 nm STED Laser.

mit *4-TMR Actin*. Dies kann mit einer möglichen gesteigerten Zellpermeabilität der Aktin-Sonde und erhöhter Bindeaffinität mit dem TMR-Laktam begründet werden.

Die Sonde **4-Rh-Tub, N1** (*4-TMR Tris Tubu*) (Abbildung 20A) wurde genutzt, um Tubulinfilamente in lebenden humanen Fibroblasten zu markieren. Durch den flachen länglichen Zellkörper und das dadurch stark ausgebreitete Tubulin-Netzwerk, ließen sich einzelne Filamente in Fibroblasten gut visualisieren. Die Konzentration der Färbelösung betrug 0,5  $\mu\text{M}$ .

In Abbildung 20B ist zu erkennen, dass die Filamente spezifisch von der Tubulinsonde markiert wurden. Obgleich das Emissionsmaximum von *4-TMR Tris* weit blauverschoben liegt, wurde mithilfe der STED-Mikroskopie eine gesteigerte optische Auflösung – über die Beugungsgrenze hinaus – erzielt (Abbildung 20C und D). Das Linienprofil in Abbildung 20E wurde über mehrere Tubulinfilamente aus Abbildung 20C und D (weiße Linie) gelegt und stellt graphisch die Verbesserung der optischen Auflösung durch die STED-Mikroskopie dar. Der graue Kurvenverlauf in der Grafik entspricht dem Linienprofil aus der konfokalmikroskopischen Aufnahme, während der rote Kurvenverlauf das Linienprofil aus der STED-Mikroskopie zeigt. Es ist zu sehen, dass Filamente die nah beieinander lagen mit der konfokalen Messmethode nicht getrennt aufgelöst werden konnten. Hingegen ließ sich mit der STED-Mikroskopie eine klare Separation von vier Tubulinfilamenten ermöglichen. Mit der Sonde **4-Rh-Tub, N1** (*4-TMR Tris Tubu*) wurde eine optische Auflösung mithilfe der STED-Mikroskopie von etwa 100 nm erzielt (gegenüber 250 nm in der Konfokalmikroskopie).

Dies zeigt, dass *4-TMR Tris* auch an weiteren Liganden gebunden werden kann und neben doppelsträngiger DNA in fixierten, wie auch lebenden Zellen weitere Strukturen wie Aktin und Tubulin spezifisch markieren kann. Weiterhin konnte die Sonde *4-TMR-Tubu* in der STED-Mikroskopie verwendet werden.

### 3.1.7 Resümee der Ergebnisse

Primäre Amine mit verschiedenen funktionellen Seitengruppen wurde genutzt, um TMR-Spirolaktam Derivate darzustellen. Vor allem durch räumlich große funktionelle Gruppen am Spirolaktam-Stickstoff konnte das Gleichgewicht zwischen der offenen und geschlossenen Form beeinflusst werden. Im physiologischen pH-Bereich lag durch einen hohen  $pK_{\text{cycl}}$ -Wert die Molekülpopulation bei Laktam-Derivaten mit Tris-Amid zum großen Teil in der offenen, fluoreszierenden Form vor.

TMR-Laktam Derivate mit einem Tris-Amid als funktionelle Gruppe wurden an *Hoechst 33258* gekoppelt, und so DNA-Sonden für die Lebendzellmikroskopie synthetisiert. Bei lebenden Vero-Zellen wurden mit den DNA-Sonden, die ein TMR-Tris Derivat trugen, fluoreszenzintensivere Aufnahmen von Zellkernen erhalten, verglichen zu DNA-Sonden mit einem TMR Derivat. Ebenso war das Verhältnis von Fluoreszenzsignal im Zellkern zu Zytoplasma bei TMR-Tris Sonden höher als bei Sonden ohne Tris-Gruppe.

Aufbauend auf den Ergebnissen wurde überprüft, in wie weit funktionelle Gruppen am Laktam die Fluorogenität und Bindeaffinität beeinflussen. Hierzu wurden zusätzlich die TMR-Spirolaktame *4-TMR tBu* (*tert*-Buthylamid) und *4-TMR CN* (Cyanamid) dargestellt und an *Hoechst 33258* gebunden.

Ogleich die Fluorogenität der DNA-Laktam-Sonden gegenüber der DNA-Lakton-Sonde wesentlich geringer war, konnte durch eine stärkere Bindeaffinität zur Zielstruktur die höheren Fluoreszenzsignale erklärt werden. Durch das Zusammenspiel aus einem  $pK_{\text{cycl}}$ -Wert, der für eine vorrangig offenen fluoreszierenden Form des Farbstoffs sorgt und die gesteigerte Bindeaffinität zur Zielstruktur, wurden mit der DNA-Sonde *4-TMR Tris DNA* ein spezifisches und hohes Fluoreszenzsignal im Zellkern lebender Zellen erzielt.

Neben den DNA-Sonden wurden weitere molekulare Marker mit dem Fluorophor *4-TMR Tris* synthetisiert. Das Aktinnetzwerk konnten mit *4-TMR Tris Act* in lebenden Vero Zellen spezifisch markiert werden. Weiterhin wurden Tubulinfilamente mit der Sonde *4-TMR Tris Tub* in humanen Fibroblasten visualisiert. Mithilfe der STED-Mikroskopie wurde eine verbesserte optische Auflösung der Tubulinfilamente von 100 nm gemessen.





## 3.2 Pyridinhaltige Rhodamine

Rhodamine, die sich durch eine erhöhte Ausbildung eines Spirolaktons auszeichnen, zeigen ebenso eine erhöhte Membranpermeabilität. Die meisten Strategien versuchen Einfluss auf die Elektronendichte-Verteilung im polyzyklischen Xanthensystem zu nehmen, um eine Ausbildung des Spirolaktons zu verstärken.

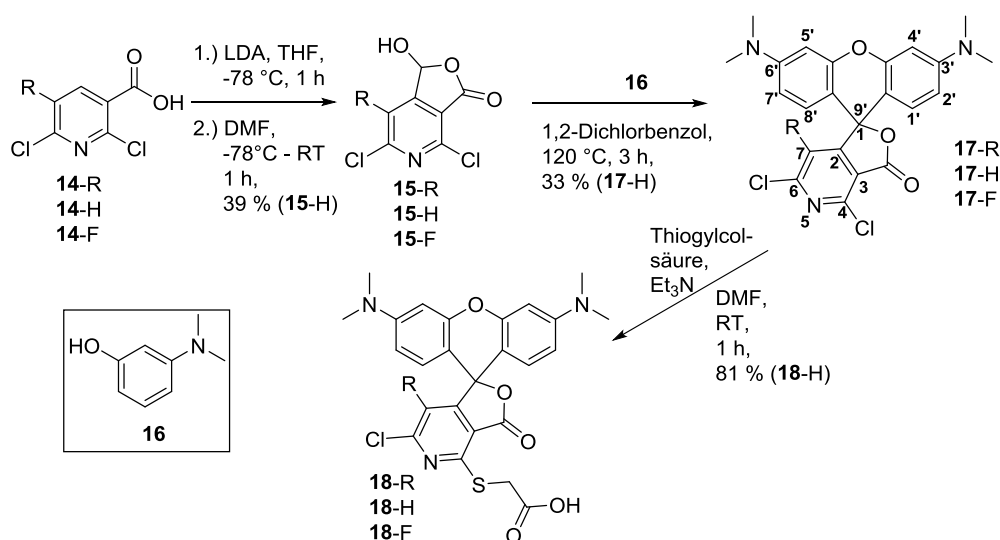
Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Elektrophilie des meso-Kohlenstoffs ist, die Elektronendichte-Verteilung im aromatischen Ring, der direkt mit dem meso-Kohlenstoff verbunden ist, zu verändern. In diesem Abschnitt wird gezeigt, dass der Austausch des Benzols mit einem Dichlorpyridin eine Erhöhung des  $D_{50}$ -Wertes zu Folge hat. Der neue Farbstoff, ein pyridinhaltiger Rhodamin, wurde an verschiedenen Liganden und reaktive Gruppen gekoppelt. Diese Sonden konnten erfolgreich an lebenden Zellen und im Gewebe mit Hilfe der Konfokal- als auch STED-Mikroskopie genutzt werden.

Im Folgenden wird auf die Synthese und die Charakterisierung der neuartigen Farbstoffklasse als auch auf die Färbung und Visualisierung einzelner Proteine und Organellen in lebenden Objekten mit den synthetisierten Sonden eingegangen.

### 3.2.1 Synthese und Charakterisierung pyridinhaltiger Rhodamine

#### Synthese und Strukturaufklärung

2,6-Dichlorpyridinsäure (**14-H**) wurde nach Zugabe von Lithiumdiisopropylamid (LDA) und DMF zu dem Aldehyd **15-H** umgesetzt (Schema 6). In einer Kondensationsreaktion mit *N,N*-Dimethylaminophenol (**16**) in Dichlorbenzol kam es zur Bildung des pyridinhaltigen Rhodamins **17-H**. Die sehr moderate Ausbeute konnte durch den Einsatz anderer Lösungsmittel wie Propionsäure, Toluol oder Trifluorethanol und höherer Temperatur nicht verbessert werden. Mercaptoessigsäure wurde in einer  $S_NAr$ -Reaktion unter Chlor-Austausch als funktionale Gruppe in dem Rhodamin eingebracht. Durch die Ausbildung des Thioethers wurde Rhodamin **18-H** (*565pR*) dargestellt. Interessant zu sehen war, dass ausschließlich ein einziges Isomer gebildet wurde. Für eine genau Validierung, an welchem Chlor die nucleophile Substitution stattfindet, wurde ein zweiter pyridinhaltiger Farbstoff (**18-F**) mit einem weiteren Halogen am Pyridin herangezogen.<sup>76</sup> NMR-Studien sollte Aufschluss über die chemische Struktur der synthetisierten Farbstoffe geben. Die Signale waren bei 25 °C jedoch sehr breit, was auf eine mögliche Protonenaustausch des Pyridin-Stickstoffs zurückzuführen ist. Bei einer erhöhten Temperatur von 75 °C war es jedoch möglich die Signale auszuwerten. Das fehlende



Schema 6. Syntheseroute zur Darstellung der Verbindungen **18-R**.

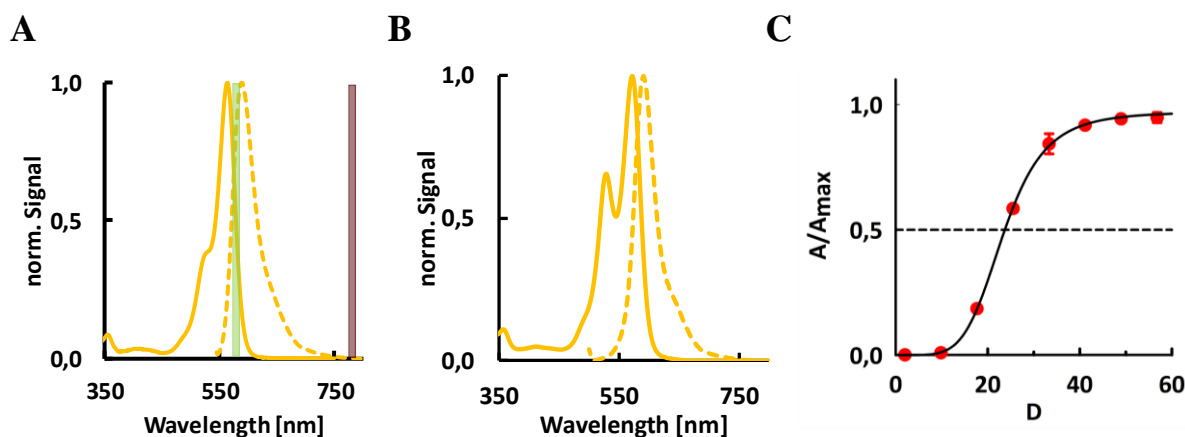
NOE-Signal zwischen der SCH<sub>2</sub>-Gruppe mit anderen Protonen in **18-H** lässt darauf schließen, dass der Thioether an dem C4-Kohlenstoff substituiert wurde. Im Fall der Verbindung **18-F** ist ebenso ein Fehlen der NOE-Signale mit den Protonen an C1'- und C2'- bzw. C7'- und C8'-Kohlenstoff im Xanthen-Ring durch die Position des Thioethers am C4-Kohlenstoff zu erklären.<sup>76</sup> Weiterhin deutet die sehr geringe chemische Verschiebung des <sup>19</sup>F-Signals von nur +4 ppm zwischen **17-F** (-129 ppm) und **18-F** (-125 ppm) auf eine Position des Thiolinkers am C4-Kohlenstoff.<sup>76</sup> Würde der Thiolinker sich an Position C6 befinden, müsste von einer wesentlich höheren chemischen Verschiebung von 27 – 31 ppm ausgegangen werden.<sup>77</sup>

### Photophysikalische Eigenschaften

Nachdem die Rhodamine **18-R** erfolgreich synthetisiert und ihre Struktur aufgeklärt werden konnte, wurden die photophysikalischen Eigenschaften untersucht. Hierzu wurden sie mit dem strukturell stark verwandten *N,N,N',N'*-Tetramethylrhodamin *4-TMR*<sup>40</sup> und mit dem zellgängigen Carbopyronin *6-610CP* (6-COOH-610CP)<sup>48b</sup> verglichen (Tabelle 7). Absorptions- und Emissionsmaxima, sowie Fluoreszenz-Lebenszeit und Quantenausbeute der Farbstoffe wurde in PBS gemessen. Die bathochrome und bathofluore Verschiebung der Verbindungen **18-H** und **18-F** verglichen mit *4-TMR* lassen sich durch die elektronenziehenden Atome wie Fluor und Chlor an dem Elektronenakzeptorring Pyridin erklären (Abbildung 21A

**Tabelle 7.** Vergleichend sind die photophysikalischen Eigenschaften der Farbstoffe **5-H** und **5-F** den Farbstoffen *4-TMR* und *6-610CP* gegenübergestellt.  $\lambda$ : Wellenlänge;  $\epsilon$ : Extinktionskoeffizient;  $\Phi_f$ : Fluoreszenzquantenausbeute.

Farbstoff	Absorption $\lambda_{max}$ , [nm] ( $\epsilon$ , M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	Emission $\lambda_{max}$ , [nm] ( $\Phi_f$ )	$D_{50}$	Fluoreszenz- Lebenszeit [ns]
<b>18-H</b> ( <i>565pR</i> )	564 (90000)	589 (0,31)	24	2,2
<b>18-F</b>	529 / 573 (57000)	597 (0,29)	15	2,0
<i>4-TMR</i> <sup>40</sup>	551 (75000)	573 (0,41)	14	2,0
<i>6-610CP</i> <sup>48b</sup>	609 (100000)	634 (0,59)	37	3,1



**Abbildung 21.** In **A** ist das Absorptions- (durchgezogene Linie) und Emissionsspektrum (gestrichelte Linie) von *565pR* gezeigt. Der grüne Balken markiert die Wellenlänge des für die Mikroskopie verwendeten Anregungslasers (561 nm). In **B** ist das Absorptions- (durchgezogene Linie) und Emissionsspektrum (gestrichelte Linie) von **18-F** gezeigt. Die Spektren wurden in PBS aufgenommen. In **C** sind die normierten Absorptionsintensitäten von *565pR* in verschiedenen Dioxan-Wasser Lösungen gegen die jeweilige Dielektrizitätskonstante der Lösungen aufgetragen (rote Punkte). Zur Bestimmung des  $D_{50}$ -Wertes wurde die Messpunkte mit der Hill-Gleichung extrapoliert.

und **B**). Der wesentlich geringere Extinktionskoeffizient bei **18-F** ergibt sich aus den zwei Maxima im Absorptionsspektrum (529 nm und 573 nm). Die Fläche der Absorptionsbande von **18-F** ist verglichen mit **18-H** jedoch ähnlich.

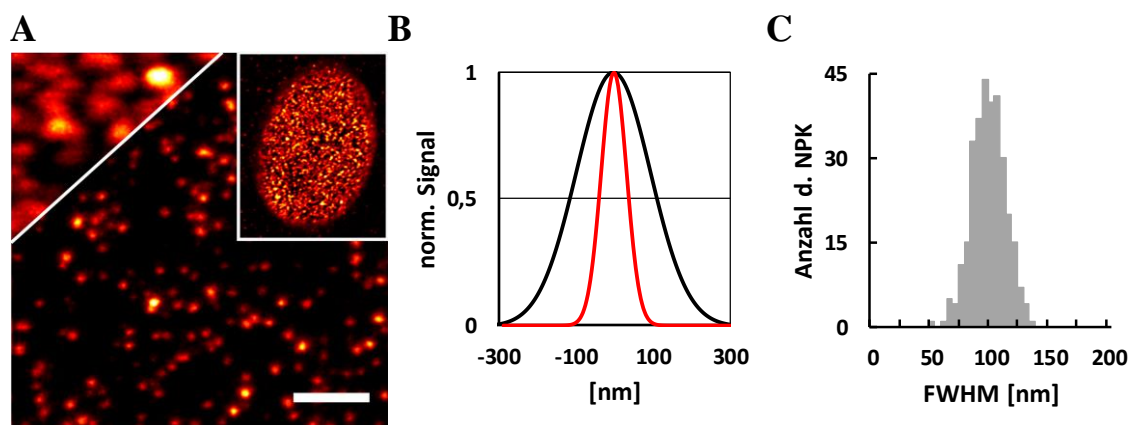
Der Einfluss des Pyridins und der Halogene auf die Bildung des Spirolaktons wurde in der Bestimmung des  $D_{50}$ -Wertes gezeigt (Abbildung 21C) und mit *4-TMR* und *6-610CP* verglichen. Für **18-H** liegt der Wert bei 24 und ist verglichen zu *4-TMR* ( $D_{50} = 14$ )<sup>40</sup> höher. Dies hat zur Folge, dass die Bereitschaft zur Ausbildung des Spirolaktons bei **18-H** höher ist als bei *4-TMR*. Von einer besseren Membranpermeabilität kann somit ausgegangen werden. Jedoch steigt der  $D_{50}$ -Wert von **5-F** verglichen mit *4-TMR* nicht signifikant. Es ist zuweilen unklar, warum eine Erhöhung des  $D_{50}$ -Werts durch eine weitere Elektronenziehende Gruppe ausbleibt. Der  $D_{50}$ -Wert von *6-610CP* ist höher, da der Austausch des Xanthen-Sauerstoffs durch Dimethylkohlenstoff den elektrophilen Charakter des Mesokohlenstoffs im Xanthenring stärker erhöht, als es der Elektronenakzeptorring Pyridin vermag.

### 3.2.2 Synthese fluoreszierender Sonden und deren Einsatz in der Mikroskopie

#### Färbung fixierter Zellen mit 565pR

Nach dem die chemische Struktur aufgeklärt und die photophysikalischen Eigenschaften untersucht wurden, wurde überprüft, ob der neue Farbstoff 565pR in der Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden kann. Hierzu wurde ein NHS-Ester (565pR-NHS) genutzt, um den Fluorophor an einen Antikörper (Ziege anti-Kaninchen IgG) zu koppeln. In fixierten Zellen wurde über indirekte Immunfärbung mit einem *anti-NUP98* Antikörper das Protein 98 im Kernporenkomplex (NUP98, engl. *nuclear pore protein 98*) markiert (Kopplung und Färbung durch Frau M. Sc. J. Rehman, Abberior GmbH, Göttingen).

In fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen werden die markierten Proteine im Kernporenkomplex als kleine Punkte mit ähnlicher Größe auf der Membran des Zellkerns abgebildet. Diese Struktur erlaubt es, nicht nur konfokalmikroskopisch zu überprüfen, ob das Protein spezifisch mit dem Farbstoff angefärbt werden kann. Für die STED-Mikroskopie kann hiermit sehr gut validiert werden, ob der neue organische Fluorophore 565pR mit dem



**Abbildung 22.** Konfokal- und STED-mikroskopische Aufnahmen des Kernporenproteins NUP98 markiert mit 565pR und die anschließende Bestimmung des Durchmessers der angefärbten Struktur. In A ist ein vergrößerter Bereich einzelner Kernporenproteine NUP98 aus dem Übersichtsbild (obere rechte Ecke) zu sehen. Die Struktur wurde mit dem Farbstoff 565pR gekoppelt an einem anti-NUP98 Antikörper in fixierten Vero Zellen gefärbt und durch die STED-Mikroskopie und Konfokalmikroskopie (obere linke Ecke) visualisiert. Maßstabsbalken: 1  $\mu\text{m}$ . Beispielhaft ist in B ein Linienprofil eines Kernporenproteins gezeigt. Es stellt den Unterschied der Halbwertsbreite (Durchmesser) zwischen der STED-Mikroskopie (rote Linie) und der Konfokalmikroskopie (schwarze Linie) dar. Die Linienprofile von 309 NUP98 Proteinen wurden analysiert und die Anzahl der jeweiligen Halbwertsbreiten (FWHM; engl. *Full-Width-at-Half-Maximum*) in einem Histogramm in C aufgetragen. Die mittlere Halbwertsbreite der Kernporen mit der STED-Mikroskopie beträgt 96 nm. Der Farbstoff 565pR wurde mit einem 561 nm Laser angeregt (Power: 2,8  $\mu\text{W}$ ). Für die STED-Mikroskopie wurde ein 775 nm STED-Laser mit einer Power von 60 mW verwendet.

STED-Laser interagiert und so eine Verbesserung der optischen Auflösung zu erkennen ist. In Abbildung 22A ist ein Zellkern gezeigt, dessen Kernporen mit dem Farbstoff *565pR* markiert wurden. Vergrößert ist ein Ausgewählter Bereich dargestellt, der sowohl in der Konfokal- wie auch STED-Mikroskopie helle und spezifische Signale des NUP98 mit geringem Hintergrund zeigt.

Für ein besseres Verständnis, wie stark die optische Auflösung durch die STED-Mikroskopie mit diesem Farbstoff erhöht werden kann, wurden 309 NUP98 Strukturen analysiert. Hierzu wurden Linienprofile über die punktförmigen Strukturen gezogen und die Halbwertsbreite (FWHM; engl. *Full-Width-at-Half-Maximum*) bestimmt. In Abbildung 22B ist ein solches Linienprofil exemplarisch gezeigt. Hier ist gut erkennbar, dass sich die optische Auflösung mit Hilfe der STED-Mikroskopie (rote Linie) verglichen zur Konfokalmikroskopie (schwarze Linie) erheblich verbessert. Im Mittel zeigte die Struktur in der STED-Mikroskopie einen Durchmesser von 96 nm (Abbildung 22C). Obwohl der Farbstoff mit Blick auf das Emissionsspektrum (Abbildung 22A) nur schwach mit dem 775 nm STED-Laser interagiert, zeigte sich dennoch eine – über die Beugungsgrenze hinaus – verbesserte optische Auflösung.

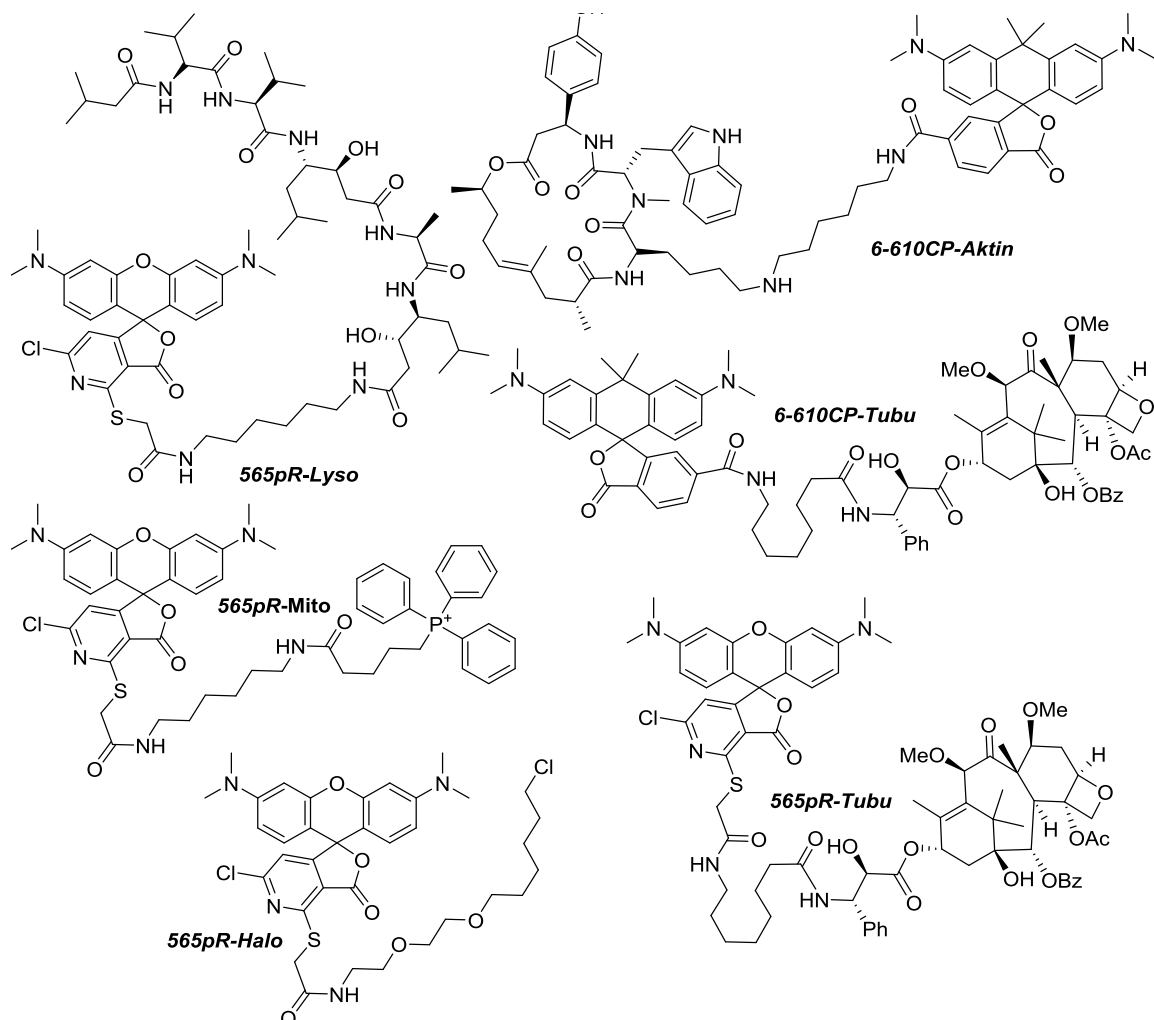
### **Molekulare Sonden mit 565pR für die Lebendzellmikroskopie**

Der Farbstoff *565pR* wurde anschließend in der Lebendzellmikroskopie ausgetestet, um zu prüfen, ob dessen Konjugate durch die Membran diffundieren können. Hierzu wurden Sonden hergestellt, bei denen der Farbstoff *565pR* über aliphatische Linker mit molekularen Liganden oder funktionelle Gruppen verbunden ist. Die chemischen Strukturen der Sonden sind in Abbildung 23 gezeigt. Mit diesen Sonden wurden lebende Fibroblasten Zellen und U2OS Zellen angefärbt und an einem STED-Mikroskop analysiert. Für die Visualisierung der Mitochondrien wird in vielen Fällen die positiv geladene Triphenylphosphonium-Gruppe verwendet. Diese Gruppe wurde auch in dieser Arbeit genutzt und mit einem 1,6-

Diaminohexan-Linker an *565pR* geknüpft. In Abbildung 24A sind die Mitochondrien in lebenden Fibroblasten gezeigt, angefärbt mit der Sonde *565pR-Mito*.

Tubulinfilamente konnten mit der Sonde *565pR-Tubu* markiert werden. Als Ligand wurde das Taxol Cabazitaxel verwendet. Neben der spezifischen Färbung in Abbildung 24B von Tubulinfilamenten in lebenden U2OS Zellen konnte auch mit der STED-Mikroskopie die optische Auflösung erheblich verbessert werden.

Die Peptidase Cathepsin D, die sich im Lysosom befinden, wird von dem linearen Peptid Pepstatin A inhibiert. An dieses Peptid wurde der Farbstoff *565pR* durch den Linker 1,6-



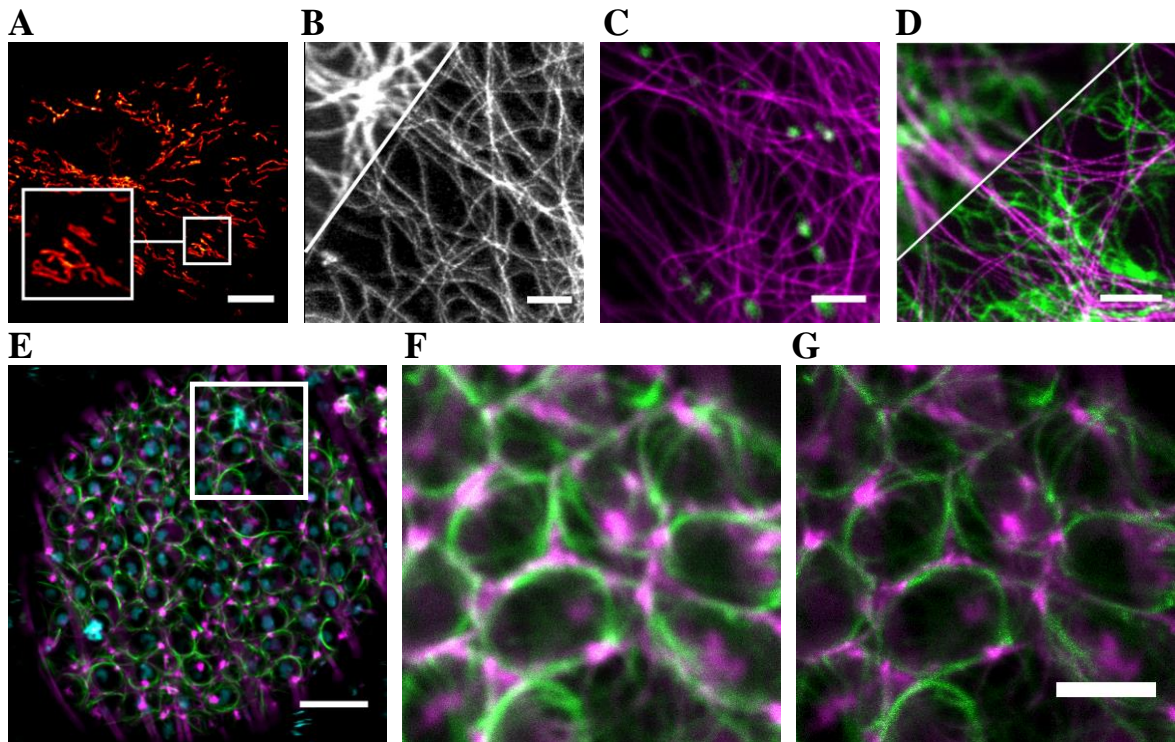
**Abbildung 23.** Chemische Strukturen der fluoreszierenden Sonden bestehend aus dem Farbstoff *565pR*, einem aliphatischen Linker und den Liganden Pepstatin A (Lysosom), (4-Carboxybutyl)-Triphenylphosphonium (Mitochondrium), Halo Tag Aminooxy (Halo Tag Fusionsprotein) und Cabazitaxel (Tubulin). Das Carbopyronin *6-610CP* wurde für die Herstellung der beiden Tubulin- und Aktinsonden *6-610CP-Tubu* und *6-610CP-Aktin* mit den Liganden Cabazitaxel und einem modifiziertes Jasplakinolid verwendet.

Diaminohexan gebunden. Die Sonde *565pR-Lyso* wurde an lebenden Fibroblasten getestet (Abbildung 24C). Als Referenzsonde wurde *6-610CP-Tubu* genutzt, um mit einem zweiten Farbstoff die Tubulinfilamente zu markieren. Die Emissionsbereiche beider Farbstoffe wurden durch die Verwendung einer neuen Detektionsmethode voneinander getrennt. Durch die so genannte spektrale Detektion, die aus zwei gradient-beschichteten Lichtfiltern besteht, ist es möglich den Detektionsbereich je nach Farbstoff anzupassen. Der Pyridin haltige Farbstoff *565pR* wurde mit einem 561 nm Laser und der Carbopyronin *6-610CP* mit einem 640 nm Laser angeregt. Jedoch absorbiert *6-610CP* auch bei 561 nm. Damit Signalüberlagerungen beider Farbstoffe vermieden werden, wurde das Detektionsfenster für *565pR* zwischen 571 nm und 600 nm gesetzt. Fluoreszenzsignal durch *6-610CP* wurden hierdurch nahezu perfekt abgeschnitten. *6-610CP* wurde anschließend mit dem 640 nm Laser angeregt und das Detektionsfenster im Bereich von 650 nm bis 725 nm gelegt. So wurden die spezifischen Färbungen beider Sonden durch den Einsatz von zwei Lasern und der spektralen Detektion voneinander getrennt aufgenommen.

Das Vimentin-Netzwerk in U2OS Zellen, die ein Vimentin-Halo Tag Fusionsprotein exprimieren, wurde mit der Sonde *565pR-Halo* kovalent markiert (Abbildung 24D; Zellen und Färbung von Herrn Dr. S. Stoldt, NanoBiophotonik, MPI BPC Göttingen). In einer Co-Färbung wurde die Sonde *6-610CP-Tubulin* genutzt, um Tubulinfilamente zu färben. Das hierbei genutzte STED-Mikroskop war mit zwei festen Detektionsfenstern von 580 nm bis 630 nm und von 650 nm bis 720 nm ausgestattet. Auch hier war die Separation der Fluoreszenzsignal beider Farbstoffe gut möglich, obgleich ein schwaches Hintergrundsignal von *6-610CP-Tubulin* im Detektionsbereich von 580 nm bis 630 nm aufkam. Beide Strukturen konnten durch den Einsatz der organischen Fluorophore in der STED-Mikroskopie hochaufgelöst dargestellt werden.

Um den Einsatzbereich der Sonden mit dem Farbstoff *565pR* zu erweitern, wurden Eierstöcke aus *Drosophila melanogaster* entnommen und die Tubulinfilamente und Aktinnetzwerke mit





**Abbildung 24.** Mikroskopische Aufnahmen zellulärer Strukturen und Organellen in lebenden Objekten mit fluoreszierenden Sonden. In **A** sind Mitochondrien in einem lebenden Fibroblasten abgebildet. Die Mitochondrien wurden mit der Sonde *565pR-Mito* angefärbt und mithilfe der Konfokalmikroskopie abgebildet. Maßstabsbalken: 10  $\mu\text{m}$ . Abbildung **B** zeigt Tubulinfilamente in einer lebenden U2OS Zelle. Markiert wurde die Struktur mit der Sonde *565pR-Tubu*. Die Strukturen wurden sowohl mit der STED- als auch der Konfokalmikroskopie (linke obere Ecke) aufgenommen. Maßstabsbalken: 2  $\mu\text{m}$ . Das Zwei-Farbenbild in **C** zeigt Lysosome (Grün), markiert mit der Sonde *565pR-Lyso* und Tubulinfilamente (Magenta), markiert mit der Sonde *6-610CP-Tubu* in einem lebenden Fibroblasten. Die Lysosome wurden über die Konfokalmikroskopie und die Tubulinfilamente durch STED-Mikroskopie visualisiert. Maßstabsbalken: 2  $\mu\text{m}$ . Das Vimentinnetzwerk in **D** wurde mit Hilfe eines Vimentin-Halo Tag Fusionsprotein in monoklonalen U2OS Zellen und durch die Sonde *565pR-Halo* markiert (Grün). Als Co-Färbung wurden Tubulinfilamente mit der Sonde *6-610CP-Tubu* markiert (Magenta). Die Strukturen wurden mithilfe der STED- und Konfokalmikroskopie (obere linke Ecke) aufgenommen. Maßstabsbalken 2  $\mu\text{m}$ . In **E** sind die genomische DNA innerhalb der Zellkerne durch Hoechst (Cyan), Tubulinfilamente durch *565pR-Tubu* (Grün) und Aktinnetzwerke durch *6-610CP-Aktin* (Magenta) von Follikelzellen eines Gameten im frühen Stadium in Ovarien von *Drosophila melanogaster* markiert. Der eingerahmte Bereich wird in **F** und **G** vergrößert dargestellt. Die Aufnahme mithilfe der Konfokalmikroskopie wird in **F**, die Aufnahme mithilfe der STED-Mikroskopie in **G** gezeigt. Maßstabsbalken: 10  $\mu\text{m}$  (**E**) und 2  $\mu\text{m}$  (**F** und **G**). Die Farbstoffe wurden mit einem 405 nm (Hoechst), 561 nm (*565pR*-Sonden) und 640 nm (*6-610CP*-Sonden) Laser angeregt. Für die STED-Mikroskopie wurde ein gepulster 775 nm STED Laser verwendet.

den Sonden *565pR-Tubu* und *6-610-Aktin* visualisiert (Probenpräparation und Färbung bei Frau M. Sc. J. Rehman, Abberior GmbH, Göttingen). Der Ausschnitt des Gewebes in Abbildung 24E zeigt den oberen Bereich eines Gameten in einem frühen Stadium. Zu sehen sind Tubulinstrukturen und Aktinnetzwerke, sowie die DNA in den Zellkernen der Follikelzellen. Hierdurch wurde gezeigt, dass Proteine nicht nur in einzelnen Zellen, sondern auch in komplexen Organen mit den Sonden angefärbt werden können. Auch hierbei wurde demonstriert, dass eine optische Auflösung durch die STED-Mikroskopie unter Verwendung von *565pR* verbessert werden kann (vergleiche Abbildung 24F und G).

### 3.2.3 Resümee der Ergebnisse

Der Austausch des Benzolrings bei *N,N,N',N'*-Tetramethylrhodamin durch ein Dichloropyridin beeinflusste durch eine Elektronendichteverchiebung das Gleichgewicht zwischen der offenen und geschlossene Form des Farbstoffs. Dies bewirkte letztlich eine verbesserte Zellpermeabilität.

Für die Bindung des Farbstoffs an Liganden wurde Mercaptoessigsäure als Linker verwendet. Es zeigte sich, dass der Linker sehr spezifisch mit dem Chloratom in *ortho*-Position zur Carboxy-Gruppe austauscht und nicht mit dem Chloratom in *para*-Position.

Der so synthetisierte Farbstoff *565pR* wurde an molekulare Liganden gekoppelt um spezifisch Tubulin, Lysosom, Mitochondrien und Halo-Tag Fusionsprotein zu markieren. Hiermit konnten Strukturen und Organellen nicht bloß in lebenden Zellen, sondern auch in Organen höhere Organismen visualisiert werden. STED-Mikroskopische Aufnahmen zeigten, dass der Farbstoff *565pR* durch einen 775 nm STED Laser erfolgreich abgeregt werden kann, wodurch es zu einer Verbesserung der optischen Auflösung in fixierten und Lebenden Zellen, sowie in Gewebeproben kam.

## 4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zwei Strategien zur Verbesserung organischer Fluorophore für die Lebendzell-Mikroskopie entwickelt.

Zunächst wurde unter Verwendung von Tetramethylrhodamin (TMR) als Modellsystem Spirolaktam-Derivate mit verschiedenen *N*-Alkyl-Amidseitengruppen dargestellt. Es wurde herausgefunden, dass der Einsatz großer funktioneller Gruppen am Spirolaktam-Stickstoff das Gleichgewicht zwischen der offenen und geschlossenen Form beeinflusst. Laktam-Derivate mit Tris-Amid lagen im physiologischen pH-Bereich zum Großteil in der offenen, fluoreszierenden Form vor. Durch Kopplung der TMR-Laktam Derivate mit einem Tris-Amid an *Hoechst 33258* wurden so DNA-Sonden für die Lebendzellmikroskopie synthetisiert. Im Vergleich zeigte sich, dass die hergestellten TMR-Tris-DNA-Sonden eine deutlich erhöhte Fluoreszenzintensität aufwiesen als TMR-DNA Sonden (ohne Tris-Gruppe). Ebenso war das Verhältnis von Fluoreszenzsignal im Zellkern zu Zytoplasma bei TMR-Tris Sonden höher als bei Sonden ohne Tris-Gruppe.

Aufbauend auf den Ergebnissen wurde untersucht, inwieweit funktionelle Gruppen am Laktam die Fluorogenität und Bindeaffinität beeinflussen. Hierzu wurden weitere TMR-Spirolaktame dargestellt und an *Hoechst 33258* gebunden. Obgleich die Fluorogenität der DNA-Laktam-Sonden gegenüber der DNA-Lakton-Sonde wesentlich geringer war, wurde bei DNA-Laktam-Sonden eine stärkere Bindeaffinität zur Zielstruktur festgestellt. Das Zusammenspiel zwischen der gesteigerte Bindeaffinität und einem  $pK_{\text{cycl}}$ -Wert, der für eine vorrangig offenen fluoreszierenden Form des Farbstoffs sorgt, ermöglicht der DNA-Sonde *4-TMR Tris DNA* ein spezifisches und hohes Fluoreszenzsignal im Zellkern lebender Zellen. Neben DNA-Sonden wurden weitere *4-TMR Tris* Sonden synthetisiert und untersucht. Hierdurch konnten die Aktin- und Tubulinfilamente in lebenden Säugerzellen visualisiert werden. Mithilfe der STED-

Mikroskopie wurde eine verbesserte optische Auflösung der Tubulinfilamente von 100 nm gemessen.

Weiterhin wurden Pyridin-haltige Rhodamine für die Lebendzellmikroskopie untersucht. Hierzu wurden ein Austausch des Benzolrings bei TMR durch ein Dichloropyridin durchgeführt, welcher zu einer Elektronendichteverchiebung führt. Es zeigte sich, dass dieser Austausch das Gleichgewicht zwischen der offenen und geschlossenen Form des Farbstoffs beeinflusst, welches letztlich zu einer Verbesserung der Zellpermeabilität führt.

Durch spezifischen Austausch des Chloratoms in *ortho*-Position mit Mercaptoessigsäure wurde ein Linker eingeführt, der für die Bindung des Farbstoffs an Liganden genutzt wurde.

Mit dem Farbstoff *565pR* an molekulare Liganden wurde spezifisch Tubulin, Lysosom, Mitochondrien und Halo-Tag Fusionsproteine markiert. Diese Sonden wurden erfolgreich in lebenden Zellen sowie Organen höherer Organismen eingesetzt. STED-Mikroskopische Aufnahmen zeigten, dass der Farbstoff *565pR* durch einen 775 nm STED Laser erfolgreich abgeregt werden kann, wodurch es zu einer Verbesserung der optischen Auflösung in fixierten und Lebenden Zellen, sowie in Gewebeproben kam.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Bestimmung photophysikalischer Eigenschaften der Farbstoffe

Die Absorptions- und Emissionsspektren wurden an einem UV/Vis-Spektrometer *Cary 4000*, *Varian* (Agilent, Santa Clara, CA, USA) und einem Fluoreszenzspektrometer *Cary Eclips*, *Varian* (Agilent, Santa Clara, CA, USA) in Quarzküvetten (Hellma, Mühlheim, Deutschland) und in PBS (pH 7,4) aufgenommen. Die Konzentrationen zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten betragen  $2 \cdot 10^{-6}$  M und  $4 \cdot 10^{-6}$  M. Der Extinktionskoeffizient [ $M^{-1}cm^{-1}$ ] wurde mit dem Labert Beer Gesetz

$$D_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

berechnet. Hierbei ist  $D_{\lambda}$  die optische Dichte bei einer Wellenlänge  $\lambda$ ,  $\epsilon_{\lambda}$  ist der Extinktionskoeffizient derselben Wellenlänge,  $c$  ist die Konzentration der Lösung in [M] (mol/L) und  $d$  ist die Schichtdicke der Küvette in [cm] (1,0 cm).

Die Bestimmung der absoluten Fluoreszenz-Quantenausbeute wurde in PBS (pH 7,4) an einem *Quantaaurus-QY Absolute PL quantum yield C11347* (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) durchgeführt.

Die Fluoreszenz-Lebenszeit der Farbstoffe wurde in PBS (pH 7,4) an einem *Quantaaurus QY C11347-12 spectrometer* (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) gemessen.

Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 5.2 Bestimmung der $pK_{cycl}$ -Werte der Spirolactam-Derivate

Es wurden wässrige Pufferlösungen mit pH-Werten von 3 bis 11 angesetzt. Die pH-Werte wurden mit einem pH-Meter überprüft und mit HCl (1M) und NaOH (1M) eingestellt. Die Farbstoffe wurden in den Pufferlösungen gelöst, sodass eine Konzentration von  $2 \cdot 10^{-6}$  M

vorlag. Teilweise benötigte es mehrere Stunden - je nach Farbstoff und Pufferlösung - bis sich eine Gleichgewichtsform zwischen der offenen und geschlossenen Form eingestellt hatte. Daher wurden die Messungen 16 h nachdem die Lösungen angesetzt wurden durchgeführt. In Einweg-Plastikküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm wurden Triplikate der Absorptionsspektren an einem UV/Vis Spektrometer *Cary 4000, Varian* (Agilent, Santa Clara, CA, USA) aufgenommen. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Intensitäten der Absorptionsmaxima wurden gemittelt und normiert ( $A/A_{max}$ ) und gegen den pH-Wert aufgetragen. Die Messpunkte wurden mit der Gleichung

$$A/A_{max} = A_{min} + \frac{A_{max} - A_{min}}{1 + 10^{\log(pK_{cycl}) - x}}$$

für die Ligandenbindung mit einer sigmoidalen Dosisantwort extrapoliert. Hierbei ist  $pK_{cycl}$  der Wert, bei dem die Hälfte der maximalen Absorptionsintensität erreicht wurde.

### 5.3 Bestimmung der $D_{50}$ -Werte

In einer Lösungsmittelreihe mit aufsteigenden Dielektrizitätskonstanten ( $\epsilon_r$ ) wurden Dioxan ( $\epsilon_r = 2$ ) und Wasser ( $\epsilon_r = 82$ ) gemischt. Ein Lösungsmittelgemisch mit hohem Anteil Dioxan weist eine geringere Dielektrizitätskonstante und eine geringere Polarität auf, ein Gemisch mit einem höheren Wasseranteil dementsprechend eine hohe Dielektrizitätskonstante und hohe Polarität.

In den 11 Dioxan-Wasser Lösungen (Wasseranteil von 0-100 % v/v; aufsteigend in 10er Prozenteinheiten) wurden die Absorptionsspektren aufgenommen. Die Konzentration der Farbstoffe betrug  $2 \cdot 10^{-6}$  M. Die Messungen wurden in Quarzküvetten (Hellma, Mühlheim, Deutschland) mit einer Schichtdicke von 1 cm und bei Raumtemperatur durchgeführt. Teilweise benötigte es mehrere Stunden je nach Farbstoff, bis sich eine Gleichgewichtsform zwischen der offenen und geschlossenen Form eingestellt hatte. Daher wurden die Messungen

16 h nachdem die Lösungen angesetzt wurden durchgeführt. Die Intensitäten der Absorptionsmaxima wurden bestimmt, die Triplikate gemittelt und die normierten Werte gegen die Dielektrizitätskonstanten der jeweiligen Lösungen aufgetragen. Mit der Hill-Gleichung

$$A/A_{max} = A_{min} + \frac{A_{max} - A_{min}}{1 + \left(\frac{D}{D_{50}}\right)^{Hillkoeffizient}}$$

wurden die Messpunkte extrapoliert. Hierbei ist  $D_{50}$  der Wert, bei dem die Hälfte der maximalen Absorptionsintensität in dieser Messreihe erreicht wurde. Der Hillkoeffizient wurde wie folgt bestimmt:

$$Hillkoeffizient = \frac{\log(81)}{\log(D_{10}/D_{90})}$$

Die Werte  $D_{10}$  und  $D_{90}$  geben die Dielektrizitätskonstanten an, bei denen 10 % und 90 % der maximal zu erreichenden Absorption erhaltenen wurden.

#### 5.4 Bestimmung der Fluorogenität

Die DNA-Sonden wurden in PBS (pH 7,4) und einer Lösung aus 1 mg/ml isolierter Fischsperma DNA (SERVA Electrophoreseis GmbH, Heidelberg, Deutschland) in PBS (pH 7,4) gelöst. Die Konzentration der DNA-Sonden betrug  $4 \cdot 10^{-6}$  M. Die Absorptions- und Emissionsspektren der Lösungen wurden in Quarzküvetten (Hellma, Mühlheim, Deutschland) mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Es wurden je Probe drei Spektren aufgenommen. Der Faktor der Intensitätsunterschiede wurde aus den gemittelten Werten der Absorptions- und Emissionsmaxima für Lösungen mit und ohne DNA ermittelt.

## 5.5 Bestimmung der Dissoziationskonstante $K_d$

Ein Oligonukleotide (5'-CGCGAATTCGCGTTTTTCGCGAATTCGCG-3'; Sigma-Aldrich) wurde in PBS gelöst, sodass eine Konzentration von 1 mM vorlag. Die Lösung wurde 10 Minuten bei 95°C erwärmt und anschließend langsam auf Raumtemperatur herunter gekühlt. Das hierdurch gebildete Dodecamer mit einer Haarnadelstruktur (eng.: *hairpin* DNA; hpDNA) wurde für den weiteren Versuch verwendet.

In einer 96-Loch Platte mit Glasboden (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) wurden zu PBS-Lösungen (300 µL) mit gelöster DNA-Sonde (1 µM) 0,25 – 20,0 Äquivalente der hpDNA zugegeben. Von jeder Lösung wurden Triplikate erstellt. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei Raumtemperatur wurden die Fluoreszenzintensitäten der Lösungen an einem Mikroplattenreader *FluoroMax* (Horiba, Kyōto, Japan) bestimmt. Hierzu wurden die Sonden bei 540 nm ( $\pm 2$  nm) angeregt. Die Fluoreszenz wurde bei 580 nm ( $\pm 2$  nm) detektiert. Die Signalintensitäten der jeweiligen Lösungen wurden gemittelt und die normierten Werte gegen die hpDNA in [M] aufgetragen. Die Messpunkte wurden mit der Gleichung

$$\frac{F}{F_0} = \frac{F_{max} \cdot [hpDNA]}{K_d + [hpDNA]}$$

extrapoliert. Hierbei ist  $F$  die gemessenen Fluoreszenzintensität bei 580 nm,  $F_0$  die Fluoreszenzintensität der DNA-Sonde ohne hpDNA,  $F_{max}$  die maximale Fluoreszenzintensität der DNA-Sonde,  $[hpDNA]$  die Konzentration der hpDNA in [M] und  $K_d$  die Dissoziationskonstante.

## 5.6 Aufbau des Konfokal- und STED-Mikroskops

Für die Mikroskopieaufnahmen wurden Konfokal- und STED-Mikroskope genutzt. Die Mikroskope waren mit folgenden Anregungslasern ausgestattet: 405 nm UV, gepulster 561 nm Laser (Frequenz; 40 MHz; Pulslänge: 50-130 ps), gepulster 640 nm Laser (Frequenz; 40 MHz;



Pulslänge: 50-130 ps). Für die STED-Mikroskopie wurde zusätzlich ein gepulster 775 nm STED Laser (Frequenz; 40 MHz; Pulslänge: 1,1 ns) verwendet. Die optischen Aufbauten (*INFINITY line*, *FACILITY line*, und *STEDYCON*, Abberior Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) waren an einem Weitfeld-Fluoreszenz Mikroskop *IX83* (Olympus Europa SE & CO. KG, Hamburg, Deutschland) mit einem 20 x Luftobjektiv, 60 x Öobjektiv (NA = 1,40) und 100 x Öobjektiv (NA = 1,45) verbunden.

## 5.7 Zellkultur, Immunfluoreszenz- und Lebendfärbung

### ***Zellkultur***

Adhärenente Fibroblasten und Vero Zellen wurden in DMEM Wachstumsmedium mit 10 % (v/v) fetales Kälberserum (FBS, eng. *fetal bovin serum*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1 % (w/w) Natriumpyruvat (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) und 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) kultiviert. U-2 OS Zellen wurden in McCoy's Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) versetzt mit 10 % (v/v) FBS, 1 % (w/w) Natriumpyruvat (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) und Penicillin-Streptomycin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) kultiviert. Die Zellen wurden bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden alle 3 bis 4 Tage vereinzelt. Für die Mikroskopie wurden die Zellen auf Deckgläsern ausgesät und verwendet, wenn diese ein Schicht von ca. 80 % bedeckten.

### ***Immunfluoreszenzfärbung***

Der NHS-Ester der Farbstoffe wurde genutzt, um Sekundärantikörper zu markieren. 0,2 mg des NHS-Esters wurden in 20 µL DMSO gelöst und langsam zu einer Antikörperlösung (1 mg/ml) in wässrigem 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> Puffer (Endvolumen 1 ml) bei pH 8,5 pipettiert. Die Lösung wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf eine PD10-Säule (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) gegeben. Das Konjugat wurde mit PBS Puffer (pH 7,4) eluiert.

Die Zellen auf einem Deckglas wurden 4 Minuten in eiskaltem Methanol fixiert und anschließend in einer 2 % (v/v) Rinderserumalbumin-Lösung (BSA, engl. *bovine serum albumin*) für 15 Minuten geblockt. Das Deckglas wurde aus der Lösung genommen. Alle Antikörper wurden in Block-Puffer 1:200 verdünnt. Die Zellen wurden mit dem primären Antikörper 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Zellen mit der BSA-Lösung gewaschen wurden, wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit Block-Puffer gewaschen und in *abberior* Mount Solid Antifade (Abberior GmbH, Göttingen, Deutschland) eingebettet.

### ***Lebendzellfärbung***

Eine 1 mM Stammlösung der Sonden in DMF wurden in Zellwachstumsmedium DMEM<sup>gfp</sup> (Evrogen, Moskau, Russland) auf eine Konzentration von 0,1 – 2  $\mu$ M verdünnt. Die Zellen auf einem Deckglas wurden in reinem DMEM<sup>gfp</sup> gewaschen und anschließend in der Färbelösung 1 h bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden aus der Lösung entfernt und auf einem Objektträger mit einer Mulde, versetzt mit 90  $\mu$ L frischen DMEM<sup>gfp</sup> eingebettet. Das Deckglas wurde vorsichtig an den Objektträger gedrückt und überschüssiges Medium entfernt. Damit die Zellen nicht austrocknen oder das Deckglas sich verschiebt wurde das Deckglas mit Twinsil Speed 22 (picodent Dental-Produktions- und Vertriebs GmbH, Wipperfürth, Deutschland) festgeklebt. Die gefärbten Zellen wurden umgehend am Mikroskop untersucht. Für Langzeitmessungen wurde eine Inkubationskammer (Oko-Lab, Ottaviano, NA, Italien) verwendet.

### ***Proteinmarkierung in Gewebeproben***

*Drosophila melanogaster* wurden in Gefäßen mit Maismehl-Agarmedium bei 20 °C unter konstanter Luftfeuchtigkeit gehalten. Es wurde ein Hell-Dunkelzyklus von 12/12 h eingehalten. Die Fliegen waren ein Geschenk von Dr. Leonard Drees, *Abteilung für Gewebedynamik und Regeneration*, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie.

Die Fliegen wurden auf Eis betäubt. Die Hoden von 5 – 6 Tage alte Männchen wurden in PBS entnommen. Eierstöcke von 5 – 6 Tage alte Weibchen wurden in PBS entnommen.

Die Sonden wurden in PBS auf eine Endkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  verdünnt. Das Gewebe wurde in einer Glasschale für 1 h bei Raumtemperatur in der Färbelösung inkubiert und anschließend in der Färbelösung auf einen Objektträger eingebettet. Die Proben wurden umgehend am Mikroskop analysiert.

## 5.8 Viabilitätstest

Vero Zellen wurden in 96 Loch Platten (Thermo Fisher Scientific™ Nunc™ F96 MicroWell™, schwarz) ausgesät. Pro Loch befanden sich ca. 10000 Zellen in 100  $\mu\text{L}$  Zellwachstumsmedium (DMEM + 10 % FBS). Nach einer Ruhezeit von 24 h wurden die DNA-Sonden in 100  $\mu\text{L}$  Zellwachstumsmedium verdünnt und zu den Zellen pipettiert (Endkonzentration: 0,01 – 10  $\mu\text{M}$ ). Nach 1 h, 6 h bzw. 24 h Inkubationszeit bei 37 °C wurden 100  $\mu\text{L}$  CellTiter-Glo® 2.0 (Promega, Madison, USA) zu den Zellen gegeben. Die Lösung wurde 2 Minuten auf einem Schüttler gemischt, um die Zellyse zu induzieren. Die Lösung mit dem Zellysat wurde weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend das Lumineszenz-Signal an einem Centro LB 963 Luminometer (Berthold Technologies GmbH & Co.KG, Bad Wildbad, Deutschland) gemessen.

## 5.9 Bestimmung der optischen Auflösung mit der STED-Mikroskopie bei 565pR

Das Kernporenprotein 98 (NUP98; engl. *nuclear porin 98*) in Vero Zellen wurde durch indirekte Immun-Färbung mit dem Farbstoff 565pR an einem Sekundärantikörper markiert. Die NUP98-Struktur wurde an einem STED-Mikroskop *FACILITY line* (Abberior Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) abgebildet. Ein 561 nm Anregungslaser (2,8  $\mu\text{W}$ , gemessen in der Fokusebene) und ein 775 nm STED-Laser (60 mW, gemessen in der Fokusebene)

wurden genutzt. Der Durchmesser des markierten Kernporenkomplexes (Halbwertsbreite; FWHM, engl. *full width at half maximum*) wurde mithilfe von Linienprofilen bestimmt ( $N > 300$ ).

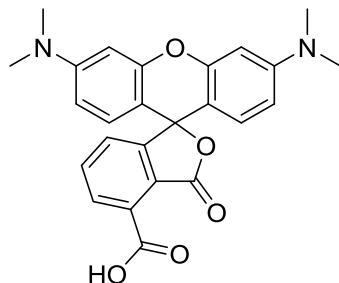
## 5.10 Allgemeine Bemerkungen zur chemischen Synthese

Sauerstoffempfindliche Reaktionen wurden unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Wenn die Reaktionen über ein Ölbad erhitzt wurden, sind die Temperaturen des Ölbad angegeben. Das Entfernen von organischen Lösungsmitteln wurde unter Vacuum an einem Rotationsverdampfer (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) durchgeführt. Die Temperatur des Wasserbads wurde bei maximal 40 °C gehalten. Die Trocknung von Substanzen in wässriger Lösung geschah über eine Gefriertrocknungsanlage (Christ GmbH, Osterode, Deutschland). Die chromatographische Auftrennung wurde über Säulenchromatographie durchgeführt. Als stationäre Phase wurde Kieselgel (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA) verwendet. Für analytische Dünnschichtchromatographie (DC) wurden DC-Platten mit Kieselgel 60, F<sub>254</sub> (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA) verwendet. Die Laufhöhe der Substanzen wurden über eine UV-Lampe ( $\lambda = 254$  and 365 nm) visualisiert oder nach der Entwicklung mit Phosphormolybdänsäure entwickelt. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} and <sup>19</sup>F NMR Spektren wurden bei 25 °C und 75 °C an einem *Agilent 400-MR* (Agilent, Santa Clara, CA, USA), *Avance NEO 600 MHz* (Bruker GmbH, Mannheim, Deutschland) und *Avance III HD 500 MHz* (Bruker GmbH, Mannheim, Deutschland) Instrument aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen wurden in Teile pro Million (ppm, engl. *parts per million*) angegeben, unter Verwendung des/der Lösungsmittelpeaks als Referenz. Die Signale wurden wie folgt beschrieben: s = Singulett, d = Duplett, t = Triplet, q = Quartett, m = Multiplet. Die Kopplungskonstante *J* wurde in Hz angegeben. Massenspektren wurden über Elektronenspray-Ionisation (ESI-MS) an einem *expression CMS Spektrometer* (Advion, Ithaca, NY, USA)

aufgenommen. Hochaufgelöste Massenspektren (HR-MS, engl. *high-resolution MS*) wurden an einem *MICROTOF Spektrometer* (Bruker, Mannheim, Deutschland) mit einer Apollo-Ionen Quelle und über Direktinjektion gemessen. Weiterhin wurden hochaufgelöste Massenspektren an einem *maXis Spektrometer* (Bruker, Mannheim, Deutschland) aufgenommen. Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, engl. *high performance liquid chromatography*) wurden an einem *1260 Infinty System* (Agilent, Santa Clara, CA, USA) mit einer 250 x 4,6 mm C18 Säule (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Deutschland) durchgeführt. Für die Semi-Präparative HPLC wurde eine 250 x 9,6 mm C18 Säule mit einer Partikelgröße von 5 µm (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Deutschland) verwendet. Das Laufmittel setzte sich aus den Lösungen A: H<sub>2</sub>O + 0,05 % v/v TFA und B: ACN + 0,05 % v/v TFA zusammen. Kommerzielle Reagenzien wurden von bekannten Herstellern bezogen und wie erhalten verwendet.

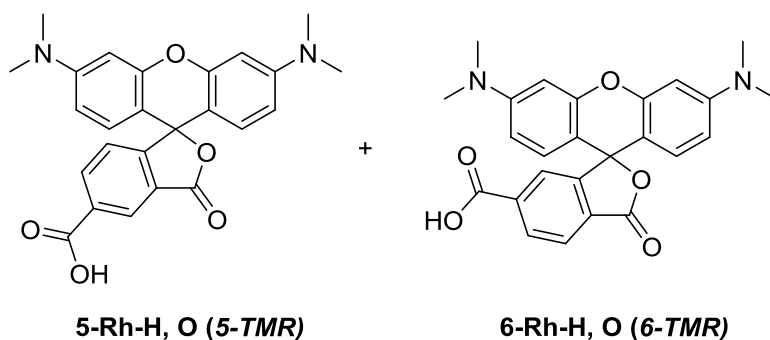
## 5.11 Synthesen der TMR-Derivate

### Verbindungen 4-Rh, O (4-TMR)



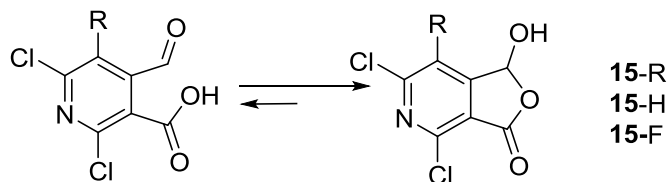
Synthese wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt.<sup>40</sup>

### Verbindungen 5-Rh-H, O (5-TMR) und 6-Rh-H, O (6-TMR)



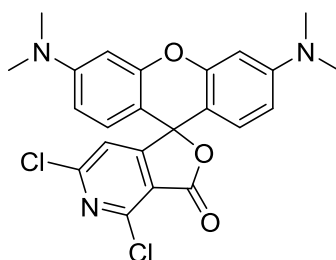
Synthese wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt.<sup>78</sup>

### 4-Formyl-2,6-dichlornicotinsäure (15-H) and 5-fluoro-4-formyl-2,6 dichlornicotinsäure (15-F)



Synthese wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt.<sup>79</sup>

### Verbindung 17-H



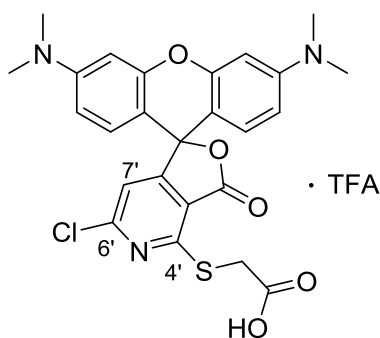
3-(*N,N*-dimethylamino)phenol (471 mg, 3,45 mmol, 2,5 äquival.) und Verbindung **15-H** (300 mg, 1,38 mmol, 1 äquival.) wurden in 1,2-Dichlorbenzol (5 ml) gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei 160 °C gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf Raumtemperatur gekühlt und mit Kiesegel versetzt. Das Gemisch wurde auf eine mit Kiesegel (50 g) vorgepackte Säule überführt und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (ACN/Wasser: 9:1 → 7:1 → 5:1). Die Fraktionen, die das Produkt enthielten wurden vereinigt und Acetonitril teilweise unter vermindertem Druck evaporiert. Die anschließende Gefriertrocknung lieferte 208 mg (33 %) des Produktes **17-H** als violettes Pulver. Das Produkt war mit dem Analog mit drei Methyl Gruppen verunreinigt. Die reine Verbindung **17-H** wurde über semi-präparative HPLC erhalten (3 ml/min, 20 – 50 % ACN in 25 min).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO, 75 °C) δ (ppm): 7,67 (s, 1 H), 7,05 (d, *J* = 9,2 Hz, 2 H), 6,81 (m, 2 H), 6,73 (d, *J* = 2,5 Hz, 2 H), 3,14 (s, 12 H);

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO, 75 °C) δ (ppm): 164,4 (C<sub>q</sub>), 158,3 (C<sub>q</sub>), 155,3 (C<sub>q</sub>), 154,9 (C<sub>q</sub>), 146,3 (C<sub>q</sub>), 130,4 (CH), 122,1 (CH), 112,4 (CH), 97,7 (CH), 40,6 (NCH<sub>3</sub>);

HRMS (C<sub>23</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>): *m/z* (positiver Modus) = 456,0869 (gefunden ([M+H]<sup>+</sup>), 456,0876 (berechnet [M+H]<sup>+</sup>).

### Verbindung 18-H (565pR)



Zu einer Lösung aus Verbindung **17-H** (10 mg, 22,0  $\mu\text{mol}$ , 1 äquival.) in trockenem DMF (200  $\mu\text{L}$ ) wurden  $\text{Et}_3\text{N}$  (6,0  $\mu\text{L}$ , 44,0  $\mu\text{mol}$ , 2 äquival.) und Thioglycolsäure (1,5  $\mu\text{L}$ ,  $M = 92$ ,  $d = 1,3$ , 22,0  $\mu\text{mol}$ , 1 äquival.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur 1 h gerührt. Der Verlauf der Reaktion wurde über die HPLC kontrolliert. DMF wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand über die semi-präparative HPLC (3 ml/min, 30 – 70 % ACN in 20 Minuten) aufgereinigt. Die Fraktionen mit dem Produkt wurden gefriergetrocknet und 9,1 mg (66 %) des Farbstoffs **18-H** (565pR) als dunkles magentafarbenes Pulver erhalten.

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ , 75 °C)  $\delta$  (ppm): 7,21 (s, 1 H), 6,88 (br. d,  $J = 9,1$  Hz, 2 H), 6,74 (br. d,  $J = 9,1$  Hz, 2 H), 6,66 (br. s, 2 H), 4,09 (s, 2 H), 3,08 (s, 12 H);

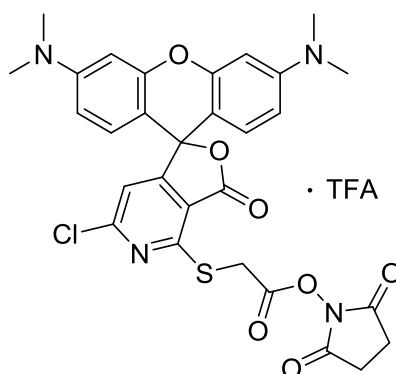
$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ , 75 °C)  $\delta$  (ppm): 169,0 ( $\text{C}_q$ ), 165,1 ( $\text{C}_q$ ), 159,4 ( $\text{C}_q$ ), 153,8 ( $\text{C}_q$ ), 153,4 ( $\text{C}_q$ ), 152,8 ( $\text{C}_q$ ), 128,8 (CH), 116,1 (CH), 111,0 (CH), 106,7 ( $\text{C}_q$ ), 97,2 (CH), 39,7 ( $\text{NCH}_3$ ), 32,0 ( $\text{CH}_2\text{S}$ );

$^{19}\text{F-NMR}$  (376 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ , 75 °C)  $\delta$  (ppm): -74,1 (TFA) ppm;

HRMS ( $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}$ ):  $m/z$  (positive Modus) = 512,1048 (gefunden ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 512,1041 (berechnet  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).



**Verbindung 565pR-NHS Ester**

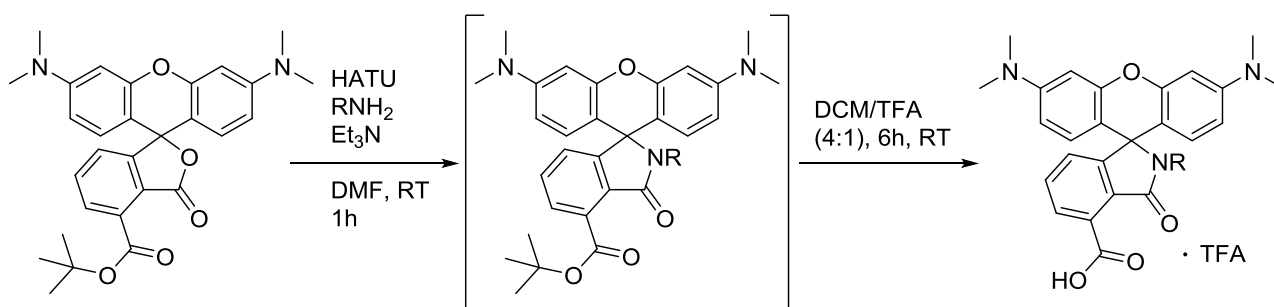


Zu einer Lösung aus 565pR (1,0 mg, 2,0  $\mu\text{mol}$ , 1 äquival.) in DMF (100  $\mu\text{L}$ ) wurden TSTU (0,9 mg, 3,0  $\mu\text{mol}$ , 1,5 äquival.) und Et<sub>3</sub>N (1,0  $\mu\text{L}$ , 7,2  $\mu\text{mol}$ , 3,7 äquival.) zugegeben. Die Reaktion wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in ACN/H<sub>2</sub>O (3:7) gelöst und an der semi-präparativen HPLC aufgereinigt. Die Fraktionen mit dem Produkt wurden lyophilisiert und 0,9 mg (76 %) 565pR-NHS Ester als pinkes Pulver erhalten.

HRMS: (C<sub>29</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S):  $m/z$  (positiver Modus) = 609.1199 (gefunden [M+H]<sup>+</sup>), 609.1205 (berechnet [M+H]<sup>+</sup>).

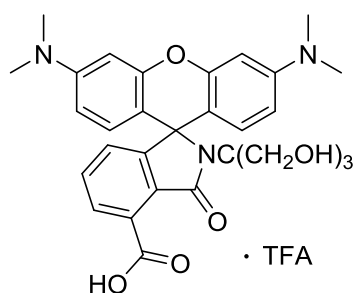
## 5.12 Synthese der TMR-Spirolaktam-Derivate

### *Generelle Synthese für die Verbindungen 4-Rh-H, NR*



Zu einer Lösung aus **4-Rh-*t*Bu, O**<sup>40</sup> (1 äquival.) in DMF (100 µL) wurde HATU (1,5 äquival.) zugegeben. Die Lösung färbte sich stark rot. Eine Lösung aus primärem Amin (2 äquival.) und Et<sub>3</sub>N (10 äquival.) in DMF (100 µL) wurde zu dem Reaktionsgemisch gegeben und zusammen bei Raumtemperatur eine Stunde gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde mithilfe der analytischen LC-MS kontrolliert. Nachdem die Reaktion abgeschlossen war, wurde das DMF unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand an der semi-präparativen HPLC aufgereinigt. Die Fraktionen mit dem Zwischenprodukt wurde lyophilisiert. Das erhaltene pinkfarbene Pulver wurde in einer Lösung aus DCM/TFA (4:1; 125 µL) aufgenommen und die Lösung 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden DCM und TFA über einen Stickstoffstrom verblasen. Der Rückstand wurde in einer Lösung aus H<sub>2</sub>O/ACN (1:1) gelöst und gefriergetrocknet. Die Fraktionen mit dem Produkt wurden lyophilisiert und ein pinkes Pulver erhalten.

**Verbindung 4-Rh-H, N1 (4-TMR Tris)**



Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **4-Rh-tBu, O** (15,0 mg, 30,9  $\mu\text{mol}$ ) durchgeführt.

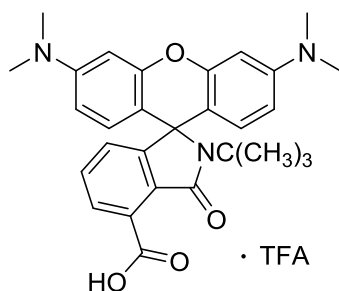
Die analytische LC-MS zeigte die Ausbildung eines Phthalimids als Hauptpeak. Daher wurde der Rückstand in einer 1 M KOH-Lösung (100  $\mu\text{L}$ ) aufgenommen, nach 5 Minuten bei Raumtemperatur neutralisiert und über die semi-präparative HPLC (3 ml/min; 10 – 70 % ACN in 20 Minuten) gereinigt. Die Fraktionen mit dem Produkt wurden lyophilisiert. Es wurden 4,3 mg (26 %) des Produkts **4-Rh-H, N1** als pinkfarbenes Pulver erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO)  $\delta$  8.08 (dd,  $J = 7.7, 1.0$  Hz, 1H), 7.59 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 6.97 (dd,  $J = 7.7, 1.0$  Hz, 1H), 6.75 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 6.39 (d,  $J = 2.6$  Hz, 2H), 6.33 (dd,  $J = 9.0, 2.6$  Hz, 2H), 4.34 (bs, 3H), 3.64 (d,  $J = 3.7$  Hz, 6H), 2.91 (s, 12H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO)  $\delta$  171.5, 165.4, 157.3, 151.6, 151.5, 133.8, 132.3, 130.5, 128.4, 128.2, 126.4, 119.3, 116.3, 108.5, 106.2, 98.5, 70.5, 67.8, 59.0

HRMS (C<sub>29</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>):  $m/z$  (positiver Modus) = 534,2238 (gefunden [M+H]<sup>+</sup>), 534,2235 (berechnet [M+H]<sup>+</sup>).

**Verbindung 4-Rh-H, N5 (4-TMR tBu)**

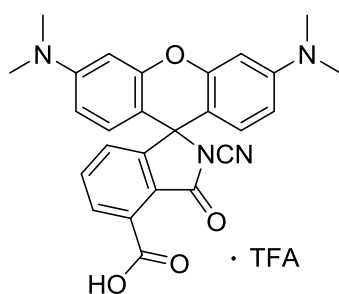


Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **4-Rh-tBu, O** (5,0 mg, 10,3  $\mu\text{mol}$ ) durchgeföhrt. Es wurden 3,8 mg (76 %) des Produkts **4-Rh-H, N5** als pinkfarbenes Pulver erhalten.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )  $\delta$  8.14 (dd,  $J = 7.8, 1.3$  Hz, 1H), 7.73 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.64 – 7.58 (m, 2H), 7.22 (d,  $J = 9.5$  Hz, 2H), 7.04 (dd,  $J = 9.5, 2.4$  Hz, 2H), 6.95 (d,  $J = 2.4$  Hz, 2H), 3.28 (s, 12H), 0.81 (s, 9H).

HRMS ( $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4$ ):  $m/z$  (positiver Modus) = 486,2395 (gefunden  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 486,2387 (berechnet  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).

**Verbindung 4-Rh-H, N7 (4-TMR CN)**

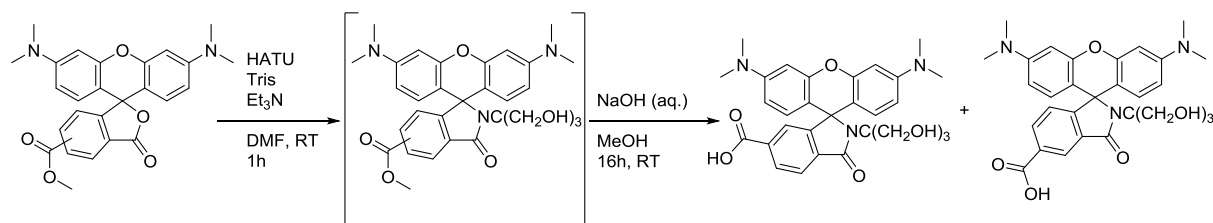


Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **4-Rh-tBu, O** (3,2 mg, 6,7  $\mu\text{mol}$ ) durchgeföhrt. Es wurden 2,0 mg (67 %) des Produkts **4-Rh-H, N7** als pinkfarbenes Pulver erhalten.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )  $\delta$  7.88 – 7.75 (m, 2H), 7.26 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1H), 6.65 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.58 – 6.46 (m, 4H), 2.96 (s, 12H).

HRMS (C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>): *m/z* (positiver Modus) = 455,1711 (gefunden [M+H]<sup>+</sup>), 455,1714 (berechnet [M+H]<sup>+</sup>), 477,1520 (gefunden [M+N]<sup>+</sup>), 477,1533 (berechnet [M+N]<sup>+</sup>).

**Verbindung 5-Rh-H, N1 (5-TMR Tris) und 6-Rh-H, N1 (6-TMR Tris)**



Zu einem Isomeren-Gemisch aus **5-Rh-Me, O** und **6-Rh-Me, O**<sup>78</sup> (100 mg, 0,23 mmol, 1 äquival.) in DMF (2 ml) wurde HATU (171 mg, 0,45 mmol, 2 äquival.) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus Tris (142 mg, 0,90 mmol, 4 äquival.) und Et<sub>3</sub>N 249 µL, 1,80 mmol, 8 äquival.) in DMF (2 ml) zu dem Reaktionsgemisch gegeben und die Lösung eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. DMF wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde auf Kieselgel gezogen und auf eine vorgepackte Glassäule (Ø = 3,5 cm) mit Kieselgel (150 g) überführt. Die säulenchromatographische Aufreinigung (Laufmittel: ACN/H<sub>2</sub>O; 0 – 20 % H<sub>2</sub>O) lieferte ein Isomeren-Gemisch des Zwischenproduktes. Nachdem Acetonitril teilweise am Rotationsverdampfer entfernt wurde, wurde die Lösung lyophilisiert. Das erhaltene pinkfarbene Pulver wurde in MeOH (6 ml) gelöst und mit einer 2 M NaOH Lösung (1,1 ml) verdünnt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Neutralisierung mit TFA (165 µL) wurde Kieselgel zu der Lösung gegeben und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Substanz wurde auf eine vorgepackte Glassäule (Ø = 3,5 cm) mit Kieselgel (150 g) überführt und die Produkte als Isomerengemisch säulenchromatographisch vorgereinigt. Die Regioisomeren wurden an der semi-präparativen HPLC (3 ml/min; 30 – 100 % ACN in 20 Minuten) getrennt. Nach Lyophilisierung der

Produkte wurden 48 mg (40 %) **5-Rh-H, N1** und 23 mg (20 %) **6-Rh-H, N1** als pinkefarbenes Pulver erhalten.

### **5-Rh-H, N1**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )  $\delta$  8.40 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H), 8.25 (dd,  $J = 7.9, 1.7$  Hz, 1H), 7.58 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.17 (d,  $J = 9.5$  Hz, 2H), 7.05 (dd,  $J = 9.5, 2.5$  Hz, 2H), 6.94 (d,  $J = 2.4$  Hz, 2H), 3.34 (s, 6H), 3.28 (s, 12H), 2.91 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )  $\delta$  167.2, 166.9, 157.3, 157.2, 157.1, 151.4, 151.3, 138.4, 135.2, 132.5, 131.6, 131.1, 131.0, 129.4, 114.9, 113.3, 96.6, 63.3, 60.3, 41.0.

HRMS ( $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_7$ ):  $m/z$  (positiver Modus) = 534,2235 (gefunden  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 534,2235 (berechnet  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).

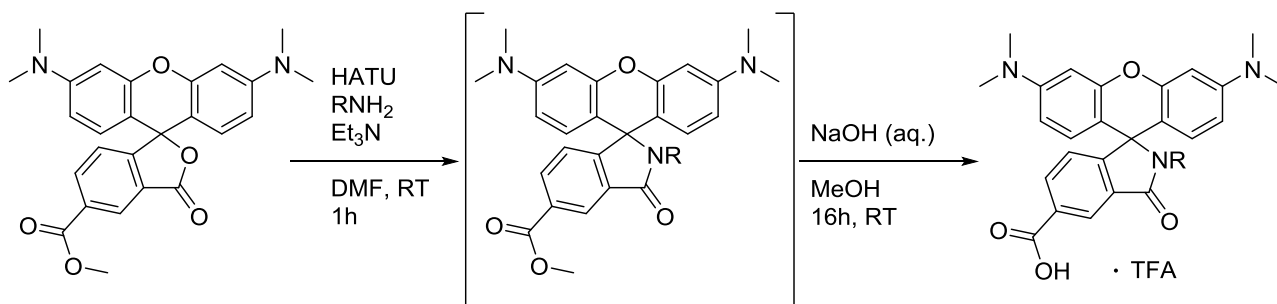
### **6-Rh-H, N1**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )  $\delta$  8.28 (dd,  $J = 8.1, 1.7$  Hz, 1H), 8.00 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.92 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7.18 (d,  $J = 9.5$  Hz, 2H), 7.06 (dd,  $J = 9.5, 2.5$  Hz, 2H), 6.95 (d,  $J = 2.4$  Hz, 2H), 3.33 (s, 6H), 3.28 (s, 12H), 2.91 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )  $\delta$  167.2, 166.6, 157.3, 156.9, 151.4, 141.5, 132.7, 131.6, 131.3, 131.2, 129.3, 114.8, 113.6, 107.6, 96.6, 63.3, 60.3, 41.0.

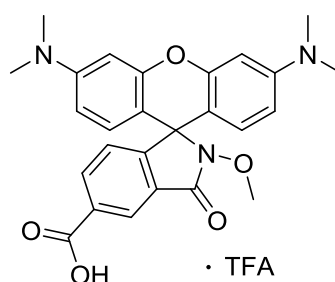
HRMS ( $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_7$ ):  $m/z$  (positiver Modus) = 534,2234 (gefunden  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 534,2235 (berechnet  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).

### **Generelle Synthese für die Verbindungen 5-Rh-H, NR**



Zu einer Lösung aus **5-Rh-Me, O** (1 äquival.) in DMF (100 µL) wurde HATU (1,5 äquival.) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das primäre Amin (1,5 äquival.) und Et<sub>3</sub>N (2,0 äquival.) wurden in DMF (50 µL) gelöst und zu dem Reaktionsgemisch pipettiert. Die Lösung wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und DMF anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in einer Lösung aus ACN/H<sub>2</sub>O (3:7) gelöst und über die semi-präparative HPLC (3 ml/min; 30 – 100 % ACN in 20 Minuten) aufgereinigt. Die Fraktionen mit dem Zwischenprodukt wurden lyophilisiert. Das pinkfarbene Pulver wurde in MeOH (6 ml) gelöst und mit einer 2 M NaOH Lösung (1,1 ml) verdünnt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit TFA (165 µL) neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Das Wasserbad hatte eine Temperatur von 25 °C. Der Rückstand wurde in einer Lösung aus ACN/H<sub>2</sub>O (3:7) gelöst und über die semi-präparative HPLC (3 ml/min; 30 – 100 % ACN in 20 Minuten) gereinigt. Die Fraktionen mit dem Produkt wurden lyophilisiert und ein pinkfarbendes Pulver erhalten.

**Verbindung 5-Rh-H, N2 (5-TMR OMe)**

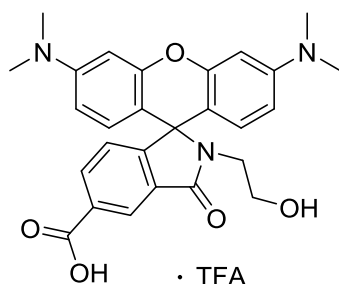


Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **5-Rh-Me, O** (10,0 mg, 22,5 µmol) durchgeführt. Es wurden 4,0 mg (39 %) des Produkts **5-Rh-H, N2** als pinkfarbendes Pulver erhalten.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )  $\delta$  8.28 (dd,  $J = 1.6, 0.7$  Hz, 1H), 8.13 (dd,  $J = 8.0, 1.6$  Hz, 1H), 7.15 (dd,  $J = 8.0, 0.7$  Hz, 1H), 6.53 – 6.43 (m, 6H), 3.46 (s, 3H), 2.92 (s, 12H).

HRMS ( $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_5$ ):  $m/z$  (positive Modus) = 460,1855 (gefunden  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 460,1867 (berechnet  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 482,1676 (gefunden  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ), 482,1686 (berechnet  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ).

**Verbindung 5-Rh-H, N3 (5-TMR MH)**



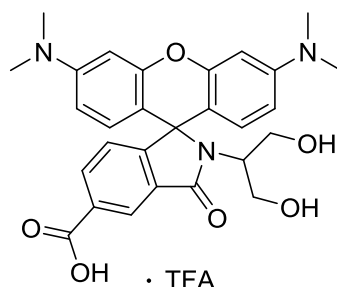
Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **5-Rh-Me, O** (10,0 mg, 22,5  $\mu\text{mol}$ ) durchgeföhrt. Es wurden 2,8 mg (21 %) des Produkts **5-Rh-H, N3** als pinkfarbenes Pulver erhalten.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )  $\delta$  8.25 (dd,  $J = 1.6, 0.7$  Hz, 1H), 8.07 (dd,  $J = 8.0, 1.6$  Hz, 1H), 7.10 (dd,  $J = 8.0, 0.7$  Hz, 1H), 6.49 – 6.34 (m, 6H), 3.27 (s, 2H), 3.08 – 2.94 (m, 4H), 2.92 (s, 12H).

HRMS ( $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_5$ ):  $m/z$  (positive Modus) = 474,2026 (gefunden  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 474,2023 (berechnet  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 496,1846 (gefunden  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ), 496,1843 (berechnet  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ).



**Verbindung 5-Rh-H, N4 (5-TMR DH)**

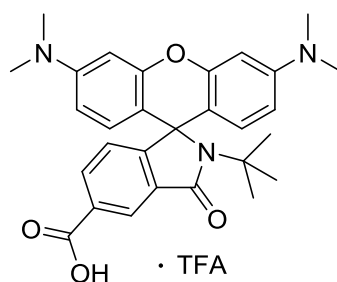


Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **5-Rh-Me, O** (10,0 mg, 22,5  $\mu\text{mol}$ ) durchgeföhrt. Es wurden 2,2 mg (20 %) des Produkts **5-Rh-H, N4** als pinkfarbenes Pulver erhalten.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )  $\delta$  8.50 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 8.39 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 8.25 (dd,  $J = 7.9, 1.7$  Hz, 1H), 7.13 (d,  $J = 9.6$  Hz, 2H), 7.05 (dd,  $J = 9.5, 2.4$  Hz, 2H), 6.95 (d,  $J = 2.4$  Hz, 2H), 4.57 (bs, 2H), 3.28 (s, 12H).

HRMS ( $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_6$ ):  $m/z$  (positive Modus) = 504,2134 (gefunden  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 504,2129 (berechnet  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 526,1949 (gefunden  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ), 526,1949 (berechnet  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ).

**Verbindung 5-Rh-H, N5 (5-TMR tBu)**

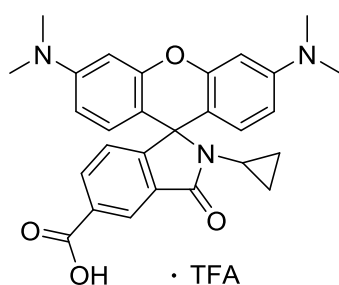


Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **5-Rh-Me, O** (10,0 mg, 22,5  $\mu\text{mol}$ ) durchgeföhrt. Es wurden 5,4 mg (50 %) des Produkts **5-Rh-H, N5** als pinkfarbenes Pulver erhalten.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )  $\delta$  8.28 – 8.06 (m, 2H), 7.94 – 7.85 (m, 1H), 7.21 (d,  $J = 9.5$  Hz, 2H), 7.07 (dd,  $J = 9.5, 2.5$  Hz, 2H), 6.96 (d,  $J = 2.4$  Hz, 2H), 3.28 (s, 12H), 1.02 (d,  $J = 5.1$  Hz, 9H).

HRMS ( $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4$ ):  $m/z$  (positive Modus) = 486,2381 (gefunden  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 486,2387 (berechnet  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 508,2192 (gefunden  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ), 508,2207 (berechnet  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ).

**Verbindung 5-Rh-H, N6 (5-TMR CP)**

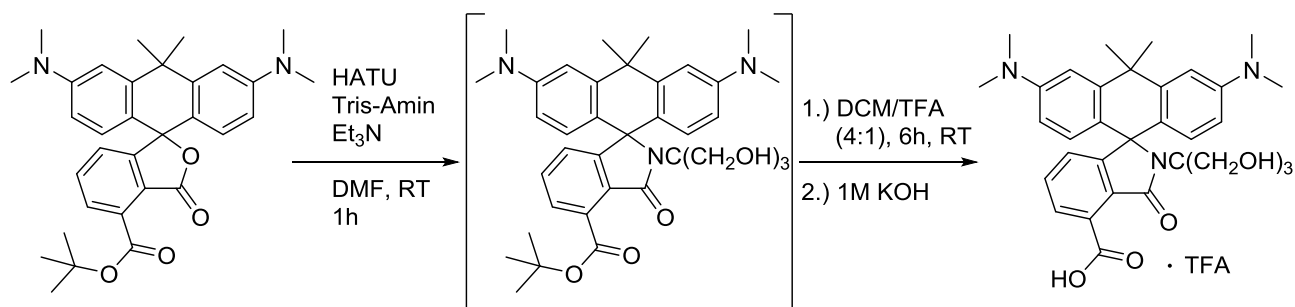


Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **5-Rh-Me, O** (10,0 mg, 22,5  $\mu\text{mol}$ ) durchgeföhrt. Es wurden 2,4 mg (23 %) des Produkts **5-Rh-H, N6** als pinkfarbenes Pulver erhalten.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ )  $\delta$  8.23 (dd,  $J = 1.6, 0.7$  Hz, 1H), 8.06 (dd,  $J = 8.0, 1.6$  Hz, 1H), 7.09 – 7.04 (m, 2H), 6.48 – 6.34 (m, 6H), 2.92 (s, 12H), 2.05 – 1.99 (m, 1H), 0.43 – 0.36 (m, 2H), 0.34 – 0.27 (m, 2H).

HRMS ( $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4$ ):  $m/z$  (positive Modus) = 470,2071 (gefunden  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 470,2074 (berechnet  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 492,1882 (gefunden  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ), 492,1894 (berechnet  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ).

### 5.13 Synthese des Carbopyronin-Spirolaktams **4-CP-H, N1** (4-610CP Tris)



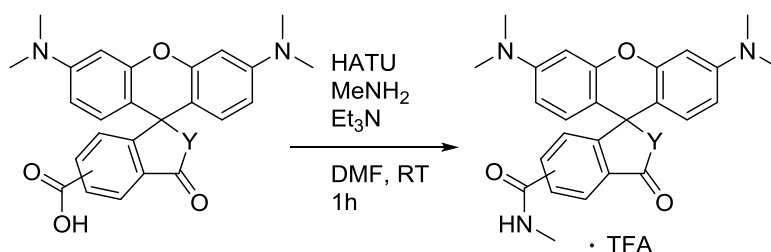
Zu einer Lösung aus **4-CP-*t*Bu, O<sup>40</sup>** (5,0 mg, 9,8  $\mu$ mol, 1,0 äquival.) in DMF (100  $\mu$ L) wurde HATU (5,6 mg, 14,6  $\mu$ mol, 1,5 äquival.) zugegeben. Die Lösung färbte sich stark blau. Eine Lösung aus Tris-Amin (2,4 mg, 19,6  $\mu$ mol, 2,0 äquival.) und Et<sub>3</sub>N (9,9 mg, 98,0  $\mu$ mol, 10 äquival.) in DMF (100  $\mu$ L) wurde zu dem Reaktionsgemisch gegeben und bei Raumtemperatur eine Stunde gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde mithilfe der analytischen LC-MS kontrolliert. Nachdem die Reaktion abgeschlossen war, wurde das DMF unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand an der semi-präparativen HPLC aufgereinigt. Die Fraktionen mit dem Zwischenprodukt wurde lyophilisiert. Das erhaltene blaufarbene Pulver wurde in einer Lösung aus DCM/TFA (4:1; 125  $\mu$ L) aufgenommen und die Lösung 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden DCM und TFA über einen Stickstoffstrom verblasen. Der Rückstand wurde in einer Lösung aus H<sub>2</sub>O/ACN (1:1) gelöst und gefriergetrocknet. Es wurden 0,5 mg (10 %) eines dunkel blauen Pulvers erhalten.

HRMS (C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>): *m/z* (positive Modus) = 560,2761 (gefunden [M+H]<sup>+</sup>), 560,2755 (berechnet [M+H]<sup>+</sup>).

## 5.14 Synthese der TMR Modelsonden mit Methylamid als Pseudoligand

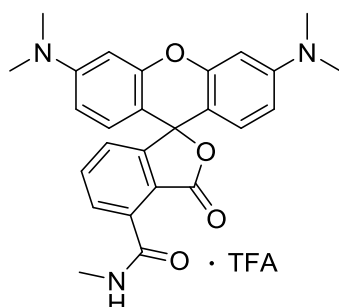
*Generelle Synthese für die Verbindungen 4-Rh-MA, Y, 5-Rh-MA, Y und 6-Rh-MA, Y*

*(Y = O, NC(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>)*



Zu einer Lösung aus dem Rhodamin-Derivat (1 äquival.) in DMF (100 µL) wurde HATU (1,5 äquival.) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Methylamin (2 äquival.; 40 % w/w in H<sub>2</sub>O) und Et<sub>3</sub>N (4,0 äquival.) wurden in DMF (50 µL) verdünnt und zu dem Reaktionsgemisch pipettiert. Die Lösung wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und DMF anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in einer Lösung aus ACN/H<sub>2</sub>O (3:7) gelöst und über die semi-präparative HPLC (3 ml/min; 30 – 100 % ACN in 20 Minuten) aufgereinigt. Die Fraktionen mit dem Produkt wurden lyophilisiert und ein pinkfarbenes Pulver erhalten.

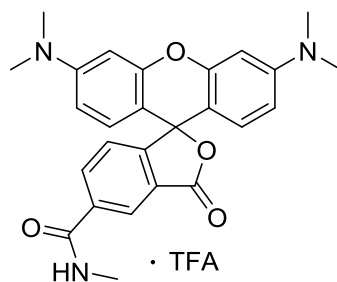
*Verbindung 4-Rh-MA, O (4-TMR MA)*



Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **5-Rh, O** (5,0 mg, 11,6 µmol) durchgeführt. Es wurden 2,6 mg (51 %) der Verbindung **5-Rh-MA, O** als pinkfarbenes Pulver erhalten.

HRMS (C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>): *m/z* (positiver Modus) = 444,1915 (gefunden [M+H]<sup>+</sup>), 444,1918 (berechnet [M+H]<sup>+</sup>).

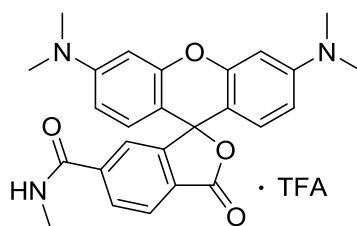
**Verbindung 5-Rh-MA, O (5-TMR MA)**



Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **5-Rh, O** (3,3 mg, 7,7 μmol) durchgeführt. Es wurden 1,3 mg (38 %) der Verbindung **5-Rh-MA, O** als pinkfarbenes Pulver erhalten.

HRMS (C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>): *m/z* (positiver Modus) = 444,1918 (gefunden [M+H]<sup>+</sup>), 444,1918 (berechnet [M+H]<sup>+</sup>).

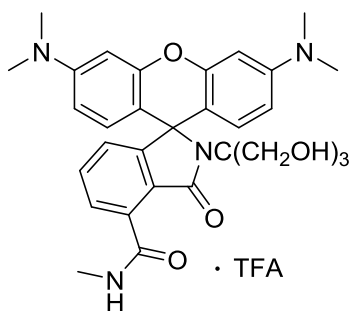
**Verbindung 6-Rh-MA, O (6-TMR MA)**



Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **6-Rh, O** (3,0 mg, 7,0 μmol) durchgeführt. Es wurden 1,5 mg (48 %) der Verbindung **5-Rh-MA, O** als pinkfarbenes Pulver erhalten.

HRMS (C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>): *m/z* (positiver Modus) = 444,1918 (gefunden [M+H]<sup>+</sup>), 444,1918 (berechnet [M+H]<sup>+</sup>).

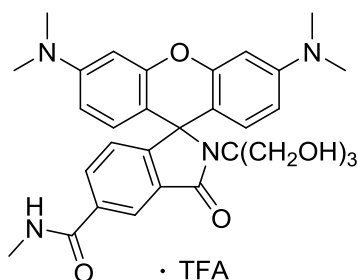
**Verbindung 4-Rh-MA, N1 (4-TMR Tris MA)**



Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **4-Rh, N1** (5,0 mg, 9,4  $\mu$ mol) durchgeführt. Es wurden 1,0 mg (19 %) der Verbindung **5-Rh-MA, N1** als pinkfarbenes Pulver erhalten.

HRMS (C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>):  $m/z$  (positiver Modus) = 547,2544 (gefunden [M+H]<sup>+</sup>), 547,2551 (berechnet [M+H]<sup>+</sup>).

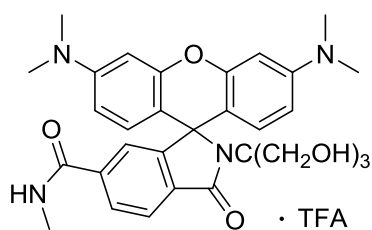
**Verbindung 5-Rh-MA, N1 (5-TMR Tris MA)**



Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **5-Rh, N1** (5,0 mg, 9,4  $\mu$ mol) durchgeführt. Es wurden 1,2 mg (24 %) der Verbindung **5-Rh-MA, N1** als pinkfarbenes Pulver erhalten.

HRMS (C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>):  $m/z$  (positiver Modus) = 547,2542 (gefunden [M+H]<sup>+</sup>), 547,2551 (berechnet [M+H]<sup>+</sup>).

**Verbindung 6-Rh-MA, N1 (6-TMR Tris MA)**

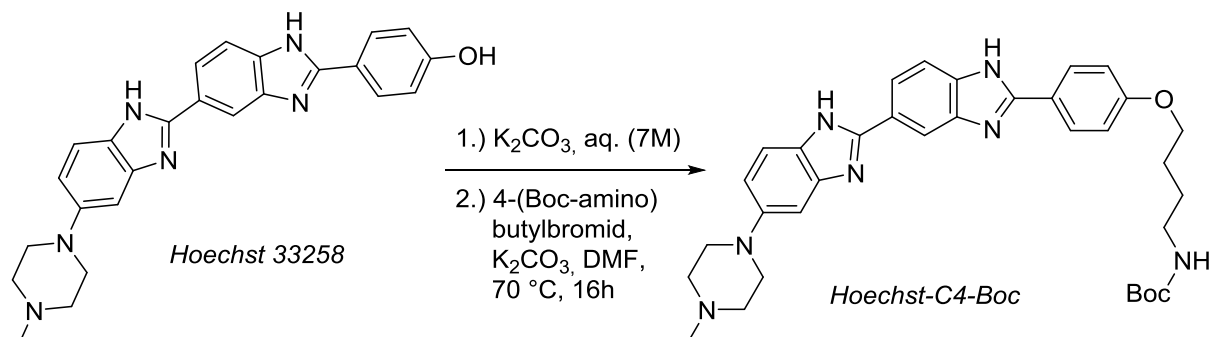


Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **6-Rh, N1** (5,0 mg, 9,4  $\mu$ mol) durchgeführt. Es wurden 1,2 mg (23 %) der Verbindung **6-Rh-MA, N1** als pinkfarbenes Pulver erhalten.

HRMS (C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>):  $m/z$  (positiver Modus) = 547,2551 (gefunden [M+H]<sup>+</sup>), 547,2551 (berechnet [M+H]<sup>+</sup>).

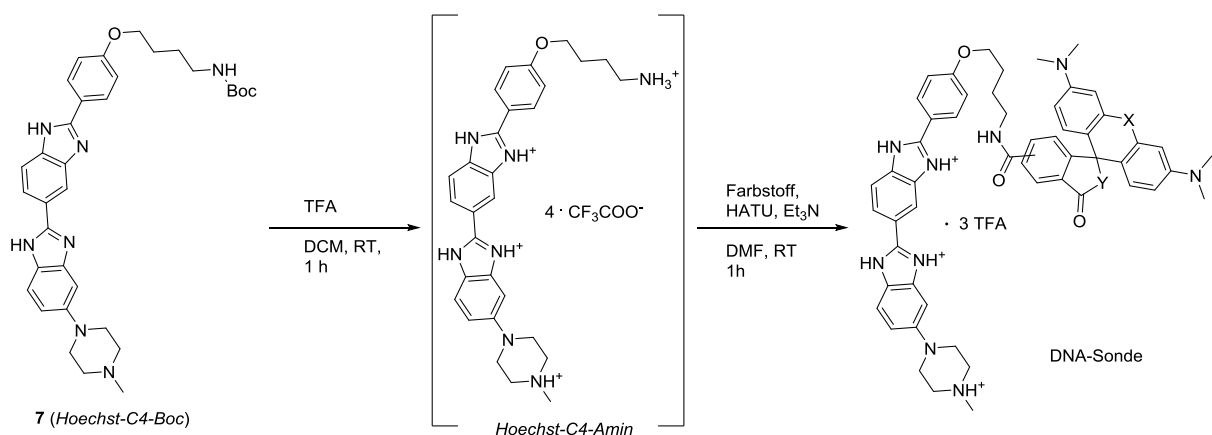
## 5.15 Synthese der DNA-Sonden

### Verbindung 7 (*Hoechst-C4-Boc*)



Die Synthese wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt.<sup>35b</sup>

### Generelle Synthese der DNA-Sonden



Zu einer Lösung aus Verbindung **7** (*Hoechst-C4-Boc*; 1,5 äquival.) in DCM (1 ml) wurde TFA (200  $\mu\text{L}$ ) langsam zugegeben. Die Lösung wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Stickstoffstrom verblasen und der Rückstand in einem Lösungsmittelgemisch aus ACN/ $H_2O$  (1:1) aufgenommen und gefriergetrocknet. Das Zwischenprodukt *Hoechst-C4-Amin* wurde als gelbliches Pulver erhalten.

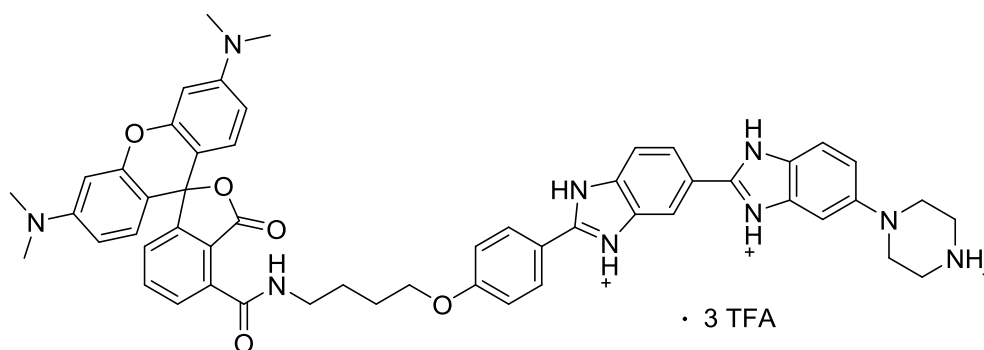
Rhodamin- oder Carbopyronin-Derivate (1 äquival.) wurden in DMF (100  $\mu\text{L}$ ) gelöst und HATU (1,5 äquival.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur



gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus *Hoechst-C4-Amin* und Et<sub>3</sub>N (6 äquival.), gelöst in DMF (50 µL), zu dem Reaktionsgemisch gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde über LC-MS kontrolliert.

DMF wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in einem Lösungsmittelgemisch aus ACN/H<sub>2</sub>O (1:9) aufgenommen. Das Produkt wurde an der semi-präparativen HPLC (3 ml/min; 10 – 70 % ACN in 20 Minuten) gereinigt. Die Fraktionen mit dem Produkt wurden lyophilisiert.

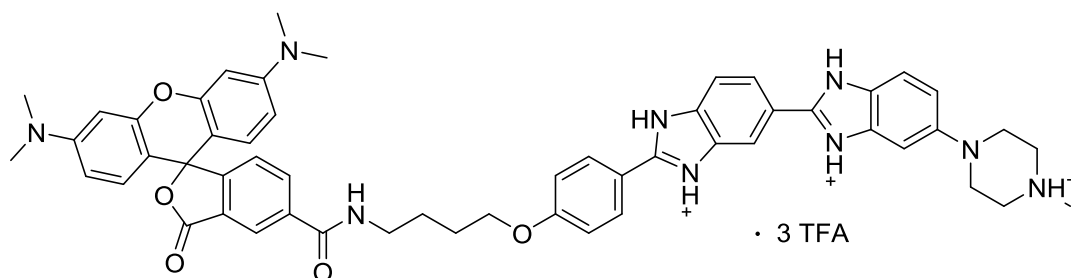
**Verbindung 4-Rh-DNA, O (4-TMR DNA)**



Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **4-Rh-H, O** (1,0 mg, 2,3 µmol) und **7** (1,7 mg, 3,5 µmol) durchgeführt. Es wurden 0,5 mg (24 %) der DNA-Sonde **4-Rh-DNA, O** als pinkfarbenes Pulver erhalten.

HRMS (C<sub>54</sub>H<sub>53</sub>N<sub>9</sub>O<sub>5</sub>): *m/z* (positiver Modus) = 908,4218 (gefunden [M+H]<sup>+</sup>), 908,4242 (berechnet [M+H]<sup>+</sup>), 454,7153 (gefunden [M+2H]<sup>2+</sup>), 454,7158 (berechnet [M+2H]<sup>2+</sup>), 303,4800 (gefunden [M+3H]<sup>3+</sup>), 303,4796 (berechnet [M+3H]<sup>3+</sup>).

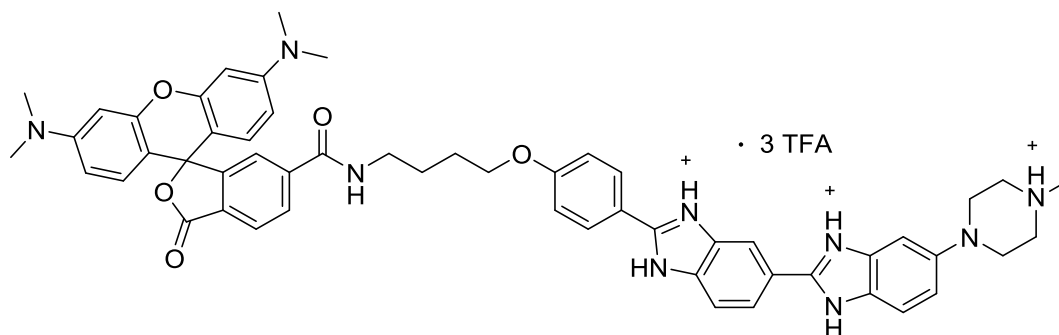
**Verbindung 5-Rh-DNA, O (5-TMR DNA)**



Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **5-Rh-H, O** (1,0 mg, 2,3  $\mu\text{mol}$ ) und **7** (1,7 mg, 3,5  $\mu\text{mol}$ ) durchgeföhrt. Es wurden 1,5 mg (71 %) der DNA-Sonde **5-Rh-DNA, O** als pinkfarbenes Pulver erhalten.

HRMS ( $\text{C}_{54}\text{H}_{53}\text{N}_9\text{O}_5$ ):  $m/z$  (positiver Modus) = 908,4230 (gefunden  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 908,4242 (berechnet  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 454,7156 (gefunden  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ), 454,7158 (berechnet  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ), 303,4798 (gefunden  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ), 303,4796 (berechnet  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ).

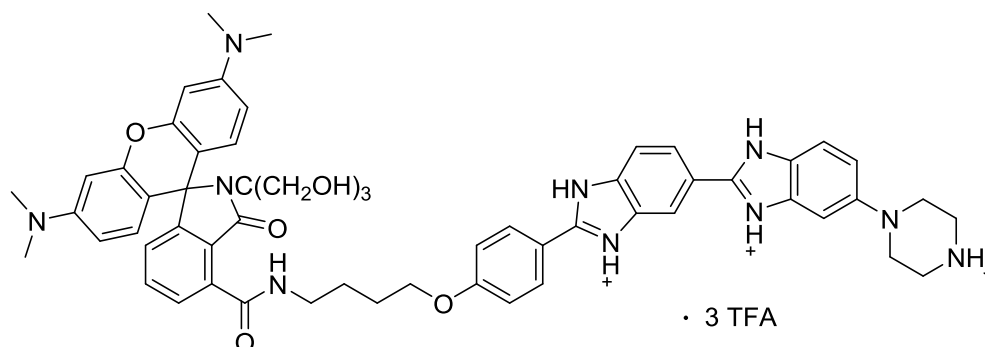
**Verbindung 6-Rh-DNA, O (6-TMR DNA)**



Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **6-Rh-H, O** (1,0 mg, 2,3  $\mu\text{mol}$ ) und **7** (1,7 mg, 3,5  $\mu\text{mol}$ ) durchgeföhrt. Es wurden 1,4 mg (66 %) der DNA-Sonde **6-Rh-DNA, O** als pinkfarbenes Pulver erhalten.

HRMS ( $\text{C}_{54}\text{H}_{53}\text{N}_9\text{O}_5$ ):  $m/z$  (positiver Modus) = 908,4226 (gefunden  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 908,4242 (berechnet  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 454,7156 (gefunden  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ), 454,7158 (berechnet  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ), 303,4799 (gefunden  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ), 303,4796 (berechnet  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ).

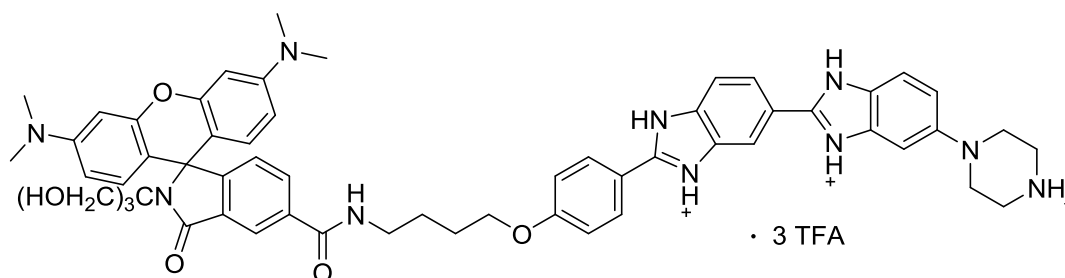
**Verbindung 4-Rh-DNA, N1 (4-TMR Tris DNA)**



Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **4-Rh-H, N1** (1,0 mg, 1,9  $\mu$ mol) und **7** (1,4 mg, 2,8  $\mu$ mol) durchgeführt. Es wurden 0,7 mg (37 %) der DNA-Sonde **4-Rh-DNA, N1** als pinkfarbenes Pulver erhalten.

HRMS (C<sub>58</sub>H<sub>62</sub>N<sub>10</sub>O<sub>7</sub>):  $m/z$  (positiver Modus) = 1011,4841 (gefunden [M+H]<sup>+</sup>), 1011,4876 (berechnet [M+H]<sup>+</sup>), 506,2466 (gefunden [M+2H]<sup>2+</sup>), 506,2474 (berechnet [M+2H]<sup>2+</sup>), 337,8343 (gefunden [M+3H]<sup>3+</sup>), 337,8340 (berechnet [M+3H]<sup>3+</sup>).

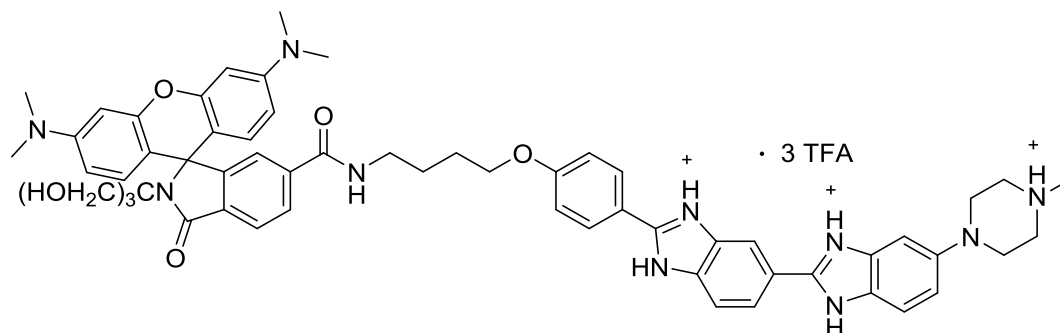
**Verbindung 5-Rh-DNA, N1 (5-TMR Tris DNA)**



Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **5-Rh-H, N1** (1,0 mg, 1,9  $\mu$ mol) und **7** (1,4 mg, 2,8  $\mu$ mol) durchgeführt. Es wurden 0,6 mg (32 %) der DNA-Sonde **5-Rh-DNA, N1** als pinkfarbenes Pulver erhalten.

HRMS (C<sub>58</sub>H<sub>62</sub>N<sub>10</sub>O<sub>7</sub>):  $m/z$  (positiver Modus) = 1011,4870 (gefunden [M+H]<sup>+</sup>), 1011,4876 (berechnet [M+H]<sup>+</sup>), 506,2474 (gefunden [M+2H]<sup>2+</sup>), 506,2474 (berechnet [M+2H]<sup>2+</sup>), 337,8348 (gefunden [M+3H]<sup>3+</sup>), 337,8340 (berechnet [M+3H]<sup>3+</sup>).

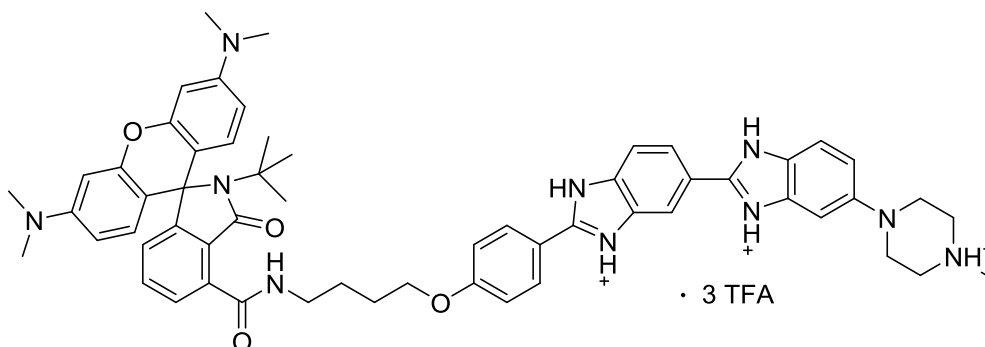
**Verbindung 6-Rh-DNA, N1 (6-TMR Tris DNA)**



Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **6-Rh-H, N1** (1,0 mg, 1,9  $\mu$ mol) und **7** (1,4 mg, 2,8  $\mu$ mol) durchgeführt. Es wurden 1,2 mg (63 %) der DNA-Sonde **6-Rh-DNA, N1** als pinkfarbenes Pulver erhalten.

HRMS (C<sub>58</sub>H<sub>62</sub>N<sub>10</sub>O<sub>7</sub>):  $m/z$  (positiver Modus) = 1011,4860 (gefunden [M+H]<sup>+</sup>), 1011,4876 (berechnet [M+H]<sup>+</sup>), 506,2472 (gefunden [M+2H]<sup>2+</sup>), 506,2474 (berechnet [M+2H]<sup>2+</sup>), 337,8342 (gefunden [M+3H]<sup>3+</sup>), 337,8340 (berechnet [M+3H]<sup>3+</sup>).

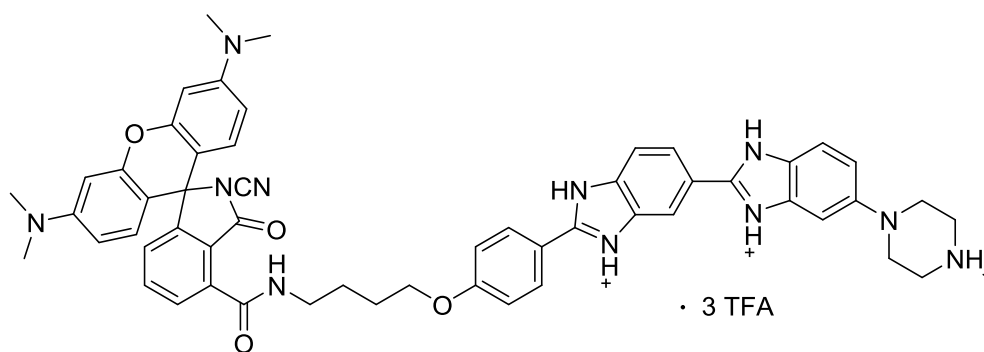
**Verbindung 4-Rh-DNA, N5 (4-TMR tBu DNA)**



Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **4-Rh-H, N5** (1,0 mg, 2,1  $\mu\text{mol}$ ) und **7** (1,5 mg, 3,1  $\mu\text{mol}$ ) durchgeführt. Es wurden 0,6 mg (30 %) der DNA-Sonde **4-Rh-DNA, N5** als pinkfarbenes Pulver erhalten.

HRMS ( $\text{C}_{58}\text{H}_{62}\text{N}_{10}\text{O}_4$ ):  $m/z$  (positiver Modus) = 936,5004 (gefunden  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 936,5028 (berechnet  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 482,2546 (gefunden  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ), 482,2551 (berechnet  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ), 321,8396 (gefunden  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ), 321,8391 (berechnet  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ).

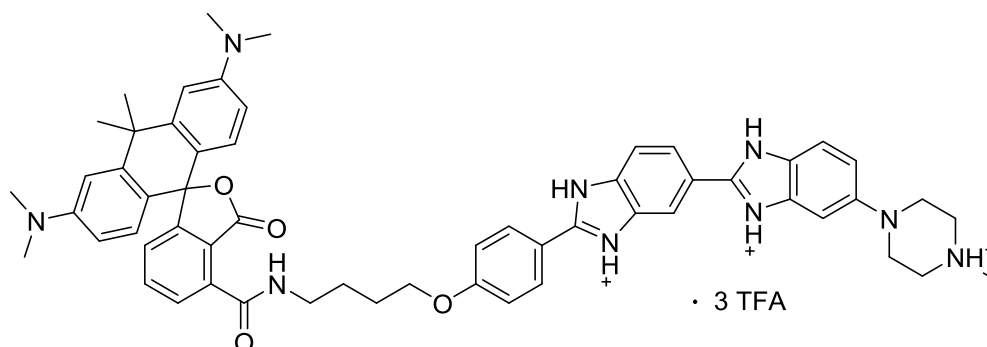
**Verbindung 4-Rh-DNA, N7 (4-TMR CN DNA)**



Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **4-Rh-H, N7** (1,0 mg, 2,2  $\mu\text{mol}$ ) und **7** (1,6 mg, 3,3  $\mu\text{mol}$ ) durchgeführt. Es wurden 0,6 mg (29 %) der DNA-Sonde **4-Rh-DNA, N7** als pinkfarbenes Pulver erhalten.

HRMS ( $\text{C}_{55}\text{H}_{53}\text{N}_4\text{O}_{11}$ ):  $m/z$  (positiver Modus) = 932,4346 (gefunden  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 932,4355 (berechnet  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 954,4155 (gefunden  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ), 954,4174 (berechnet  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ), 466,7216 (gefunden  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ), 466,7214 (berechnet  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ), 311,4840 (gefunden  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ), 311,4833 (berechnet  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ).

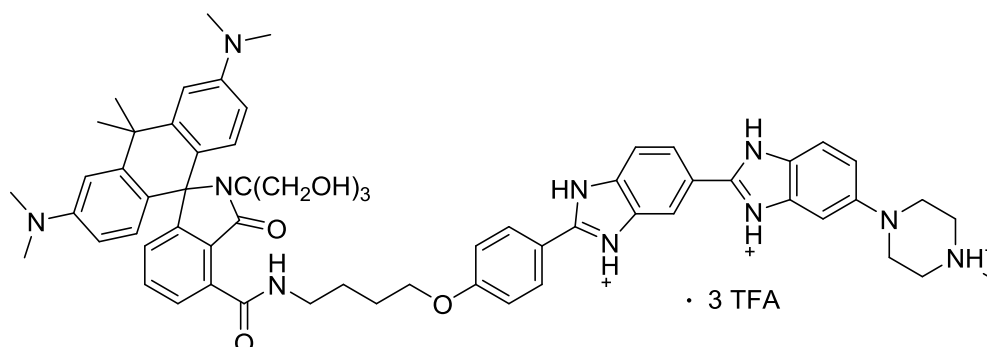
**Verbindung 4-CP-DNA, O (4-610 DNA)**



Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **4-CP-H, O** (1,0 mg, 2,2  $\mu\text{mol}$ ) und **7** (1,6 mg, 3,3  $\mu\text{mol}$ ) durchgeführt. Es wurden 1,1 mg (54 %) der DNA-Sonde **4-CP-DNA, O** als blaues Pulver erhalten.

HRMS ( $\text{C}_{57}\text{H}_{59}\text{N}_9\text{O}_4$ ):  $m/z$  (positiver Modus) = 934,4735 (gefunden  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 934,4763 (berechnet  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 467,7415 (gefunden  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ), 467,7418 (berechnet  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ), 312,1641 (gefunden  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ), 312,1636 (berechnet  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ).

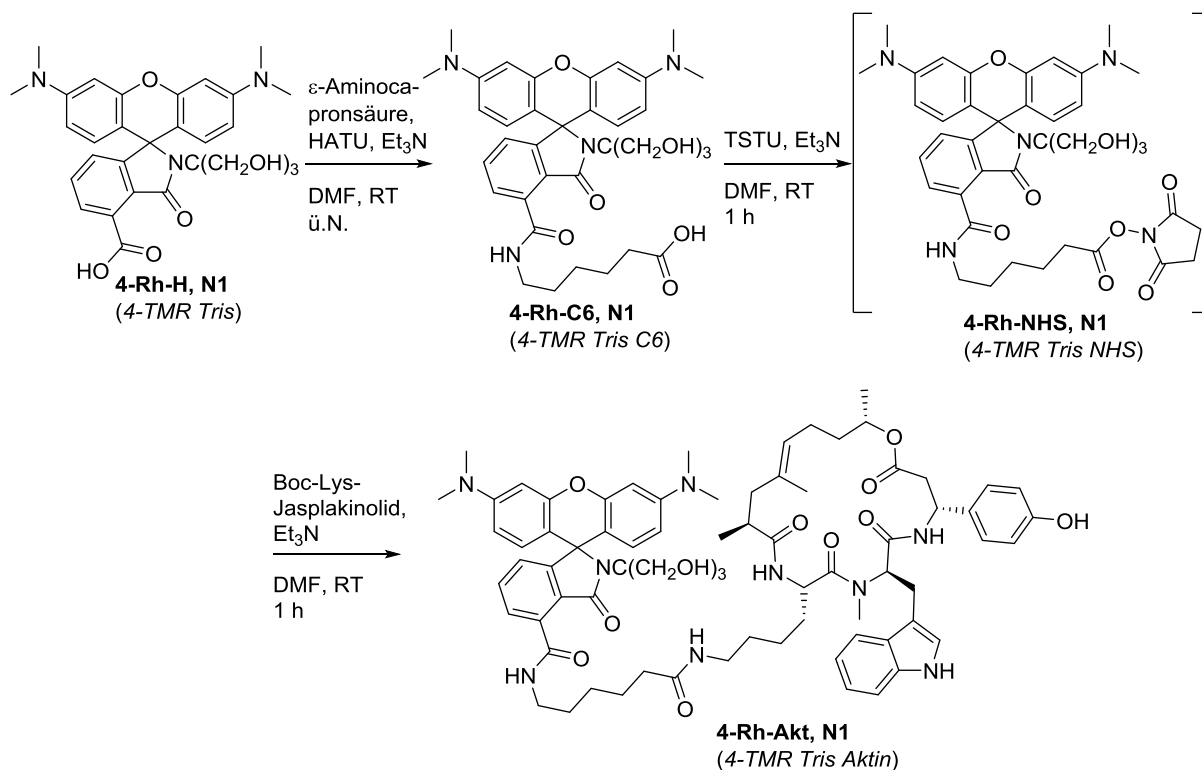
**Verbindung 4-CP-DNA, N1 (4-610 Tris DNA)**



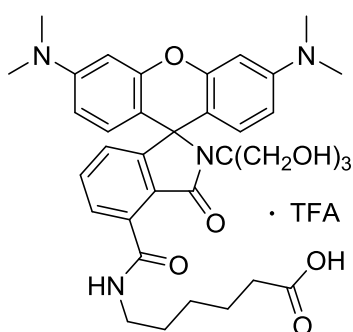
Die Reaktion wurde ausgehend von Verbindung **4-CP-H, N1** (1,0 mg, 1,8  $\mu\text{mol}$ ) und **7** (1,7 mg, 2,7  $\mu\text{mol}$ ) durchgeführt. Es wurden 1,0 mg (47 %) der DNA-Sonde **4-CP-DNA, N1** als blaues Pulver erhalten.

HRMS (C<sub>61</sub>H<sub>68</sub>N<sub>10</sub>O<sub>6</sub>):  $m/z$  (positiver Modus) = 1037,5375 (gefunden [M+H]<sup>+</sup>), 1037,5396 (berechnet [M+H]<sup>+</sup>), 519,2724 (gefunden [M+2H]<sup>2+</sup>), 519,2734 (berechnet [M+2H]<sup>2+</sup>), 346,5181 (gefunden [M+3H]<sup>3+</sup>), 346,5181 (berechnet [M+3H]<sup>3+</sup>).

## 5.16 Synthese der Aktin-Sonde



### Verbindung 4-Rh-C6, N1 (4-TMR Tris C6)



Zu einer Lösung aus 4-TMR Tris (4,0 mg, 7,5  $\mu$ mol, 1 äquival.) in DMF (75  $\mu$ L) wurde HATU (2,8 mg, 7,4  $\mu$ mol, 1,0 äquival.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde  $\epsilon$ -Aminocapronsäure (1,0 mg, 7,7  $\mu$ mol, 1,0 äquival.) und Et<sub>3</sub>N (10  $\mu$ L, 75  $\mu$ mol, 10 äquival.) in DMF (50  $\mu$ L) gelöst.  $\epsilon$ -Aminocapronsäure löst sich schlecht in DMF. Die Lösung wurde 15 Minuten im Ultraschallbad

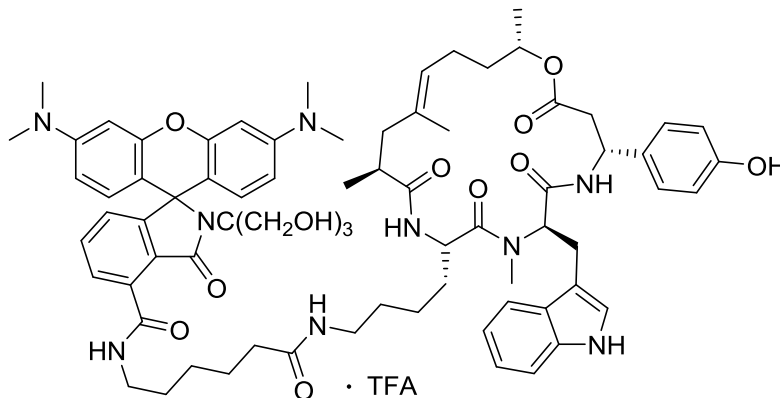


behandelt. Die heterogene Mischung wurde zu dem Reaktionsgemisch gegeben und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt.

DMF wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand an der semi-präparativen HPLC aufgereinigt (3 ml/min, 10 – 70 % ACN in 20 Minuten). Eine Trennung von Edukt und Produkt war nicht möglich, da beide Substanze ähnliche Retentionszeiten haben. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden lyophilisiert und 1,8 mg eines Gemischs aus *4-TMR Tris* und *4-TMR Tris C6* als pinkfarbenes Pulver erhalten. In der nachfolgenden Reaktion ist eine bessere Separation möglich.

HRMS ( $C_{35}H_{42}N_4O_8$ ):  $m/z$  (positiver Modus) = 647,3081 (gefunden  $[M+H]^+$ ), 647,3075 (berechnet  $[M+H]^+$ ).

#### **Verbindung 4-Rh-Akt, N1 (4-TMR Tris Aktin)**



Das Farbstoffgemisch der Vorstufe (1,8 mg) wurde in DMF (100  $\mu$ L) gelöst und  $Et_3N$  (1,0  $\mu$ L, 7,2  $\mu$ mol) zugegeben. TSTU (0,6 mg, 2,0  $\mu$ mol) wurde in DMF (50  $\mu$ L) gelöst und zu der Farbstofflösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Der Rückstand wurde in ACN/ $H_2O$  (1:9) gelöst und an der semi-präparativen HPLC (3 ml/min, 10 – 70 % ACN in 20 Minuten) aufgereinigt. Die Fraktion mit **4-Rh-NHS, N1 (4-TMr Tris**

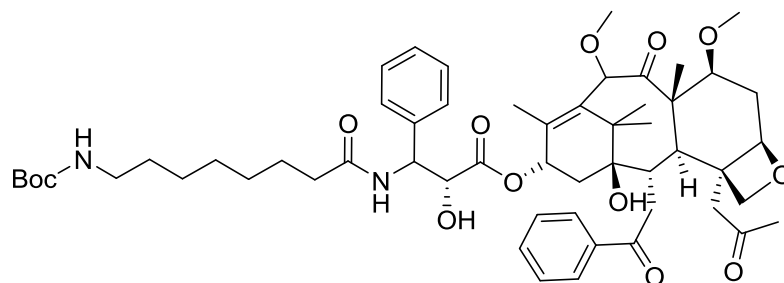
*NHS*) als Zwischenprodukt wurde lyophilisiert und 0,4 mg (0,5  $\mu\text{mol}$ ) des *NHS*-Esters als pinkes Pulver erhalten.

*Boc-Lys-Jasplkinolide*<sup>31b</sup> (0,5 mg, 0,4  $\mu\text{mol}$ ) wurde in Ameisensäure (100  $\mu\text{L}$ ) gelöst und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Ameisensäure wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und gefriergetrocknet. Das farblose fluffige Pulver wurde in DMF (50  $\mu\text{L}$ ) gelöst und  $\text{Et}_3\text{N}$  (0,3  $\mu\text{L}$ , 2,0  $\mu\text{mol}$ ) zugegeben. Eine Lösung von **4-Rh-NHS, N1** (*4-TMR Tris NHS*) in DMF (100  $\mu\text{L}$ ) wurde zu der Jasplakinolid-Lösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde DMF unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand an der semi-präparativen HPLC aufgereinigt (3 ml/min; 30 – 100 % ACN in 20 Minuten). Die Fraktion mit dem Produkt wurde gefriergetrocknet und 0,6 mg (6 %; über 3 Stufen) der Aktin-Sonde **4-Rh-Akt, N1** (*4-TMR Tris Aktin*) als pinkfarbendes Pulver erhalten.

HRMS ( $\text{C}_{73}\text{H}_{91}\text{N}_9\text{O}_{13}$ ):  $m/z$  (positiver Modus) = 1302,67885 (gefunden  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 1302,6809 (berechnet  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 1324,6609 (gefunden  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ), 1324,6629 (berechnet  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ), 651,8439 (gefunden  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ), 651,8441 (berechnet  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ), 662,8343 (gefunden  $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$ ), 662,8351 (berechnet  $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$ ).

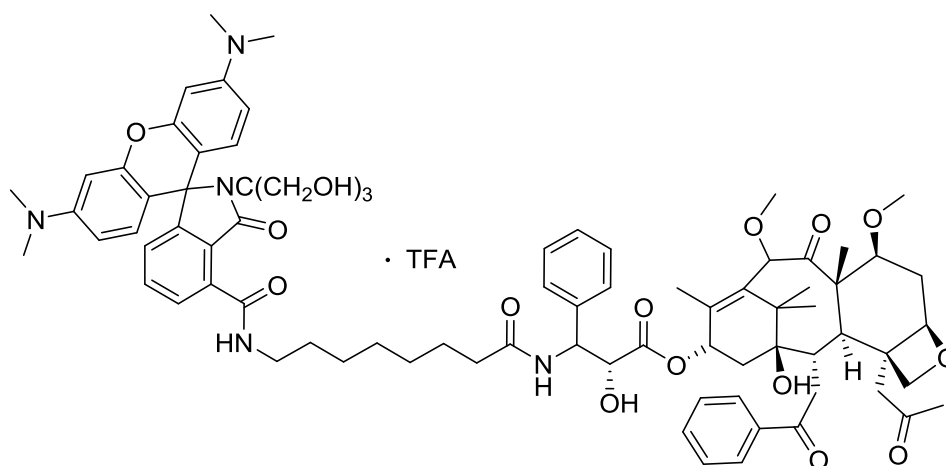
## 5.17 Synthese der Tubulin-Sonden

### Verbindung *Boc-C8-Cabazitaxel*



Die Synthese wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt.<sup>40</sup>

### Verbindung *4-Rh-Tub, N1 (4-TMR Tris Tubu)*



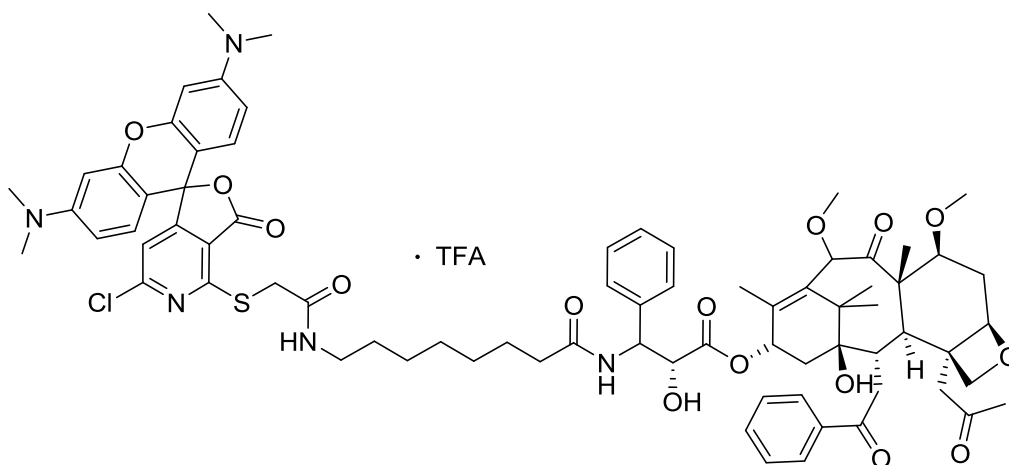
*Boc-C8-Cabazitaxel* (1,4 mg, 1,4  $\mu\text{mol}$ , 1,5 äquival.) wurde in Ameisensäure (100  $\mu\text{L}$ ) gelöst und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Ameisensäure unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Nach Gefriertrocknung wurde ein weißes fluffiges Pulver erhalten, welches in DMF (50  $\mu\text{L}$ ) gelöst und mit  $\text{Et}_3\text{N}$  (1,3  $\mu\text{L}$ , 9,5  $\mu\text{mol}$ , 10 äquival.) versetzt wurde.

Zu einer Lösung aus **4-Rh-H, N1** (0,5 mg, 1,0  $\mu\text{mol}$ , 1 äquival.) in DMF (100  $\mu\text{L}$ ) wurde HATU (0,5 mg, 1,3  $\mu\text{mol}$ , 1,4 äquival.) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend zu der Taxen-Lösung gegeben. Das

Reaktionsgemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in ACN/H<sub>2</sub>O (3:7) gelöst und an der semi-präparativen HPLC (3 ml/min; 30 – 100 % ACN in 20 Minuten) aufgereinigt. Die Fraktionen mit dem Produkt wurden gefriergetrocknet und 0,4 mg (30 %) der Tubulin-Sonde **4-Rh-Tub, N1** (*4-TMR Tris Tubu*) als pinkfarbenes Pulver erhalten.

HRMS (C<sub>77</sub>H<sub>93</sub>N<sub>5</sub>O<sub>19</sub>): *m/z* (positiver Modus) = 1392,6531 (gefunden [M+H]<sup>+</sup>), 1392,6538 (berechnet [M+H]<sup>+</sup>), 1410,6620 (gefunden [M+H+H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), 1410,6643 (berechnet [M+H+H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>) 696,8301 (gefunden [M+2H]<sup>2+</sup>), 696,8305 (berechnet [M+2H]<sup>2+</sup>), 707,8210 (gefunden [M+H+Na]<sup>2+</sup>), 707,8215 (berechnet [M+H+Na]<sup>2+</sup>).

#### Verbindung **565pR-Tubu**



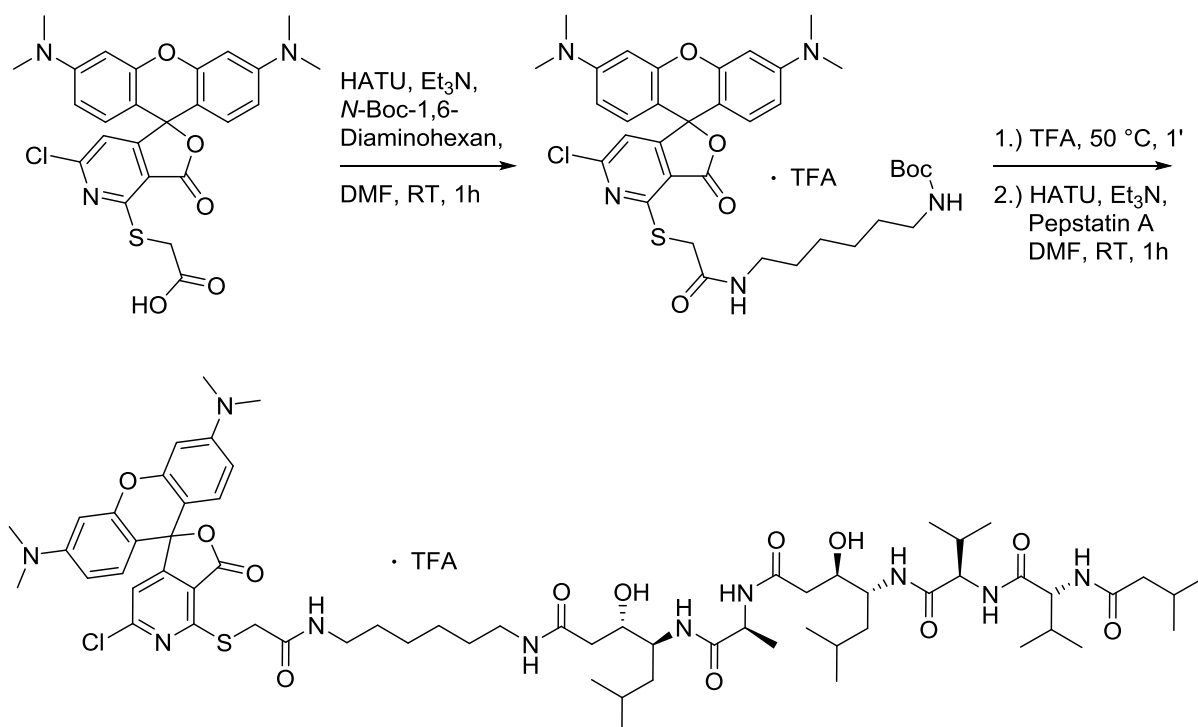
*Boc-C8-Cabazitaxel* (1,2 mg, 1,2 μmol, 1,5 äquival.) wurde in Ameisensäure (100 μL) gelöst und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Ameisensäure unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in H<sub>2</sub>O aufgenommen. Nach Gefrier Trocknung wurde ein weißes fluffiges Pulver erhalten, welches in DMF (50 μL) gelöst und mit Et<sub>3</sub>N (3,4 μL einer 10 % (v/v) Stammlösung in DMF, 2,5 μmol, 3,0 äquival.) versetzt wurde.

Zu einer Lösung aus **565pR-NHS Ester** (0,5 mg, 0,8 μmol, 1 äquival.) in DMF (100 μL) wurde die Taxen-Lösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und

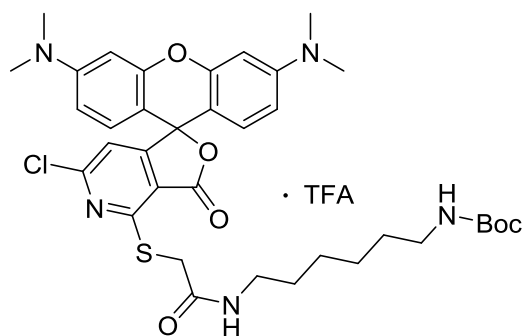
anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in ACN/H<sub>2</sub>O (3:7) gelöst und an der semi-präparativen HPLC (3 ml/min; 30 – 100 % ACN in 20 Minuten) aufgereinigt. Die Fraktionen mit dem Produkt wurden gefriergetrocknet und 0,3 mg (27 %) der Tubulin-Sonde **565pR-Tubu** als pinkfarbenes Pulver erhalten.

HRMS: (C<sub>73</sub>H<sub>84</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>17</sub>S): m/z (positiver Modus) = 1370.5341 (gefunden [M+H]<sup>+</sup>), 1370.5344 (berechnet [M+H]<sup>+</sup>), 685.7701 (gefunden [M+2H]<sup>2+</sup>), 685.7708 (berechnet [M+2H]<sup>2+</sup>), 696.7614 (gefunden [M+H+Na]<sup>2+</sup>), 696.7618 (berechnet [M+H+Na]<sup>2+</sup>).

## 5.18 Synthese der Lysosom-Sonde



### Verbindung 565pR-C6-Boc

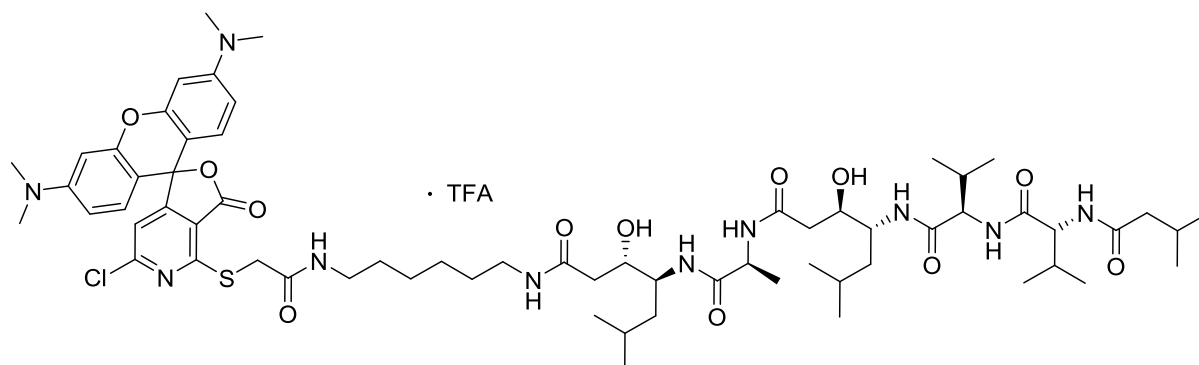


Zu einer Lösung aus **565pR** (1,0 mg, 2,0  $\mu$ mol, 1,0 äquival.) in DMF (100  $\mu$ L) wurde HATU (1,1 mg, 2,9  $\mu$ mol, 1,5 äquival.) zugegeben. Nach fünfminütigem rühren bei Raumtemperatur wurde *N*-Boc-1,6-Diaminohexan (1,3 mg, 6,1  $\mu$ mol, 3,1 äquival.) und Et<sub>3</sub>N (1,0  $\mu$ L, 7,1  $\mu$ mol, 3,6 äquival.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und DMF anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in ACN/H<sub>2</sub>O (3:7) aufgenommen und an der semi-präparativen HPLC (3 ml/min; 30 – 100 % ACN in 20

Minuten) aufgereinigt. Nach Gefriertrocknung wurden 0,9 mg (65 %) **565pR-C6-Boc** als pinkfarbene Substanz erhalten.

HRMS: (C<sub>36</sub>H<sub>44</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S): m/z (positiver Modus) = 710.2773 (gefunden ([M+H]<sup>+</sup>), 710.2774 (berechnet [M+H]<sup>+</sup>).

### Verbindung 565pR-Lyso



**565pR-C6-Boc** (0,5mg, 0,7  $\mu$ mol, 1 äquival.) wurde in TFA (50  $\mu$ L) gelöst und 1 Minute bei 50°C erhitzt. TFA wurde unter Stickstoffstrom verblasen und der Rückstand in Wasser gelöst. Nach Gefriertrocknung wurde die Substanz in DMF (100  $\mu$ L) gelöst und Et<sub>3</sub>N (3,0  $\mu$ L einer 10 % (v/v) Stammlösung in DMF, 2,1  $\mu$ mol, 3 äquival.) zugegeben.

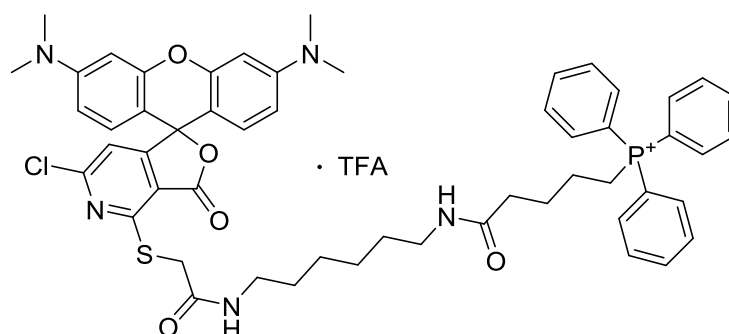
Pepstatin A (0,7 mg, 1,0  $\mu$ mol, 1,4 äquival.) wurde in DMF (50  $\mu$ L) gelöst und HATU (0,5 mg, 1,3  $\mu$ mol, 1,9 äquival.) zugegeben. Die Lösung wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend zu der Farbstofflösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das DMF unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in ACN/H<sub>2</sub>O (3:7) gelöst und auf der semi-präparativen HPLC (3 ml/min, 30 – 100 % ACN in 20 Minuten) gereinigt. Die Fraktionen mit dem Produkt wurden gefriergetrocknet und 0,7 mg (77 %) der Lysosom-Sonde **565pR-Lyso** als pinkfarbendes Pulver erhalten.

HRMS (C<sub>65</sub>H<sub>97</sub>ClN<sub>10</sub>O<sub>12</sub>S): m/z (positiver Modus) = 1277.6749 (gefunden [M+H]<sup>+</sup>), 1277.6769 (berechnet [M+H]<sup>+</sup>), 639.3415 (gefunden [M+2H]<sup>2+</sup>), 639.3421 (berechnet [M+2H]<sup>2+</sup>), 650.3313 (gefunden [M+H+Na]<sup>2+</sup>), 650.3331 (berechnet [M+H+Na]<sup>2+</sup>).



## 5.19 Synthese der Mitochondrium-Sonde

### Verbindung 565pR-Mito



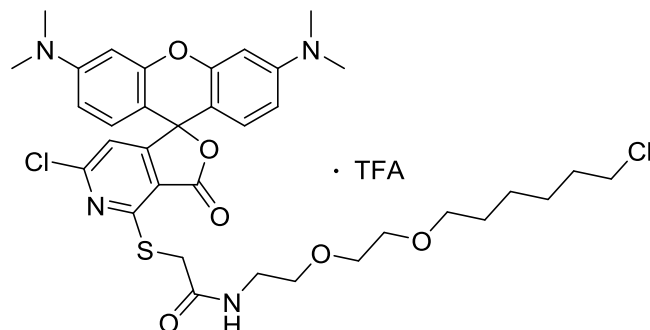
**565pR-C6-Boc** (0,5mg, 0,7  $\mu\text{mol}$ , 1,0 äquival.) wurde in TFA (50  $\mu\text{l}$ ) gelöst und 1 Minute bei 50°C erhitzt. TFA wurde unter Stickstoffstrom verblasen und der Rückstand in Wasser gelöst. Nach Gefriertrocknung wurde die Substanz in DMF (100  $\mu\text{l}$ ) gelöst und  $\text{Et}_3\text{N}$  (3,0  $\mu\text{l}$  einer 10 % (v/v) Stammlösung in DMF, 2,1  $\mu\text{mol}$ , 3,0 äquival.) zugegeben.

(4-Carboxybutyl)-triphenylphosphoniumbromid (0,5 mg, 1,1  $\mu\text{mol}$ , 1,6 äquival.) wurde in DMF (100  $\mu\text{l}$ ) gelöst und HATU (0,5 mg, 1,4  $\mu\text{mol}$ , 1,9 äquival.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Farbstofflösung wurde zugegeben und das Reaktionsgemisch 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde DMF unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:1) gelöst. und an der semi-präparativen HPLC (3 ml/min.; 30 – 100 % in 20 Minuten) aufgereinigt. Die Fraktionen mit dem Produkt wurden gefriergetrocknet und 0,5 mg (74 %) der Mitochondrium-Sonde **565pR-Mito** als pinkfarbenes Pulver erhalten.

HRMS ( $\text{C}_{54}\text{H}_{58}\text{ClN}_5\text{O}_5\text{PS}$ ): m/z (positiver Modus) = 954.3561 (gefunden  $[\text{M}]^+$ ), 954.3579 (berechnet  $[\text{M}]^+$ ), 488.6732 (gefunden  $[\text{M}+\text{Na}]^{2+}$ ), 488.6736 (berechnet  $[\text{M}+\text{Na}]^{2+}$ ), 477.6829 (gefunden  $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$ ), 477.6826 (berechnet  $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$ ).

## 5.20 Synthese der HaloTag-Sonde

### *565pR-Halo*

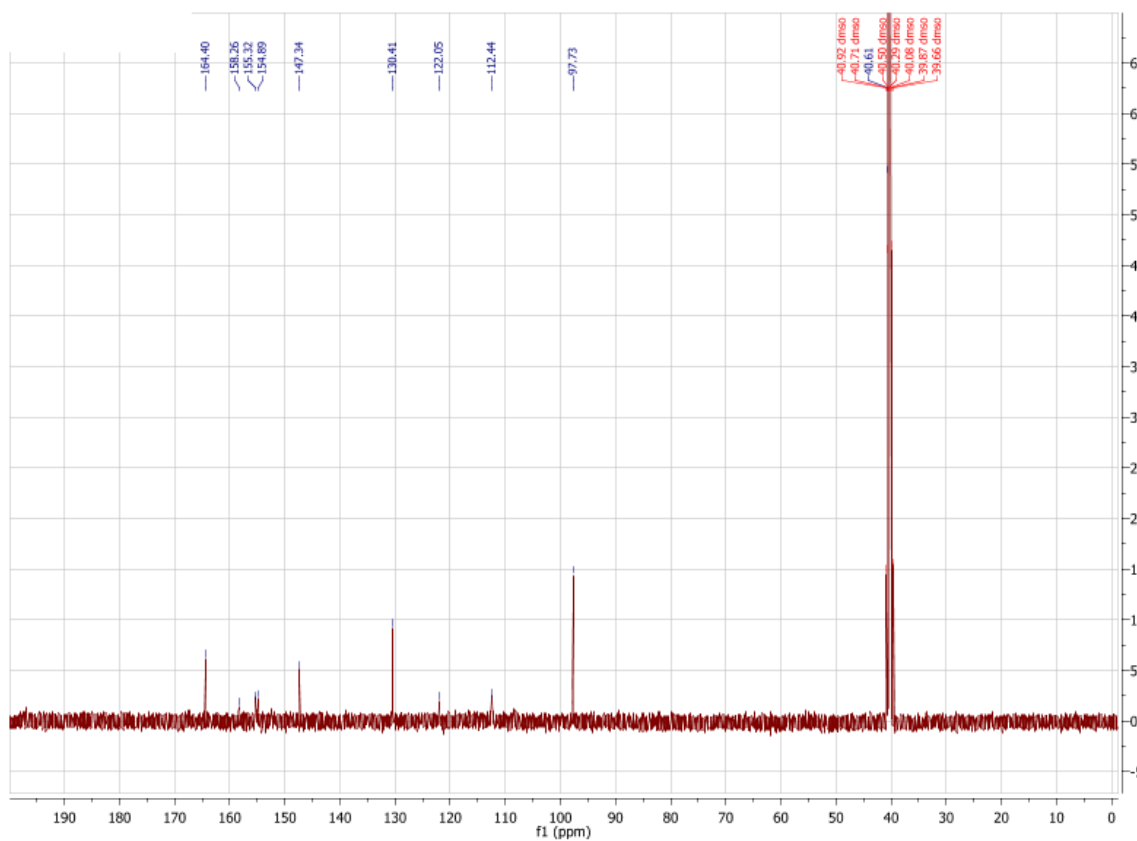
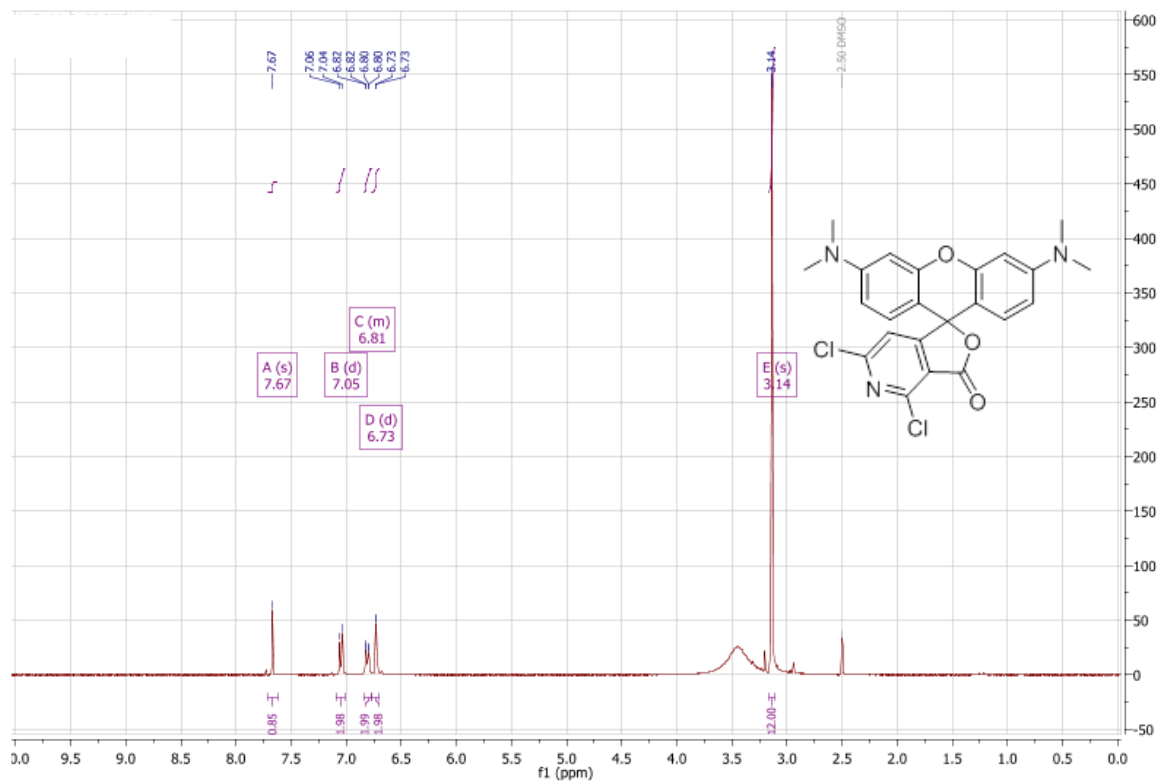


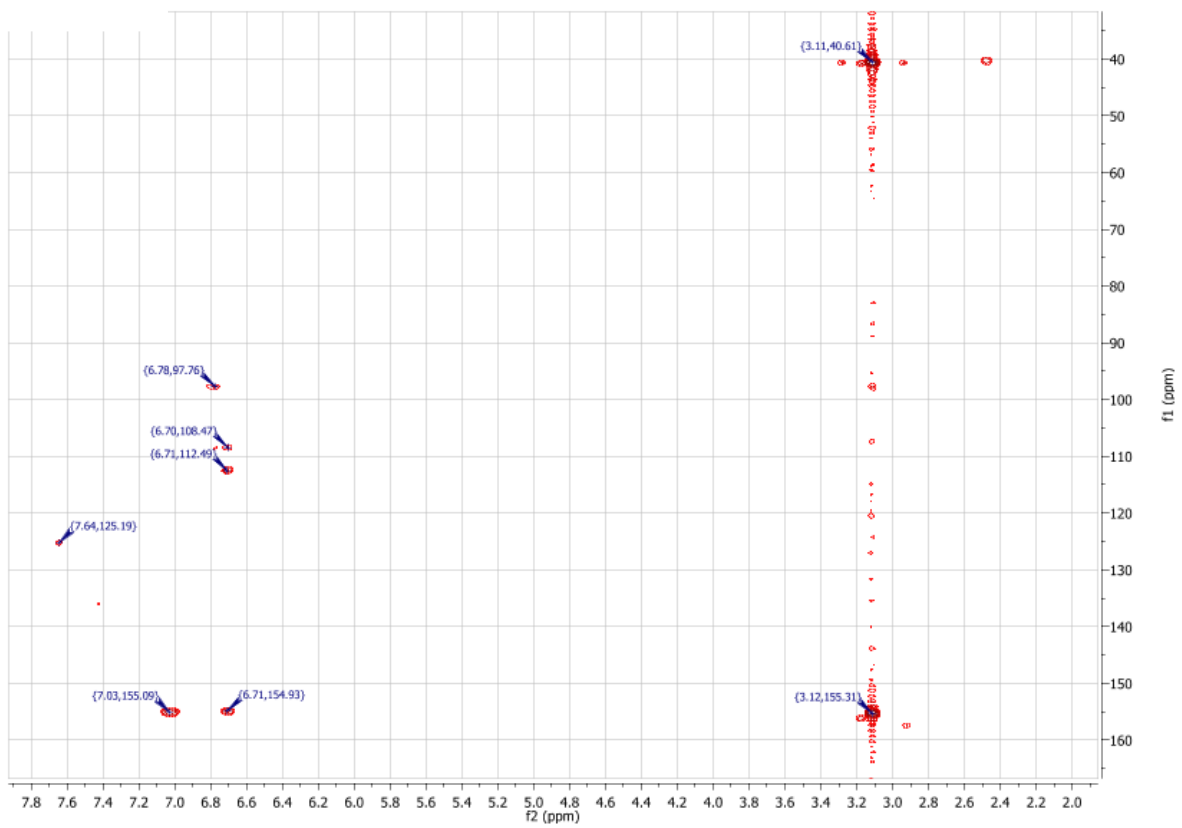
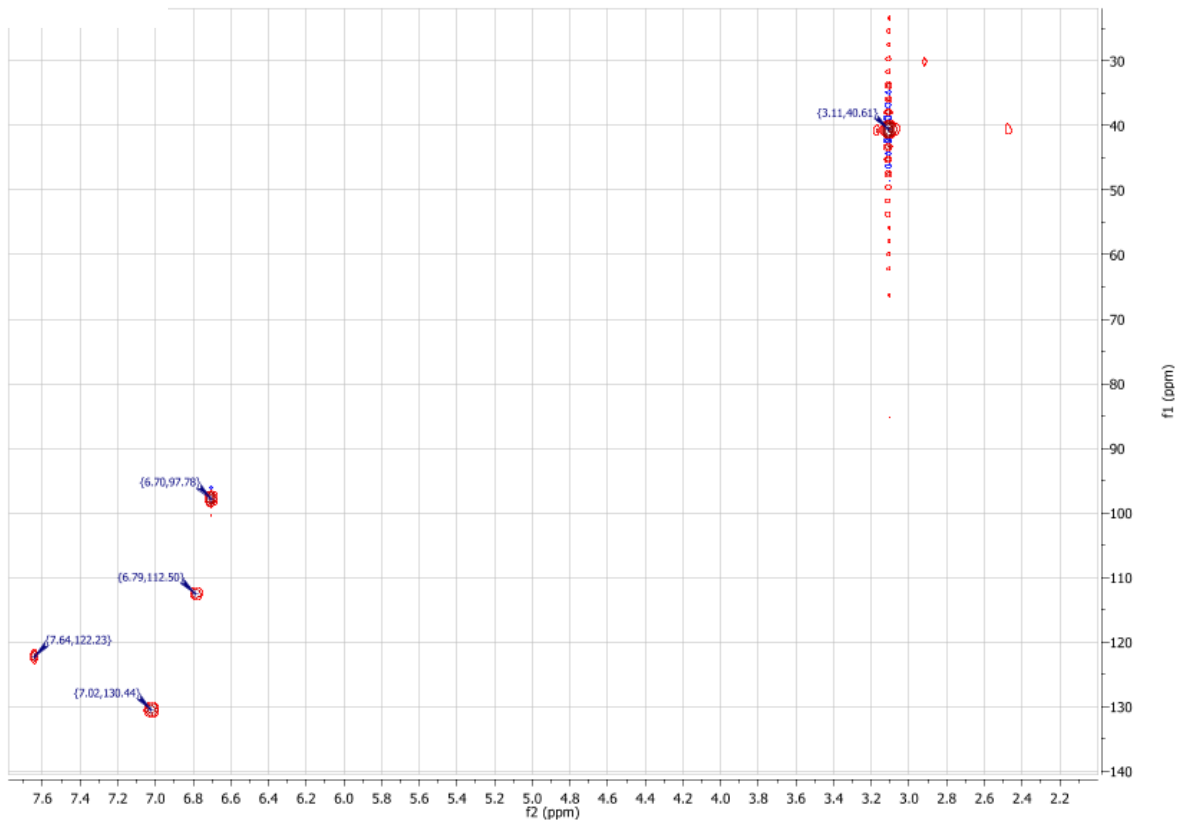
Zu einer Lösung aus HaloTag® Amin (O2) (Promega, Madison, USA) (0.6 mg, 2.7  $\mu$ mol, 3,3 äquival.) und Et<sub>3</sub>N (1,7  $\mu$ l einer 10 % (v/v) Stammlösung in DMF, 1,2  $\mu$ mol, 1,5 äquival.) in DMF (100  $\mu$ l) wurde NHS-Esters **565pR-NHS Ester** (0,5 mg, 0,8  $\mu$ mol, 1,0 äquival.) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt. DMF wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in einer Lösung aus ACN/H<sub>2</sub>O (3:7) gelöst. Das Produkt wurde anschließend an der semi-präparativen HPLC aufgereinigt (3 ml/min; 30 – 100 % in 20 Minuten). Die Fraktionen mit dem Produkt wurden gefriergetrocknet und 0,4 mg (68 %) der HaloTag-Sonde **565pR-Halo** wurden als pinkes Pulver erhalten.

HRMS (C<sub>35</sub>H<sub>42</sub>C<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S): m/z (positiver Modus) = 739.2110 (gefunden [M+Na]<sup>+</sup>), 739.2094 (berechnet [M+Na]<sup>+</sup>), 717.2287 (gefunden [M+H]<sup>+</sup>), 717.2275 (berechnet [M+H]<sup>+</sup>).

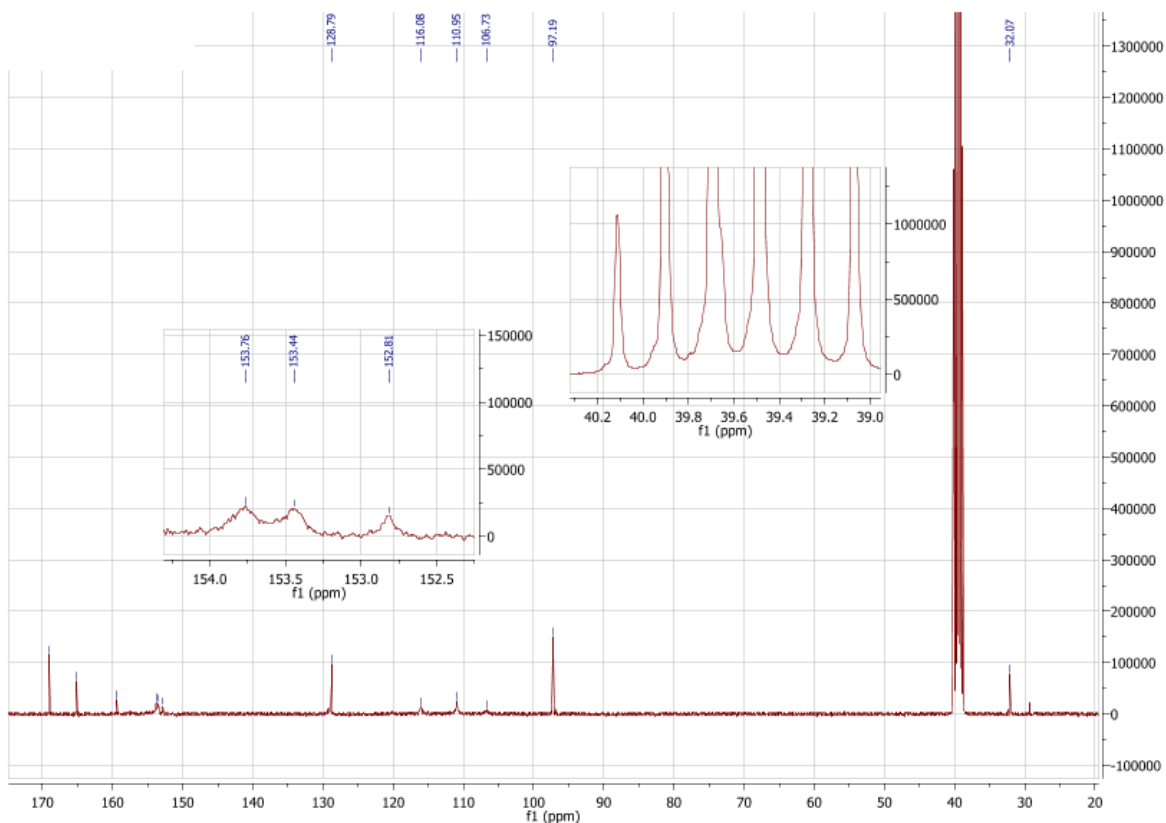
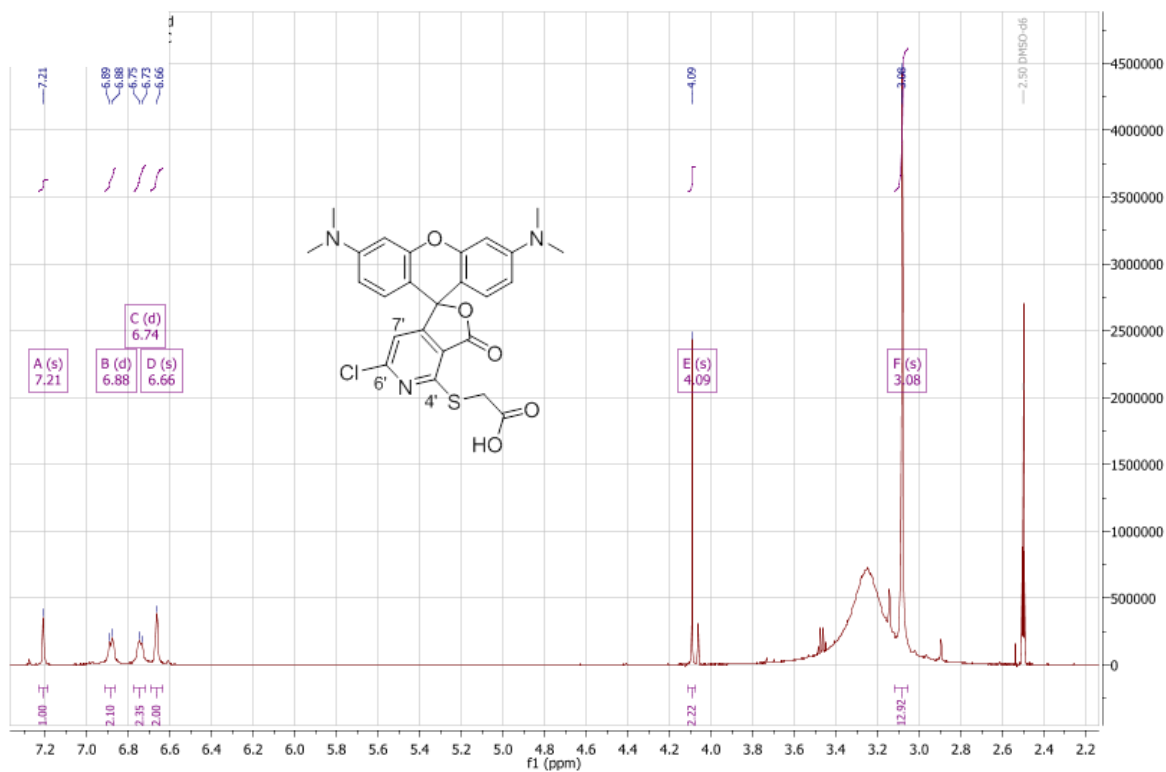
# 6 NMR-Spektren

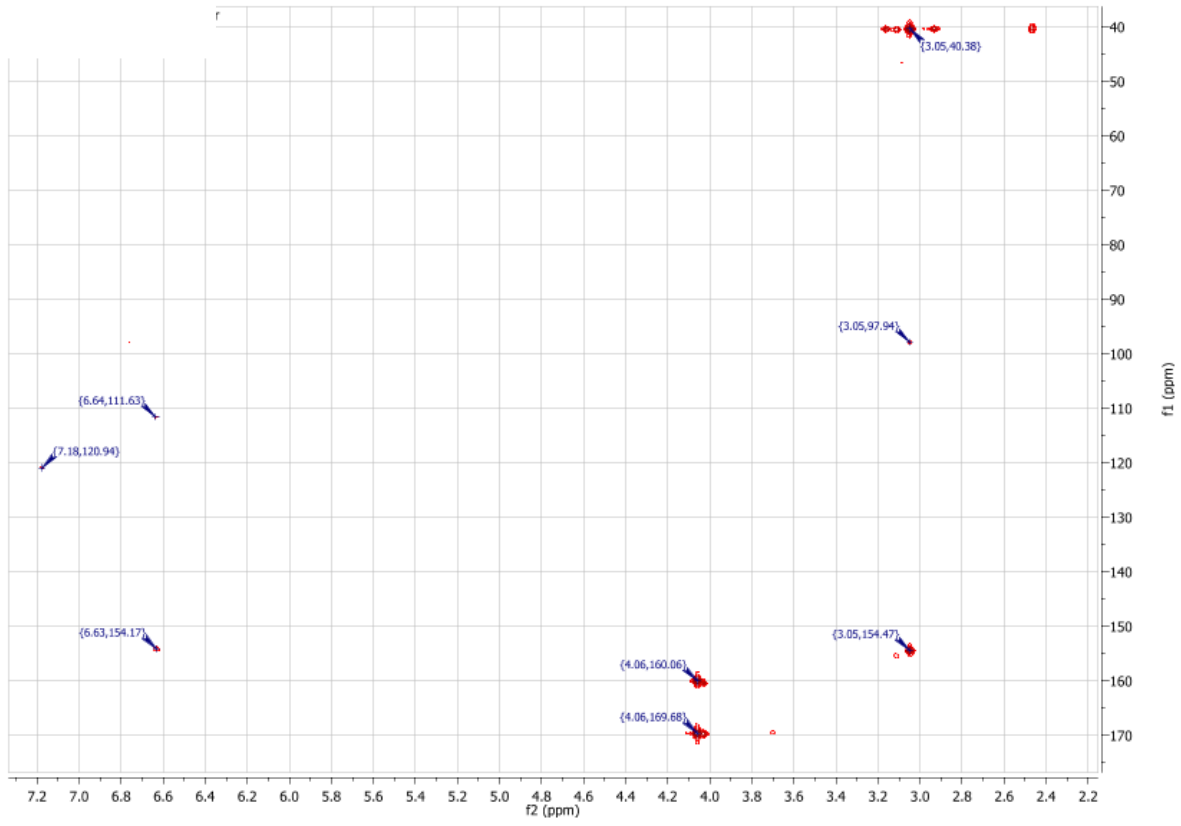
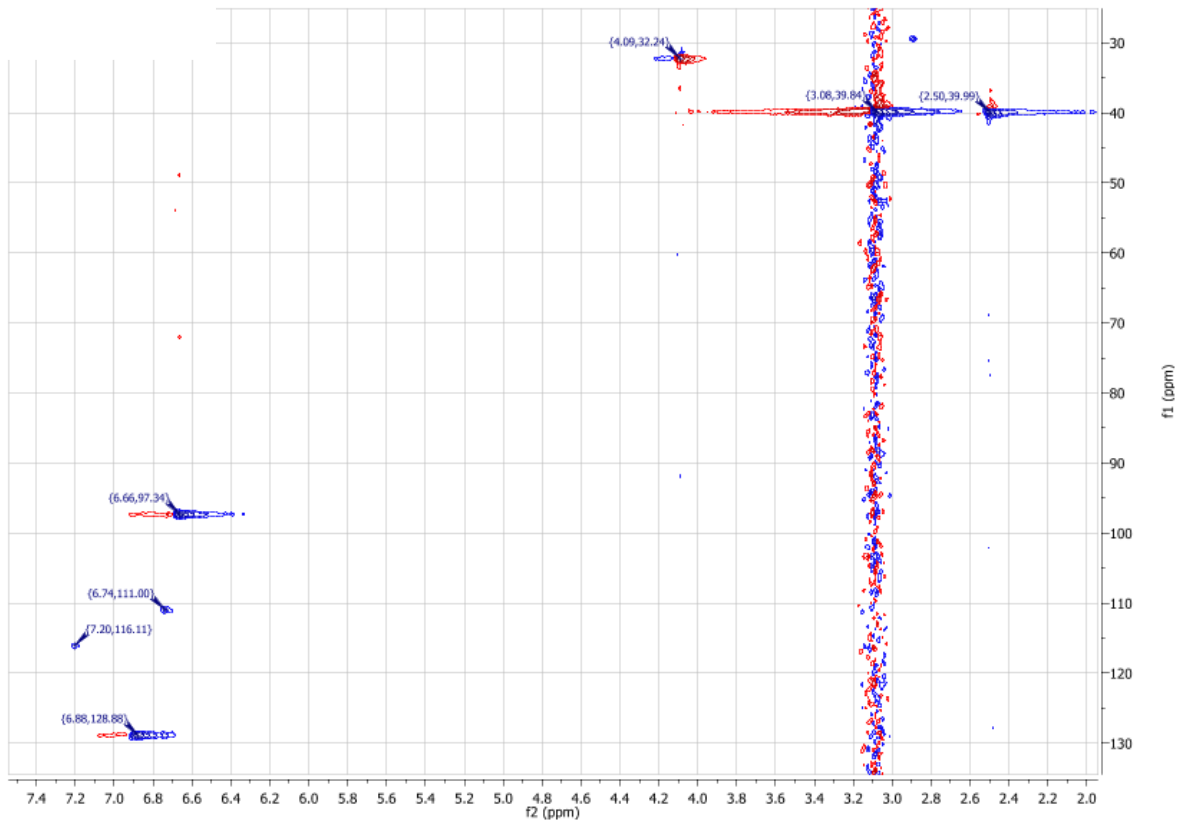
## 17-H





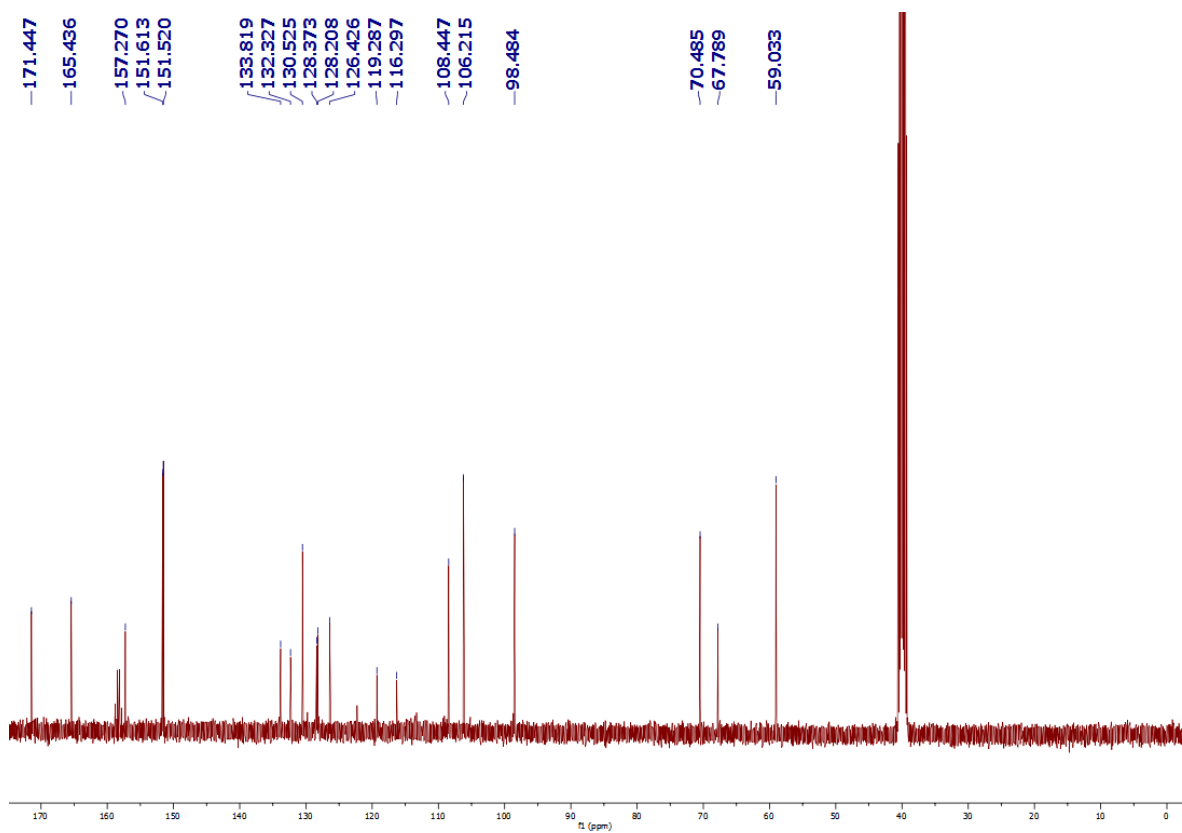
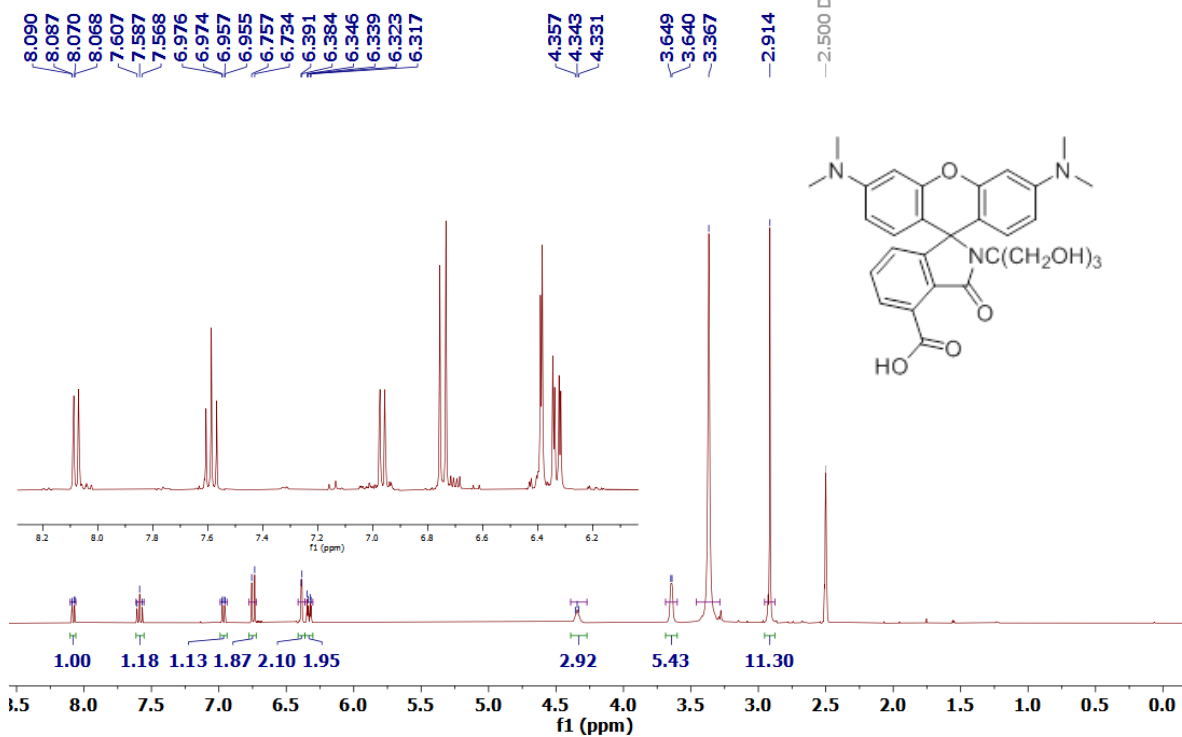
**18-H (565pR)**



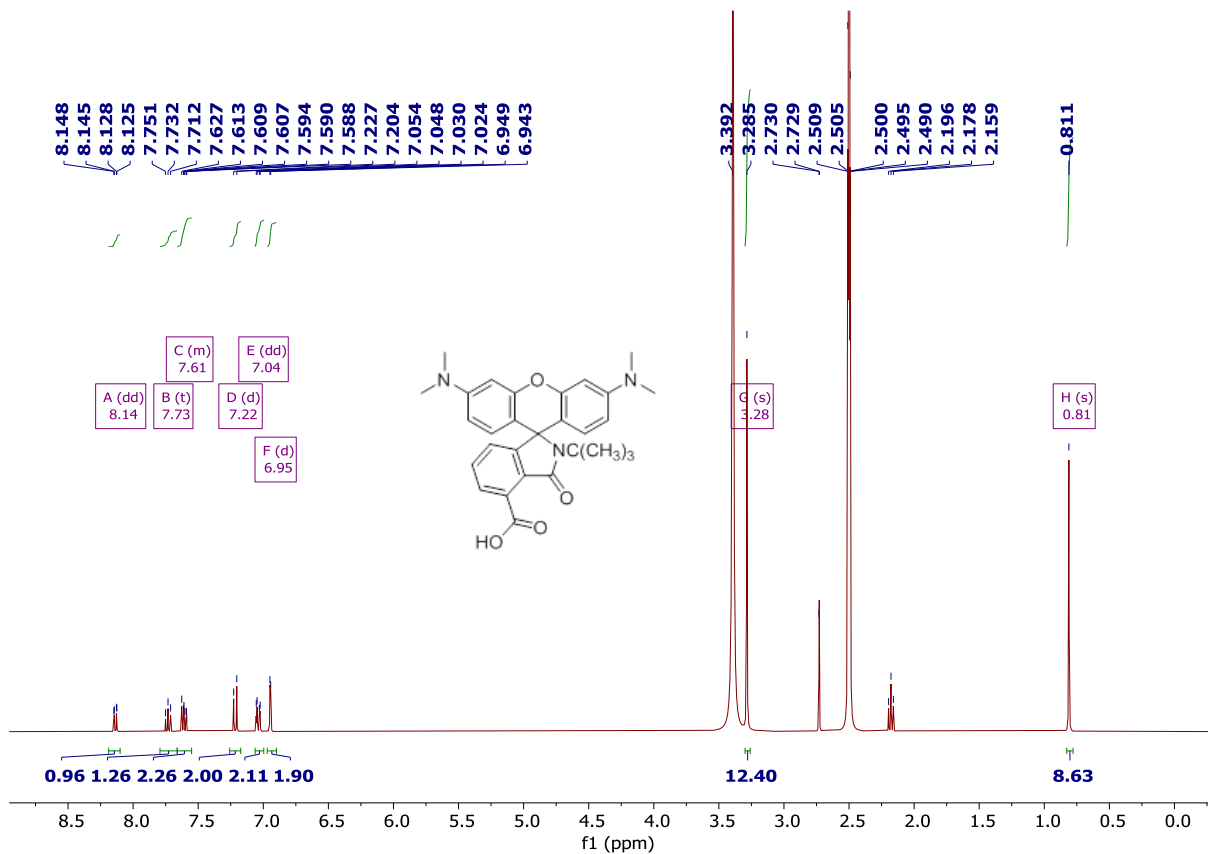


### 4-Rh-H, N1 (4-TMR Tris)

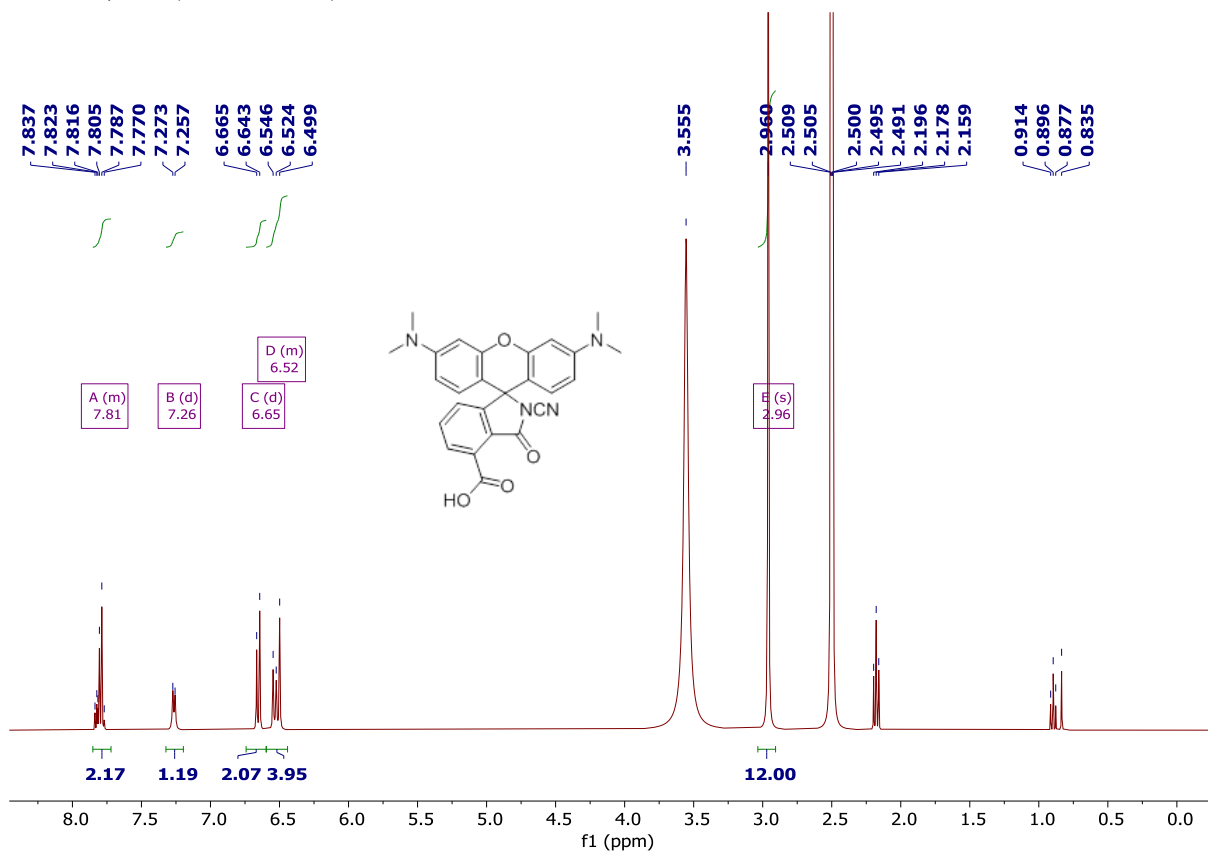
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, dms<sub>o</sub>) δ 8.08 (dd, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 1H), 7.59 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.97 (dd, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.39 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H), 6.35 (dd, *J* = 9.0, 2.6 Hz, 2H), 4.34 (t, *J* = 5.1 Hz, 3H), 3.64 (d, *J* = 3.7 Hz, 5H), 3.37 (s, 38H), 2.91 (s, 11H).



**4-Rh-H, N5 (4-TMR tBu)**



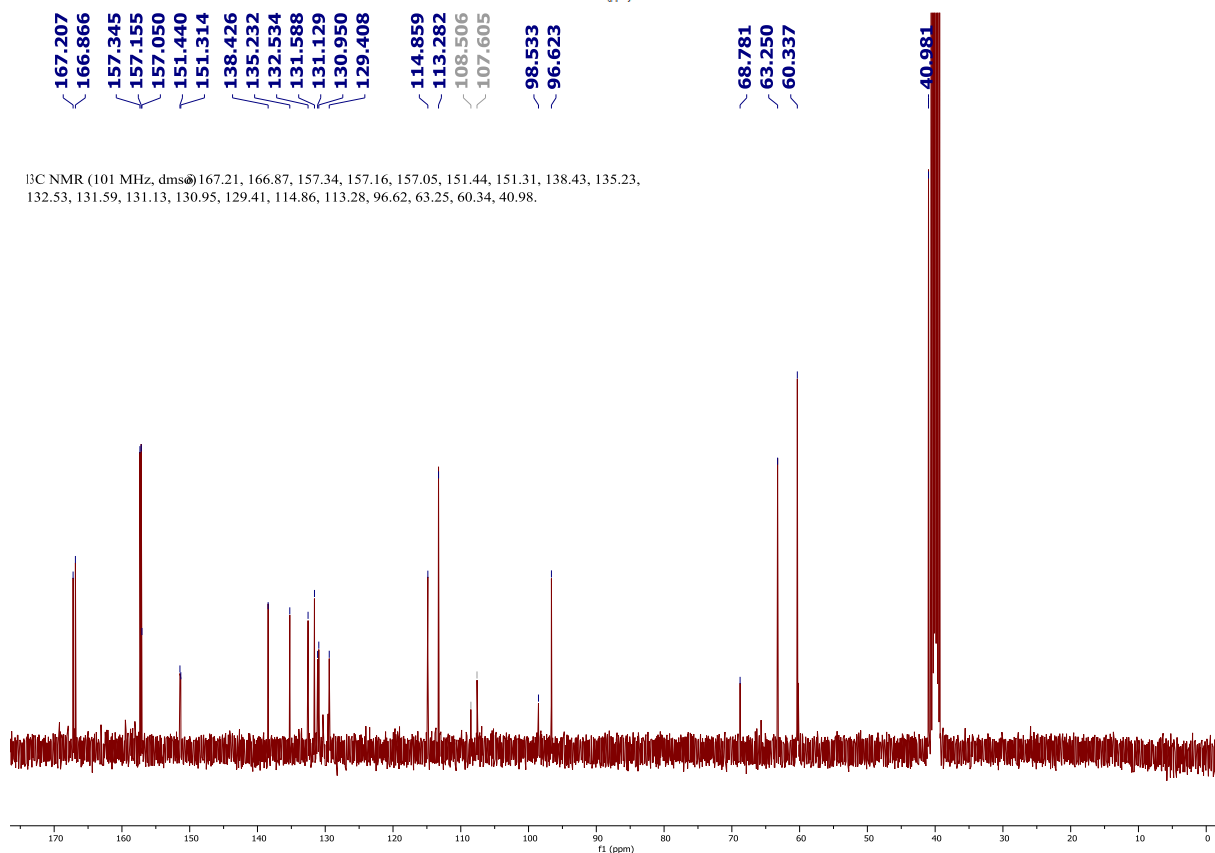
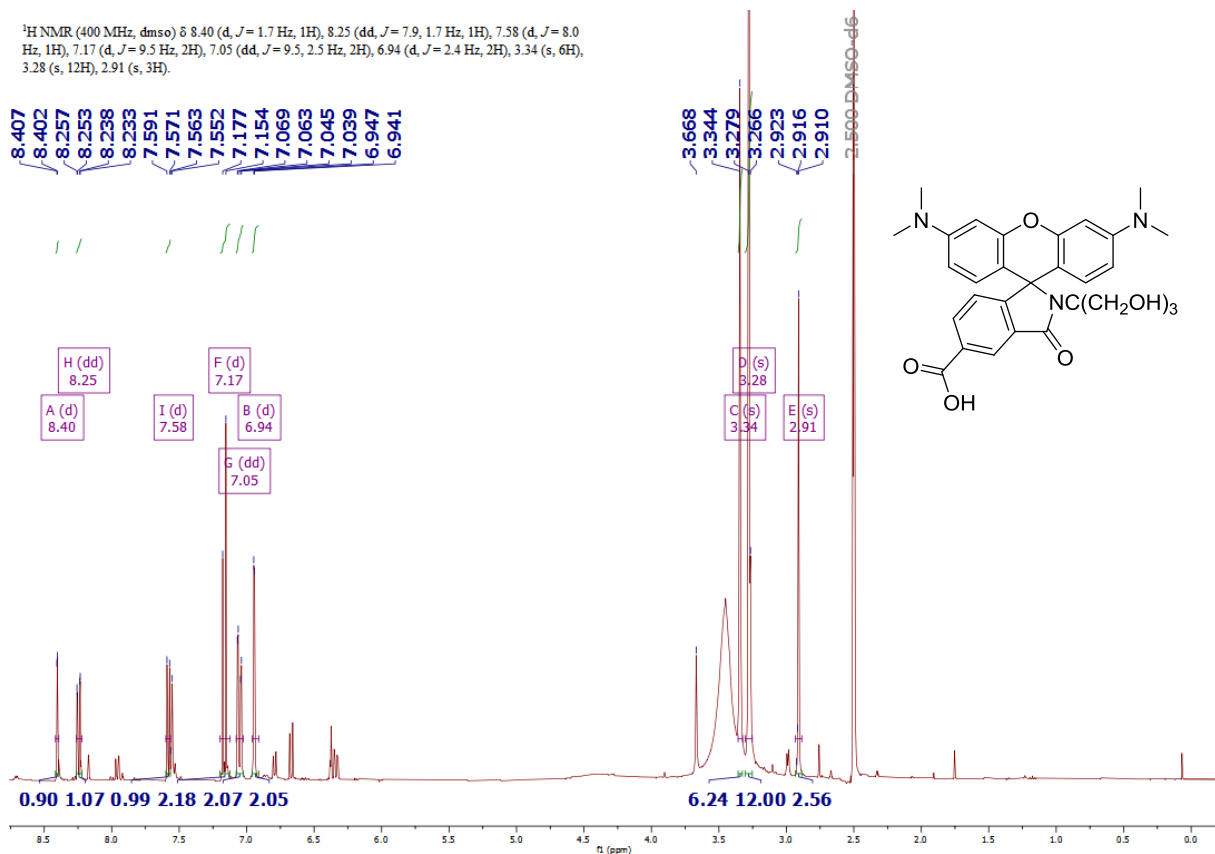
**4-Rh-H, N7 (4-TMR CN)**





### 5-Rh-H, N1 (5-TMR Tris)

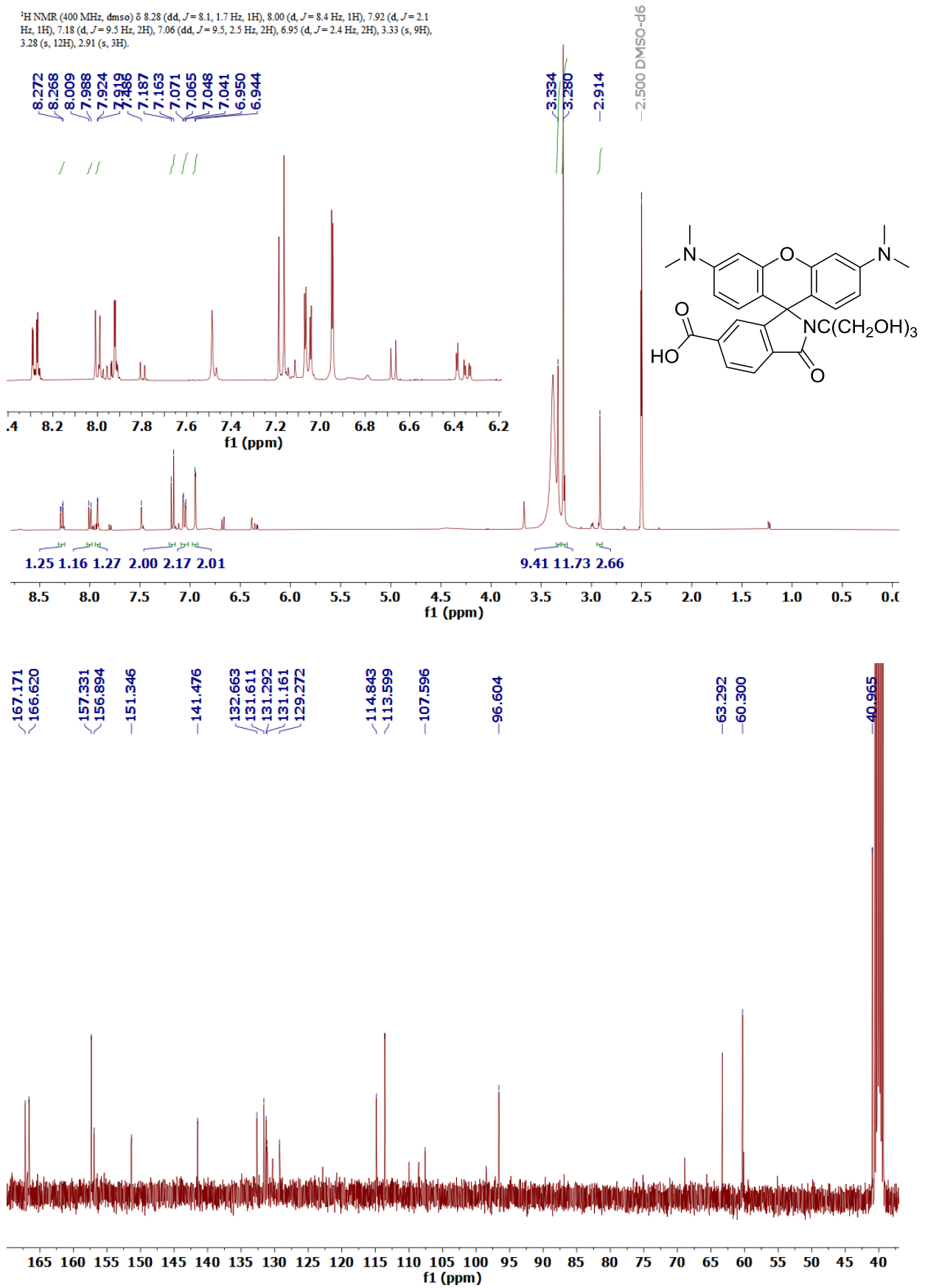
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, dms<sup>o</sup>) δ 8.40 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 8.25 (dd, J = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.17 (d, J = 9.5 Hz, 2H), 7.05 (dd, J = 9.5, 2.5 Hz, 2H), 6.94 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 3.34 (s, 6H), 3.28 (s, 12H), 2.91 (s, 3H).



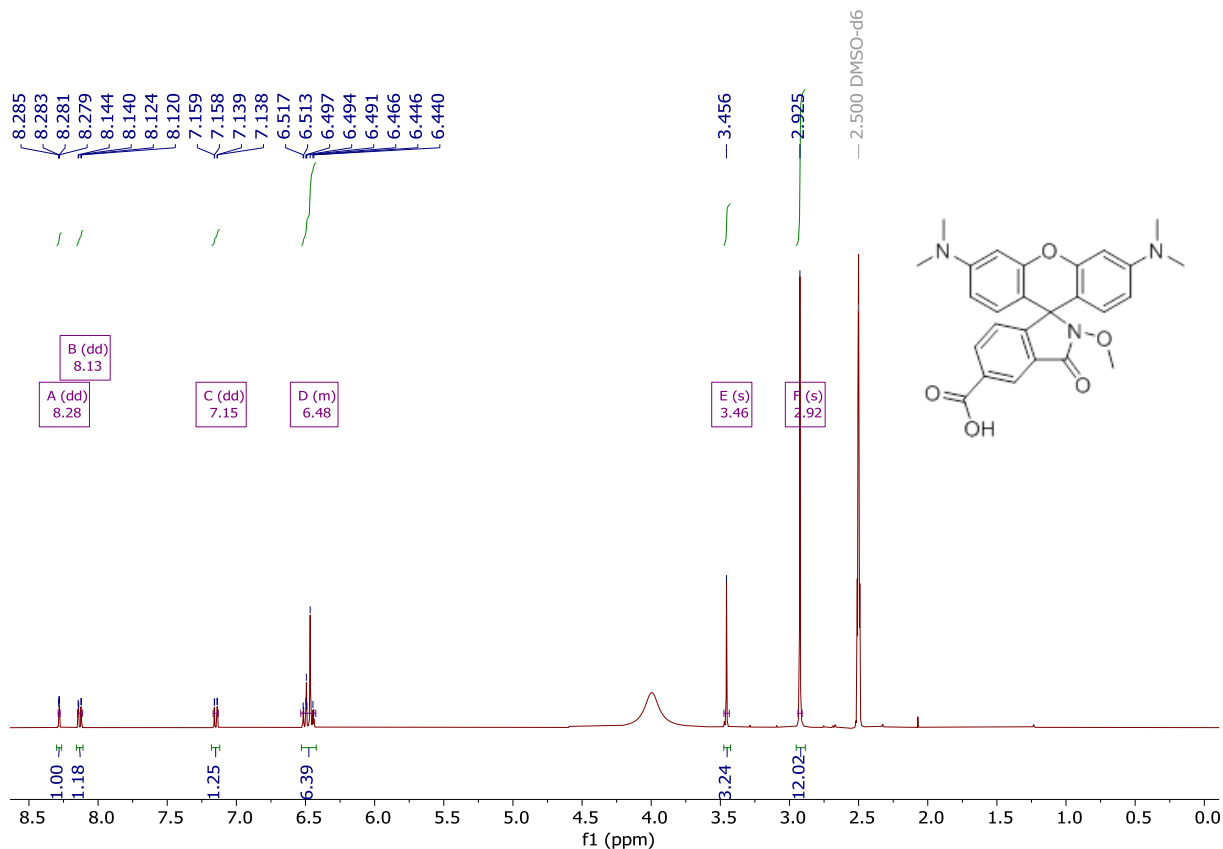
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, dms<sup>o</sup>) 167.21, 166.87, 157.34, 157.16, 157.05, 151.44, 151.31, 138.43, 135.23, 132.53, 131.59, 131.13, 130.95, 129.41, 114.86, 113.28, 96.62, 63.25, 60.34, 40.98.

### 6-Rh-H, N1 (6-TMR Tris)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, dms<sup>o</sup>) δ 8.28 (dd, *J* = 8.1, 1.7 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 9.5 Hz, 2H), 7.06 (dd, *J* = 9.5, 2.5 Hz, 2H), 6.95 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 3.33 (s, 9H), 3.28 (s, 12H), 2.91 (s, 3H).

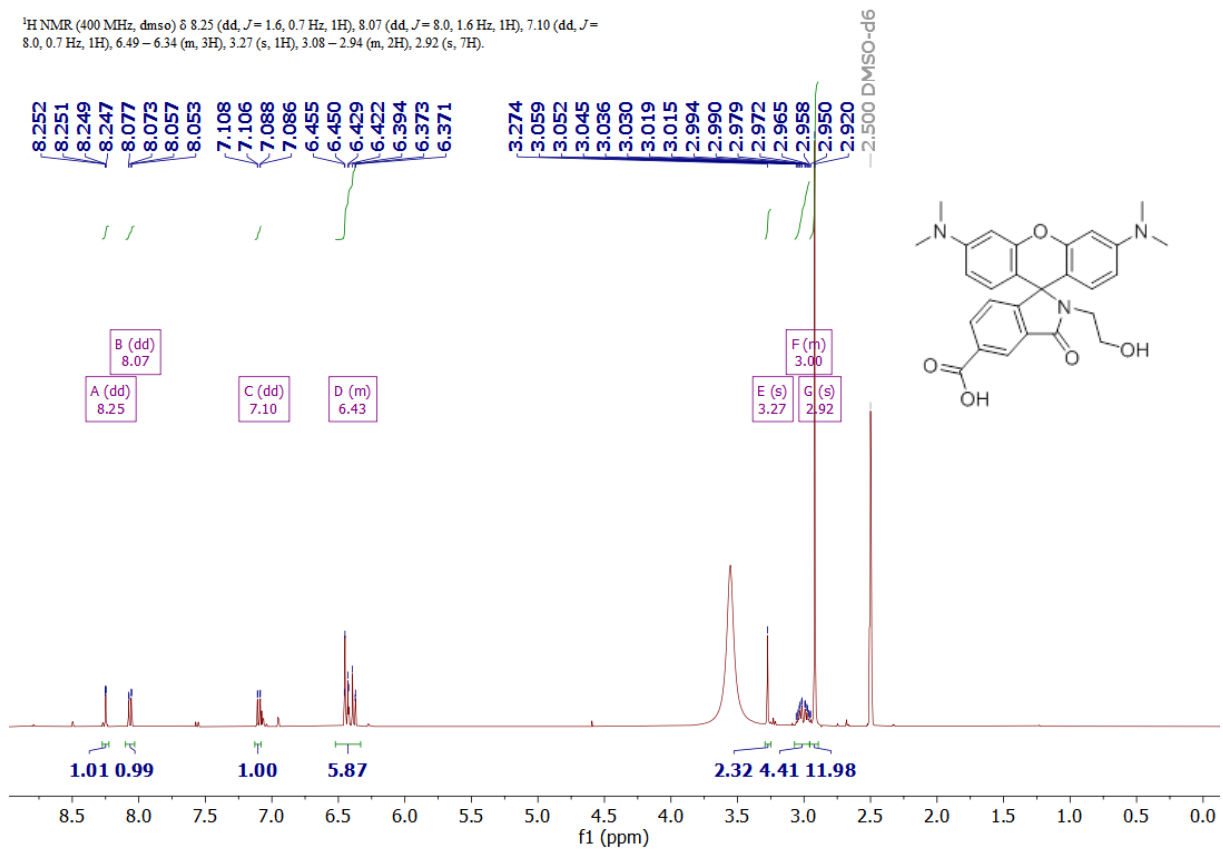


**5-Rh-H, N2 (5-TMR OMe)**



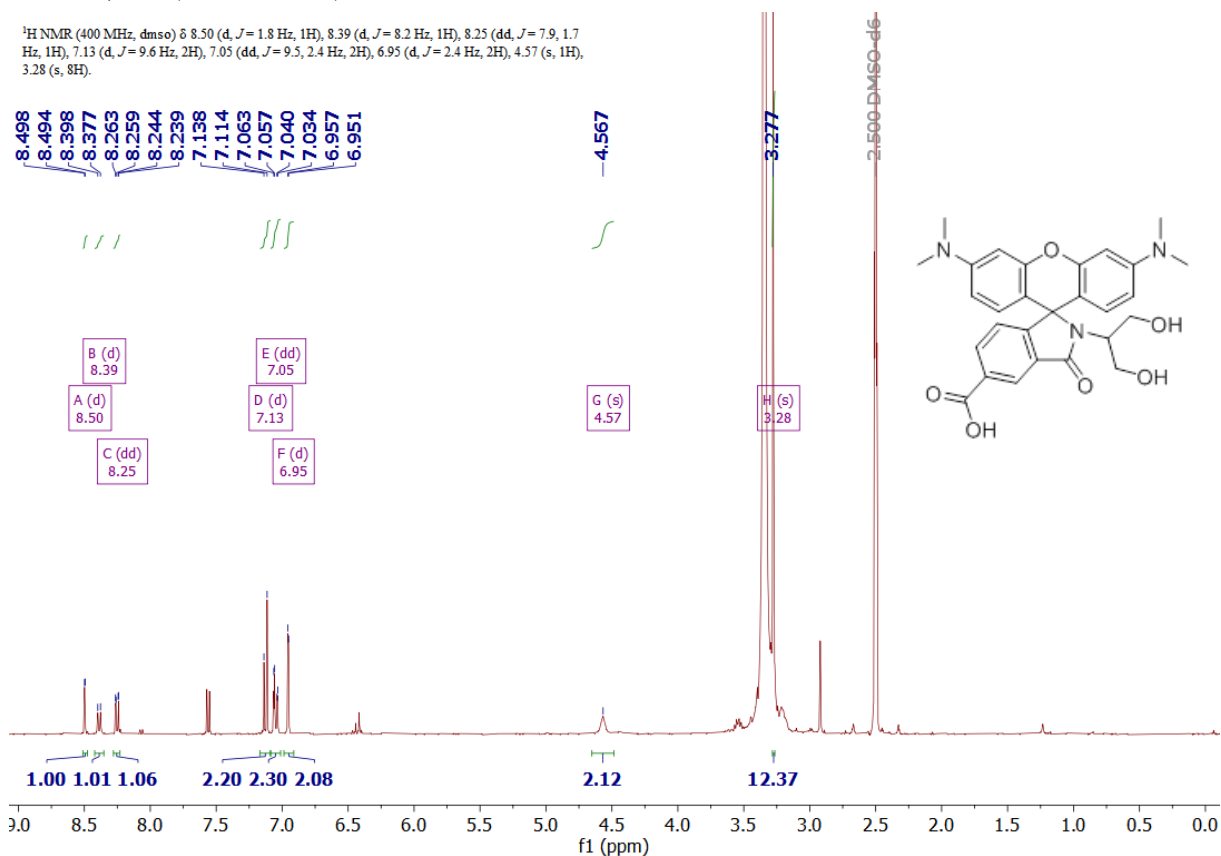
**5-Rh-H, N3 (5-TMR MH)**

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.25 (dd, J = 1.6, 0.7 Hz, 1H), 8.07 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 7.10 (dd, J = 8.0, 0.7 Hz, 1H), 6.49 – 6.34 (m, 3H), 3.27 (s, 1H), 3.08 – 2.94 (m, 2H), 2.92 (s, 7H).



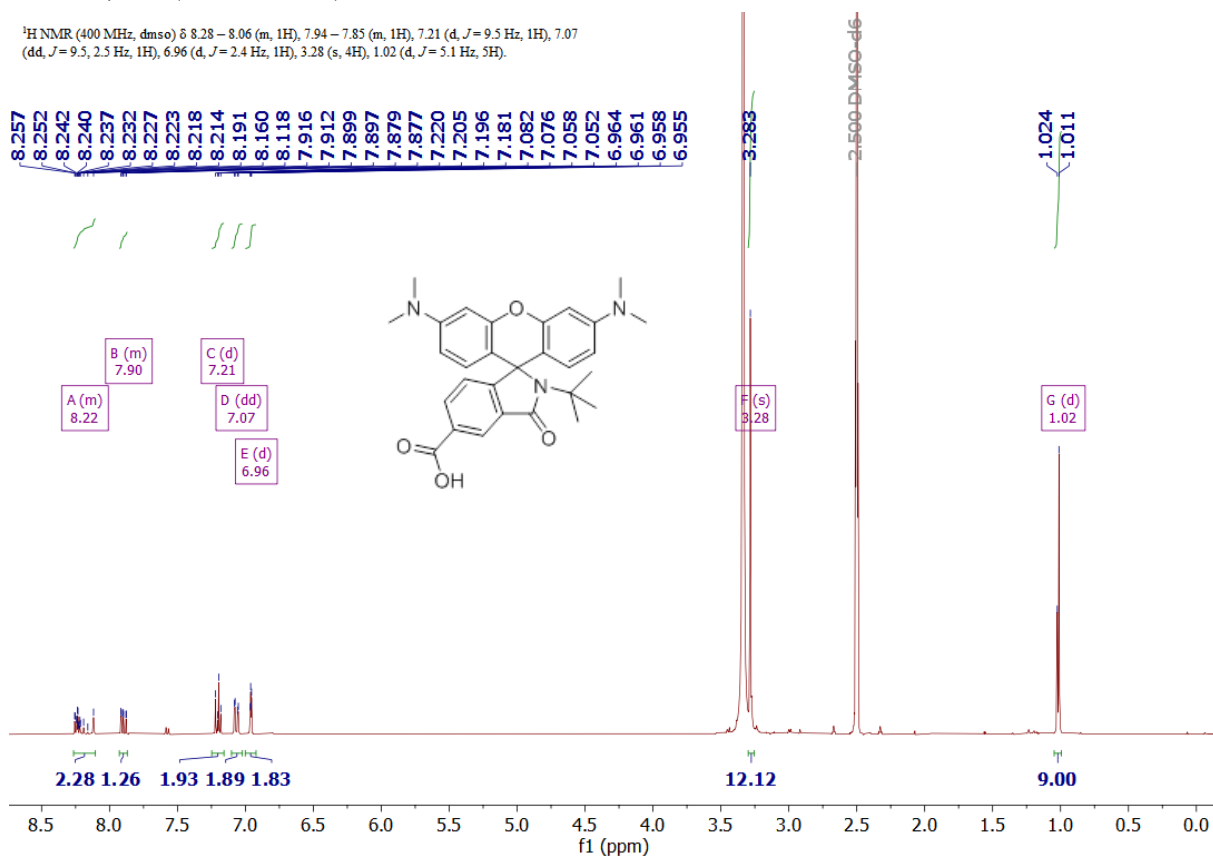
### 5-Rh-H, N4 (5-TMR DH)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, dmsO) δ 8.50 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.39 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.25 (dd, J = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 9.6 Hz, 2H), 7.05 (dd, J = 9.5, 2.4 Hz, 2H), 6.95 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 4.57 (s, 1H), 3.28 (s, 8H).

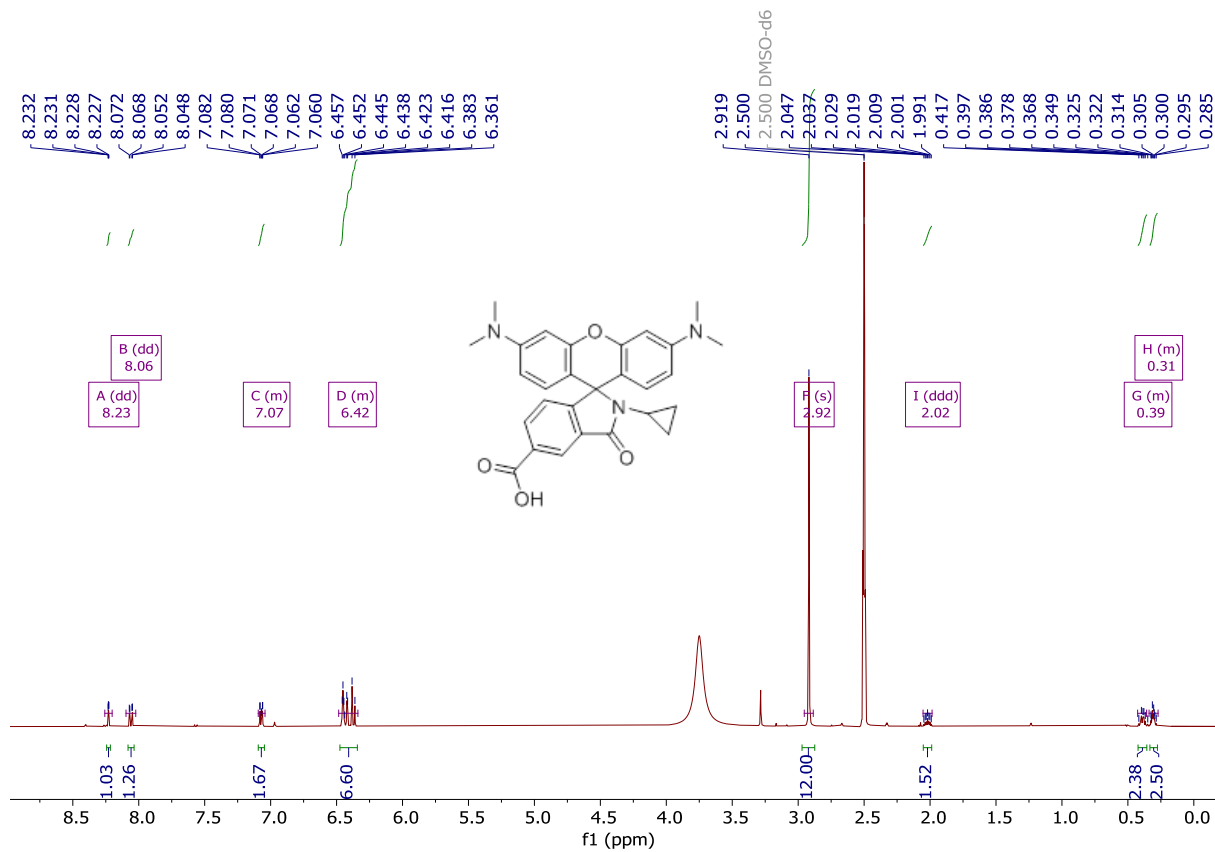


### 5-Rh-H, N5 (5-TMR tBu)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, dmsO) δ 8.28 – 8.06 (m, 1H), 7.94 – 7.85 (m, 1H), 7.21 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 7.07 (dd, J = 9.5, 2.5 Hz, 1H), 6.96 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 3.28 (s, 4H), 1.02 (d, J = 5.1 Hz, 5H).



**5-Rh-H, N6 (5-TMR CP)**



## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Wollman, Adam J. M.; Nudd, R.; Hedlund, E. G.; Leake, M. C. *Open Biol.* **2015** 5, 150019.
- [2] Renz, M. *Cytometry* **2013** 83, 767–779.
- [3] Lichtman, J. W.; Conchello, J.-A. *Nat Methods* **2005** 2, 910–919.
- [4] Wurm C.A., Neumann D., Schmidt R., Egner A., Jakobs S *Humana Press* **2009** 591.
- [5] Specht, E. A.; Braselmann, E.; Palmer, A. E. *Annu. Rev. Physiol.* **2017** 79, 93–117.
- [6] Chudakov, D. M.; Matz, M. V.; Lukyanov, S.; Lukyanov, K. A. *Physiological Reviews* **2010** 90, 1103–1163.
- [7] *The Nobel Prize in Chemistry 2008. NobelPrize.org // P-glycoproteins and multidrug resistance*, <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2008/summary/>, Sat. 16 Jan 2021 // 1996.
- [8] Bukhari, H.; Müller, T. *Trends in Cell Biology* **2019** 29, 912–928.
- [9] A. Miyawaki, T. Nagaiin H. Mizuno, *Engineering Fluorescent Proteins*, Springer, Berlin, Heidelberg, Vol. 95 **2005**.
- [10] A. Müller-Taubenberger, *Application of Fluorescent Protein Tags as Reporters in Live-Cell Imaging Studies*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, Vol. 346 **2006**.
- [11] Fernández-Suárez, M.; Ting, A. Y. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2008** 9, 929–943.
- [12] Leung, B. O.; Chou, K. C. *Appl Spectrosc* **2011** 65, 967–980.
- [13] Lord, S. J.; Lee, H. D.; Moerner, W. E. *Anal. Chem.* **2010** 82, 2192–2203.
- [14] Uno, S.; Tiwari, D. K.; Kamiya, M.; Arai, Y.; Nagai, T.; Urano, Y. *Microscopy (Tokyo)* **2015** 64, 263–277.
- [15] a) Lavis, L. D.; Raines, R. T. *ACS Chem. Biol.* **2008** 3, 142–155; b) Wiederschain, G. Y. *Biochemistry Moscow* **2011** 76, 1276.

- [16] Wang, L.; Frei, M. S.; Salim, A.; Johnsson, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2019** *141*, 2770–2781.
- [17] a) Chen, Z.; Cornish, V. W.; Min, W. *Current Opinion in Chemical Biology* **2013** *17*, 637–643; b) Chen, I.; Ting, A. Y. *Current Opinion in Biotechnology* **2005** *16*, 35–40; c) Kozma, E.; Kele, P. *Org. Biomol. Chem.* **2019** *17*, 215–233; d) Miller, L. W.; Cornish, V. W. *Current Opinion in Chemical Biology* **2005** *9*, 56–61; e) van de Linde, Sebastian; Heilemann, M.; Sauer, M. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2012** *63*, 519–540.
- [18] a) Keppler, A.; Gendreizig, S.; Gronemeyer, T.; Pick, H.; Vogel, H.; Johnsson, K. *Nat Biotechnol* **2003** *21*, 86–89; b) Keppler, A.; Pick, H.; Arrivoli, C.; Vogel, H.; Johnsson, K. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004** *101*, 9955–9959; c) Los, G. V.; Encell, L. P.; McDougall, M. G.; Hartzell, D. D.; Karassina, N.; Zimprich, C.; Wood, M. G.; Learish, R.; Ohana, R. F.; Urh, M.; Simpson, D.; Mendez, J.; Zimmerman, K.; Otto, P.; Vidugiris, G.; Zhu, J.; Darzins, A.; Klaubert, D. H.; Bulleit, R. F.; Wood, K. V. *ACS Chem. Biol.* **2008** *3*, 373–382.
- [19] Pegg, A. E. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **2000** *462*, 83–100.
- [20] Janssen, D. B. *Current Opinion in Chemical Biology* **2004** *8*, 150–159.
- [21] a) Lukinavičius, G.; Umezawa, K.; Olivier, N.; Honigmann, A.; Yang, G.; Plass, T.; Mueller, V.; Reymond, L.; Corrêa Jr, Ivan R.; Luo, Z.-G.; Schultz, C.; Lemke, E. A.; Heppenstall, P.; Eggeling, C.; Manley, S.; Johnsson, K. *Nature Chem* **2013** *5*, 132–139; b) Bottanelli, F.; Kromann, E. B.; Allgeyer, E. S.; Erdmann, R. S.; Wood Baguley, S.; Sirinakis, G.; Schepartz, A.; Baddeley, D.; Toomre, D. K.; Rothman, J. E.; Bewersdorf, J. *Nat Commun* **2016** *7*, 780; c) Gautier, A.; Juillerat, A.; Heinis, C.; Corrêa, I. R.; Kindermann, M.; Beaufils, F.; Johnsson, K. *Chemistry & Biology* **2008** *15*, 128–136.
- [22] Stagge, F.; Mitronova, G. Y.; Belov, V. N.; Wurm, C. A.; Jakobs, S.; Wang, Y. *PLoS ONE* **2013** *8*, e78745.

- [23] UniprotKB, P42212,  
<https://www.uniprot.org/uniparc/UIP0000002FB4?direct=yes&sort=score>, So. 17 Jan 2021.
- [24] Kang, M.-G.; Lee, H.; Kim, B. H.; Dunbayev, Y.; Seo, J. K.; Lee, C.; Rhee, H.-W.  
*Chem. Commun.* **2017** *53*, 9226–9229.
- [25] S. Schmitt, F. Pojer, M. Schiltzin K. Johnsson, *Crystal structure of SNAP-tag bound to its substrate benzylguanine*, <https://www.rcsb.org/structure/3KZZ>, 2010.
- [26] Sahl, S. J.; Hell, S. W.; Jakobs, S. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2017** *18*, 685–701.
- [27] Wang, L.; Frei, M. S.; Salim, A.; Johnsson, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2019** *141*, 2770–2781.
- [28] a) Zielonka, J.; Joseph, J.; Sikora, A.; Hardy, M.; Ouari, O.; Vasquez-Vivar, J.; Cheng, G.; Lopez, M.; Kalyanaraman, B. *Chem. Rev.* **2017** *117*, 10043–10120; b) UMEZAWA, H.; AOYAGI, T.; MORISHIMA, H.; MATSUZAKI, M.; HAMADA, M.; Takeushi, T. *J. Antibiot.* **1970** *23*, 259–262; c) Cortes, J. E.; Pazdur, R. *JCO* **1995** *13*, 2643–2655; d) Hornick, J. E.; Bader, J. R.; Tribble, E. K.; Trimble, K.; Breunig, J. S.; Halpin, E. S.; Vaughan, K. T.; Hinchcliffe, E. H. *Cell Motil. Cytoskeleton* **2008** *65*, 595–613; e) Jordan, M. A.; Toso, R. J.; Thrower, D.; Wilson, L. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **90** **1993**, 9552–9556; f) Latt, S. A.; Stetten, G. *J Histochem Cytochem.* **1976** *24*, 24–33; g) Latt, S. A.; Stetten, G.; Juergens, L. A.; Willard, H. F.; Scher, C. D. *J Histochem Cytochem.* **1975** *23*, 493–505; h) M. R. Bubb, A. M. J. Senderowicz, E. A. Sausville, K. L. K. Duncan, E. D. Kornis *J Biol Chem*, **269** **1994**, 14869–14871; i) Wulf, E.; Deboben, A.; Bautz, F. A.; Faulstich, H.; Wieland, T. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1979** *76*, 4498–4502.
- [29] a) Lukinavičius, G.; Mitronova, G. Y.; Schnorrenberg, S.; Butkevich, A. N.; Barthel, H.; Belov, V. N.; Hell, S. W. *Chem. Sci.* **2018** *9*, 3324–3334; b) Lukinavičius, G.; Blaukopf, C.; Pershagen, E.; Schena, A.; Reymond, L.; Derivery, E.; Gonzalez-Gaitan, M.; D’Este,



- E.; Hell, S. W.; Wolfram Gerlich, D.; Johnsson, K. *Nat Commun* **2015** *6*, 453; c) Milroy, L.-G.; Rizzo, S.; Calderon, A.; Ellinger, B.; Erdmann, S.; Mondry, J.; Verveer, P.; Bastiaens, P.; Waldmann, H.; Dehmelt, L.; Arndt, H.-D. *J. Am. Chem. Soc.* **2012** *134*, 8480–8486; d) Nakamura, A.; Takigawa, K.; Kurishita, Y.; Kuwata, K.; Ishida, M.; Shimoda, Y.; Hamachi, I.; Tsukiji, S. *Chem. Commun.*, *50* **2014**, 6149–6152.
- [30] a) Lukinavičius, G.; Reymond, L.; D'Este, E.; Masharina, A.; Göttfert, F.; Ta, H.; Güther, A.; Fournier, M.; Rizzo, S.; Waldmann, H.; Blaukopf, C.; Sommer, C.; Gerlich, D. W.; Arndt, H.-D.; Hell, S. W.; Johnsson, K. *Nat Methods* **2014** *11*, 731–733; b) Grimm, F.; Nizamov, S.; Belov, V. N. *ChemBioChem* **2019** *20*, 2248–2254.
- [31] a) Milroy, L.-G.; Rizzo, S.; Calderon, A.; Ellinger, B.; Erdmann, S.; Mondry, J.; Verveer, P.; Bastiaens, P.; Waldmann, H.; Dehmelt, L.; Arndt, H.-D. *J. Am. Chem. Soc.* **2012** *134*, 8480–8486; b) Belov, V. N.; Stoldt, S.; Rüttger, F.; John, M.; Seikowski, J.; Schimpfhauser, J.; Hell, S. W. *J. Org. Chem.* **2020** *85*, 7267–7275.
- [32] a) Gerasimaitė, R.; Seikowski, J.; Schimpfhauser, J.; Kostiuk, G.; Gilat, T.; D'Este, E.; Schnorrenberg, S.; Lukinavičius, G. *Org. Biomol. Chem.* **2020** *18*, 2929–2937; b) D'Este, E.; Kamin, D.; Göttfert, F.; El-Hady, A.; Hell, S. W. *Cell Reports* **2015** *10*, 1246–1251.
- [33] Dervan, P. *Science* **1986** *232*, 464–471.
- [34] Haq, I.; Ladbury, J. E.; Chowdhry, B. Z.; Jenkins, T. C.; Chaires, J. B. *Journal of Molecular Biology* **1997** *271*, 244–257.
- [35] a) Zhang, X.; Ye, Z.; Zhang, X.; Man, H.; Huang, Z.; Li, N.; Xiao, Y. *Chem. Commun.* **2019** *55*, 1951–1954; b) Bucevičius, J.; Keller-Findeisen, J.; Gilat, T.; Hell, S. W.; Lukinavičius, G. *Chem. Sci.* **2019** *10*, 1962–1970; c) Lukinavičius, G.; Blaukopf, C.; Pershagen, E.; Schena, A.; Reymond, L.; Derivery, E.; Gonzalez-Gaitan, M.; D'Este, E.; Hell, S. W.; Wolfram Gerlich, D.; Johnsson, K. *Nat Commun* **2015** *6*, 453; d) Nakamura,

- A.; Takigawa, K.; Kurishita, Y.; Kuwata, K.; Ishida, M.; Shimoda, Y.; Hamachi, I.; Tsukiji, S. *Chem. Commun.* **2014** *50*, 6149–6152.
- [36] a) Ross, M. F.; Kelso, G. F.; Blaikie, F. H.; James, A. M.; Cochemé, H. M.; Filipovska, A.; Da Ros, T.; Hurd, T. R.; Smith, R. A. J.; Murphy, M. P. *Biochemistry (Moscow)*, **70** **2005**, 222–230; b) Smith, R. A.; Hartley, R. C.; Murphy, M. P. *Antioxidants & Redox Signaling*, **15** **2011**, 3021–3038; c) Smith, R. A.; Hartley, R. C.; Cochemé, H. M.; Murphy, M. P. *Trends in Pharmacological Sciences* **2012** *33*, 341–352.
- [37] M. Fusek, M. Maresin V. Vetvicka, *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press **2013**.
- [38] Chen, C.-S.; Chen, W.-N. U.; Zhou, M.; Arttamangkul, S.; Haugland, R. P. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2000** *42*, 137–151.
- [39] a) Haraguchi, T.; Kaneda, T.; Hiraoka, Y. *Genes Cells* **1997** *2*, 369–380; b) Kühholzer, B.; Prather, R. S. *Animal Reproduction Science* **2001** *66*, 109–116; c) Sen, O.; Saurin, A. T.; Higgins, Jonathan M. G. *Sci Rep* **2018** *8*, 111.
- [40] Bucevičius, J.; Kostiuk, G.; Gerasimaitė, R.; Gilat, T.; Lukinavičius, G. *Chem. Sci.* **2020** *11*, 7313–7323.
- [41] a) Wang, Q.; Parrish, A. R.; Wang, L. *Chemistry & Biology* **2009** *16*, 323–336; b) Liu, C. C.; Schultz, P. G. *Annu. Rev. Biochem.* **2010** *79*, 413–444; c) Spicer, C. D.; Davis, B. G. *Nat Commun* **2014** *5*, 1281.
- [42] a) Liu, W.; Brock, A.; Chen, S.; Chen, S.; Schultz, P. G. *Nat Methods* **2007** *4*, 239–244; b) Chin, J. W. *Science* **2003** *301*, 964–967; c) Klass, K.-D. *Science* **2002** *296*, 1456–1459.
- [43] a) Wang, Y.-S.; Russell, W. K.; Wang, Z.; Wan, W.; Dodd, L. E.; Pai, P.-J.; Russell, D. H.; Liu, W. R. *Mol. BioSyst.* **2011** *7*, 714; b) Blight, S. K.; Larue, R. C.; Mahapatra, A.; Longstaff, D. G.; Chang, E.; Zhao, G.; Kang, P. T.; Green-Church, K. B.; Chan, M. K.;

- Krzycki, J. A. *Nature* **2004** *431*, 333–335; c) Mukai, T.; Kobayashi, T.; Hino, N.; Yanagisawa, T.; Sakamoto, K.; Yokoyama, S. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2008** *371*, 818–822; d) Polycarpo, C.; Ambrogelly, A.; Berube, A.; Winbush, S. M.; McCloskey, J. A.; Crain, P. F.; Wood, J. L.; Soll, D. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004** *101*, 12450–12454; e) Wang, Y.-S.; Fang, X.; Wallace, A. L.; Wu, B.; Liu, W. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2012** *134*, 2950–2953.
- [44] Dumas, A.; Lercher, L.; Spicer, C. D.; Davis, B. G. *Chem. Sci.* **2015** *6*, 50–69.
- [45] a) Fan, X.; Ge, Y.; Lin, F.; Yang, Y.; Zhang, G.; Ngai, William Shu Ching; Lin, Z.; Zheng, S.; Wang, J.; Zhao, J.; Li, J.; Chen, P. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016** *55*, 14046–14050; b) Nikić, I.; Plass, T.; Schraidt, O.; Szymański, J.; Briggs, John A. G.; Schultz, C.; Lemke, E. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014** *53*, 2245–2249; c) Plass, T.; Milles, S.; Koehler, C.; Szymański, J.; Mueller, R.; Wießler, M.; Schultz, C.; Lemke, E. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012** *51*, 4166–4170.
- [46] a) Kozma, E.; Estrada Girona, G.; Paci, G.; Lemke, E. A.; Kele, P. *Chem. Commun.* **2017** *53*, 6696–6699; b) Wieczorek, A.; Werther, P.; Euchner, J.; Wombacher, R. *Chem. Sci.* **2017** *8*, 1506–1510; c) Wieczorek, A.; Buckup, T.; Wombacher, R. *Org. Biomol. Chem.* **2014** *12*, 4177–4185.
- [47] Drexhage, K. H. *J. RES. NATL. BUR. STAN. SECT. A.* **1976** *80A*, 421.
- [48] a) Butkevich, A. N.; Belov, V. N.; Kolmakov, K.; Sokolov, V. V.; Shojaei, H.; Sidenstein, S. C.; Kamin, D.; Matthias, J.; Vlijm, R.; Engelhardt, J.; Hell, S. W. *Chem. Eur. J.* **2017** *23*, 12114–12119; b) Butkevich, A. N.; Mitronova, G. Y.; Sidenstein, S. C.; Klocke, J. L.; Kamin, D.; Meineke, Dirk N. H.; D'Este, E.; Kraemer, P.-T.; Danzl, J. G.; Belov, V. N.; Hell, S. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016** *55*, 3290–3294; c) Butkevich, A. N.; Ta, H.; Ratz, M.; Stoldt, S.; Jakobs, S.; Belov, V. N.; Hell, S. W. *ACS Chem. Biol.* **2018** *13*, 475–480; d) Grimm, J. B.; Muthusamy, A. K.; Liang, Y.; Brown, T. A.; Lemon,

- W. C.; Patel, R.; Lu, R.; Macklin, J. J.; Keller, P. J.; Ji, N.; Lavis, L. D. *Nat Methods* **2017** *14*, 987–994; e) Grimm, J. B.; English, B. P.; Chen, J.; Slaughter, J. P.; Zhang, Z.; Revyakin, A.; Patel, R.; Macklin, J. J.; Normanno, D.; Singer, R. H.; Lionnet, T.; Lavis, L. D. *Nat Methods* **2015** *12*, 244–250; f) Iwatate, R. J.; Kamiya, M.; Urano, Y. *Chem. Eur. J.* **2016** *22*, 1696–1703; g) Koide, Y.; Urano, Y.; Hanaoka, K.; Terai, T.; Nagano, T. *ACS Chem. Biol.* **2011** *6*, 600–608; h) Lukinavičius, G.; Umezawa, K.; Olivier, N.; Honigmann, A.; Yang, G.; Plass, T.; Mueller, V.; Reymond, L.; Corrêa Jr, Ivan R.; Luo, Z.-G.; Schultz, C.; Lemke, E. A.; Heppenstall, P.; Eggeling, C.; Manley, S.; Johnsson, K. *Nature Chem* **2013** *5*, 132–139; i) Uno, S.; Kamiya, M.; Yoshihara, T.; Sugawara, K.; Okabe, K.; Tarhan, M. C.; Fujita, H.; Funatsu, T.; Okada, Y.; Tobita, S.; Urano, Y. *Nature Chem* **2014** *6*, 681–689; j) Wang, L.; Tran, M.; D’Este, E.; Roberti, J.; Koch, B.; Xue, L.; Johnsson, K. *Nat. Chem.* **2020** *12*, 165–172; k) Zheng, Q.; Ayala, A. X.; Chung, I.; Weigel, A. V.; Ranjan, A.; Falco, N.; Grimm, J. B.; Tkachuk, A. N.; Wu, C.; Lippincott-Schwartz, J.; Singer, R. H.; Lavis, L. D. *ACS Cent. Sci.* **2019** *5*, 1602–1613.
- [49] Beija, M.; Afonso, C. A. M.; Martinho, J. M. G. *Chemical Society reviews* **2009** *38*, 2410–2433.
- [50] a) Grimm, J. B.; Tkachuk, A. N.; Xie, L.; Choi, H.; Mohar, B.; Falco, N.; Schaefer, K.; Patel, R.; Zheng, Q.; Liu, Z.; Lippincott-Schwartz, J.; Brown, T. A.; Lavis, L. D. *Nat Methods* **2020** *17*, 815–821; b) Kolmakov, K.; Belov, V. N.; Bierwagen, J.; Ringemann, C.; Müller, V.; Eggeling, C.; Hell, S. W. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2010** *16*, 158–166; c) Kolmakov, K.; Belov, V. N.; Wurm, C. A.; Harke, B.; Leutenegger, M.; Eggeling, C.; Hell, S. W. *Eur. J. Org. Chem.* **2010** *2010*, 3593–3610; d) Kolmakov, K.; Wurm, C. A.; Meineke, Dirk N. H.; Göttfert, F.; Boyarskiy, V. P.; Belov, V. N.; Hell, S. W. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2014** *20*, 146–157; e) Mitronova, G. Y.; Belov, V. N.; Bossi, M. L.; Wurm, C. A.; Meyer, L.;

- Medda, R.; Moneron, G.; Bretschneider, S.; Eggeling, C.; Jakobs, S.; Hell, S. W. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2010** *16*, 4477–4488; f) Wang, L.; Du, W.; Hu, Z.; Uvdal, K.; Li, L.; Huang, W. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2019** *58*, 14026–14043.
- [51] Hinckley, D. A.; Seybold, P. G. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* **1988** *44*, 1053–1059.
- [52] a) Cavallo, L.; Moore, M. H.; Corrie, J. E. T.; Fraternali, F. *J. Phys. Chem. A* **2004** *108*, 7744–7751; b) Chi, W.; Qi, Q.; Lee, R.; Xu, Z.; Liu, X. *J. Phys. Chem. C* **2020** *124*, 3793–3801; c) Chi, W.; Qiao, Q.; Wang, C.; Zheng, J.; Zhou, W.; Xu, N.; Wu, X.; Jiang, X.; Tan, D.; Xu, Z.; Liu, X. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2020** *59*, 20215–20223.
- [53] M. W. Davidson, M. Abramowitz, *Optical Microscopy*, <https://static2.olympus-lifescience.com/data/olympusmicro/primer/microscopy.pdf?rev=3869>, Mo. 18 Jan 2021.
- [54] Jablonski, A. *Nature* **1933** *131*, 839–840.
- [55] Minsky, M. *Scanning* **1988** *10*, 128–138.
- [56] M. Born, E. Wolf, A. B. Bhatia, P. C. Clemmow, D. Gabor, A. R. Stokes, A. M. Taylor, P. A. Waymanin W. L. Wilcock, *Principles of Optics*, Cambridge University Press **2013**.
- [57] Hell, S. W. *Science* **2007** *316*, 1153–1158.
- [58] Hell, S. W. *Nat Biotechnol* **2003** *21*, 1347–1355.
- [59] a) Dyba, M.; Hell, S. W. *Applied optics* **2003** *42*, 5123–5129; b) Eggeling, C.; Widengren, J.; Rigler, R.; Seidel, C. A. *Anal. Chem.* **1998** *70*, 2651–2659.
- [60] Donnert, G.; Keller, J.; Wurm, C. A.; Rizzoli, S. O.; Westphal, V.; Schönle, A.; Jahn, R.; Jakobs, S.; Eggeling, C.; Hell, S. W. *Biophysical journal* **2007** *92*, L67-9.
- [61] a) Belov, V. N.; Wurm, C. A.; Boyarskiy, V. P.; Jakobs, S.; Hell, S. W. *Angew. Chem.* **2010** *122*, 3598–3602; b) Wysocki, L. M.; Grimm, J. B.; Tkachuk, A. N.; Brown, T. A.;

- Betzig, E.; Lavis, L. D. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2011** *50*, 11206–11209; c) Belov, V. N.; Bossi, M. L.; Fölling, J.; Boyarskiy, V. P.; Hell, S. W. *Chem. Eur. J.* **2009** *15*, 10762–10776; d) Ye, Z.; Yu, H.; Yang, W.; Zheng, Y.; Li, N.; Bian, H.; Wang, Z.; Liu, Q.; Song, Y.; Zhang, M.; Xiao, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2019** *141*, 6527–6536; e) Roubinet, B.; Bischoff, M.; Nizamov, S.; Yan, S.; Geisler, C.; Stoldt, S.; Mitronova, G. Y.; Belov, V. N.; Bossi, M. L.; Hell, S. W. *J. Org. Chem.* **2018** *83*, 6466–6476; f) Fölling, J.; Belov, V.; Kunetsky, R.; Medda, R.; Schönle, A.; Egner, A.; Eggeling, C.; Bossi, M.; Hell, S. W. *Angew. Chem.* **2007** *119*, 6382–6386.
- [62] Aquino, D.; Schönle, A.; Geisler, C.; Middendorff, C. V.; Wurm, C. A.; Okamura, Y.; Lang, T.; Hell, S. W.; Egner, A. *Nat Methods* **2011** *8*, 353–359.
- [63] Li, H.; Guan, H.; Duan, X.; Hu, J.; Wang, G.; Wang, Q. *Org. Biomol. Chem.* **2013** *11*, 1805–1809.
- [64] Liu, C.; Best, Q. A.; Suarez, B.; Pertile, J.; McCarroll, M. E.; Scott, C. N. *Journal of fluorescence* **2015** *25*, 231–237.
- [65] Yuan, L.; Lin, W.; Feng, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2011** *9*, 1723–1726.
- [66] a) Roubinet, B.; Bischoff, M.; Nizamov, S.; Yan, S.; Geisler, C.; Stoldt, S.; Mitronova, G. Y.; Belov, V. N.; Bossi, M. L.; Hell, S. W. *J. Org. Chem.* **2018** *83*, 6466–6476; b) Czaplyski, W. L.; Purnell, G. E.; Roberts, C. A.; Allred, R. M.; Harbron, E. J. *Org. Biomol. Chem.* **2014** *12*, 526–533.
- [67] Bucevičius, J.; Gilat, T.; Lukinavičius, G.; Lukinavičius, G. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2020** *56*, 14797–14800.
- [68] a) Chen, Y.; Tsao, K.; Keillor, J. W. *Can. J. Chem.* **2015** *93*, 389–398; b) Hori, Y.; Kikuchi, K. *Current Opinion in Chemical Biology* **2013** *17*, 644–650; c) Nadler, A.; Schultz, C. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2013** *52*, 2408–2410.

- [69] Nakamura, A.; Tsukiji, S. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2017** *27*, 3127–3130.
- [70] Bellamy, W. T. *Annual review of pharmacology and toxicology* **1996** *36*, 161–183.
- [71] Dellinger, M.; Gèze, M. *Journal of microscopy* **2001** *204*, 196–202.
- [72] Breusegem, S. Y.; Clegg, R. M.; Loontjens, F. G. *Journal of Molecular Biology* **2002** *315*, 1049–1061.
- [73] Devi, M.; Dhir, A.; Pradeep, C. P. *Eur. J. Org. Chem.* **2015** *2015*, 4650–4657.
- [74] Bucevičius, J.; Lukinavičius, G.; Gerasimaitė, R. *Chemosensors* **2018** *6*, 18.
- [75] Purschke, M.; Rubio, N.; Held, K. D.; Redmond, R. W. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **2010** *9*, 1634–1639.
- [76] Grimm, F.; Rehman, J.; Stoldt, S.; Khan, T. A.; Schlötel, J. G.; Nizamov, S.; John, M.; Belov, V. N.; Hell, S. W. *Chem. Eur. J.* **2021** *27*, 6070–6076.
- [77] a) Neil, R. J.; Peach, M. E. *Journal of Fluorine Chemistry* **1972** *1*, 257–267; b) Mitronova, G. Y.; Polyakova, S.; Wurm, C. A.; Kolmakov, K.; Wolfram, T.; Meineke, Dirk N. H.; Belov, V. N.; John, M.; Hell, S. W. *Eur. J. Org. Chem.* **2015** *2015*, 337–349.
- [78] Halabi, E. A.; Püntener, S.; Rivera-Fuentes, P. *HCA* **2018** *101*, e1800165.
- [79] a) Thoma, P. Buehlmayer, M. van Eis, A. B. Smith (Novartis AG), WO 2014/027300.; b) Y. Arikava, Q. Dong, V. Feher, B. Jones, B. Lam, Z. Nie, C. Smith, M. Takahashi (Takeda Ltd.), US 2011/0152273 A1.23.06.2011.; c) Z. Nie, R. Chen, M. Kono, B. Lam, M. Lardy, S. Reddy, S. Wilkins (Takeda Ltd.), WO 2012/177714 A1.27.12.2012.





## 8 Danksagung

Ich darf es mir nun erlauben aus einer wissenschaftlich distanzierten Betrachtungsweise herauszutreten, um mich ganz persönlich mit den letzten Sätzen dieser Arbeit direkt an die Personen zu wenden, die durch ihr Wirken und Handeln einen Beitrag an diesem Schriftstück geleistet haben.

Bei Andreas Janshoff möchte ich mich aufrichtig bedanken, da er sich mir sofort nach einem ersten kurzen Gespräch zum Projektvorhaben als Erstbetreuer angenommen und mich in diesen 4 Jahren begleitet hat. Die Anfertigung meiner Promotionsarbeit an der Georg-August-Universität wurde dadurch erst ermöglicht.

Bei Herrn Belov bedanke ich mich für die intensive Betreuung, den vielen projektbezogenen Ideen, die ausgiebigen wissenschaftlichen Diskussionen und der geschaffenen Möglichkeit an Messinstrumenten in der Abteilung für NanoBiophotonik arbeiten zu können. Sein stets kritisches und konstruktives Lesen wissenschaftlicher Texte hat mir gezeigt, wie aneinandergereihte Worte zu sinnhaften Schriftstücken ausgearbeitet werden können.

Marina Bennati, Alexander Egner, Silvio Rizzoli und Kai Tittmann danke ich für die sofortige Zustimmung als Mitglied in meinem Prüfungskomitee beigetreten zu sein.

Bei Gerald Donnert möchte ich mich für die geschaffene Möglichkeit bedanken, meine Promotionsarbeit bei der Abberior GmbH anfertigen zu können. Als Geschäftsführer der Abberior GmbH hat er mir bei der Bearbeitung von Projekten stets freie Hand gelassen und ein enormes Vertrauen entgegengebracht.

Shamil Nizamov gebührt ein großer Dank. Viele bei mir aufgetretenen Probleme im chemischen Laboraltag wären ohne seine langjährige Erfahrung in der organisch chemischen Synthese wesentlich holpriger und erhebliche langsamer aus dem Weg geschaffen worden.

Ohne seine vielen Ideen und die wissenschaftlichen Diskussionen würden einigen Erkenntnissen in dieser Arbeit fehlen.

Die Fähigkeiten, komplexe Sachverhalte auf das Wesentliche herunterbrechen zu können, kombiniert mit einer unermüdlichen Bereitschaft jederzeit zu helfen, gibt mir Anlass mich bei Christian Wurm zu bedanken. Zu allen Fragen rund um die Mikroskopie und biologische Sachverhalte habe ich immer Antworten bei ihm finden können. Die vielen Diskussionen mit ihm zeigten mir jedes Mal die scheinbar unbegrenzten Anwendungsmöglichkeiten von fluoreszierenden Sonden in biologischen Systemen auf. Das macht Mut und gibt Motivation in diesem Bereich weiterhin tätig sein zu wollen.

Für die stets angenehme, freundschaftliche und ergebnisreiche Zusammenarbeit möchte ich Jasmin Rehmann danken. Einige der in dieser Arbeit abgebildeten Mikroskopieaufnahmen sind vor allem durch ihre Mühen entstanden.

Es erschien mir schon damals eine gute Wahl, in einem wirtschaftlichen Unternehmen, was dennoch sehr nah an der Wissenschaft arbeitet und in dem fast alle naturwissenschaftlichen Bereiche interdisziplinär abgedeckt werden, zu promovieren. Bis zum heutigen Tag hat sich diese Meinung bei mir nicht geändert. Es sind die ausgesprochen freundlichen und stets hilfsbereiten Kolleg\*innen, die vielen Fachbereiche, die diversen und spannenden Projekte und die fortschreitenden Entwicklungen dieser zwei wachsenden Firmen, durch die die Arbeit bei Abberior und Abberior-Instruments immer spannend blieb und die Motivation Neues zu erlernen aufrecht erhalten wurde. Dem kompletten Team von Abberior und Abberior-Instruments möchte ich daher meinen aufrichtigen Dank für die vielen großartigen Jahre zukommen lassen, in denen ich so viel lernen durfte.

Ferner bedanke ich mich bei den Mitarbeiter\*innen der Abteilung für biophysikalischen Chemie am IPC für die interessanten Seminare, angenehmen Diskussionsrunden und teils gemeinsam durchgeführten Lehrveranstaltungen. In dem Zusammenhang geht ein großer Dank

an Tabea Oswald und Angela Rübeling die mir bei den Viabilitätstests tatkräftig geholfen haben.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeiter\*innen der Abteilung für *Optical Nanoscopy* im IFNANO für die gute erfolgreiche Zusammenarbeit in diversen Projekten und der freundlichen Bereitschaft, Labore und Gerätschaften mit nutzen zu dürfen.

Gražvydas Lukinavičius und Jonas Bucevicius aus der Forschungsgruppe *Chromatin Labeling & Imaging* möchte ich für die vielen und guten Gespräche über die Synthese von fluoreszierenden Sonden und die Hilfsbereitschaft bei den biochemischen Analysen danken.

Für die analytischen Messungen von NMR- und Massenspektren chemischer Substanzen danke ich Herrn Bienert, dem Team um Herrn Frauendorf und dem Team um Herrn John.

Bei dem Bundesministerium für Bildung und Forschung und bei dem Bundesministerium für Wirtschaft und Energie möchte ich mich für die finanzielle Förderung der Forschungsprojekte bedanken.

Ein so langes Studium mit einer am Ende stehenden Promotion ist kaum durchzuhalten, wenn keine Möglichkeit besteht, auf den Rückhalt von Familie und guten und langjährigen Freund\*innen zurückgreifen zu können. Ich bin froh und überaus dankbar Menschen an meiner Seite zu wissen, die mich erden, die meinen Alltag durchbrechen, die mich stützen, prägen, leiten und anspornen, die mir auf dem beschwerlichen Weg zur Promotion stets gute Leidensgenossen waren, und die mit ihrem Dasein eine Beständigkeit schaffen, die mir überaus viel Kraft gibt. Mein aufrichtiger Dank geht an Ina, Daniel & Janosch; an Juliane, Hector & Amalia; an Anna & Sarah; an Patrizia, Philip & Charlotta; an Christa, Christof & Julian; an Dana; an Christin; an Steffi; an Katharina & Patrick; an Julia & Marcel; an Constantin; an Kora, Paul-Henry & Luisa; an Jasmin und an Sophie, Ricardo & Fritz. Es ist ein überaus großes Gut, so viele vertraute Menschen um sich haben zu dürfen.

Kurz vor der Fertigstellung meiner Abschlussarbeit fand mein Vater ein altes Bild, welches vor etwa 25 Jahren aufgenommen wurde. Es zeigt meine Schwester und mich als Kinder, wie wir glücklich unsere Weihnachtsgeschenke der Kamera präsentieren. In meiner Hand halte ich ein kleines Mikroskop, was es mir immerhin ermöglichte Zwiebelhaut oder ein menschliches Haar zu untersuchen. Vielleicht war dies der Zeitpunkt, an dem in mir das Interesse wuchs, zu erkunden welche schon fast künstlerisch erscheinenden Mikrostrukturen die Natur für uns bereithält. Hätten meine Eltern erahnt, dass dieses aufkeimende Interesse an der Natur möglicherweise in ein 10 Jahre andauerndes Studium mündet, das Weihnachtsgeschenk hätte vielleicht anders ausgesehen. Meinen lieben Eltern gebührt ein außerordentlicher Dank, da sie zu jeder Zeit ihre eigenen Interessen hinter die Bedürfnisse und Wünsche ihrer Kinder gestellt haben. Ihr habt uns immer unterstützt und gleichzeitig uns unseren eigenen Weg frei wählen lassen. Von ganzem Herzen, vielen Dank!