

9 Fluoreszenzspektroskopie

9.1 Fluoreszenzspektren von 1,2-Diaryl-, 1,2,4-Triaryl- und 1,2,4,5-Tetraaryl-1H-imidazolen sowie 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4H-indeno[2,3-d]imidazol

Um festzustellen, ob die neu synthetisierten Verbindungen in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen oder in quantitativen Experimenten zur Aufklärung der Signaltransduktion oder zu Aufnahmestudien in Zellkulturen eingesetzt werden können, wurden Fluoreszenzspektren in 0.1 M HCl, 0.1 M NaOH und in PBS-Puffer aufgenommen. Die Untersuchungen wurden mit einem Exitationsspalt von 8 nm und einem Emissionsspalt von 11 nm durchgeführt. Die Scangeschwindigkeit betrug 100 nm/min. Die Konzentration aller untersuchten Verbindungen lag bei 10^{-5} M. In den Spektren wurde die Bande der eingestrahlten Wellenlänge, die Bande des emittierten Lichts sowie die Bande für die Streuung 2. Ordnung aufgezeichnet (Abb. 28 - 33).

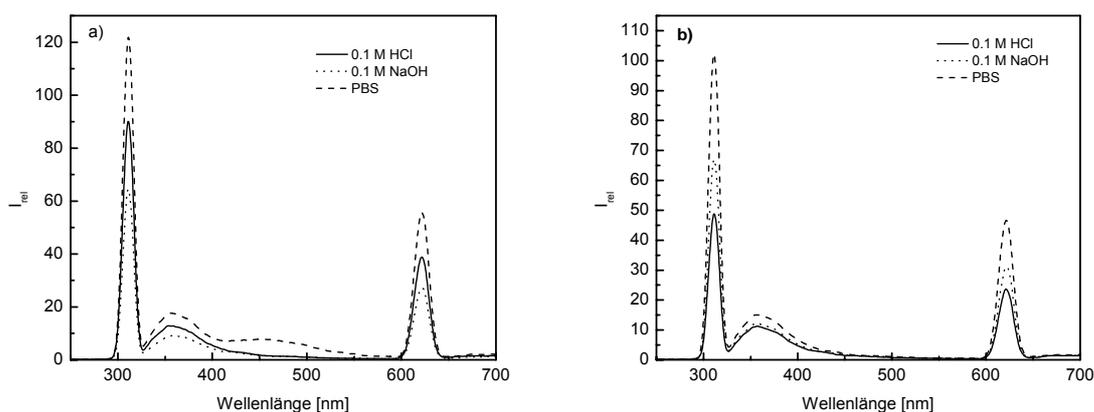


Abbildung 28. Fluoreszenzspektren der Verbindung **116** (a) und **19** (b) bei pH 7.3 in PBS, pH 0.4 in 0.1 M HCl und bei pH 14.0 in 0.1 M NaOH bei einer Exitationswellenlänge von 310 nm.

Für die Verbindungen **116** und **19**, deren auxochrome Gruppen einen starken -I-Effekt aufweisen, konnte keine nennenswerte Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abb.28). Die ethylierten 1,2,4-Triaryl-1H-imidazole **18** und **123** wurden mit einer Exitationswellenlänge von 310 nm und 300 nm angeregt. Für beide Verbindungen wurde ein bathochromer Shift des Emissionsmaximums vom sauren über das alkalische zum neutralen Milieu festgestellt (355 nm → 358 nm → 415 nm, **18**; 356 nm → 359 (und 420 nm) → 389 nm **123**). Die Emissionsintensitäten im sauren und alkalischen Medium betragen dabei nur ein 1/7 derer in PBS-Puffer (Abb. 29).

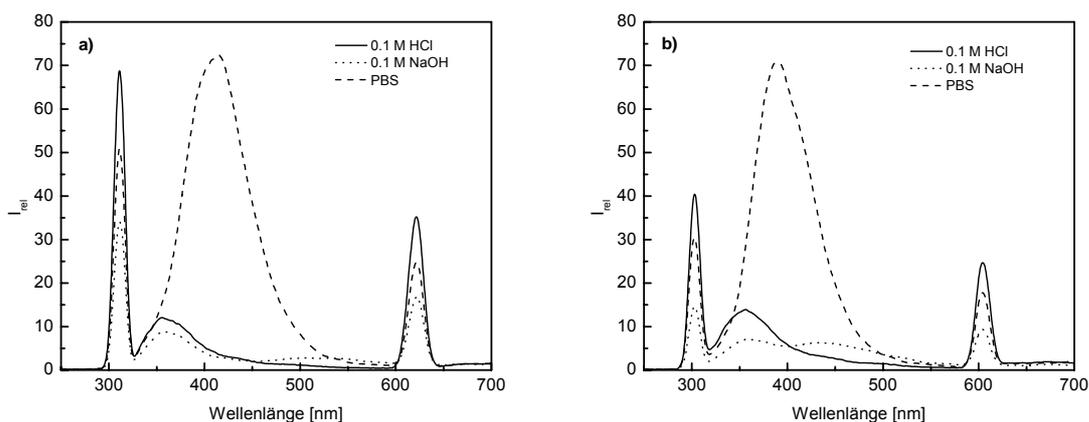


Abbildung 29. Fluoreszenzspektren der Verbindung **18** (a) und **123** (b) bei pH 7.3 in PBS, pH 0.4 in 0.1 M HCl und bei pH 14.0 in 0.1 M NaOH.

Das 1,2,4,5-Tetraaryl-1*H*-imidazol **127** zeigt bei einer Anregungswellenlänge von 312 nm ebenfalls Fluoreszenz (Abb. 30 a). Anders als bei den ethylierten Verbindungen **18** und **123** tritt bei diesem 1*H*-Imidazol die stärkste Emission im alkalischen Medium bei 444 nm auf, gefolgt von der Emission im neutralen Milieu bei 408 nm. Für die protonierte Form wurde wie für alle anderen Verbindungen nur eine schwache Emission bei 356 nm detektiert.

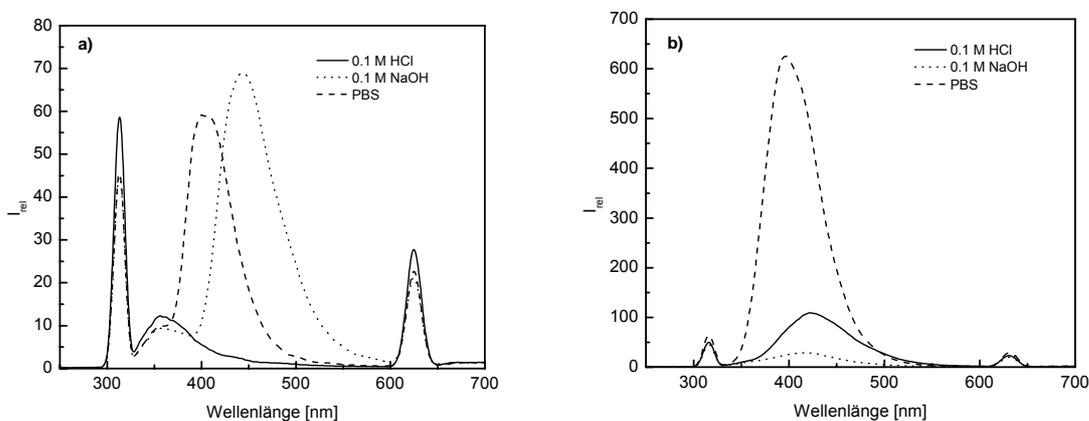


Abbildung 30. Fluoreszenzspektren der Verbindung **127** (a) und **144** (b) bei pH 7.3 in PBS, pH 0.4 in 0.1 M HCl und bei pH 14.0 in 0.1 M NaOH.

Das 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4*H*-indeno[2,3-*d*]imidazol (**144**) zeigt mit einer 10-fach höheren Intensität der Emission in PBS-Puffer die stärkste Fluoreszenz aller untersuchten Verbindungen. Der +M-Effekt der Protonierung der Imidazolteilstruktur im sauren Medium verringert die Emission auf ein 1/6, sie liegt damit aber in der Intensität noch über der aller

anderen untersuchten Verbindungen in PBS. Die Deprotonierung der phenolischen Gruppen reduziert die Emissionsintensität weiter auf 1/4 des Niveaus im sauren Milieu (Abb. 30b).

Die Anregungswellenlängen für die Verbindungen **18**, **19**, **116**, **123**, **127** und **144** liegen zwischen 300 nm und 315 nm. Die Maxima der Emissionswellenlängen traten zwischen 355 nm und 444 nm auf (Tab. 9).

Tabelle 9. Excitations- und Emissionswellenlängen der Verbindungen **18**, **19**, **116**, **123**, **127** und **144**, aufgenommen in 0.1 M Salzsäure und Natronlauge sowie in PBS-Puffer.

Verbindung	Excitation [nm] (I_{rel})	Emission in 0.1 M HCl [nm] (I_{rel})	Emission in 0.1 M NaOH [nm] (I_{rel})	Emission in PBS [nm] (I_{rel})
116	310	354 (13)	357 (9)	356 (18), 448 (8)
18	310	355 (12)	358 (9)	415 (73)
123	300	356 (14)	359 (7), 420 (6)	389 (71)
144	315	422 (109)	417 (29)	397 (625)
19	310	358 (11)	357 (12)	361 (15)
127	312	356 (12)	356 (9), 444 (69)	356 (10), 408 (59)

9.2 Wiederfindung von 5-Ethyl-1,2,4-tris(4-hydroxyphenyl)-1H-imidazol im Lysat der Zelllinie MDA-MB 231

Zur Wiederfindung der Verbindung **123** in Zelllysate wurde ein konfluenten Zellrasen von MDA-MB 231 Zellen aus einer Zellkulturflasche (72 cm²) gewonnen, in 0.5 ml TET-Puffer aufgenommen, mit einer Sonotrode lysiert und mit 1.5 ml PBS weiter verdünnt. Mit dem gepoolten und homogenisierten Lysat mehrerer Kulturen wurden Lösungen von 5-Ethyl-1,2,4-tris(4-hydroxyphenyl)-1H-imidazol (**123**) in einem Konzentrationsbereich von 5.00×10^{-5} - 1.56×10^{-6} M hergestellt. Diese Lösungen wurden wie unter Kapitel 9.1 beschrieben mit einer Excitationswellenlänge von 300 nm vermessen. Das Emissionsmaximum des Lysats wurde mit 349 nm, das der Lösung der Verbindung **123** mit 374 nm bestimmt. Das Maximum der Verbindung in PBS liegt bei 389 nm (Abb. 31).

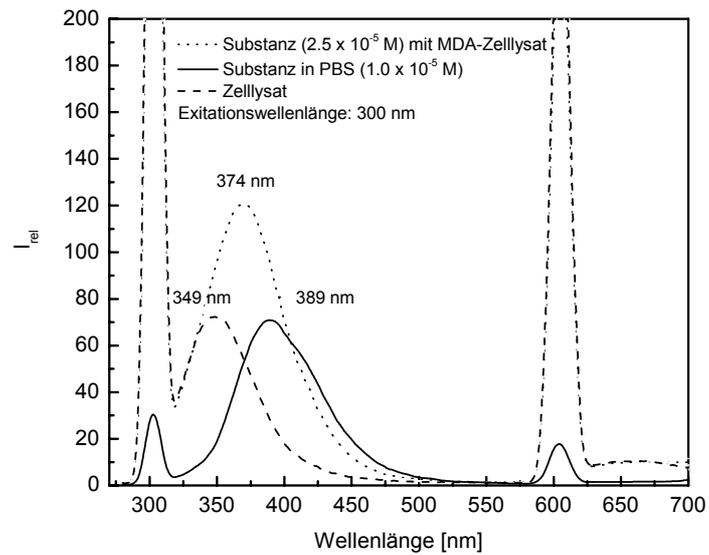


Abbildung 31. Fluoreszenzspektren der Verbindung **123** in PBS (1.0×10^{-5} M), des Zellysats aus MDA-MB 231 Zellen und von **123** mit Lysat (2.5×10^{-5} M).

Das Maximum der Emission fällt mit abnehmender Konzentration von 374 nm auf 349 nm, dem Emissionsmaximum des Zellysats ab. Die Grenzkonzentration der Nachweisbarkeit der Verbindung **132** liegt bei 6.25×10^{-6} M (Abb. 32).

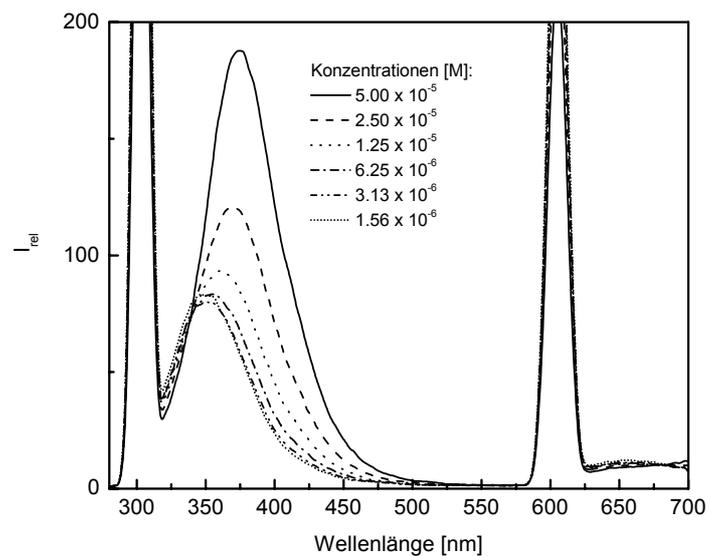


Abbildung 32. Zellysat aus MDA-MB 231 Zellen mit Verbindung **123** in einem Konzentrationsbereich von 5×10^{-5} - 1.56×10^{-6} M.

Für die relative Intensität (I_{rel}) bei 374 nm in Abhängigkeit von der Konzentration wurde ein linearer Zusammenhang gefunden (Abb. 33a). Die Emissionswellenlänge des Zelllysats erfährt eine bathochrome Verschiebung mit steigender Exitationswellenlänge von 349 nm auf 363 nm bei einer Steigerung der Anregungswellenlänge von 300 nm auf 330 nm. Die Intensität der Emission verringert sich dabei um die Hälfte (Abb. 33b).

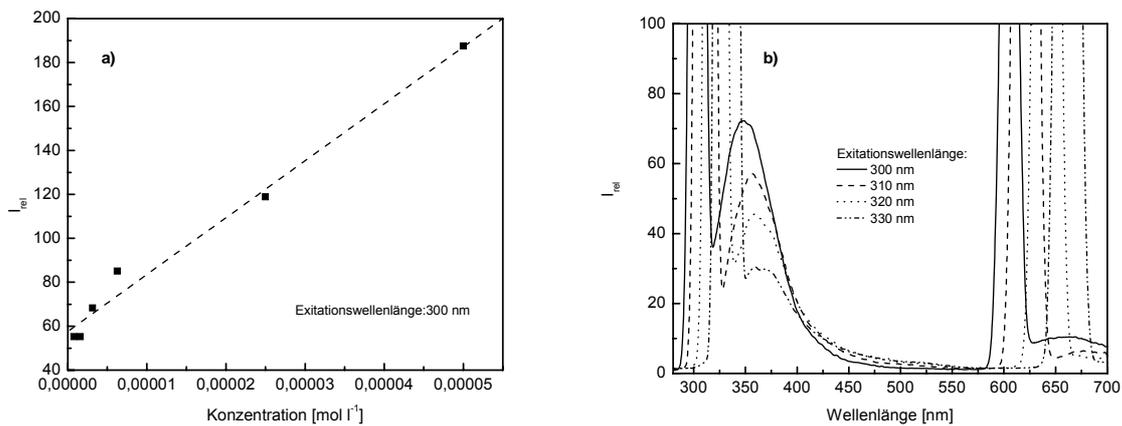


Abbildung 33. a) Darstellung der relativen Intensität (I_{rel}) bei 374 nm Emissionswellenlänge in Abhängigkeit der Konzentration von Verbindung **123** im Zelllysats aus MDA-MB 231 Zellen. b) Auftragung der Emissionswellenlänge des MDA-MB 231 Zelllysats in Abhängigkeit von der Exitationswellenlänge von 300 – 330 nm.