

## **Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen**



## 8 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

### 8.1 Allgemeines zur Fluoreszenz

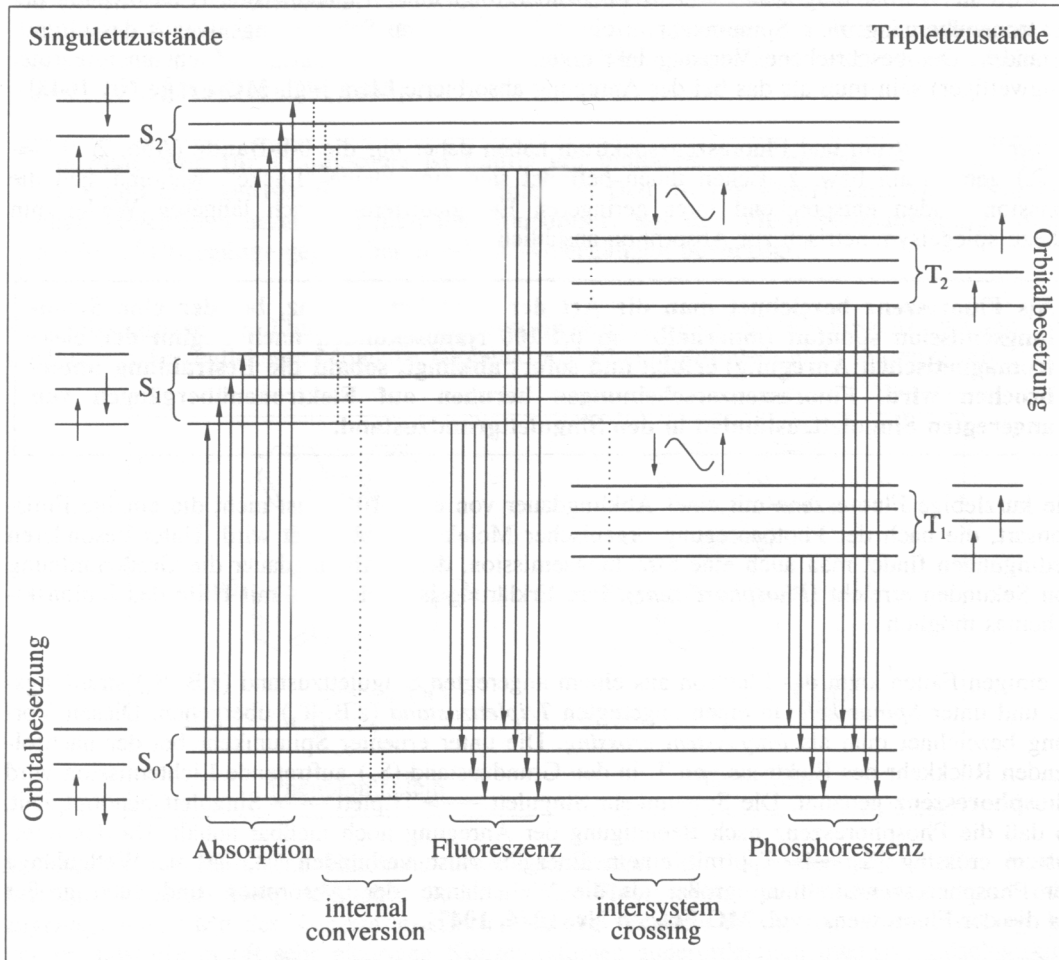
Strahlungserscheinungen, die bei einer Substanz nach vorangegangener Anregung ohne Abgabe von thermischer Energie auftreten, nennt man Lumineszenz. In Abhängigkeit von der Dauer der Emission wird zwischen Phosphoreszenz und Fluoreszenz unterschieden. Bei Raumtemperatur befinden sich die Moleküle normalerweise im untersten Schwingungsniveau des Grundzustandes  $S_0$ . Durch Lichtabsorption können Übergänge in angeregte Zustände  $S_n$  erfolgen. Nach dem Jablonski-Termschema (Abb. 54) bestehen mehrere Möglichkeiten die absorbierte Energie wieder abzugeben. Der zunächst erfolgende Übergang aus einem höheren angeregten Singulettniveau zurück auf das niedrigste Energieniveau des angeregten Zustandes  $S_1$  erfolgt strahlungslos durch Molekülstöße (internal conversion). Erfolgt die Rückkehr von  $S_1$  direkt in den Grundzustand, findet die Lichtemission bereits 0.1 bis 100 ns nach der Anregung statt und man spricht von Fluoreszenz.

Im Allgemeinen ist die absorbierte Energie größer, als die bei der Emission frei werdende. Deshalb ist das Emissionsspektrum im Vergleich zum Absorptionsspektrum zu höheren Wellenlängen verschoben <sup>[209]</sup>.

Ein wichtiger Parameter bei Fluoreszenzuntersuchungen ist die Quantenausbeute  $\Phi_F$ . Sie gibt das Verhältnis aus emittierten zu absorbierten Photonen an.

In stark verdünnten Lösungen ist die Fluoreszenzintensität  $F$  direkt proportional zur Intensität der anregenden Strahlung  $I_0$  und wird nach Gleichung (3) berechnet. Durchlaufen alle angeregten Moleküle den Übergang von  $S_1$  nach  $S_0$  unter Abgabe der Energie in Form von Fluoreszenzstrahlung, ist die Quantenausbeute 1.

$$F = 2.3 \cdot \Phi_F \cdot I_0 \cdot \epsilon \cdot c \cdot d \quad (3)$$



**Abb. 54:** Termschema nach Jablonski mit Angabe der Spinzustände <sup>[205]</sup>.

[...] strahlungslose Übergänge.

[—] Übergänge durch Absorption oder Emission elektromagnetischer Wellen.

### 8.1.1 Strukturelle Voraussetzungen

Das Auftreten von Fluoreszenz ist auf Verbindungen mit einem System konjugierter Doppelbindungen beschränkt. Voraussetzung für die Fluoreszenz ist die Absorption von Strahlung. Für die Absorption im sichtbaren und ultravioletten Bereich sind hauptsächlich  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergänge verantwortlich. Die Präsenz eines Chromophors bedingt nicht zwingend Fluoreszenz, da strahlungslose Übergänge und „intersystem crossing“-Ereignisse die Fluoreszenz auf Null absenken können oder sie so stark verringern, dass ihre Messung unmöglich wird. Bereits einfache Aromaten wie

Phenol ( $\lambda_{Em} = 330 \text{ nm}$ ,  $\Phi_F = 3.2$ ) und Anillin ( $\lambda_{Em} = 350 \text{ nm}$ ,  $\Phi_F = 2.5$ ) zeigen Fluoreszenz, die jedoch bei sehr niedrigen Wellenlängen auftritt. Durch Erhöhung der Planarität und Rigidität werden die Vibrationen und Rotationen der aromatischen Ringe eingeschränkt und eine bathochrome Verschiebung der Emissionswellen sowie gesteigerte Fluoreszenzintensität erreicht. Die Starrheit eines Moleküls verringert die strahlungslose Abgabe der Anregungsenergie <sup>[210]</sup>. Die Emission bei hohen Wellenlängen ist Voraussetzung für Untersuchungen auf zellulärer Ebene (Kap. 8.2.2).

## 8.2 Fluoreszenzmarkierte Estrogenrezeptor-Liganden

### 8.2.1 Einsatzmöglichkeiten fluoreszenzmarkierter ER-Liganden

Eine Vielzahl von Methoden zur Ermittlung der zellulären ER-Konzentration ist in der Literatur beschrieben. Neben *in situ* Autoradiographie mit Tritium- oder Iod-125-markiertem  $17\beta$ -Estradiol <sup>[211, 212]</sup> finden rezeptorspezifische monoklonale Antikörper Verwendung <sup>[11-13]</sup>. Ein weiterer Versuch zur Bestimmung der ER-Konzentration und -Verteilung in Brustkrebszellen basiert auf dem Einsatz fluoreszierender ER-Liganden (Durchflusszytometrie, Fluoreszenzmikroskopie) <sup>[16, 17]</sup>. Sie finden ebenfalls Verwendung zur Untersuchung der Ligand-Rezeptor-Assoziation und -Dissoziation in Echtzeit mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FKS) oder Fluoreszenzpolarisation. Zusätzlich bieten sie die Möglichkeit die zelluläre Heterogenität der ER zu bestimmen <sup>[213]</sup>. Ihre Anwendung in Ligand-Rezeptor-Bindungsstudien ist ebenfalls vorstellbar, wobei sie radioaktiv markierte Liganden ersetzen könnten.

### 8.2.2 Anforderungen an fluoreszenzmarkierte ER-Liganden

Je nach Einsatz der fluoreszierenden Verbindung müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

- hohe Affinität zum ER, verbunden mit geringer nichtspezifischer Bindung an andere zelluläre Proteine
- starke Fluoreszenzintensität (großer Extinktionskoeffizient, hohe Quantenausbeute)
- Emission im langwelligen Bereich (>400 nm), zur besseren Abgrenzung gegen die Hintergrundfluoreszenz (Emission der Zellen und Proteine ausgehend von z.B. Tyrosin- und Tryptophanresten (Tyrosin:  $\lambda_{Em} = 303$  nm, Tryptophan:  $\lambda_{Em} = 348$  nm) <sup>[210]</sup>)
- Anregung der Fluoreszenz mit gebräuchlichen Lasern der FKS oder Fluoreszenzmikroskopie (488/514 nm)
- Empfindlichkeit der Fluoreszenz auf ihre Umgebung (guter Indikator dafür, dass sich die spektralen Eigenschaften ändern, wenn das Fluorophor mit einem biologischen Molekül (Rezeptor, Protein) interagiert <sup>[214]</sup>)

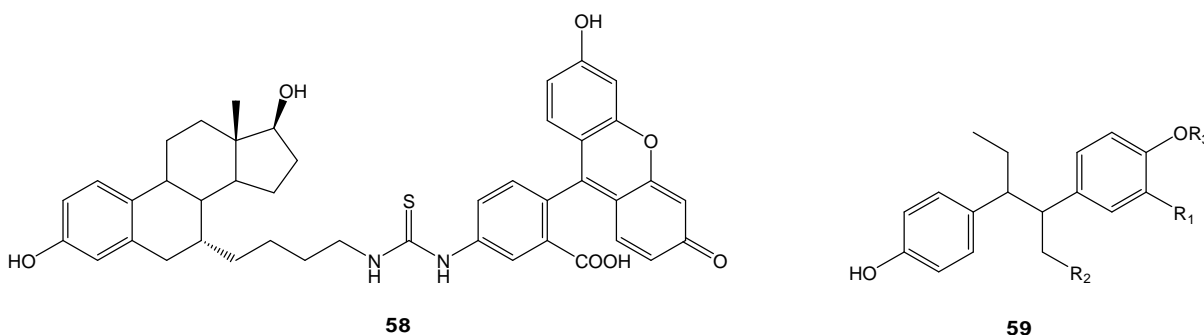
## 8.3 Fluoreszenzmarkierungsmethoden

In der Literatur sind zahlreiche Versuche beschrieben, fluoreszierende Verbindungen für den ER zu entwickeln. Diese können generell in 3 Klassen eingeteilt werden: Konjugate, photofluorogene Verbindungen, inhärent fluoreszierende Liganden.

### 8.3.1 Konjugate aus ER-Liganden und Fluoreszenzmarkern

Der Fluoreszenzfarbstoff ist direkt oder über einen Spacer mit dem ER-Liganden verbunden. Die entstehenden Moleküle weisen in der Regel gute Emissionseigenschaften auf, können sich aber bedingt durch ihre Größe, oft nicht mehr in die

hydrophobe Bindungstasche des ER legen und zeigen somit eine drastische Reduktion der Bindungsaffinität. Fluoresceinderivate und Biotin sind gebräuchliche Fluoreszenzmarker, die an C(6) <sup>[215, 216]</sup>, C(7) <sup>[217]</sup> und C(17) <sup>[218]</sup> des Estradiols gekoppelt wurden. An dieser Stelle sei das Beispiel der Konjugation von 17 $\beta$ -Estradiol-7 $\alpha$ -butylamin mit Fluoresceinisothiocyanat zum entsprechenden Produkt **58** erwähnt (Abb. 55). Bei der Kopplung des Estradiolderivates mit dem Farbstoff wurde die Affinität zum ER im Vergleich zu Estradiol um das 36-fache verringert (E2: EC<sub>50</sub> = 5 nM, Konjugat: EC<sub>50</sub> = 180 nM) <sup>[217]</sup>.



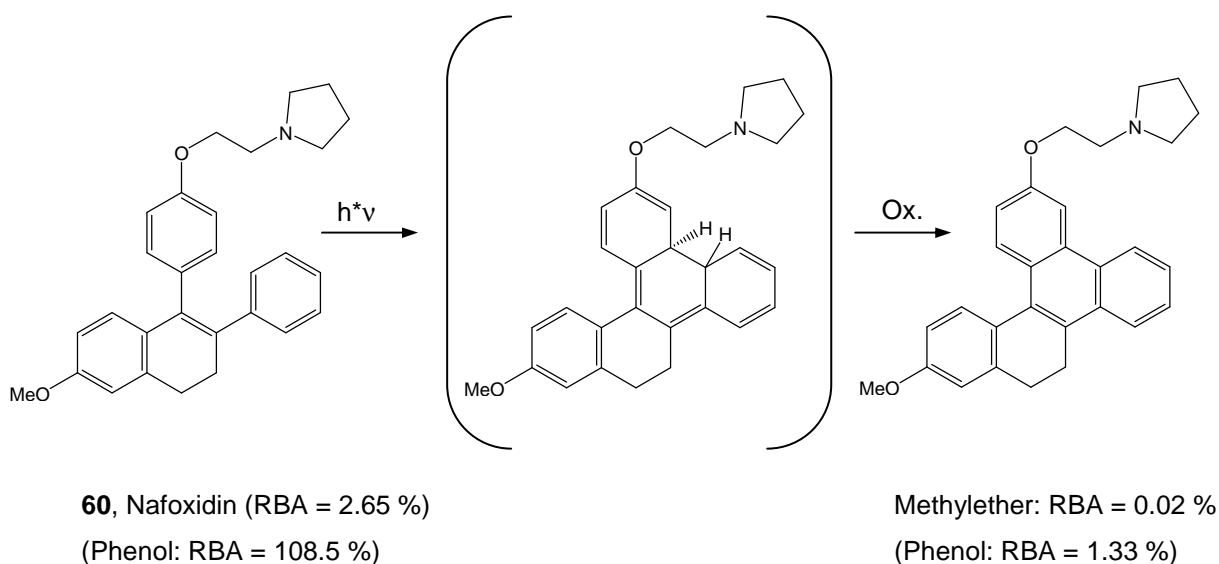
**Abb. 55:** Konjugate als Liganden des ER.

Auch nichtsteroidale ER-Liganden mit Hexestrolgrundgerüst **59** wurden in o-Stellung zur phenolischen Hydroxygruppe (R<sub>1</sub>), an der Ethylkette (R<sub>2</sub>) <sup>[219]</sup> oder durch Veretherung der phenolischen Hydroxygruppen (R<sub>3</sub>) <sup>[220]</sup> fluoreszenzmarkiert (Abb. 55). Nitrobenzoxadiazol (NBD), 1-(Dimethylamino)naphthalen-6-sulfonamid (Dansyl) und Aminophthalimid (AP) wurden als Fluoreszenzmarker eingesetzt. Derivate die an R<sub>1</sub> oder R<sub>2</sub> fluoreszenzmarkiert wurden, zeigten mittlere Rezeptorbindungsaffinitäten, während die Konjugation an R<sub>3</sub> mit Fluorescein zu einer Verbindung führte, die für den Einsatz in einem Fluoreszenzpolarisationsassay mit ER $\alpha$  geeignet zu sein scheint <sup>[220]</sup>.

### 8.3.2 Photofluorogene ER-Liganden

Nichtfluoreszierende Liganden mit hoher relativer Bindungsaffinität für den ER können durch UV-Bestrahlung in ein Fluorophor umgewandelt werden. Die erhaltenen Moleküle haben im Vergleich zu den Konjugaten eine deutlich geringere Größe. Die Veränderung der räumlichen Anordnung (hohe Planarität) führt neben verbesserten Fluoreszenzeigenschaften auch bei den Photofluorogenen zu einer geringeren Rezeptoraffinität. Zur Bestimmung des ER-Levels sind die photofluorogenen Verbindungen daher ungeeignet.

Diese photochemische Zyklisierung/Oxidation findet u.a. bei der Konversion von Tamoxifen zu einem fluoreszierenden Phenanthren statt und bildet die Grundlage zur klinischen Bestimmung des Plasmalevels von Tamoxifen und seinen Metaboliten <sup>[221]</sup>. Abbildung 56 zeigt am Beispiel von Nafoxidin **60** die Photozyklisierung des *cis*-Stilbengerüsts und die anschließende Oxidation zum Phenanthren <sup>[222]</sup>. Zahlreiche weitere Versuche zur Synthese photofluorogener Liganden sind in der Literatur beschrieben <sup>[223, 224]</sup>.



**Abb. 56:** Beispiel eines photofluorogenen Estrogenrezeptorliganden.



### 8.3.3 Inhärent fluoreszierende ER-Liganden

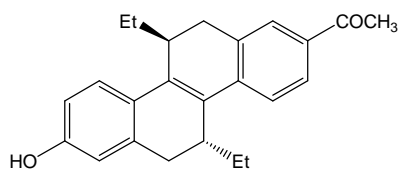
Bei inhärent fluoreszierenden Verbindungen ist der Fluorophor in das Molekül integriert. Ausgehend von der Stilbenstruktur, die ein Merkmal vieler ER-Liganden ist, sind zahlreiche Versuche beschrieben, durch Rigidisierung inhärent fluoreszierende Liganden zu erhalten. Als Beispiele seien die Tetrahydrochrysene (**61**)<sup>[21, 225, 226]</sup>, 2,3-Diarylindene (**62**)<sup>[227, 228]</sup>, 2,3-Bis(4-hydroxyphenyl)indole (**63**)<sup>[229]</sup> und die Styrylpyridine (**64**)<sup>[230, 231]</sup> erwähnt (Abb. 57).

Die Donor-Akzeptor-Tetrahydrochrysene, bei denen eine Hydroxygruppe (Donor) durch eine Protonenakzeptor-Gruppe ersetzt wurde, weisen im Vergleich zu den Tetrahydrochrysenen ohne Akzeptorfunktion ( $\lambda_{Em} = 382$  nm) eine starke Rotverschiebung der Absorption und Emission ( $\lambda_{Em} = 450-525$  nm) auf. Sie stellen die erste Gruppe inhärent fluoreszierender Estrogene mit guter relativer Bindungsaffinität (15-40%) und guten Fluoreszenzeigenschaften dar<sup>[225]</sup>. Eine weitere Möglichkeit, die photophysikalischen und photochemischen Eigenschaften der Stilbenstruktur zu verbessern, besteht in der Einbeziehung des  $n-\pi^*$  Zustandes durch Einführung eines Stickstoffatoms in den Phenylring<sup>[230]</sup>. Die so erhaltenen Styrylpyridine weisen z.T. eine gute relative Bindungsaffinität auf (RBA = 7-81%). Jedoch waren die Fluoreszenzintensitäten zu gering (1000-fach geringer als die der THC), so dass von einer weiteren Charakterisierung abgesehen wurde<sup>[231]</sup>.

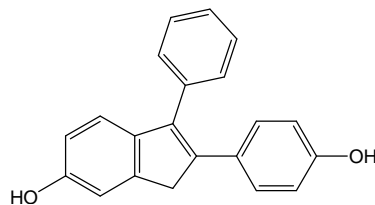
Wie erwartet, ist die Fluoreszenz der 2,3-Bis(4-hydroxyphenyl)indole relativ schwach. Ein Grund hierfür ist die Torsion der 2- und 3-Arylringe gegeneinander, so dass eine ausreichende Planarität des Moleküls nicht mehr gewährleistet ist<sup>[229]</sup>.

Durch Einführung von Akzeptorgruppen konnten in der Reihe der 2,3-Diarylindene Verbindungen mit guten Fluoreszenzeigenschaften, jedoch zu geringen RBA-Werten (<1%) erhalten werden<sup>[232]</sup>.

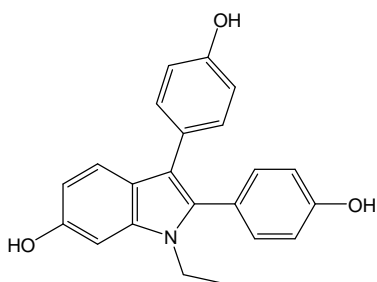
Da mit inhärent fluoreszierenden ER-Liganden bisher der größte Erfolg erzielt werden konnte, wurde dieser Ansatz im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiter verfolgt.



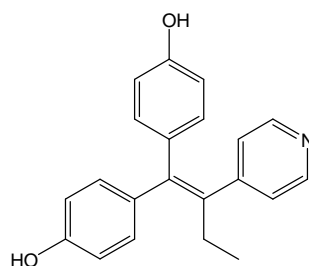
**61**, Tetrahydrochryseno



**62**, 2,3-Diarylinden



**63**, 2,3-Bis(4-hydroxyphenyl)indol



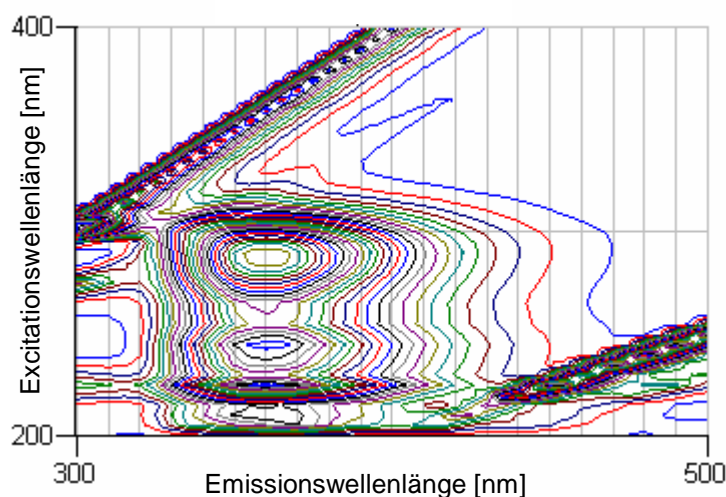
**64**, Styrylpyridin

**Abb. 57:** Inhärent fluoreszierende Estrogenrezeptorliganden.

## 8.4 Ergebnisse der Fluoreszenzuntersuchungen

Die neu synthetisierten Benzimidazolderivate gehören zur Klasse der inhärent fluoreszierenden Verbindungen. Zu ihrer Charakterisierung wurden zunächst Emissionsspektren in Methanol aufgenommen. Für weiterführende Arbeiten (Zellaufnahme, Ligand-Rezeptor-Interaktion) sind die Fluoreszenzeigenschaften in PBS-Puffer von besonderer Bedeutung, da PBS die physiologischen Bedingungen am besten widerspiegelt. Der Einfluss des pH-Wertes wurde durch Messungen in 0.1 M NaOH bzw. 0.1 M HCl ermittelt. Die zu untersuchenden Lösungen wiesen Konzentrationen von 0.1-10  $\mu\text{M}$  auf. Da die Linearität der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Konzentration in diesem Bereich gegeben ist, wurden zur anschaulichen graphischen Darstellung die Substanzkonzentrationen so gewählt, dass die Fluoreszenzintensitäten gut vergleichbar waren.

Zur Bestimmung der Anregungswellenlängen der Emissionsmaxima wurden zunächst 3D-Spektren aufgenommen. Abbildung 58 zeigt exemplarisch das 3D-Fluoreszenzspektrum der Verbindung **56a** in PBS. Das 3D-Spektrum lässt sowohl bei einer Anregungswellenlänge von 244 nm als auch bei 289 nm ein Emissionsmaximum bei 353 nm erkennen. Zur Ermittlung der 2D-Fluoreszenzspektren wurde die höhere Excitationswellenlänge eingestrahlt, da die Wahrscheinlichkeit eines Bindungsbruches mit steigender Energie der Strahlung zunimmt <sup>[233]</sup>.

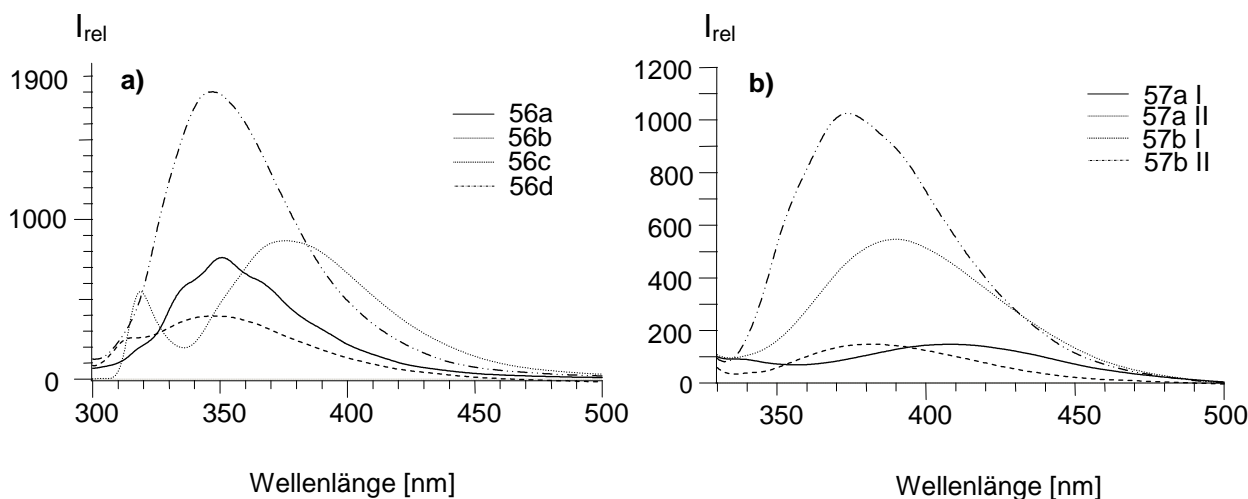


**Abb. 58:** 3D-Fluoreszenzspektrum der Verbindung **56a** in PBS bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$ .

Eine ausreichende Affinität zum ER ist nur durch das Vorhandensein freier Hydroxygruppen am Benzimidazolgerüst und/oder Phenylring gegeben. Ligand-Rezeptor-Interaktionen sind für weiterführende Arbeiten (z.B. Bestimmung des ER-Levels) erforderlich. Die weiteren Untersuchungen beschränken sich daher auf Verbindungen die diese Voraussetzung erfüllen. Um den Einfluss verschiedener Substituenten auf die Fluoreszenz zu untersuchen, wurden sowohl Vertreter der 2-(4-Hydroxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazole (**56a-d**) als auch der Gruppe der 5- bzw. 6-Hydroxy-2-phenyl-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazole (**57a I+II** und **57b I+II**) ausgewählt. Da bereits in der zuerst genannten Gruppe die Chlor- bzw. Fluorsubstitution eine drastische Reduktion der Fluoreszenzintensität zur Folge hatte, wurden innerhalb der 5- bzw. 6-Hydroxy-Isomere nur Benzimidazole ohne Halogensubstituenten für die Fluoreszenzuntersuchungen in Betracht gezogen. Im Weiteren wird auf einige charakteristische Unterschiede im Emissionsverhalten der Verbindungen näher eingegangen. Für Untersuchungen auf zellulärer Ebene ist der Einfluss von DNA- und Proteinkomplexen, die in Zellsuspensionen enthalten sind, auf die Fluoreszenz der Benzimidazole von Bedeutung und soll exemplarisch ermittelt werden.

#### 8.4.1 Fluoreszenzuntersuchungen in Methanol

In methanolischer Lösung unterscheiden sich die Wellenlängen der Emissionsmaxima der Verbindungen **56a**, **56c** und **56d** unwesentlich (**56a**:  $\lambda_{Em} = 351$  nm, **56c**, **56d**:  $\lambda_{Em} = 347$  nm). Das Emissionsmaximum der 2-fach hydroxylierten Verbindung **56b** weist gegenüber den zuerst genannten Benzimidazolen eine bathochrome Verschiebung auf (**56b**:  $\lambda_{Em} = 376$  nm). Die Einführung eines Chlor- oder Fluoratoms hat einen quencheden Effekt, wobei der Effekt des Chlorsubstituenten stärker ausgeprägt ist (Abb. 59a, Tab. 16). So ist die Fluoreszenzintensität der Verbindung **56c** trotz 10-fach höherer Konzentration im Vergleich zu Verbindung **56b** nur halb so groß (**56c** [2-Cl, 1  $\mu$ M]:  $I_{rel} = 437$ , **56b** [2-OH, 0.1  $\mu$ M]:  $I_{rel} = 868$ ). Dieser auch als Schweratomeffekt bezeichnete Effekt erklärt sich durch die Erhöhung der Wahrscheinlichkeit für das „intersystem crossing“ in den Triplettzustand durch ein Chloratom <sup>[233]</sup>.



**Abb. 59: a)** Emissionsspektren der Verbindungen **56a** (0.1  $\mu\text{M}$ ), **56b** (0.1  $\mu\text{M}$ ), **56c** (1  $\mu\text{M}$ ) und **56d** (1  $\mu\text{M}$ ) in Methanol.

**b)** Emissionsspektren der Verbindungen **57a I** (0.1  $\mu\text{M}$ ), **57a II** (0.1  $\mu\text{M}$ ), **57b I** (5  $\mu\text{M}$ ) und **57b II** (5  $\mu\text{M}$ ) in Methanol.

Die Excitationswellenlängen sind Tab. 16 zu entnehmen.

Verbindung	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Excitation [nm]	Emission [nm]	$I_{rel}$
<b>56a</b>	0.1	291	351	763
<b>56b</b> (2-OH)	0.1	286	376	868
<b>56c</b> (2-Cl)	1	278	347	437
<b>56d</b> (2-F)	1	284	347	1802
<b>57a I</b> (5-OH)	0.1	309	409	170
<b>57a II</b> (6-OH)	0.1	304	390	579
<b>57b I</b> (5-OH)	5	309	380	168
<b>57b II</b> (6-OH)	5	304	374	1060

**Tab. 16:** Excitations- und Emissionsmaxima der Verbindungen **56a-d** und **57a I+II**, **57b I+II** in Methanol.

Die Emissionswellenlängen der 5- bzw. 6-Hydroxy-2-phenyl-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazole weisen gegenüber denen der 2-(4-Hydroxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazole eine Rotverschiebung auf (**56a**:  $\lambda_{Em} = 351$  nm, **57b I** [5-OH]:  $\lambda_{Em} = 380$  nm, **57b II** [(6-OH):  $\lambda_{Em} = 374$  nm).

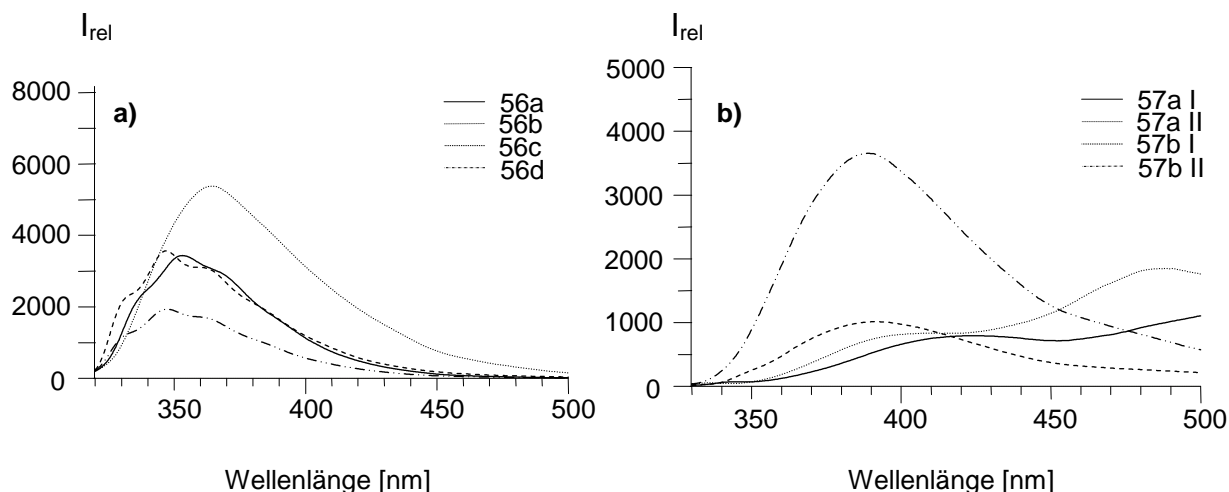
Diese lässt sich durch Konjugation eines ungepaarten Elektronenpaares der Hydroxygruppe mit dem Benzimidazol  $\pi$ -Molekülorbital erklären („internal charge transfer“). Die Isomeren der Verbindung **57a** zeigen eine deutlich stärkere Emission als die Isomeren der Verbindung **57b**. Die relative Intensität von **57a I** und **57b I** ist identisch, trotzdem sich die Konzentrationen um den Faktor 50 unterscheiden. (**57a I** [5-OH, 0.1  $\mu$ M]:  $I_{\text{rel}} = 170$ , **57b I** [5-OH, 5  $\mu$ M]:  $I_{\text{rel}} = 168$ ). Die Emission der 6-Hydroxy-Isomere ist stärker als die der 5-Hydroxy-Isomere (**57a I** [5-OH, 0.1  $\mu$ M]:  $I_{\text{rel}} = 170$ , **57a II** [6-OH, 0.1  $\mu$ M]:  $I_{\text{rel}} = 579$ ) (Abb. 59b, Tab. 16).

#### 8.4.2 Fluoreszenzuntersuchungen in PBS

Die Fluoreszenzeigenschaften ändern sich beim Übergang von Methanol zu PBS nur unwesentlich. Alle Substanzen zeigen in PBS ausgeprägte Emissionsmaxima (Abb. 60a, b, Tab. 17). Die Anregungswellenlängen liegen in einem Bereich von 283 nm bis 304 nm. Bei den 2-(4-Hydroxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)-benzyl]-1*H*-benzimidazolen weist das einfach hydroxylierte Derivat **56a**, bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M, eine relative Intensität von 3440 auf. Zusätzliche Substituenten in *o*-Stellung des Phenylrings führen zur Abschwächung der Intensität. Verbindung **56d** (2-F) weist bei gleicher Konzentration eine um den Faktor 1.8 verringerte Intensität auf (**56d** [2-F, 1  $\mu$ M]:  $I_{\text{rel}} = 1934$ ). Der quenchende Einfluss des Chloratoms (Schweratomeffekt) ist hierbei am stärksten ausgeprägt, so dass Verbindung **56c** (2-Cl) im Vergleich zu **56a** trotz 10-fach höherer Konzentration annähernd die gleiche Emission aufweist (**56c** [2-Cl, 10  $\mu$ M]:  $I_{\text{rel}} = 3573$ ). Substitution in *o*-Stellung führt zu einer gesteigerten Torsion der Phenylringe, die mit einer Verringerung der Planarität und damit der Fluoreszenzintensität einhergeht<sup>[232]</sup>.

Die Emissionswellenlängen der 5- bzw. 6-Hydroxy-Isomere weisen gegenüber den in dieser Position unsubstituierten Verbindungen wiederum eine bathochrome Verschiebung der Emissionswellenlängen auf (**57b I+II**:  $\lambda_{\text{Em}} = 390$  nm, **56a**:  $\lambda_{\text{Em}} = 353$  nm). Innerhalb der Isomerenpaare sind die Fluoreszenzintensitäten der 6-Hydroxy-Isomere gegenüber den 5-Hydroxy-Isomeren deutlich erhöht (**57b I** [5-OH, 5  $\mu$ M]:  $I_{\text{rel}} = 1015$ , **57b II** [6-OH, 5  $\mu$ M]:  $I_{\text{rel}} = 3650$ ). Bei Isomerenpaar **57a** sind die Unterschiede noch stärker ausgeprägt. Das 5-OH-Isomer zeigt bei 10-fach

höherer Konzentration etwa die gleiche relative Intensität auf wie sein 6-OH-Isomer (**57a I** [5-OH, 10  $\mu\text{M}$ ]:  $I_{\text{rel}} = 749$ , **57a II** [6-OH, 1  $\mu\text{M}$ ]:  $I_{\text{rel}} = 816$ ). Beide Isomere der Verbindung **57a** zeigen ein zweites Emissionsmaximum im längerwelligen Bereich (**57a I** [5-OH, 10 $\mu\text{M}$ ]:  $\lambda_{\text{Em}} = 540$  nm,  $I_{\text{rel}} = 1369$ , **57a II** [6-OH, 1 $\mu\text{M}$ ]:  $\lambda_{\text{Em}} = 490$  nm,  $I_{\text{rel}} = 1849$ ), wobei auch hier die Intensität des 6-OH-Isomers **57a II** höher ist.



**Abb. 60: a)** Emissionsspektren der Verbindungen **56a** (1  $\mu\text{M}$ ), **56b** (10  $\mu\text{M}$ ), **56c** (10  $\mu\text{M}$ ) und **56d** (1  $\mu\text{M}$ ) in PBS.

**b)** Emissionsspektren der Verbindungen **57a I** (10  $\mu\text{M}$ ), **57a II** (1  $\mu\text{M}$ ) und **57b I** (5  $\mu\text{M}$ ), **57b II** (5  $\mu\text{M}$ ) in PBS.

Die Excitationswellenlängen sind Tab. 17 zu entnehmen.

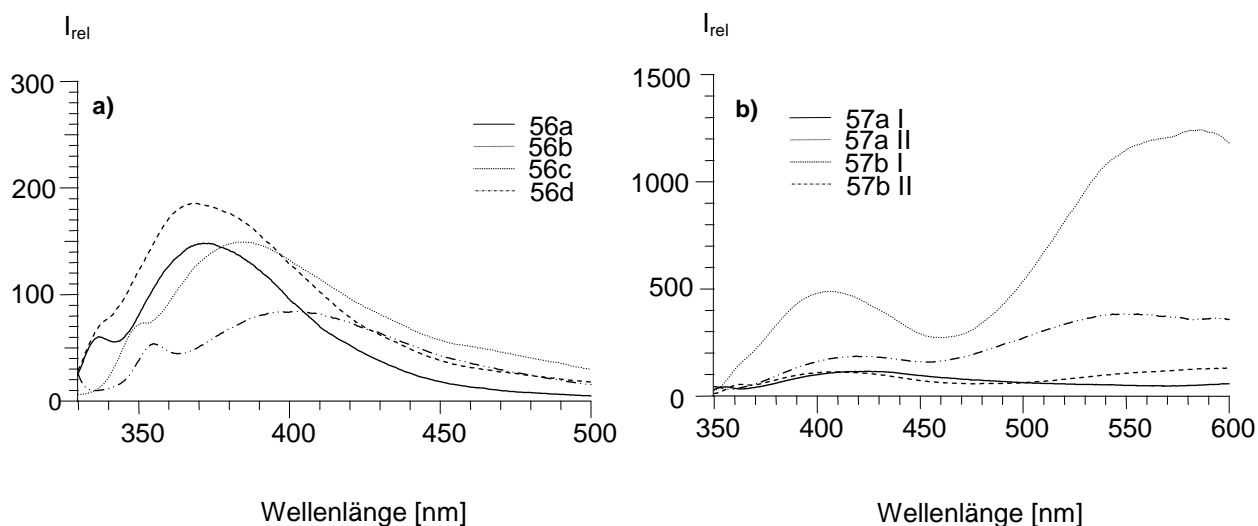
Verbindung	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Excitation [nm]	Emission [nm]	$I_{\text{rel}}$
<b>56a</b>	1	289	353	3440
<b>56b</b> (2-OH)	10	285	365	5377
<b>56c</b> (2-Cl)	10	284	347	3573
<b>56d</b> (2-F)	1	283	348	1934
<b>57a I</b> (5-OH)	10	304	421; 540	749; 1369
<b>57a II</b> (6-OH)	1	301	400; 490	816; 1849
<b>57b I</b> (5-OH)	5	304	390	1015
<b>57b II</b> (6-OH)	5	302	390	3650

**Tab. 17:** Excitations- und Emissionsmaxima der Verbindungen **56a-d** und **57a I+II**, **57b I+II** unter physiologischen Bedingungen (PBS).

### 8.4.3 Fluoreszenzuntersuchungen im sauren und basischen Medium

Die Emissionsmessungen im sauren und basischen Medium haben für weitere Zelluntersuchungen keine Bedeutung und dienen lediglich der Charakterisierung des Fluoreszenzverhaltens. Es ist deutlich erkennbar, dass ein saurer pH-Wert bei allen Substanzen zu einer deutlichen Verringerung der Fluoreszenzintensität führt. Verbindung **56a** zeigt bei einer Konzentration von  $1\ \mu\text{M}$  eine relative Intensität von 148. Zusätzliche Substitution des Phenylrings in 2-Position führt in allen Fällen zu einer weiteren Schwächung. Verbindung **56d** (2-F) weist im Vergleich zu **56a** bei gleicher Konzentration eine um den Faktor 2 verringerte Emission auf, während die Verbindungen **56b** und **56c** in einer 10-fach höheren Konzentration ähnliche Intensitäten wie **56a** zeigen (**56b** [ $10\ \mu\text{M}$ ]:  $I_{\text{rel}} = 149$ , **56c** [ $10\ \mu\text{M}$ ]:  $I_{\text{rel}} = 186$ , **56d** [ $1\ \mu\text{M}$ ]:  $I_{\text{rel}} = 84$ ) (Abb. 61a, Tab. 18).

Die Anregungs- und Emissionswellenlängen innerhalb der Isomerenpaare sind sehr ähnlich (**57a I** [5-OH]:  $\lambda_{\text{EX}} = 305\ \text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{EM}} = 409\ \text{nm}$ , **57a II** [6-OH]:  $\lambda_{\text{EX}} = 305\ \text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{EM}} = 405\ \text{nm}$ ).



**Abb. 61: a)** Emissionsspektren der Verbindungen **56a** ( $1\ \mu\text{M}$ ), **56b** ( $10\ \mu\text{M}$ ), **56c** ( $10\ \mu\text{M}$ ) und **56d** ( $1\ \mu\text{M}$ ) in  $0.1\ \text{M HCl}$ .

**b)** Emissionsspektren der Verbindungen **57a I+II**, **57b I+II** in  $0.1\ \text{M HCl}$  in einer Konzentration von  $10\ \mu\text{M}$ .

Die Excitationswellenlängen sind Tab. 18 zu entnehmen.



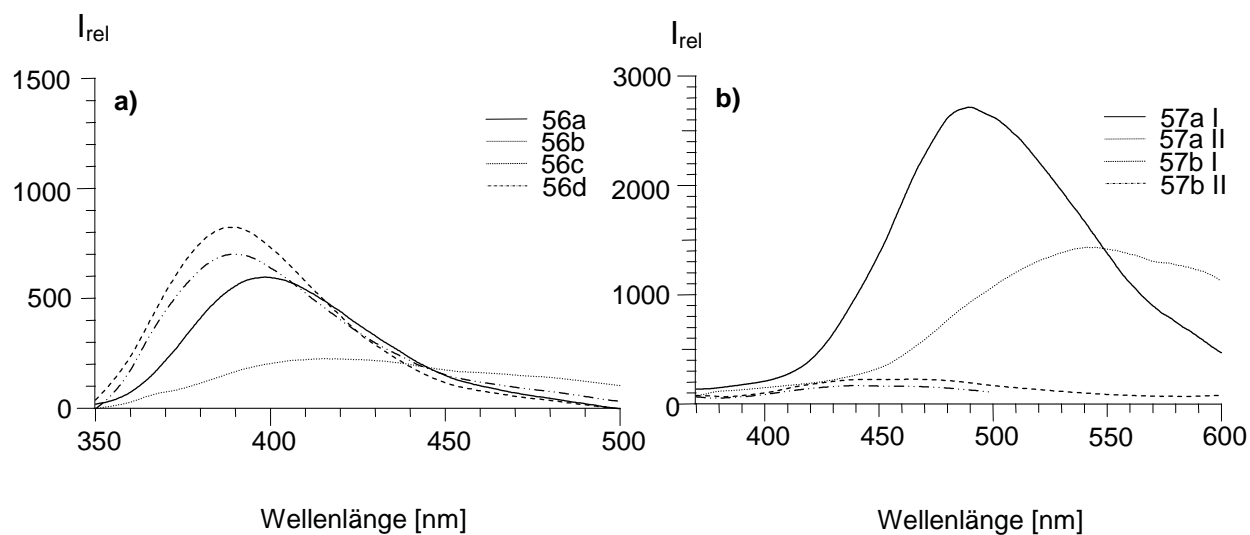
Wie bereits die Emissionsspektren in PBS und Methanol gezeigt haben, weisen die jeweiligen 6-Hydroxy-Isomere gegenüber ihren 5-Hydroxy-Isomeren auch in 0.1 M HCl eine deutlich gesteigerte Intensität auf (**57a I** [5-OH, 10  $\mu$ M]:  $I_{\text{rel}} = 113$ , **57a II** [6-OH, 10  $\mu$ M]:  $I_{\text{rel}} = 489$ ). Ein zweites Emissionsmaximum im längerwelligen Bereich mit höherer Intensität ist bei den 6-Hydroxy-Isomeren **57a II** ( $\lambda_{\text{Em}} = 586$  nm,  $I_{\text{rel}} = 1244$ ) und **57b II** ( $\lambda_{\text{Em}} = 554$  nm,  $I_{\text{rel}} = 383$ ) erkennbar (Abb. 61b, Tab. 18).

Verbindung	Konzentration [ $\mu$ M]	Excitation [nm]	Emission [nm]	$I_{\text{rel}}$
<b>56a</b>	1	296	373	148
<b>56b</b> (2-OH)	10	302	385	149
<b>56c</b> (2-Cl)	10	280	369	186
<b>56d</b> (2-F)	1	293	402	84
<b>57a I</b>	10	305	409	113
<b>57a II</b>	10	305	405; 586	489; 1244
<b>57b I</b>	10	310	430	115
<b>57b II</b>	10	309	430; 554	181; 383

**Tab. 18:** Excitations- und Emissionsmaxima der Verbindungen **56a-d** und **57a I+II**, **57b I+II** in 0.1 M HCl.

Im alkalischen Milieu ist der Einfluss der Hydroxygruppen besonders ausgeprägt. Sie erfahren in 0.1 M NaOH eine Deprotonierung, die zu einer negativen Ladung des Gesamtmoleküls führt. So zeigt die 2-fach hydroxylierte Verbindung in einer um den Faktor 10 erhöhten Konzentration eine deutlich geringere Emission bei höherer Wellenlänge (**56b** [10  $\mu$ M]:  $\lambda_{\text{Em}} = 415$  nm,  $I_{\text{rel}} = 299$ ) als Verbindungen mit nur einer Hydroxygruppe (**56a** [1  $\mu$ M]:  $\lambda_{\text{Em}} = 399$  nm,  $I_{\text{rel}} = 748$ ) (Abb. 62a, Tab. 19).

Auch bei den Isomerenpaaren zeigt Verbindung **57b** mit zwei Hydroxygruppen eine geringere Emission als Verbindung **57a** mit nur einer Hydroxygruppe (**57a I** [5-OH, 1  $\mu$ M]:  $I_{\text{rel}} = 2716$ , **57a II** [6-OH, 10  $\mu$ M]:  $I_{\text{rel}} = 1432$ , **57b I** [5-OH, 10  $\mu$ M]:  $I_{\text{rel}} = 227$ , **57b II** [6-OH, 5  $\mu$ M]:  $I_{\text{rel}} = 169$ ) (Abb. 62b, Tab. 19). Alle Emissionsmaxima weisen im Vergleich zum neutralen Medium eine Rotverschiebung auf (**56a** [PBS]:  $\lambda_{\text{Em}} = 353$  nm, **56a** [0.1 M NaOH]:  $\lambda_{\text{Em}} = 399$  nm).



**Abb. 62:** a) Emissionsspektren der Verbindungen **56a** (1  $\mu\text{M}$ ), **56b** (10  $\mu\text{M}$ ), **56c** (1  $\mu\text{M}$ ) und **56d** (1  $\mu\text{M}$ ) in 0.1 M NaOH.

b) Emissionsspektren der Verbindungen **57a I** (1  $\mu\text{M}$ ), **57a II** (10  $\mu\text{M}$ ), **57b I** (10  $\mu\text{M}$ ) und **57b II** (5  $\mu\text{M}$ ) in 0.1 M NaOH.

Die Excitationswellenlängen sind Tab. 19 zu entnehmen.

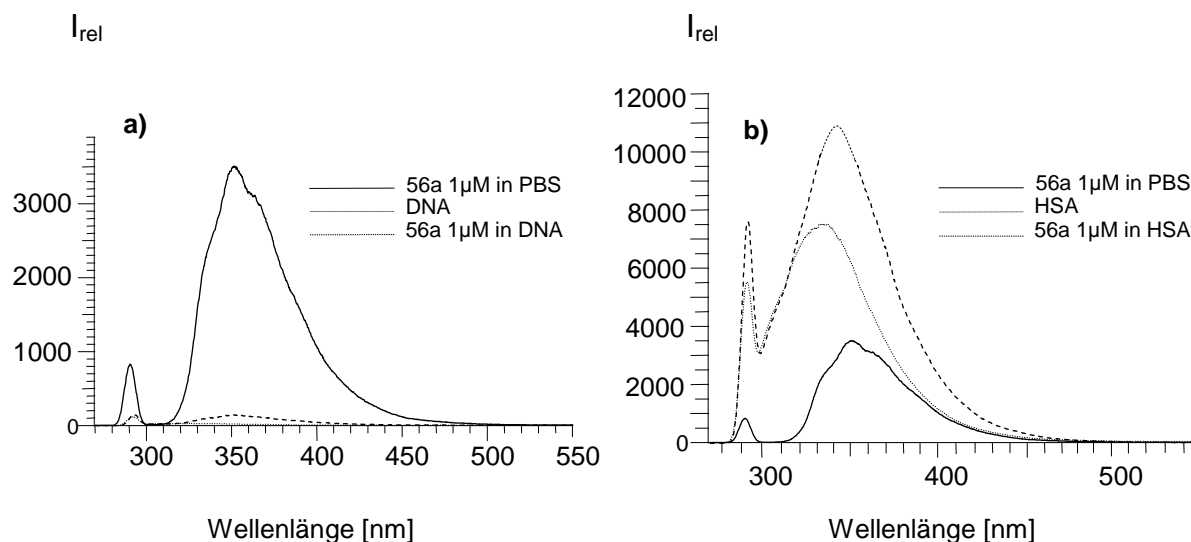
Verbindung	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Excitation [nm]	Emission [nm]	$I_{rel}$
<b>56a</b>	1	308	399	748
<b>56b</b> (2-OH)	10	314	415	299
<b>56c</b> (2-Cl)	1	284	390	975
<b>56d</b> (2-F)	1	297	390	839
<b>57a I</b>	1	329	489	2716
<b>57a II</b>	10	322	540	1432
<b>57b I</b>	10	325	462	227
<b>57b II</b>	5	325	439	169

**Tab. 19:** Excitations- und Emissionsmaxima der Verbindungen **56a-d** und **57a I+II**, **57b I+II** in 0.1 M NaOH.

## 8.4.4 Fluoreszenzuntersuchungen in DNA- und Protein-Lösungen

Fluoreszenzuntersuchungen in DNA-Lösung konnten eine Wechselwirkung der Benzimidazole mit der DNA nachweisen. Wie Abbildung 63a zeigt, geht die Fluoreszenz der Verbindung **56a** (bei  $\lambda_{\text{EX}} = 290 \text{ nm}$ ), bedingt durch Substanz-DNA-Wechselwirkungen, bei Zugabe einer 0.1%-igen DNA-Lösung fast völlig verloren.

Durch Fluoreszenzmessungen in HSA („humanes Serumalbumin“) wird deutlich, dass keine Wechselwirkungen mit HSA statt finden und die Fluoreszenz der 2-(4-Hydroxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazole im Bereich der zellulären Autofluoreszenz liegt (Abb. 63b). Die Fluoreszenzen von Protein und Benzimidazol verhalten sich additiv.



**Abb. 63:** Fluoreszenzspektren der Verbindung **56a** (1  $\mu\text{M}$ ).

**a)** in DNA-Lösung (1 mg / ml),

**b)** in HSA-Lösung (1 mg / ml).

## 8.5 Diskussion der Ergebnisse

Alle untersuchten Benzimidazolderivate weisen charakteristische Fluoreszenzeigenschaften auf und reagieren empfindlich auf Änderungen des pH-Wertes. Dabei erwies sich die Gruppe der 2-(4-Hydroxyphenyl)-1-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazole als ungeeignet für weitere Untersuchungen, da die Fluoreszenz im Bereich der zellulären Eigenemission liegt. Das Emissionsmaximum der 5- bzw. 6-Hydroxybenzimidazole ist bathochrom verschoben, mit einem Maximum um 400 nm. Die Intensität der 6-Hydroxy-Isomere ist deutlich stärker ausgeprägt als die der 5-Hydroxy-Isomere.

Als geeignet für weiterführende pharmakologische Arbeiten (Zellaufnahme, Verteilung in der Zelle) erwies sich Verbindung **57a II** (6-OH-Isomer), die ein zweites langwelliges Emissionsmaximum in PBS bei 490 nm, mit ausreichender Intensität, aufweist. Die Ermittlung von Protein-Fluorophor-Wechselwirkungen (z.B. unspezifische Bindung, ER-Ligand-Wechselwirkungen) ist prinzipiell möglich, da Proteine die Fluoreszenz der Benzimidazole nicht beeinträchtigen. Aufgrund der Verringerung der Fluoreszenzintensität durch DNA-Lösung ist die Substanz-DNA-Interaktion mittels Fluoreszenzmikroskopie nicht untersuchbar. Die Durchführung von Zellaufnahmestudien ist möglich, bedarf aber gegebenenfalls der Empfindlichkeitssteigerung durch Abtrennung der DNA.

Da die gebräuchlichen Argon-Ionen-Laser der Fluoreszenzmikroskopie eine Anregungswellenlänge von 488 nm oder 514 nm aufweisen, sind diese Untersuchungen nicht ohne weiteres durchführbar. Der Einsatz deutlich teurerer und selten verwendeter He-Cad-Laser, deren Anregungswellenlänge bei 325 nm liegt, wäre durchaus denkbar. Auch die üblichen Laser der FKS sind mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm bzw. 514 nm für weiterführende Arbeiten ungeeignet.