

**Fluoreszierende 2,2'-Bisbenzimidazolderivate:**

**Synthese, pharmakologische Testung  
und Untersuchungen zur Visualisierung des  
Estrogenrezeptors in humanen Tumorzellen**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Kathrin Szymanowitz  
aus Berlin

2012

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2006 bis August 2012 unter der Leitung von Prof. Dr. Ronald Gust am Institut für Pharmazie an der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ronald Gust
2. Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Wolber

Disputation am: 06.12.2012

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Gust danke ich für die Überlassung des interessanten und vielfältigen Themas, für die Freiheit bei der Bearbeitung und für die Unterstützung sowie anregenden wissenschaftlichen Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt den Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises um Prof. Gust für das angenehme Arbeitsklima, ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie für die gute Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich Thomas Rudolf für die Unterstützung bei der Synthese und Silke Bergemann für die umfangreiche Unterstützung bei den Zelltestungen danken.

Des Weiteren möchte ich den Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Pharmazie der Freien Universität Berlin, insbesondere Frau Dr. Grimm und den Assistentinnen und Assistenten des achten Semesters für die gute Arbeitsatmosphäre und Kooperation danken. Eleonore Christmann-Oesterreich, Jürgen Lindemann, Heike Scheffler und Bettina Zeisig danke ich für die wertvolle Unterstützung bei der Analytik.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Schäfer vom Institut für Chemie und Biochemie der FU Berlin für die Durchführung der ROESY-Experimente.

Herrn Prof. Dr. Wolber und seinem Arbeitskreis danke ich für die Durchführung der Molecular-Modelling-Untersuchungen und für die Bereitstellung der UV- und Fluoreszenzspektrometer.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern, und meinen Freunden für die immer währende Unterstützung und Aufmunterung.



# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Brustkrebs</b>	<b>1</b>
1.2	<b>Der Estrogenrezeptor</b>	<b>2</b>
1.2.1	Aufbau	2
1.2.2	Liganden	3
1.2.3	Ligandenbindung und Signaltransduktion	6
1.3	<b>Fluoreszenzmarkierte Estrogenrezeptorliganden</b>	<b>7</b>
1.3.1	Konjugate	8
1.3.2	Photofluorogene Verbindungen	9
1.3.3	Inhärent fluoreszierende ER-Liganden	10
1.4	<b>Problemstellung</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>15</b>
2.1	<b>Synthese</b>	<b>15</b>
2.1.1	Übersicht der Synthesewege	15
2.1.2	Synthese von 5-Methoxy-2-nitroanilin	17
2.1.3	<i>N</i> -Alkylierung von 2-Nitroanilinen	19
2.1.4	Synthese von 4,5-Dinitroveratrol	22
2.1.5	Synthese von <i>o</i> -Phenylendiaminen	22
2.1.5.1	Reduktion von Nitrogruppen mit Wasserstoff	23
2.1.5.2	Reduktion von Nitrogruppen mit Zinn(II)-chlorid	25
2.1.6	Synthese von 2,2'-Bisbenzimidazolen	26
2.1.6.1	Synthese von 2,2'-Bisbenzimidazolen aus <i>o</i> -Phenylendiaminen	26
2.1.6.2	Synthese von <i>N</i> -substituierten 2,2'-Bisbenzimidazolen aus 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1 <i>H</i> -benzimidazol	30
2.1.7	Synthese von 5,5',6,6'-Tetramethoxy-2,2'-bisbenzimidazolen	34
2.1.8	Synthese von <i>N,N'</i> -verbrückten 2,2'-Bisbenzimidazolen	35

2.1.9	Synthese von 2,2'-überbrückten Benzimidazolen	38
2.1.10	Etherspaltung von Methoxyschutzgruppen	39
2.1.11	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie zur Isomerentrennung	42
<b>2.2</b>	<b>Strukturuntersuchungen</b>	<b>46</b>
2.2.1	Kernresonanzspektroskopie	46
2.2.1.1	<sup>1</sup> H-NMR-Spektren bei variablen Temperaturen	47
2.2.1.2	Protonenresonanzspektren der Stellungsisomere	55
2.2.1.3	Kern-Overhauser-Effekt und zweidimensionale Protonenkorrelation	60
2.2.2	UV-spektroskopische Untersuchungen	66
2.2.2.1	pH-abhängige Absorptionsspektroskopie	67
2.2.2.2	Absorptionsspektren ausgewählter 2,2'-Bisbenzimidazolderivate	72
2.2.3	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen	82
2.2.4	Stokesverschiebung	97
<b>2.3</b>	<b>Pharmakologische Untersuchungen</b>	<b>99</b>
2.3.1	Verwendete Zelllinien	99
2.3.2	Testung auf Hemmung der Zellproliferation	100
2.3.3	Bestimmung der estrogenen und antiestrogenen Wirkung	104
2.3.4	Herabregulation des ER $\alpha$	110
2.3.5	Molecular Modelling	112
2.3.6	Rezeptorbindung	114
2.3.7	Mikroskopische Zellbeobachtungen	116
<b>3</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>119</b>
<b>4</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>121</b>
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>123</b>
<b>5.1</b>	<b>Synthetischer und analytischer Teil</b>	<b>123</b>
5.1.1	Verbrauchsmaterialien	123
5.1.2	Geräte	123
5.1.3	Synthesvorschriften und analytische Daten	125
5.1.3.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften	125

5.1.3.2	Synthese von 5-Methoxy-2-nitroanilin	127
5.1.3.3	<i>N</i> -Alkylierung von 2-Nitroanilinen	128
5.1.3.4	Synthese von 4,5-Dinitroveratrol	133
5.1.3.5	Synthese von <i>o</i> -Phenylendiaminen	134
5.1.3.6	Synthese von 2,2'-Bisbenzimidazolen	139
5.1.3.7	Synthese von 5,5',6,6'-Tetramethoxy-2,2'-bisbenzimidazolen	154
5.1.3.8	Synthese von <i>N,N'</i> -verbrückten 2,2'-Bisbenzimidazolen	155
5.1.3.9	Synthese von 2,2'-überbrückten Benzimidazolen	156
5.1.3.10	Etherspaltung von Methoxyschutzgruppen	158
5.1.3.11	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie zur Isomerentrennung	174
<b>5.2</b>	<b>Strukturuntersuchungen</b>	<b>175</b>
5.2.1	UV-spektroskopische Untersuchungen	175
5.2.2	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen	176
<b>5.3</b>	<b>Pharmakologischer Teil</b>	<b>177</b>
5.3.1	Verbrauchsmaterialien	177
5.3.2	Geräte	179
5.3.3	Pharmakologische Methoden	180
5.3.3.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften	180
5.3.3.2	Testung auf Hemmung der Zellproliferation	184
5.3.3.3	Bestimmung der estrogenen und antiestrogenen Wirkung	186
5.3.3.4	Herabregulation des ER $\alpha$	190
5.3.3.5	Rezeptorbindung	192
5.3.3.6	Mikroskopische Zellbeobachtungen	195
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>197</b>
<b>7</b>	<b>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS</b>	<b>205</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>207</b>





## Abkürzungsverzeichnis

$\delta$	chemische Verschiebung
$\varepsilon_{\lambda}$	molarer Absorptionskoeffizient (bei einer bestimmten Wellenlänge)
$\lambda$	Wellenlänge
$\lambda_A$	Wellenlänge des Absorptionsmaximums im Anregungsspektrum
$\lambda_{Em}$	Wellenlänge des Emissionsmaximums
$\lambda_{max}$	Wellenlänge des Absorptionsmaximums im Absorptionsspektrum
$\nu$	Frequenz
$\nu_0$	Anregungsfrequenz
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
[D6]-DMSO	Dimethylsulfoxid, deuteriert
2D / 3D	zwei- / dreidimensional
A	Absorption
$A_{max}$	Absorptionsmaximum
Å	Angström
Abb.	Abbildung
abs.	absolut (wasserfreies Lösungsmittel)
ACN	Acetonitril
AF	Aktivierungsfunktion
ATR	abgeschwächte Totalreflexion
b	Schichtdicke der Küvette
bar	Bar (Einheit des Druckes)
BBI	2,2'-Bisbenzimidazol(-derivat)
ber.	berechnet
bidest.	bidestilliert (zweifach destilliertes Wasser)
bzgl.	bezüglich
c	Konzentration (Concentration)
ca.	circa
$\text{CDCl}_3$	Chloroform, deuteriert
CHN	CHN-Elementaranalyse

D <sub>2</sub> O	Wasser, deuteriert
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DC	Dünnschichtchromatographie
d. h.	das heißt
DM	Dichlormethan
DE	Diethylether
DES	Diethylstilbestrol
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic Acid)
E2	Estradiol
EA	Ethylacetat
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration (half maximal Effective Concentration)
ESI	Elektrosprayionisierung
Em	Emission
(h)ER( $\alpha/\beta$ )	(humaner) Estrogenrezeptor ( $\alpha/\beta$ )
ERE	Estrogen-responsives Element
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
FCS	fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FM	Fließmittel
FT	Fourier-Transformation
g	Gramm
gef.	gefunden
h	Stunden (Hours)
<sup>1</sup> H-NMR	Protonenresonanz
Hal	Halogen
HAP	Hydroxyapatit
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase)

## Abkürzungsverzeichnis

---

Hsp	Hitzeschockprotein
HT	Hochtemperatur
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration (half maximal Inhibitory Concentration)
IR	Infrarot
I <sub>rel</sub>	relative Intensität der Fluoreszenz
J	Kopplungskonstante
Kap.	Kapitel
konz.	konzentriert
L	Liter
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LM	Lösungsmittel
<i>m</i>	<i>meta</i>
M	Molar (in mol·L <sup>-1</sup> )
MaCa	Mammakarzinom (Mammacarcinom)
MCF-7	Michigan Cancer Foundation; -Zelllinie: hormonabhängige humane Mammakarzinomzelllinie
MDA-MB-231	Monroe Dunaway Anderson; -Zelllinie: hormonunabhängige humane Mammakarzinomzelllinie
MeOH	Methanol
min	Minute
MPLC	Mitteldruckchromatographie (Medium Pressure Liquid Chromatography)
MS	Massenspektrometrie
2-NA	2-Nitroanilin(-derivat)
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
NOE	Kern-Overhauser-Effekt (Nuclear Overhauser Effect)
OPD	<i>ortho</i> -Phenylendiamin(-derivat)
<i>o</i>	<i>ortho</i>
<i>p</i>	<i>para</i>
P	Leistung (Power)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)

---

PE	Petrolether (Siedebereich: 40-60 °C)
Pol II	RNA-Polymerase II
ppm	Teile pro Million (Parts Per Million)
R	Rest
RBA	relative Bindungsaffinität
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RGT-Regel	Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel
RLU	relative Lichteinheiten (Relative Light Units)
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
ROESY	Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy
rpm	Umdrehung pro Minute (Revolutions Per Minute)
RT	Raumtemperatur
SC	Säulenchromatographie
Sdp.	Siedepunkt
SERM	selektiver Estrogenrezeptormodulator
SI	Internationales Einheitensystem (Système international d'unités)
Smb. / Smp.	Schmelzbereich / Schmelzpunkt
Tab.	Tabelle
TAM	Tamoxifen
TATA	Basensequenz Thymin-Adenin-Thymin-Adenin (TATA) innerhalb des Promotors von Genen
TCA	2,2,2-Trichloracetimid säuremethylester
THC	Tetrahydrochrysen(-derivat)
TMS	Tetramethylsilan
t <sub>R</sub>	Retentionszeit (Retention Time)
U2OS	U2-Osteosarkom; -Zelllinie: eine humane Osteosarkomzelllinie
UV	ultraviolettes Licht
VIS	sichtbares Licht (Visible)
z. B.	zum Beispiel

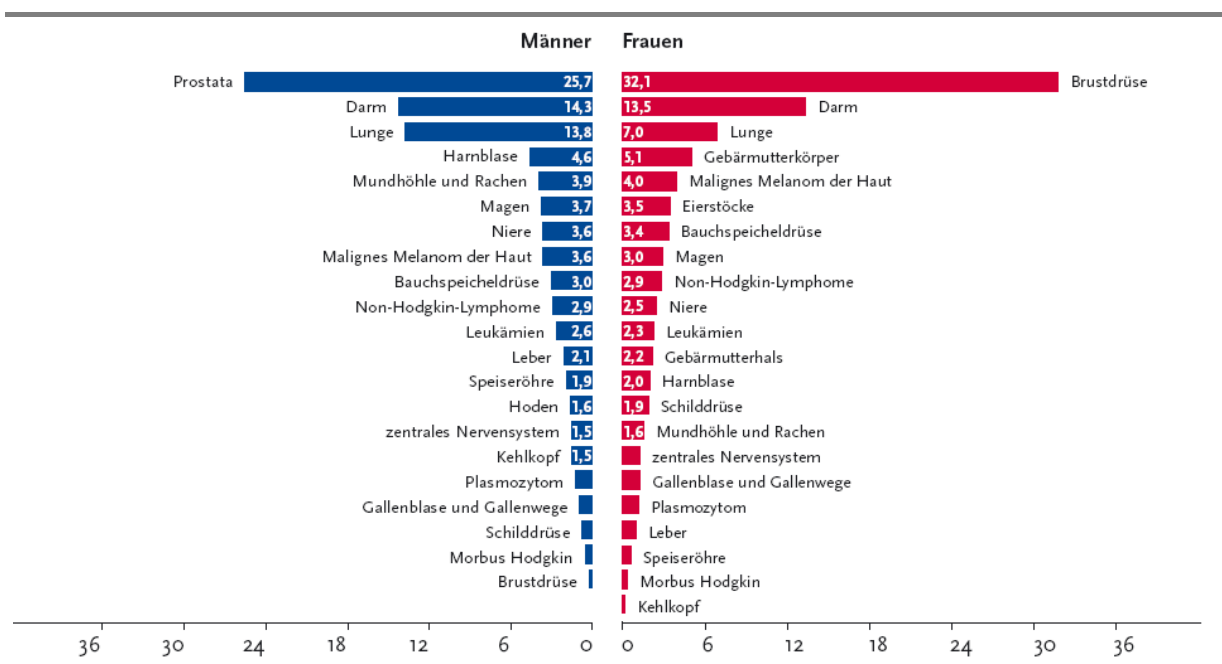
des Weiteren gelten die SI-Einheiten, die abgeleiteten SI-Einheiten und die SI-Präfixe

# 1 Einleitung

## 1.1 Brustkrebs

Krebs ist in Deutschland nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache.

Brustkrebs (Mammakarzinom, MaCa) stellt die häufigste Krebsneuerkrankung bei Frauen dar (Abb. 1), wobei das mittlere Erkrankungsalter sinkt. Frühzeitig erkannt ist das MaCa oft heilbar, die Sterblichkeit ist daher trotz steigender Inzidenz rückläufig.



**Abb. 1:** Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2008 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) <sup>[1]</sup>

Circa 60 % der Mammatumore sind hormonabhängig, d. h. die Zellen besitzen Estrogenrezeptoren und benötigen Estradiol (E2) für ihr Wachstum <sup>[2]</sup>. Brusttumore, die hormonempfindlich sind, können mit selektiven Estrogenrezeptormodulatoren (SERMs), Aromataseinhibitoren oder Hormonantagonisten behandelt werden. Antiestrogene Substanzen belasten die Patientinnen in der Regel weniger als eine zytostatische Therapie mit Alkylantien, Antimetaboliten oder Mitosehemmstoffen. Bei der Wahl der Therapie spielt daher die Unterscheidung zwischen hormonabhängigen und hormonunabhängigen Tumoren eine große Rolle <sup>[3]</sup>.

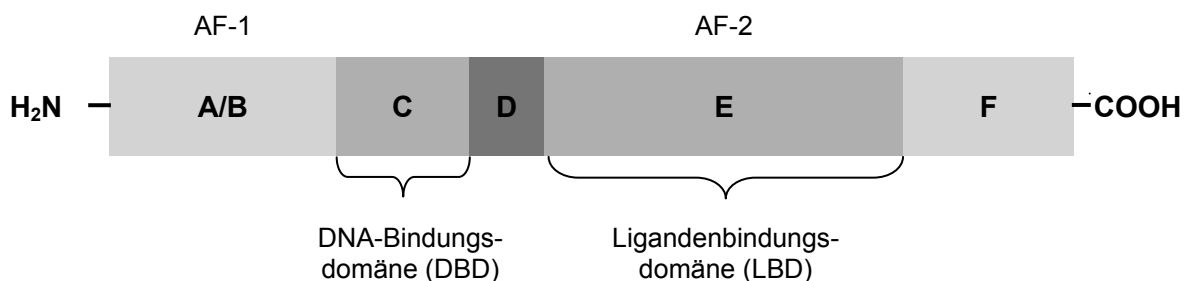
## 1.2 Der Estrogenrezeptor

Der Estrogenrezeptor (ER) gehört zur Klasse der ligandeninduzierbaren Transkriptionsfaktoren und damit zur Familie der Steroidhormonrezeptoren<sup>[4]</sup>. ER steht nachfolgend als Synonym für die Subtypen des (humanen) Estrogenrezeptors alpha und beta ([h]ER $\alpha$  und [h]ER $\beta$ ). Beide Subtypen werden durch unterschiedliche Gene codiert. Während sich das Gen für ER $\alpha$  auf Chromosom 6 befindet, befindet sich das für ER $\beta$  auf Chromosom 14<sup>[5, 6]</sup>.

Die beiden ER-Subtypen weisen unterschiedliche Gewebeverteilung im Körper auf<sup>[7]</sup>. In der Prostata, den Eierstöcken, den Hoden sowie im Gastrointestinaltrakt wird vor allem ER $\beta$  exprimiert. Im zentralen Nervensystem, kardiovaskulären System, Urogenitaltrakt und in den Knochen liegen beide ER-Subtypen nebeneinander vor. Im Uterus und in der Brustdrüse überwiegt ER $\alpha$ <sup>[8]</sup>. Im MaCa verschiebt sich das Verhältnis der ER-Subtypen zugunsten des ER $\alpha$ <sup>[9]</sup>.

### 1.2.1 Aufbau

Als Steroidhormonrezeptor gehört der ER zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren und besitzt sechs Regionen (A-F, Abb. 2)<sup>[10]</sup>.



**Abb. 2:** Allgemeiner Aufbau der Estrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$ , schematische Darstellung

Der N-Terminus wird durch die A/B-Domäne gebildet. Sie ist Träger der ligandenunabhängigen Aktivierungsfunktion-1 (AF-1) und aktiviert die Transkription, indem sie mit dem Präinitiationskomplex der Transkription oder Koaktivatoren in Wechselwirkung tritt.

Die Region C (DNA-Bindungsdomäne, DBD) ist für die Erkennung bestimmter DNA-Sequenzen innerhalb des Promotors der estrogenabhängigen Zielgene, den sogenannten Estrogen-responsiven Elementen (EREs), und für die Rezeptordimerisierung verantwortlich. Sie ist die am höchsten konservierte Region der Steroidhormonrezeptoren.

Die wenig charakterisierte Domäne D („hinge region“) ermöglicht die der Ligandenbindung folgende Rezeptorkonformationsänderung.

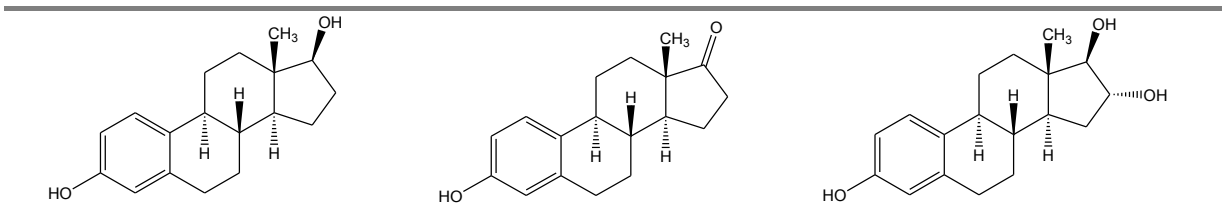
Am C-terminalen Ende befindet sich die Region E, in der die Ligandenbindungsdomäne (LBD) und die hormonabhängige AF-2 lokalisiert sind. Die Region E ist für Dimerisierung, nukleare Lokalisation und Transaktivierung zuständig. Durch die Domäne F werden die agonistische und antagonistische Aktivität von Antiestrogenen beeinflusst.

Die Homologie von ER $\alpha$  und ER $\beta$  liegt im Bereich der LBD bei 47 % <sup>[11]</sup>. Eine deutlich höhere Übereinstimmung (97 %) weist die DBD beider Rezeptortypen auf. Der physiologische Ligand E2 wird an beide ER-Subtypen gebunden.

### 1.2.2 Liganden

#### Agonisten

Die drei nativen Formen der endogenen Estrogene sind E2, Estron und Estriol (Abb. 3), wobei E2 das potenteste Estrogen darstellt. Sie gehören ebenso wie die Gluko- und Mineral-kortikoide zur Klasse der Steroidhormone. Neben dem physiologischen Liganden E2, existiert eine Vielzahl sehr unterschiedlicher Strukturen, die eine Affinität zum ER aufweisen. Dabei kann in Typ-I- und in Typ-II-Estrogene unterschieden werden <sup>[11, 12]</sup>.

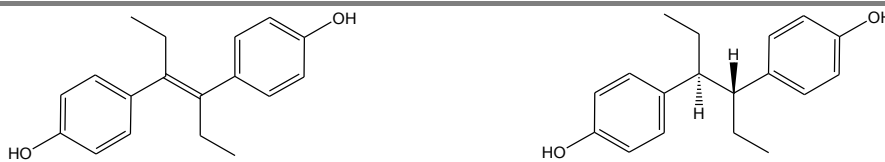


**Abb. 3:** Native Formen der endogenen Estrogene: E2, Estron, Estriol (von links nach rechts)

Typ-I-Estrogene sind dem E2 strukturell ähnlich und zeigen einen mit E2 vergleichbaren Bindungsmodus: Für die Wechselwirkung mit dem ER $\alpha$  spielen sowohl der Abstand der beiden OH-Gruppen als auch deren Positionierung in der ER $\alpha$ -Bindungstasche sowie der lipophile Teil des Moleküls eine entscheidende Rolle. Die Ligandenbindung erfolgt durch die Kombination spezifischer Wasserstoffbrücken und Van-der-Waals-Wechselwirkungen.

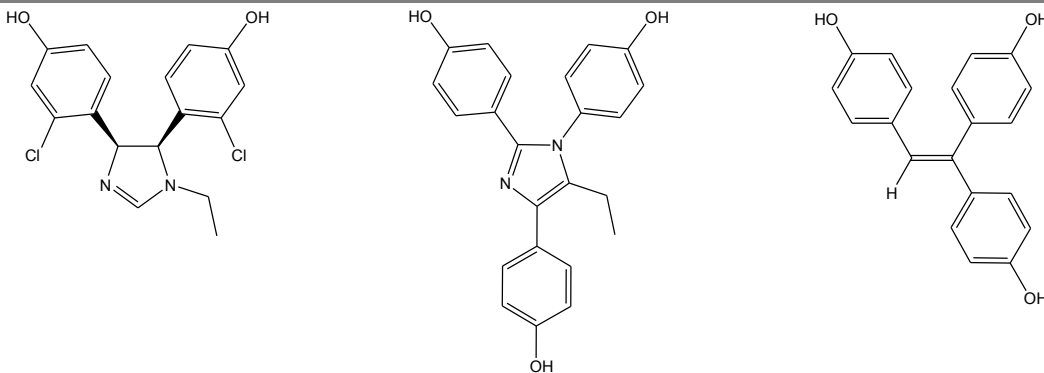
Beim physiologischen Liganden E2 geht die phenolische Hydroxygruppe Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Glutamin 353 und Arginin 394 ein, die Hydroxygruppe in Position 17 bildet eine Wasserstoffbrücke zur Aminosäure Histidin 524 aus. Van-der-Waals-Wechselwirkungen finden mit den lipophilen und aromatischen Aminosäuren in näherer Umgebung, insbesondere Leucin 346 und 384, Tryptophan 383 sowie Phenylalanin 404, statt.

Beispiele für Typ-I-Estrogene sind die synthetischen Estrogene Diethylstilbestrol (DES) und Hexestrol (Abb. 4). Weitere Molekülmodifikationen führten zur Entwicklung von ER-Liganden, die aufgrund ihrer Struktur als fluoreszierende ER-Liganden eingesetzt werden können (Kap. 1.3).



**Abb. 4:** Typ-I-Estrogene: DES (links), Hexestrol (rechts)

Typ-II-Estrogene weisen aufgrund ihrer Struktur einen anderen Bindungsmodus als E2 auf. Beispiele für Typ-II-Estrogene sind etliche Derivate von 2-Imidazolinen, Imidazolen und Triarylalkenen (Abb. 5).

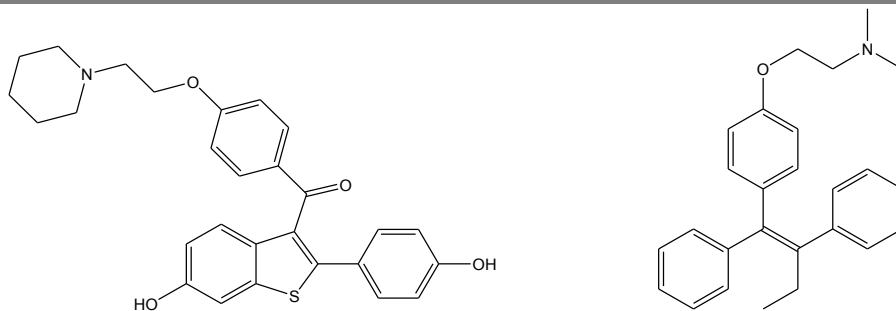


**Abb. 5:** Typ-II-Estrogene: jeweils ein Beispiel für ein 2-Imidazolin, Imidazol und Triarylalken (von links nach rechts)



### Selektive Estrogenrezeptormodulatoren

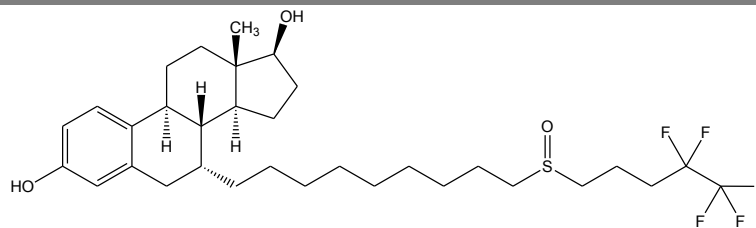
Nachdem die Bedeutung der Estrogene für das Wachstum und die Entstehung vom MaCa erforscht wurde, führte dies konsequenterweise zur Entwicklung der SERMs. Diese ER-Modulatoren sollen die nützlichen agonistischen Effekte beispielsweise im Knochen und im kardiovaskulärem System beibehalten, aber keine estrogenere Wirkung im Brustgewebe und Uterus zeigen<sup>[13-15]</sup>. Beispiele für SERMs sind nichtsteroidale Verbindungen wie Tamoxifen (TAM) und Raloxifen (Abb. 6)<sup>[16]</sup>.



**Abb. 6:** Raloxifen (links), TAM (rechts)

### Antagonisten

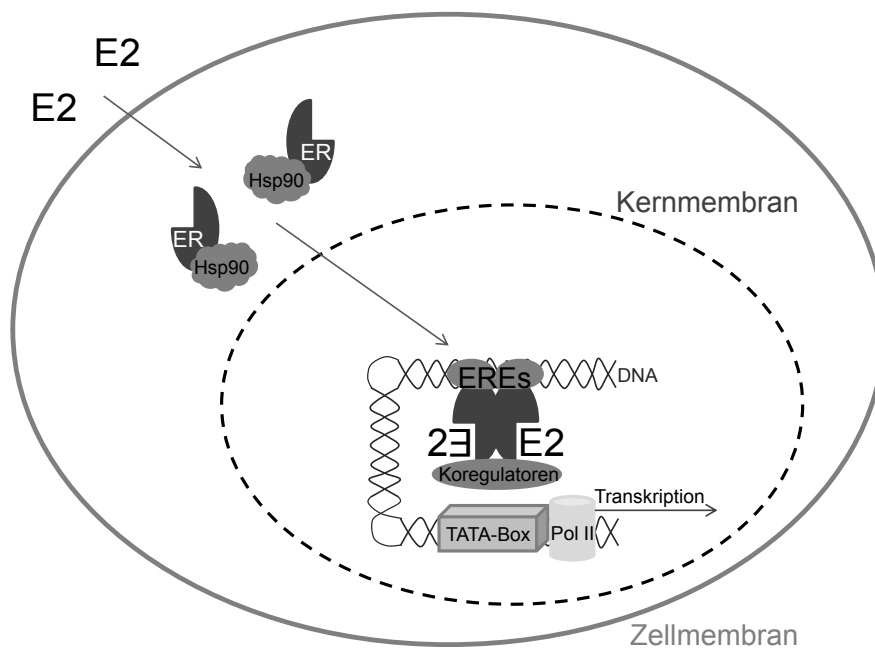
Ein reiner ER $\alpha$ -Antagonist und selektiver Estrogenrezeptor-Down-Regulator (selective estrogen receptor downregulator, SERD) ist z. B. Fulvestrant (ICI 182 780, Abb. 7). Fulvestrant bindet kompetitiv an den ER $\alpha$  und unterbindet durch die lange Seitenkette die Konformationsänderung des ER $\alpha$ . Dadurch wird die Aktivierung der AF-1 und AF-2 sowie die Rezeptordimerisierung verhindert. Der ER $\alpha$  bleibt inaktiv und wird abgebaut<sup>[17]</sup>.



**Abb. 7:** Fulvestrant (ICI 182 780)

### 1.2.3 Ligandenbindung und Signaltransduktion

Der ER liegt ohne Ligand inaktiv an Hitzeschockproteine (Hsps) z. B. an Hsp90 gebunden im Zytosol als Monomer vor <sup>[18]</sup>. Nach der Ligandenbindung wird das Hitzeschockprotein vom ER abgespalten, der Rezeptor ändert seine Konformation und dimerisiert (Abb. 8) <sup>[19]</sup>. Bei der Dimerisierung des ER werden sowohl Homodimere als auch Heterodimere aus ER $\alpha$  und ER $\beta$  gebildet. ER $\alpha$ /ER $\beta$ -Heterodimere und ER $\alpha$ /ER $\alpha$ -Homodimere weisen gegenüber den ER $\beta$ /ER $\beta$ -Homodimeren eine größere Affinität zur DNA auf <sup>[20, 21]</sup>.



**Abb. 8:** Modell der Transkriptionsaktivierung, vereinfacht nach Katzenellenbogen <sup>[22]</sup>

Der aktivierte Ligand-Rezeptor-Komplex bindet im Zellkern an die EREs. Neben den Wechselwirkungen zwischen dem ER und den an der TATA-Box gebundenen Transkriptionsfaktoren, sind Interaktionen mit Koaktivatoren erforderlich, um den Präinitiationskomplex zu bilden. Anschließend kann die RNA-Polymerase II (Pol II) die Transkription aktivieren (Abb. 8).

Neben dem ER-vermittelten Weg der Signaltransduktion kommt es nach Ligandenbindung am ER auch zu Wechselwirkungen mit anderen Transkriptionsfaktoren beispielsweise mit dem Nuklearfaktor-kappa B <sup>[23]</sup>. Auf diesem Weg kann die Transkription von Genabschnitten aktiviert werden, die nicht die EREs, sondern die DNA-Sequenz anderer Zielgene beinhalten.

### 1.3 Fluoreszenzmarkierte Estrogenrezeptorliganden

Die Visualisierung des ER in den Zellen ist Inhalt zahlreicher Forschungsarbeiten<sup>[24-27]</sup>. Die Bestimmung seiner Konzentration und Verteilung in humanen Brusttumoren liefert für prognostische und prädiktive Faktoren wichtige Informationen. Neben radioaktiven Verfahren mit tritiummarkierten Liganden und Iod-125-markiertem E2 finden auch rezeptorspezifische monoklonale Antikörper in biochemischen Assays Verwendung<sup>[28-31]</sup>.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der ER-Konzentration und -Verteilung in Brustkrebszellen basiert auf dem Einsatz fluoreszierender ER-Liganden in der Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie<sup>[32]</sup>. Mit Hilfe fluoreszierender ER-Liganden kann ebenfalls die Ligand-Rezeptor-Assoziation und -Dissoziation in Echtzeit mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie oder Fluoreszenzpolarisation untersucht werden. Ihre Anwendung ist auch in Ligand-Rezeptor-Bindungsstudien anstelle radioaktiv markierter Liganden vorstellbar.

#### Strukturelle Voraussetzungen für die Fluoreszenz

Voraussetzungen für die Fluoreszenz einer Substanz sind das Vorhandensein eines Systems konjugierter Doppelbindungen und die Absorption von Licht. Die Präsenz eines Fluorophors, dem für die Fluoreszenz eines Moleküls verantwortlichen Teil, bedingt nicht zwingend das Auftreten von Fluoreszenz. Strahlungslose Inaktivierung und Spinumkehr sowie Eigenlöschung können die Fluoreszenz auf Null absenken oder sie so stark verringern, dass ihre Messung nicht möglich ist.

Fluoreszenz, die jedoch bei sehr niedrigen Wellenlängen auftritt, kann bereits bei einfachen Aromaten wie Phenol ( $\lambda_{Em} = 300 \text{ nm}$ ) und Anilin ( $\lambda_{Em} = 350 \text{ nm}$ ) gemessen werden. Durch Erhöhung der Planarität und Rigidität werden die Vibrationen und Rotationen der aromatischen Ringe eingeschränkt, so dass eine Bandenverschiebung der Emissionsmaxima zu höheren Wellenlängen sowie eine gesteigerte Intensität des Fluoreszenzlichtes erreicht werden. Die Emission bei höheren Wellenlängen ist Voraussetzung für Untersuchungen der Lokalisation der Substanzen in den Zellen.

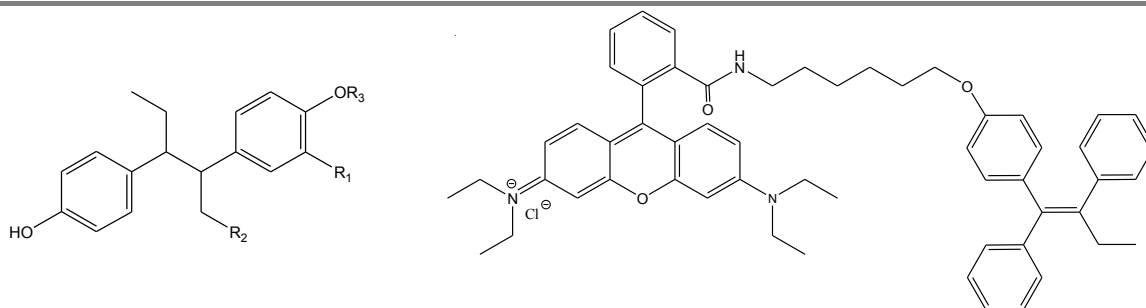
### Anforderungen an fluoreszierende ER-Liganden

Fluoreszierende Verbindungen müssen für den Einsatz als ER-Liganden folgende Voraussetzungen erfüllen: Sie sollten eine hohe Affinität zum ER zeigen und dabei eine geringe nicht spezifische Bindung an andere zelluläre Proteine aufweisen<sup>[33]</sup>. Sie sollten eine hohe Intensität des Fluoreszenzlichtes (großer molarer Absorptionskoeffizient, hohe Quantenausbeute) besitzen und ein Emissionsmaximum im langwelligen Bereich (> 400 nm) zeigen, damit eine Abgrenzung gegen die Hintergrundfluoreszenz vorliegt. Diese wird durch die Emission der Zellen und Proteine, ausgehend von z. B. Tyrosin- und Tryptophanresten (Tyrosin:  $\lambda_{Em} = 303$  nm, Tryptophan:  $\lambda_{Em} = 348$  nm), erzeugt. Des Weiteren sollte die Anregung der Fluoreszenz mit gebräuchlichen Lasern der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie oder Fluoreszenzmikroskopie möglich sein.

In der Literatur werden zahlreiche Versuche beschrieben, niedermolekulare fluoreszierende Verbindungen für Untersuchungen des ER zu entwickeln. Diese Substanzen können in Konjugate aus ER-Liganden und Fluoreszenzfarbstoffen (Kap. 1.3.1), photofluorogene (Kap. 1.3.2) sowie inhärent fluoreszierende ER-Liganden (Kap. 1.3.3) unterschieden werden.

#### 1.3.1 Konjugate

Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) und ER-Ligand sind direkt oder über einen Spacer verbunden<sup>[34]</sup>. Beispiele sind nichtsteroidale ER-Liganden mit Hexestrolgrundkörper, die in *o*-Stellung zur phenolischen Hydroxygruppe ( $R_1$ ), an der Ethylkette ( $R_2$ ) oder durch Veretherung der phenolischen Hydroxygruppe ( $R_3$ ) mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind (Abb. 9)<sup>[35, 36]</sup>.



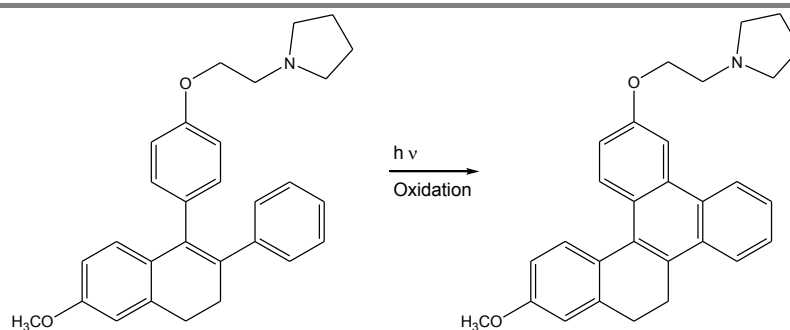
**Abb. 9:** Fluoreszenzmarkierte Hexestrolanaloga: Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff in *o*-Stellung zur phenolischen Hydroxygruppe ( $R_1$ ), an der Ethylkette ( $R_2$ ) oder durch Veretherung der phenolischen Hydroxygruppe ( $R_3$ ) (links); mit Rhodamin B markiertes TAM-Analogon (rechts)

Solche Konjugate weisen in der Regel hohe Fluoreszenzintensitäten und zu höheren Wellenlängen verschobene Emissionsmaxima auf. Allerdings können sie sich aufgrund ihrer Größe oft nicht mehr in die lipophile Bindungstasche des ER legen, so dass es häufig zur Reduktion der Bindungsaffinität kommt.

Ein Forschungsschwerpunkt im Arbeitskreis um Prof. Gust war die Versuchsdurchführung mit fluoreszierenden Verbindungen der mit Rhodamin B markierten TAM-Analoga (Abb. 9) <sup>[24]</sup>. Diese zeigten jedoch zu geringe ER-Affinitäten, um in Rezeptorbindungsstudien eingesetzt werden zu können.

### 1.3.2 Photofluorogene Verbindungen

Durch UV-Strahlung können nichtfluoreszierende Liganden mit hoher relativer Bindungsaffinität (RBA) für den ER in einen Fluorophor umgewandelt werden <sup>[37]</sup>. Eine photochemische Zyklisierung mit anschließender Oxidation findet zum Beispiel bei Nafoxidin statt. Nafoxidin ist eine dem TAM ähnliche nichtsteroidale Verbindung. Es reagiert zu einem fluoreszierenden Phenanthren (Abb. 10) <sup>[38]</sup>.

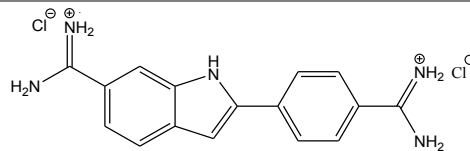


**Abb. 10:** Photochemische Zyklisierung und Oxidation von Nafoxidin zum Phenanthren

Die so erhaltenen Moleküle haben im Vergleich zu den Konjugaten eine deutlich geringere Größe. Durch die Veränderung der räumlichen Anordnung kommt es zu einer hohen Planarität und damit zu einer Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften. Aufgrund der zu geringen RBA-Werte sind die photofluorogenen Verbindungen für Rezeptorbindungsstudien allerdings ungeeignet. Ihr Einsatz ist beispielsweise bei der klinischen Bestimmung des Plasmalevels von TAM und seinen Metaboliten möglich <sup>[39, 40]</sup>.

### 1.3.3 Inhärent fluoreszierende ER-Liganden

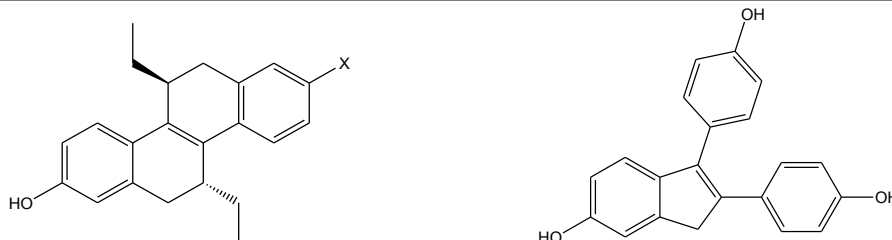
Unter dem Begriff der inhärent fluoreszierenden Verbindungen wird der Einsatz von Substanzen verstanden, die den Fluorophor bereits im Molekül integriert haben. Die Fluoreszenz der Zielstruktur wird erst durch Präparation mit der fluoreszierenden Substanz erzeugt, es handelt sich somit um induzierte Fluoreszenz.



**Abb. 11:** DAPI

Ein Beispiel für einen etablierten Fluoreszenzfarbstoff ist 4',6-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI, Abb. 11), das auch im Rahmen dieser Arbeit zur Visualisierung des Zellkerns verwendet wird. DAPI bindet an die Adenin-Thymin-reichen Regionen der DNA und kann bei Anregung mit ultraviolettem Licht als blaue Farbe unter dem Fluoreszenzmikroskop wahrgenommen werden.

Ausgehend von der Stilbenstruktur sind in der Literatur zahlreiche Versuche zur Visualisierung des ER mittels Fluoreszenzmikroskopie beschrieben <sup>[41-47]</sup>. Beispiele sind Donor-Akzeptor-Tetrahydrochrysen (Donor-Akzeptor-THCs, Abb. 12), 2,3-Diaryllindene (Abb. 12), 2,3-Bis(4-hydroxyphenyl)indole (Abb. 13) und Styrylpyridine (Abb. 13) <sup>[48-50]</sup>.

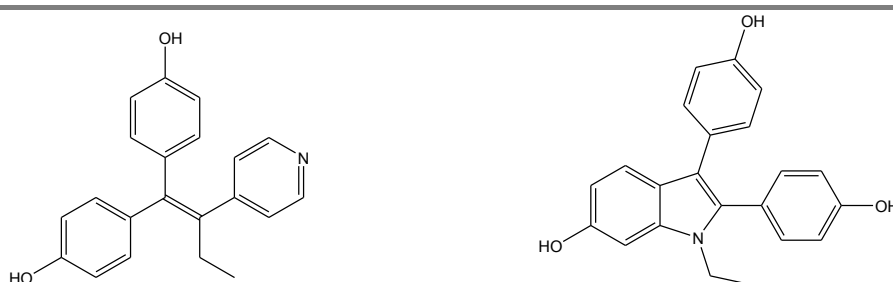


**Abb. 12:** Fluoreszierende Donor-Akzeptor-THCs, X = COCH<sub>3</sub>, CONH<sub>2</sub>, CN (links); ein Beispiel für ein 2,3-Diaryllinden (rechts)

Donor-Akzeptor-THCs, die ersten inhärent fluoreszierenden Verbindungen mit guten Fluoreszenzeigenschaften und ausreichender Rezeptoraffinität, ermöglichen die Visualisierung des ER unter Verwendung konventioneller Epifluoreszenzmikroskopie <sup>[48, 51, 52]</sup>.

Die gewünschte Verschiebung der Lage der Emissionsmaxima zu höheren Wellenlängen konnte bei den THCs durch Einführen einer Protonenakzeptorgruppe anstelle der Hydroxygruppe (Donor) erreicht werden. Ähnliche Molekülmodifikationen führten bei den 2,3-Diarylindenen zu Verbindungen mit guten Fluoreszenzeigenschaften, jedoch mit zu geringen ER-Affinitäten.

Die Einführung eines Stickstoffatoms in den Phenylring und somit die Einbeziehung des  $n-\pi^*$  Zustandes stellt eine weitere Möglichkeit dar, die photochemischen Eigenschaften der Stilbenstruktur zu verbessern <sup>[33, 50]</sup>. Die erhaltenen Styrylpyridine (Abb. 13) weisen zwar gute RBA-Werte, aber geringe Fluoreszenzintensitäten auf.



**Abb. 13:** Ein Beispiel für ein Styrylpyridin (links) und ein 2,3-Bis(4-hydroxyphenyl)indol (rechts)

Da die 2,3-Bis(4-hydroxyphenyl)indole (Abb. 13) aufgrund der Torsion der 2- und 3-Arylringe eine geringe Planarität des Moleküls aufweisen, zeigen sie eine relativ geringe Emission des Fluoreszenzlichtes. Dabei konnte in Untersuchungen eine Abhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten und Lage der Emissionsmaxima von der Polarität und vom pH-Wert des Lösungsmittels (LM) gezeigt werden. Die am Stickstoff alkylierten Indole zeigten gute RBA-Werte <sup>[46]</sup>.

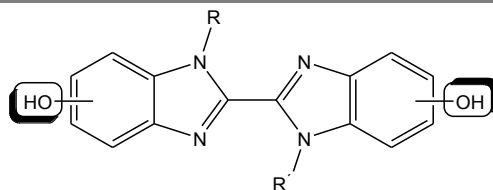
Die Donor-Akzeptor-THCs zeigen die besten Fluoreszenzeigenschaften, bzgl. der ER-Affinität zeigen sich dagegen die stickstoffhaltigen Verbindungen vielversprechend. Die Kombination der Strukturmerkmale soll in einem Molekül vereint werden, um eine Verbindung mit guten Fluoreszenzeigenschaften und ausreichender Rezeptoraffinität zu erhalten.

## 1.4 Problemstellung

Mit inhärent fluoreszierenden ER-Liganden konnte bisher im Bereich der niedermolekularen Verbindungen der größte Erfolg erzielt werden <sup>[53, 54]</sup>, so dass dieser Ansatz im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiter verfolgt wird. Eine interessante Methode ist die Visualisierung des Estrogenrezeptors mittels hormonell aktiver, fluoreszierender 2,2'-Bisbenzimidazole (BBIs).

Das Ziel dieser Arbeit ist die Synthese von BBIs, deren Struktur durch *N*-Substitution, *N,N'*-Verbrückung und durch Variation des Grundkörpers modifiziert werden soll. Sie sollen neben ausreichender Rezeptoraffinität über gute Fluoreszenzeigenschaften (hohe Fluoreszenzintensitäten und zu höheren Wellenlängen verschobene Emissionsmaxima) verfügen und damit zur Visualisierung des ER dienen können.

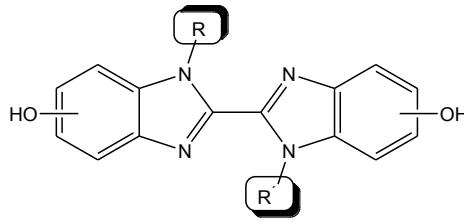
Strukturelle Voraussetzungen für eine Bindung an den Rezeptor sind phenolische Hydroxygruppen an einem lipophilen, planaren Grundgerüst, deren Abstand bei E2 11 Å und bei DES 12 Å beträgt <sup>[55]</sup>. So kann bei den BBIs mit einem O-O-Abstand von 13 Å die Voraussetzung für Interaktionen mit dem ER gegeben sein.



**Abb. 14:** BBIs, die Hydroxygruppen befinden sich in den Positionen 5,5'/5,6'/6,6'

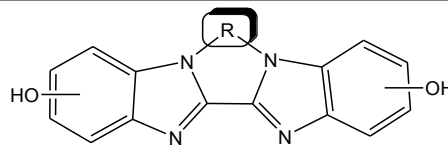
Abhängig vom gewählten Syntheseweg können Verbindungen mit 5,5'-, 5,6'- oder 6,6'-Stellung der phenolischen Hydroxygruppen erhalten werden (Abb. 14). Die Positionen der phenolischen Hydroxygruppen werden sowohl auf die ER-Bindung als auch auf die Fluoreszenzeigenschaften Einfluss haben. In der Literatur sind von der OH-Gruppenstellung abhängige RBA-Werte bei Typ-I-Estrogen beschrieben <sup>[55]</sup>. Deutliche Unterschiede bzgl. der Lage der Emissionsmaxima und Fluoreszenzintensitäten zeigten im Arbeitskreis um Prof. Gust durchgeführte Untersuchungen mit Benzimidazolen abhängig vom Substitutionsmuster der Hydroxygruppen <sup>[56, 57]</sup>.





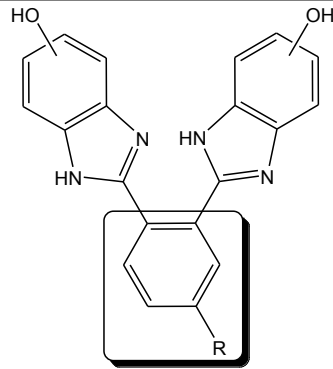
**Abb. 15:** BBIs, Variation der *N*-Substitution (R, R'): Mono- und Dialkylierungen oder -arylierungen, die Hydroxygruppen befinden sich in den Positionen 5,5'/5,6'/6,6'

Die *N*-Substitution hat eine Steigerung der Lipophilie zur Folge, die die lipophilen Wechselwirkungen mit der Rezeptorbindungstasche erhöhen kann. Durch ein aromatisches System mit konjugierten Doppelbindungen ist außerdem die Voraussetzung für Fluoreszenz gegeben. Die verschiedenen *N*-Substituenten (R, R') in Form von Mono- und Dialkylierungen oder -arylierungen (Abb. 15) können dabei sowohl die Lage der Emissionsmaxima als auch die Intensität der Fluoreszenz beeinflussen.



**Abb. 16:** *N,N'*-verbrückte BBIs, die Hydroxygruppen befinden sich in den Positionen 2 oder 3 und 10 oder 11

Des Weiteren sollen *N,N'*-verbrückte 2,2'-Bisbenzimidazole synthetisiert werden (Abb. 16). Durch diese Strukturveränderung kann eine Erhöhung der Rigidität und Planarität und somit eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität und Verschiebung des Emissionsmaximums zu höheren Wellenlängen erreicht werden. Ob die neu synthetisierten *N,N'*-verbrückten BBIs ausreichende Fluoreszenzeigenschaften zeigen und als ER-Liganden eingesetzt werden können, soll ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.



**Abb. 17:** 2,2'-überbrückte Benzimidazole: Modifikation der 2,2'-Überbrückung (R = H, OH), die Hydroxygruppen befinden sich in den Positionen 5,5'/5,6'/6,6'

Eine weitere Variationsmöglichkeit des 2,2'-Bisbenzimidazolgrundkörpers besteht in der Modifikation der 2,2'-Überbrückung (Abb. 17). Dabei soll ein System mit konjugierten Doppelbindungen erhalten bleiben, damit die Voraussetzung für ausreichende Fluoreszenzeigenschaften gegeben ist. Durch Verwendung von *o*-Dicarbonsäuren sollen Verbindungen synthetisiert werden, die aufgrund ihrer Struktur den Typ-II-Estrogenen zugeordnet werden können.

Die neu synthetisierten BBIs sollen hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften analysiert werden. Dabei sind insbesondere UV- und fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zur Charakterisierung erforderlich. Weitere Aufgaben bestehen in der Testung der (anti-)proliferativen Eigenschaften an der hormonabhängigen MCF-7- und der hormonunabhängigen MDA-MB-231-Zelllinie sowie in der Untersuchung der Wechselwirkungen mit dem ER.

Bei ausreichenden Fluoreszenzeigenschaften, d. h. wenn die Emission der Liganden außerhalb der Eigenfluoreszenz der Zellen liegt und die Fluoreszenzintensität hoch genug ist, und bei ausreichender Bindungsaffinität zum ER soll die Bestimmung der ER-Konzentration und -Verteilung im Brustkrebsgewebe unter Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden.

## 2 Ergebnisse und Diskussion

### 2.1 Synthese

#### 2.1.1 Übersicht der Synthesewege

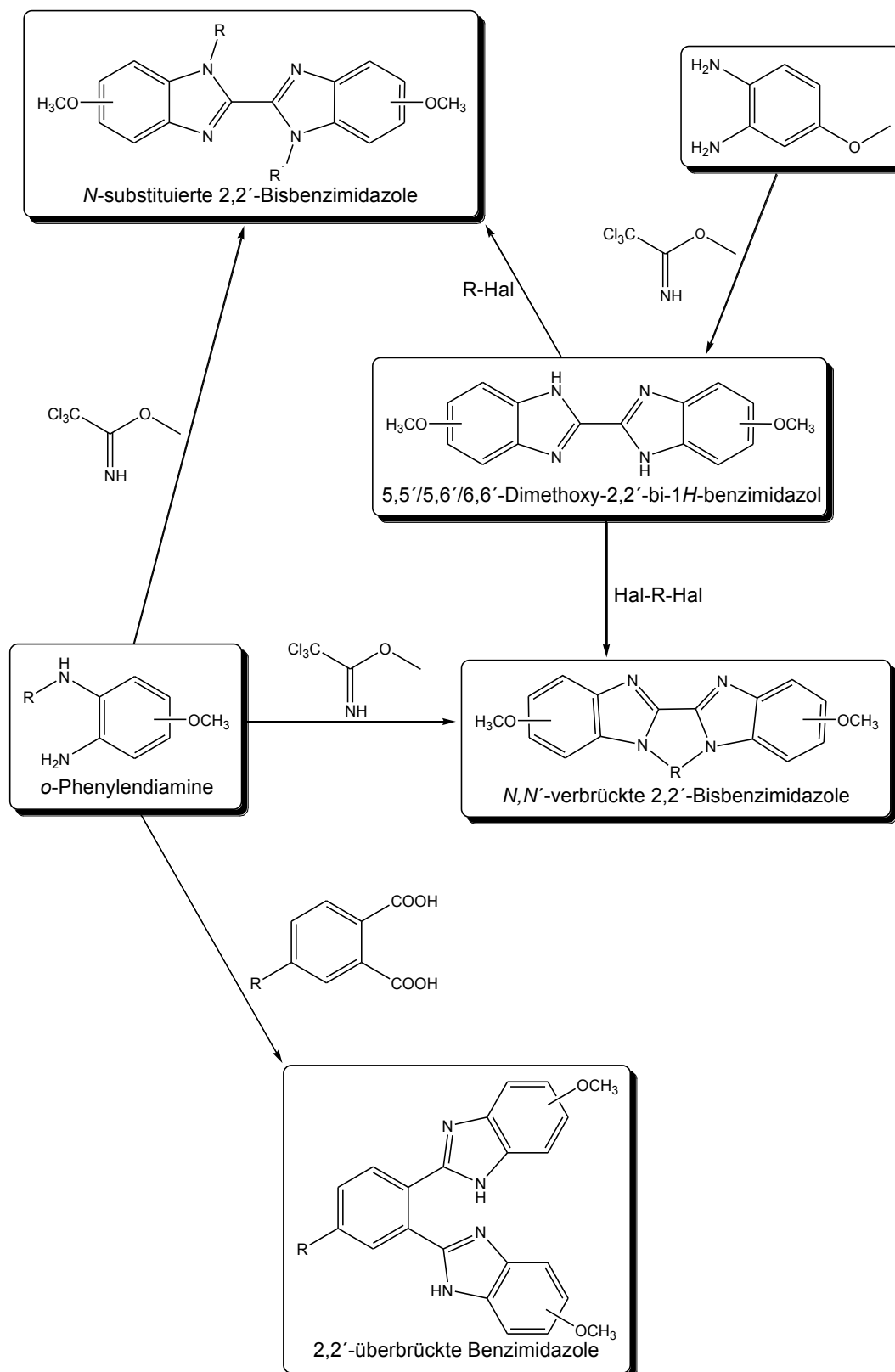
Im Folgenden wird ein Überblick (Abb. 18) über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Syntheseschritte dargestellt.

4-Methoxy-2-nitroanilin und 5-Methoxy-2-nitroanilin werden mit verschiedenen Alkylhalogeniden (R-Hal) am Stickstoff substituiert und nach der Reduktion zum entsprechenden Diamin mittels Ringschluss in das jeweilige *N*-substituierte symmetrische 2,2'-Bisbenzimidazolderivat überführt. Auf diese Weise können BBIs mit 5,5'- oder 6,6'-Stellung der beiden Methoxygruppen erfolgreich dargestellt werden. BBIs mit 5,6'-Stellung der beiden Methoxygruppen sind im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf diesem Weg nicht zugänglich.

Eine weitere Möglichkeit substituierte BBIs darzustellen, bietet der Syntheseweg über 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol. Auf diese Weise können die Stellungsisomerenmische der *N*-alkylierten BBIs mit 5,5'-, 5,6'- oder 6,6'-Stellung der beiden Methoxygruppen synthetisiert werden. Die dem Ringschluss sonst aus sterischen Gründen hinderlichen Reste können am 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol ebenso erfolgreich substituiert werden. Durch die Verwendung von Dihalogenidverbindungen (Hal-R-Hal) können *N,N'*-verbrückte BBIs dargestellt und durch Verwendung von *o*-Dicarbonsäuren in den Positionen 2 und 2' unterschiedliche Überbrückungen der beiden Benzimidazolringe synthetisiert werden.

Nach Abspaltung der Methylschutzgruppen werden die entsprechenden Dihydroxyverbindungen erhalten.

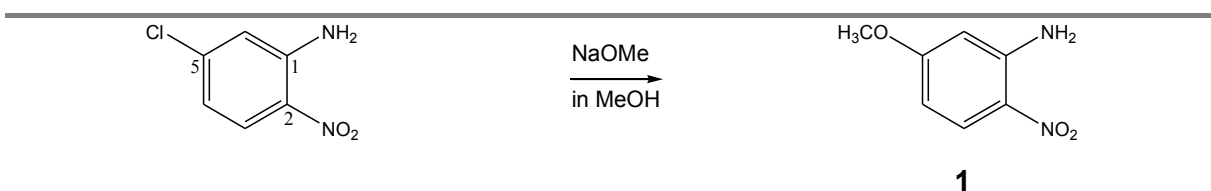
Die detaillierten Beschreibungen der Synthesen und Angaben zu den Substituenten erfolgen in den anschließenden Kapiteln (Kap. 2.1.2 - Kap. 2.1.11). Die genauen Synthesevorschriften befinden sich im experimentellen Teil (Kap. 5.1).



**Abb. 18:** Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit vorrangig verwendeten Syntheseschritte, Angaben zu den Substituenten erfolgen in den anschließenden Kapiteln (Kap. 2.1.2 - Kap. 2.1.11)

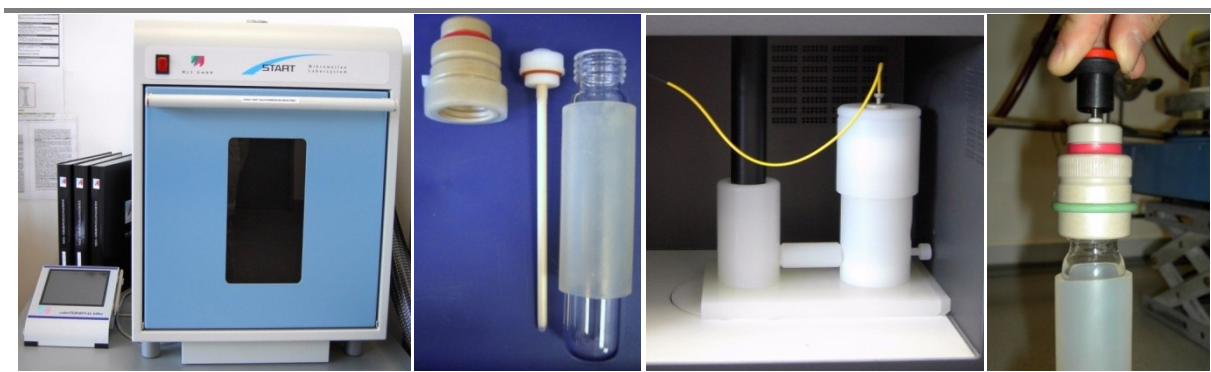
### 2.1.2 Synthese von 5-Methoxy-2-nitroanilin

Die 2-Nitroverbindung, die den Ausgangsstoff für die Synthesen der  $N^1$ -alkylierten 5-Methoxy-*o*-phenylendiamine und damit der *N*-alkylierten 6,6'-Dimethoxy-2,2'-bisbenzimidazole darstellt, wird im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert. Die Darstellung des 5-Methoxy-2-nitroanilins (**1**) erfolgt aus 5-Chlor-2-nitroanilin und Natriummethanolat in Methanol (MeOH) (Abb. 19).



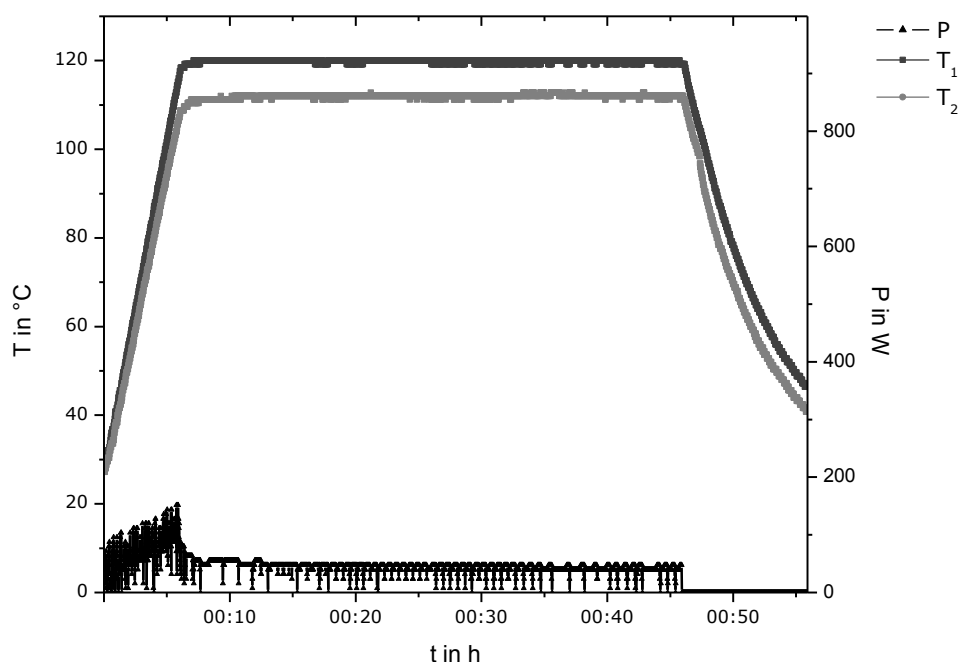
**Abb. 19:** Synthese von 5-Methoxy-2-nitroanilin (**1**)

Die Synthesevorschrift wird anhand einer in der Literatur beschriebenen Synthese auf die Anwendung in der Synthesemikrowelle übertragen. Nozary et al. beschreiben die Umsetzung des 5-Chlor-2-nitroanilins mit Natriummethanolat in MeOH in einem Autoklaven, bei einer Temperatur von 100 °C und einer Reaktionsdauer von 24 h <sup>[58]</sup>. Durch die Übertragung der Parameter auf die Anwendung in der Synthesemikrowelle kann die Reaktionszeit auf 45 min gekürzt werden.



**Abb. 20:** Synthesemikrowelle und Zubehör: Synthesemikrowelle, druckstabiles Quarzreaktorsystem (mit Silikonschutzüberzug) mit Thermorohr, Reaktionsbehälter monoPREP<sup>®</sup> mit Temperaturfühler, Belüften des Reaktionsgefäßes vor dem Öffnen (Bilder von links nach rechts)

Für die Temperaturkontrolle der Reaktion in der Synthesemikrowelle steht neben der Temperaturmessung am äußeren Bereich des Reaktionsgefäßes ( $T_2$ ) per Infrarot (IR) auch die Bestimmung der Temperatur im Inneren des Gefäßes ( $T_1$ ) zur Verfügung. Durch ein integriertes Thermorohr kann ein phaseroptischer Sensor als Temperaturfühler die tatsächliche Temperatur des Reaktionsgemisches bestimmen (Abb. 20). Diese genaue Temperaturkontrolle ermöglicht eine angepasste Energiezufuhr durch die Synthesemikrowelle.



**Abb. 21:** Leistungs- und Temperaturkurvenverläufe der Synthesemikrowelle während der Synthese von Verbindung **1**;  $T_1$ : Temperatur im Inneren des Reaktionsgefäßes,  $T_2$ : Temperatur am äußeren Bereich des Reaktionsgefäßes,  $P$ : Leistung (Angabe in Watt)

Abb. 21 zeigt den Kurvenverlauf der Temperatur von  $T_1$  und  $T_2$  sowie der Leistung ( $P$ ). Die Parameter werden gegen die Zeit ( $t$ ) aufgetragen. Die tatsächlich eingesetzte Leistung der Synthesemikrowelle ist dabei immer so groß, dass die Kurve von der Temperatur im Inneren des Gefäßes ( $T_1$ ) dem gewünschten Kurvenverlauf der Reaktion entspricht.

Das Arbeiten bei Temperaturen über dem Siedepunkt ermöglicht neben einer Temperatur- auch eine Druckvariation. Durch die Verwendung eines druckstabilen Quarzreaktorsystems, das als geschlossenes System eingesetzt wird, kann bei Erhöhung der Temperatur eine adäquate Druckerhöhung berücksichtigt werden. Die Steigerung von Temperatur und Druck verkürzen die Reaktionszeit.

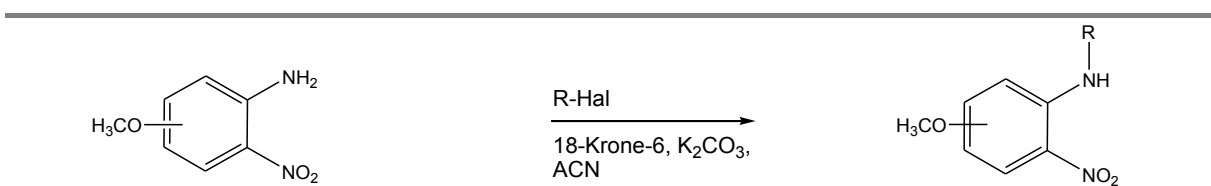
Nach dem Ablauf der Reaktion in der Synthesemikrowelle wird das Gefäß nach einer Abkühlphase entnommen und vor dem Öffnen belüftet, um den Überdruck vorsichtig abzulassen und ein Überschießen der Lösung zu vermeiden (Abb. 20).

Nach Entfernen des LM im Vakuum und Aufnahme des Reaktionsgemisches in Wasser folgt die Extraktion des gewünschten Produkts mit Diethylether (DE). DE kann anstelle des chlor-kohlenwasserstoffhaltigen LM Dichlormethan verwendet werden, welches Nozary et al. zwecks Auftrennung angeben <sup>[58]</sup>.

Die 2-Nitroverbindung mit der Methoxygruppe in Position 4 für die Synthese von den  $N^1$ -alkylierten 4-Methoxy-*o*-phenylendiaminderivaten und damit von den *N*-alkylierten 5,5'-Dimethoxy-2,2'-bisbenzimidazolen ist käuflich erwerbbar.

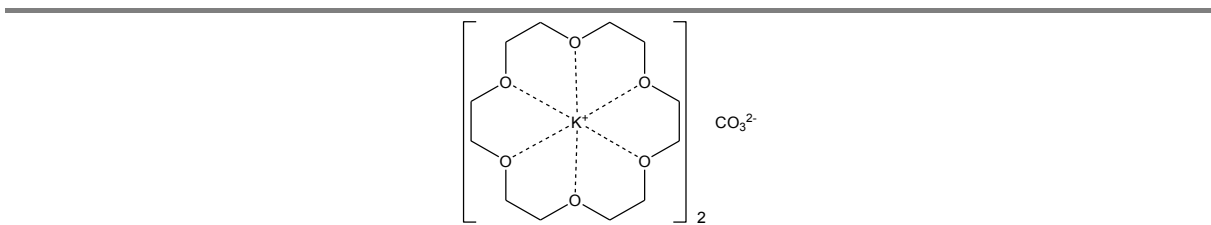
### 2.1.3 *N*-Alkylierung von 2-Nitroanilinen

Die *N*-Alkylierung der 2-Nitroaniline (2-NAs) erfolgt durch den Einsatz eines Alkylhalogenids in Anwesenheit eines Kronenethers (Abb. 22) <sup>[59]</sup>. Als aprotisches LM wird Acetonitril (ACN) verwendet.



**Abb. 22:** *N*-Alkylierung der 2-NAs, die Methoxygruppe befindet sich in Position 4 oder 5 (R = Alkyl)

Für die Deprotonierung der NH-aciden Verbindungen wird Kaliumcarbonat eingesetzt. Der verwendete Kronenether 18-Krone-6 komplexiert bevorzugt mit Kaliumionen <sup>[60]</sup>. Dies führt zu einer Erhöhung der Löslichkeit des anorganischen Salzes  $K_2CO_3$  in dem organischen LM ACN und zur Steigerung der Reaktivität des Carbonations <sup>[60, 61]</sup>.



**Abb. 23:** 18-Krone-6 komplexiert das Kaliumion, das Carbonation liegt frei vor

Bei 18-Krone-6 handelt es sich um einen makrozyklischen Polyether mit einem gesättigten achtzehngliedrigen Ring, der das Kaliumion in seinem Hohlraum aufnimmt (Abb. 23) <sup>[62]</sup>. Infolge dessen kommt es zu einem drastischen Anstieg der Basizität und damit zur Steigerung der Reaktivität des Carbonations. Die frei vorliegenden Carbonationen begünstigen die für die *N*-Substitution erforderliche Deprotonierung der Stickstoffatome.

Die Übertragung der konventionellen Methode auf eine Vorschrift für die Synthesemikrowelle erfolgt bei der *N*-Alkylierung ähnlich der Parameterabwandlung für die Synthese von Verbindung **1** (Kap. 2.1.2). Durch Erhöhung der Reaktionstemperatur über den Siedepunkt und Verwendung eines geschlossenen Reaktorsystems, kann die Reaktionszeit gegenüber dem Erhitzen unter Rückfluss drastisch gekürzt werden. Nach der Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel (RGT-Regel) kann eine zwei- bis dreifache Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Temperaturerhöhung um 10 K kalkuliert werden. Während die Reaktionszeit bei 82 °C, dem Siedepunkt von ACN, acht Stunden betragen würde, braucht man gemäß der RGT-Regel lediglich 30 min bei einer Erhöhung der Reaktionstemperatur um 40 K. Für die *N*-Alkylierung der 2-NAs erweist sich eine Plateauphase von 30 min als angemessene Reaktionszeit für die Synthesemikrowelle.

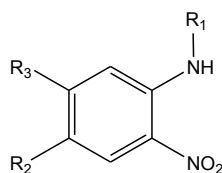
In der Dünnschichtchromatographie (DC) haben die *N*-alkylierten Verbindungen bei Verwendung des Laufmittels PE/DE (5+1) größere  $R_f$ -Werte als ihre jeweiligen Edukte. Der  $R_f$ -Wert stellt den Retentionsfaktor dar, der das Verhältnis der Entfernung des Substanzflecks vom Start zur Entfernung der Fließmittelfront vom Start angibt. Unter Verwendung einer hydrophilen stationären Phase (Kieselgel) und einer lipophilen mobilen Phase (PE/DE) zeigen die Edukte stärkere Wechselwirkungen mit dem Kieselgel als die *N*-alkylierten Produkte und folglich eine kürzere Laufstrecke. Je länger die Alkylkette ist, desto lipophiler ist die Substanz und desto größer ist ihr  $R_f$ -Wert. Mit Hilfe der DC kann dementsprechend die Zusammensetzung der Reaktionsgemische untersucht werden.

Interessant ist das Phänomen der sichtbaren Farben der 2-NAs, nicht *N*-alkyliert und *N*-alkyliert. Die Feststoffe der 2-NAs mit der Methoxygruppe in Position 4 sind rot, die Feststoffe der 2-NAs mit der Methoxygruppe in Position 5 sind gelb. Die gleichen Farben zeigen sich auch nach der Entwicklung der DC-Platte. Die Farbe der sich in Lösung befindlichen 2-NAs ist vom LM abhängig (Solvatochromie). So ist beispielsweise die Farbe der 5-Methoxy-2-nitroaniline für den Feststoff gelb, dagegen für die Lösung in MeOH rot. Solche Farbphänomene wurden bereits im Jahr 1910 von Hantzsch für die Nitroaniline beschrieben<sup>[63]</sup>.

Der im Reaktionsgemisch vorhandene Kronenether kann mittels Iodkammer auf der DC-Platte sichtbar gemacht werden. In der Iodkammer zeigt sich durch reversible adsorptive Effekte eine Braunfärbung der Flecken des Kronenethers.

Nach säulenchromatographischer Aufreinigung der Reaktionsgemische werden die zu sehr geringem Anteil entstehenden dialkylierten Nebenprodukte abgetrennt und die *N*-alkylierten 2-NAs (Tab. 1) in reiner Form erhalten.



**2-11****Tab. 1:** *N*-alkylierte 2-NAs

Verbindung	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>2</b>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
<b>3</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
<b>4</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
<b>5</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
<b>6</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	OCH <sub>3</sub>	H
<b>7</b>	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
<b>8</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
<b>9</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
<b>10</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
<b>11</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	H	OCH <sub>3</sub>

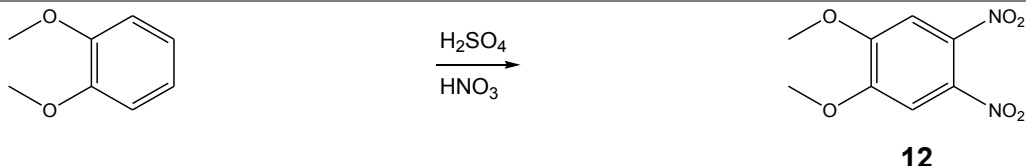
Für die *N*-Alkylierung werden Alkylreste verschiedener Kettenlänge und -art gewählt, da unterschiedliche Eigenschaften der aus diesen Molekülen synthetisierten BBIs bzgl. UV- und Fluoreszenzspektroskopie und Untersuchungen in der Zelltestung zu erwarten sind.

Die *N*-Alkylierung der 2-NAs mit sperrigen Resten wie 2-Methylpropan kann zwar erfolgreich durchgeführt werden, allerdings ist nach erfolgter Reduktion der Nitrogruppe der anschließende Ringschluss zum BBI nicht möglich. Deshalb wird auf die Darstellung entsprechender 2-NAs verzichtet. Für die Synthese von BBIs mit sterisch hinderlichen Resten für den Ringschluss wird die *N*-Alkylierung von 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**24**) gewählt (Kap. 2.1.6.2).

Auch die *N*-arylierten Verbindungen sind über den Syntheseweg mit Hilfe der aus den 2-NAs gewonnenen *o*-Phenylendiaminen (OPDs) nicht zugänglich. Die *N*-arylierten Verbindungen werden wie die BBIs mit sperrigen Alkylresten im Rahmen der *N*-Substitution mit Hilfe der Verbindung **24** dargestellt (Kap. 2.1.6.2).

### 2.1.4 Synthese von 4,5-Dinitroveratrol

Die Synthese von 4,5-Dinitroveratrol (**12**) erfolgt durch die Umsetzung von Veratrol mit Schwefelsäure in Salpetersäure (Abb. 24). Das Gemisch aus konz.  $\text{HNO}_3$  und konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  wird als Nitriersäure bezeichnet und für die Nitrierung von Aromaten eingesetzt<sup>[60, 64]</sup>. Es handelt sich dabei um eine elektrophile aromatische Substitution, bei der das Nitroniumion als Elektrophil das elektronenreiche  $\pi$ -System des Aromaten angreift.



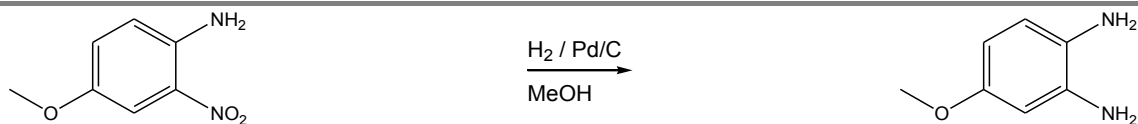
**Abb. 24:** Synthese von 4,5-Dinitroveratrol (**12**) aus Veratrol

Die Methoxygruppen dirigieren bei der Zweitsubstitution die Nitrogruppen bevorzugt in die Positionen 4 und 5. Neben dem gewünschten Produkt entstehen auch Mono- und wenig Trinitroveratrol. Die Auftrennung kann säulenchromatographisch mit dem Fließmittelgemisch EA/PE (1+1) oder durch Umkristallisation aus EtOH erfolgen. Man erhält gelbe Nadeln des isolierten 4,5-Dinitroveratrols.

### 2.1.5 Synthese von *o*-Phenylendiaminen

Die Synthese von OPDs erfolgt durch Reduktion der entsprechenden Nitroverbindungen.

Aus 4-Methoxy-2-nitroanilin kann durch Reduktion der Nitrogruppe 4-Methoxy-*o*-phenylen-diamin hergestellt werden (Abb. 25). Dieses Diamin kann käuflich erworben werden, so dass im Rahmen dieser Arbeit auf das käufliche Produkt zurückgegriffen wird.



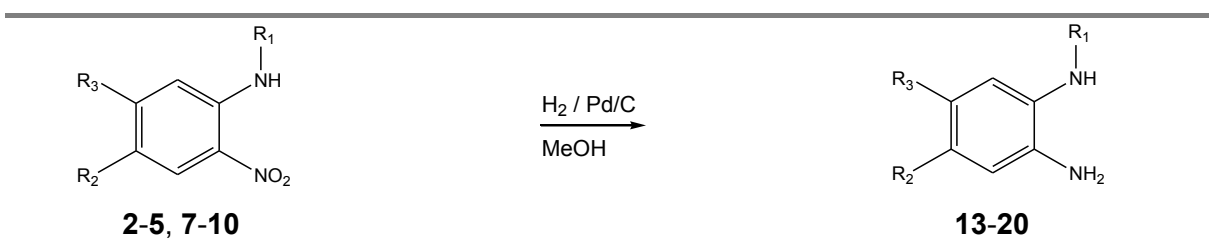
**Abb. 25:** Reduktion der Nitrogruppe

Eine selektive Monoalkylierung am Stickstoff kann nur bei einem 2-NA erfolgen<sup>[65]</sup>, d. h. die *N*-Alkylierung muss bereits vor der Reduktion der Nitrogruppe stattfinden. Auf diese Weise werden nach der Reduktion der Nitrogruppe *N*<sup>1</sup>-alkylierte OPDs erhalten, deren Methoxygruppe in ihrer Position fest ist. Diese OPDs ermöglichen die Synthese von BBIs mit vorgegebener Stellung der Methoxygruppen (Kap. 2.1.6.2).

### 2.1.5.1 Reduktion von Nitrogruppen mit Wasserstoff

#### Reduktion von *N*-alkylierten 2-Nitroanilinen

Zur Umwandlung der Nitro- zu Aminogruppen kann die Hydrierung mit Wasserstoff (H<sub>2</sub>) verwendet werden <sup>[66]</sup>. Als Katalysator wird Palladium/Kohle (Pd/C) eingesetzt. MeOH stellt ein geeignetes LM für die Reduktion dar. Die Reaktion findet in einem Autoklaven statt. Die *N*-substituierten 2-NAs werden auf diese Weise quantitativ zum entsprechenden OPD reduziert (Abb. 26).



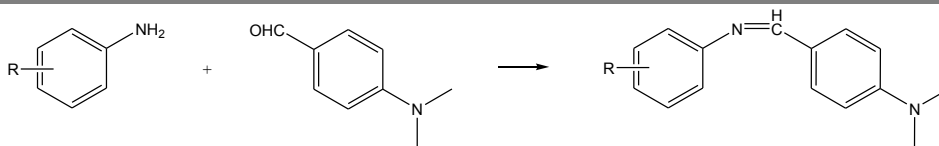
**Abb. 26:** Reduktion der Nitrogruppe mit H<sub>2</sub> und Pd/C, R<sub>1</sub> - R<sub>3</sub> siehe **Tab. 2**

**Tab. 2:** OPDs

Verbindung	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
13	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
14	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
15	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
16	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
17	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
18	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
19	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
20	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	OCH <sub>3</sub>

Die Verlaufskontrolle der Reduktion kann mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie durchgeführt werden. Als Laufmittel wird EA/EtOH (9+1) verwendet. Die Diamine haben einen geringeren R<sub>F</sub>-Wert als ihre entsprechenden Vorstufen. Die jeweilige Nitroverbindung zeigt im Fall der 5-Stellung der Methoxygruppe einen gelben Fleck und im Fall der 4-Stellung der Methoxygruppe einen roten Fleck auf der DC-Platte. Die aus den 2-NAs entstandenen OPDs zeigen jeweils einen farblosen Fleck mit Löschung bei einer Wellenlänge von 254 nm unter dem UV-Betrachter, der sich nach einiger Zeit violett bis rotbraun färbt.

Die bei 254 nm erkennbare Löschung des Substanzflecks beruht auf der Art der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten DC-Platten. Diese sind mit einem Fluoreszenzindikator imprägniert, der bei einer Anregungswellenlänge von 254 nm fluoresziert. Das Vorhandensein einer Substanz mit einem aromatischen System bedingt eine Löschung.



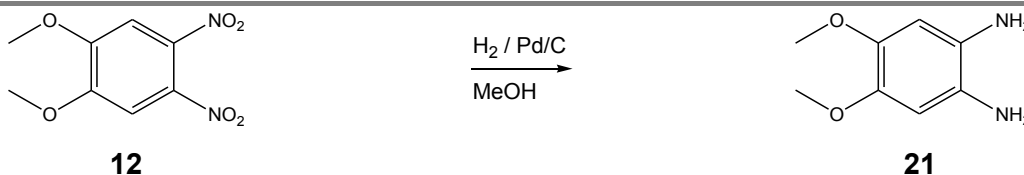
**Abb. 27:** Primäres aromatisches Amin und Ehrlich-Reagenz (4-Dimethylaminobenzaldehyd) zeigen ein farbiges Imin, R = 2-NH<sub>2</sub>, 4/5-OCH<sub>3</sub>

Folgt unmittelbar nach dem Entwickeln der DC-Platte eine Detektion mit Ehrlich-Reagenz, ergibt sich eine Gelbfärbung des farblosen Flecks vom Diamin. Es handelt sich dabei um eine Reaktion eines primären aromatischen Amins mit einem Aldehyd, wobei ein farbiges Imin entsteht (Abb. 27).

Für die sich anschließende Synthese nach Holan<sup>[67]</sup> wird das gleiche LM (MeOH) verwendet, so dass die oxidationsempfindlichen OPDs sofort nach Abfiltrieren des Katalysators ohne weitere Aufarbeitung für den Ringschluss zum BBI eingesetzt werden können (Kap. 2.1.6). Das Umschließen der Gefäße mit Aluminiumfolie zwecks Lichtschutzes und zügiges Arbeiten sind für den Umgang mit den OPDs von Bedeutung.

### Reduktion von 4,5-Dinitroveratrol

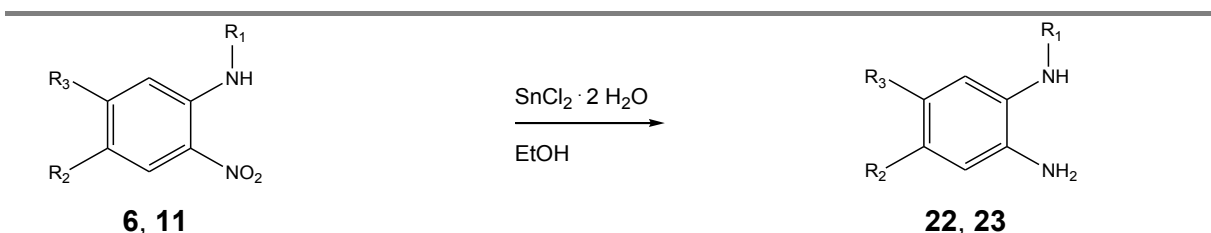
Für die Reduktion von 4,5-Dinitroveratrol (**12**) zum 4,5-Dimethoxy-*o*-phenylendiamin (**21**) kann ebenfalls die Methode im Autoklaven mit H<sub>2</sub> und Pd/C in MeOH eingesetzt werden (Abb. 28). Die Reaktion läuft auch bei zwei Nitrogruppen quantitativ ab.



**Abb. 28:** Reduktion von 4,5-Dinitroveratrol (**12**) zu 4,5-Dimethoxy-*o*-phenylendiamin (**21**)

### 2.1.5.2 Reduktion von Nitrogruppen mit Zinn(II)-chlorid

Für die Reduktion von Verbindungen mit Propargylrest wird eine milde und selektive Variante unter Verwendung von Zinn(II)-chlorid in EtOH gewählt (Abb. 29). Mit dieser Methode ist es möglich, nur die Nitrogruppe zu reduzieren, die Dreifachbindung des Propargylrestes bleibt dabei erhalten. Die Synthesevorschrift lehnt sich an den Angaben von Bellamy et al. an<sup>[68]</sup>, die herausgefunden haben, dass unter diesen Bedingungen säurelabile und andere reduktionsempfindliche Gruppen nicht beeinflusst werden.



**Abb. 29:** Reduktion der Nitrogruppe mit  $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{R}_1 - \text{R}_3$  siehe Tab. 3

**Tab. 3:** OPDs mit Propargylrest

Verbindung	$\text{R}_1$	$\text{R}_2$	$\text{R}_3$
<b>22</b>	$\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$	$\text{OCH}_3$	H
<b>23</b>	$\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$	H	$\text{OCH}_3$

Für eine erfolgreiche Reduktion ist das Erhitzen des Ansatzes unter Rückfluss erforderlich. Die Verlaufskontrolle der Reaktion kann mit Hilfe der DC durchgeführt werden. Als Laufmittel dient PE/DE (1+1). Das entstandene OPD hat aufgrund der geringeren Lipophilie einen geringeren  $R_f$ -Wert als das Edukt. Dabei zeigt sich der Fleck des aus dem 2-NA entstandenen OPD charakteristisch: Der Fleck zeigt bei einer Wellenlänge von 254 nm eine Löschung unter dem UV-Betrachter und färbt sich nach kurzer Zeit braun. Der Fleck des 2-NA zeigt weiterhin im Fall der 5-Stellung der Methoxygruppe einen kräftigen Gelbton und im Fall der 4-Stellung der Methoxygruppe eine rote Färbung. Zum Beenden der Reaktion wird das Reaktionsgemisch in Eiswasser gegossen, da die Hydrolyse des entstandenen Zinn(IV)-chlorids unter starker Erwärmung zu Zinndioxid und Salzsäure erfolgt. Anschließend wird zur Extraktion des OPD ein pH-Wert von 7-8 eingestellt. Ein höherer pH-Wert kann nicht gewählt werden, da sonst Zinn(IV)-hydroxid und somit ein Gallert entsteht, welches die Extraktion des OPD erschwert. Nach der Aufarbeitung liegt das OPD mit Propargylrest in reiner Form vor (Abb. 29). Es folgt sofort die Umsetzung zum entsprechenden BBI.

Wegen der aufwendigen Aufarbeitung des Reaktionsgemisches und der geringen Ausbeute an OPD, wird die Reduktion mit  $\text{SnCl}_2$  lediglich für die Verbindungen mit Propargylrest eingesetzt.

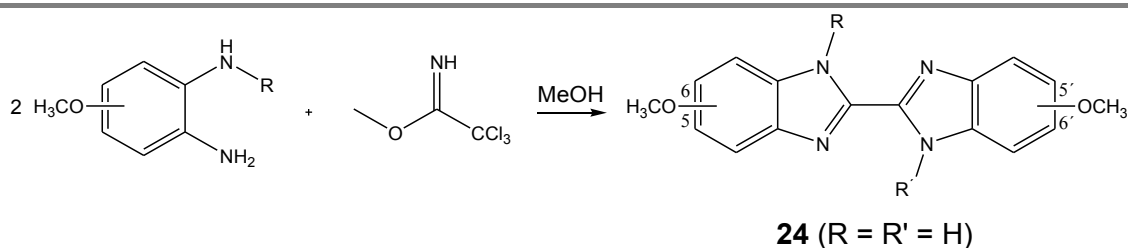
## 2.1.6 Synthese von 2,2'-Bisbenzimidazolen

### 2.1.6.1 Synthese von 2,2'-Bisbenzimidazolen aus *o*-Phenylendiaminen

Für die Synthese von BBIs werden in der Literatur verschiedene Verfahren beschrieben. Die häufig genannten Kondensationsreaktionen nach Phillips<sup>[69]</sup> von OPDs mit wasserfreien aliphatischen Dicarbonsäuren sind für die Synthese von den im Rahmen dieser Arbeit gewünschten BBIs nicht erfolgreich anwendbar. Weitere Synthesevorschriften unter Verwendung von Oxalsäure oder deren Ester<sup>[70, 71]</sup> erwiesen sich ebenfalls als nicht geeignet. Die Synthese von BBIs aus OPDs mit Hexachloraceton wurde von Rezende et al. beschrieben<sup>[72]</sup>. Allerdings ist ein deutlicher (10facher) Überschuss an OPD nötig, um akzeptable Ausbeuten zu erzielen.

Eine weitere Methode zur Darstellung der BBIs ist die Synthese nach Holan et al.<sup>[67]</sup>. Diese Synthese bietet die Möglichkeit, sowohl 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**24**, Abb. 30) als auch *N*-substituierte BBIs (Verbindungen **25-34**, Tab. 4) herzustellen.

Für die Synthese von BBIs nach Holan et al.<sup>[67]</sup> werden 4-Methoxy-*o*-Phenylendiamin oder seine Derivate mit 2,2,2-Trichloracetimid säuremethylester (TCA) in abs. MeOH umgesetzt (Abb. 30). Die Reaktion erfolgt bei Raumtemperatur (RT) unter Verwendung von Stickstoff als Schutzgas. Das oxidationsempfindliche OPD wird durch das Umschließen der Reaktionsgefäße mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt.



**Abb. 30:** Ringschluss nach Holan<sup>[67]</sup>;  
 OPDs: die Methoxygruppe befindet sich in Position 4 oder 5;  
 BBIs: die Methoxygruppen befinden sich in den Positionen 5,5'/5,6'/6,6'

Durch den Ringschluss von 4-Methoxy-*o*-phenylendiamin (R = H) mit TCA entsteht 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**24**, Abb. 30), welches als Tautomer vorliegt. Weitere Angaben zur Tautomerie werden in Kap. 2.1.6.2 beschrieben.

Optimierungsversuche mit Variationen der Edukt- und Lösungsmittelmengen sowie der Reaktionsbedingungen bringen keine Steigerung der Ausbeute. Deshalb werden mehrere Ansätze mit 2 mmol OPD und 1 mmol TCA in 30 mL abs. MeOH unter N<sub>2</sub>-Schutzbegasung bei RT durchgeführt, um eine ausreichende Menge vom gewünschten Produkt zu erhalten.

Die Verlaufskontrolle der Reaktion kann mittels DC erfolgen. Nach dem Entwickeln der DC-Platte im Laufmittel EA/EtOH (9+1) zeigt sich das gewünschte Produkt bei einem größeren R<sub>F</sub>-Wert als sein Edukt. Dieses Laufverhalten ist aufgrund der Lipophilieerhöhung durch den Ringschluss zu erwarten. Unter Verwendung einer hydrophilen stationären Phase und einer lipophilen mobilen Phase zeigt das hydrophile OPD stärkere Wechselwirkungen mit dem Kieselgel als das entstandene BBI. Der Fleck des BBI zeigt sowohl bei einer Wellenlänge von 254 nm als auch von 366 nm unter dem UV-Betrachter blaue Fluoreszenz.

Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Wasserzugabe erfolgt die Aufarbeitung der Reaktionsmischung. Die Auftrennung kann entweder säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Fließmittelgemisch EA/EtOH (9+1) oder durch Extraktion mit DE durchgeführt werden. Nach der Extraktion wird das erhaltene Feststoffgemisch mit Aceton gewaschen. Der durch Zentrifugation erhaltene gelbe Rückstand stellt das gewünschte BBI in reiner Form dar.

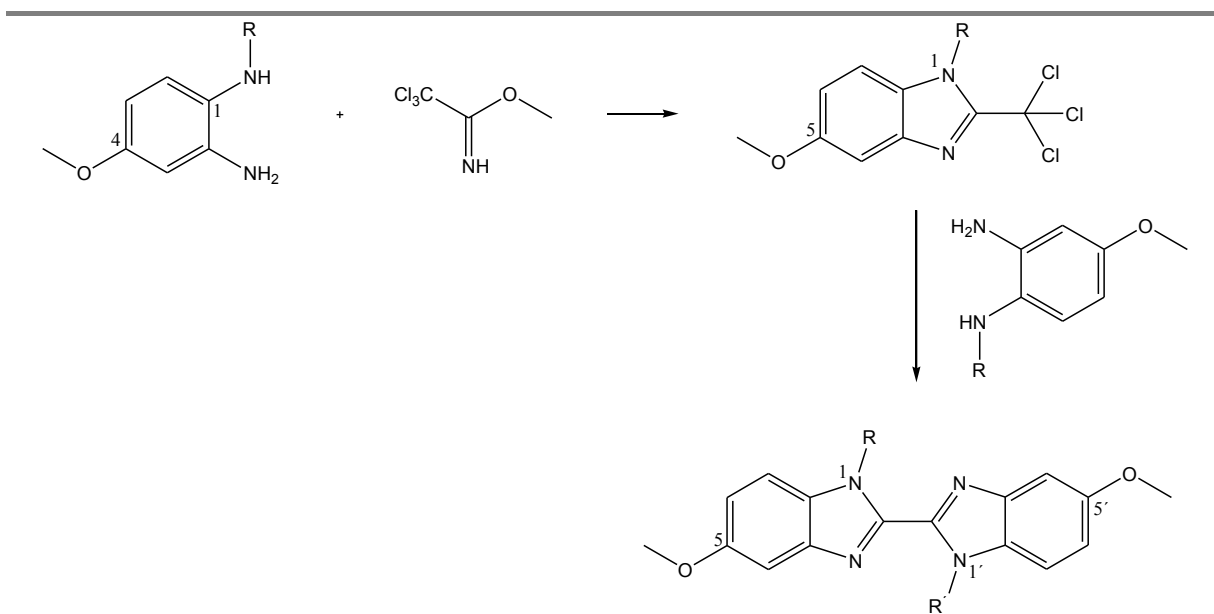
Die Synthese von 1,1'-disubstituierten BBIs erfolgt in gleicher Weise wie die der Verbindung **24**. Als Edukte werden hier OPDs verwendet, die bereits am Stickstoff alkyliert sind.



**Abb. 31:** OPDs mit 4- (links) oder 5-Stellung (rechts) der Methoxygruppe

Wenn der Stickstoff (N<sup>1</sup>) des OPD alkyliert ist, ist die Methoxygruppe in ihrer Position fest (Abb. 31) und die Base kann zur Synthese von BBIs mit vorgegebener Stellung der Methoxygruppen verwendet werden.

Abb. 32 zeigt die Synthese nach Holan et al. [67] am Beispiel der 1,1'-dialkylierten 5,5'-Dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazolderivate.

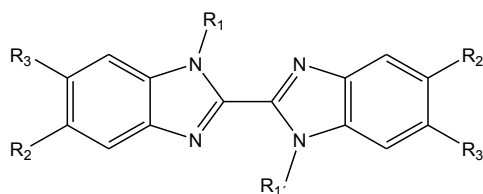


**Abb. 32:** Synthese (Ringschluss) nach Holan et al. [67] am Beispiel der Synthese von 1,1'-dialkylierten 5,5'-Dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazolderivaten ( $R = R' = \text{Alkyl}$ )

Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Einfluss des +I-Effekts der Methoxygruppe den Ringschluss aus dem  $N^1$ -alkylierten 4-Methoxy-*o*-phenyldiamin zum entsprechenden 5,5'-Dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol im Vergleich zum Ringschluss aus dem  $N^1$ -alkylierten 5-Methoxy-*o*-phenyldiamin zum entsprechenden 6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol begünstigt [72, 73]. Dies wird durch die Ausbeute der jeweiligen Stellungsisomere untermauert: Die BBIs mit 5,5'-Stellung der Methoxygruppen werden in höherer Ausbeute als die BBIs mit 6,6'-Stellung der Methoxygruppen erhalten.

Das in Position 1 alkylierte 6-Methoxy-2-(trichlormethyl)-1*H*-benzimidazol kann laut Literatur als Zwischenstufe isoliert werden [67, 74]. Durch Umsetzung dieser Zwischenstufe mit einem  $N^1$ -alkylierten 5-Methoxy-*o*-phenyldiamin anstelle eines  $N^1$ -alkylierten 4-Methoxy-*o*-phenyldiamins könnte ein BBI mit 5,6'-Stellung der beiden Methoxygruppen erzielt werden. Die Zwischenstufe konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht isoliert werden, so dass lediglich die symmetrischen BBIs mit 5,5'- oder 6,6'-Stellung der beiden Methoxygruppen auf diesem Weg zugänglich sind (Tab. 4).



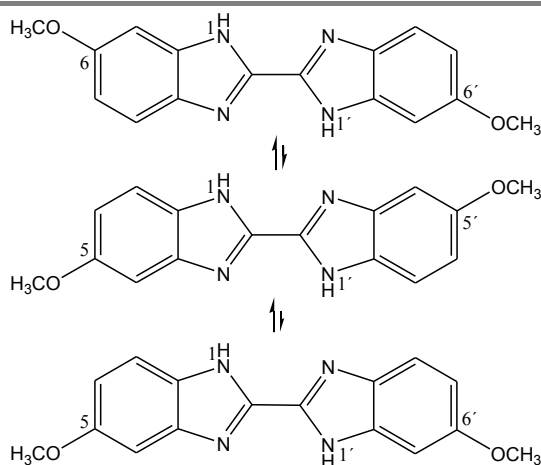
**25-34****Tab. 4:** 5,5'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazole, 1,1'-disubstituiert

Verbindung	$R_1 = R_{1'}$	$R_2 = R_{2'}$	$R_3 = R_{3'}$
<b>25</b>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
<b>26</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
<b>27</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
<b>28</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
<b>29</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	OCH <sub>3</sub>	H
<b>30</b>	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
<b>31</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
<b>32</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
<b>33</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
<b>34</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	H	OCH <sub>3</sub>

Nach dem Entwickeln der DC-Platten im Laufmittel EA/n-Hexan (9+1) zeigen sich die entstandenen BBIs analog der Verbindung **24** bei größeren  $R_f$ -Werten und die jeweiligen Edukte bei geringeren  $R_f$ -Werten. Die Flecke der BBIs zeigen sowohl bei einer Wellenlänge von 254 nm als auch von 366 nm unter dem UV-Betrachter blaue Fluoreszenz. Die Eigenfluoreszenz der *N*-alkylierten BBIs hat im Vergleich zur Eigenfluoreszenz der Verbindung **24** eine höhere Intensität.

### 2.1.6.2 Synthese von *N*-substituierten 2,2'-Bisbenzimidazolen aus 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol

5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**24**) wird als Ausgangssubstanz für die Substitution der Positionen 1 und 1' verwendet, da nicht sämtliche Verbindungen auf dem im Kap. 2.1.6.1 beschriebenen Syntheseweg zugänglich sind. Zudem bietet die Synthese aus Verbindung **24** die Möglichkeit, auf den Umgang mit den giftigen Nitroverbindungen zu verzichten.



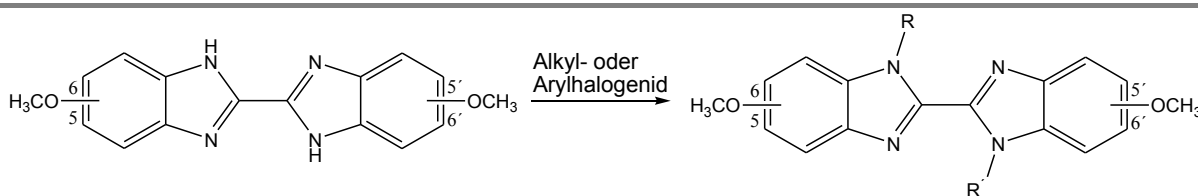
**Abb. 33:** Tautomerie der Verbindung **24**

Verbindung **24** liegt als Tautomer vor, so dass die Positionen der Methoxygruppen nicht fest sind. Es ergeben sich drei mögliche Stellungen für die Methoxygruppen: Sie können sich sowohl in den Positionen 5,5' und 6,6' als auch in den Positionen 5,6' befinden (Abb. 33). Dall'Oglio et al. haben die 6,6'-Stellung der beiden Methoxygruppen als die energetisch günstigere und damit wahrscheinlich vorliegende Form beschrieben <sup>[75]</sup>.

#### Stellungsisomerie

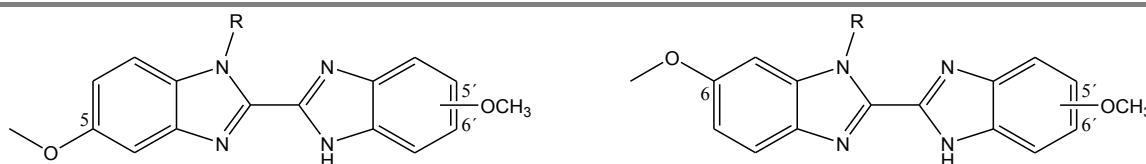
Die Summenformel eines Moleküls allein sagt noch nichts über die Stellung und Bindung der einzelnen Atome in dem Molekül aus <sup>[61]</sup>. Erst aus der Konstitutionsformel ergibt sich, wie Atome miteinander verbunden sind. Stellungsisomere sind Strukturisomere und können auch als Konstitutionsisomere bezeichnet werden. Es handelt sich hierbei um Moleküle, die bei gleicher Summenformel unterschiedliche Verknüpfungen der Atome aufweisen <sup>[76]</sup>. Folglich zeigen Stellungsisomere Unterschiede in ihrem chemischen, physikalischen und biologischen Verhalten. Für die Konstitutionsaufklärung werden die physikalischen Methoden wie die Massenspektrometrie (MS), die IR- und insbesondere die NMR-Spektroskopie (Kap. 2.2) eingesetzt.

Die *N*-Substitution der Stickstoffe beider Benzimidazolringe von Verbindung **24** kann folglich drei mögliche Stellungsisomere ergeben. Durch die Substitution sind die Stickstoffe in ihren Positionen 1 und 1' festgelegt und den beiden Methoxygruppen können die Positionen 5,5', 5,6' oder 6,6' zugeordnet werden. Verbindung **24** und die Isomere gemische sollen im Folgenden vereinfacht wie in Abb. 34 dargestellt werden.



**Abb. 34:** *N*-Substitution von Verbindung **24**, die Methoxygruppen befinden sich in den Positionen 5,5'/5,6'/6,6'

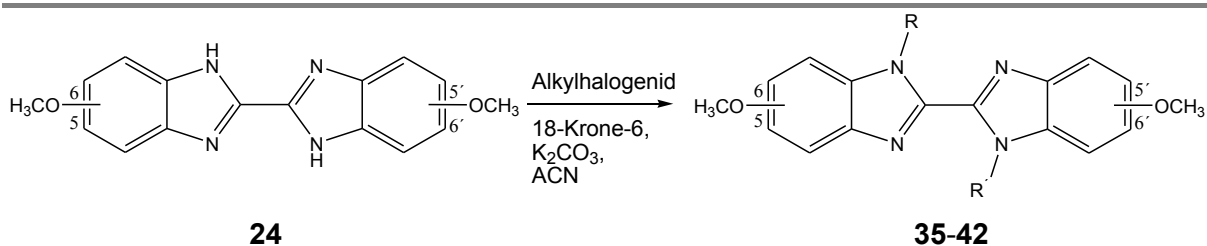
Die Substitution am Stickstoff kann wie in Abb. 34 dargestellt jeweils einmal an einem Stickstoff der beiden Benzimidazolringe erfolgen. Neben diesen 1,1'-disubstituierten BBIs können auch 1-monosubstituierte BBIs entstehen. Diese BBIs sind nur an einem Stickstoff eines Benzimidazolrings substituiert, der zweite Benzimidazolring liegt weiterhin als Tautomer vor. Die Monosubstitution von Verbindung **24** kann somit die in Abb. 35 dargestellten möglichen Stellungsisomere ergeben und ist insbesondere bei sterisch hinderlichen Resten zu erwarten.



**Abb. 35:** *N*-Monosubstitution von Verbindung **24**, die Methoxygruppe befindet sich in Position 5' oder 6'

#### *N*-Alkylierung mit Hilfe von 18-Krone-6 und Kaliumcarbonat

Als einfache und schnelle *N*-Alkylierungsmethode wird auch hier die Methode der *N*-Alkylierung wie bei den 2-NAs (Kap. 2.1.3) verwendet. Verbindung **24** wird in ACN suspendiert, 18-Krone-6 und  $K_2CO_3$  sowie das entsprechende Alkylhalogenid werden zugeben und der Ansatz in der Synthesemikrowelle erhitzt (Abb. 36). Die Aufreinigung der erhaltenen Reaktionsgemische erfolgt säulenchromatographisch unter Verwendung von EA/n-Hexan (9+1) als Fließmittelgemisch.

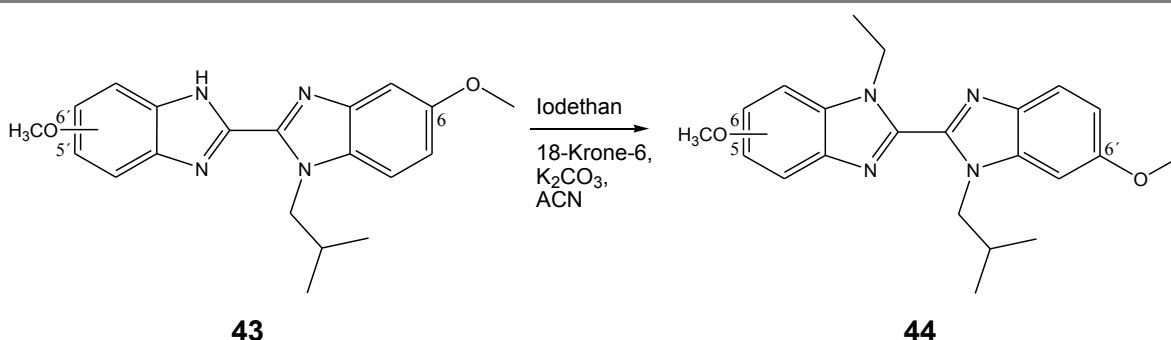


**Abb. 36:** *N*-Alkylierung der Verbindung **24**, R = R' siehe **Tab. 5**, die Methoxygruppen befinden sich in den Positionen 5,5'/5,6'/6,6'

**Tab. 5:** Stellungsisomerengemische der 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bisbenzimidazole, 1,1'-disubstituiert

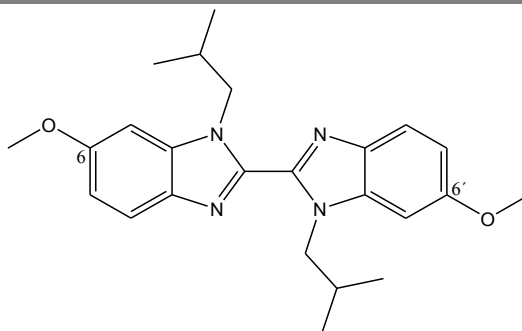
Verbindung	R = R'
<b>35</b>	CH <sub>3</sub>
<b>36</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<b>37</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<b>38</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>39</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<b>40</b>	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>41</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH
<b>42</b>	4-Methylbenzyl

Bei der Synthese von Verbindung **40** (Abb. 36) ist als Nebenprodukt ein lediglich mono-substituiertes BBI entstanden, das durch säulenchromatographische Aufarbeitung isoliert werden kann (Verbindung **43**). Beim *N*-alkylierten Benzimidazolring der Verbindung **43** zeigt sich die Methoxygruppe in Position 6 (Abb. 37).



**Abb. 37:** Synthese von Verbindung **44** (rechts; die Methoxygruppe befindet sich in Position 5 oder 6) aus Verbindung **43** (links; die Methoxygruppe befindet sich in Position 5' oder 6')

Ein Teil der Verbindung **43** wird in einer weiteren *N*-Alkylierung mit Iodethan mit Hilfe von 18-Krone-6 und  $K_2CO_3$  in ACN in Verbindung **44** überführt (Abb. 37). Das hierbei entstandene Isomerengemisch wird als solches für die später folgende Etherspaltung verwendet.

**45****Abb. 38:** Verbindung **45**

Des Weiteren kann aus dem Stellungsisomerengemisch der Verbindung **40** die dialkylierte Verbindung mit 6,6'-Stellung der Methoxygruppen isoliert werden (Verbindung **45**, Abb. 38). Die Substanzmenge der Verbindung **45** reicht lediglich für analytische Zwecke (MS, NMR-Spektroskopie) und wird nicht für die anschließende Etherspaltung eingesetzt.

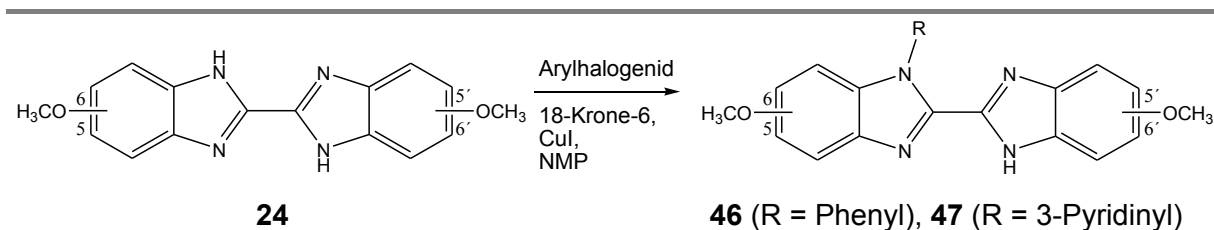
Die Auftrennung der Stellungsisomerengemische wird nur von ausgewählten Verbindungen durchgeführt, da sie zeitintensiv sowie aufwendig ist und zudem nur sehr geringe Ausbeuten liefert. Die auf diesem Wege gewonnenen Stellungsisomere können für analytische Zwecke (MS, NMR-Spektroskopie) und teilweise für die Zelltestung verwendet werden.

Die *N*-Substitution mit Phenylbromid und 3-Brompyridin ist auf diese Weise nicht erfolgreich durchführbar. Hierfür wird die Methode mit Kupfer(I)-iodid als Katalysator angewendet.

#### Kupfer(I)-iodid-katalysierte *N*-Arylierung

Die Kupfer(I)-iodid-katalysierte *N*-Arylierung wird ähnlich der von Wu et al. angegebenen Synthesevorschrift durchgeführt<sup>[77]</sup>. Verbindung **24** wird in *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) suspendiert. Kupfer(I)-iodid (CuI) und  $K_2CO_3$  sowie das entsprechende Arylhalogenid werden zugegeben. Die Reaktionsparameter sind der verwendeten Synthesemikrowelle inkl. Zubehör und Substanzen entsprechend angepasst.

Für die Aufarbeitung der Reaktionsgemische wird der Kugelrohrföfen zum Entfernen des LM NMP eingesetzt. Die weitere Auftrennung erfolgt säulenchromatographisch, man erhält die in Abb. 39 dargestellten Verbindungen.

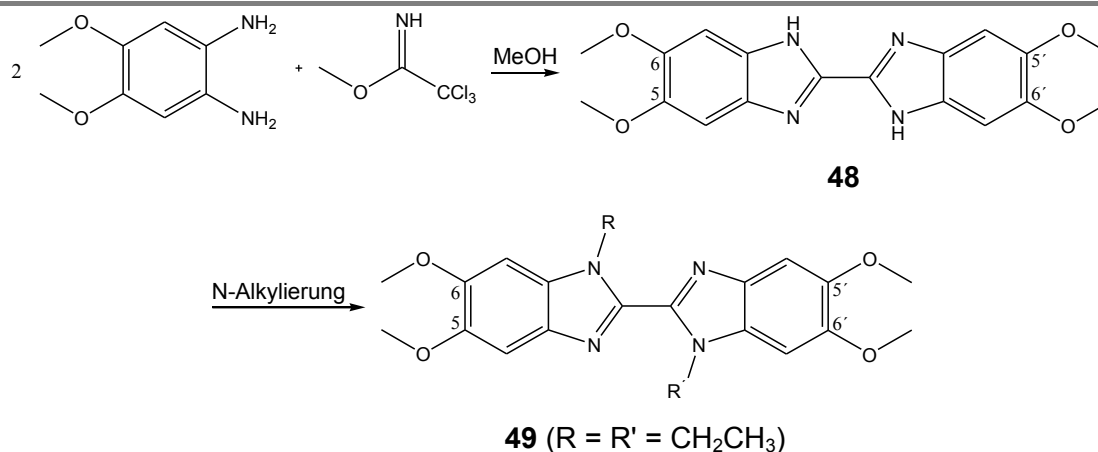


**Abb. 39:** *N*-Arylierung der Verbindung **24**, die Methoxygruppen befinden sich in den Positionen 5,5',6,6'

Die *N*-arylierten Verbindungen zeigen lediglich eine Monosubstitution, d. h. nur einer der beiden Benzimidazolringe wird an einem Stickstoff aryliert.

### 2.1.7 Synthese von 5,5',6,6'-Tetramethoxy-2,2'-bisbenzimidazolen

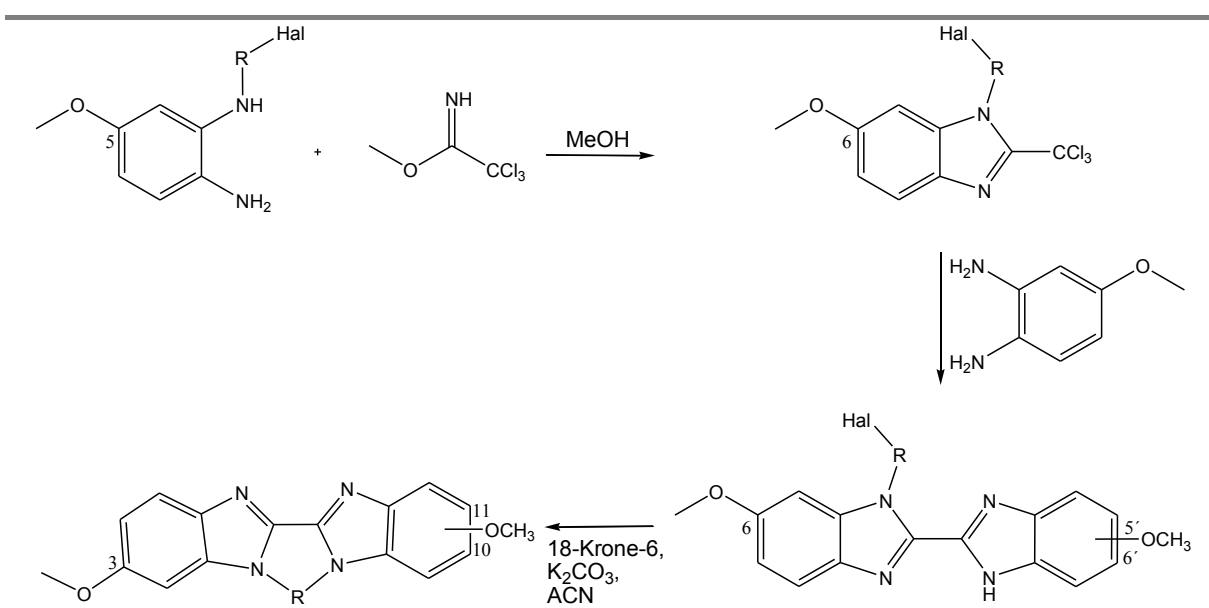
Für die Synthese von 5,5',6,6'-Tetramethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol und der anschließenden *N*-Alkylierung werden die gleichen Methoden wie bereits beschrieben eingesetzt: Der Ringschluss erfolgt aus 4,5-Dimethoxy-*o*-phenylendiamin (**21**) und TCA in MeOH für 24 h bei RT unter N<sub>2</sub>-Schutzbegasung (Synthese nach Holan et al. <sup>[67]</sup>, Kap. 2.1.6.1). Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung an Kieselgel mit EA als FM oder alternativ nach Extraktion mit DE erfolgt die *N*-Alkylierung mit Iodethan mit Hilfe von 18-Krone-6 und K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in ACN. Die Auftrennung dieses Reaktionsgemisches wird mittels SC an Kieselgel mit dem Fließmittelgemisch EA/*n*-Hexan (9+1) durchgeführt. Die schematische Darstellung der Reaktionen sowie die aus ihnen entstandenen Verbindungen werden in Abb. 40 wiedergegeben.



**Abb. 40:** Ringschluss nach Holan <sup>[67]</sup> mit anschließender *N*-Alkylierung

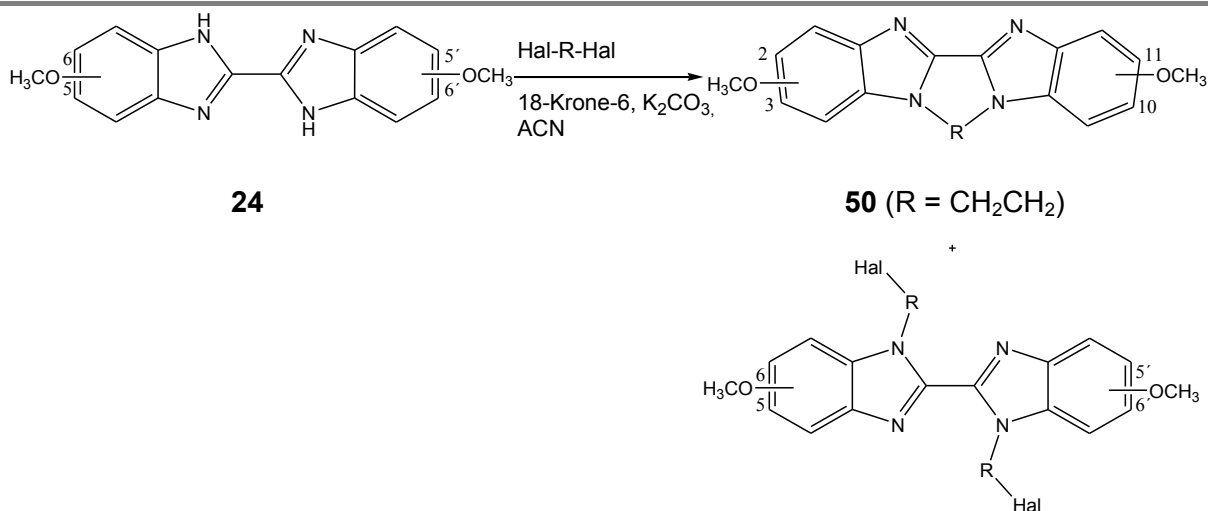
### 2.1.8 Synthese von *N,N'*-verbrückten 2,2'-Bisbenzimidazolen

Die *N,N'*-Verbrückung der BBIs an den Stickstoffen der beiden Benzimidazolringe kann auf verschiedenen Synthesewegen erfolgen. Eine elegante Methode stellt die folgende Variante dar: Es werden ein mit einem Alkylhalogenid *N*-alkyliertes OPD und TCA eingesetzt. Das hierbei entstehende 2-(Trichlormethyl)-1*H*-benzimidazol wird im nächsten Schritt mit 4-Methoxy-*o*-phenyldiamin umgesetzt, so dass der Ringschluss zum BBI erfolgen kann. Das nur an einem Stickstoff der beiden Benzimidazolringe mit einem Alkylhalogenidrest alkylierte BBI wird den Reaktionsbedingungen der *N*-Alkylierung ausgesetzt, um eine intramolekulare *N*-Alkylierung und damit die *N,N'*-Verbrückung der beiden Benzimidazolringe zu erreichen.



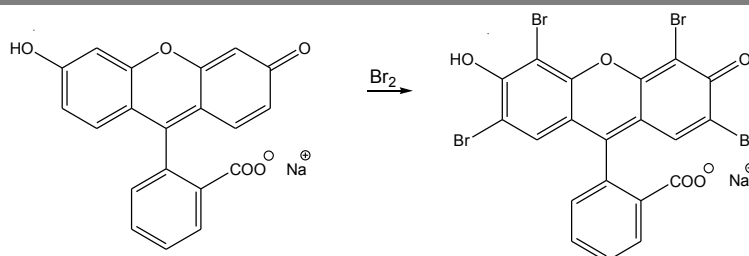
**Abb. 41:** Synthese *N,N'*-verbrückter BBIs, dargestellt am Beispiel des *N*-substituierten 2-(Trichlormethyl)-6-methoxy-1*H*-benzimidazols, die Methoxygruppe befindet sich in Position 10 oder 11, wenn  $R = CH_2CH_2$

Auf diese Weise wird einer der beiden Benzimidazolringe in der Stellung festgelegt und es könnten theoretisch nur noch zwei Stellungsisomere entstehen (Abb. 41). Allerdings konnten die in der Literatur beschriebenen Erfolge für die in dieser Arbeit gewünschten Derivate nicht erreicht werden, weil das *N*-substituierte Derivat vom 2-(Trichlormethyl)-1*H*-benzimidazol weder mit 5- noch mit 6-Stellung der Methoxygruppe zugänglich war [67, 74].



**Abb. 42:** Synthese von *N,N'*-verbrückten BBIs; die Methoxygruppen befinden sich in den Positionen 2 oder 3 und 10 oder 11, wenn R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> (Verbindung **50**); bei den BBIs befinden sich die Methoxygruppen in den Positionen 5,5',6,6',

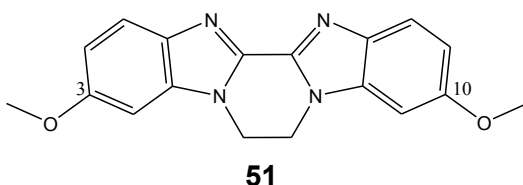
Eine weitere Möglichkeit der Darstellung von *N,N'*-verbrückten BBIs stellt die Synthese aus Verbindung **24** dar. Mit Hilfe der *N*-Alkylierungsmethode in ACN unter Verwendung von 18-Krone-6 und K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> kann die *N,N'*-Verbrückung erfolgreich durchgeführt werden (Abb. 42). Durch den Einsatz von 1,2-Dibromethan oder 1-Brom-2-chlorethan ist ein *N,N'*-ethanverbrücktes BBI (Verbindung **50**) als Stellungsisomerengemisch zugänglich. Allerdings entsteht zu einem nicht unerheblichen Anteil die dialkylierte Form als Nebenprodukt, d. h. dass anstelle der *N,N'*-Verbrückung jeder Benzimidazolring einmal *N*-alkyliert ist (Abb. 42). Die Reaktionsbedingungen werden so gewählt, dass eine *N,N'*-Verbrückung erfolgt. Da in der Synthesemikrowelle bevorzugt die *N*-Alkylierung beider Benzimidazolringe erfolgt, wird für die Darstellung der *N,N'*-verbrückten BBIs die konventionelle Methode gewählt: Der Reaktionsansatz wird vier Stunden unter Rückfluss erhitzt.



**Abb. 43:** Detektion mittels Fluorescein/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bromierung von Fluorescein-Na zu Eosin)



Die Verlaufskontrolle der Reaktion kann mittels DC durchgeführt werden. Dabei kann nach dem Entwickeln der DC-Platte im Fließmittelgemisch EA/n-Hexan (9+1) die Detektion mit dem Sprühreagenz Fluorescein/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unterstützt werden. Die Bromide befinden sich nach dem Entwickeln der DC-Platte am Start und zeigen unmittelbar nach dem Besprühen eine Rosafärbung ihres nicht per Löschung erkennbaren Flecks. Bei der Farbreaktion wird Fluorescein-Na (gelb) zu Eosin, dem Natriumsalz des Tetrabromfluoresceins (rot), bromiert (Abb. 43). Die organisch gebundenen Bromatome der dialkylierten Form, die beim Einsatz von 1,2-Dibromethan noch an den Alkylresten gebunden sind, zeigen erst nach der Erwärmung im Trockenschrank eine Rosafärbung des Flecks. Wenn anstelle von 1,2-Dibromethan das 1-Brom-2-chlorethan für die *N,N'*-Verbrückung eingesetzt wird, ist keine Rosafärbung des Flecks vom dialkylierten Nebenprodukt zu erkennen, da das Bromid als bessere Abgangsgruppe am Start bleibt und das noch am Alkylrest vorhandene Chlor die Farbreaktion nicht eingeht. Für den Nachweis des organisch gebundenen Chloratoms kann die Beilstein-Probe angewendet werden. Bei der Beilstein-Probe werden Halogene in organischen Verbindungen nachgewiesen, in dem mit Hilfe von Kupfer in der nicht leuchtenden Bunsenbrennerflamme verdampfende Kupferhalogenide erzeugt werden. Diese zeigen dann eine charakteristische Grünfärbung der Flamme. Die Beilstein-Probe wird aus der Fraktion durchgeführt, so dass keine Anionen, sondern nur organisch gebundene Halogene nachgewiesen werden.



**Abb. 44:** Verbindung **51**

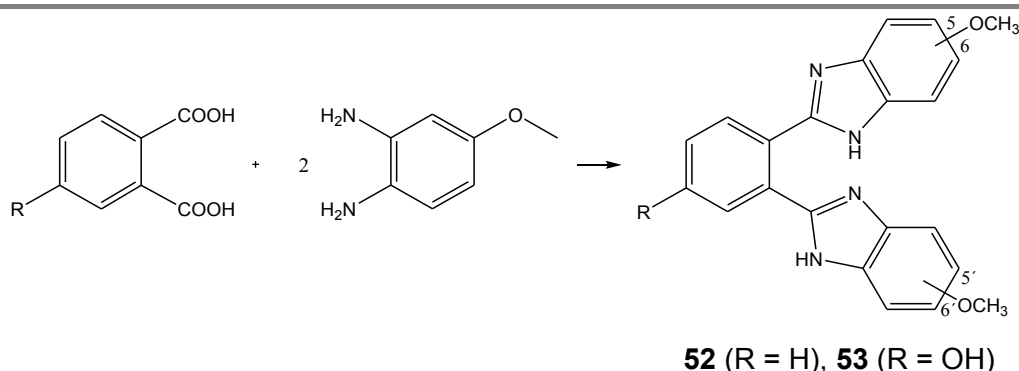
Nach der Aufarbeitung mittels SC an Kieselgel mit dem Fließmittelgemisch EA/n-Hexan (9+1) kann die gewünschte *N,N'*-ethanverbrückte Verbindung als Stellungsisomerengemisch (Verbindung **50**, Abb. 42) isoliert werden. Für die geringe Ausbeute ist es nicht von Bedeutung, ob die Reaktion mit 1,2-Dibromethan oder mit 1-Brom-2-chlorethan durchgeführt wird. Aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeitseigenschaften der Isomerengemische in verschiedenen Lösungsmitteln (beispielsweise in Aceton und MeOH) kann die Verbindung mit 3,10-Stellung der Methoxygruppen (Verbindung **51**, Abb. 44) isoliert werden.

Weitere Molekülvariationen wie beispielsweise die *N,N'*-Verbrückung mit  $\alpha,\alpha'$ -Dibrom-*o*-xylol waren im Rahmen dieser Arbeit nicht zugänglich.

### 2.1.9 Synthese von 2,2'-überbrückten Benzimidazolen

Weitere Variationen des Bisbenzimidazolgrundkörpers sind durch die Veränderung der Überbrückung der Benzimidazole in den Positionen 2 und 2' möglich. Dabei sollen die Strukturen so ausgewählt werden, dass die Substanzen Emissionsmaxima bei Wellenlängen > 400 nm und hohe Fluoreszenzintensitäten zeigen. Die dafür notwendigen Voraussetzungen können durch die Überbrückung mit einem Ringsystem und der damit verbundenen guten Delokalisierbarkeit der Elektronen gegeben sein.

In der Literatur werden verschiedene Verfahren zur Synthese von 2,2'-überbrückten Benzimidazolen beschrieben <sup>[78-80]</sup>. Als Edukte für die Kondensationsreaktionen werden aromatische *o*-Dicarbonsäuren und OPDs eingesetzt. Weder die Synthese in Polyphosphorsäure noch die in Methansulfonsäure führen im Rahmen dieser Arbeit zum gewünschten Produkt oder lassen dieses nur in sehr kleiner Menge entstehen. Erfolgreich und in ausreichender Menge sind die 2,2'-überbrückten Benzimidazole mittels einer Feststoffsynthese zugänglich (Abb. 45).

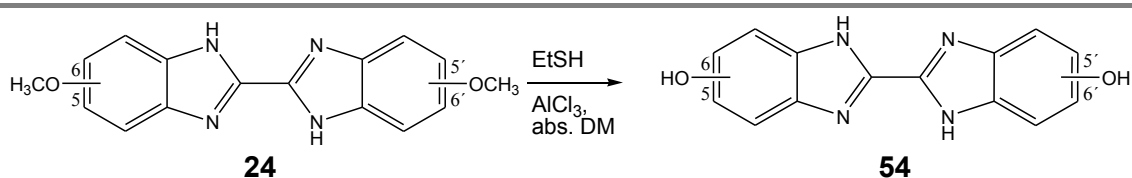


**Abb. 45:** Darstellung der 2,2'-überbrückten Benzimidazole, die Methoxygruppen befinden sich in den Positionen 5,5'/5,6'/6,6'

Bei der Durchführung der Feststoffsynthese ist langsames Erwärmen bei guter Homogenisierung von Bedeutung. Die Auftrennung erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel mit DM/MeOH (9+1) als Fließmittelgemisch mit anschließender Umkristallisation aus EtOH. Die so erhaltenen Stellungsisomere werden als Gemische für die spätere Etherspaltung verwendet.

### 2.1.10 Etherspaltung von Methoxyschutzgruppen

Die Etherspaltung mit Bortribromid<sup>[81]</sup> wurde an Verbindung **31**, einem diethylierten BBI, getestet. Diese Methode führte nicht zum gewünschten Produkt, da aus dem entstandenen Stoffgemisch kein BBI isoliert werden konnte. Aus diesem Grund wird ein milderes Verfahren für die Etherspaltung unter Verwendung von Ethanthiol (EtSH) und Aluminiumchlorid (AlCl<sub>3</sub>) gewählt<sup>[82]</sup>. Die Etherspaltung von Arylalkylethern ist durch den Einsatz von Ethanthiol in Gegenwart von wasserfreiem AlCl<sub>3</sub> in abs. Dichlormethan (DM) möglich (Abb. 46). Die Lewisäure AlCl<sub>3</sub> unterstützt durch die polarisierende Wirkung auf die O-Alkylbindung den Angriff der stark nucleophilen Mercaptoverbindung am O-gebundenen Kohlenstoff der Alkylgruppe. Neben dem Ethylmethylthioether entsteht die gewünschte Verbindung mit freier phenolischer Hydroxygruppe<sup>[83]</sup>.

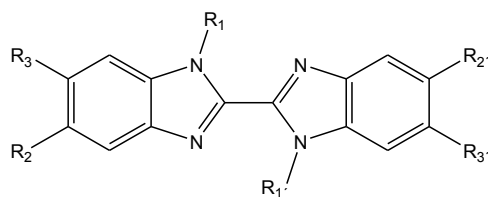


**Abb. 46:** Etherspaltung unter Verwendung von AlCl<sub>3</sub> und Ethanthiol, am Beispiel der Verbindung **54**, die Hydroxygruppen befinden sich in den Positionen 5,5'/5,6'/6,6'

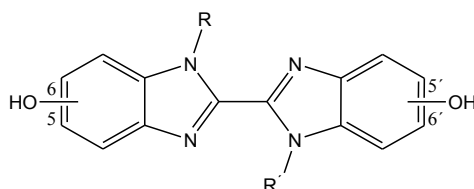
Die hydrophilen Phenole zeigen nach dem Entwickeln der DC-Platten im Fließmittelgemisch DM/MeOH (9+1) geringere R<sub>F</sub>-Werte als ihre Edukte, da sie mit den Silanolgruppen der stationären Phase stärker in Wechselwirkung treten als die lipophilen Ether. Die Flecken der Phenole färben sich nach einiger Zeit gelb bis gelb-braun. Dieser Farbwechsel kann durch die Bestrahlung mit UV-Licht unter dem UV-Betracher beschleunigt werden. Eine weitere Möglichkeit, die Flecken der Phenole sichtbar zu machen, ist der Einsatz der Iodkammer (Kap. 2.1.3).

Die Reaktionsmischung wird 30 min auf Eis sowie weitere 30 min bei RT gerührt und dann durch die Zugabe von Wasser abgestoppt. Anschließend erfolgt die Extraktion mit DM. Die weitere Aufarbeitung erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Fließmittelgemisch DM/MeOH (9+1).

In den folgenden Tabellen und Abbildungen werden die nach erfolgreicher Etherspaltung erhaltenen Hydroxyverbindungen dargestellt. Die Hydroxyverbindungen werden für die weiteren Untersuchungen wie die Strukturuntersuchungen mit Hilfe der NMR-, UV- und Fluoreszenzspektroskopie (Kap. 2.2) sowie für die pharmakologischen Untersuchungen (Kap. 2.3) eingesetzt.

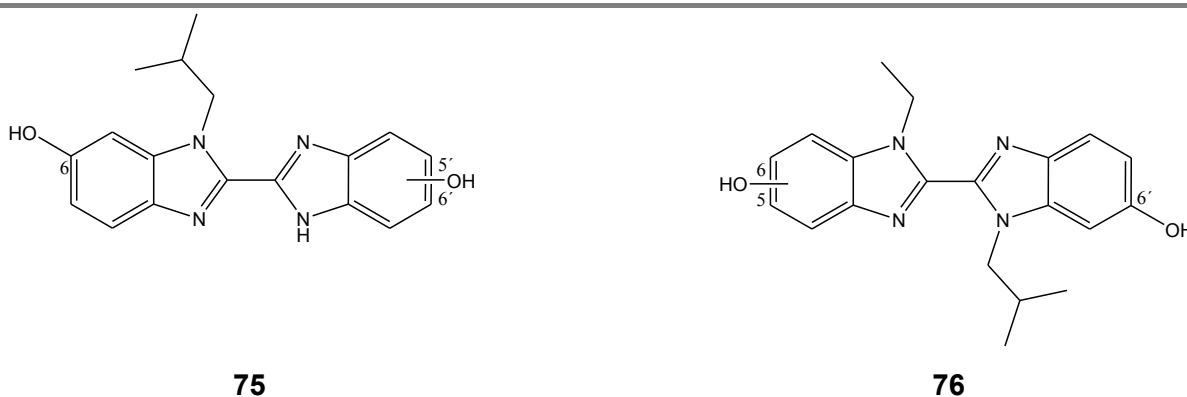
**55-64****Tab. 6:** [2,2'-Bi-1*H*-benzimidazol]-5,5'/6,6'-diole, 1,1'-disubstituiert

Verbindung	R <sub>1</sub> = R <sub>1'</sub>	R <sub>2</sub> = R <sub>2'</sub>	R <sub>3</sub> = R <sub>3'</sub>
55	CH <sub>3</sub>	OH	H
56	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OH	H
57	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OH	H
58	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	H
59	CH <sub>2</sub> C≡CH	OH	H
60	CH <sub>3</sub>	H	OH
61	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	OH
62	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	OH
63	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	OH
64	CH <sub>2</sub> C≡CH	H	OH

**65-74****Tab. 7:** Stellungsisomerengemische der [2,2'-Bi-1*H*-benzimidazol]-5,5'/6,6'-diole, 1,1'-disubstituiert

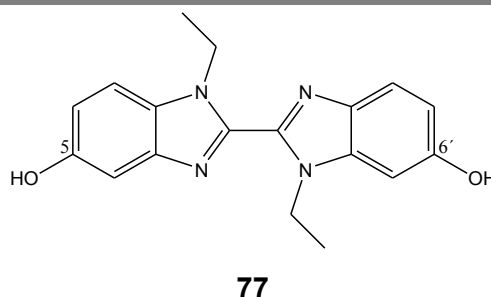
Verbindung	R	R'
65	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
66	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
67	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
68	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
69	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
70	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
71	CH <sub>2</sub> C≡CH	CH <sub>2</sub> C≡CH
72	4-Methylbenzyl	4-Methylbenzyl

Verbindung	R	R'
<b>73</b>	Phenyl	H
<b>74</b>	3-Pyridinyl	H



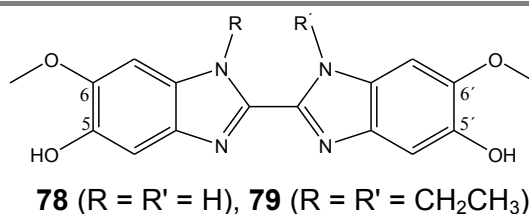
**Abb. 47:** Stellungsisomerengemische: Verbindung **75**, die Hydroxygruppe befindet sich in Position 5' oder 6' (links); Verbindung **76**, die Hydroxygruppe befindet sich in Position 5 oder 6 (rechts)

Durch die Auftrennung mit Hilfe der Mitteldruckchromatographie (Kap. 2.1.11) kann aus dem Stellungsisomerengemisch der Verbindung **66** die Verbindung **77** mit 5,6'-Stellung der beiden phenolischen Hydroxygruppen isoliert werden (Abb. 48).

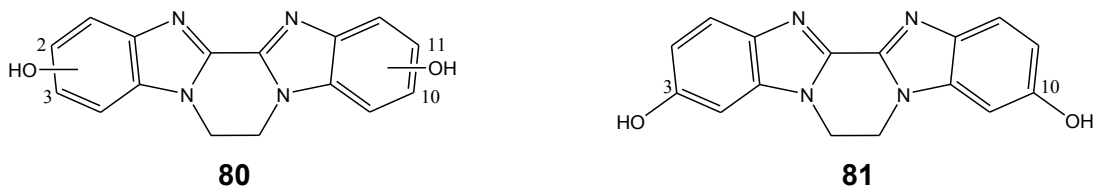


**Abb. 48:** Verbindung **77**

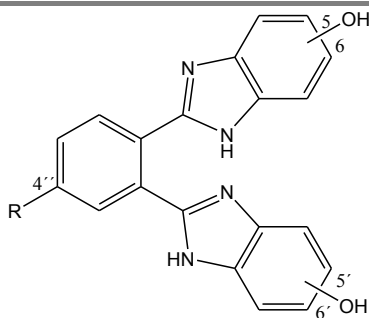
Die Etherspaltung der 5,5',6,6'-Tetramethoxy-BBI-Derivate ergibt lediglich Verbindungen mit zwei Hydroxygruppen: Jeder der beiden Benzimidazolringe zeigt weiterhin eine Methoxygruppe (Abb. 49).



**Abb. 49:** 6,6'-Dimethoxy-BBI-5,5'-diol-Derivate: Verbindung **78** und **79**



**Abb. 50:** *N,N'*-verbrückte BBIs: Verbindung **80** (Isomerengemisch), die Hydroxygruppen befinden sich in den Positionen 2 oder 3 und 10 oder 11 (links); Verbindung **81** (Stellungsisomer) (rechts)



**82** (R = H), **83** (R = OH)

**Abb. 51:** 2,2'-überbrückte Benzimidazole: Verbindung **82** und **83**, die Hydroxygruppen befinden sich in den Positionen 5,5',6/6,6'

### 2.1.11 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie zur Isomerentrennung

Bei der *N*-Alkylierung der Verbindung **24** entsteht ein Stellungsisomerengemisch (Kap. 2.1.6.2). Die Trennung der Stellungsisomere wird nach erfolgter Etherspaltung durchgeführt. Durch herkömmliche säulenchromatographische Verfahren an Kieselgel und durch Umkristallisieren aus verschiedenen Lösungsmitteln wie Aceton und MeOH kann die Verbindung mit 6,6'-Stellung der phenolischen Hydroxygruppen isoliert, aber nicht quantitativ aus dem Isomerengemisch entfernt werden. Aus diesem Grund wird für das Isomerengemisch die Mitteldruckchromatographie (MPLC) als Trennmethode gewählt.

Stellvertretend für sämtliche Isomerengemische wird die Gemischtrennung anhand der diethylierten Hydroxyverbindung Verbindung **66** per MPLC untersucht.

Zuerst wird eine geeignete Methode im analytischen Maßstab mit Hilfe der HPLC entwickelt, die anschließend auf eine präparative Säule (MPLC) übertragen wird. Die gewählten Bedingungen führen bei kurzen Retentionszeiten zu einer guten Auftrennung der Isomere.

### Auswahl der Trennmethode

Die Trennung eines Stoffgemisches durch chromatographische Methoden wird im Wesentlichen durch eine stationäre Phase, eine mobile Phase, die Fließgeschwindigkeit und durch die Eigenschaften des zu trennenden Stoffgemisches bestimmt.

### Umkehrphasenchromatographie

Im Gegensatz zur klassischen Chromatographie, bei der polare stationäre Phasen wie Kieselgel oder Aluminiumoxid und weniger polare Fließmittel (FM) verwendet werden, kommen bei der Umkehrphasenchromatographie unpolare stationäre Phasen und polare FM zum Einsatz. Dadurch werden unpolare Stoffe stärker zurückgehalten, während polare Stoffe leichter eluiert werden können <sup>[84]</sup>.

### Stationäre Phase

Zur Auftrennung des synthetisierten Isomerengemisches wird eine Trennsäule mit Umkehrphase gewählt. Das mit Octadecylgruppen modifizierte Kieselgel zeichnet sich durch hohe chemische und mechanische Stabilität aus.

### Mobile Phase

Durch Variation der Fließmittelkomponenten und ihrer prozentualen Zusammensetzung wird das FM optimiert. Mobile Phasen aus den Komponenten Wasser und ACN mit unterschiedlicher Zusammensetzung zeigen keine ausreichende Trennung der Isomere. Eine mobile Phase aus den Komponenten Wasser und MeOH im Verhältnis 55+45 erweist sich für das Trennungsproblem der Stellungsisomere als geeignet. Es wird eine Trennung mittels isokratischer Elution durchgeführt.

### Detektion

Die Detektion der zu trennenden Isomere erfolgt mit Hilfe eines UV/VIS-Detektors. Die UV-Messung erfolgt bei 300 nm, da die Stellungsisomere bei dieser Wellenlänge eine ausreichende Absorption aufweisen.

### Analytische HPLC-Methode

Die Chromatogramme (Abb. 52, Abb. 53) zeigen die unterschiedlichen Retentionszeiten ( $t_R$ ) der einzelnen Stellungsisomere. Verbindung **61** (6,6'-Stellung) weist unter den gewählten Bedingungen die kürzeste Retentionszeit mit  $t_R = 20,85$  s auf (Abb. 52, Bild a). Eine längere Retentionszeit zeigt Verbindung **56** (5,5'-Stellung) mit  $t_R = 21,70$  s (Abb. 52, Bild b). Verbindung **66** (Isomerengemisch) zeigt drei Peaks (Abb. 52, Bild d), wobei die ersten beiden den Stellungsisomeren der Verbindungen mit 6,6'- und 5,5'-Stellung der phenolischen Hydroxygruppen zugeordnet werden können, der dritte Peak hat eine Retentionszeit von  $t_R = 23,23$  s.

Wie bereits in Kap. 2.1.6.2 beschrieben, ergeben sich bei der *N*-Alkylierung von 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**24**) drei mögliche Stellungsisomere: die 5,5'- und die 6,6'-Stellung sowie die 5,6'-Stellung der phenolischen Hydroxygruppen. Um nachzuweisen, dass es sich bei dem dritten Peak um die Verbindung mit 5,6'-Stellung handelt, soll diese isoliert und analysiert werden.

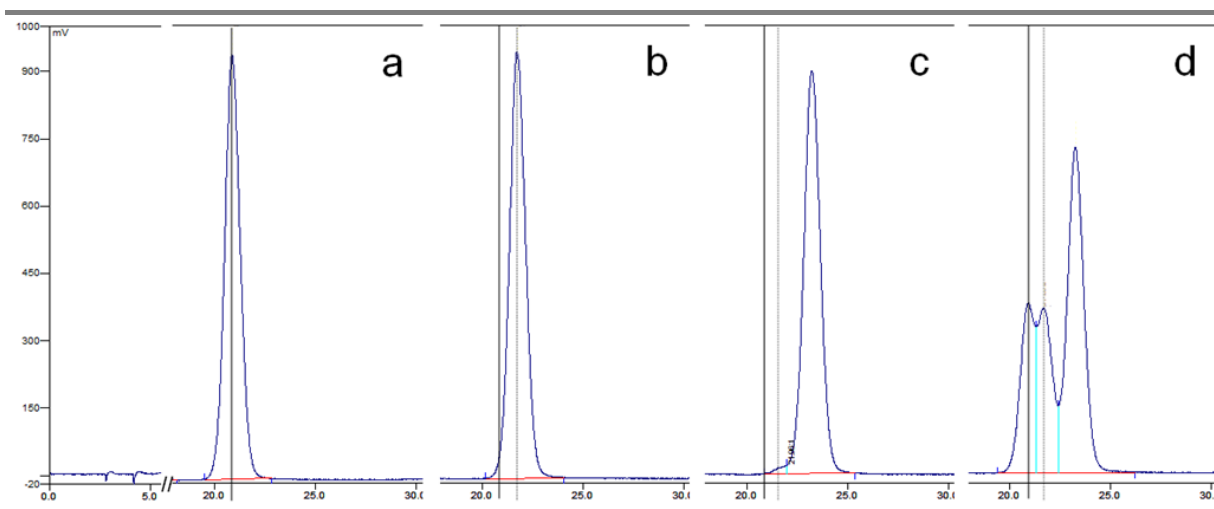
### Präparative MPLC zur Isomerentrennung

Die Bedingungen für die Durchführung der analytischen HPLC werden ebenfalls für die MPLC angewendet. So kann aus dem Stellungsisomerengemisch 1,1'-Diethyl-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-5,5'/5,6'/6,6'-diol **66** die Verbindung **77** (5,6'-Stellung) isoliert werden.

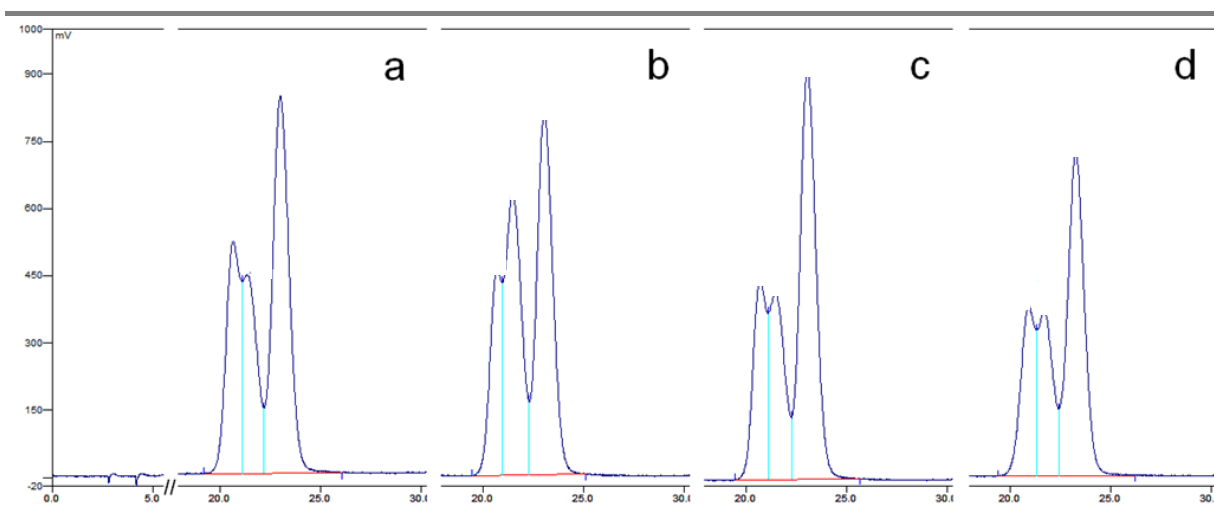
Für die Analyse der isolierten Verbindungen werden Chromatogramme mit der HPLC (Reinheit) und Kernresonanzspektren (Strukturzuordnung) aufgenommen. Das Chromatogramm der Verbindung **77** (5,6'-Stellung) ist in Abb. 52, Bild c dargestellt. Mittels NOE kann das Vorliegen der 5,6'-Stellung belegt werden (Kap. 2.2.1).

Dass es sich bei Verbindung **66** tatsächlich um ein Gemisch der drei Stellungsisomere handelt, kann durch Zugabe der einzelnen Stellungsisomere zum Gemisch gezeigt werden. Nach Zuspiken einer definierten Menge vergrößert sich genau die Fläche unter dem Peak, der dem jeweiligen Isomer zugeordnet werden kann (Abb. 53).





**Abb. 52:** HPLC-Chromatogramme (das Detektorsignal ist gegen  $t_R$  in min aufgetragen):  
**a:** Verbindung **61**: 6,6'-Stellung (gekennzeichnet mit einer durchgehenden Linie),  
**b:** Verbindung **56**: 5,5'-Stellung (gekennzeichnet mit einer gestrichelten Linie),  
**c:** Verbindung **77**: 5,6'-Stellung,  
**d:** Verbindung **66**: Isomerengemisch



**Abb. 53:** HPLC-Chromatogramme des Isomerengemisches nach Zuspiken des jeweils reinen Stellungsisomers (das Detektorsignal ist gegen  $t_R$  in min aufgetragen):  
**a:** Verbindung **66** (Isomerengemisch) + Verbindung **61** (6,6'-Stellung),  
**b:** Verbindung **66** (Isomerengemisch) + Verbindung **56** (5,5'-Stellung),  
**c:** Verbindung **66** (Isomerengemisch) + Verbindung **77** (5,6'-Stellung),  
**d:** Verbindung **66** (Isomerengemisch)

## 2.2 Strukturuntersuchungen

Die Stellungsisomere unterscheiden sich sowohl in den physikalischen als auch in den chemischen Stoffeigenschaften. Kernresonanz-, Absorptions- und Emissionsspektroskopie werden zur Untersuchung der physikalischen Eigenschaften eingesetzt. Im Folgenden sollen mit Hilfe dieser Verfahren die Unterschiede der Strukturen analysiert werden.

### 2.2.1 Kernresonanzspektroskopie

Die Protonen einer Verbindung weisen in Protonenresonanzspektren ( $^1\text{H}$ -NMR-Spektren) charakteristische chemische Verschiebungen auf. Die chemische Verschiebung ( $\delta$ ) ist die relative Entfernung des Signals einer Substanz vom Signal des Standards, in diesem Fall Tetramethylsilan (TMS), und wird in ppm (parts per million) angegeben:

$$\delta = \frac{(\text{Resonanzfrequenz der Substanz} - \text{Resonanzfrequenz von TMS}) \text{ in Hz}}{\text{Betriebsfrequenz des Gerätes in MHz}}$$

Wasserstoffkerne werden von Elektronenhüllen umgeben, die den Kern vom äußeren Magnetfeld abschirmen. Effekte, die die Elektronendichte am Wasserstoffkern beeinflussen können, sind mesomere Effekte, elektrische Dipole in der Umgebung des Wasserstoffkerns, van der Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und die Elektronendichte des Kohlenstoffatoms, an dem der Wasserstoffkern gebunden ist. Wird die Elektronendichte am Wasserstoffkern erhöht, wird dieser folglich von einer dichteren Elektronenhülle umgeben und damit stärker abgeschirmt. Um den Kern trotz starker Abschirmung in Resonanz zu bringen, muss ein entsprechend höheres Feld eingesetzt werden (Hochfeldverschiebung). Die Kernresonanzsignale zeigen sich bei kleineren  $\delta$ -Werten. Umgekehrt erscheinen die Signale bei größeren  $\delta$ -Werten (Tiefeldverschiebung), wenn das Proton eine Entschirmung des äußeren Feldes erfährt.

In den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wird auf der Abszisse die Stärke des äußeren Magnetfeldes und auf der Ordinate die der Resonanzenergie entsprechende Spannung der Empfängerspule dargestellt. Im Folgenden werden die Werte der Abszisse in ppm angegeben.

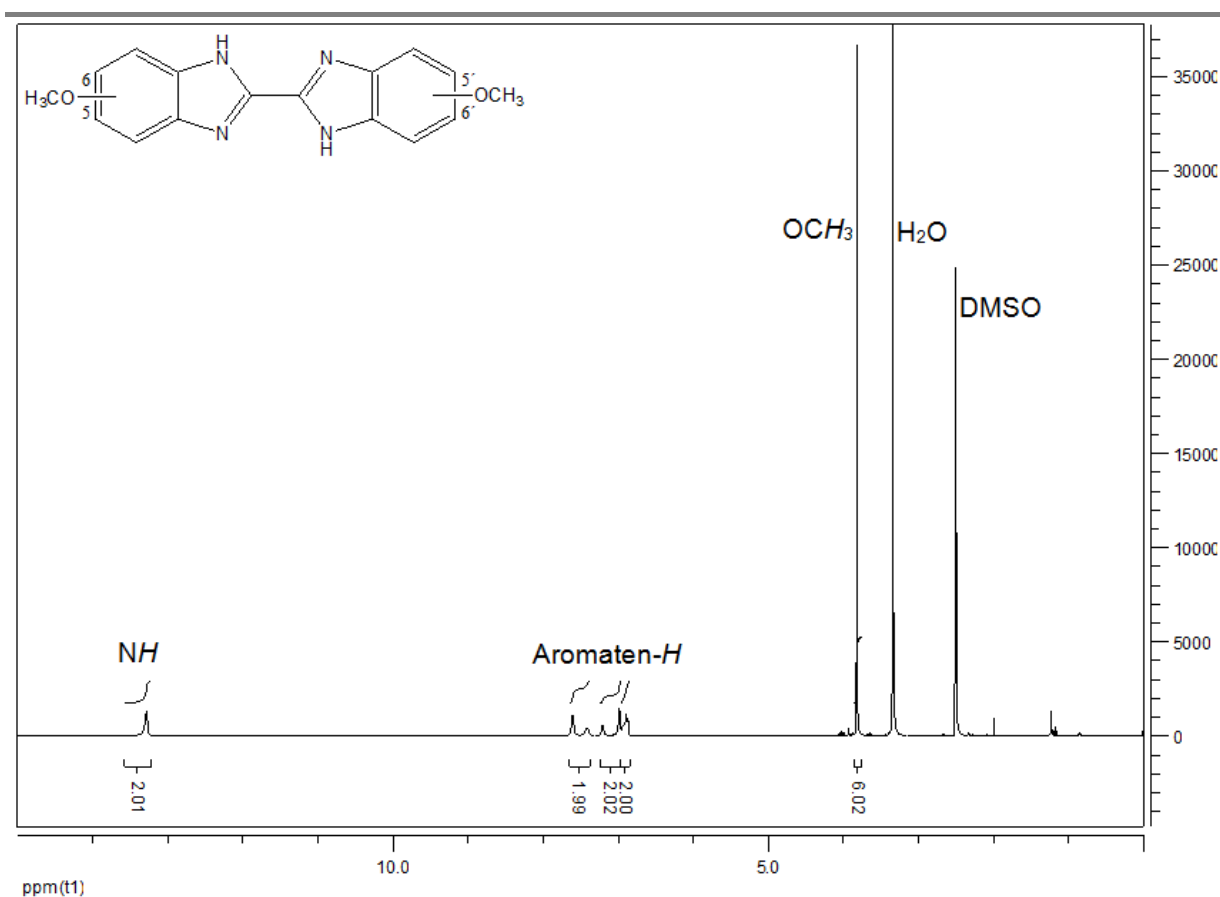
### 2.2.1.1 $^1\text{H-NMR}$ -Spektren bei variablen Temperaturen

#### $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Verbindung **24**

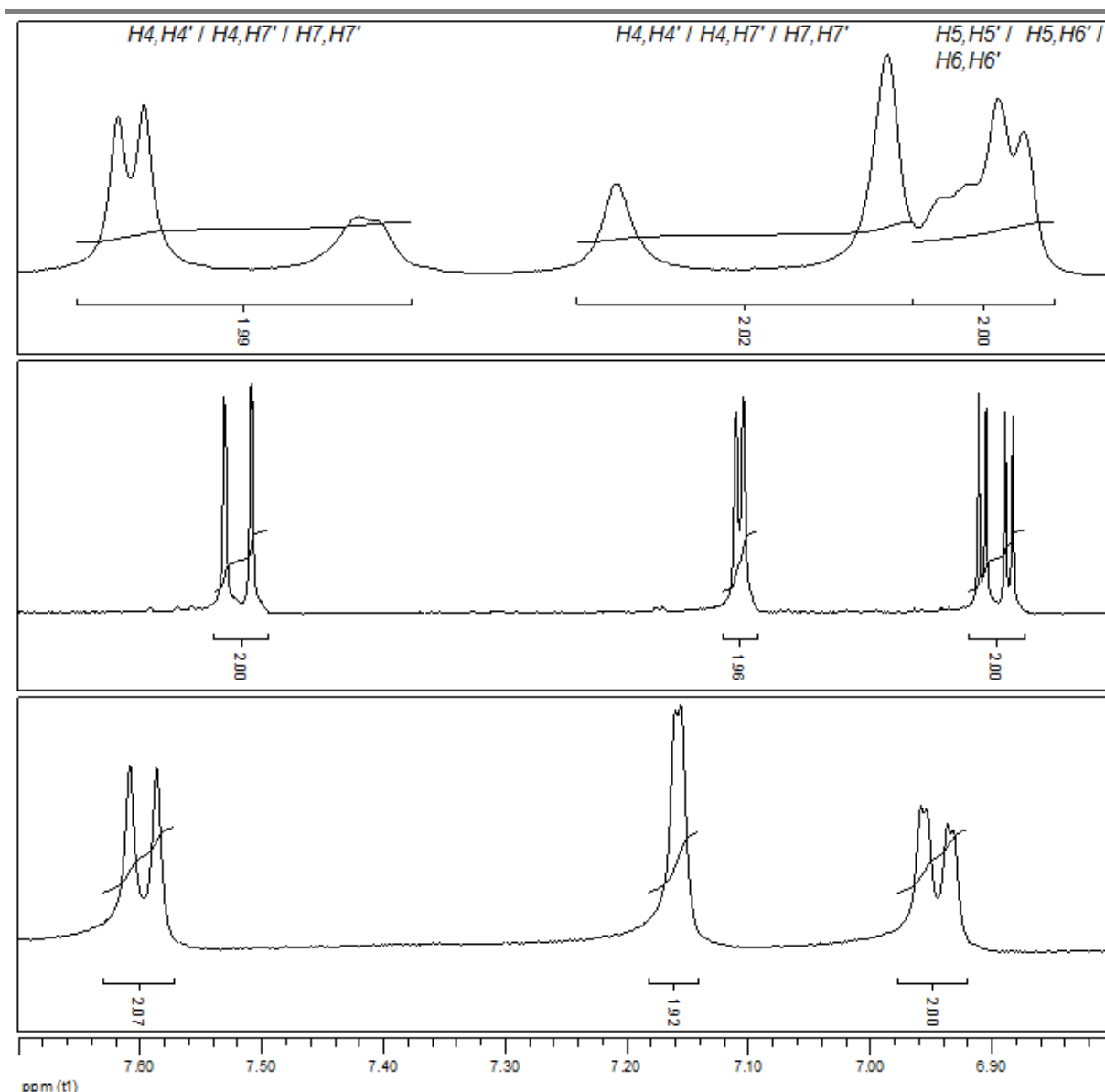
Für die Strukturuntersuchungen soll neben dem Lösungsmittel auch die Temperatur variiert werden, wobei die Temperatur während einer Messung konstant bleibt.

Die Zahl der unter den gewählten Bedingungen im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum auftretenden Signale wird durch die Eigenschaften des Moleküls bestimmt.

Die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Verbindung **24** zeigen sowohl in verschiedenen LM als auch bei variablen Temperaturen Unterschiede in der chemischen Verschiebung und verschiedene Signale der Protonen im Aromatenbereich (Abb. 54 - Abb. 56) [75]. Ursachen können in den unterschiedlichen Viskositäten der LM und in der damit verbundenen Geschwindigkeit des Austausches der Protonen liegen.

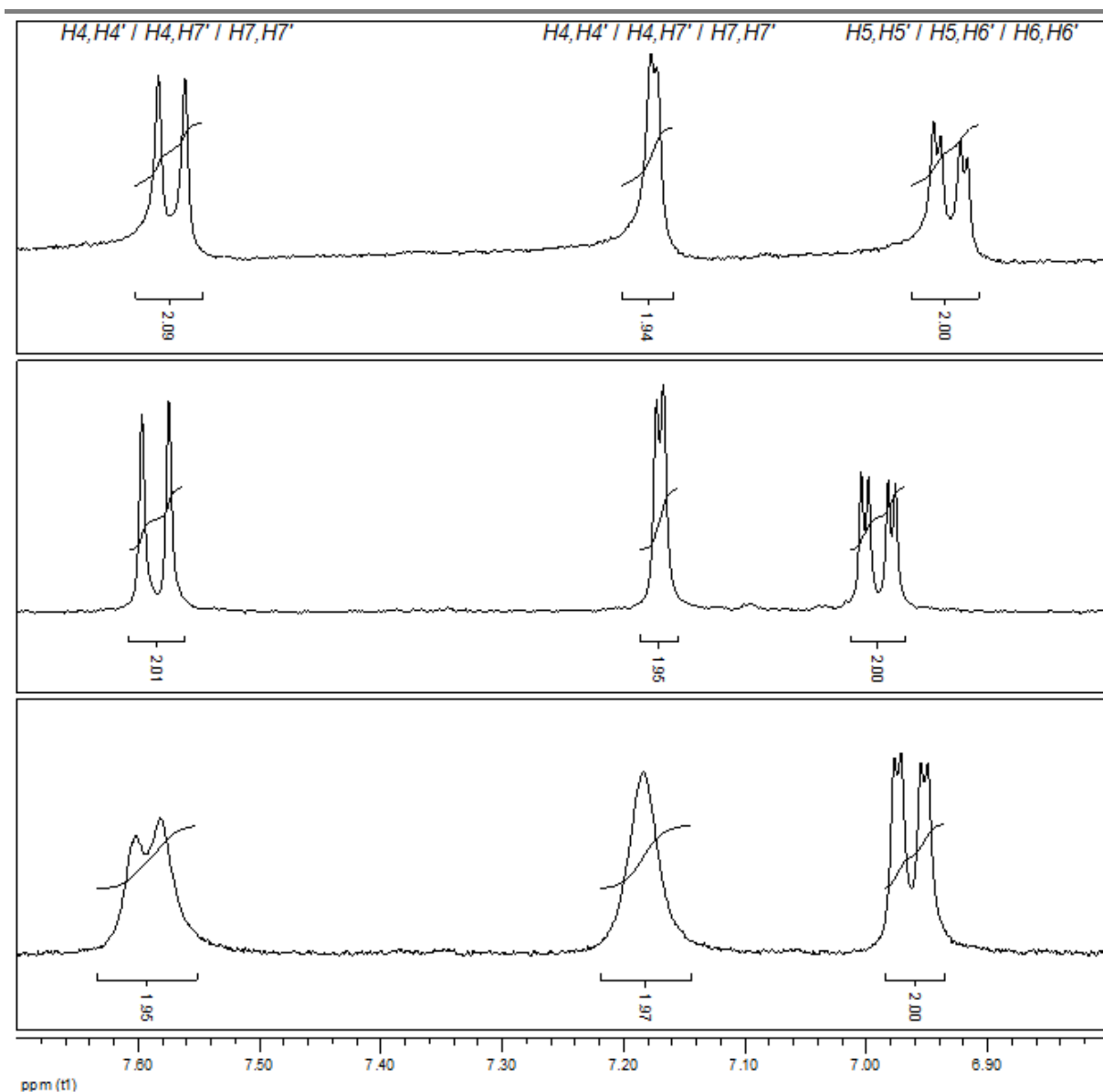


**Abb. 54:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung **24** in  $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$ ,  $20\text{ }^\circ\text{C}$ , 0-15 ppm; die Methoxygruppen befinden sich in den Positionen 5,5'/5,6'/6,6'



**Abb. 55:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Verbindung **24** in  $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$ , oben: 20 °C, Mitte: 90 °C, unten: nach  $\text{D}_2\text{O}$ -Austausch, 20 °C; Darstellung der Signale der Aromaten-H, 6,8-7,7 ppm

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **24** in  $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$  zeigt bei 20 °C breite Signale der Protonen im Aromatenbereich (Abb. 54, Vergrößerungsausschnitt in Abb. 55). Wird diese Probe erwärmt und bei 90 °C vermessen, zeigen die Protonen im Aromatenbereich gute Signalaufspaltungen. Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bei 90 °C (Hochtemperatur, HT, Abb. 55) erlaubt eine Strukturzuordnung der Protonen im Aromatenbereich und die Bestimmung der jeweiligen Kopplungskonstante (J). Die einzelnen Signale der Protonen zeigen sich bei dem Mittelwert der chemischen Verschiebung der Signalbereiche der entsprechenden Protonen des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums bei 20 °C (Tab. 8). Das Integral der Protonen wird jeweils mit zwei beziffert.



**Abb. 56:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Verbindung **24** in oben:  $[\text{D}_6]$ -Aceton ( $20\text{ }^\circ\text{C}$ ), Mitte:  $[\text{D}_4]$ -Methanol ( $20\text{ }^\circ\text{C}$ ), unten:  $[\text{D}_6]$ -Aceton/ $[\text{D}_4]$ -Methanol (1+1) ( $20\text{ }^\circ\text{C}$ ); Darstellung der Signale der Aromaten-H, 6,8-7,7 ppm

**Tab. 8:** Chemische Verschiebungen der Protonen im Aromatenbereich der Verbindung **24** aus  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren in ppm (LM:  $[\text{D}_6]$ -DMSO) bei variablen Temperaturen

Temperatur in $^\circ\text{C}$	$H5,H5'$   $H5,H6'$   $H6,H6'$	$H4,H4'$   $H4,H7'$   $H7,H7'$	$H4,H4'$   $H4,H7'$   $H7,H7'$
20	6,84 - 6,96	6,96 - 7,24	7,37 - 7,65
90	6,90	7,11	7,52

Die Signale der Protonen mit *ortho+meta*-Kopplung ( $H5,H5'$  /  $H5,H6'$  /  $H6,H6'$ ) zeigen bei 20 °C ein Multiplett in einem Bereich von 6,84-6,96 ppm; bei 90 °C zeigen sie ein Doppeldublett (dd) bei 6,90 ppm,  $^3J = 8,78$  Hz und  $^4J = 2,44$  Hz (Abb. 55). Die Signale der Protonen mit *m*-Kopplung ( $H4,H4'$  /  $H4,H7'$  /  $H7,H7'$ ) zeigen bei 20 °C ein Dublett in einem Bereich von 6,96-7,24 ppm; bei 90 °C zeigen sie ein Dublett (d) bei 7,11 ppm,  $^4J = 2,32$  Hz. Die Signale der Protonen mit *o*-Kopplung ( $H4,H4'$  /  $H4,H7'$  /  $H7,H7'$ ) zeigen bei 20 °C ein Dublett in einem Bereich von 7,37-7,65 ppm; bei 90 °C zeigen sie ein Dublett (d) bei 7,52 ppm,  $^3J = 8,79$  Hz. Nach Abkühlen der Probe, wird diese erneut bei 20 °C vermessen und zeigt wieder das gleiche  $^1H$ -NMR-Spektrum wie bei der ersten Messung bei 20 °C.

Der Nachweis, dass es sich bei dem Singulett bei 13,28 ppm um das Signal der beiden am Stickstoff gebundenen Protonen (NH) handelt, kann durch die Zugabe von D<sub>2</sub>O geführt werden. Die Deuteriumionen tauschen mit den beiden Protonen am Stickstoff aus. Das Signal der beiden Protonen (NH) ist bei erneuter Messung im  $^1H$ -NMR-Spektrum nicht mehr vorhanden.

D<sub>2</sub>O hat als weiteres LM Einfluss auf die chemische Verschiebung. So zeigen sich die Signale der Protonen im Aromatenbereich bei anderen  $\delta$ -Werten als das im  $^1H$ -NMR-Spektrum im reinen [D6]-DMSO der Fall ist.

Ein weiterer Einfluss von D<sub>2</sub>O zeigt sich in der Signalaufspaltung der Protonen. Die Messung erlaubt bereits bei 20 °C eine Strukturzuordnung der Aromaten-H (Abb. 55).

**Tab. 9:** Chemische Verschiebungen der Protonen im Aromatenbereich der Verbindung **24** aus  $^1H$ -NMR-Spektren in ppm in verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	$H5,H5'$ / $H5,H6'$ /	$H4,H4'$ / $H4,H7'$ /	$H4,H4'$ / $H4,H7'$ /
	$H6,H6'$	$H7,H7'$	$H7,H7'$
[D6]-Aceton	6,93	7,17	7,57
[D4]-Methanol	6,99	7,17	7,59
[D6]-Aceton / [D4]-Methanol 1+1	6,96	7,18	7,59

Der Einfluss der Viskosität des LM wird auch durch die Wahl niedrig viskoser LM belegt: Die  $^1H$ -NMR-Spektren in [D6]-Aceton, in [D4]-Methanol und in deren 1+1-Mischung zeigen ähnlich der Hochtemperaturaufnahme in [D6]-DMSO eine gute Signalaufspaltung der Protonen im Aromatenbereich (Abb. 56).

Der Einfluss des LM auf die chemische Verschiebung ist ebenfalls in den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren in  $[\text{D}_6]$ -Aceton und in  $[\text{D}_4]$ -Methanol oder in deren 1+1-Mischung deutlich erkennbar: Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der 1+1-Mischung zeigt in etwa die Mittelwerte der chemischen Verschiebung gegenüber den Werten in den reinen LM (Tab. 9). Allerdings sind in  $[\text{D}_6]$ -Aceton, in  $[\text{D}_4]$ -Methanol und in deren 1+1-Mischung kaum bis keine Aussagen zu Protonen am Stickstoff ( $\text{NH}$ ) möglich.

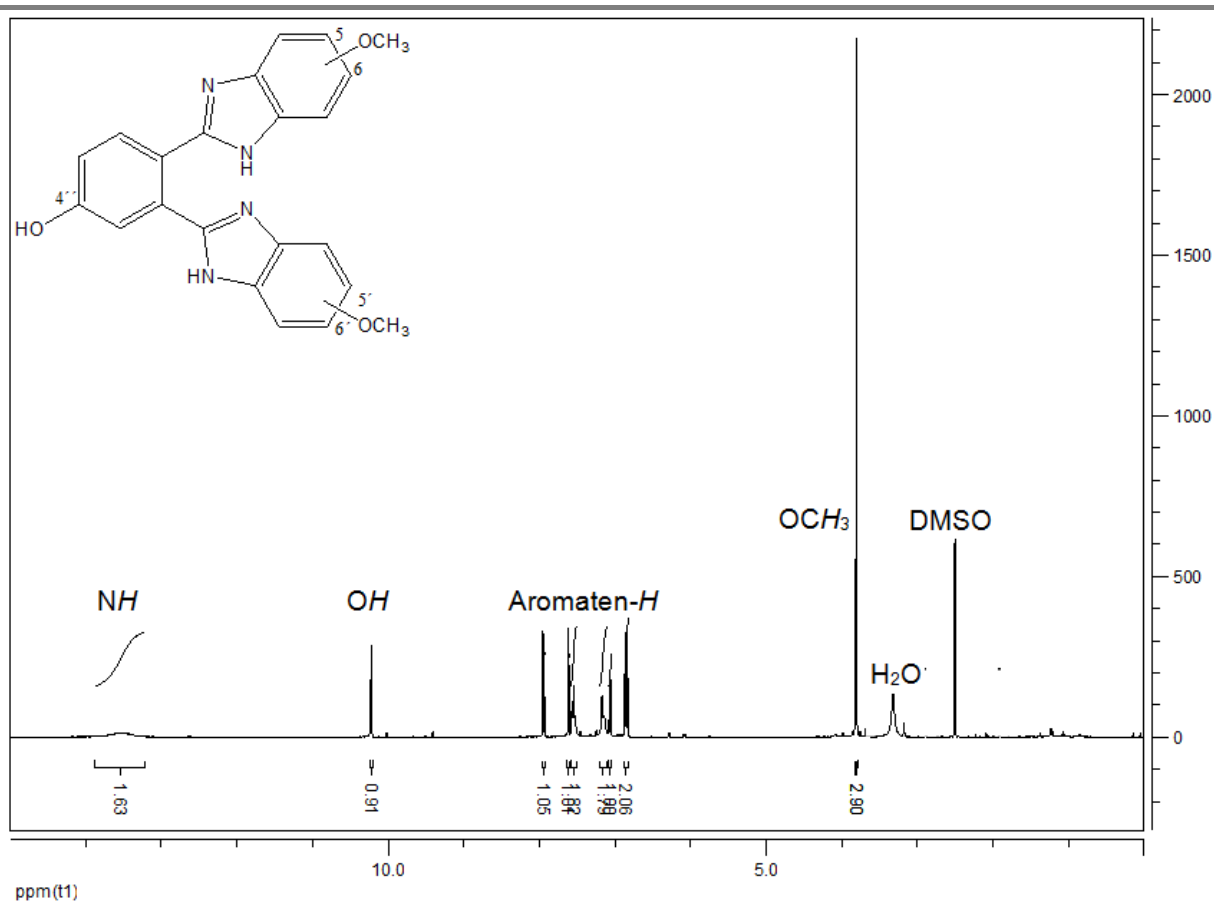
$[\text{D}_6]$ -DMSO erlaubt Aussagen bzgl. der Protonen am Stickstoff ( $\text{NH}$ ) und Sauerstoff ( $\text{OH}$ ), da es aufgrund eines verlangsamten Austausches die Beobachtung der Kopplungen dieser Protonen ermöglicht. Die Darstellung der Protonen am Stickstoff ( $\text{NH}$ ) ist auch für die spätere Kontrolle der Mono- und Disubstitution des 2,2'-Bisbenzimidazolgrundkörpers von Bedeutung. Die Signale der Hydroxygruppen ( $\text{OH}$ ) dienen der Erfolgs- und Reinheitsprüfung der nach der Etherspaltung erhaltenen Dihydroxyverbindungen.  $[\text{D}_6]$ -DMSO ist daher ein geeignetes LM für die Protonenresonanzspektroskopie der BBIs.

Ferner empfiehlt sich die Verwendung eines einheitlichen LM zwecks Vergleichbarkeit der chemischen Verschiebung und Signalaufspaltung der Protonen.

### $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Verbindung **53**

Verbindung **53** zeigt im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (Abb. 57, Vergrößerungsausschnitt in Abb. 58) ein ähnliches Verhalten wie die zuvor dargestellte Verbindung **24**. Auch bei Verbindung **53** können durch Vermessen bei HT gute Signalaufspaltungen der Protonen der Benzimidazol-körper im Aromatenbereich erreicht werden (Abb. 58).

Verbindung **53** ist kein symmetrisches Molekül, so dass die Protonen der beiden Benzimidazolkörper unterschiedliche chemische Verschiebungen zeigen (Tab. 10). Die Protonen mit *ortho+meta*-Kopplung ( $H_5, H_5' / H_5, H_6' / H_6, H_6'$ ) zeigen bei 6,82-6,88 ppm bereits bei 20 °C eine ähnliche Signalaufspaltung wie bei 90 °C, wobei die beiden Protonen sich in ihrer chemischen Verschiebung so ähnlich sind, dass die Signale sich teilweise überlappen. Die Protonen mit *m*-Kopplung ( $H_4, H_4' / H_4, H_7' / H_7, H_7'$ ) zeigen sich bei 20 °C als ein Dublett bei 7,10-7,20 ppm. Erst bei 90 °C sind die Dubletts der beiden Protonen einzeln bei 7,12 ppm und 7,15 ppm erkennbar ( $^4J = 2,34 \text{ Hz}$  und  $^4J = 2,28 \text{ Hz}$ ).



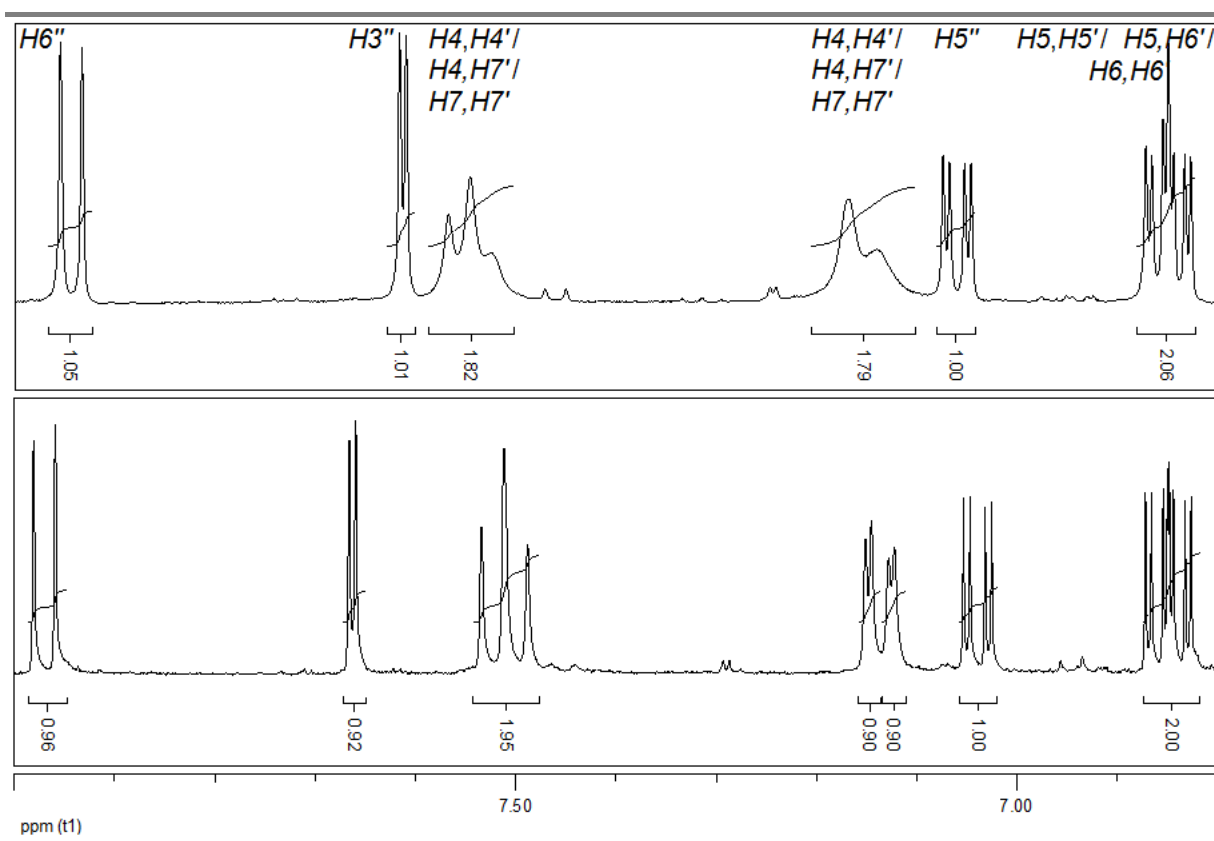
**Abb. 57:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Verbindung **53** in  $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$ , 20 °C, Darstellung von 0-15 ppm; die Methoxygruppen befinden sich in den Positionen 5,5'/5,6'/6,6'

**Tab. 10:** Chemische Verschiebungen der Protonen im Aromatenbereich der Verbindung **53** aus  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren in ppm (LM:  $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$ ) bei variablen Temperaturen

Temp. in °C	$H5, H5' /$ $H5, H6' / H6, H6'$	$H5''$	$H4, H4' /$ $H4, H7' / H7, H7'$	$H4, H4' /$ $H4, H7' / H7, H7'$	$H3''$	$H6''$
20	6,82 - 6,88	7,06	7,10 - 7,20	7,50 - 7,59	7,61	7,94
90	6,82 - 6,87	7,04	7,12 + 7,15	7,48 - 7,54	7,66	7,97

Die Protonen mit *o*-Kopplung ( $H4, H4' / H4, H7' / H7, H7'$ ) zeigen bei 20 °C ein Signal bei 7,50-7,59 ppm, das sich bei 90 °C als ein Pseudotriplett darstellt: Die Signale der beiden Protonen weisen ähnliche chemische Verschiebungen auf, so dass die beiden Dubletts teilweise übereinander liegen und man ein Triplett bei 7,48-7,54 ppm beobachtet. Die Protonen  $H3''$ ,  $H5''$  und  $H6''$  zeigen bereits bei 20 °C die dem Substitutionsmuster entsprechenden Signalaufspaltungen, die bei höheren Temperaturen unverändert bleiben (chemische Verschiebungen bei 20 °C:  $H5''$  bei 7,06 ppm mit  $^3J = 8,62$  Hz und  $^4J = 2,61$  Hz,  $H3''$  bei 7,61 ppm mit  $^4J = 2,59$  Hz und  $H6''$  bei 7,94 ppm mit  $^3J = 8,61$  Hz).



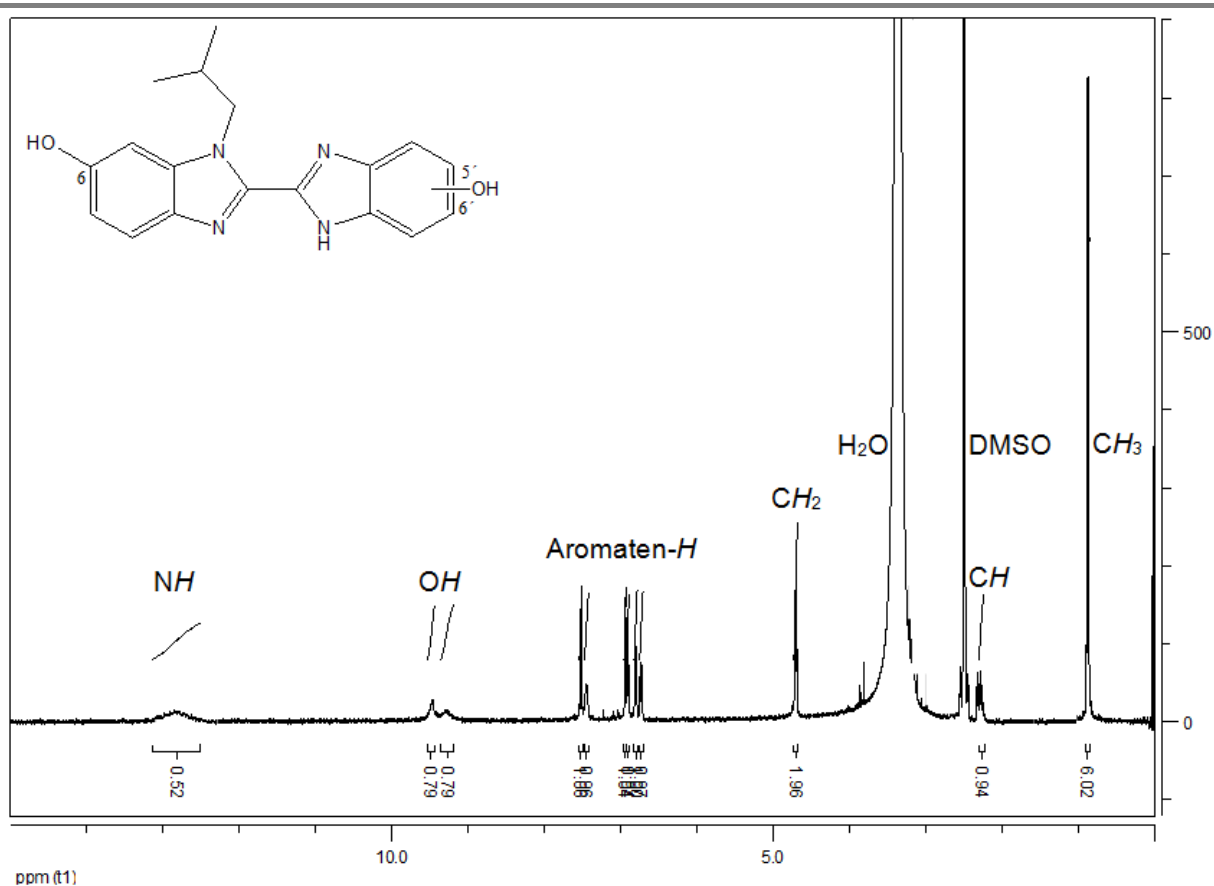


**Abb. 58:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Verbindung **53** in  $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$ , oben:  $20\text{ }^\circ\text{C}$ , unten:  $90\text{ }^\circ\text{C}$ , Darstellung der Signale der Aromaten-H, 6,8–8,0 ppm

### $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Verbindung **75**

Wie die Verbindungen **24** und **53** zeigt auch Verbindung **75** bei Hochtemperaturmessung eine entsprechende Aufspaltung der Signale der Protonen im Aromatenbereich (Abb. 59, Abb. 60). Dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum sind ebenso Informationen wie die der *N*-Alkylierung und die der erfolgreichen Etherspaltung zu entnehmen.

Bei Verbindung **75** handelt es sich um ein monoalkyliertes 2,2'-Bisbenzimidazolderivat, d. h. in Verbindung **75** ist nur einer der beiden Benzimidazolkörper an einem Stickstoff alkyliert, der zweite Benzimidazolkörper liegt weiterhin als Tautomer vor. Das Signal bei 4,71 ppm steht für die  $\text{CH}_2$ -Gruppe des 2-Methylpropanrestes am Stickstoff und zeigt sich als Dublett mit einem Integral von zwei. Ein weiterer Beleg für die *N*-Alkylierung von nur einem Benzimidazolkörper ist das Vorhandensein des breiten Singulett bei 13,00 ppm. Dieses Signal wird durch das am Stickstoff gebundene Wasserstoffatom (*NH*) erzeugt und kann mit den Deuteriumatomen des  $\text{D}_2\text{O}$  ausgetauscht werden. Die breiten Singulett der beiden Hydroxygruppen (*OH*) zeigen die für die BBIs charakteristische chemische Verschiebung zwischen 9 und 10 ppm. Auch hier können die Deuteriumatome des  $\text{D}_2\text{O}$  mit den Wasserstoffatomen der Hydroxygruppen austauschen.

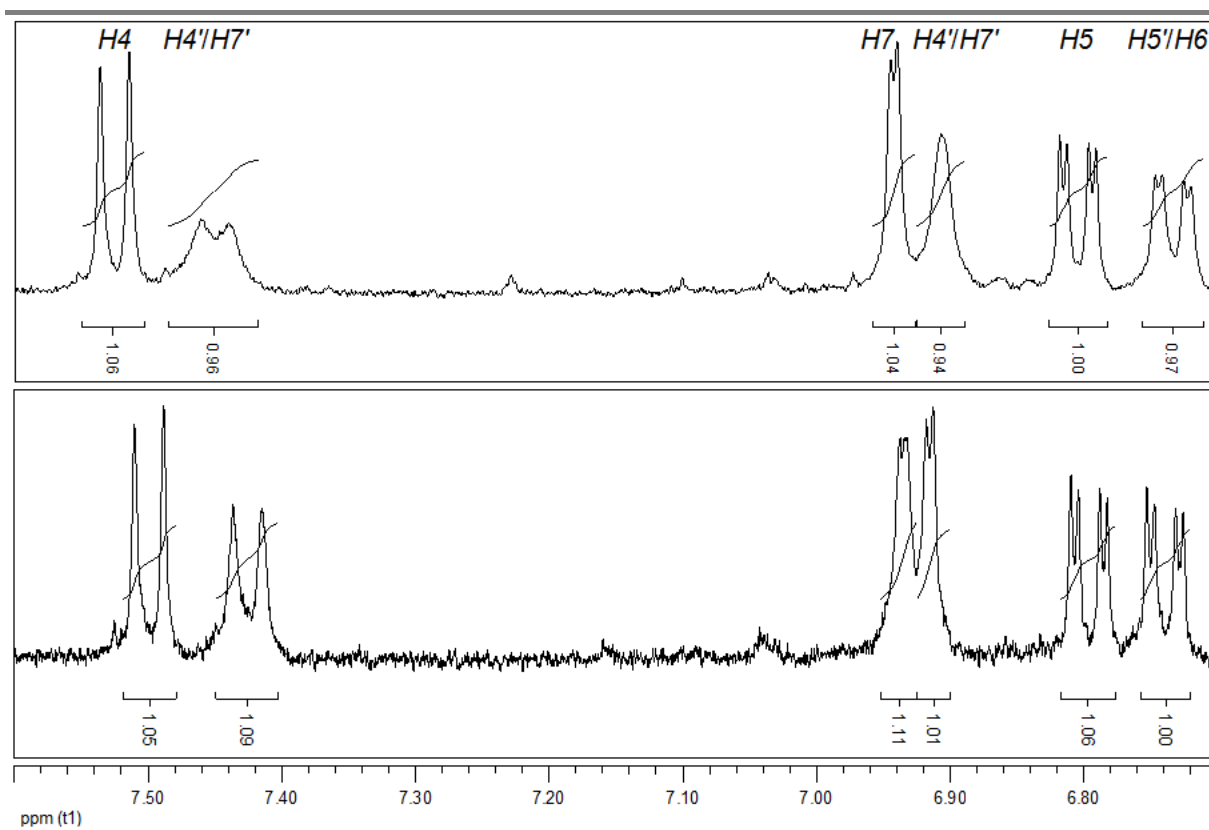


**Abb. 59:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Verbindung **75** in  $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$ ,  $20\text{ }^\circ\text{C}$ , Signale der Aromaten-H,  $0,0\text{-}15,0\text{ ppm}$ ; die Hydroxygruppe befindet sich in Position 5' oder 6'

**Tab. 11:** Chemische Verschiebungen der Protonen im Aromatenbereich der Verbindung **75** aus  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren in ppm (LM:  $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$ ) bei variablen Temperaturen

Temp. in $^\circ\text{C}$	$H5'/H6'$	$H5$	$H4'/H7'$	$H7$	$H4'/H7'$	$H4$
20	6,73	6,81	6,91	6,94	7,45	7,53
70	6,74	6,80	6,92	6,94	7,43	7,50

Die Zuordnung der Protonen zum *N*-alkylierten und nicht *N*-alkylierten Benzimidazolkörper ist ebenfalls möglich. Wie beschrieben, unterliegt der nicht *N*-alkylierte Benzimidazolkörper weiterhin der Tautomerie und ist wieder an den teilweise breiten Signalen der Protonen im Aromatenbereich erkennbar. Während das Proton mit *ortho+meta*-Kopplung ( $H5'/H6'$ ) bereits bei  $20\text{ }^\circ\text{C}$  ein Doppeldublett bei  $6,73\text{ ppm}$  zeigt, können das Proton mit *m*-Kopplung ( $H4'/H7'$ ) bei  $6,91\text{ ppm}$  und das Proton mit *o*-Kopplung ( $H4'/H7'$ ) bei  $7,45\text{ ppm}$  erst bei  $70\text{ }^\circ\text{C}$  mit entsprechender Signalaufspaltung dargestellt und die Kopplungskonstanten bestimmt werden.



**Abb. 60:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Verbindung **75** in  $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$ , oben:  $20\text{ }^\circ\text{C}$ , unten:  $70\text{ }^\circ\text{C}$ , Signale der Aromaten-H, 6,7-7,6 ppm

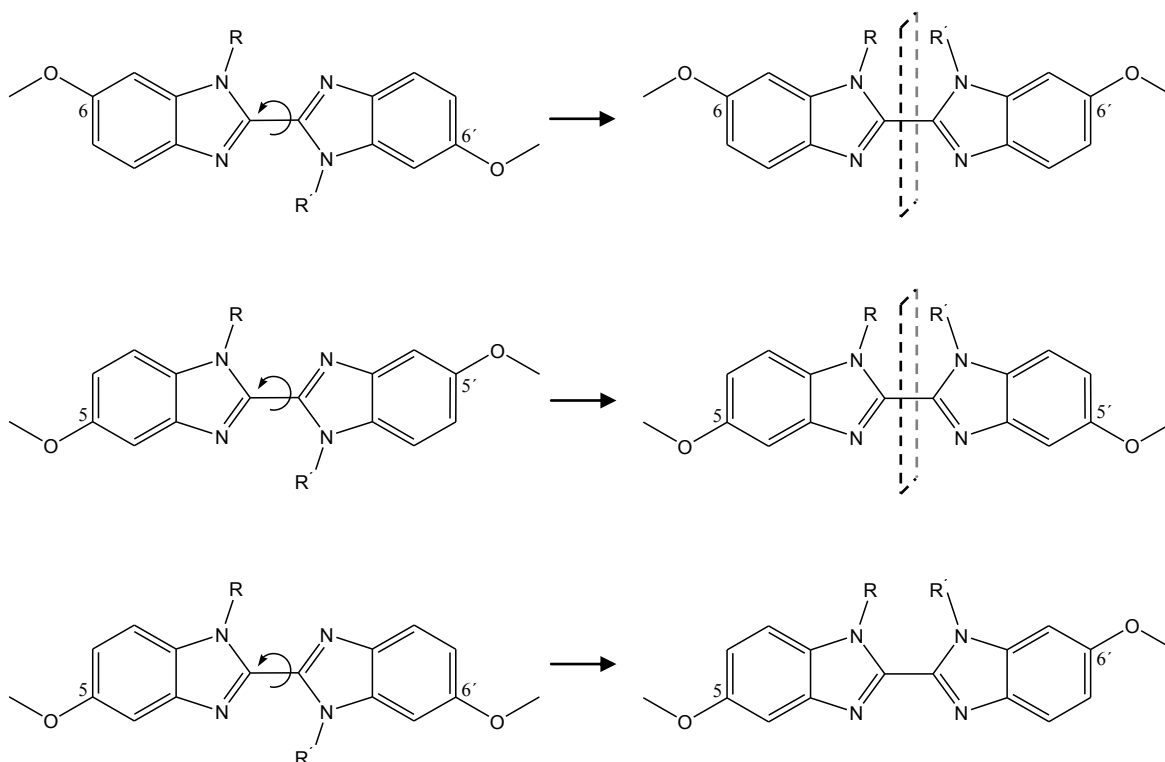
Die chemischen Verschiebungen der Protonen im Aromatenbereich des *N*-alkylierten Benzimidazolkörpers weisen auf eine Verbindung mit 6-Stellung der Hydroxygruppe hin (Tab. 11). Insbesondere die zur Hydroxygruppe *o*-ständigen Protonen *H5* (Doppeldublett bei 6,81 ppm) und *H7* (Dublett bei 6,94 ppm) zeigen die für die Verbindungen mit 6-Stellung charakteristischen chemischen Verschiebungen (Kap. 2.2.1.2). Die weitere Strukturaufklärung erfolgt mit Hilfe des Kern-Overhauser-Effekts (Kap. 2.2.1.3).

### 2.2.1.2 Protonenresonanzspektren der Stellungsisomere

Für die Emission und Intensität der Fluoreszenz sowie für die Interaktionen der in dieser Arbeit neu synthetisierten Verbindungen mit dem ER sind die Positionen der Hydroxygruppen am Bisbenzimidazolgrundgerüst von besonderer Bedeutung. Die Unterschiede der Stellungsisomere zeigen sich bereits deutlich in der Analytik mittels Kernresonanzspektroskopie. Dabei können verschiedene Effekte die Elektronendichte am Wasserstoffkern beeinflussen. Neben den Dihydroxyverbindungen sollen auch deren Vorstufen, die entsprechenden Dimethoxyverbindungen, betrachtet werden.

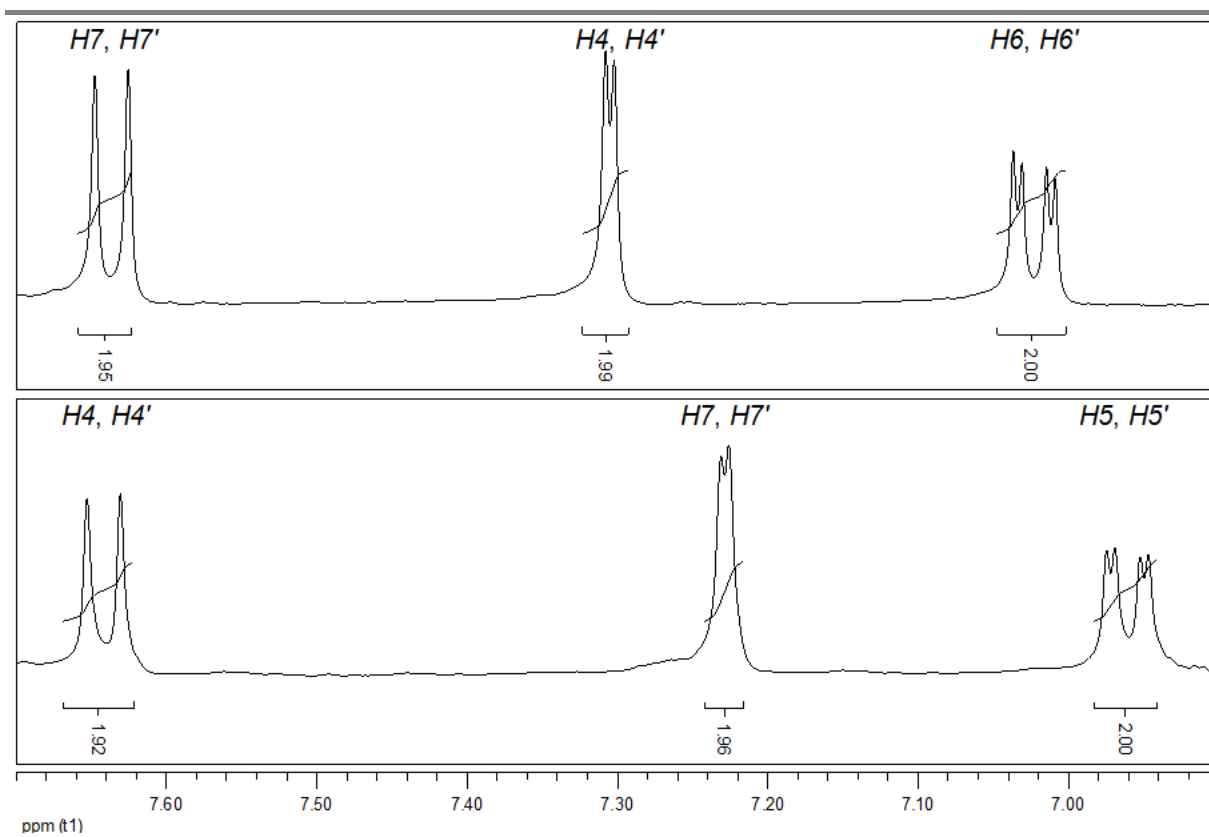
### Protonenresonanzspektren der Dimethoxyverbindungen

Befinden sich die Methoxygruppen in den Positionen 5,5' oder 6,6', besteht die Möglichkeit der Spiegelung an der in Abb. 61 eingezeichneten Ebene. In diesem Fall zeigen die Protonen beider Benzimidazolkörper dieselbe chemische Verschiebung, es handelt sich um chemisch und magnetisch äquivalente Protonen.



**Abb. 61:** BBIs mit den phenolischen Hydroxygruppen in den Positionen 5,5' oder 6,6' zeigen nach Drehung um die Achse der 2,2'-Verknüpfung die Möglichkeit der Spiegelung an der eingezeichneten Ebene (Verbindung **24**: R = R' = H)

Die Protonen im Aromatenbereich weisen charakteristische chemische Verschiebungen auf (Tab. 12). Die Protonen mit *ortho+meta*-Kopplung ( $H_6, H_6'$ ) und die Protonen mit *m*-Kopplung ( $H_4, H_4'$ ) der Verbindung **26** (5,5'-Stellung) zeigen gegenüber den Protonen mit *ortho+meta*-Kopplung ( $H_5, H_5'$ ) und Protonen mit *m*-Kopplung ( $H_7, H_7'$ ) der Verbindung **31** (6,6'-Stellung) eine Tieffeldverschiebung. In Abb. 62 sind die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der diethylierten Verbindungen als jeweiliger Vertreter der beiden Stellungen exemplarisch dargestellt. Das Integral der Protonen wird jeweils mit zwei beziffert, da es sich bei den Stellungsisomeren um symmetrische Moleküle aus zwei identischen Benzimidazolkörpern handelt.



**Abb. 62:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektren in [D<sub>6</sub>]-DMSO, Signale der Aromaten-H, 6,90-7,70 ppm, oben: Verbindung **26** (5,5'-Stellung), unten: Verbindung **31** (6,6'-Stellung)

**Tab. 12:** Chemische Verschiebungen relevanter Protonen der 5,5'- und 6,6'-Stellungsisomere der Dimethoxyverbindungen aus <sup>1</sup>H-NMR-Spektren in ppm (LM: [D<sub>6</sub>]-DMSO)

Verbindung	R = R'	5,5'-OCH <sub>3</sub>	H6, H6'	H4, H4'	H7, H7'
<b>25</b>	CH <sub>3</sub>	3,83	7,03	7,32	7,61
<b>26</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3,84	7,02	7,31	7,64
<b>27</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3,84	7,01	7,29	7,64
<b>28</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3,83	6,98	7,32	7,80
<b>29</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	3,85	7,09	7,38	7,68
Verbindung	R = R'	6,6'-OCH <sub>3</sub>	H5, H5'	H7, H7'	H4, H4'
<b>30</b>	CH <sub>3</sub>	3,88	6,94	7,23	7,67
<b>31</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3,86	6,96	7,23	7,64
<b>32</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3,87	6,92	7,25	7,65
<b>33</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3,84	6,88	7,17	7,57
<b>34</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	3,87	6,99	7,31	7,73

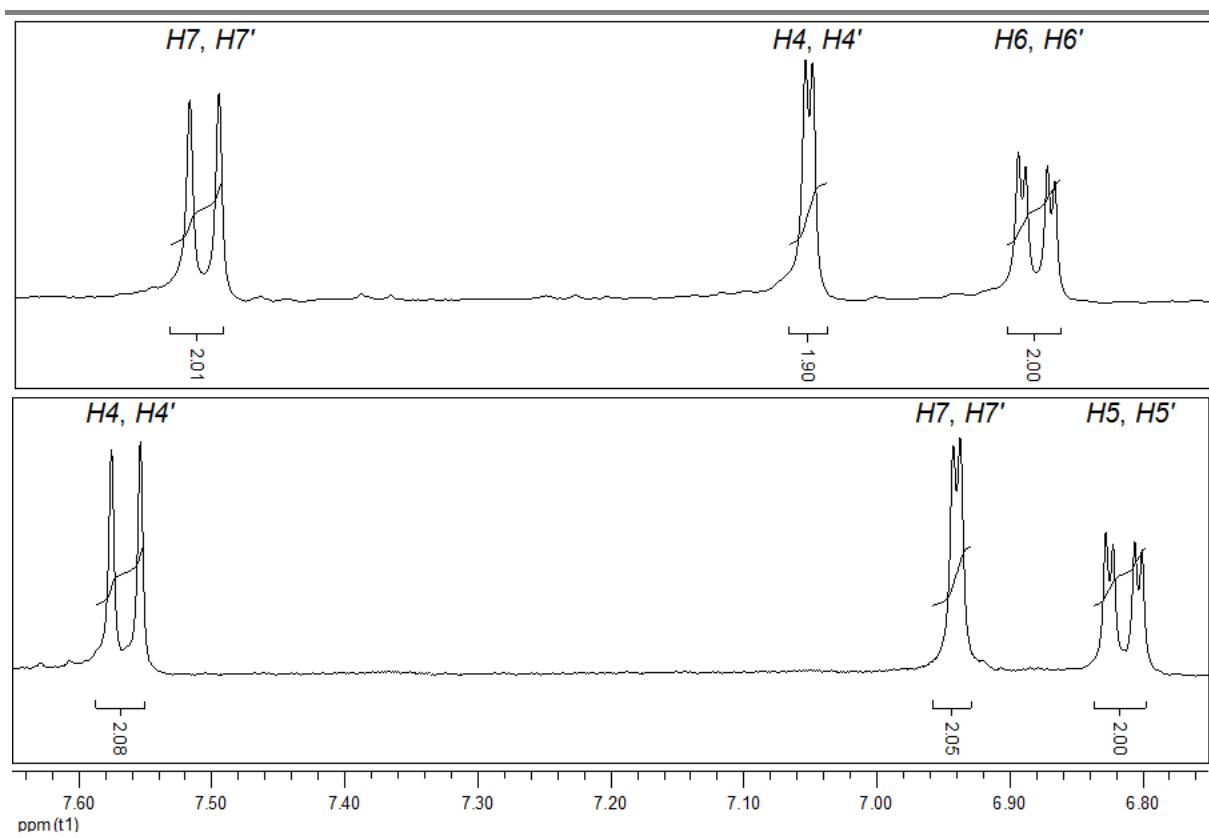
### Protonenresonanzspektren der Dihydroxyverbindungen

Nach erfolgter Etherspaltung liegen die gewünschten Endstufen, die Dihydroxyverbindungen, vor. Wie bei den Dimethoxyverbindungen befinden sich die Hydroxygruppen in den Positionen 5,5' oder 6,6'. Auch hier handelt es sich um symmetrische Moleküle. Die entsprechenden Protonen beider identischen Benzimidazolkörper sind chemisch und magnetisch äquivalent, so dass sie dieselbe chemische Verschiebung zeigen.

**Tab. 13:** Chemische Verschiebungen relevanter Protonen der 5,5'- und 6,6'-Stellungsisomere der Dihydroxyverbindungen aus  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren in ppm (LM:  $[\text{D}_6]$ -DMSO)

Verbindung	R = R'	H6, H6'	H4, H4'	H7, H7'	5,5'-OH
55	CH <sub>3</sub>	6,91	7,08	7,49	9,31
56	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	6,89	7,06	7,51	9,24
57	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	6,90	7,07	7,54	9,35
58	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	6,88	7,07	7,70	9,37
59	CH <sub>2</sub> C≡CH	6,95	7,11	7,56	9,38
Verbindung	R = R'	H5, H5'	H7, H7'	H4, H4'	6,6'-OH
60	CH <sub>3</sub>	6,81	6,91	7,57	9,31
61	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	6,82	6,94	7,57	9,60
62	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	6,80	6,94	7,55	9,50
63	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	6,81	7,11	7,57	9,51
64	CH <sub>2</sub> C≡CH	6,86	7,02	7,62	9,69

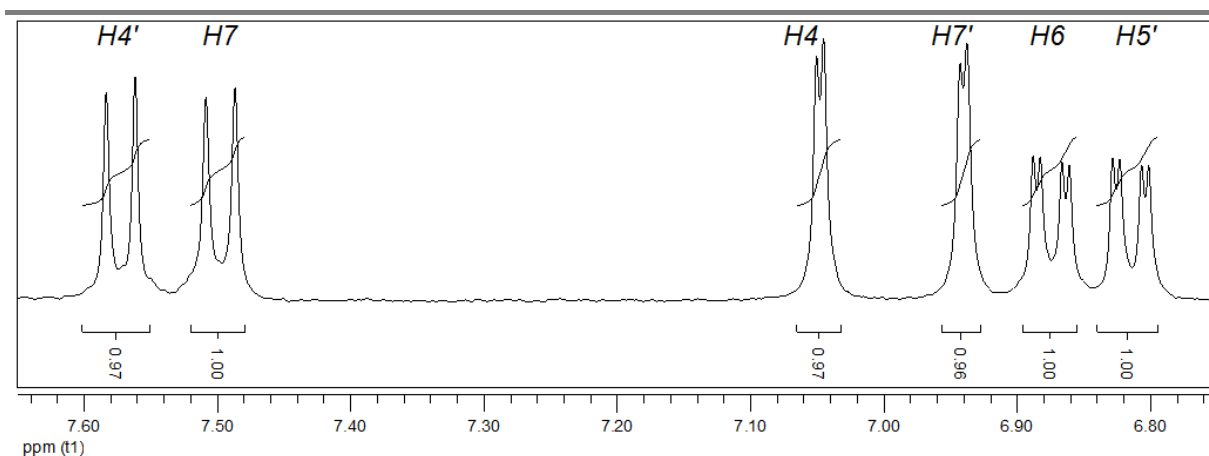
Die Protonen der Dihydroxyverbindungen weisen ebenso wie die der Dimethoxyverbindungen charakteristische chemische Verschiebungen auf (Tab. 13). Die Protonen mit *ortho+meta*-Kopplung (H6, H6') und die Protonen mit *m*-Kopplung (H4, H4') der Verbindung **56** (5,5'-Stellung) zeigen gegenüber den Protonen mit *ortho+meta*-Kopplung (H5, H5') und Protonen mit *m*-Kopplung (H7, H7') der Verbindung **61** (6,6'-Stellung) eine Tiefeldverschiebung. Dagegen zeigen die Protonen mit *o*-Kopplung (H7, H7') der Verbindung **56** (5,5'-Stellung) gegenüber den Protonen mit *o*-Kopplung (H4, H4') der Verbindung **61** (6,6'-Stellung) eine Hochfeldverschiebung. Die Hydroxygruppen der Verbindung **56** (5,5'-Stellung) weisen gegenüber denen der Verbindung **61** (6,6'-Stellung) eine Hochfeldverschiebung auf. In Abb. 63 sind die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der diethylierten Verbindungen als jeweiliger Vertreter der beiden Stellungen exemplarisch dargestellt. Das Integral der Protonen wird jeweils mit zwei beziffert.



**Abb. 63:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren in  $[\text{D}_6]$ -DMSO, Signale der Aromaten-H, 6,75-7,65 ppm, oben: Verbindung **56** (5,5'-Stellung), unten: Verbindung **61** (6,6'-Stellung)

#### Protonenresonanzspektrum der Verbindung **77** (5,6'-Stellung)

Die Kenntnisse der Signalzuordnung in den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der symmetrischen BBIs kann für die Strukturuntersuchungen der aus dem Isomerengemisch isolierten Verbindungen genutzt werden.



**Abb. 64:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Verbindung **77** (5,6'-Stellung) in  $[\text{D}_6]$ -DMSO, Signale der Aromaten-H, 6,75-7,65 ppm

**Tab. 14:** Chemische Verschiebungen relevanter Protonen der 5,5'-, 5,6'- und 6,6'-Stellungsisomere der 1,1'-diethylierten Dihydroxyverbindungen aus  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren in ppm, Auflistung der relevanten Protonen nach steigender Tieffeldverschiebung (LM: [D6]-DMSO)

Verbindung	<i>H6, H6'</i>		<i>H4, H4'</i>		<i>H7, H7'</i>		<i>5,5'-OH</i>	
<b>56</b>	6,89		7,06		7,51		9,24	
Verbindung	<i>H5'</i>	<i>H6</i>	<i>H7'</i>	<i>H4</i>	<i>H7</i>	<i>H4'</i>	<i>5-OH</i>	<i>6'-OH</i>
<b>77</b>	6,82	6,88	6,94	7,05	7,50	7,57	9,24	9,56
Verbindung	<i>H5, H5'</i>		<i>H7, H7'</i>		<i>H4, H4'</i>		<i>6,6'-OH</i>	
<b>61</b>	6,82		6,94		7,57		9,60	

Die mit Hilfe der MPLC (Kap. 2.1.11) isolierte Verbindung **77** (5,6'-Stellung) zeigt Verschiebungen der Signale der Protonen im Aromatenbereich, die in Tab. 14 im Vergleich zur Verbindung **56** (5,5'-Stellung) und Verbindung **61** (6,6'-Stellung) dargestellt werden. Die Darstellung ist so gewählt, dass die Protonen der Verbindung **77** (5,6'-Stellung) jeweils denen der Verbindung **56** (5,5'-Stellung) beziehungsweise Verbindung **61** (6,6'-Stellung) gegenüber gestellt werden können. Das Integral der einzelnen Protonen im Aromatenbereich ist mit eins beziffert, da Verbindung **77** kein symmetrisches Molekül ist und damit die Protonen nicht äquivalent sind (Abb. 64).

### 2.2.1.3 Kern-Overhauser-Effekt und zweidimensionale Protonenkorrelation

Die Daten der Protonenresonanzspektren der symmetrischen BBIs bilden die Grundlage für die Strukturzuordnung der isolierten Verbindungen aus dem Isomerengemisch.

Im Fall der drei möglichen Stellungen der beiden Hydroxygruppen bei den 1,1'-disubstituierten BBIs sind lediglich die symmetrischen Verbindungen mit 5,5'- und 6,6'-Stellung, aber nicht die Verbindungen mit 5,6'-Stellung zugänglich (Kap. 2.1.6.1). Die Verbindungen mit 5,6'-Stellung der phenolischen Hydroxygruppen können wie in Kap. 2.1.6.2 dargestellt durch *N*-Alkylierung der Verbindung **24** und anschließender Isolierung aus dem entstandenen Stellungsisomerengemisch erhalten werden. Die Stofftrennung wird wie beschrieben mit Hilfe der MPLC durchgeführt (Kap. 2.1.11). Die Kernresonanzspektroskopie, insbesondere der Kern-Overhauser-Effekt, belegt das Ergebnis.

Auch im Fall der sterisch hinderlichen Reste beispielsweise dem 2-Methylpropanrest sind die BBIs nur über die Synthese aus Verbindung **24** zugänglich. Dabei werden sowohl die mono- als auch die disubstituierten Verbindungen erhalten (Kap. 2.1.6.2).



Für die Strukturzuordnung der isolierten Verbindungen werden der Kern-Overhauser-Effekt und die zweidimensionale Protonenkorrelationen hinzugezogen. Im Folgenden sollen Spektren ausgewählter Verbindungen beschrieben werden.

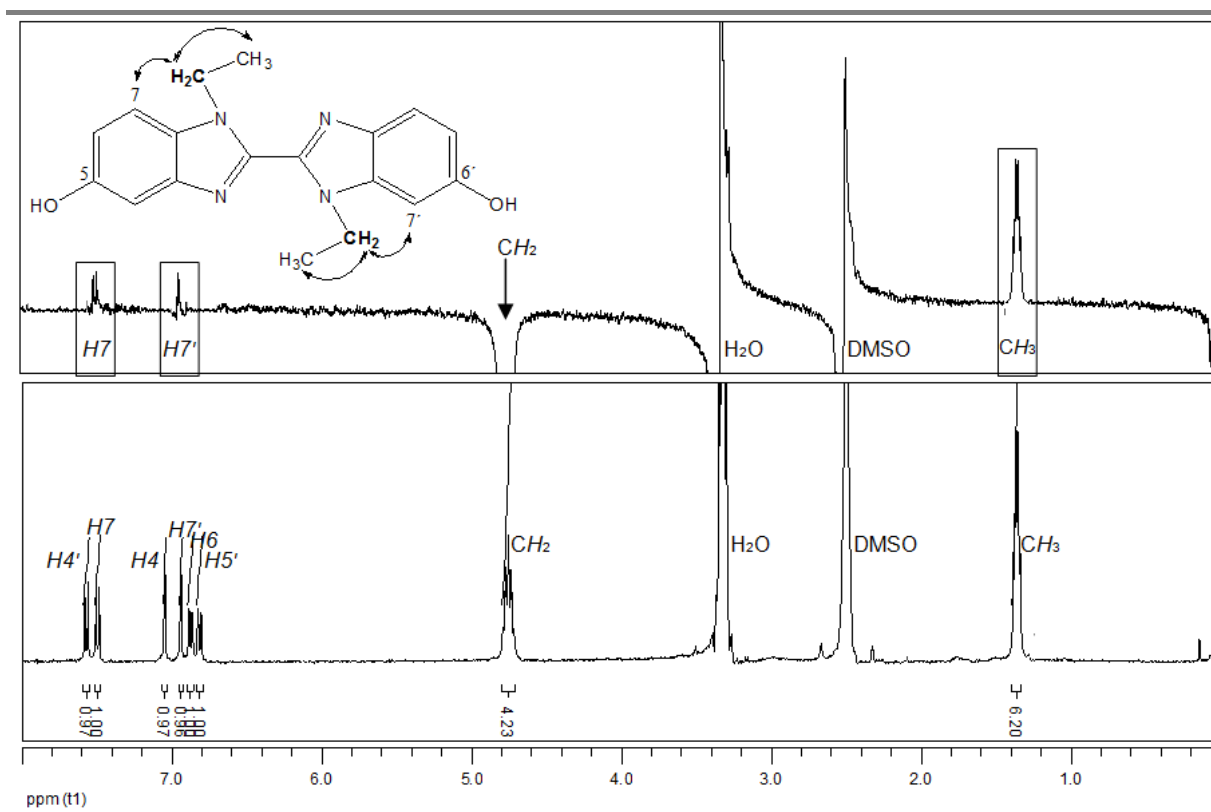
### Kern-Overhauser-Effekt

Der Kern-Overhauser-Effekt (NOE, Nuclear Overhauser Effect) ist in der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie für die Strukturaufklärung von Bedeutung. Wenn die Resonanz eines Protons durch Einstrahlen einer Anregungsfrequenz gesättigt wird, nimmt die Signalintensität eines räumlich sehr nahe gelegenen Protons ( $< 5,5 \text{ \AA}$ ) zu. Die Intensitätszunahme ist unterschiedlich stark ausgeprägt; in der Literatur werden bei homonuklearen Systemen Werte bis zu 45 % beschrieben <sup>[85, 86]</sup>.

Für solche Entkopplungsexperimente wird zuerst das normale  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum und dann das Spektrum mit NOE gemessen. Das Spektrum mit NOE wird durch Einstrahlen einer Anregungsfrequenz ( $\nu_0$ ) erhalten. Anschließend werden beide Spektren voneinander subtrahiert, d. h. ein NOE-Differenzspektrum gebildet. In diesem NOE-Differenzspektrum zeigen sich nur dort Signale, wo zwischen dem Spektrum ohne und dem mit NOE Intensitätsunterschiede vorhanden sind <sup>[84]</sup>. Das mit der Anregungsfrequenz gesättigte Proton zeigt ein negatives Signal. Das Proton, bei dem der NOE registriert wird, zeigt ein positives Signal. Somit können mit Hilfe des NOE Aussagen zu den benachbarten Protonen und damit Aussagen zur Konstitution der Stellungsisomere getroffen werden. Die Aufnahme der Spektren erfolgt in [D6]-DMSO; die Betriebsfrequenz beträgt 400,13 MHz.

### NOE-Differenzspektrum der Verbindung 77

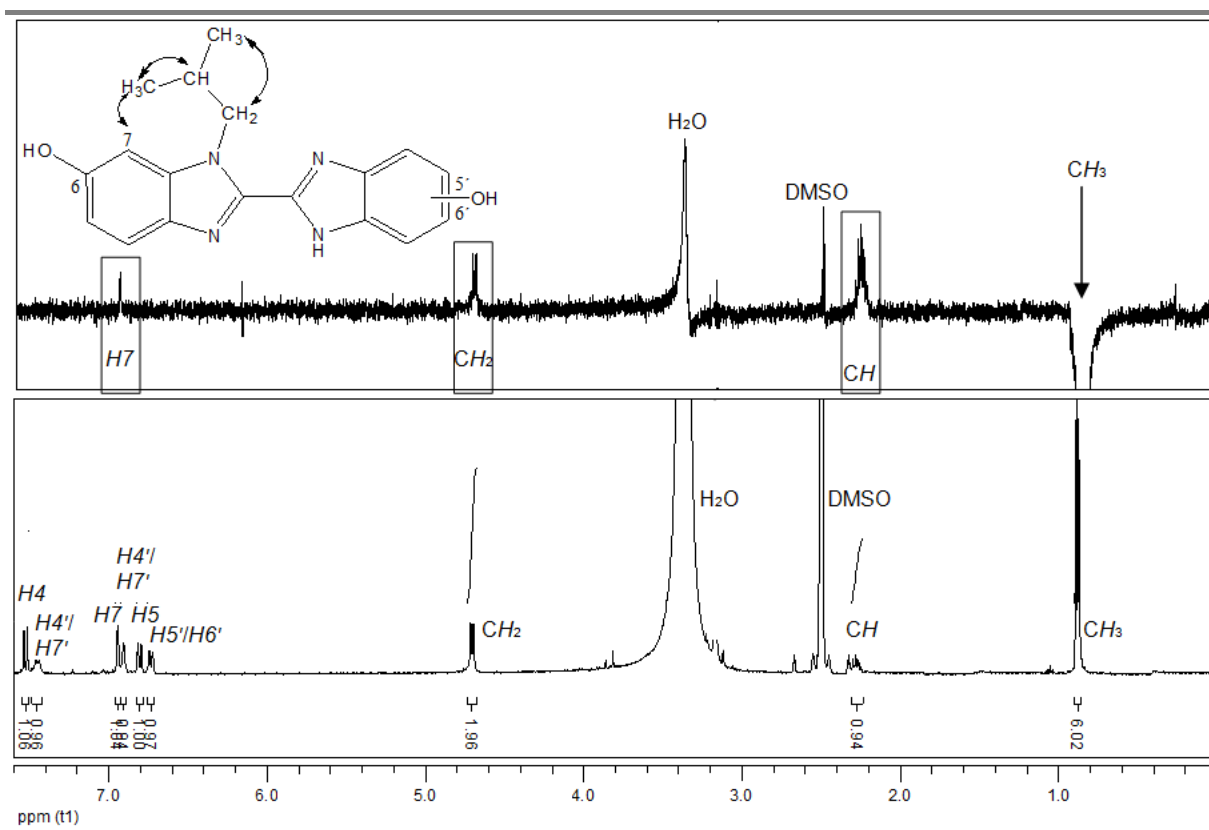
Wird die Resonanz der Protonen der beiden am Stickstoff gebundenen Methylengruppen ( $\text{CH}_2$ ) mit der Frequenz  $\nu_0 = 1905 \text{ Hz}$  (4,76 ppm) (negatives Signal) gesättigt, zeigen die Protonen der Methylgruppen ( $\text{CH}_3$ ) der beiden Ethylreste bei 544 Hz (1,36 ppm) wie erwartet ein positives Signal. Von besonderem Interesse sind die in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Methylengruppen gelegenen Protonen im Aromatenbereich. Dort zeigen zwei Protonen je ein positives Signal: Zum einen zeigt das Signal des Protons mit *m*-Kopplung ( $H7'$ ) bei 2777 Hz (6,94 ppm) ein Dublett mit der Kopplungskonstanten  $^4J = 1,97 \text{ Hz}$  und zum anderen zeigt das Signal des Protons mit *o*-Kopplung ( $H7$ ) bei 3001 Hz (7,50 ppm) ein Dublett mit  $^3J = 8,73 \text{ Hz}$ . Die Zuordnung der Protonen im Aromatenbereich ist in Kap. 2.2.1.2 in Tab. 14 bereits dargestellt. Abb. 65 zeigt sowohl das NOE-Differenzspektrum als auch den gleichen Ausschnitt des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums. Das mittels NOE bestätigte Kopplungsmuster belegt die Zuordnung der Protonen und damit die 5,6'-Stellung der Hydroxygruppen der Verbindung 77.



**Abb. 65:** oben: NOE-Differenzspektrum der Verbindung **77** in [D<sub>6</sub>]-DMSO (300 K),  $\nu_0 = 1905$  Hz; unten: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der Verbindung **77** in [D<sub>6</sub>]-DMSO; 0-8 ppm

### NOE-Differenzspektrum der Verbindung **75**

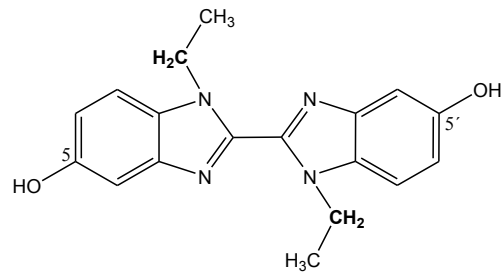
Kernspinresonanzspektren mit Kern-Overhauser-Effekt beweisen im Fall der Verbindung **75** die 6'-Stellung der Hydroxygruppe des *N*-alkylierten Benzimidazolkörpers. Wenn die Resonanz der Protonen der beiden Methylgruppen (CH<sub>3</sub>) des 2-Methylpropanrestes mit der Frequenz  $\nu_0 = 352$  Hz (0,88 ppm) (negatives Signal) gesättigt wird, zeigen das Methin-Proton (CH) bei 913 Hz (2,28 ppm) und die Protonen der am Stickstoff gebundenen Methylengruppe (CH<sub>2</sub>) des Alkylrestes bei 1883 Hz (4,71 ppm) wie erwartet je ein positives Signal (Abb. 66). Im Bereich der Protonen im Aromatenbereich zeigt lediglich das Dublett des Protons mit *m*-Kopplung (H7) bei 2778 Hz (6,94 ppm) mit der Kopplungskonstanten  $^4J = 1,97$  Hz ein positives Signal. Die Zuordnung der Protonen ist bereits in Kap. 2.2.1.1 dargestellt. Das mittels NOE bestätigte Kopplungsmuster beweist die 6-Stellung der Hydroxygruppe.



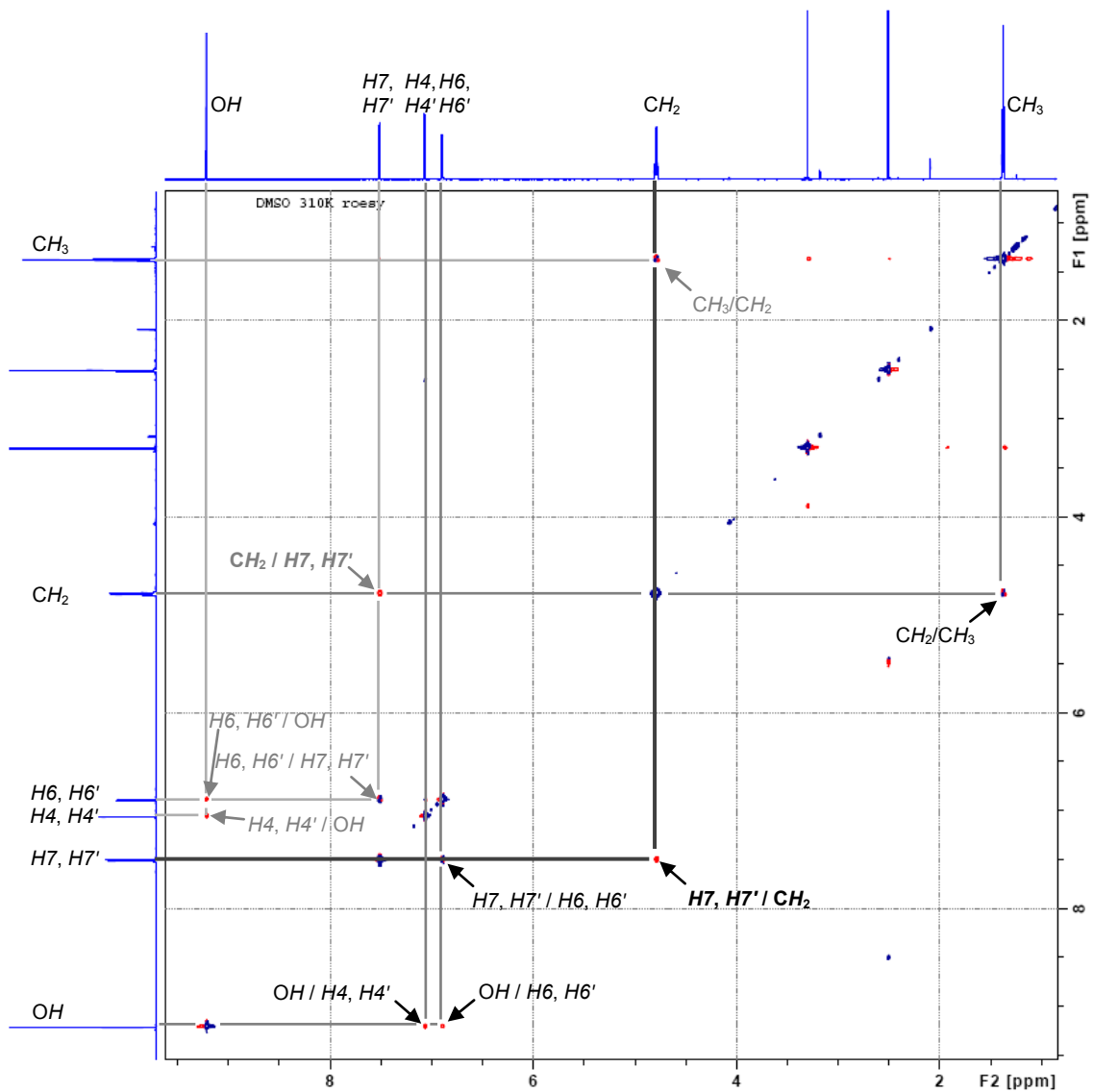
**Abb. 66:** oben: NOE-Differenzspektrum der Verbindung **75** (die Hydroxygruppe befindet sich in Position 5' oder 6') in [D<sub>6</sub>]-DMSO (300 K),  $\nu_0 = 352$  Hz; unten: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der Verbindung **75** in [D<sub>6</sub>]-DMSO; 0,0-7,6 ppm

### Zweidimensionale Protonenkorrelation der Stellungsisomere

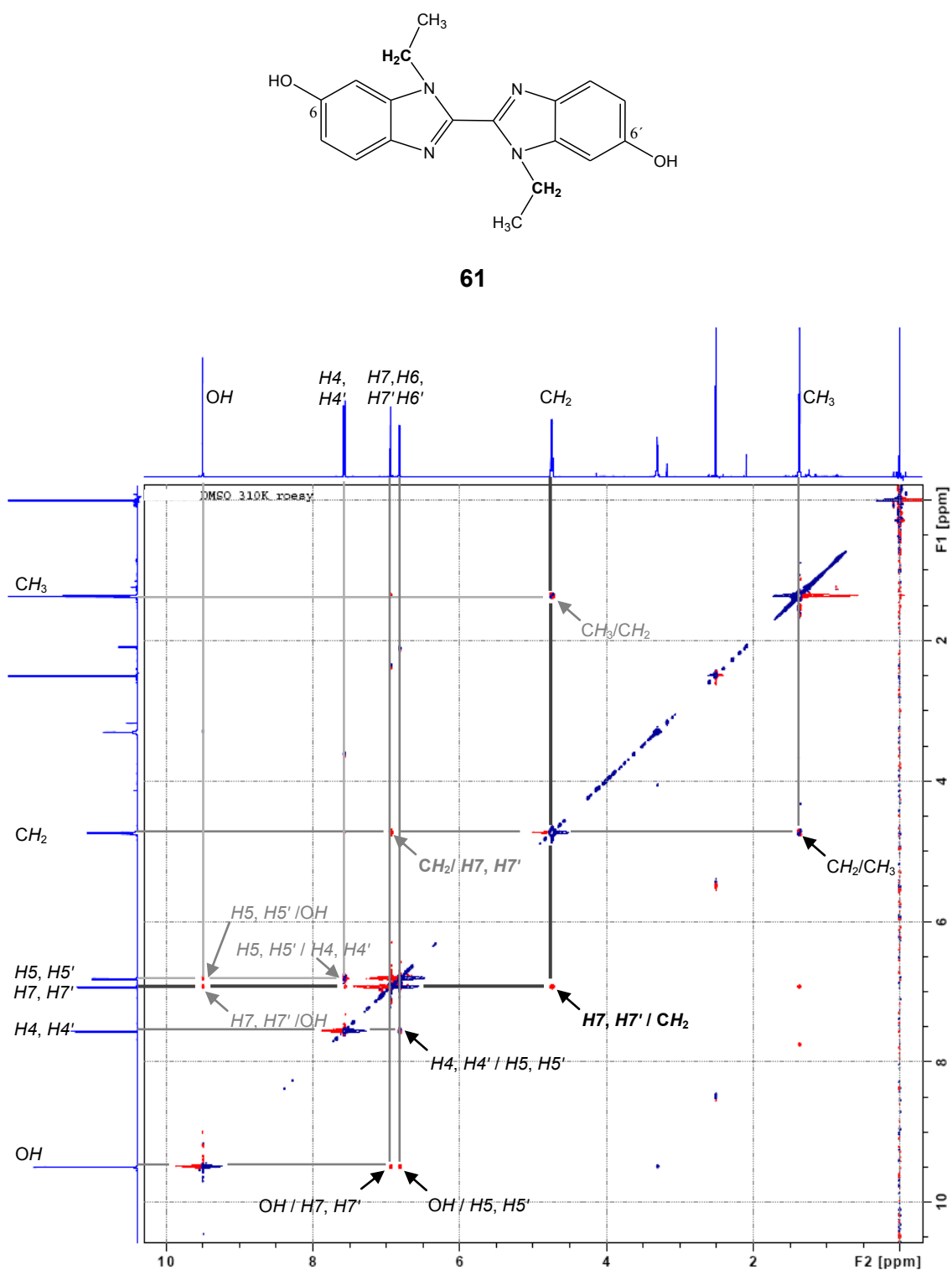
Zum weiteren Nachweis der Stellungen der Hydroxygruppen wird mittels zweidimensionaler Protonenkorrelation, im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe eines ROESY-Experiments (Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy), untersucht, welche Kerne sich in enger räumlicher Nachbarschaft befinden. Hierbei wird durch Relaxation im rotierenden Koordinatensystem ein NOE hervorgerufen. Diagonalsignale verbinden die gleichen Signale der beiden <sup>1</sup>H-NMR-Spektren und stellen die Wechselwirkungen zwischen jeweils gleichen Protonen dar. Den außerhalb der Diagonalen in Wechselwirkung stehenden Protonen können Kreuzsignale zugeordnet werden, die durch die zweidimensionale Präsentation der ROESY-NMR-Spektren zweimal sichtbar sind. Die Darstellung der so erhaltenen Spektren erfolgt am Beispiel der diethylierten Verbindungen (Verbindung **56** in Abb. 67 und Verbindung **61** in Abb. 68).



56



**Abb. 67:** 2D-ROESY-NMR-Spektrum der Verbindung **56** (5,5'-Stellung) in [D<sub>6</sub>]-DMSO, 310 K; Die Kreuzsignale sind mit Hilfslinien verbunden und mit Pfeilen gekennzeichnet. In der horizontalen Ebene sind sie in schwarz und in der vertikalen in grau beschriftet.



**Abb. 68:** 2D-ROESY-NMR-Spektrum der Verbindung **61** (6,6'-Stellung) in  $[D_6]$ -DMSO, 310 K; Die Kreuzsignale sind mit Hilfslinien verbunden und mit Pfeilen gekennzeichnet. In der horizontalen Ebene sind sie in schwarz und in der vertikalen in grau beschriftet.

Wie erwartet zeigen die Protonen der Methylgruppen ( $CH_3$ ) mit den Protonen der Methylen-  
gruppen ( $CH_2$ ) Wechselwirkungen ( $CH_3/CH_2$ ), da es sich um vicinale Protonen handelt. Die  
zur jeweiligen Hydroxygruppe benachbarten Protonen im Aromatenbereich (Aromaten-H)  
zeigen Wechselwirkungen mit den Protonen der entsprechenden Hydroxygruppe ( $OH$ ). Es  
handelt sich hierbei um die Aromaten-H mit *ortho+meta*-Kopplung und mit *m*-Kopplung. Von  
besonderem Interesse sind die sich in unmittelbarer Nachbarschaft zur Methylengruppe  
gelegenen Protonen im Aromatenbereich. Anhand des Kopplungsmusters ist der  
Unterschied zwischen den Verbindungen mit 5,5'- und 6,6'-Stellung der OH-Gruppen  
eindeutig sichtbar: Im Fall der Verbindung **56** (5,5'-Stellung) treten die Aromaten-H mit  
*o*-Kopplung ( $H7$ ,  $H7'$ ) und im Fall der Verbindung **61** (6,6'-Stellung) die Aromaten-H mit  
*m*-Kopplung ( $H7$ ,  $H7'$ ) mit den Methylengruppen in Wechselwirkung (in Abb. 67 und Abb. 68  
jeweils fett dargestellt).

### 2.2.2 UV-spektroskopische Untersuchungen

Zur Charakterisierung der neu synthetisierten BBIs werden UV-spektroskopische Unter-  
suchungen durchgeführt. Bei der UV-Spektroskopie handelt es sich um eine Elektronen-  
spektroskopie, bei der Valenzelektronen angeregt und Absorptionen ultravioletter Strahlung  
untersucht werden. Die Lage des Absorptionsmaximums wird maßgeblich durch die Struktur  
des Moleküls und durch die Art des Lösungsmittels bestimmt. Des Weiteren ist das  
Absorptionsmaximum ( $A_{max}$ ) konjugierter Systeme umso mehr zu höheren Wellenlängen  
verschoben (bathochrom) und umso intensiver (hyperchrom), je ausgedehnter das  
konjugierte System (Chromophor) ist<sup>[84]</sup>. Chromophore sind Gruppierungen, die Strahlung  
absorbieren und Elektronenübergänge ermöglichen<sup>[61]</sup>.

Die Bestimmung der molaren Absorptionskoeffizienten  $\epsilon_\lambda$  erfolgt nach dem Lambert-  
Beerschen Gesetz:

$$A = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot b$$

A = Absorption

$\epsilon_\lambda$  = molarer Absorptionskoeffizient (in  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) (bei einer bestimmten Wellenlänge)

c = molare Konzentration (in  $mol \cdot L^{-1}$ )

b = Schichtdicke der Küvette

Aus den Absorptionsmaxima ( $A_{max}$ ) können bei bekannter Konzentration ( $c$ ) und Schichtdicke der Küvette ( $b = 1 \text{ cm}$ ) die  $\epsilon_{\lambda}$ -Werte berechnet werden:

$$\epsilon_{\lambda} = \frac{A_{max}}{c \cdot b}$$

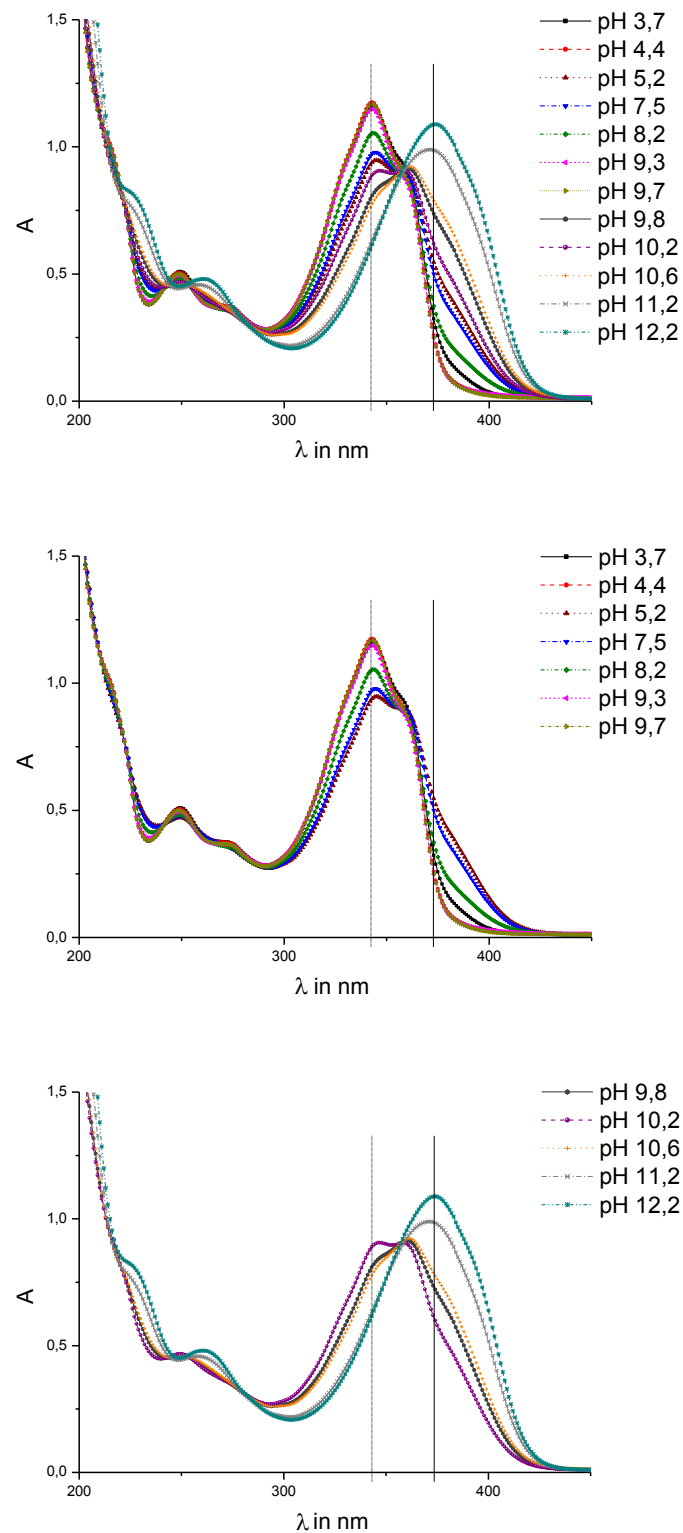
Die in der Arbeit dargestellten Absorptionsspektren sind Diagramme, die auf der Abszisse die Wellenlänge ( $\lambda$ ) des eingestrahlt Lichtes und auf der Ordinate die Absorption ( $A$ ) zeigen.  $A$  ist der durch die Probe absorbierte Anteil der eingestrahlt Lichtintensität. Die erhaltenen Kurven stellen die Absorptionskurven dar.

Die Absorptionsspektren werden in einem Wellenlängenbereich von 200/ 240 nm - 450 nm aufgenommen. Die Konzentrationen der Proben werden jeweils so gewählt, dass die Absorption in einem Bereich zwischen 0,2 und 0,8 liegt. Dieser Bereich wird gewählt, damit das Lambert-Beersche Gesetz anwendbar ist.

### 2.2.2.1 pH-abhängige Absorptionsspektroskopie

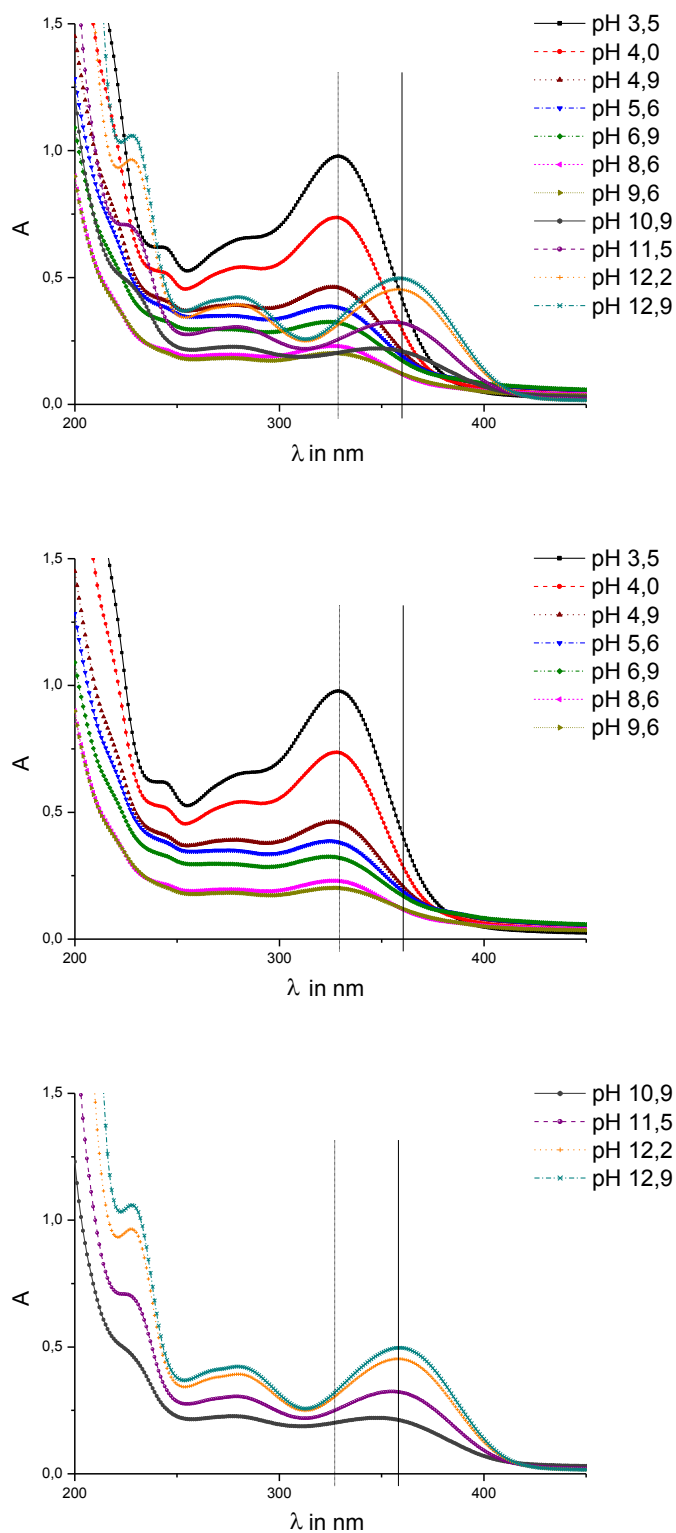
Sowohl für die spektroskopischen Untersuchungen als auch für den Einsatz in der Zelltestung ist das Verhalten der Verbindungen in unterschiedlichen Lösungsmitteln, aber auch im Wässrigen bei unterschiedlichen pH-Werten von Interesse. Um die Fähigkeiten der Verbindungen, Protonen aufzunehmen oder abzugeben, zu untersuchen, werden Absorptionsspektren ausgewählter Verbindungen bei verschiedenen pH-Werten aufgenommen (Abb. 69 - Abb. 71). Als Lösungsmittel wird Wasser gewählt. Die Substanzen werden zu Beginn in 0,1 M HCl gelöst. Der pH-Wert wird schrittweise durch NaOH-Zugabe erhöht. Nach Erreichen des höchsten pH-Wertes werden die Lösungen mittels HCl wieder auf den ursprünglich sauren pH-Wert eingestellt und erneut UV-spektroskopisch vermessen. Die Lösungen zeigen wieder das gleiche Absorptionsspektrum wie bei der ersten Messung.

Für die Untersuchungen der pH-abhängigen Absorptionsspektroskopie werden Verbindung **54** sowie die dimethylierten BBIs Verbindungen **55** und **60** eingesetzt. Aufgrund der geringen Ausbeuten stehen von den diethylierten BBIs Verbindungen **56** und **61** keine ausreichenden Substanzmengen für diesen Versuch zur Verfügung.

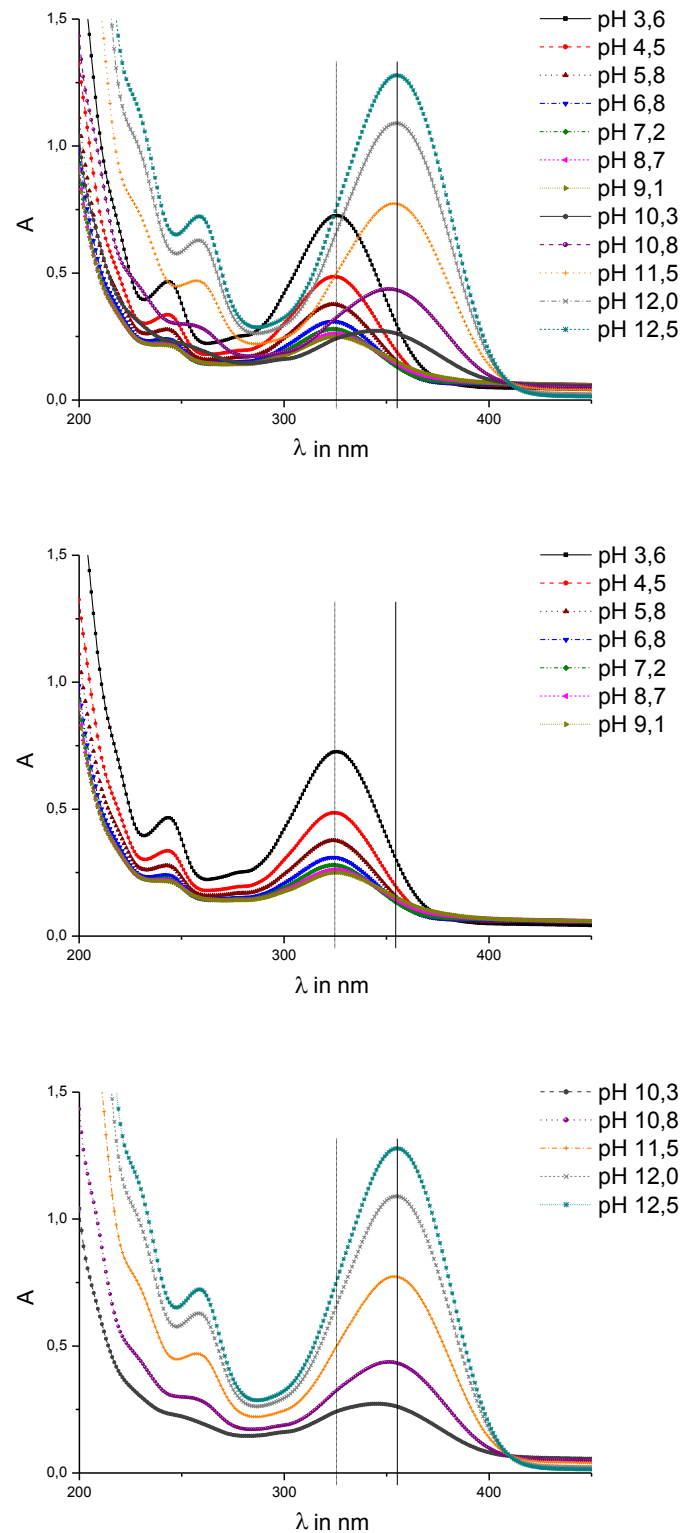


**Abb. 69:** Absorptionskurven der Verbindung **54** (Tautomer), in  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $10^{-4}$  M;  
 Darstellung der Spektralkurven:  
 oben: Kurven aller pH-Werte,  
 Mitte: Kurven bei pH-Werten zwischen 3,7 und 9,7,  
 unten: Kurven bei pH-Werten zwischen 9,8 und 12,2;  
 gestrichelte Linie: Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge  $\lambda_{\max} = 343$  nm,  
 durchgehende Linie: Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge  $\lambda_{\max} = 374$  nm





**Abb. 70:** Absorptionskurven der Verbindung **55** (5,5'-Stellung), in  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$  M; Darstellung der Spektralkurven:  
oben: Kurven aller pH-Werte,  
Mitte: Kurven bei pH-Werten zwischen 3,5 und 9,6,  
unten: Kurven bei pH-Werten zwischen 10,9 und 12,9;  
gestrichelte Linie: Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge  $\lambda_{\max} = 329$  nm,  
durchgehende Linie: Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge  $\lambda_{\max} = 359$  nm

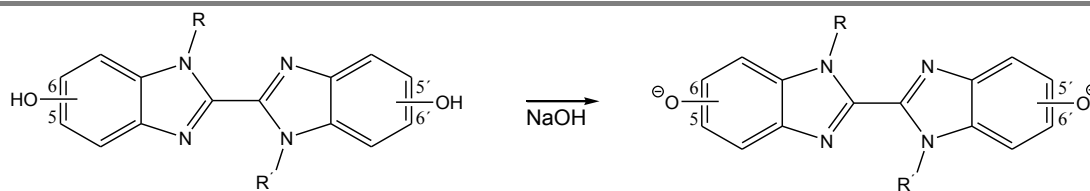


**Abb. 71:** Absorptionskurven der Verbindung **60** (6,6'-Stellung), in H<sub>2</sub>O, 10<sup>-4</sup> M;  
 Darstellung der Spektralkurven:  
 oben: Kurven aller pH-Werte,  
 Mitte: Kurven bei pH-Werten zwischen 3,6 und 9,1,  
 unten: Kurven bei pH-Werten zwischen 10,3 und 12,5;  
 gestrichelte Linie: Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge λ<sub>max</sub> = 326 nm,  
 durchgehende Linie: Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge λ<sub>max</sub> = 355 nm

Die Verbindungen zeigen bei verschiedenen pH-Werten unterschiedliche Absorptionsspektren. Allen drei Verbindungen gemeinsam ist eine bathochrome Bandenverschiebung beim Wechsel zu deutlich höheren pH-Werten. Verbindung **54** zeigt bei pH-Werten zwischen 3,7 und 9,7 ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge ( $\lambda_{\max}$ ) von 343 nm; bei pH-Werten zwischen 11,2 und 12,2 zeigt sich  $A_{\max}$  bathochrom verschoben bei  $\lambda_{\max} = 374$  nm (Abb. 69). Bei Verbindung **55** (5,5'-Stellung) verschiebt sich  $A_{\max}$  ebenso um 30 nm von  $\lambda_{\max} = 329$  nm bei pH-Werten zwischen 3,5 und 9,6 zu höheren Wellenlängen auf  $\lambda_{\max} = 359$  nm bei pH-Werten zwischen 10,9 und 12,9 (Abb. 70). Auch bei Verbindung **60** (6,6'-Stellung) erfährt  $\lambda_{\max}$  einen bathochromen Effekt beim Wechsel zu deutlich höheren pH-Werten von 326 nm auf 355 nm (Abb. 71).

Bei einem pH-Wert  $\sim 7$ , was in etwa den physiologischen Bedingungen entspricht, zeigen insbesondere die dialkylierten Verbindungen bei etwa gleicher Wellenlänge deutlich kleinere Absorptionswerte als unter sauren oder stark alkalischen Bedingungen (Abb. 70, Abb. 71). Verbindung **55** (5,5'-Stellung) zeigt bei pH-Werten zwischen 3,5 und 9,6 bei  $\lambda_{\max} = 329$  nm höhere Absorptionswerte als bei pH-Werten zwischen 10,9 und 12,9 bei  $\lambda_{\max} = 359$  nm (Abb. 70). Bei Verbindung **55** kann beobachtet werden, dass sich die Lösung in einem pH-Bereich zwischen 5,6 und 10,9 milchig zeigt. Eine milchige Trübung der Lösung kann z. B. die Entstehung von Streulicht verursachen. Es ist eine kritische Betrachtung der erhaltenen Werte angezeigt, da die Auswertung der Daten nicht mehr nach dem Lambert-Beerschen Gesetz erfolgen kann. Bei pH-Werten  $> 11$  ist die Lösung wieder farblos und klar. Verbindung **60** (6,6'-Stellung) zeigt im stark alkalischen Bereich die größten Absorptionswerte bei  $\lambda_{\max} = 355$  nm (Abb. 71).

Im Fall der vorliegenden Dihydroxyverbindungen handelt es sich um Moleküle mit dissoziierbaren auxochromen Gruppen, die vom pH-Wert abhängig sind. Aufgrund der phenolischen Struktur sind in wässriger Lösung Eigenschaften wie die schwach saurer Verbindungen zu erwarten. Durch Zugabe von NaOH werden die Protonen der phenolischen Hydroxygruppen abgegeben. Es entsteht ein Phenolatanion, das durch das aromatische System bedingt eine gute Mesomeriestabilisierung erfährt. Die negativen Ladungen können sich über das gesamte Molekül verteilen, so dass die in Abb. 72 dargestellte deprotonierte Form als eine der möglichen Grenzformeln zu verstehen ist. Folglich ist eine bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima im stark alkalischen Bereich sichtbar (Abb. 69 - Abb. 71).



**Abb. 72:** Deprotonierung der Dihydroxyverbindungen durch Basenzusatz; Verbindung **54** ( $R = R' = H$ ; die Hydroxygruppen befinden sich in den Positionen 5,5'/5,6'/6,6'), Verbindung **55** ( $R = R' = CH_3$ ; 5,5'-Stellung der Hydroxygruppen), Verbindung **60** ( $R = R' = CH_3$ ; 6,6'-Stellung der Hydroxygruppen)

In den Absorptionsspektren sind Schnittpunkte der einzelnen Kurven erkennbar. Liegt dieser Schnittpunkt bei einer Wellenlänge ( $\lambda_{iso}$ ), deren Absorption nicht vom pH-Wert beeinflusst wird, bezeichnet man ihn als isosbestischen Punkt. Die Absorptionskurven von Verbindung **54** weisen bei  $\lambda_{iso} = 357$  nm einen Schnittpunkt auf. Das Vorhandensein eines isosbestischen Punktes bei Variation des pH-Wertes weist in diesem Fall auf ein sich im Gleichgewicht befindliches System von protonierter und deprotonierter Form des Moleküls hin.

#### 2.2.2.2 Absorptionsspektren ausgewählter 2,2'-Bisbenzimidazolderivate

Wie die Untersuchungen der pH-abhängigen Absorptionsspektren zeigen, sind die Lage des Absorptionsmaximums und die Absorption sowohl von den Substanzeigenschaften als auch von den Eigenschaften des Lösungsmittels abhängig. Für die UV-spektroskopischen Untersuchungen werden daher verschiedene LM ausgewählt: MeOH repräsentiert ein in der organischen Chemie häufig verwendetes LM, PBS (pH 7,4) dient der Simulation des physiologischen pH-Wertes und mit Hilfe von 0,1 M HCl (pH 1,0) oder 0,1 M NaOH (pH 13,0) können saure oder basische Lösungen vermessen werden.

#### Absorptionsspektren der Stellungsisomere

Die UV-Spektren der Verbindungen mit 5,5'-Stellung der phenolischen Hydroxygruppen zeigen in MeOH, PBS und 0,1 M NaOH Absorptionsmaxima mit Bandenverschiebung zu höheren Wellenlängen im Vergleich zu den BBIs mit 6,6'-Stellung der Hydroxygruppen. In 0,1 M HCl sind dagegen die  $\lambda_{max}$ -Werte der Verbindungen mit 6,6'-Stellung gegenüber denen mit 5,5'-Stellung bathochrom verschoben. In Tab. 15 - Tab. 18 sind die UV-Daten der Stellungsisomere im methanolischen, neutralen, basischen und sauren Milieu dargestellt.

In allen vier LM zeigen die Stellungsisomere mit 6,6'-Stellung der phenolischen Hydroxygruppen bei kleineren Konzentrationen höhere Absorptionsmaxima als die Isomere mit 5,5'-Stellung. Folglich haben die Stellungsisomere mit 6,6'-Stellung die größeren molaren Absorptionskoeffizienten. Unabhängig von der Substitution am Stickstoff und der Stellung der Hydroxygruppen ist  $\varepsilon_\lambda$  in MeOH am größten, in PBS dagegen am kleinsten. In 0,1 M NaOH und in 0,1 M HCl ist  $\varepsilon_\lambda$  jeweils dem Wert von  $\varepsilon_\lambda$  in MeOH ähnlich.

**Tab. 15:** UV-Daten der Stellungsisomere in MeOH; Verbindung **54** (Tautomer), Verbindungen **55-59** (5,5'-Stellung), Verbindungen **60-64** (6,6'-Stellung)

Verbindung	R = R'	c in $10^{-5}$ mol·L <sup>-1</sup>	$\lambda_{\max}$ in nm	A <sub>max</sub>	$\varepsilon_\lambda$ in L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>
<b>54</b>	H	3,3	346	0,663	20.000
<b>55</b>	CH <sub>3</sub>	2,5	337	0,630	25.200
<b>56</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	10,0	332	0,415	4.100
<b>57</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2,0	334	0,483	24.100
<b>58</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10,0	308	0,306	3.000
<b>59</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	3,3	344	0,459	13.900
<b>60</b>	CH <sub>3</sub>	2,0	332	0,635	31.700
<b>61</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2,0	328	0,567	28.300
<b>62</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2,5	330	0,564	22.500
<b>63</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	5,0	303	0,666	13.300
<b>64</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	1,4	343	0,484	34.500

**Tab. 16:** UV-Daten der Stellungsisomere in PBS; Verbindung **54** (Tautomer), Verbindungen **55-59** (5,5'-Stellung), Verbindungen **60-64** (6,6'-Stellung)

Verbindung	R = R'	c	$\lambda_{\max}$	$A_{\max}$	$\epsilon_{\lambda}$
		in $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$	in nm	in $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$	
<b>54</b>	H	3,3	343	0,533	16.100
<b>55</b>	CH <sub>3</sub>	10,0	329	0,233	2.300
<b>56</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	10,0	316	0,317	3.700
<b>57</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	10,0	322	0,412	4.100
<b>58</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10,0	303	0,373	3.700
<b>59</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	10,0	334	0,459	4.500
<b>60</b>	CH <sub>3</sub>	5,0	324	0,630	12.600
<b>61</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2,0	319	0,471	23.500
<b>62</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	5,0	322	0,585	11.700
<b>63</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	5,0	299	0,633	12.600
<b>64</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	3,3	328	0,582	17.600

**Tab. 17:** UV-Daten der Stellungsisomere in 0,1 M NaOH; Verbindung **54** (Tautomer), Verbindungen **55-59** (5,5'-Stellung), Verbindungen **60-64** (6,6'-Stellung)

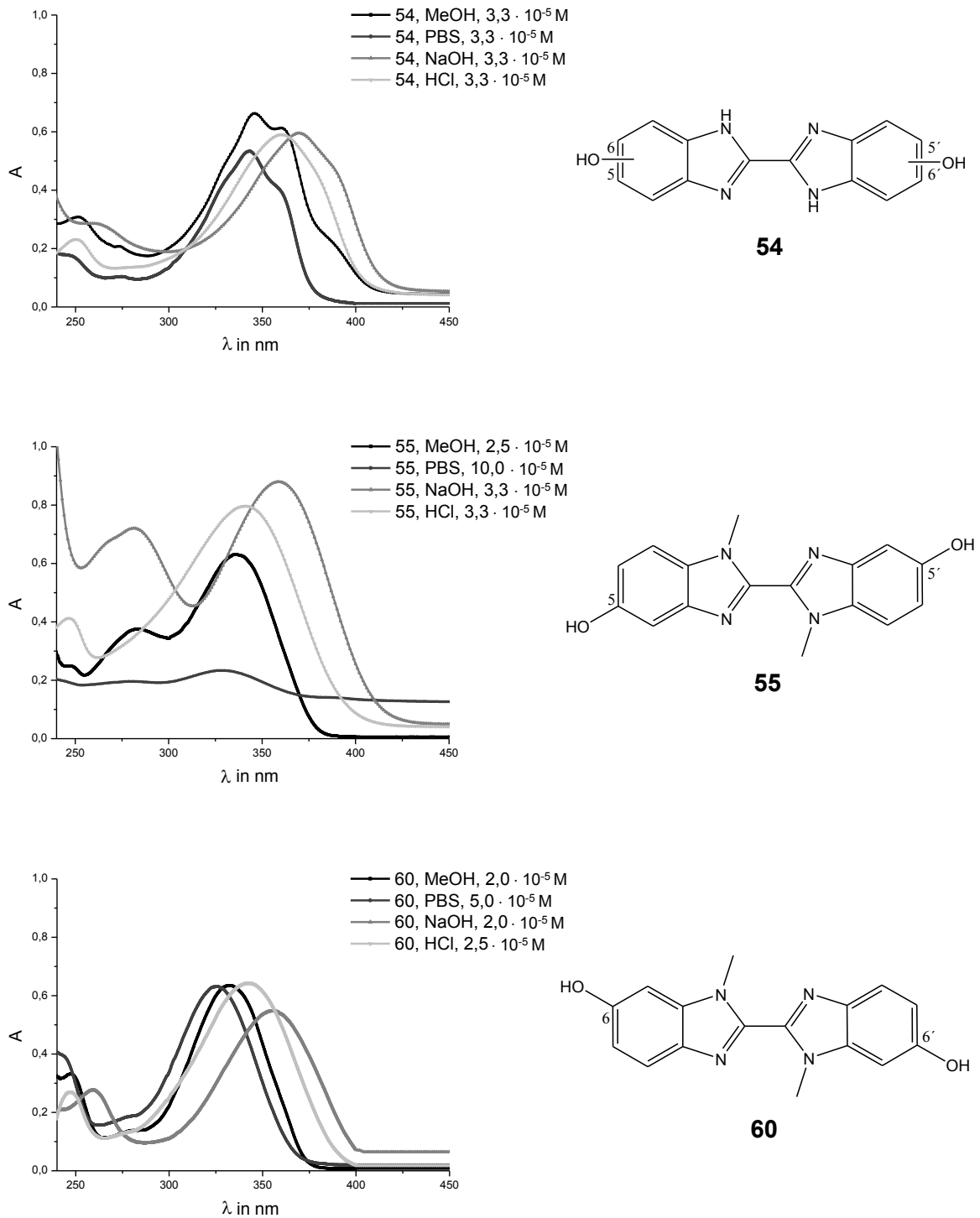
Verbindung	R = R'	c	$\lambda_{\max}$	$A_{\max}$	$\epsilon_{\lambda}$
		in $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$	in nm	in $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$	
<b>54</b>	H	3,3	370	0,595	18.000
<b>55</b>	CH <sub>3</sub>	3,3	359	0,880	26.600
<b>56</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	10,0	347	0,361	3.600
<b>57</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3,3	351	0,631	19.100
<b>58</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10,0	330	0,276	2.700
<b>59</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	3,3	364	0,371	11.200
<b>60</b>	CH <sub>3</sub>	2,0	356	0,548	27.400
<b>61</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2,5	344	0,540	21.600
<b>62</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	5,0	348	0,643	12.800
<b>63</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	5,0	324	0,650	13.000
<b>64</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	1,4	361	0,422	30.100

**Tab. 18:** UV-Daten der Stellungsisomere in 0,1 M HCl; Verbindung **54** (Tautomer), Verbindungen **55-59** (5,5'-Stellung), Verbindungen **60-64** (6,6'-Stellung)

Verbindung	R = R'	c in 10 <sup>-5</sup> mol·L <sup>-1</sup>	λ <sub>max</sub> in nm	A <sub>max</sub> in L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>	ε <sub>λ</sub>
<b>54</b>	H	3,3	351	0,553	16.700
<b>55</b>	CH <sub>3</sub>	3,3	341	0,797	24.100
<b>56</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	10,0	319	0,387	3.800
<b>57</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3,3	322	0,665	20.100
<b>58</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10,0	303	0,344	3.400
<b>59</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	5,0	332	0,641	12.800
<b>60</b>	CH <sub>3</sub>	2,5	344	0,643	25.700
<b>61</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3,3	328	0,709	21.400
<b>62</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	5,0	331	0,519	10.300
<b>63</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	5,0	304	0,547	10.900
<b>64</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	2,0	336	0,453	22.600

Im Folgenden werden die Absorptionsspektren der Verbindungen **54**, **55** und **60** miteinander verglichen (Abb. 73). Verbindung **54** weist in MeOH bei einer Wellenlänge von 346 nm ein Absorptionsmaximum auf, das in PBS (λ<sub>max</sub> = 343 nm) zu kleineren Wellenlängen (hypsochrom), dagegen im Sauren gering (λ<sub>max</sub> = 351 nm) und im alkalischen Milieu stark (λ<sub>max</sub> = 370 nm) bathochrom verschoben ist. Das Absorptionsmaximum und der molare Absorptionskoeffizient sind in MeOH am größten.

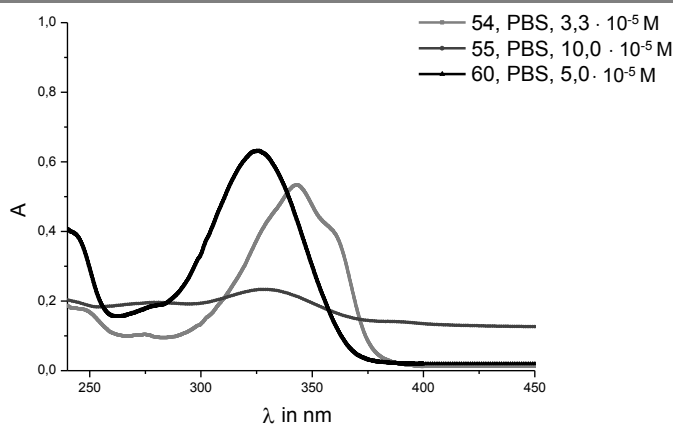
Die Einführung von Substituenten am Stickstoff führt zu deutlichen Veränderungen des spektroskopischen Verhaltens der Substanzen. Bei den Verbindungen **55** und **60** handelt es sich jeweils um Isomerenpaare, die sich in der Stellung der phenolischen Hydroxygruppen an den Benzimidazolringen unterscheiden. Verbindung **55** stellt einen Vertreter der Verbindungen mit 5,5'-Stellung und Verbindung **60** einen Vertreter der Verbindungen mit 6,6'-Stellung der phenolischen Hydroxygruppen dar.



**Abb. 73:** Absorptionskurven der Verbindungen **54**, **55** und **60**, in MeOH, PBS, 0,1 M NaOH und 0,1 M HCl, mit angegebener Konzentration



Das Absorptionsmaximum der Verbindung **55** (5,5'-Stellung) liegt in MeOH bei einer Wellenlänge von 337 nm, das der Verbindung **60** (6,6'-Stellung) liegt bei kleinerer Wellenlänge ( $\lambda_{\max} = 332$  nm). Eine hypsochrome Bandenverschiebung zeigt sich auch in PBS ( $\lambda_{\max} = 329$  nm der Verbindung **55** versus  $\lambda_{\max} = 324$  nm der Verbindung **60**) und in 0,1 M NaOH ( $\lambda_{\max} = 359$  nm der Verbindung **55** versus  $\lambda_{\max} = 356$  nm der Verbindung **60**). In 0,1 M HCl zeigt  $A_{\max}$  sich dagegen bei Verbindung **60** ( $\lambda_{\max} = 344$  nm) bei höherer Wellenlänge als Verbindung **55** ( $\lambda_{\max} = 341$  nm). Die Werte der Absorptionsmaxima und der molaren Absorptionskoeffizienten sind bei Verbindung **60** in MeOH und in PBS deutlich höher als die der Verbindung **55**. Im sauren und alkalischen Milieu weist Verbindung **55** ähnliche  $A_{\max}$ - und  $\epsilon_{\lambda}$ -Werte auf. Dies korreliert mit den Beobachtungen in der pH-abhängigen Absorptionsspektroskopie.



**Abb. 74:** Absorptionskurven der Verbindungen **54**, **55** und **60** in PBS, mit angegebener Konzentration

Für die mikroskopischen Untersuchungen an den Zellen ist insbesondere das dem Zellmedium ähnliche LM PBS von Bedeutung. In Abb. 74 ist ersichtlich, dass Verbindung **60** (6,6'-Stellung) gegenüber Verbindung **55** (5,5'-Stellung) in PBS bei geringerer Konzentration ein höheres  $A_{\max}$  bei jedoch kleinerer Wellenlänge zeigt. Verbindung **54** zeigt gegenüber den *N*-alkylierten Verbindungen ein  $A_{\max}$  zu höheren Wellenlängen verschoben.

### Absorptionsspektren weiterer ausgewählter Verbindungen

Durch Variationen der Substituenten am Stickstoff oder auch des Grundgerüsts der Bisbenzimidazole soll untersucht werden, ob Verbesserungen bei den Substanzen bzgl. ihrer UV- und fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften erreicht werden können. Nachfolgend werden die UV-Daten (Tab. 19 - Tab. 22) weiterer ausgewählter Verbindungen dargestellt.

Verbindung **71** zeigt als Stellungsisomerengemisch in etwa die Werte der einzelnen Stellungsisomere (Verbindungen **59** und **64**).

Verbindung **72** liegt im Rahmen dieser Arbeit nur als Isomerengemisch vor. Vergleicht man die Absorptionswerte mit den durchschnittlichen Werten der Stellungsisomere, sind die Werte der Verbindung **72** denen der Isomere mit 5,5'-Stellung der phenolischen Hydroxygruppen ähnlich.

Verbindungen **73** und **74** sind jeweils nur an einem Benzimidazolring substituiert. Die Absorptionsspektren zeigen bei Verbindung **74** deutlich höhere Werte als bei Verbindung **73**. Die molaren Absorptionskoeffizienten der Verbindung **74** sind in allen vier LM ca. fünfmal höher als die  $\epsilon_{\lambda}$ -Werte der Verbindung **73**.

Verbindungen **75** und **76** unterscheiden sich ebenso in der *N*-Substitution. Bei Verbindung **75** ist lediglich einer der beiden Benzimidazolringe mit 2-Methylpropan substituiert. Bei Verbindung **76** ist der eine Stickstoff ebenso mit 2-Methylpropan substituiert, der Stickstoff des anderen Benzimidazolrings trägt einen Ethylrest. Verbindung **75** zeigt in allen vier LM größere  $\epsilon_{\lambda}$ -Werte und ein zu höheren Wellenlängen verschobenes  $A_{\max}$  als Verbindung **76**.

Die Absorptionswerte des *N,N'*-verbrückten 2,2'-Bisbenzimidazols (Verbindung **80**) zeigen sich denen der Stellungsisomere mit 5,5'-Stellung der phenolischen Hydroxygruppen ähnlich.

Als Vertreter der 2,2'-überbrückten Benzimidazole können die Verbindungen **82** und **83** untersucht werden. In MeOH, PBS und im Sauren zeigen sich beide Verbindungen etwa gleich. Im Basischen ist aufgrund der Deprotonierung einer weiteren Hydroxygruppe bei Verbindung **83** eine negative Ladung mehr als bei Verbindung **82** möglich, die durch das aromatische System bedingt eine gute Mesomeriestabilisierung erfährt. Folglich zeigt Verbindung **83** in 0,1 M NaOH einen bathochromen Effekt und einen höheren molaren Absorptionskoeffizienten als Verbindung **82**.

**Tab. 19:** UV-Daten weiterer ausgewählter Verbindungen in MeOH;  
Verbindungen **71-76** (Stellungsisomerengemische), Verbindung **80** (*N,N'*-verbrücktes BBI),  
Verbindungen **82-83** (2,2'-überbrückte Benzimidazole)

Verbindung	R = R' / R, R' / R	c in 10 <sup>-5</sup> mol·L <sup>-1</sup>	λ <sub>max</sub> in nm	A <sub>max</sub>	ε <sub>λ</sub> in L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>
71	CH <sub>2</sub> C≡CH	2,0	343	0,513	25.600
72	4-Methylbenzyl	5,0	335	0,700	14.000
73	Phenyl, H	10,0	341	0,230	2.300
74	3-Pyridinyl, H	5,0	346	0,749	14.900
75	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , H	1,7	344	0,604	35.500
76	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,7	331	0,548	32.200
80	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	3,3	353	0,500	15.100
82	H	3,3	304	0,652	19.700
83	OH	3,3	303	0,670	20.300

**Tab. 20:** UV-Daten weiterer ausgewählter Verbindungen in PBS;  
Verbindungen **71-76** (Stellungsisomerengemische), Verbindung **80** (*N,N'*-verbrücktes BBI),  
Verbindungen **82-83** (2,2'-überbrückte Benzimidazole)

Verbindung	R = R' / R, R' / R	c in 10 <sup>-5</sup> mol·L <sup>-1</sup>	λ <sub>max</sub> in nm	A <sub>max</sub>	ε <sub>λ</sub> in L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>
71	CH <sub>2</sub> C≡CH	3,3	329	0,556	16.800
72	4-Methylbenzyl	5,0	354	0,477	9.500
73	Phenyl, H	10,0	338	0,239	2.300
74	3-Pyridinyl, H	3,3	341	0,455	13.700
75	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , H	1,7	336	0,432	25.400
76	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3,3	320	0,641	19.400
80	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	10,0	351	0,474	4.700
82	H	10,0	301	0,675	6.700
83	OH	10,0	299	0,681	6.800

**Tab. 21:** UV-Daten weiterer ausgewählter Verbindungen in 0,1 M NaOH;  
Verbindungen **71-76** (Stellungsisomere), Verbindung **80** (*N,N'*-verbrücktes BBI),  
Verbindungen **82-83** (2,2'-überbrückte Benzimidazole)

Verbindung	R = R' / R, R' / R	c in 10 <sup>-5</sup> mol·L <sup>-1</sup>	λ <sub>max</sub> in nm	A <sub>max</sub>	ε <sub>λ</sub> in L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>
71	CH <sub>2</sub> C≡CH	3,3	362	0,528	16.000
72	4-Methylbenzyl	5,0	359	0,594	11.800
73	Phenyl, H	10,0	331	0,241	2.400
74	3-Pyridinyl, H	5,0	360	0,567	11.300
75	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , H	1,4	359	0,497	35.500
76	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2,0	349	0,628	31.400
80	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	5,0	383	0,554	11.000
82	H	3,3	327	0,621	18.800
83	OH	2,0	322	0,685	34.200

**Tab. 22:** UV-Daten weiterer ausgewählter Verbindungen in 0,1 M HCl;  
Verbindungen **71-76** (Stellungsisomere), Verbindung **80** (*N,N'*-verbrücktes BBI),  
Verbindungen **82-83** (2,2'-überbrückte Benzimidazole)

Verbindung	R = R' / R, R' / R	c in 10 <sup>-5</sup> mol·L <sup>-1</sup>	λ <sub>max</sub> in nm	A <sub>max</sub>	ε <sub>λ</sub> in L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>
71	CH <sub>2</sub> C≡CH	3,3	336	0,499	15.100
72	4-Methylbenzyl	5,0	329	0,545	10.900
73	Phenyl, H	10,0	357	0,266	2.600
74	3-Pyridinyl, H	3,3	358	0,443	13.400
75	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , H	1,7	342	0,444	26.100
76	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3,3	329	0,606	18.300
80	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	3,3	372	0,459	13.900
82	H	3,3	313	0,633	19.100
83	OH	3,3	300	0,627	19.000

**Tab. 23:** UV-Daten von DAPI

LM	c in $10^{-5}$ mol·L <sup>-1</sup>	$\lambda_{\max}$ in nm	A <sub>max</sub>	$\epsilon_{\lambda}$ in L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>
MeOH	1,7	350	0,577	33.900
PBS	3,3	344	0,639	19.300
0,1 M NaOH	1,7	333	0,553	32.500
0,1 M HCl	1,7	345	0,532	33.200

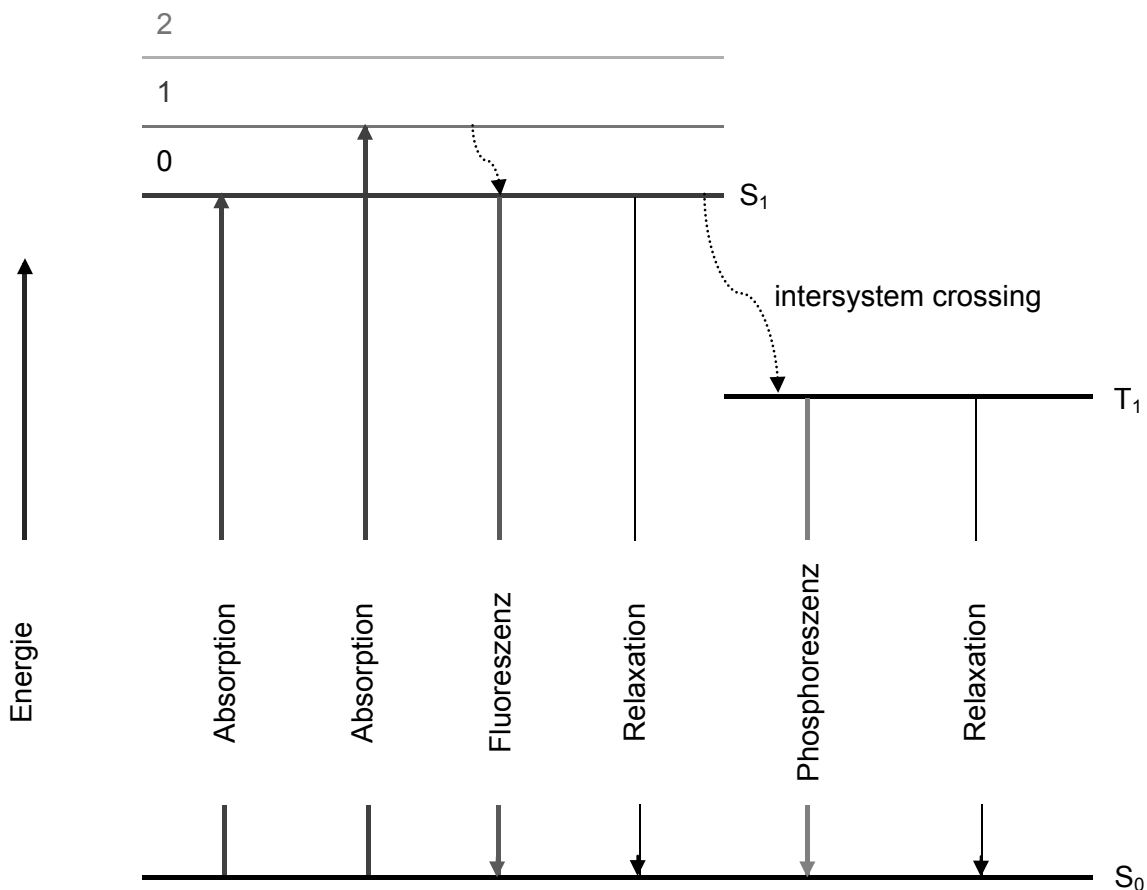
Zum Vergleichen und Einschätzen der erhaltenen Werte für die neu synthetisierten BBIs wird auch DAPI UV-spektroskopisch vermessen. DAPI zeigt in allen vier LM hohe Werte bzgl. Absorption und molaren Absorptionskoeffizienten (Tab. 23). Der jeweilige Wert ist dabei vom LM abhängig: DAPI zeigt einen kleineren  $\epsilon_{\lambda}$ -Wert in PBS als in MeOH, im sauren oder alkalischen Milieu.

Der molare Absorptionskoeffizient von DAPI ist in PBS mit 19.300 deutlich größer als die  $\epsilon_{\lambda}$ -Werte der BBIs mit 5,5'-Stellung der phenolischen Hydroxygruppen: Die Verbindungen **55-59** weisen lediglich  $\epsilon_{\lambda}$ -Werte zwischen 2.300 und 4.500 auf (Tab. 16). Die  $\epsilon_{\lambda}$ -Werte der BBIs mit 6,6'-Stellung zeigen in PBS dem DAPI ähnliche  $\epsilon_{\lambda}$ -Werte. Diese liegen für die Verbindungen **60-64** zwischen 11.700 und 23.500 (Tab. 16).

Der molare Absorptionskoeffizient ist für die Fluoreszenzuntersuchungen von Bedeutung. Je größer der Koeffizient ist, umso mehr Energie kann von den Molekülen absorbiert und als Fluoreszenzlicht emittiert werden. Weitere Informationen werden im Kap. 2.2.3 erläutert. Damit weisen die großen  $\epsilon_{\lambda}$ -Werte der Verbindungen mit 6,6'-Stellung der phenolischen Hydroxygruppen auf höhere Fluoreszenzintensitäten als die der Verbindungen mit 5,5'-Stellung hin. Die Verbindungen sollen eine hohe Intensität des fluoreszierenden Lichtes und ein Emissionsmaximum im langwelligen Bereich (> 400 nm) zeigen, damit bei Zellaufnahmen eine Abgrenzung gegen die Hintergrundfluoreszenz vorliegt.

### 2.2.3 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Die durch Ausstrahlung von Licht gekennzeichneten Erscheinungen, die bei einer Substanz nach vorangegangener Anregung durch Licht ohne Abgabe von thermischer Energie auftreten, nennt man Lumineszenz. Die Aussendung von elektromagnetischer Teilchenstrahlung wird als Emission bezeichnet. In Abhängigkeit von der Dauer der Aussendung von elektromagnetischer Teilchenstrahlung wird zwischen Phosphoreszenz und Fluoreszenz unterschieden. Fluoreszenz tritt nur während oder unmittelbar nach der Anregung durch Licht auf. Dagegen ist die Phosphoreszenz noch nach Beendigung der Anregung messbar. Ein Emissionsspektrum stellt das elektromagnetische Wellenspektrum dar, das die Substanz nach Anregung ausstrahlt.



**Abb. 75:** Jablonski-Termschema, vereinfachte Darstellung; dabei ist  $S_0$  der Grundzustand,  $S_1$  der angeregte Zustand mit den Schwingungsniveaus 0, 1, 2 und  $T_1$  der Triplettzustand

Die Elektronen der Moleküle befinden sich bei Raumtemperatur normalerweise im untersten Schwingungsniveau des Grundzustandes ( $S_0$ ). Dabei handelt es sich meist um einen Singulett-Zustand, in dem die Elektronenspins antiparallel angeordnet sind. Durch Absorption von Licht können Übergänge in angeregte Zustände ( $S_n$ ) erfolgen. Die Elektronen gehen zunächst in den angeregten Zustand  $S_1$  mit den Schwingungsniveaus 0, 1, 2 usw. über. Nach dem Jablonski-Termschema (Abb. 75) bestehen mehrere Möglichkeiten, die absorbierte Energie wieder abzugeben. Die Rückkehr (Relaxation) von  $S_1$  nach  $S_0$  erfolgt meist durch strahlungslose Inaktivierung (Umwandlung der Elektronenenergie in Wärmeenergie, „internal conversion“) oder durch Emission von Licht (Fluoreszenz). Durch strahlungslose Spinumkehr („intersystem crossing“) und Übergang in die etwas energieärmeren Triplett-Zustände ( $T_n$ ) sowie erneuter Spinumkehr und weiterem Übergang von  $T_1$  in den Grundzustand  $S_0$  entsteht Phosphoreszenz.

Das Verhältnis emittierter zu absorbierter Energie wird durch die Fluoreszenzquantenausbeute beschrieben. In stark verdünnten Lösungen ist die Intensität des Fluoreszenzlichtes direkt proportional zur Intensität des Anregungslichtes:

$$I_\lambda \sim \varepsilon_\lambda \cdot I_0 \cdot \Phi_F \cdot K$$

- $I_\lambda$  = Intensität des Fluoreszenzlichtes einer Probe  
von bestimmter Konzentration (in mol·L<sup>-1</sup>) (bei einer bestimmten Wellenlänge)
- $\varepsilon_\lambda$  = molarer Absorptionskoeffizient (in L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>) (bei der Anregungswellenlänge)
- $I_0$  = Intensität des Anregungslichtes
- $\Phi_F$  = Fluoreszenzquantenausbeute
- $K$  = Gerätekonstante

Erfolgt die Rückkehr aller angeregten Moleküle von  $S_1$  nach  $S_0$  unter Abgabe der Energie in Form von Fluoreszenzstrahlung ist die Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_F = 1$ .

Die Fluoreszenzquantenausbeute wird bei den Verbindungen in der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt.

Ein wichtiger Parameter für die Fluoreszenzuntersuchungen stellt der molare Absorptionskoeffizient  $\varepsilon_\lambda$  dar. Je größer der molare Absorptionskoeffizient ist, umso mehr Energie kann von den Molekülen absorbiert und als Fluoreszenzlicht emittiert werden.

Die in der Arbeit dargestellten Fluoreszenzspektren sind Emissionsspektren, die auf der Abszisse die Wellenlänge ( $\lambda$ ) und auf der Ordinate die relative Intensität ( $I_{\text{rel}}$ ) des Fluoreszenzlichtes zeigen. Das Maximum der Emissionswellenlänge wird mit  $\lambda_{\text{Em}}$  abgekürzt.

Da das Fluoreszenzspektrometer im Vergleich zum Absorptionsspektrometer ein erheblich empfindlicheres Gerät ist, werden für die Aufnahmen der Emissionsspektren geeignete Verdünnungen der Proben hergestellt.

Die in der UV-Spektroskopie erhaltenen Wellenlängen der Absorptionsmaxima ( $\lambda_{\text{max}}$ ) werden als Anregungswellenlänge in den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen eingesetzt. Nach Erhalt des Emissionsspektrums wird ein Anregungsspektrum mit dem Fluoreszenzspektrometer aufgenommen. Als feste Wellenlänge des Emissionsmonochromators wird das Maximum des Emissionsspektrums ( $\lambda_{\text{Em}}$ ) eingestellt. Die erhaltenen Maxima werden als  $\lambda_{\text{A}}$  dargestellt. Das erhaltene Anregungsspektrum steht im Zusammenhang mit dem Absorptionsspektrum, da dem Emissionsprozess der Anregungsprozess zugrunde liegt (weiterführende Informationen Kap. 2.2.4).

#### Emissionsspektren ausgewählter 2,2'-Bisbenzimidazolderivate

Wie bei der UV-Spektroskopie zeigen sich die Moleküle auch bei den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen empfindlich auf ihre Umgebung<sup>[87]</sup>. Ein Einflussfaktor stellt das gewählte Lösungsmittel dar. So kann die Polarität des LM die Fluoreszenzintensität und die Lage des Emissionsmaximums des Moleküls beeinflussen. Einen starken Einfluss auf die Elektronendichte im Fluorophor hat die Deprotonierung der Hydroxygruppen, so dass der intramolekulare Ladungstransfer verstärkt wird.

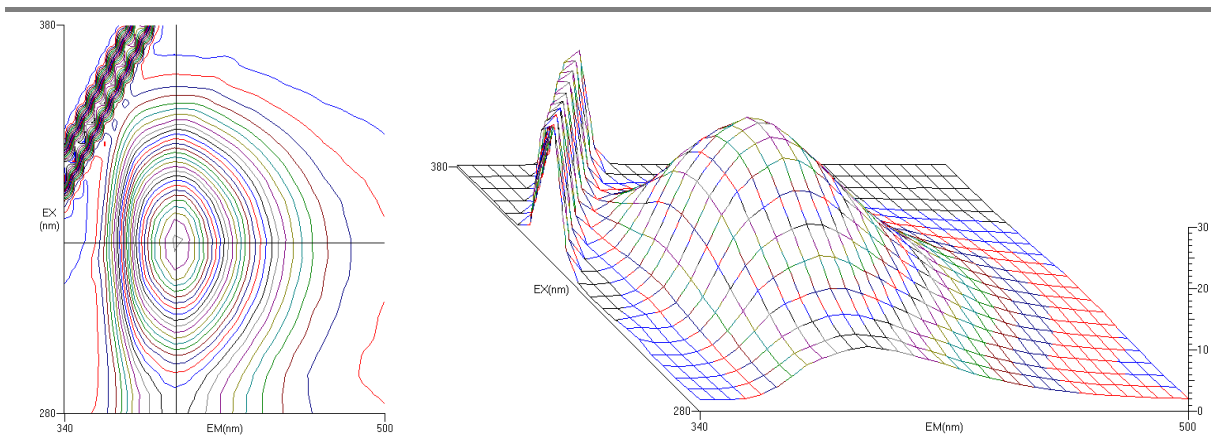
Für die Fluoreszenzuntersuchungen werden die gleichen LM wie für die UV-Spektroskopie ausgewählt: MeOH, PBS (pH 7,4), 0,1 M HCl (pH 1,0) und 0,1 M NaOH (pH 13,0).

#### Emissionsspektren der Stellungsisomere

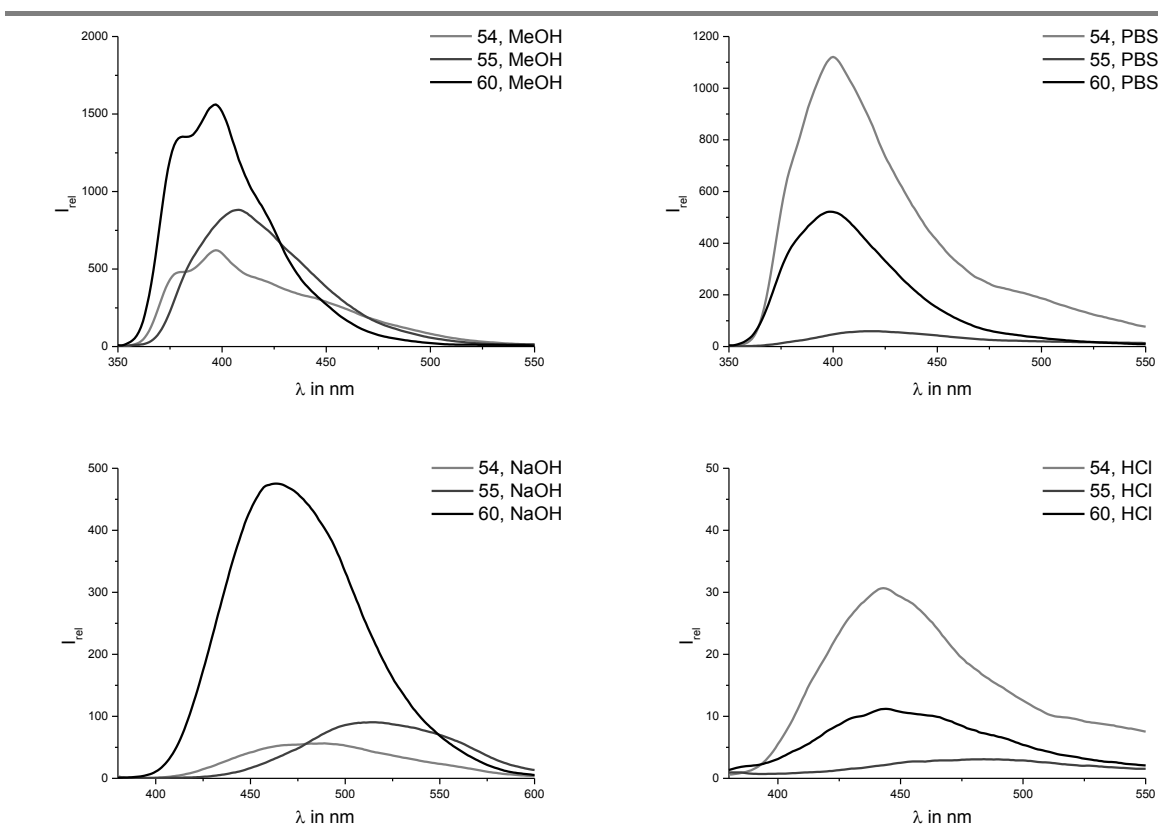
Die Verbindungen **54-64** werden für die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der Stellungsisomere eingesetzt.

Die graphische Darstellung der erhaltenen Fluoreszenzdaten kann in unterschiedlicher Form erfolgen. Abb. 76 zeigt jeweils eine 2D- und eine 3D-Abbildung eines Emissionsspektrums der Verbindung **60** in PBS. Nachfolgend wird das Auftragen der relativen Intensität des Fluoreszenzlichtes gegen die Wellenlänge der Emission bevorzugt.





**Abb. 76:** 2D- (links) und 3D- (rechts) Emissionsspektrum der Verbindung **60**,  $10^{-6}$  M, in PBS; Die Absorption (Bereich: 280-380 nm) ist gegen die Emission (Bereich: 340-500 nm) aufgetragen. In der 3D-Darstellung ist zusätzlich  $I_{rel}$  (Bereich: 0-30) abgebildet.



**Abb. 77:** Emissionsspektren der Verbindungen **54**, **55** und **60**,  $10^{-5}$  M, in MeOH, PBS\*, NaOH, HCl; \*  $10^{-4}$  M

In allen vier LM zeigen die BBIs mit 5,5'-Stellung der phenolischen Hydroxygruppen die höheren  $\lambda_{Em}$ -Werte. Beachtlich sind die deutlich höheren  $I_{rel}$ -Werte der BBIs mit 6,6'-Stellung. Die BBIs mit 5,5'-Stellung erreichen dagegen erst bei Konzentrationen mit Faktor 10 ähnliche  $I_{rel}$ -Werte. In Abb. 77 ist eine Übersicht der Emissionsspektren der Verbindungen **54**, **55** und **60** dargestellt. Die Einzelwerte werden nachfolgend beschrieben.

Fluoreszenzuntersuchungen in Methanol

In Tab. 24 sind die Daten der Fluoreszenzmessungen in MeOH dargestellt. Verbindung **54** und die *N*-alkylierten BBIs mit 6,6'-Stellung der phenolischen Hydroxygruppen (Verbindungen **60-64**) haben in MeOH Emissionsmaxima bei einer Wellenlänge ( $\lambda_{Em}$ ) von 392-396 nm. Die BBIs mit 5,5'-Stellung der Hydroxygruppen (Verbindungen **55-59**) zeigen zu höheren Wellenlängen verschobene  $\lambda_{Em}$ -Werte (405-412 nm). Die Intensitäten der Fluoreszenz der BBIs mit 6,6'-Stellung sind größer als die der BBIs mit 5,5'-Stellung. Diese Beobachtungen korrelieren mit den in der UV-Spektroskopie erhaltenen Daten.

**Tab. 24:** Fluoreszenzdaten der Stellungsisomere in MeOH; Verbindung **54** (Tautomer), Verbindungen **55-59** (5,5'-Stellung), Verbindungen **60-64** (6,6'-Stellung)

Verbindung	R = R'	c in mol·L <sup>-1</sup>	$\lambda_A$ in nm	$\lambda_{Em}$ in nm	I <sub>rel</sub>
<b>54</b>	H	10 <sup>-5</sup>	346	396	643
<b>54</b>	H	10 <sup>-6</sup>	345	395	96
<b>55</b>	CH <sub>3</sub>	10 <sup>-5</sup>	337	405	967
<b>55</b>	CH <sub>3</sub>	10 <sup>-6</sup>	335	405	99
<b>56</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	10 <sup>-5</sup>	333	406	209
<b>57</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	10 <sup>-5</sup>	334	406	890
<b>58</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10 <sup>-5</sup>	313	406	90
<b>59</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	10 <sup>-5</sup>	343	412	700
<b>59</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	10 <sup>-6</sup>	344	411	77
<b>60</b>	CH <sub>3</sub>	10 <sup>-5</sup>	332	395	1.632
<b>60</b>	CH <sub>3</sub>	10 <sup>-6</sup>	333	395	1.022
<b>60</b>	CH <sub>3</sub>	10 <sup>-7</sup>	332	395	40
<b>61</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	10 <sup>-5</sup>	330	396	1.633
<b>62</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	10 <sup>-5</sup>	331	396	804
<b>63</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10 <sup>-5</sup>	306	392	607
<b>64</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	10 <sup>-5</sup>	340	396	1.900
<b>64</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	10 <sup>-6</sup>	341	396	231

Fluoreszenzuntersuchungen in PBS

In PBS haben Verbindung **54** und die Verbindungen **60-64** mit 6,6'-Stellung der phenolischen Hydroxygruppen ähnliche  $\lambda_{Em}$ -Werte (396-404 nm) wie in MeOH (392-396 nm). Die Verbindungen **55-59** mit 5,5'-Stellung zeigen in PBS  $\lambda_{Em}$ -Werte mit größerer Verschiebung zu höheren Wellenlängen als in MeOH (PBS:  $\lambda_{Em}$  = 417-434 nm, MeOH:  $\lambda_{Em}$  = 405-412 nm). Die Fluoreszenzintensitäten sind bei allen Verbindungen deutlich geringer als die in MeOH. Besonders geringe Intensitäten zeigen sich bei den BBIs mit 5,5'-Stellung der phenolischen Hydroxygruppen. Die Daten der Fluoreszenzmessungen in PBS werden in Tab. 25 präsentiert.

**Tab. 25:** Fluoreszenzdaten der Stellungsisomere in PBS; Verbindung **54** (Tautomer), Verbindungen **55-59** (5,5'-Stellung), Verbindungen **60-64** (6,6'-Stellung)

Verbindung	R = R'	c in mol·L <sup>-1</sup>	$\lambda_A$ in nm	$\lambda_{Em}$ in nm	I <sub>rel</sub>
<b>54</b>	H	10 <sup>-4</sup>	341	398	1.091
<b>54</b>	H	10 <sup>-6</sup>	341	398	62
<b>55</b>	CH <sub>3</sub>	10 <sup>-4</sup>	331	417	57
<b>55</b>	CH <sub>3</sub>	10 <sup>-6</sup>	327	421	9
<b>56</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	10 <sup>-4</sup>	321	424	129
<b>57</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	10 <sup>-4</sup>	326	423	96
<b>58</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10 <sup>-4</sup>	306	421	63
<b>59</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	10 <sup>-4</sup>	331	434	33
<b>59</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	10 <sup>-5</sup>	331	430	6
<b>60</b>	CH <sub>3</sub>	10 <sup>-4</sup>	326	396	515
<b>60</b>	CH <sub>3</sub>	10 <sup>-5</sup>	326	396	150
<b>60</b>	CH <sub>3</sub>	10 <sup>-6</sup>	326	396	29
<b>61</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	10 <sup>-4</sup>	343	398	1.732
<b>62</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	10 <sup>-4</sup>	317	398	1.280
<b>63</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10 <sup>-4</sup>	302	397	794
<b>64</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	10 <sup>-5</sup>	327	404	670
<b>64</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	10 <sup>-6</sup>	327	402	89

Fluoreszenzuntersuchungen in 0,1 M NaOH

Wie bei den UV-spektroskopischen Untersuchungen bereits dargestellt, erfolgt im Basischen eine Deprotonierung der phenolischen Hydroxygruppen. Folglich entsteht ein Phenolatanion, das aufgrund der Delokalisierbarkeit der Ladungen gute Mesomeriestabilisierung erfährt. In der UV-Spektroskopie zeigt sich ein bathochromer Effekt und höhere Werte der molaren Absorptionskoeffizienten (Tab. 26). Es ist im stark basischen Milieu gegenüber PBS auch eine Verschiebung der Emissionsmaxima zu höheren Wellenlängen zu erwarten. Sowohl Verbindung **54** ( $\lambda_{Em} = 484-486$  nm) als auch die Verbindungen **60-64** mit 6,6'-Stellung der phenolischen Hydroxygruppen ( $\lambda_{Em} = 460-475$  nm) zeigen die Verschiebung zu höheren Wellenlängen. Bei den Verbindungen **55-59** mit 5,5'-Stellung findet die Verschiebung zu noch höheren Wellenlängen statt: Sie zeigen die Emissionsmaxima bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{Em} = 511-539$  nm. Allerdings sind wie in PBS auch in 0,1 M NaOH die Fluoreszenzintensitäten bei allen Verbindungen deutlich geringer als die in MeOH.

**Tab. 26:** Fluoreszenzdaten der Stellungsisomere in 0,1 M NaOH; Verbindung **54** (Tautomer), Verbindungen **55-59** (5,5'-Stellung), Verbindungen **60-64** (6,6'-Stellung)

Verbindung	R = R'	c in mol·L <sup>-1</sup>	$\lambda_A$ in nm	$\lambda_{Em}$ in nm	I <sub>rel</sub>
<b>54</b>	H	10 <sup>-5</sup>	373	486	53
<b>54</b>	H	10 <sup>-6</sup>	370	484	9
<b>55</b>	CH <sub>3</sub>	10 <sup>-5</sup>	360	511	105
<b>55</b>	CH <sub>3</sub>	10 <sup>-6</sup>	356	511	13
<b>56</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	10 <sup>-5</sup>	347	515	18
<b>57</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	10 <sup>-5</sup>	351	512	97
<b>58</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10 <sup>-5</sup>	331	512	6
<b>59</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	10 <sup>-4</sup>	362	539	97
<b>59</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	10 <sup>-5</sup>	361	536	13
<b>60</b>	CH <sub>3</sub>	10 <sup>-5</sup>	353	461	461
<b>60</b>	CH <sub>3</sub>	10 <sup>-6</sup>	350	462	17
<b>61</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	10 <sup>-5</sup>	343	462	546
<b>62</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	10 <sup>-5</sup>	347	461	267
<b>63</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10 <sup>-5</sup>	325	460	78
<b>64</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	10 <sup>-5</sup>	360	475	771
<b>64</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	10 <sup>-6</sup>	358	475	87

Fluoreszenzuntersuchungen in 0,1 M HCl

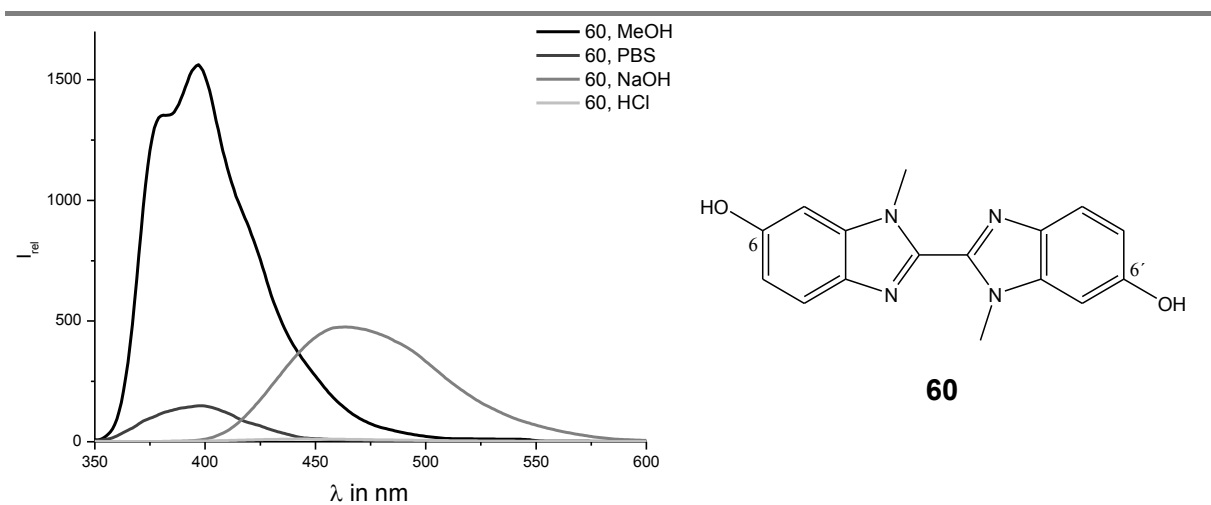
In 0,1 M HCl vermessen zeigen die Lösungen der Verbindungen eine Verschiebung der Emissionsmaxima zu höheren Wellenlängen, allerdings nicht so stark wie im Basischen. Die Verbindungen **54** (Tautomer) und **60-64** (6,6'-Stellung) zeigen Emissionsmaxima bei  $\lambda_{Em}$  zwischen 403-455 nm. Die  $\lambda_{Em}$ -Werte der Verbindungen **55-59** (5,5'-Stellung) liegen wiederum bei höheren Wellenlängen ( $\lambda_{Em} = 445-490$  nm). Allerdings sind die Fluoreszenzintensitäten bei allen Verbindungen dramatisch geringer als in den anderen LM. Tab. 27 zeigt die Daten der Fluoreszenzmessungen in 0,1 M HCl.

**Tab. 27:** Fluoreszenzdaten der Stellungsisomere in 0,1 M HCl; Verbindung **54** (Tautomer), Verbindungen **55-59** (5,5'-Stellung), Verbindungen **60-64** (6,6'-Stellung)

Verbindung	R = R'	c in mol·L <sup>-1</sup>	$\lambda_A$ in nm	$\lambda_{Em}$ in nm	I <sub>rel</sub>
<b>54</b>	H	10 <sup>-5</sup>	361	442	30
<b>54</b>	H	10 <sup>-6</sup>	360	441	5
<b>55</b>	CH <sub>3</sub>	10 <sup>-5</sup>	340	485	4
<b>56</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	10 <sup>-4</sup>	327	486	4
<b>57</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	10 <sup>-4</sup>	360	490	5
<b>58</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10 <sup>-4</sup>	345	445	3
<b>59</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	10 <sup>-4</sup>	335	445	10
<b>60</b>	CH <sub>3</sub>	10 <sup>-5</sup>	342	444	11
<b>61</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	10 <sup>-5</sup>	330	450	7
<b>62</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	10 <sup>-5</sup>	335	445	4
<b>63</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10 <sup>-4</sup>	344	455	8
<b>64</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	10 <sup>-4</sup>	325	405	137
<b>64</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	10 <sup>-5</sup>	327	403	25

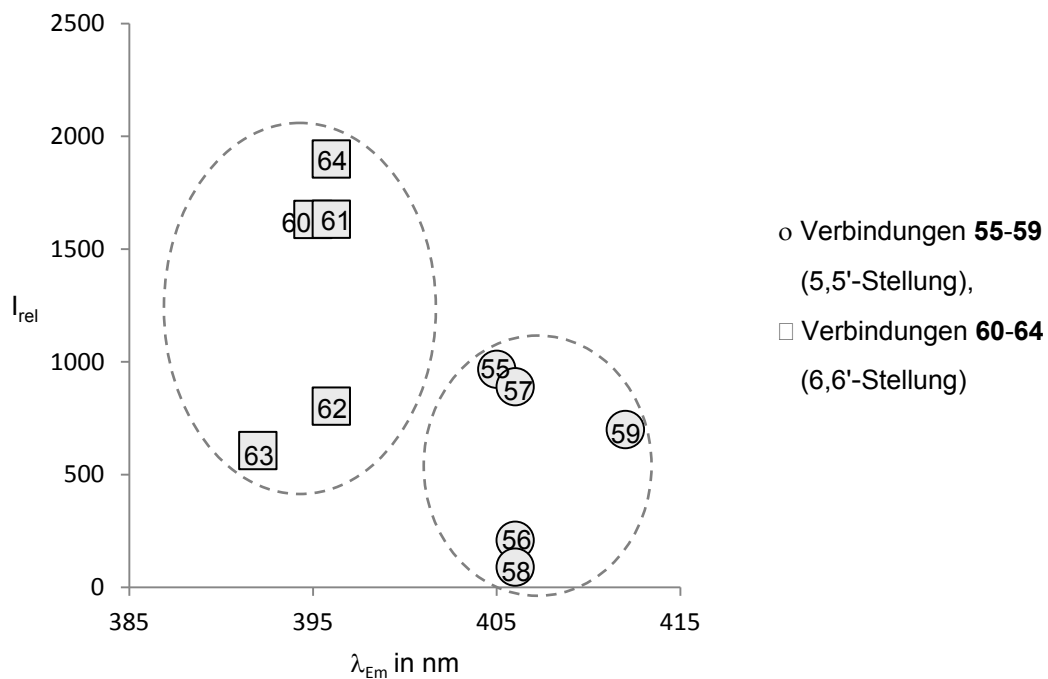
### Übersicht der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der Stellungsisomere

Eine Übersicht der Emissionsspektren der Verbindung **60** in allen vier LM zeigt Abb. 78. Es ist deutlich erkennbar, dass die höchste Fluoreszenzintensität in MeOH messbar ist. In 0,1 M NaOH, in PBS und in 0,1 M HCl zeigt die Verbindung eine geringere Intensität als in MeOH. Die Verschiebung der Lage des Emissionsmaximums zu deutlich höheren Wellenlängen und relativ hoher Fluoreszenzintensität ist nur im alkalischen Milieu erreichbar. Dieses Milieu kann in den Zelltestungen nicht berücksichtigt werden, hier sind die Werte in PBS von Bedeutung.

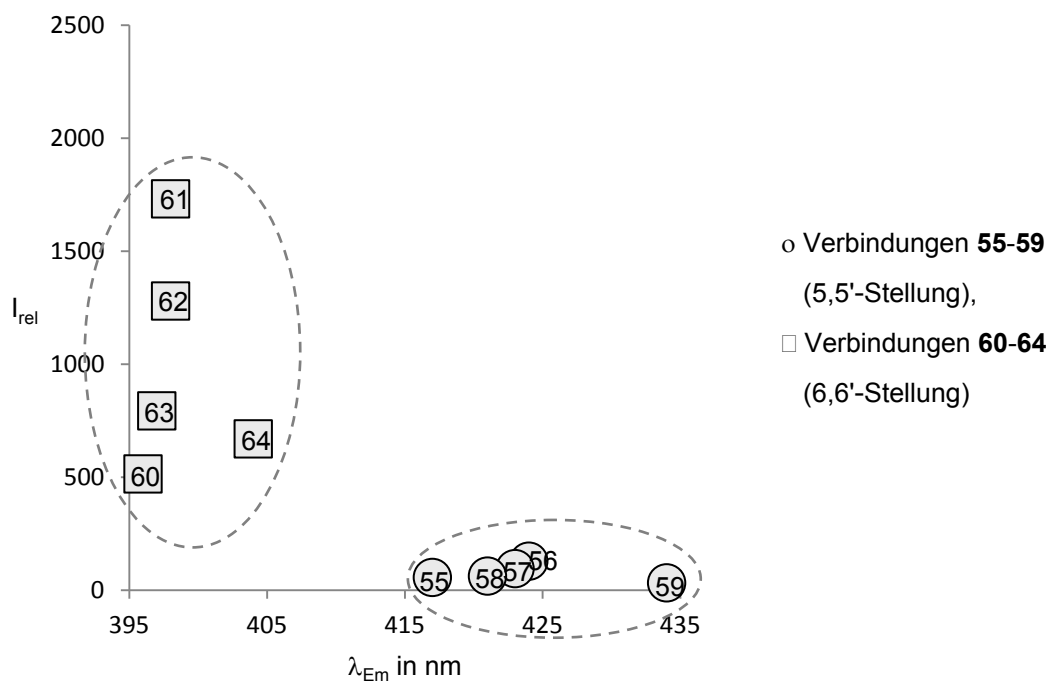


**Abb. 78:** Emissionsspektren der Verbindung **60**,  $10^{-5}$  M, in MeOH, PBS, NaOH, HCl

Abb. 79 und Abb. 80 zeigen die Verteilung der Emissionsmaxima und relativen Intensitäten der Stellungsisomere (Verbindungen **55-64**) in MeOH und in PBS. Die BBIs mit 5,5'-Stellung der phenolischen Hydroxygruppen (Verbindungen **55-59**) zeigen gegenüber den BBIs mit 6,6'-Stellung (Verbindungen **60-64**) in beiden LM deutlich höhere  $\lambda_{Em}$ -Werte. Die BBIs mit 6,6'-Stellung zeigen dagegen höhere  $I_{rel}$ -Werte als die BBIs mit 5,5'-Stellung.



**Abb. 79:** Punktdiagramm: relative Intensität gegen die Wellenlänge, in MeOH,  $c = 10^{-5}$  M



**Abb. 80:** Punktdiagramm: relative Intensität gegen die Wellenlänge, in PBS,  $c = 10^{-4}$  M\*,  
\* Verbindung **64**:  $10^{-5}$  M

### Emissionsspektren weiterer ausgewählter Verbindungen

Nachfolgend werden die Daten der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen (Tab. 28 - Tab. 31) weiterer ausgewählter Verbindungen dargestellt.

Verbindung **71** zeigt als Stellungsisomerengemisch Fluoreszenzintensitäten und Lagen der Emissionsmaxima, die zwischen den Werten der einzelnen Stellungsisomere (Verbindungen **59** und **64**) liegen. Beispielsweise zeigt eine  $10^{-5}$  M-Lösung in PBS der Verbindung mit 5,5'-Stellung der phenolischen Hydroxygruppen (Verbindung **59**) ein Emissionsmaximum bei  $\lambda_{Em} = 430$  nm ( $I_{rel} = 6$ ) (Kap. 2.2.3, Tab. 25). Dagegen zeigt die  $10^{-5}$  M-Lösung in PBS der Verbindung **64** (6,6'-Stellung) ein Emissionsmaximum bei  $\lambda_{Em} = 404$  nm ( $I_{rel} = 670$ ) (Kap. 2.2.3, Tab. 25). Die  $10^{-5}$  M-Lösung in PBS der Verbindung **71** (Tab. 29) zeigt mit  $\lambda_{Em} = 410$  nm ein zu höheren Wellenlängen verschobenes Emissionsmaximum als die Verbindung mit 6,6'-Stellung. Die Fluoreszenzintensität ist mit  $I_{rel} = 87$  geringer als die der Verbindung mit 6,6'-Stellung, aber höher als die der Verbindung mit 5,5'-Stellung.

Die Verbindung **72** ist ebenfalls ein Stellungsisomerengemisch. Die Fluoreszenzwerte sind denen der Verbindung **71** ähnlich: Z. B. weist eine  $10^{-5}$  M-Lösung in PBS der Verbindung **72** ein Emissionsmaximum bei  $\lambda_{Em} = 403$  nm und eine  $I_{rel}$  mit 23 auf (Tab. 29).

Verbindungen **73** und **74** sind jeweils nur an einem Benzimidazolring substituiert. Eine  $10^{-6}$  M-Lösung in PBS der Verbindung **73** zeigt ein Emissionsmaximum bei  $\lambda_{Em} = 410$  nm ( $I_{rel} = 6$ ) (Tab. 29) und damit der Verbindung **71** ähnliche Fluoreszenzwerte.

In der Literatur werden für nichtsteroidale ER-Liganden, die mit heterozyklischen Resten substituiert sind, größere  $\lambda_{Em}$ -Werte als für Liganden ohne heterozyklische Substituenten beschrieben<sup>[33, 50]</sup>. Tatsächlich zeigt Verbindung **74** in allen vier LM Emissionsmaxima mit einer Bandenverschiebung zu höheren Wellenlängen als Verbindung **73**. Beispielsweise liegt das Emissionsmaximum einer  $10^{-6}$  M-Lösung in PBS der Verbindung **74** bei  $\lambda_{Em} = 418$  nm ( $I_{rel} = 6$ ), das der Verbindung **73** dagegen bei  $\lambda_{Em} = 410$  nm ( $I_{rel} = 6$ ) (Tab. 29).



Verbindungen **75** und **76** unterscheiden sich ebenso in der Substitution am Stickstoff. Bei Verbindung **75** ist lediglich einer der beiden Benzimidazolringe mit 2-Methylpropan substituiert. Dieser Benzimidazolring ist in 6-Stellung mit der phenolischen Hydroxygruppe substituiert. Die 6-Stellung widerspiegelt sich in der Lage der Emissionsmaxima und den Fluoreszenzintensitäten. Diese Werte sind in allen vier LM denen der Stellungsisomere mit 6,6'-Stellung ähnlich: Es liegt eine Verschiebung der Emissionsmaxima gegenüber den Verbindungen mit 5,5'-Stellung zu kleineren Wellenlängen bei höheren Fluoreszenzintensitäten vor.

Bei Verbindung **76** ist der eine Benzimidazolring wie bei Verbindung **75** am Stickstoff mit 2-Methylpropan und in 6-Stellung mit der phenolischen Hydroxygruppe substituiert. Der Stickstoff des anderen Benzimidazolrings ist mit einem Ethylrest substituiert, die phenolische Hydroxygruppe kann sich hier in Position 5 oder 6 befinden. Verbindung **76** zeigt in MeOH, 0,1 M HCl und 0,1 M NaOH Emissionsmaxima zu höheren Wellenlängen als die der Verbindung **75** verschoben (Tab. 28, Tab. 30, Tab. 31). Bei einer  $10^{-6}$  M-Lösung in PBS (Tab. 29) sind die Maxima beider Verbindungen hingegen fast gleich (Verbindung **75**:  $\lambda_{Em} = 399$  nm,  $I_{rel} = 90$  und Verbindung **76**:  $\lambda_{Em} = 401$  nm,  $I_{rel} = 41$ ) und den Werten der Isomere mit 6,6'-Stellung (z. B. Verbindung **60**:  $\lambda_{Em} = 396$  nm,  $I_{rel} = 29$ ; Kap. 2.2.3, Tab. 25) ähnlich.

Das *N,N'*-verbrückte 2,2'-Bisbenzimidazol (Verbindung **80**) zeigt bei einer  $10^{-6}$  M-Lösung in PBS mit  $\lambda_{Em} = 405$  nm ( $I_{rel} = 51$ ) (Tab. 29) ein zu kleineren Wellenlängen verschobenes Emissionsmaximum als das dimethylierte Isomer mit 5,5'-Stellung der phenolischen Hydroxygruppen (Verbindung **55**:  $\lambda_{Em} = 421$  nm,  $I_{rel} = 9$ ; Kap. 2.2.3, Tab. 25). Die Intensität der Fluoreszenz ist dagegen höher als die der Verbindung mit 6,6'-Stellung (Verbindung **60**:  $\lambda_{Em} = 396$  nm,  $I_{rel} = 29$ ; Kap. 2.2.3, Tab. 25).

Die 2,2'-überbrückten Benzimidazole (Verbindungen **82** und **83**) zeigen die Emissionsmaxima mit der größten Bandenverschiebung zu höheren Wellenlängen. Mit einem Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{Em} = 450$  nm in MeOH (Tab. 28) zeigt sich Verbindung **83** bei ähnlichen Wellenlängen wie DAPI ( $\lambda_{Em} = 454$  nm; Tab. 32). Die Bandenverschiebung ist im LM PBS nicht so stark wie in MeOH ausgeprägt: Eine  $10^{-5}$  M-Lösung der Verbindung **83** zeigt mit  $\lambda_{Em} = 485$  nm ( $I_{rel} = 14$ ) (Tab. 29) ein Emissionsmaximum bei kleineren Wellenlängen als DAPI ( $5 \cdot 10^{-5}$  M in PBS:  $\lambda_{Em} = 515$  nm,  $I_{rel} = 38$ ; Tab. 32). Die Fluoreszenzintensitäten der Verbindungen **82** und **83** sind allerdings sehr gering, insbesondere in dem für die Untersuchungen an Zellen interessanten LM PBS.

**Tab. 28:** Fluoreszenzdaten weiterer ausgewählter Verbindungen in MeOH; Verbindungen **71-76** (Stellungsisomeregemische), Verbindung **80** (*N,N'*-verbrücktes BBI), Verbindungen **82-83** (2,2'-überbrückte Benzimidazole)

Verbindung	R = R' / R, R' / R	c in mol·L <sup>-1</sup>	λ <sub>A</sub> in nm	λ <sub>Em</sub> in nm	I <sub>rel</sub>
71	CH <sub>2</sub> C≡CH	10 <sup>-5</sup>	341	406	1.159
71	CH <sub>2</sub> C≡CH	10 <sup>-6</sup>	341	405	129
72	4-Methylbenzyl	10 <sup>-5</sup>	335	401	862
72	4-Methylbenzyl	10 <sup>-6</sup>	334	400	98
73	Phenyl, H	10 <sup>-5</sup>	337	405	1.160
73	Phenyl, H	10 <sup>-6</sup>	337	405	10
74	3-Pyridinyl, H	10 <sup>-5</sup>	346	412	214
74	3-Pyridinyl, H	10 <sup>-6</sup>	345	412	24
75	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , H	10 <sup>-6</sup>	343	395	131
76	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10 <sup>-6</sup>	331	400	163
80	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	10 <sup>-5</sup>	354	406	1.160
80	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	10 <sup>-6</sup>	354	405	126
82	H	10 <sup>-5</sup>	303	446	107
82	H	10 <sup>-6</sup>	302	445	12
83	OH	10 <sup>-5</sup>	301	450	43
83	OH	10 <sup>-6</sup>	301	450	6

**Tab. 29:** Fluoreszenzdaten weiterer ausgewählter Verbindungen in PBS; Verbindungen **71-76** (Stellungsisomeregemische), Verbindung **80** (*N,N'*-verbrücktes BBI), Verbindungen **82-83** (2,2'-überbrückte Benzimidazole)

Verbindung	R = R' / R, R' / R	c in mol·L <sup>-1</sup>	λ <sub>A</sub> in nm	λ <sub>Em</sub> in nm	I <sub>rel</sub>
71	CH <sub>2</sub> C≡CH	10 <sup>-5</sup>	328	410	87
71	CH <sub>2</sub> C≡CH	10 <sup>-6</sup>	328	410	11
72	4-Methylbenzyl	10 <sup>-5</sup>	326	403	23
72	4-Methylbenzyl	10 <sup>-6</sup>	326	402	18
73	Phenyl, H	10 <sup>-5</sup>	336	406	49
73	Phenyl, H	10 <sup>-6</sup>	336	410	6

Verbindung	R = R' / R, R' / R	c in mol·L <sup>-1</sup>	λ <sub>A</sub> in nm	λ <sub>Em</sub> in nm	I <sub>rel</sub>
74	3-Pyridinyl, H	10 <sup>-5</sup>	341	416	50
74	3-Pyridinyl, H	10 <sup>-6</sup>	340	418	6
75	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , H	10 <sup>-6</sup>	332	399	90
76	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10 <sup>-6</sup>	319	401	41
80	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	10 <sup>-5</sup>	350	405	176
80	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	10 <sup>-6</sup>	366	405	51
82	H	10 <sup>-4</sup>	296	467	25
82	H	10 <sup>-5</sup>	295	465	5
83	OH	10 <sup>-5</sup>	300	485	14

**Tab. 30:** Fluoreszenzdaten weiterer ausgewählter Verbindungen in 0,1 M NaOH; Verbindungen **71-76** (Stellungsisomerengemische), Verbindung **80** (*N,N'*-verbrücktes BBI), Verbindungen **82-83** (2,2'-überbrückte Benzimidazole)

Verbindung	R = R' / R, R' / R	c in mol·L <sup>-1</sup>	λ <sub>A</sub> in nm	λ <sub>Em</sub> in nm	I <sub>rel</sub>
71	CH <sub>2</sub> C≡CH	10 <sup>-5</sup>	359	490	61
71	CH <sub>2</sub> C≡CH	10 <sup>-6</sup>	358	490	7
72	4-Methylbenzyl	10 <sup>-5</sup>	354	472	180
72	4-Methylbenzyl	10 <sup>-6</sup>	352	476	19
73	Phenyl, H	10 <sup>-4</sup>	365	487	41
73	Phenyl, H	10 <sup>-5</sup>	363	487	4
74	3-Pyridinyl, H	10 <sup>-4</sup>	384	490	9
75	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , H	10 <sup>-6</sup>	359	464	27
76	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10 <sup>-6</sup>	345	488	23
80	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	10 <sup>-5</sup>	386	482	171
80	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	10 <sup>-6</sup>	383	486	12
82	H	10 <sup>-4</sup>	_*	_*	_*
83	OH	10 <sup>-4</sup>	300	497	9

\* Für die Verbindung **82** können in 0,1 M NaOH in einer Konzentration von 10<sup>-4</sup> M weder I<sub>rel</sub> noch λ<sub>Em</sub> und damit auch nicht λ<sub>A</sub> mit dem Fluorimeter bestimmt werden.

**Tab. 31:** Fluoreszenzdaten weiterer ausgewählter Verbindungen in 0,1 M HCl; Verbindungen **71-76** (Stellungsisomeregemische), Verbindung **80** (*N,N'*-verbrücktes BBI), Verbindungen **82-83** (2,2'-überbrückte Benzimidazole)

Verbindung	R = R' / R, R' / R	c in mol·L <sup>-1</sup>	λ <sub>A</sub> in nm	λ <sub>Em</sub> in nm	I <sub>rel</sub>
<b>71</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	10 <sup>-4</sup>	331	436	29
<b>71</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	10 <sup>-5</sup>	331	436	5
<b>72</b>	4-Methylbenzyl	10 <sup>-4</sup>	341	450	20
<b>72</b>	4-Methylbenzyl	10 <sup>-5</sup>	338	445	4
<b>73</b>	Phenyl, H	10 <sup>-4</sup>	356	449	32
<b>73</b>	Phenyl, H	10 <sup>-5</sup>	355	448	5
<b>74</b>	3-Pyridinyl, H	10 <sup>-4</sup>	355	450	12
<b>75</b>	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , H	10 <sup>-5</sup>	348	446	41
<b>75</b>	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , H	10 <sup>-6</sup>	346	445	6
<b>76</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10 <sup>-5</sup>	333	450	5
<b>80</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	10 <sup>-5</sup>	371	445	57
<b>82</b>	H	10 <sup>-4</sup>	_*	_*	_*
<b>83</b>	OH	10 <sup>-4</sup>	300	491	9

\* Für die Verbindung **82** können in 0,1 M HCl in einer Konzentration von 10<sup>-4</sup> M weder I<sub>rel</sub> noch λ<sub>Em</sub> und damit auch nicht λ<sub>A</sub> mit dem Fluorimeter bestimmt werden.

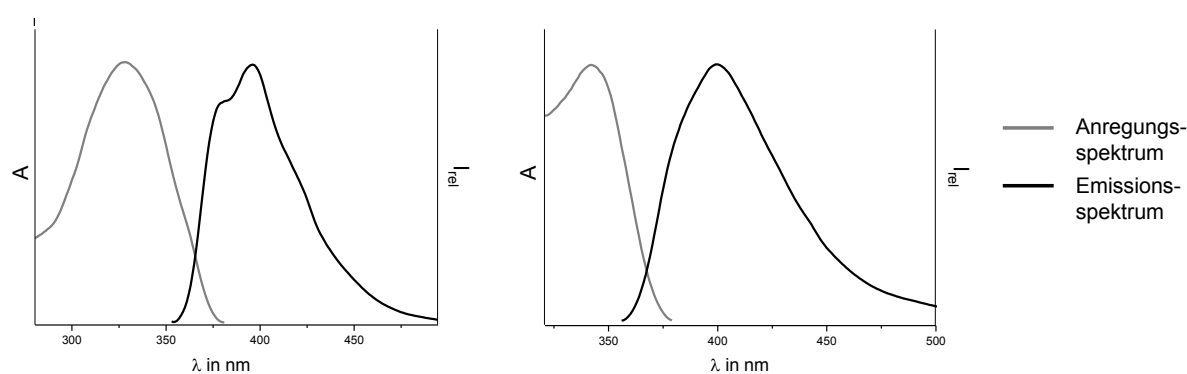
**Tab. 32:** Fluoreszenzdaten von DAPI

LM	c in 10 <sup>-5</sup> mol·L <sup>-1</sup>	λ <sub>A</sub> in nm	λ <sub>Em</sub> in nm	I <sub>rel</sub>
<b>MeOH</b>	1,0	344	454	965
<b>PBS</b>	5,0	327	515	38
<b>0,1 M NaOH</b>	1,0	336	450	42
<b>0,1 M HCl</b>	1,0	341	487	19

DAPI hat in allen vier LM deutlich > 400 nm gelegene Emissionsmaxima, insbesondere in PBS ist die Lage des Emissionsmaximums zu höheren Wellenlängen verschoben (Tab. 32). Die Fluoreszenzintensitäten sind im alkalischen und sauren Milieu sowie in PBS gegenüber dem I<sub>rel</sub>-Wert in MeOH deutlich geringer. Der niedrige I<sub>rel</sub>-Wert in PBS zeigt sich, obwohl in PBS bereits bei einer höheren Konzentration als in den anderen drei LM gemessen wird.

### 2.2.4 Stokesverschiebung

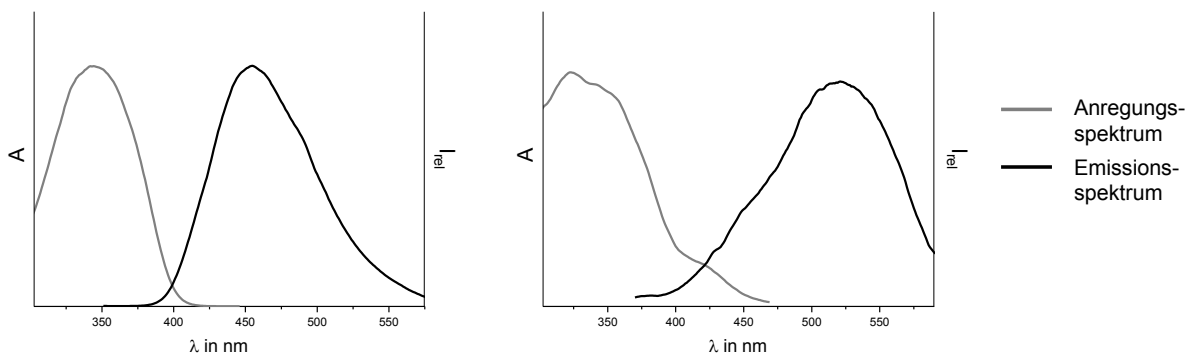
Im Allgemeinen ist die absorbierte Energie größer als die bei der Emission frei werdende. Da sich Energie und Wellenlänge umgekehrt proportional zueinander verhalten, ist das Anregungsspektrum im Vergleich zum Absorptionsspektrum zu höheren Wellenlängen verschoben. Diese Beobachtung kann mit Hilfe der Stokesverschiebung („Stokes Shift“) dargestellt werden. Aus den erhaltenen Daten der Anregungs- und Emissionsspektren kann die Stokesverschiebung dargestellt werden. Dabei wird die Höhe der Absorption ( $A$ ) beziehungsweise die relative Intensität der Fluoreszenz ( $I_{\text{rel}}$ ) gegen die Wellenlänge ( $\lambda$ ) aufgetragen. Bei kleineren Wellenlängen befindet sich die Absorptionskurve des Anregungsspektrums und bei höheren Wellenlängen die Emissionskurve.



**Abb. 81:** Stokesverschiebung der Verbindung **61**: Gegenüberstellung der Anregungs- und Emissionsspektren in MeOH ( $10^{-5}$  M) (links) und in PBS ( $10^{-4}$  M) (rechts); dabei ist  $A$  die Höhe der Absorption,  $I_{\text{rel}}$  die relative Intensität der Fluoreszenz und  $\lambda$  die Wellenlänge

Die neu synthetisierten Bisbenzimidazole sollen eine möglichst große Stokesverschiebung aufweisen, damit in Zellaufnahmen die Fluoreszenzemission einfach von der Anregungsstrahlung separiert werden kann. Verbindung **61** stellt einen Vertreter der Verbindungen mit 6,6'-Stellung der phenolischen Hydroxygruppen dar, die gegenüber den Verbindungen mit 5,5'-Stellung deutlich höhere Werte der Intensitäten in den UV- und fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen zeigten.

In Abb. 81 ist eine ähnliche Stokesverschiebung in PBS wie in MeOH erkennbar. Zum Erreichen der gleichen Fluoreszenzintensität ist in PBS jedoch eine 10fach höhere Konzentration als für die Messung in MeOH nötig ( $c = 10^{-5}$  M in MeOH mit  $I_{\text{rel}} = 1.633$  und  $c = 10^{-4}$  M in PBS mit  $I_{\text{rel}} = 1.732$ ; Kap. 2.2.3, Tab. 24 und Tab. 25).



**Abb. 82:** Stokesverschiebung von DAPI: Gegenüberstellung der Anregungs- und Emissionsspektren in MeOH ( $10^{-5}$  M) (links) und in PBS ( $5 \cdot 10^{-5}$  M) (rechts); dabei ist A die Höhe der Absorption,  $I_{\text{rel}}$  die relative Intensität der Fluoreszenz und  $\lambda$  die Wellenlänge

Zum Vergleichen und Einschätzen der erhaltenen Werte für die neu synthetisierten BBIs wird auch die Stokesverschiebung von DAPI dargestellt. DAPI zeigt in PBS eine größere Stokesverschiebung als in MeOH (Abb. 82). Allerdings liegt wie bei den BBIs auch bei DAPI eine deutlich geringere Fluoreszenzintensität in PBS als in MeOH vor ( $c = 10^{-5}$  M in MeOH mit  $I_{\text{rel}} = 965$  und  $c = 5 \cdot 10^{-5}$  M in PBS mit  $I_{\text{rel}} = 38$ ; Kap. 2.2.3, Tab. 32).

Die Eignung der Verbindungen für die mikroskopischen Zellbeobachtungen (Kap. 2.3.6) ist u. a. von der Löslichkeit der jeweiligen Substanz in dem für die Zelluntersuchungen verwendeten Medium, von der Aufnahme der Substanz in die Zelle und von den fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften abhängig. Weitere Einflussfaktoren stellen die gewählten Versuchsbedingungen wie die Auswahl der Anregungswellenlänge und des Filtertyps dar.

Aufgrund der erhaltenen Fluoreszenzdaten und insbesondere aufgrund der hier dargestellten Stokesverschiebungen sind bei den neu synthetisierten BBIs kleinere Fluoreszenzintensitäten in den mikroskopischen Zellbeobachtungen als bei DAPI zu erwarten. Für die Vertreter der BBIs sind bei den Verbindungen mit 6,6'-Stellung der phenolischen Hydroxygruppen größere Fluoreszenzintensitäten als bei den Verbindungen mit 5,5'-Stellung wahrscheinlich.

## 2.3 Pharmakologische Untersuchungen

Die antiproliferativen Eigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen werden an verschiedenen Zelllinien bestimmt. Dafür werden die hormonabhängige MCF-7-Zelllinie und die hormonunabhängige MDA-MB-231-Zelllinie verwendet.

Weiterhin werden die Substanzen auf estrogene und antiestrogene Eigenschaften im Transaktivierungsassay an U2OS-Zellen getestet. Deshalb wird auch an den U2OS-Zellen der Einfluss der Verbindungen auf das Zellwachstum getestet.

Des Weiteren werden die Fähigkeiten zur Herabregulation des ER $\alpha$  in MCF-7-Zellen sowie die Affinität zu ER $\alpha/\beta$  in einem kompetitiven Bindungsassay untersucht.

Mit Hilfe von Molecular Modelling sollen Informationen zur Raumstruktur und Interaktion mit der LBD des ER $\alpha$  erhalten werden.

Um das Verhalten der neu synthetisierten BBIs in Zellkultur und ihre Lokalisation nach Aufnahme in die Zelle bestimmen zu können, werden pharmakologische Untersuchungen durchgeführt und Fotos der inkubierten Zellen aufgenommen.

Für die pharmakologischen Untersuchungen werden die Verbindungen mit den phenolischen Hydroxygruppen, d. h. die Verbindungen **54-83**, eingesetzt.

Die detaillierten Beschreibungen der pharmakologischen Methoden erfolgen in den anschließenden Kapiteln (Kap. 2.3.1 - Kap. 2.3.7). Die genauen Arbeitsvorschriften befinden sich im experimentellen Teil (Kap. 5.3).

### 2.3.1 Verwendete Zelllinien

#### MCF-7-Zelllinie

Die MCF-7-Zelllinie wurde 1970 aus dem Pleuraerguss einer Patientin isoliert, deren metastasiertes, duktales Mammaadenokarzinom zuvor drei Jahre mit Hormon- und Radiotherapie behandelt worden war<sup>[88]</sup>. MCF-7-Zellen enthalten den ER und sind in ihrem Wachstum estrogenabhängig. Sie besitzen neben dem ER auch Rezeptoren für Androgene, Progesteron und Glukokortikoide<sup>[89]</sup>. Aufgrund ihres hohen Hormonrezeptorgehalts wird die MCF-7-Zelllinie als hormonabhängig (ER+) bezeichnet<sup>[90, 91]</sup>. Dabei wird ER $\alpha$  in großer Menge exprimiert, während ER $\beta$  lediglich in geringen Mengen vorhanden ist<sup>[92]</sup>.

### MDA-MB-231-Zelllinie

Die MDA-MB-231-Zelllinie wurde 1974 etabliert. Die Zellen wurden aus einem malignen Pleuraerguss einer Patientin mit metastasierendem, duktalem Mammakarzinom gewonnen, das zuvor drei Wochen mit den Chemotherapeutika 5-Fluoruracil und Cyclophosphamid behandelt wurde<sup>[93]</sup>. Aufgrund des Fehlens vom ER $\alpha$ -Protein wird die MDA-MB-231-Zelllinie als hormonunabhängig (ER-) bezeichnet<sup>[94, 95]</sup>.

### U2OS-Zelllinie

Die humanen Osteosarkomzellen, isoliert aus dem Knochengewebe eines 15 Jahre alten Mädchens mit einem mäßig differenzierten Sarkom der Tibia, wurden 1964 etabliert<sup>[96]</sup>. Es handelt sich um Epithelzellen, die zum Einbringen (Transfektion) von Fremd-DNA und -RNA geeignet sind.

### **2.3.2 Testung auf Hemmung der Zellproliferation**

Die antiproliferativen Eigenschaften einer Verbindung können mit Hilfe von in vitro Zytotoxizitätstests bestimmt werden. Hierzu wird der Kristallviolettassay eingesetzt, mit dessen Hilfe die Zellmasse ermittelt wird<sup>[97]</sup>. Für die Testung auf Hemmung der Zellproliferation werden im Rahmen dieser Arbeit MCF-7-, MDA-MB-231- sowie U2OS-Zellen verwendet. Dabei werden der Einfluss der Stellung der phenolischen Hydroxygruppen und der Substitution des Stickstoffs des Benzimidazolrings sowie der Einfluss der *N,N'*-Verbrückung und der Variation der 2,2'-Überbrückung der Benzimidazole auf die Zellproliferation untersucht.

Die Zellen werden in definierter Aussaatdichte in 96-Loch-Kulturplatten ausgesät. Nach dem Anwachsen erfolgt die Substanzzugabe in verschiedenen Konzentrationen. Als Positivkontrolle wird Cisplatin, als Negativkontrolle wird reines LM verwendet. Anschließend wird das Medium abgesaugt. Tote Zellen, die nicht mehr am Boden haften, werden dadurch entfernt. Die Fixierung der bis zum Zeitpunkt des Abstoppens noch lebenden Zellen erfolgt mit Glutardialdehyd. Nach dem Anfärben der Zellen mit Kristallviolett wird die Absorption gemessen. Mit einer zum Zeitpunkt der Substanzzugabe bereits als  $t_0$ -Platte abgestoppten Platte mit unbehandelten Zellen wird in gleicher Weise verfahren. Auf diese Weise wird die initiale Zelldichte ( $C_0$ -Wert) zum Zeitpunkt  $t_0$  ermittelt.



Die Wachstumshemmung ( $T/C_{\text{corr}}$ ) kann nach der folgenden Gleichung errechnet werden:

$$T/C_{\text{corr}} = \frac{T^* - C_0}{C^* - C_0} \cdot 100 \%$$

$T/C_{\text{corr}}$  = prozentuale Wachstumshemmung

$T^*$  = Mittelwert der Absorption der Substanz

$C_0$  = Mittelwert der Absorption zum Zeitpunkt der Substanzzugabe ( $t_0$ )

$C^*$  = Mittelwert der Absorption der Negativkontrolle

Die antiproliferativen Eigenschaften der Verbindungen werden wie folgt interpretiert:

$T/C_{\text{corr}} > 80 \%$	keine antiproliferative Wirkung
$T/C_{\text{corr}} 80-51 \%$	keine nennenswerte antiproliferative Wirkung
$T/C_{\text{corr}} 50-21 \%$	antiproliferative Wirkung
$T/C_{\text{corr}} 20-0 \%$	zytostatische Wirkung
$T/C_{\text{corr}} < 0 \%$	zytotoxische Wirkung

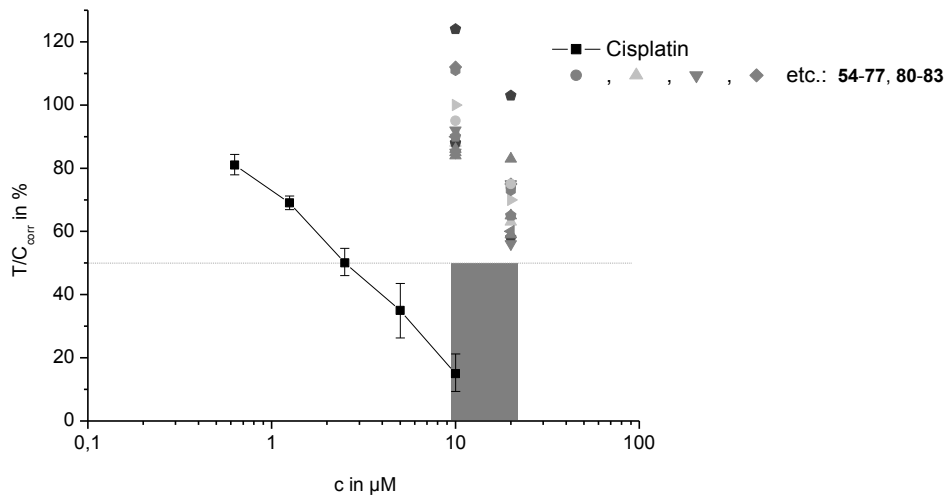
Als zytotoxische Wirkung wird jede negative Beeinflussung des Zellwachstums verstanden.

Die Darstellung der prozentualen Wachstumshemmung erfolgt graphisch durch Auftragen der  $T/C_{\text{corr}}$ -Werte gegen den dekadischen Logarithmus der Substanzkonzentration. Mit Hilfe der Boltzmann-Funktion wird der sigmoidale Kurvenverlauf ermittelt. Als mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) kann diejenige Substanzkonzentration aus der so erhaltenen Kurve errechnet werden, bei der der  $T/C_{\text{corr}}$ -Wert 50 % beträgt.

Mit Hilfe einer Voruntersuchung wird der Einfluss der Verbindungen auf das Zellwachstum betrachtet. Für eine Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes sollen die Substanzen in Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  einen  $T/C_{\text{corr}}$ -Wert  $< 50 \%$  zeigen. Wenn in diesen Konzentrationen keine nennenswerten wachstumshemmenden Eigenschaften an der jeweiligen Zelllinie auftreten, wird auf die Testung niedrigerer Verdünnungen verzichtet.

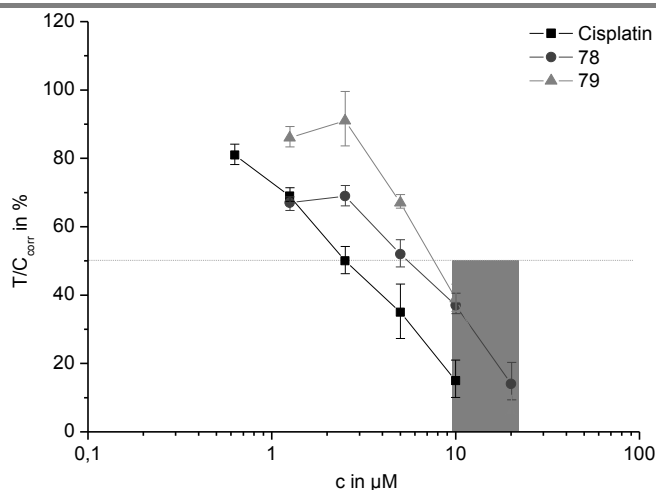
### Testung auf Hemmung der Zellproliferation an der MCF-7-Zelllinie

Die getesteten Verbindungen **54-77** und **80-83** weisen in Konzentrationen bis 20  $\mu\text{M}$  keine nennenswerten wachstumshemmenden Eigenschaften an der MCF-7-Zelllinie auf (Abb. 83).



**Abb. 83:** Darstellung der prozentualen Wachstumshemmung der Verbindungen **54-77** und **80-83** an der MCF-7-Zelllinie

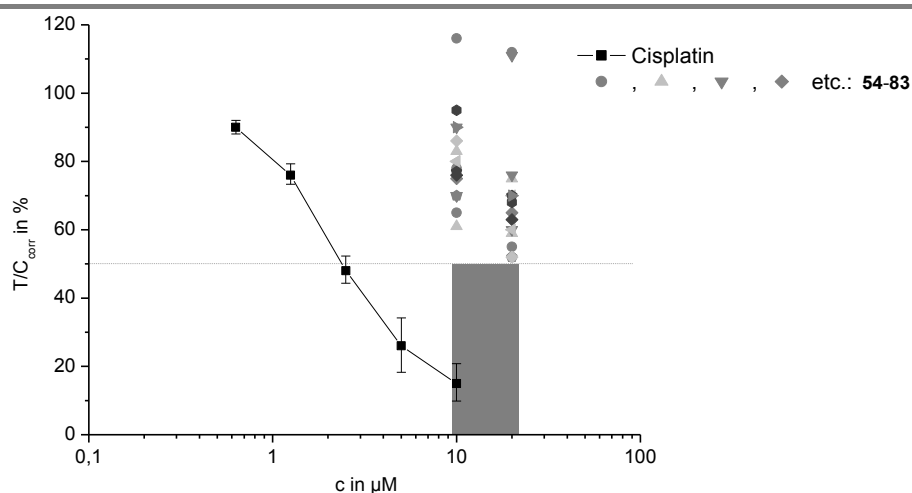
Die Verbindungen **78** und **79** zeigen an den hormonabhängigen MCF-7-Zellen wachstumshemmende Effekte (Verbindung **78**:  $\text{IC}_{50} = 6,2 \mu\text{M}$ , Verbindung **79**:  $\text{IC}_{50} = 8,1 \mu\text{M}$ , Abb. 84). Im Unterschied zu den Verbindungen **54-77** und **80-83** weisen die Verbindungen **78** und **79** je eine *o*-ständige Methoxygruppe zur phenolischen Hydroxygruppe an beiden Benzimidazolringen auf.



**Abb. 84:** Darstellung der prozentualen Wachstumshemmung der Verbindungen **78** ( $\text{IC}_{50} = 6,2 \mu\text{M}$ ) und **79** ( $\text{IC}_{50} = 8,1 \mu\text{M}$ ) an der MCF-7-Zelllinie

### Testung auf Hemmung der Zellproliferation an der MDA-MB-231-Zelllinie

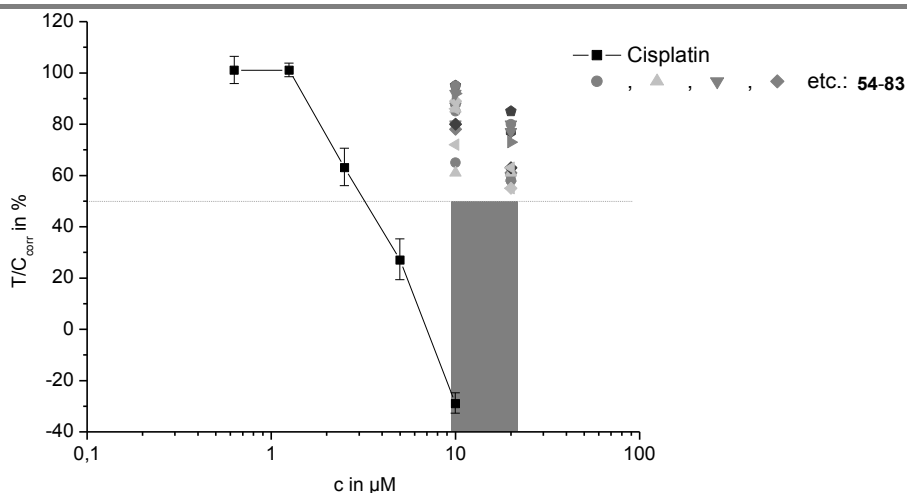
Alle getesteten Verbindungen zeigen in Konzentrationen bis 20  $\mu\text{M}$  keine nennenswerte Wachstumshemmung an der MDA-MB-231-Zelllinie (Abb. 85). Die Verbindungen zeigen unabhängig von der Stellung der phenolischen Hydroxygruppen, der Substitution des Stickstoffs des Benzimidazolrings, der  $N,N'$ -Verbrückung und unabhängig von der Variation der 2,2'-Überbrückung der Benzimidazole keinen Einfluss auf die Zellproliferation.



**Abb. 85:** Darstellung der prozentualen Wachstumshemmung der Verbindungen **54-83** an der MDA-MB-231-Zelllinie

### Testung auf Hemmung der Zellproliferation an der U2OS-Zelllinie

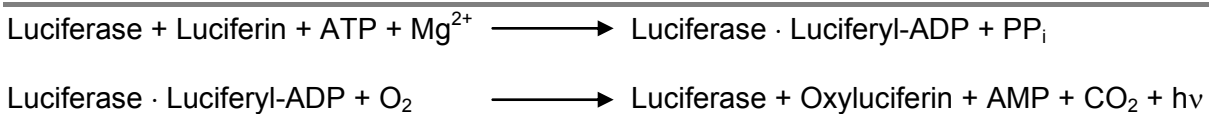
Alle getesteten Verbindungen zeigen in Konzentrationen bis 20  $\mu\text{M}$  keine nennenswerte Wachstumshemmung an der U2OS-Zelllinie (Abb. 86). Dabei spielt der Einfluss der Stellung der phenolischen Hydroxygruppen und der Substitution des Stickstoffs des Benzimidazolrings sowie der Einfluss der  $N,N'$ -Verbrückung und der Variation der 2,2'-Überbrückung der Benzimidazole auf die Zellproliferation keine Rolle.



**Abb. 86:** Darstellung der prozentualen Wachstumshemmung der Verbindungen **54-83** an der U2OS-Zelllinie

### 2.3.3 Bestimmung der estrogenen und antiestrogenen Wirkung

Der Transaktivierungsassay an U2OS-Zellen ermöglicht die *in vitro* Bestimmung der estrogenen beziehungsweise antiestrogenen Wirkung der neu synthetisierten Verbindungen<sup>[98]</sup>. Mittels Transfektion werden das Reporterplasmid p(ERE)<sub>2</sub>luc<sup>+</sup> und das Rezeptorplasmid pSG5-ER $\alpha$  oder pSG5-ER $\beta$  in die Zellen übertragen<sup>[99]</sup>. Nach der Inkubation der Zellen mit den entsprechenden Substanzen wird die Luciferase in Abhängigkeit von der estrogenen Wirkung der Substanz exprimiert<sup>[100]</sup>. Die Aktivität der Luciferase wird nach der Zugabe eines Reagenzes in Form von Lichtemission detektiert.



**Abb. 87:** Chemische Reaktion des Luciferins unter Einfluss der Luciferase führt zur Lichtemission

Eine katalysierte Reaktion, in der Luciferin als Substrat der Luciferase unter Gebrauch von ATP und Sauerstoff dient, führt zur Bildung von Licht (Abb. 87)<sup>[101]</sup>. Die entstehende Lichtmenge ist proportional zur Menge der exprimierten Luciferase und kann mit einem Lumino- meter quantifiziert werden<sup>[102]</sup>. Die Angabe der Lichtausbeute erfolgt in relativen Licht- einheiten (RLU, relative light units) und wird durch im Assay enthaltenes Coenzym A um ein Vielfaches verstärkt<sup>[103]</sup>.

Die agonistische und antagonistische Wirkung der Verbindungen wird in Transaktivierungs- assays ermittelt. Dabei werden sowohl ER $\alpha$  als auch ER $\beta$  eingesetzt, um Aussagen über eine mögliche Präferenz oder Selektivität bezüglich eines ER-Subtypes treffen zu können.

#### Ermittlung der agonistischen Wirkung

Bei der Bestimmung der estrogenen Wirkung wird die Expression der Luciferase in Abhängigkeit von der Substanz gemessen. Hierzu erfolgt die Inkubation der U2OS-Zellen mit den entsprechenden Substanzen. Als Negativkontrolle werden Zellen mit reinem LM, als Positivkontrolle mit E2 inkubiert.

Um die Testergebnisse miteinander vergleichen zu können, werden die ermittelten Werte als relative Luciferaseaktivierung in Bezug auf die maximale Aktivierung durch E2 ausgedrückt und um den Lösungsmittelwert korrigiert. Es wird mit Hilfe der Boltzmann-Funktion der sigmoidale Kurvenverlauf ermittelt.

Die durch E2 (Positivkontrolle) resultierende maximale Aktivierung wird gleich 100 % und der Lösungsmittelwert (Negativkontrolle) gleich 0 % gesetzt. Als mittlere effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ) kann diejenige Substanzkonzentration aus der erhaltenen Kurve errechnet werden, bei der die relative Aktivierung 50 % beträgt.

Die relative Aktivierung kann nach der folgenden Gleichung berechnet werden:

$$\text{relative Aktivierung} = \frac{\text{Messwert} - \text{Negativkontrolle}}{\text{Wert}_{E2_{\max}} - \text{Negativkontrolle}} \cdot 100 \%$$

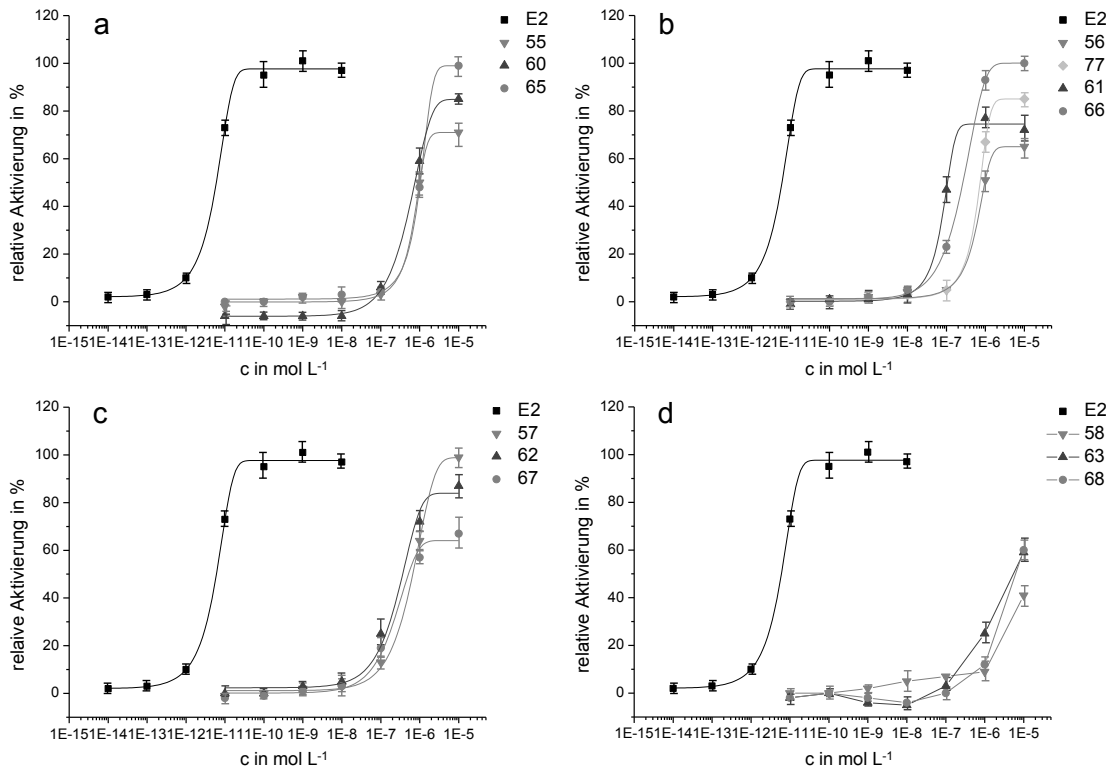
relative Aktivierung	= relative Aktivierung in Prozent
Messwert	= Messwert der Substanz in RLU
Negativkontrolle	= Mittelwert der Negativkontrolle in RLU
<b>Wert</b> <sub>E2<sub>max</sub></sub>	= Mittelwert der maximalen Messwerte von E2 (Positivkontrolle) (Messwerte im Plateau der Boltzmann-Funktion) in RLU

Die graphische Darstellung der Estrogenität erfolgt in Konzentrations-Wirkungs-Kurven durch Auftragen der prozentualen relativen Aktivierung gegen den dekadischen Logarithmus der Substanzkonzentration.

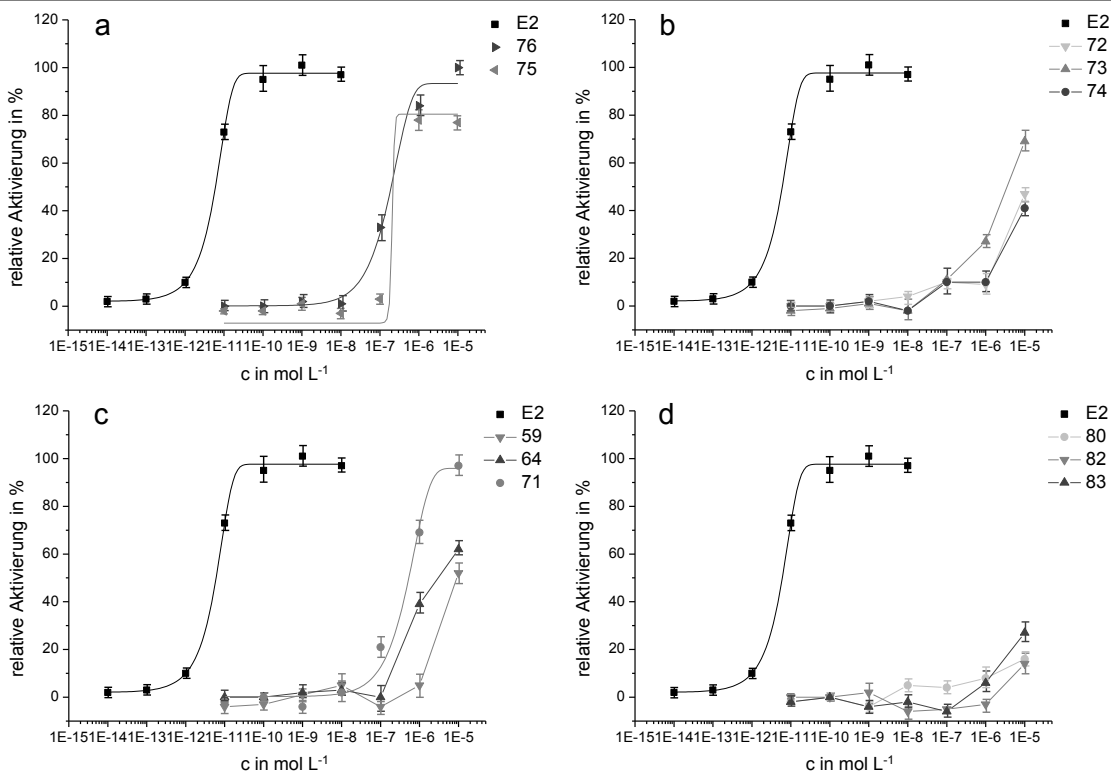
Die durch E2 resultierende maximale Aktivierung von 100 % wird bei einer Konzentration von  $3 \cdot 10^{-10}$  M für  $ER_{\alpha}$  und von  $3 \cdot 10^{-9}$  M für  $ER_{\beta}$  erreicht. E2 bindet sowohl an  $ER_{\alpha}$  als auch an  $ER_{\beta}$ . Dabei zeigen sich folgende estrogene Wirkungen: der  $EC_{50}$ -Wert beträgt  $3 \cdot 10^{-12}$  M für  $ER_{\alpha}$  und  $3 \cdot 10^{-11}$  M für  $ER_{\beta}$ .

#### Ermittlung der agonistischen Wirkung am $ER_{\alpha}$

Im Transaktivierungsassay zeigen die getesteten Verbindungen teilweise estrogene Eigenschaften am  $ER_{\alpha}$ . Dabei ist die estrogene Wirkung der synthetisierten Substanzen schwächer als die des physiologischen Liganden E2: Es ist eine starke Rechtsverschiebung der Konzentrations-Aktivierungs-Kurven gegenüber E2 erkennbar (Abb. 88, Abb. 89). Dabei zeigt die Stellung der phenolischen Hydroxygruppen keinen Einfluss auf die Estrogenität (Abb. 88, Bild a-c). Die Substitution des Stickstoffs des Benzimidazolrings beeinflusst hingegen die Estrogenität. Die Verbindungen mit 1-Methylethylrest zeigen keine estrogene Wirkung (Abb. 88, Bild d).



**Abb. 88:** Darstellung der Estrogenität am ER $\alpha$  ausgewählter Verbindungen



**Abb. 89:** Darstellung der Estrogenität am ER $\alpha$  weiterer ausgewählter Verbindungen

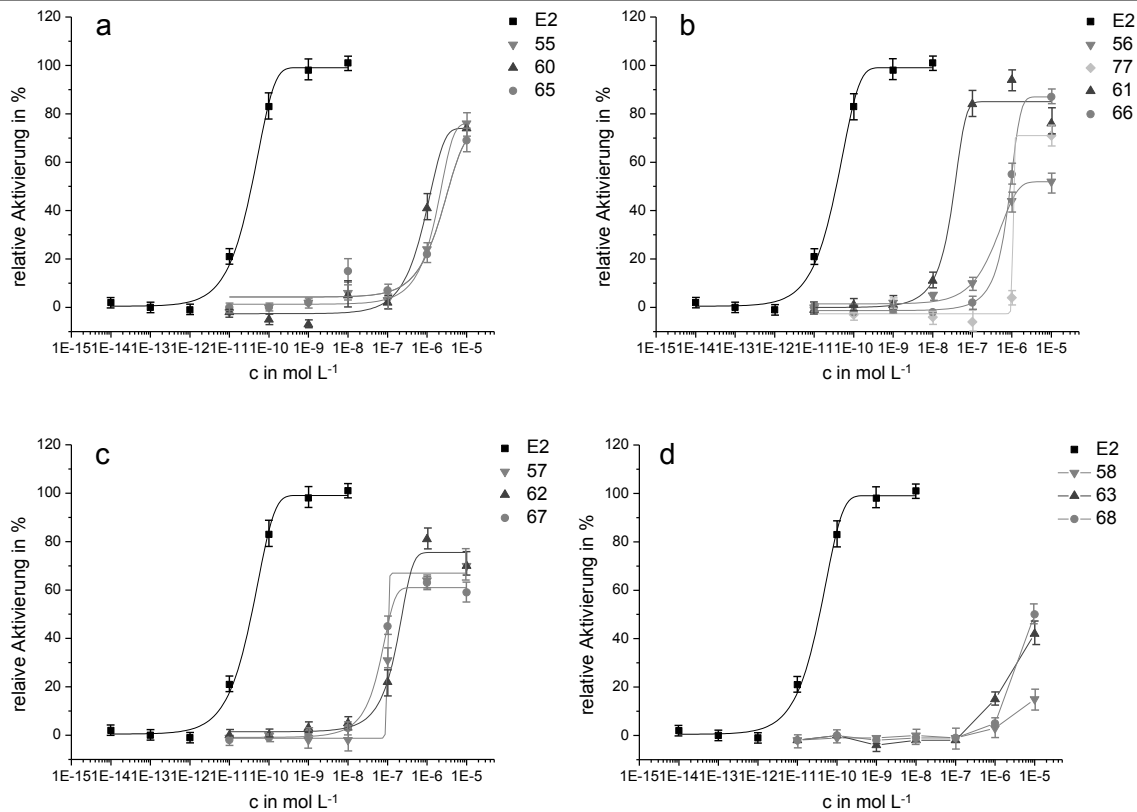
Die Verbindungen **75** und **76** zeigen ähnliche Konzentrations-Wirkungs-Kurven (Abb. 89, Bild a) wie die diethylierten Verbindungen (Abb. 88, Bild b). Der Propargylrest (Verbindungen **59**, **64** und **71**, Abb. 89, Bild c) führt zu einer Abschwächung der Estrogenität. Die Einführung von Resten mit Benzyl- (Verbindung **72**), Phenyl- (Verbindung **73**) oder Pyridinylstruktur (Verbindung **74**) führt zum Verlust der estrogenen Wirkung (Abb. 89, Bild b). Neben der Substitution des Stickstoffs des Benzimidazolrings zeigt auch die Variation des Grundkörpers Einfluss auf die Estrogenität. Sowohl die *N,N'*-verbrückten BBIs (Verbindung **80**) als auch die 2,2'-überbrückten Benzimidazole (Verbindungen **82** und **83**) zeigen keine estrogenen Wirkung (Abb. 89, Bild d).

**Tab. 33:** ER $\alpha$ , Transaktivierungsassay: EC<sub>50</sub>-Werte und relative Aktivierung ausgewählter Verbindungen; Verbindung **57** (5,5'-Stellung), Verbindungen **65**, **66**, **71** und **76** (Stellungsisomeregemische)

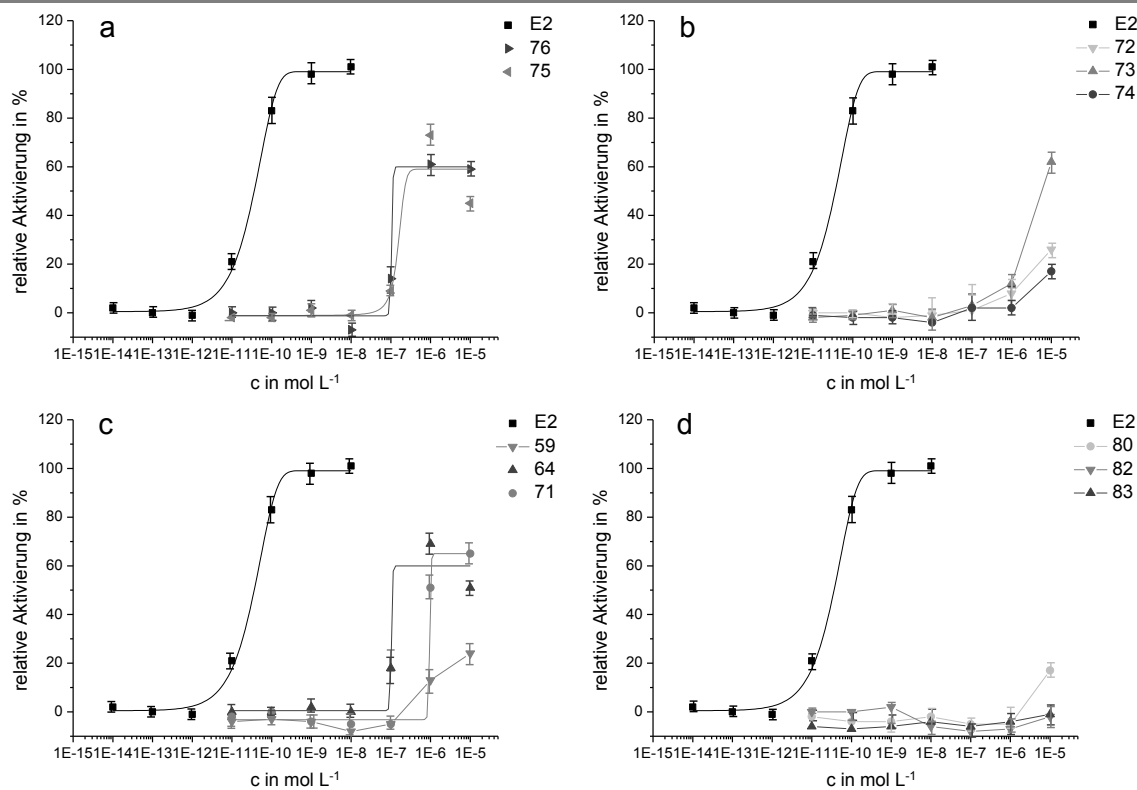
Verbindung	R = R' / R, R'	EC <sub>50</sub> in 10 <sup>-7</sup> M	relative Aktivierung in %
<b>57</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	6,6	99±4
<b>65</b>	CH <sub>3</sub>	10,0	99±4
<b>66</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2,7	100±3
<b>71</b>	CH <sub>2</sub> C≡CH	5,3	97±5
<b>76</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2,0	100±2

#### Ermittlung der agonistischen Wirkung am ER $\beta$

Im Transaktivierungsassay zeigen die getesteten Verbindungen ebenfalls teilweise estrogenen Eigenschaften am ER $\beta$ . Dabei ist die estrogenen Wirkung der synthetisierten Substanzen schwächer als die des physiologischen Liganden E2: Es ist eine starke Rechtsverschiebung der Konzentrations-Aktivierungs-Kurven gegenüber E2 erkennbar. Außerdem liegt eine abgeschwächte maximale Aktivierung vor. Die diethylierte Verbindung **61** und die BBIs mit Propylrest (Verbindungen **57**, **62** und **67**, Abb. 90, Bild c) zeigen eine stärkere estrogenen Wirkung am ER $\beta$  als am ER $\alpha$ . Beispielsweise zeigt Verbindung **61** an ER $\beta$  einen EC<sub>50</sub>-Wert von 3,6·10<sup>-8</sup> M und eine relative Aktivierung von 82±8 % (Abb. 90, Bild b), an ER $\alpha$  beträgt der EC<sub>50</sub>-Wert lediglich 1,1·10<sup>-7</sup> M und die relative Aktivierung 75±5 % (Abb. 88, Bild b). Im Vergleich zum ER $\alpha$  ist beim ER $\beta$  bei allen weiteren getesteten Verbindungen eine Abschwächung erkennbar (Abb. 90, Abb. 91).



**Abb. 90:** Darstellung der Estrogenität am ERβ ausgewählter Verbindungen

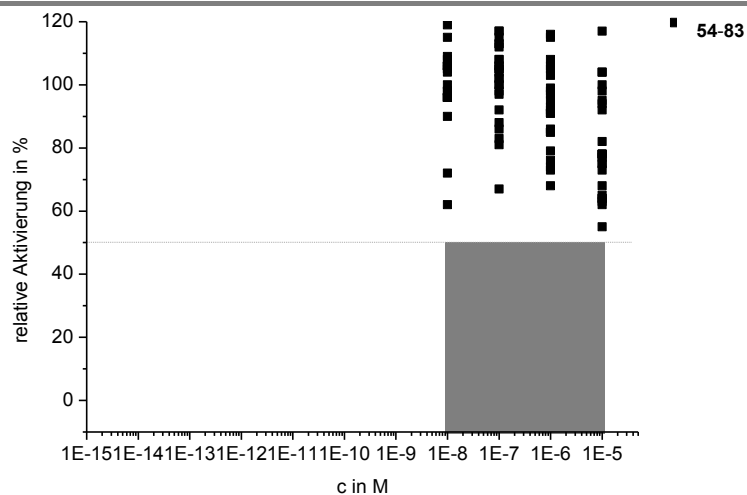


**Abb. 91:** Darstellung der Estrogenität am ERβ weiterer ausgewählter Verbindungen



### Ermittlung der antagonistischen Wirkung

Die antagonistische Potenz einer Verbindung wird durch die hervorgerufene Hemmung der E2-bedingten Luciferaseexpression in Abhängigkeit von der Substanzkonzentration ausgedrückt. Um diese kompetitive Hemmung der Luciferaseexpression zu untersuchen, erfolgt die Inkubation der U2OS-Zellen mit einer konstanten Konzentration E2 ( $ER\alpha$ :  $3 \cdot 10^{-11}$  M,  $ER\beta$ :  $3 \cdot 10^{-10}$  M). Zusätzlich werden die entsprechenden Substanzen zugegeben. Die Aufarbeitung erfolgt analog der Bestimmung der agonistischen Wirkung. Es wird die verbleibende E2-induzierte Aktivität betrachtet.



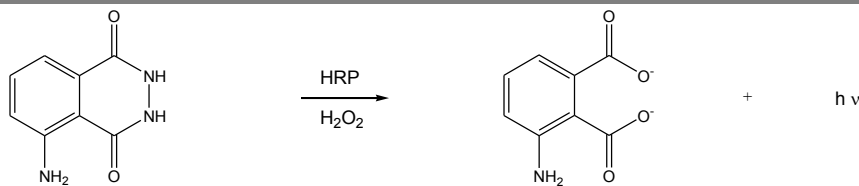
**Abb. 92:** Darstellung der Antiestrogenität an  $ER\beta$  der Verbindungen **54-83**

Mit Hilfe einer Voruntersuchung wird geprüft, ob die Verbindungen antiestrogene Eigenschaften zeigen. Für eine Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes sollen die Substanzen in Konzentrationen von  $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M in den Konzentrations-Wirkungs-Kurven Werte  $> 50\%$  zeigen. Dieser Bereich wird in Abb. 92 durch das grauschraffierte Feld dargestellt. Wenn in diesen Konzentrationen keine nennenswerten antiestrogenen Eigenschaften auftreten, wird auf die Testung niedrigerer Verdünnungen verzichtet. Die getesteten Verbindungen zeigen weder an  $ER\alpha$  (ohne Abb.) noch an  $ER\beta$  (Abb. 92) antagonistische Wirkung.

### 2.3.4 Herabregulation des ER $\alpha$

Die ER-Liganden beeinflussen den ER-Gehalt in charakteristischer Weise. Das endogen vorkommende Estrogen E2 kann den ER $\alpha$  herabregulieren <sup>[12, 104, 105]</sup>. Ob die neu synthetisierten BBIs ebenfalls Potential zeigen, eine ER $\alpha$ -Herabregulation (engl.: ER $\alpha$ -down-regulation) durchzuführen, soll mit Hilfe eines Enzymimmunoassays überprüft werden <sup>[106]</sup>.

Die hormonabhängigen MCF-7-Zellen werden mit ausgewählten Testsubstanzen inkubiert. Anschließend wird der ER $\alpha$ -Gehalt der Zellen untersucht. Dafür werden die Zellproteine elektrophoretisch aufgetrennt, mit Hilfe des Western Blots auf eine Membran übertragen und das ER $\alpha$ -Protein neben dem Aktin-Protein in einem Enzymimmunoassay durch Auslösen einer Chemolumineszenzreaktion detektiert. Dazu erfolgt die Zugabe der murinen Aktin- und ER $\alpha$ -Antikörper. Diese primären Antikörper werden mit einem sekundären Antikörper markiert. Der sekundäre Antikörper ist ein mit einer Peroxidase, der „horseradish peroxidase“ (HRP), gekoppelter Anti-Maus-IgG.



**Abb. 93:** Chemolumineszenzreaktion von Luminol, katalysiert durch die Peroxidase HRP

Nach entsprechender Aufarbeitung erfolgt die Zugabe eines Substrates, das Luminol und Wasserstoffperoxid enthält. Die vorhandene HRP katalysiert die Umsetzung des Luminols in dessen oxidierte Form unter Emission von Licht (Chemolumineszenzreaktion, Abb. 93). Mit Hilfe eines optischen Kamerasystems kann die Lichtemission bei 430 nm detektiert werden. Die Proteinbanden von ER $\alpha$  und Aktin werden auf diese Weise visualisiert. Ihre Intensität korreliert mit dem jeweiligen Proteingehalt. Aktin dient dabei als interner Standard, es kommt als Strukturprotein in allen eukaryotischen Zellen vor. Als Positivkontrolle wird E2 eingesetzt. Zur Negativkontrolle dient reines LM. Eine Quantifizierung der Herabregulation des ER $\alpha$  wird im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.



### 2.3.5 Molecular Modelling

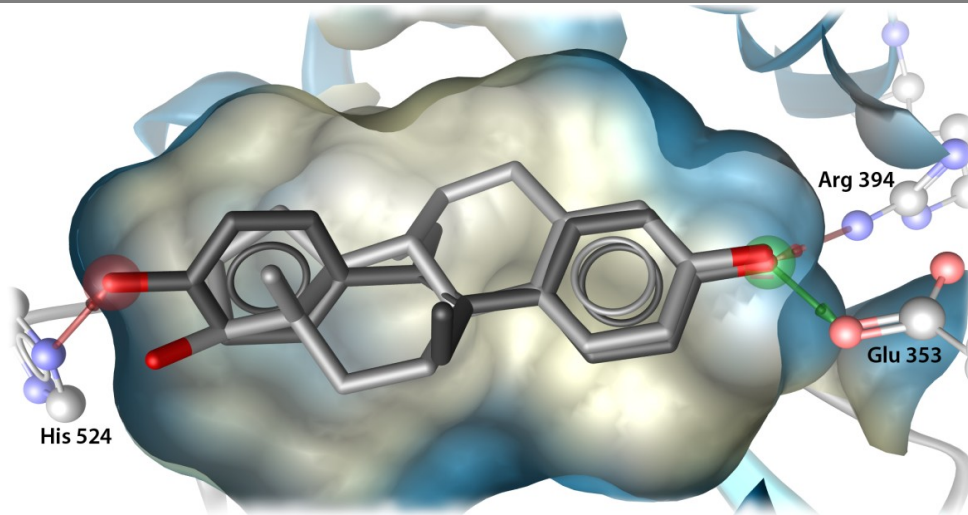
Die Ermittlung der Raumstruktur der neu synthetisierten BBIs und die mögliche Interaktion mit dem ER $\alpha$  können mit Hilfe von Molecular Modelling untersucht und dargestellt werden.

E2 weist einen O-O-Abstand von 11 Å auf. Der Abstand der Hydroxygruppen des DES beträgt 12 Å. Bei den neu synthetisierten BBIs zeigen sich O-O-Abstände von ca. 13 Å (Verbindungen **54-77**). Aufgrund der Molekülstruktur ist bei den BBIs im Vergleich zum physiologischen Liganden E2 eine ähnliche Orientierung der Hydroxygruppen mit ähnlichen Wechselwirkungen zu den entsprechenden Zielstrukturen in der ER $\alpha$ -Bindungstasche zu erwarten. Die phenolische Hydroxygruppe von E2 geht Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Glutamin 353 (Glu 353) und Arginin 394 (Arg 394) ein, die Hydroxygruppe in Position 17 bildet eine Wasserstoffbrücke zur Aminosäure Histidin 524 (His 524) aus (Abb. 95).

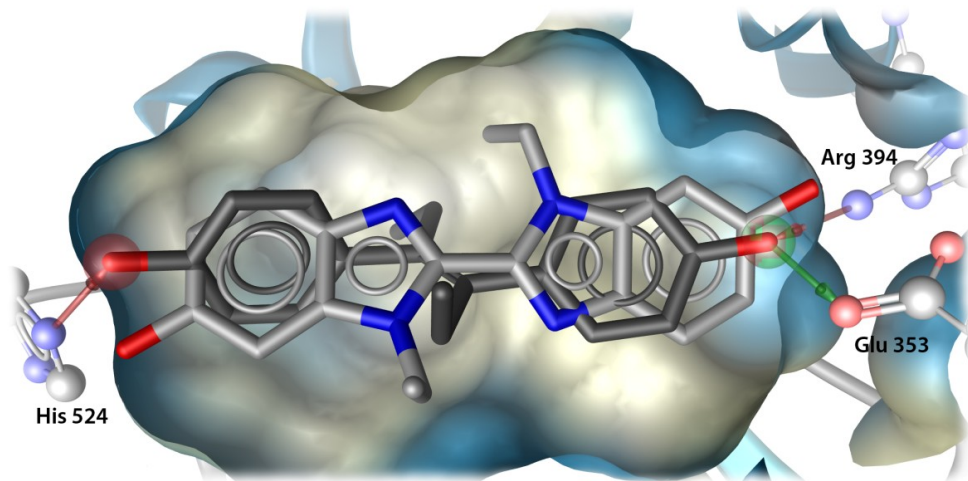
Abb. 95 zeigt die Röntgenkristallstruktur von E2 in der LBD des ER $\alpha$ . In der Überlagerung mit E2 ist DES dargestellt, an dessen Bindungsmodus sich die im Rahmen dieser Arbeit neu synthetisierten BBIs (Verbindungen **54-77**) anlehnen (Kap. 1.2.2).

Für die Untersuchungen ausgewählter Verbindungen mittels Molecular Modelling werden die Verbindungen **61** und **75** herangezogen. Sie haben keine nennenswerten wachstumshemmenden Effekte (Kap. 2.3.2), zeigen estrogene Wirkung (Kap. 2.3.3) und sind fähig, den ER $\alpha$  herabzuregulieren (Kap. 2.3.4).

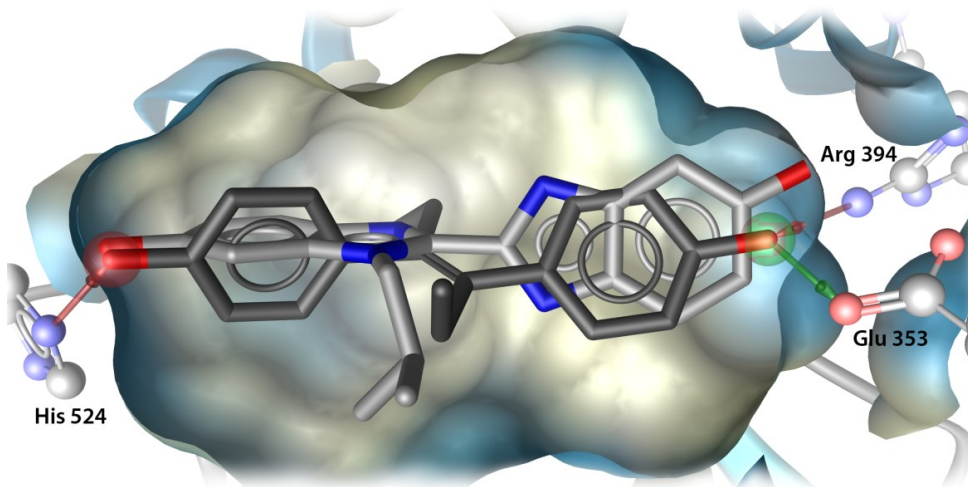
In der Überlagerung von DES und Verbindung **61** und **75** ist erkennbar, dass bestimmte chemische Strukturen mit gleicher Orientierung in der LBD liegen (Abb. 96, Abb. 97). Aufgrund der abweichenden Abstände der Hydroxygruppen und der geringeren Lipophilie der Verbindungen im lipophilen Bereich der Bindungstasche können Unterschiede in der Rezeptoraffinität erklärt werden (Kap. 2.3.6).



**Abb. 95:** Röntgenkristallstruktur von E2 (hellgrau) in der LBD des ER $\alpha$ , Überlagerung mit DES (dunkelgrau)



**Abb. 96:** Röntgenkristallstruktur der LBD des ER $\alpha$ , Überlagerung von DES (dunkelgrau) und Verbindung 61 (hellgrau)



**Abb. 97:** Röntgenkristallstruktur der LBD des ER $\alpha$ , Überlagerung von DES (dunkelgrau) und Verbindung 75 (hellgrau)

### 2.3.6 Rezeptorbindung

Die Bestimmung der RBA in einem kompetitiven Bindungsassay kann Aufschlüsse darüber geben, ob der Transkriptionsaktivierung durch die neu synthetisierten BBIs eine dem E2 ähnliche Rezeptoraffinität zugrunde liegt. Als Vergleich wird hierfür tritiummarkiertes E2 ( $[^3\text{H}]\text{-E2}$ ) als bekannter radioaktiver ER-Ligand eingesetzt<sup>[107]</sup>. Der radioaktiv markierte ER-Ligand und die jeweilige Testsubstanz konkurrieren nach gleichzeitiger Inkubation um die Bindungsstelle am Rezeptor. Dabei werden jeweils verschiedene Konzentrationen der Testsubstanz mit einer konstanten Konzentration  $[^3\text{H}]\text{-E2}$  versetzt. In Waschvorgängen werden die nicht gebundenen Moleküle entfernt und das im Rezeptor gebundene  $[^3\text{H}]\text{-E2}$  mit EtOH extrahiert. Anschließend wird mit Hilfe eines  $\beta$ -Strahlers der Anteil des gebundenen  $[^3\text{H}]\text{-E2}$  im Szintillationszähler quantifiziert. Je kleiner die dabei im Rezeptor gebundene Menge  $[^3\text{H}]\text{-E2}$  ist, umso größer ist die Rezeptoraffinität der Testsubstanz. Als Positivkontrolle und zum Erstellen einer Standardkurve wird E2 separat mitbestimmt. Zur Negativkontrolle wird reines LM eingesetzt. Eine Unterscheidung zwischen Agonisten und Antagonisten ist durch dieses Verfahren nicht möglich.

Bindungsaffinitäten können *in vitro* in einem Ganzzellassay oder an isolierten Rezeptoren untersucht werden. In zellbasierten Assays spielen verschiedene Einflussfaktoren wie die Aufnahme der Testsubstanz in die Zelle oder Metabolisierungsvorgänge eine Rolle. In Untersuchungen an isolierten Rezeptoren können solche Einflussfaktoren ausgeschlossen werden. Deshalb wird im Rahmen dieser Arbeit die Methode an isolierten Rezeptoren für die Bestimmung der RBA gewählt. Es werden die rekombinanten hER $\alpha$  und hER $\beta$  verwendet, die für den Einsatz im Hydroxyapatit (HAP)-Assay an eine HAP-Matrix gebunden sind.

Die spezifische Bindung stellt die Fähigkeit einer Substanz dar, erfolgreich mit  $[^3\text{H}]\text{-E2}$  um die ER-Bindungstasche zu konkurrieren. Neben der Interaktion der Substanz mit der Rezeptorbindungstasche (spezifischen Bindung) finden auch Wechselwirkungen mit der Matrix (nicht spezifischen Bindung) statt. Folglich widerspiegelt die gemessene Radioaktivität der Testsubstanz (Gesamtbindung) neben der spezifischen Bindung auch die nicht spezifische Bindung.

Die spezifische Bindung kann nach der folgenden Gleichung berechnet werden:

$$\text{spezifische Bindung} = \text{Gesamtbindung} - \text{nicht spezifische Bindung}$$

Die gemessene Radioaktivität einer Probe wird auf die Negativkontrolle (LM, 100 % Radioaktivität) bezogen und als relative Radioaktivität ( $R_{\text{rel}}$  in %) von [ $^3\text{H}$ ]-E2 angegeben:

$$R_{\text{rel}} ([^3\text{H}] - \text{E2}) = \frac{\text{spezifische Bindung (Testsubstanz)}}{\text{spezifische Bindung (LM)}} \cdot 100 \%$$

Die Darstellung der Radioaktivität von [ $^3\text{H}$ ]-E2 erfolgt graphisch durch Auftragen der  $R_{\text{rel}}$  ([ $^3\text{H}$ ]-E2) gegen den dekadischen Logarithmus der Substanzkonzentration. Mit Hilfe der Boltzmann-Funktion wird der sigmoidale Kurvenverlauf ermittelt. Die durch die Negativkontrolle resultierende maximale Radioaktivität wird gleich 100 % und der Vergleich (Positivkontrolle) gleich 0 % gesetzt. Als  $\text{IC}_{50}$ -Wert kann diejenige Substanzkonzentration aus der so erhaltenen Kurve errechnet werden, bei der die  $R_{\text{rel}}$  50 % beträgt, d. h. der radioaktive Ligand und die Testsubstanz haben jeweils 50 % der Rezeptorbindungsstellen inne. Aus den  $\text{IC}_{50}$ -Werten von E2 und der Testsubstanz wird der RBA-Wert (in %) berechnet, der bei E2 definitionsgemäß 100 % beträgt.

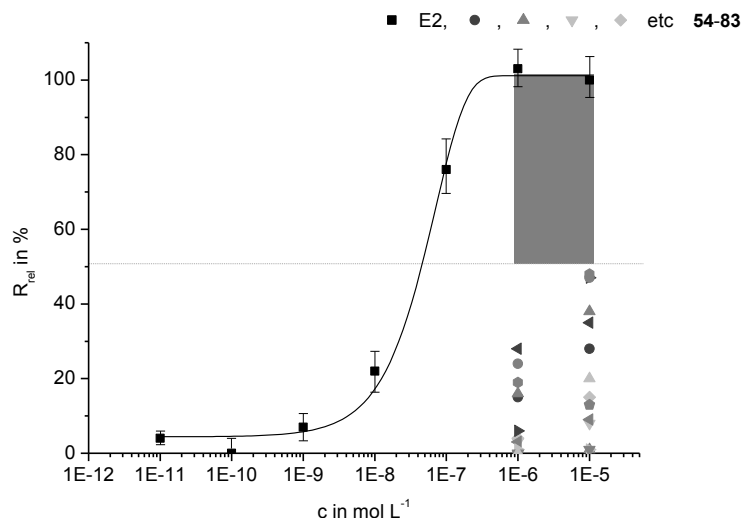
$$\text{RBA} = \frac{\text{IC}_{50} (\text{E2})}{\text{IC}_{50} (\text{Testsubstanz})} \cdot 100 \%$$

Die relative Radioaktivität der Testsubstanz wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$R_{\text{rel}} (\text{Testsubstanz}) = 100 \% - R_{\text{rel}} ([^3\text{H}] - \text{E2})$$

Die Darstellung der Radioaktivität der Testsubstanzen erfolgt graphisch durch Auftragen der  $R_{\text{rel}}$  (Testsubstanz) gegen den dekadischen Logarithmus der Substanzkonzentration. Der Wendepunkt des mit Hilfe der Boltzmann-Funktion ermittelten sigmoidalen Kurvenverlaufs bleibt im Vergleich zur Darstellung der Radioaktivität von [ $^3\text{H}$ ]-E2 unverändert.

Mit Hilfe einer Voruntersuchung wird getestet, welche Verbindungen für eine RBA-Wert-Bestimmung geeignet sind. Dafür werden die Verbindungen zunächst in Konzentrationen von  $10^{-6}$  M und  $10^{-5}$  M im HAP-Assay eingesetzt. Für eine Bestimmung des RBA-Wertes sollen die Substanzen in diesen Konzentrationen wenigstens 50 % der möglichen ER-Bindungsstellen innehaben. Dieser Bereich wird in Abb. 98 durch das grauschraffierte Feld dargestellt. Wenn die Verbindungen geringere Bindungsaffinitäten in Konkurrenz zum [ $^3\text{H}$ ]-E2 zeigen, wird auf eine Testung niedrigerer Konzentrationen verzichtet, da aufgrund der geringen Bindungsaffinität in sinnvollen Testkonzentrationen keine Kurven zwecks RBA-Wert-Berechnung erhalten werden.



**Abb. 98:** Darstellung der  $R_{\text{rel}}$  (Testsubstanz), Verbindungen **54-83**; das LM (Negativkontrolle) zeigt keine Bindung am Rezeptor, d. h. die Gerade liegt auf der Ordinate ( $y = 0$ )

Von den getesteten Verbindungen können im kompetitiven Bindungsassay keine RBA-Werte ermittelt werden. Die Verbindungen zeigen im Vergleich zum  $[^3\text{H}]$ -E2 eine deutlich geringere Bindungsaffinität zum ER, d. h. sie sind nicht in der Lage, mit  $[^3\text{H}]$ -E2 erfolgreich um die ER-Bindungsstasche zu konkurrieren. Dennoch zeigen die neu synthetisierten BBIs estrogene Eigenschaften (Kap. 2.3.3), die Fähigkeit, den  $\text{ER}\alpha$  herabzuregulieren (Kap. 2.3.4), einen O-O-Abstand von ca. 13 Å (Verbindungen **54-77**) und in Molecular-Modelling-Untersuchungen mögliche Interaktionen mit dem  $\text{ER}\alpha$  (Kap. 2.3.5), so dass bei den Verbindungen **54-77** von Typ-1-Estrogenen gesprochen werden kann.

### 2.3.7 Mikroskopische Zellbeobachtungen

Um die intrazelluläre Verteilung der BBIs zu ermitteln und so Hinweise auf den Aufnahmeweg zu erhalten, sollen Untersuchungen zur Lokalisation in den Zellen durchgeführt werden. Die Zellaufnahmen der ausgewählten Verbindungen erfolgen unter den gleichen Versuchsbedingungen wie bei DAPI, einem anerkannten Standard zum Visualisieren von Zellkernen. Die Zellen werden mit den Testsubstanzen inkubiert und mittels Fluoreszenz analysiert.

Die für die Zelltestung gewählten Bedingungen wie Anregungswellenlänge und Filtertyp liegen außerhalb der Autofluoreszenz der entsprechend vorhandenen Zellkompartimente. Die Durchführung mit dem verwendeten Filter 3 (Filter set 49 der Firma Zeiss) entspricht der Einstellung im Blaukanal, der standardgemäß in den meisten Fluoreszenzmikroskopen vorhanden ist. Zu den endogenen Fluorophoren gehören u. a. Zellkompartimente mit einem Tyrosin- oder Tryptophanrest (Kap. 1.3).



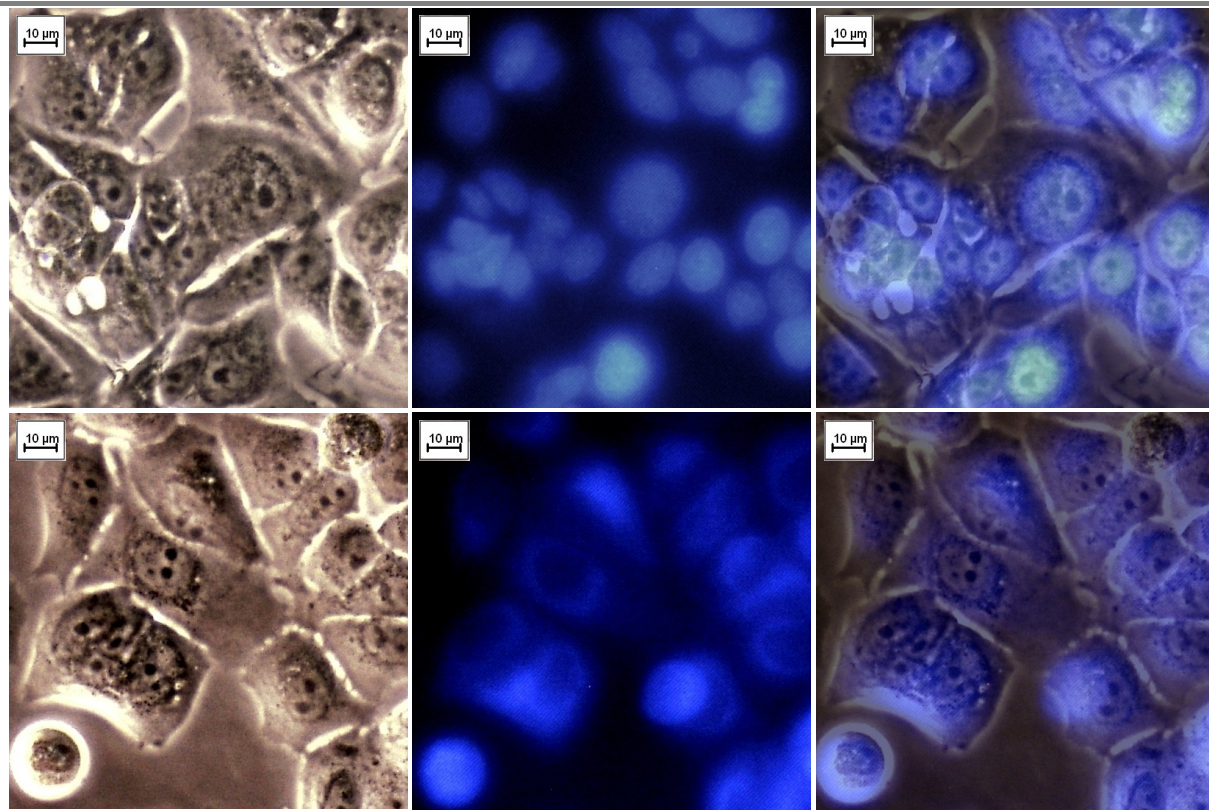
In der Literatur werden verschiedene Wellenlängen angegeben, die eine Substanz mindestens als Emissionsmaximum aufweisen sollte, damit sie sich von den Zellbestandteilen unterscheidet<sup>[56, 108]</sup>. Zur besseren Abgrenzung gegen die Hintergrundfluoreszenz sollen die  $\lambda_{Em}$ -Werte  $> 400$  nm liegen. Die Aufnahmen der nicht behandelten Zellen zeigen unter den gewählten Versuchsbedingungen keine Fluoreszenz. Erst die mit den neu synthetisierten Verbindungen inkubierten Zellen zeigen Fluoreszenz.

DAPI und Verbindung **61** sind inhärent fluoreszierende Substanzen, d. h. dass sie selbst fluoreszieren und nicht extra markiert werden müssen. Die Substanzen selbst sind in der Phasenkontrastaufnahme nicht erkennbar, sie zeigen sich erst durch Einstrahlen von Licht einer bestimmten Wellenlänge (Anregungslicht) in Form der sichtbaren Fluoreszenz.

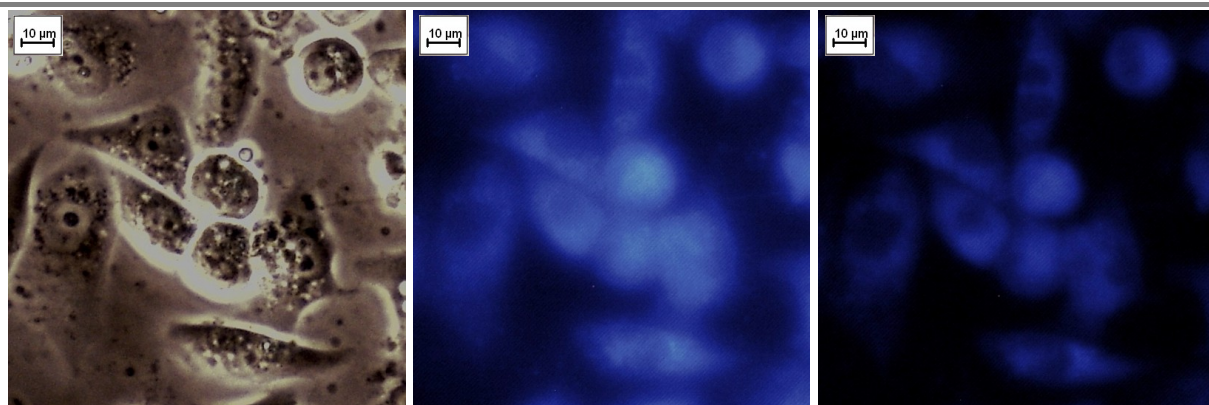
Die Zellaufnahmen zeigen bereits nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden eine schwache Fluoreszenz. Nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden zeigt sich eine auswertbare diffuse Fluoreszenz (blau auf schwarz) (Abb. 99).

Die Beobachtungen in den Zellaufnahmen stehen mit der Charakterisierung der Fluorophore (Kap. 2.2.3) in Übereinstimmung. Die mit Verbindung **61** inkubierten Zellen zeigen schwächere Intensitäten als die mit DAPI inkubierten Zellen. Dies korreliert mit den Fluoreszenzaufnahmen in reinen Lösungsmitteln. Die Fluoreszenzintensität der BBIs mit 5,5'-Stellung der beiden phenolischen Hydroxygruppen ist in den Zellaufnahmen allgemein deutlich schwächer als die der BBIs mit 6,6'-Stellung.

Die in den Fluoreszenzbildern zu sehende Fluoreszenz lässt keine Quantifizierung der eigentlich in die Zelle aufgenommenen Substanzmenge zu. Zudem sind die unmittelbaren Umgebungsbedingungen für die Fluoreszenzintensität entscheidend. Anders als bei den dünnschichtchromatographischen Untersuchungen (Kap. 2.1), stellt die Bestrahlungsdauer bei den Zellaufnahmen einen kritischen Parameter dar. Bei den Zellaufnahmen hat die Anregung der Fluoreszenz mit Licht hoher Strahlungsintensität ein schnelles Bleichen („bleaching“) des Fluorophors zur Folge (Abb. 100). Dabei zeigt sich das Bleichen in der Abnahme der sichtbaren Fluoreszenz eines Fluorophors unter Lichteinwirkung. Die Probe zeigt nach einer Ruhezeit und nach erneuter Anregung wieder Fluoreszenz. Da sich der Bleicheffekt unter energiereichem, violetterem Licht wesentlich stärker als im Weißlichtmodus zeigt, ist es bei der Epifluoreszenzmikroskopie von großer Bedeutung, die Untersuchungen zügig durchzuführen<sup>[109]</sup>.



**Abb. 99:** Zellaufnahmen, MCF-7-Zellen; obere Reihe: DAPI, untere Reihe: Verbindung **61**; links: Phasenkontrast, Mitte: Fluoreszenzaufnahme, rechts: Phasenkontrast und Fluoreszenzaufnahme übereinandergelegt



**Abb. 100:** Zellaufnahmen der Verbindung **75**, MDA-MB-231-Zellen; links: Phasenkontrast, Mitte: Fluoreszenzaufnahme, rechts: Fluoreszenzaufnahme nach 10 s Bestrahlungsdauer

In den Fluoreszenzaufnahmen lässt sich eine Lokalisation im Zytoplasma der MCF-7-Zellen (Abb. 99) ausmachen. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei den MDA-MB-231-Zellen und U2OS-Zellen (ohne Transfektion mit ER $\alpha$  oder ER $\beta$ ). Die Akkumulation der fluoreszierenden BBIs zeigt sich bei den drei untersuchten Zelllinien im Zytoplasma, insbesondere in der Nähe des Zellkerns. Eine präzise Aussage, in welchen der zytosolischen Kompartimente sich die BBIs bevorzugt ansammeln, kann jedoch nicht gemacht werden.

### 3 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Synthese hormonell aktiver und fluoreszierender 2,2'-Bisbenzimidazole (BBIs) zwecks Untersuchungen zur Visualisierung des Estrogenrezeptors (ER) in humanen Tumorzellen. Aufbauend auf den im Arbeitskreis um Prof. Gust vorliegenden Erkenntnissen zur Darstellung inhärent fluoreszierender ER-Liganden wurden Synthesen und spektroskopische sowie pharmakologische Untersuchungen von BBIs durchgeführt.

Die Strukturmodifikationen erfolgten durch *N*-Alkylierung oder *N*-Arylierung, durch *N,N'*-Verbrückung oder Variationen der 2,2'-Überbrückung der beiden Benzimidazolringe. Aufgrund der Stellung der beiden phenolischen Hydroxygruppen ergaben sich Konstitutionsisomere, die entweder direkt synthetisiert oder durch Auftrennung von Isomerengemischen isoliert werden konnten.

Als Voraussetzung für *in vitro* Untersuchungen sollten die synthetisierten BBIs gute Fluoreszenzeigenschaften wie hohe Fluoreszenzintensitäten und Emissionsmaxima > 400 nm zeigen, um sich in Zellaufnahmen vom Hintergrund der Zellen abzuheben. Die Stellung der beiden phenolischen Hydroxygruppen spielt eine wesentliche Rolle: So konnte dargelegt werden, dass die BBIs mit Hydroxygruppen in 6,6'-Stellung (z. B. 1,1'-Diethyl-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-6,6'-diol **61**:  $10^{-4}$  M in PBS:  $\lambda_{Em} = 398$  nm,  $I_{rel} = 1732$ ) im Vergleich zu den BBIs mit Hydroxygruppen in 5,5'-Stellung (z. B. 1,1'-Diethyl-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-5,5'-diol **56**:  $10^{-4}$  M in PBS:  $\lambda_{Em} = 424$  nm,  $I_{rel} = 129$ ) über höhere Fluoreszenzintensitäten verfügen, aber Bandenverschiebungen der Emissionsmaxima zu kleineren Wellenlängen aufweisen.

Des Weiteren sollten die Verbindungen keine wachstumshemmenden Eigenschaften haben, damit ihre hormonellen Effekte in zellbasierten Assays untersucht werden können. Im Kristallviolettassay wurde in Konzentrationen bis 20  $\mu$ M für die Verbindungen **54-77** und **80-83** keine nennenswerte Wachstumshemmung an der MCF-7-, MDA-MB-231- und U2OS-Zelllinie gefunden. Im kompetitiven Bindungsassay wiesen die Verbindungen (**54-83**) keine ausreichende Bindung an ER $\alpha/\beta$  auf. In Transaktivierungsassays hingegen zeigte sich teilweise eine signifikante estrogene Wirkung, die auf Interaktionen mit dem ER $\alpha$  schließen lässt (z. B. 1,1'-Diethyl-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-5,5'/5,6'/6,6'-diol **66**:  $EC_{50} = 2,7 \cdot 10^{-7}$  M, relative Aktivierung =  $100 \pm 3$  %). Dass generell eine Interaktion der BBIs mit dem ER $\alpha$  möglich ist, konnte in Molecular-Modelling-Untersuchungen gezeigt werden.

Mittels Epifluoreszenzmikroskopie konnte für ausgewählte Verbindungen (**61** und **75**) lediglich eine Lokalisation im Zytoplasma der Zellen ausgemacht werden. Für die Ermittlung der Konzentration und Verteilung des ER in Brustkarzinomzellen bei der klinischen Diagnose sind die Substanzen demnach nicht geeignet.

Ein interessanter Ansatz für die Weiterentwicklung der Substanzen ist deren Einfluss auf den zellulären ER $\alpha$ -Gehalt. Sie sind in der Lage, diesen deutlich zu verringern (Verbindungen **55-57** und **60-62** wurden getestet). Ferner zeigen die Verbindungen mit einer Methoxygruppe in *o*-Stellung zur phenolischen Hydroxygruppe eine wachstumshemmende Wirkung an den hormonabhängigen MCF-7-Zellen (Verbindung **78**: IC<sub>50</sub> = 6,2  $\mu$ M, Verbindung **79**: IC<sub>50</sub> = 8,1  $\mu$ M). Dieser antiproliferative Effekt kann ebenfalls ein interessanter Ansatz für weitere Untersuchungen dieser Substanzen sein.

## 4 Summary

The aim of this work was the synthesis of hormonally active and fluorescent 2,2'-bisbenzimidazoles (BBIs) for visualisation of the estrogen receptor (ER) in human tumor cells. Based on former results of Prof. Gust's working group about the synthesis of inherently fluorescent ER-ligands BBIs were synthesised and pharmacologically as well as spectroscopically analysed.

Structural modifications included *N*-alkylation or *N*-arylation, *N,N'*-bridging or varying the 2,2'-bridging of the two benzimidazole rings. Constitutional isomers resulting because of the position of the two hydroxyl groups were either directly synthesised or isolated from mixtures.

As prerequisite for in vitro testing, the synthesised BBIs should have good fluorescence properties e. g. high fluorescence intensities and emission maxima > 400 nm in order to be visualised during cell recording. For these purpose the position of the two phenolic hydroxyl groups plays an important role: it could be demonstrated that the BBIs with hydroxyl groups in 6,6'-position (e. g. 1,1'-diethyl-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazole]-6,6'-diole **61**:  $10^{-4}$  M in PBS:  $\lambda_{Em} = 398$  nm,  $I_{rel} = 1732$ ) compared to BBIs with hydroxyl groups in 5,5'-position (e. g. 1,1'-diethyl-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazole]-5,5'-diole **56**:  $10^{-4}$  M in PBS:  $\lambda_{Em} = 424$  nm,  $I_{rel} = 129$ ) witness higher fluorescence intensities but exhibit band shifts of emission maxima to shorter wavelengths.

Furthermore the growth-inhibiting properties of the compounds should be low, so that their hormonal effects can be studied in cell-based assays. Concentrations up to 20  $\mu$ M were tested in the crystal-violet assay on MCF-7-, MDA-MB-231- und U2OS-cell-line but no significant growth inhibition were detected for compounds **54-77** and **80-83**. In the competitive binding assay the compounds (**54-83**) exhibit no sufficient affinity to ER $\alpha/\beta$ . However, in transactivation assays they showed significant estrogenic effects that suggest possible interactions with ER $\alpha$  (e. g. 1,1'-diethyl-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazole]-5,5'/5,6'/6,6'-diole **66**:  $EC_{50} = 2,7 \cdot 10^{-7}$  M, relative activation =  $100 \pm 3$  %). The possibility of the BBIs to bind to ER $\alpha$  was further confirmed in molecular-modelling-studies.

Epifluorescence microscopy showed for selected compounds (**61** and **75**) only a localisation in the cytoplasm. Therefore the investigated substances are not suitable to determine in an active way the concentration and distribution of ER in breast carcinoma cells for clinical diagnostics.

An interesting aspect for further investigations is the property of some of the synthesised BBIs to down-regulate ER $\alpha$  (compounds **55-57** and **60-62** have been tested). Furthermore, the compounds with a methoxy group in *o*-position to the phenolic hydroxyl group showed a growth inhibiting effect on the hormone-dependent MCF-7-cells (compound **78**: IC<sub>50</sub> = 6,2  $\mu$ M, compound **79**: IC<sub>50</sub> = 8,1  $\mu$ M). This antiproliferative effect may also be of great interest for further investigations.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Synthetischer und analytischer Teil

#### 5.1.1 Verbrauchsmaterialien

##### Chemikalien

Alle für die Synthesen und die Analytik verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel sind von den Firmen Acros Organics, Alfa-Aesar, Fluka, Lancaster, Merck und Sigma-Aldrich.

##### Dünnschichtchromatographie

DC Kieselgel 60 F<sub>254</sub>-Folien (Merck). Die Auswertung erfolgt mittels UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 254 nm und von 366 nm mit Hilfe des UV-Betrachters (CAMAG, Berlin).

##### Einmalkanülen und -spritzen

Es werden verschiedene Größen und Volumina eingesetzt (B. Braun).

##### Säulenchromatographie

Kieselgel 60 (Korngröße 0,063-0,200 mm) (Merck)

#### 5.1.2 Geräte

##### Autoklav

Autoklav 50 S (Hochdruck-Laborautoklav) (Roth)

##### Elementaranalyse

Elementaranalysator Vario EL (Elementar, Hanau)

##### Fluorimeter

Fluoreszenz Spektrophotometer F-4.500 (Hitachi)

##### Heizhaube

Pilz<sup>®</sup> (Heraeus), es werden verschiedene Größen eingesetzt. Die Regelung der Leistung erfolgt mit Hilfe der Voltron<sup>®</sup> Leistungssteller (Messner).

##### HPLC

analytische HPLC (Biotek Kontron); semipräparative MPLC (Knauer)

### Infrarotspektroskopie

Spectrum 100 FTIR Spectrometer® (PerkinElmer) mit ATR-Einheit. Die Angabe der Wellenzahl ( $\tilde{\nu}$ ) erfolgt in  $\text{cm}^{-1}$ . Die Stärke der Intensität wird in w = wenig intensiv, m = mittel, s = stark und b = breit angegeben.

### Kernresonanzspektroskopie

Avance DPX-400 (Bruker, Karlsruhe) (Betriebsfrequenz:  $^1\text{H-NMR}$ : 400,13 MHz) und 700 MHz NMR-Spektrometer (Bruker). Die chemische Verschiebung ( $\delta$ ) der Substanz wird unter Berücksichtigung der Betriebsfrequenz des Gerätes relativ zu TMS als internen Standard in ppm angegeben.

Folgende Abkürzungen werden verwendet: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, t = Triplett, pt = Pseudotriplett, q = Quartett, quint = Quintett, sext = Sechstett, sept = Septett, oct = Octett, m = Multiplett, b = breite Bandenform,  $^nJ$  = Betrag der Kopplungskonstante über n Bindungen.

Werden Protonenresonanzspektren bei HT (verschiedene Temperaturen, jeweils angegeben) aufgenommen, erfolgt nach dem Abkühlen der Probe eine erneute Messung bei 20 °C, um zu überprüfen, ob sich das gleiche  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum wie bei der ersten Messung bei 20 °C zeigt.

### Magnetrührer

Ikamag®RCT (IKA)

### Massenspektrometrie

Für die Messung der hochauflösenden Masse wird ein Agilent 6210 ESI-TOF (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) verwendet. Die Flussrate beträgt 4  $\mu\text{L}/\text{min}$ , die Sprayspannung 4 kV. Das Desolvatisierungsgas wird auf 1 bar gesetzt. Alle anderen Parameter werden für eine maximale Abundanz des jeweiligen  $[\text{M}+\text{H}]^+$  optimiert. (ESI-TOF = Elektrosprayionisierung-Flugzeitmassenspektrometer)

Die Massen sollen auf 7 ppm genau sein. Die Abweichung wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Abweichung} = \left| \frac{\text{Masse (ber.)} - \text{Masse(gef.)}}{\text{Masse (gef.)}} \right| \cdot 10^6$$

### Rotationsverdampfer

Rotavapor® (Büchi), Membran-Vakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim)



### Schmelzpunktgerät

Büchi Melting Point B-545 (Büchi); Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

### Synthesemikrowelle

Start 1.500 (Milestone, MLS)

### Trockenschrank

Trockenschrank (Heraeus)

### UV/VIS-Spektroskopie

Lambda 35 UV/Vis Systems® (PerkinElmer)

### Zentrifuge

Ecco-Praxa-2 (Theodor Karow, Berlin)

## **5.1.3 Synthesevorschriften und analytische Daten**

### **5.1.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften**

#### Beilsteinprobe

Ein ausgeglühtes Kupferplättchen wird mit wenig Substanz versehen und in die nicht leuchtende Bunsenbrennerflamme gehalten.

#### Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum

Die Parameter werden dem jeweiligen LM entsprechend aus den Dampfdrucktabellen gewählt. Beispielsweise werden für EA, das einen Siedepunkt von 77 °C hat, folgende Einstellungen des Rotationsverdampfers gewählt: 240 mbar Druck und 60 °C Wasserbadtemperatur. Die Dampftemperatur (= Temperatur des Siedepunkts) von EA liegt unter diesen Bedingungen bei 40 °C. Damit beträgt die Differenz zwischen der Kühltemperatur des Kühlwassers, der Siedetemperatur des LM und der Temperatur des Wasserbads jeweils ca. 20 K.

#### Fließmittel

Die FM werden in Verhältnissen der Komponenten angegeben. Beispielsweise bedeutet die Angabe für ein Fließmittelgemisch EA/EtOH (9+1), dass eine Mischung von 9 Teilen EA und 1 Teil EtOH eingesetzt wird, so dass für die Herstellung von 1 L FM 900 mL EA und 100 mL EtOH verwendet werden.

### Iodkammer

Der Boden einer DC-Kammer (aus Glas) wird mit wenigen Iodkristallen befüllt.

### Säulenchromatographische Auftrennung

Der Durchmesser der jeweiligen Säule richtet sich nach der Menge des zu trennenden Substanzgemisches. Die als unterste Komponente in die Verengung der Säule eingebrachte Watte verhindert den Austrag von Seesand und Kieselgel. Der Seesand bildet dabei eine Schicht zwischen Watte und Kieselgel. Die Säule wird mit Kieselgel, das im FM aufgeschwemmt ist, befüllt und durch gleichmäßiges Klopfen verdichtet. Das Reaktionsgemisch wird mit einem Zusatz von Kieselgel im Vakuum eingeeengt und als trockenes Feststoffgemisch in die Säule gefüllt. So kann das zu trennende Gemisch gut auf die Säule aufgebracht werden, unabhängig davon, ob sich das Reaktionsgemisch gut oder schlecht in der geringen Fließmittelmenge löst, die üblicherweise zum Auftragen einer Mischung verwendet wird. Eine weitere Schicht Seesand verhindert beim vorsichtigen Einfüllen des FM Aufwirbelungen des Kieselgels. Die Zusammensetzung des FM bleibt während der Elution gleich. Die erhaltenen Fraktionen werden mittels DC untersucht, entsprechend zusammengefasst und weiterer Analytik (wie MS, NMR- und IR-Spektroskopie) unterzogen.

### Sprühreagenzien

#### Ehrlich-Reagenz

1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd werden in einem Gemisch aus 25 mL konz. HCl und 25 mL MeOH gelöst. Nach dem Besprühen wird die trockene DC-Platte für einige Minuten in einen Trockenschrank (105 °C) gelegt.

#### Fluorescein-Na/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Für die Lösung I wird eine 0,1 %ige Lösung von Fluorescein-Na in 50 %igem wässrigen EtOH hergestellt. Die Lösung II ist eine Mischung aus 30 %igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Eisessig (1:2). Lösung I und Lösung II werden nacheinander aufgesprüht. Nach dem Abdampfen wird die DC-Platte für einige Minuten in einen Trockenschrank (105 °C) gelegt.

### Verdünnung

Beispielsweise steht eine 1:2 Verdünnung für die Zusammenführung gleicher Volumina, so dass sich das Volumen verdoppelt, die Konzentration wird dabei halbiert.

Zum Erhalt größerer Mengen an Substanz werden entsprechend mehrere Ansätze durchgeführt.

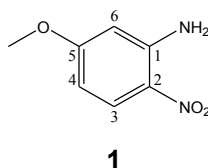
### 5.1.3.2 Synthese von 5-Methoxy-2-nitroanilin

#### Vorschrift zur Synthese von 5-Methoxy-2-nitroanilin aus 5-Chlor-2-nitroanilin

7 mmol (1,2 g) 5-Chlor-2-nitroanilin werden in 20 mL MeOH gelöst. Zu dieser gelben Lösung werden 26 mmol (6,0 mL) Natriummethanolat (Überschuss) in Form einer methanolischen Lösung (25 Gewichtsprozent) gegeben, dabei färbt sich das Gemisch rot. Der Ansatz wird in einem 50 mL druckstabilen Quarzreaktorsystem im monoPREP<sup>®</sup> in der Synthesemikrowelle nach einer 6minütigen Aufheizphase für 45 min (Plateauphase) bei 120 °C mit einer eingestellten Maximalleistung von 300 W erhitzt (Kap. 2.1.2). Anschließend wird das LM im Vakuum entfernt. Das Feststoffgemisch wird in Wasser aufgenommen. Aus dieser gelben Lösung wird dreimal mit Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das LM wird im Vakuum entfernt. Die weitere Aufreinigung erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel. Als mobile Phase dient ein FM aus Aceton/PE (1+4).

Da sich die angegebene Ansatzgröße als optimal darstellt, wird der Ansatz mehrfach durchgeführt, um eine ausreichende Substanzmenge für die weiteren Synthesen zu erhalten.

#### 5-Methoxy-2-nitroanilin



Aus 7 mmol (1,2 g) 5-Chlor-2-nitroanilin, in 20 mL MeOH gelöst, und 6,0 mL Natriummethanolatlösung:

**1:** Gelber Feststoff, Smp.: 133 °C, Ausbeute: 6 mmol (1,0 g, 88 %)

C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (168,05 g·mol<sup>-1</sup>)

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 3,78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), δ = 6,25 (dd, <sup>3</sup>J = 9,53 Hz, <sup>4</sup>J = 2,62 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), δ = 6,45 (d, <sup>4</sup>J = 2,63 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), δ = 7,50 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>, austauschbar mit D<sub>2</sub>O), δ = 7,92 (d, <sup>3</sup>J = 9,51 Hz, 1H, H<sub>3</sub>)

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>4</sub>]-MeOD): δ = 3,82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), δ = 6,23 (dd, <sup>3</sup>J = 9,56 Hz, <sup>4</sup>J = 2,62 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), δ = 6,37 (d, <sup>4</sup>J = 2,59 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), δ = 7,98 (d, <sup>3</sup>J = 9,56 Hz, 1H, H<sub>3</sub>)

**CHN** (%): ber.: C 50,00 H 4,80 N 16,66, gef.: C 50,03 H 4,80 N 16,69

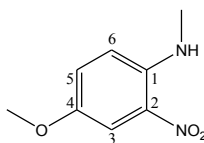
### 5.1.3.3 *N*-Alkylierung von 2-Nitroanilinen

#### Allgemeine Vorschrift zur *N*-Alkylierung von 2-Nitroanilinen

Zu einer Lösung (oder Suspension) von 5 mmol des zu alkylierenden 2-NA in 20 mL ACN werden 2 Spatelspitzen 18-Krone-6 und 2 Spatelspitzen  $K_2CO_3$  sowie 8 mmol des entsprechenden Alkylhalogenids (ca. 1,5facher Überschuss) gegeben. Der Ansatz wird in einem 50 mL druckstabilen Quarzreaktorsystem im monoPREP<sup>®</sup> in der Synthesemikrowelle nach einer 6minütigen Aufheizphase für 30 min (Plateauphase) bei 122 °C mit einer eingestellten Maximalleistung von 300 W erhitzt. Anschließend wird das LM im Vakuum entfernt. Die Auftrennung erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel. Als mobile Phase dient ein FM aus PE/DE (5+1) (Kap. 2.1.3).

#### *N*-Alkylierung von 4-Methoxy-2-nitroanilin

##### 4-Methoxy-*N*-methyl-2-nitroanilin



**2**

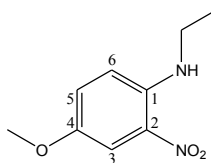
Aus 5 mmol (840 mg) 4-Methoxy-2-nitroanilin und 8 mmol (0,5 mL) Iodmethan:

**2:** Dunkelroter Feststoff, Smp.: 85 °C, Ausbeute: 4 mmol (774 mg, 85 %)

$C_8H_{10}N_2O_3$  (182,07 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D6]-DMSO):  $\delta$  = 2,95 (d, 3H,  $CH_3$ ),  $\delta$  = 3,74 (s, 3H,  $OCH_3$ ),  $\delta$  = 7,00 (d, <sup>3</sup>J = 9,36 Hz, 1H,  $H_6$ ),  $\delta$  = 7,30 (dd, <sup>3</sup>J = 9,31 Hz, <sup>4</sup>J = 2,33 Hz, 1H,  $H_5$ ),  $\delta$  = 7,50 (d, <sup>4</sup>J = 2,20 Hz, 1H,  $H_3$ ),  $\delta$  = 8,08 (d, 1H,  $NH$ , austauschbar mit  $D_2O$ )

##### *N*-Ethyl-4-methoxy-2-nitroanilin



**3**

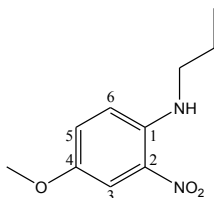
Aus 5 mmol (840 mg) 4-Methoxy-2-nitroanilin und 8 mmol (0,6 mL) Iodethan:

**3:** Dunkelroter Feststoff, Smp.: 58 °C, Ausbeute: 4 mmol (804 mg, 82 %)

$C_9H_{12}N_2O_3$  (196,08 g·mol<sup>-1</sup>)

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO):  $\delta = 1,23$  (t, 3H, CH<sub>3</sub>),  $\delta = 3,38$  (sext, 2H, CH<sub>2</sub>),  $\delta = 3,75$  (s, 3H, OCH<sub>3</sub>),  $\delta = 7,06$  (d, <sup>3</sup>J = 9,44 Hz, 1H, H<sub>6</sub>),  $\delta = 7,29$  (dd, <sup>3</sup>J = 9,39 Hz, <sup>4</sup>J = 3,01 Hz, 1H, H<sub>5</sub>),  $\delta = 7,50$  (d, <sup>4</sup>J = 3,02 Hz, 1H, H<sub>3</sub>),  $\delta = 8,00$  (t, 1H, NH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

4-Methoxy-*N*-propyl-2-nitroanilin



**4**

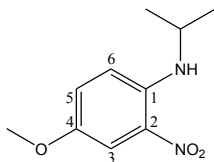
Aus 5 mmol (840 mg) 4-Methoxy-2-nitroanilin und 8 mmol (0,8 mL) 1-Iodpropan:

**4:** Dunkelrote Flüssigkeit, Ausbeute: 4 mmol (830 mg, 79 %)

C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (210,10 g·mol<sup>-1</sup>)

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>4</sub>]-MeOD):  $\delta = 1,02$  (t, 3H, CH<sub>3</sub>),  $\delta = 1,70$  (sext, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>),  $\delta = 3,26$  (t, 2H, CH<sub>2</sub>),  $\delta = 3,74$  (s, 3H, OCH<sub>3</sub>),  $\delta = 6,90$  (d, <sup>3</sup>J = 9,41 Hz, 1H, H<sub>6</sub>),  $\delta = 7,14$  (dd, <sup>3</sup>J = 9,39 Hz, <sup>4</sup>J = 3,03 Hz, 1H, H<sub>5</sub>),  $\delta = 7,50$  (d, <sup>4</sup>J = 2,97 Hz, 1H, H<sub>3</sub>)

4-Methoxy-*N*-(1-methylethyl)-2-nitroanilin



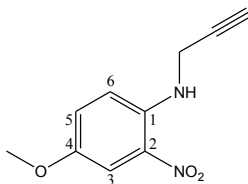
**5**

Aus 5 mmol (840 mg) 4-Methoxy-2-nitroanilin und 8 mmol (0,8 mL) 2-Iodpropan:

**5:** Dunkelroter Feststoff, Smp.: 52 °C, Ausbeute: 4 mmol (798 mg, 76 %)

C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (210,10 g·mol<sup>-1</sup>)

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>4</sub>]-MeOD):  $\delta = 1,30$  (d, 6H, CH<sub>3</sub>),  $\delta = 3,77$  (s, 3H, OCH<sub>3</sub>),  $\delta = 3,90$  (sept, 1H, CH),  $\delta = 7,02$  (d, <sup>3</sup>J = 9,42 Hz, 1H, H<sub>6</sub>),  $\delta = 7,21$  (dd, <sup>3</sup>J = 9,39 Hz, <sup>4</sup>J = 2,54 Hz, 1H, H<sub>5</sub>),  $\delta = 7,58$  (d, <sup>4</sup>J = 2,23 Hz, 1H, H<sub>3</sub>)

4-Methoxy-N-propargyl-2-nitroanilin**6**

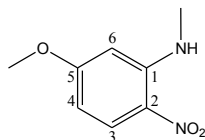
Aus 5 mmol (840 mg) 4-Methoxy-2-nitroanilin und 8 mmol (1,3 mL) Propargylbromid (80 %ige Lösung in Toluol):

**6:** Dunkelroter Feststoff, Smp.: 94 °C, Ausbeute: 4 mmol (712 mg, 70 %)

$C_{10}H_{10}N_2O_3$  (206,07 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D6]-DMSO): δ = 3,21 (t, 1H, CH), δ = 3,76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), δ = 4,21 (dd, 2H, CH<sub>2</sub>), δ = 7,10 (d, <sup>3</sup>J = 9,40 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), δ = 7,36 (dd, <sup>3</sup>J = 9,36 Hz, <sup>4</sup>J = 3,05 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), δ = 7,54 (d, <sup>4</sup>J = 3,06 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), δ = 8,15 (d, 1H, NH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D4]-MeOD): δ = 2,65 (t, 1H, CH), δ = 3,79 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), δ = 4,17 (d, 2H, CH<sub>2</sub>), δ = 7,10 (d, <sup>3</sup>J = 9,31 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), δ = 7,26 (dd, <sup>3</sup>J = 9,35 Hz, <sup>4</sup>J = 3,06 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), δ = 7,64 (d, <sup>4</sup>J = 3,04 Hz, 1H, H<sub>3</sub>)

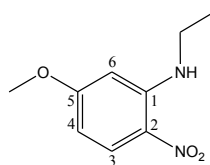
N-Alkylierung von 5-Methoxy-2-nitroanilin5-Methoxy-N-methyl-2-nitroanilin**7**

Aus 5 mmol (840 mg) 5-Methoxy-2-nitroanilin (**1**) und 8 mmol (0,5 mL) Iodmethan:

**7:** Gelber Feststoff, Smp.: 118 °C, Ausbeute: 4 mmol (756 mg, 83 %)

$C_8H_{10}N_2O_3$  (182,07 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D4]-MeOD): δ = 3,02 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), δ = 3,89 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), δ = 6,26 (sext, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>), δ = 8,08 (d, <sup>3</sup>J = 10,16 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), δ = 8,35 (bs, 1H, NH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

N-Ethyl-5-methoxy-2-nitroanilin**8**

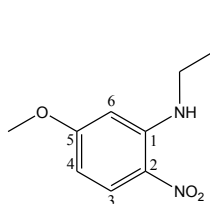
Aus 5 mmol (840 mg) 5-Methoxy-2-nitroanilin (**1**) und 8 mmol (0,6 mL) Iodethan:

**8**: Gelber Feststoff, Smp.: 105 °C, Ausbeute: 4 mmol (775 mg, 79 %)

$C_9H_{12}N_2O_3$  (196,08 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-Aceton): δ = 1,34 (t, 3H, CH<sub>3</sub>), δ = 3,44 (q, 2H, CH<sub>2</sub>), δ = 3,91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), δ = 6,29 (dd, <sup>3</sup>J = 9,50 Hz, <sup>4</sup>J = 2,52 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), δ = 6,36 (d, <sup>4</sup>J = 2,41 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), δ = 8,07 (d, <sup>3</sup>J = 9,50 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), δ = 8,25 (bs, 1H, NH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>4</sub>]-MeOD): δ = 1,35 (t, 3H, CH<sub>3</sub>), δ = 3,38 (sext, 2H, CH<sub>2</sub>), δ = 3,871 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), δ = 6,23-6,30 (m, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>), δ = 8,07 (d, <sup>3</sup>J = 9,17 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), δ = 8,26 (bs, 1H, NH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

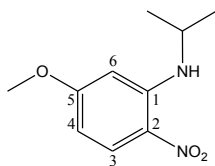
5-Methoxy-N-propyl-2-nitroanilin**9**

Aus 5 mmol (840 mg) 5-Methoxy-2-nitroanilin (**1**) und 8 mmol (0,8 mL) 1-Iodpropan:

**9**: Gelber Feststoff, Smp.: 87 °C, Ausbeute: 4 mmol (767 mg, 73 %)

$C_{10}H_{14}N_2O_3$  (210,10 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>4</sub>]-MeOD): δ = 1,05 (t, 3H, CH<sub>3</sub>), δ = 1,75 (sext, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), δ = 3,30 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), δ = 3,87 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), δ = 6,23-6,28 (m, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>), δ = 8,06 (d, <sup>3</sup>J = 9,35 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), δ = 8,34 (bs, 1H, NH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

5-Methoxy-N-(1-methylethyl)-2-nitroanilin**10**

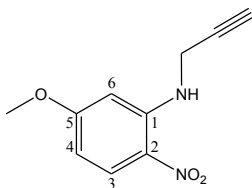
Aus 5 mmol (840 mg) 5-Methoxy-2-nitroanilin (**1**) und 8 mmol (0,8 mL) 2-Iodpropan:

**10**: Gelber Feststoff, Smp.: 98 °C, Ausbeute: 3 mmol (714 mg, 68 %)

$C_{10}H_{14}N_2O_3$  (210,10 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D6]-DMSO): δ = 1,27 (d, 6H, CH<sub>3</sub>), δ = 3,87 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), δ = 3,97 (sext, 1H, CH), δ = 6,30 (dd, <sup>3</sup>J = 9,53 Hz, <sup>4</sup>J = 2,50 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), δ = 6,36 (d, <sup>4</sup>J = 2,38 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), δ = 8,03 (d, <sup>3</sup>J = 9,52 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), δ = 8,18 (d, 1H, NH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D4]-MeOD): δ = 1,33 (d, 6H, CH<sub>3</sub>), δ = 3,89 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), δ = 3,92 (sext, 1H, CH), δ = 6,27 (dd, <sup>3</sup>J = 9,55 Hz, <sup>4</sup>J = 2,46 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), δ = 6,32 (d, <sup>4</sup>J = 2,34 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), δ = 8,09 (d, <sup>3</sup>J = 9,54 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), δ = 8,25 (bs, 1H, NH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

5-Methoxy-N-propargyl-2-nitroanilin**11**

Aus 5 mmol (840 mg) 5-Methoxy-2-nitroanilin (**1**) und 8 mmol (1,3 mL) Propargylbromid (80 %ige Lösung in Toluol):

**11**: Gelber Feststoff, Smp.: 124 °C, Ausbeute: 4 mmol (742 mg, 72 %)

$C_{10}H_{10}N_2O_3$  (206,07 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D4]-MeOD): δ = 2,71 (t, 1H, CH), δ = 3,92 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), δ = 4,22 (d, 2H, CH<sub>2</sub>), δ = 6,37 (dd, <sup>3</sup>J = 9,51 Hz, <sup>4</sup>J = 2,58 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), δ = 6,48 (d, <sup>4</sup>J = 2,56 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), δ = 8,14 (d, <sup>3</sup>J = 9,48 Hz, 1H, H<sub>3</sub>)

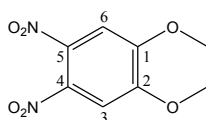


### 5.1.3.4 Synthese von 4,5-Dinitroveratrol

#### Vorschrift zur Synthese von 4,5-Dinitroveratrol aus Veratrol

0,4 mol (20,0 mL) 65 %ige HNO<sub>3</sub> werden in einem 250 mL Dreihalskolben auf 0 °C abgekühlt. Der Dreihalskolben ist mit einem Tropftrichter, einem Thermometer und einem Rückflusskühler bestückt. 55 mmol (7,0 mL) Veratrol werden langsam über einen Zeitraum von 15 min zugetropft. Das Gemisch wird dunkelbraun bis schwarz. Die Mischung rührt 5 min. Es bildet sich ein gelber Schaum. Bei einer Temperatur von 5 °C werden langsam über einen Zeitraum von 1 h 0,2 mol (11,0 mL) konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zugetropft. Die Lösung wird schwarz, der Schaum färbt sich gelb-orange. Die Mischung rührt für weitere 15 min. Danach wird der Ansatz binnen 20 min auf 55 °C erwärmt. Diese Temperatur wird für 10 min gehalten. Anschließend wird das Reaktionsgemisch binnen 5 min auf 60 °C erwärmt und auch hier für 10 min gehalten. Im Anschluss ist das Gemisch innerhalb von 5 min auf 25 °C abzukühlen und auf ein Eis-Wasser-Gemisch (20 g Eis + 20 mL Wasser) zu gießen. Diese Mischung wird mit 250 mL Wasser verdünnt und für 30 min Rühren gelassen. Es zeigt sich eine braune Lösung mit gelbem Niederschlag. Der Niederschlag wird abgetrennt und fünfmal mit je 20 mL Wasser gewaschen. Anschließend wird aus 150 mL EtOH umkristallisiert und man erhält 4,5-Dinitroveratrol in Form von gelben Kristallen. Die Aufarbeitung kann alternativ auch säulenchromatographisch an Kieselgel erfolgen. Als mobile Phase dient ein FM aus EA/PE (1+1). Nach Entfernen der LM im Vakuum erhält man 4,5-Dinitroveratrol in reiner Form.

#### 4,5-Dinitroveratrol



**12**

Aus 55 mmol (7,0 mL) Veratrol und 0,4 mol (20,0 mL) 65 %ige HNO<sub>3</sub> sowie 0,2 mol (11,0 mL) konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:

**12:** Gelbe Kristalle, Smb.: 145-147 °C, Ausbeute: 39 mmol (9 g, 70 %)

C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (228,04 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 3,96 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), δ = 7,76 (s, 2H, H<sub>3</sub>, H<sub>6</sub>)

### 5.1.3.5 Synthese von *o*-Phenylendiaminen

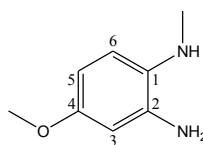
#### Allgemeine Vorschriften (Methoden A und B) zur Synthese von *o*-Phenylendiaminen

##### Methode A: Reduktion von Nitrogruppen mit Wasserstoff

Zu einer Lösung (oder Suspension) von 5 mmol des entsprechenden *N*-substituierten 2-NA in 20 mL MeOH werden unter Stickstoffatmosphäre 100 mg Palladium/Kohle (5 %) zugegeben. Der Ansatz wird im Becher (Glas) des Hochdruck-Laborautoklaven mit 5 bar H<sub>2</sub> (Überschuss) versetzt und für 12 h Rühren gelassen. Die Verlaufskontrolle wird mit Hilfe der DC durchgeführt. Als Laufmittel dient EA/EtOH (9+1). Nach Abschluss der Reduktion wird der Katalysator durch Filtration entfernt. Anschließend wird das Filtrat im Vakuum eingengt. Dabei sind zügiges Arbeiten und eine Minimalisierung des Lichteinflusses durch Verwenden von Aluminiumfolie für die Stabilität und damit für die Ausbeute des erhaltenen Diamins von Bedeutung. Bei den Diaminen wird deshalb auf das Einengen des Filtrats verzichtet und sofort die Umsetzung zum entsprechenden Bisbenzimidazol eingeleitet.

##### *N*'-Alkylierte 4-Methoxy-*o*-phenylendiamine

##### 4-Methoxy-*N*'-methyl-*o*-phenylendiamin



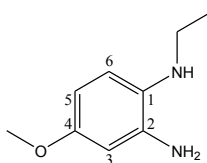
**13**

Aus 5 mmol (910 mg) 4-Methoxy-*N*-methyl-2-nitroanilin (**2**):

**13**: Rot-braun, Ausbeute: nicht ber.

C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O (152,10 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D6]-DMSO): δ = 2,64 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), δ = 3,58 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), δ = 4,11 (bs, 1H, NH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O), δ = 4,53 (s, 2H, NH<sub>2</sub>, austauschbar mit D<sub>2</sub>O), δ = 6,09 (dd, <sup>3</sup>J = 8,41 Hz, <sup>4</sup>J = 2,75 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), δ = 6,20 (d, <sup>4</sup>J = 4,28 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), δ = 6,28 (d, <sup>3</sup>J = 8,45 Hz, 1H, H<sub>6</sub>)

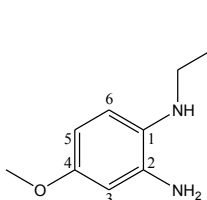
*N*<sup>1</sup>-Ethyl-4-methoxy-*o*-phenylendiamin**14**

Aus 5 mmol (980 mg) *N*-Ethyl-4-methoxy-2-nitroanilin (**3**):

**14**: Rot-braun, Ausbeute: nicht ber.

$C_9H_{14}N_2O$  (166,11 g·mol<sup>-1</sup>)

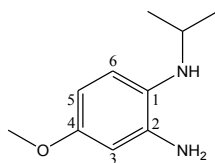
<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D6]-DMSO):  $\delta = 1,17$  (t, 3H, CH<sub>3</sub>),  $\delta = 2,95$  (q, 2H, CH<sub>2</sub>),  $\delta = 3,58$  (s, 3H, OCH<sub>3</sub>),  $\delta = 4,58$  (bs, 2H, NH<sub>2</sub>, austauschbar mit D<sub>2</sub>O),  $\delta = 6,07$  (dd, <sup>3</sup>J = 8,45 Hz, <sup>4</sup>J = 2,81 Hz, 1H, H5),  $\delta = 6,20$  (d, <sup>4</sup>J = 2,79 Hz, 1H, H3),  $\delta = 6,33$  (d, <sup>3</sup>J = 8,47 Hz, 1H, H6)

4-Methoxy-*N*<sup>1</sup>-propyl-*o*-phenylendiamin**15**

Aus 5 mmol (1050 mg) 4-Methoxy-*N*-propyl-2-nitroanilin (**4**):

**15**: Rot-braun, Ausbeute: nicht ber.

$C_{10}H_{16}N_2O$  (180,13 g·mol<sup>-1</sup>)

4-Methoxy-*N*<sup>1</sup>-(1-methylethyl)-*o*-phenylendiamin**16**

Aus 5 mmol (1050 mg) 4-Methoxy-*N*-(1-methylethyl)-2-nitroanilin (**5**):

**16**: Rot-braun, Ausbeute: nicht ber.

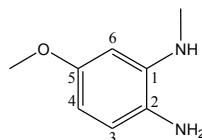
$C_{10}H_{16}N_2O$  (180,13 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D6]-DMSO):  $\delta = 1,10$  (d, 6H, CH<sub>3</sub>),  $\delta = 3,39$  (q, 1H, CH),  $\delta = 3,58$  (s, 3H, OCH<sub>3</sub>),  $\delta = 4,58$  (bs, 2H, NH<sub>2</sub>, austauschbar mit D<sub>2</sub>O),  $\delta = 6,06$  (dd, <sup>3</sup>J = 8,49 Hz, <sup>4</sup>J = 2,86 Hz, 1H, H5),  $\delta = 6,20$  (d, <sup>4</sup>J = 2,84 Hz, 1H, H3),  $\delta = 6,37$  (d, <sup>3</sup>J = 8,56 Hz, 1H, H6)

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>4</sub>]-MeOD):  $\delta = 1,16$  (d, 6H, CH<sub>3</sub>),  $\delta = 3,41$  (quint, 1H, CH),  $\delta = 3,69$  (s, 3H, OCH<sub>3</sub>),  $\delta = 6,25$  (dd, <sup>3</sup>J = 8,57 Hz, <sup>4</sup>J = 2,81 Hz, 1H, H<sub>5</sub>),  $\delta = 6,37$  (d, <sup>4</sup>J = 2,80 Hz, 1H, H<sub>3</sub>),  $\delta = 6,64$  (d, <sup>3</sup>J = 8,57 Hz, 1H, H<sub>6</sub>)

*N*<sup>1</sup>-Alkylierte 5-Methoxy-*o*-phenylendiamine

5-Methoxy-*N*<sup>1</sup>-methyl-*o*-phenylendiamin



**17**

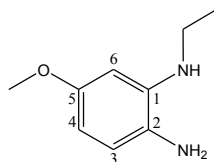
Aus 5 mmol (910 mg) 5-Methoxy-*N*-methyl-2-nitroanilin (**7**):

**17**: Rot-braun, Ausbeute: nicht ber.

C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O (152,10 g·mol<sup>-1</sup>)

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO /D<sub>2</sub>O):  $\delta = 3,21$  (s, 3H, CH<sub>3</sub>),  $\delta = 4,06$  (s, 3H, OCH<sub>3</sub>),  $\delta = 7,47$  (dd, <sup>3</sup>J = 9,52 Hz, <sup>4</sup>J = 3,89 Hz, 1H, H<sub>4</sub>),  $\delta = 7,51$  (bs, 1H, H<sub>6</sub>),  $\delta = 8,08$  (d, <sup>3</sup>J = 9,03 Hz, 1H, H<sub>3</sub>)

*N*<sup>1</sup>-Ethyl-5-methoxy-*o*-phenylendiamin



**18**

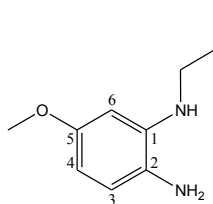
Aus 5 mmol (980 mg) *N*-Ethyl-5-methoxy-2-nitroanilin (**8**):

**18**: Rot-braun, Ausbeute: nicht ber.

C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O (166,11 g·mol<sup>-1</sup>)

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO):  $\delta = 1,19$  (t, 3H, CH<sub>3</sub>),  $\delta = 3,01$  (sext, 2H, CH<sub>2</sub>),  $\delta = 3,60$  (s, 3H, OCH<sub>3</sub>),  $\delta = 4,05$  (bs, 2H, NH<sub>2</sub>, austauschbar mit D<sub>2</sub>O),  $\delta = 4,40$  (t, 1H, NH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O),  $\delta = 5,98$  (dd, <sup>3</sup>J = 8,11 Hz, <sup>4</sup>J = 2,72 Hz, 1H, H<sub>4</sub>),  $\delta = 6,01$  (d, <sup>4</sup>J = 2,62 Hz, 1H, H<sub>6</sub>),  $\delta = 6,45$  (d, <sup>3</sup>J = 8,10 Hz, 1H, H<sub>3</sub>)

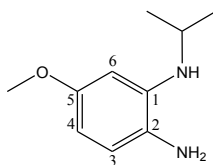
**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>4</sub>]-MeOD):  $\delta = 1,28$  (t, 3H, CH<sub>3</sub>),  $\delta = 3,12$  (q, 2H, CH<sub>2</sub>),  $\delta = 3,70$  (s, 3H, OCH<sub>3</sub>),  $\delta = 6,14$  (dd, <sup>3</sup>J = 8,33 Hz, <sup>4</sup>J = 2,68 Hz, 1H, H<sub>4</sub>),  $\delta = 6,21$  (d, <sup>4</sup>J = 2,67 Hz, 1H, H<sub>6</sub>),  $\delta = 6,65$  (d, <sup>3</sup>J = 8,32 Hz, 1H, H<sub>3</sub>)

5-Methoxy-*N*<sup>1</sup>-propyl-*o*-phenylendiamin**19**

Aus 5 mmol (1050 mg) 5-Methoxy-*N*-propyl-2-nitroanilin (**9**):

**19**: Rot-braun, Ausbeute: nicht ber.

$C_{10}H_{16}N_2O$  (180,13 g·mol<sup>-1</sup>)

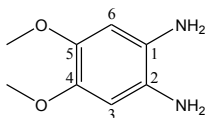
5-Methoxy-*N*<sup>1</sup>-(1-methylethyl)-*o*-phenylendiamin**20**

Aus 5 mmol (1050 mg) 5-Methoxy-*N*-(1-methylethyl)-2-nitroanilin (**10**):

**20**: Rot-braun, Ausbeute: nicht ber.

$C_{10}H_{16}N_2O$  (180,13 g·mol<sup>-1</sup>)

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 1,15 (d, 6H, CH<sub>3</sub>), δ = 3,50 (sext, 1H, CH), δ = 3,60 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), δ = 4,05 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>, austauschbar mit D<sub>2</sub>O), δ = 4,17 (d, 1H, NH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O), δ = 5,97 (dd, <sup>3</sup>J = 8,23 Hz, <sup>4</sup>J = 2,55 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), δ = 6,03 (d, <sup>4</sup>J = 2,42 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), δ = 6,46 (d, <sup>3</sup>J = 8,22 Hz, 1H, H<sub>3</sub>)

Reduktion von 4,5-Dinitroveratrol4,5-Dimethoxy-*o*-phenylendiamin**21**

Aus 5 mmol (1140 mg) 4,5-Dinitroveratrol (**12**):

**21**: Rot-braun, Ausbeute: nicht ber.

$C_8H_{12}N_2O_2$  (168,09 g·mol<sup>-1</sup>)

$^1\text{H-NMR}_{400\text{ MHz}}$  ([D6]-DMSO):  $\delta = 3,58$  (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ),  $\delta = 4,08$  (s, 2H,  $\text{NH}_2$ , austauschbar mit  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta = 6,26$  (s, 2H,  $H_3$ ,  $H_6$ )

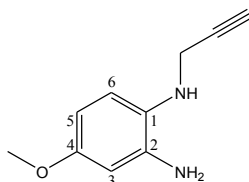
### Methode B: Reduktion von Nitrogruppen mit Zinn(II)-chlorid

Für die Hydrierung mittels Zinn(II)-chlorid werden 5 mmol des zu reduzierenden 2-NA mit 25 mmol (6 g)  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (5facher Überschuss) in 20 mL abs. EtOH 4 h unter Rückfluss erhitzt. Der Ansatz erfolgt in einem 50 mL Schlenkkolben und wird vor dem Erhitzen mit Stickstoff als Schutzgas gespült. Die Verlaufskontrolle wird mit Hilfe der DC durchgeführt. Als Laufmittel dient PE/DE (1+1). Nach Abschluss der Reduktion darf die Reaktionsmischung abkühlen.

Die Mischung wird anschließend in Eiswasser (Eis-Wasser-Gemisch: 5 g Eis + 5 mL Wasser) gegossen. Danach wird der pH-Wert langsam mit einer wässrigen 5 %igen  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung auf pH 7-8 eingestellt. Es wird dreimal mit EA extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit einer gesättigten, wässrigen  $\text{NaCl}$ -Lösung gewaschen. Die nun erhaltene organische Phase wird über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Anschließend wird das LM im Vakuum entfernt.

### $N^1$ -Propargyliertes 4-Methoxy-o-phenylendiamin

#### 4-Methoxy- $N^1$ -propargyl-o-phenylendiamin



**22**

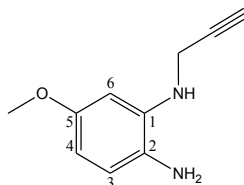
Aus 5 mmol (1030 mg) 4-Methoxy- $N$ -propargyl-2-nitroanilin (**6**):

**22**: Rot-braun, Ausbeute: nicht ber.

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$  (176,10  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

$^1\text{H-NMR}_{400\text{ MHz}}$  ([D6]-DMSO):  $\delta = 3,03$  (t, 1H, CH),  $\delta = 3,59$  (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ),  $\delta = 3,77$  (dd, 2H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta = 4,43$  (t, 1H, NH, austauschbar mit  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta = 4,60$  (bs, 2H,  $\text{NH}_2$ , austauschbar mit  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta = 6,09$  (dd,  $^3\text{J} = 8,49$  Hz,  $^4\text{J} = 2,83$  Hz, 1H,  $H_5$ ),  $\delta = 6,22$  (d,  $^4\text{J} = 2,81$  Hz, 1H,  $H_3$ ),  $\delta = 6,47$  (d,  $^3\text{J} = 8,51$  Hz, 1H,  $H_6$ )

$^1\text{H-NMR}_{400\text{ MHz}}$  ([D4]-MeOD):  $\delta = 2,25$  (t, 1H, CH),  $\delta = 3,69$  (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ),  $\delta = 3,80$  (d, 2H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta = 6,26$  (dd,  $^3\text{J} = 8,56$  Hz,  $^4\text{J} = 2,80$  Hz, 1H,  $H_5$ ),  $\delta = 6,38$  (d,  $^4\text{J} = 2,79$  Hz, 1H,  $H_3$ ),  $\delta = 6,72$  (d,  $^3\text{J} = 8,57$  Hz, 1H,  $H_6$ )

*N*<sup>1</sup>-Propargyliertes 5-Methoxy-*o*-phenylendiamin5-Methoxy-*N*<sup>1</sup>-propargyl-*o*-phenylendiamin**23**

Aus 5 mmol (1030 mg) 5-Methoxy-*N*-propargyl-2-nitroanilin (**11**):

**23**: Rot-braun, Ausbeute: nicht ber.

C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O (176,10 g·mol<sup>-1</sup>)

**5.1.3.6 Synthese von 2,2'-Bisbenzimidazolen**Allgemeine Vorschrift zur Synthese von 2,2'-Bisbenzimidazolen aus *o*-Phenylendiaminen

2 mmol OPD werden in 30 mL MeOH in einem 50 mL Schlenkkolben gelöst. Durch Umschließen der Apparatur mit Aluminiumfolie wird der Lichteinfluss auf ein Minimum reduziert. Über den Hahn des Schlenkkolbens wird Stickstoff als Schutzgas eingeleitet. Anschließend wird 1 mmol (0,12 mL) 2,2,2-Trichloracetimid säuremethylester (TCA) (äquimolar bis Überschuss) über den Hahn zugegeben und erneut mit Stickstoff gespült. Der Ansatz rührt für 24 h bei RT, wobei 2 h nach Beginn der Reaktion erneut mit Stickstoff gespült wird. Die Reaktion wird durch die Zugabe von Eiswasser (Eis-Wasser-Gemisch: 5 g Eis + 5 mL Wasser) gestoppt. Die Aufarbeitung der Reaktionsmischung erfolgt im Fall der Synthese von 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**24**) nach den Methoden A oder B und im Fall der Synthesen aus den *N*<sup>1</sup>-alkylierten OPDs nach Methode C.

Methode A: Auftrennung mittels Extraktion

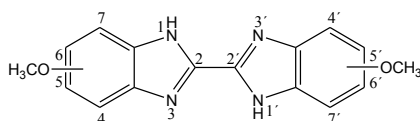
Die Aufarbeitung kann durch dreimaliges Extrahieren mit Diethylether erfolgen. Bei der Extraktion mit DE geht auch teilweise MeOH in die organische Phase über. Die LM der vereinigten organischen Phasen werden nach dem Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> im Vakuum entfernt. Die im rotbraunen Feststoffgemisch enthaltenen Verunreinigungen werden durch Waschen mit Aceton entfernt: Es wird wenig Aceton zum Feststoffgemisch gegeben und die erhaltene Suspension bei 3000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, der gelbe Feststoff stellt das gewünschte Produkt dar. Falls der Feststoff weiterhin einen roten Farbton zeigt, wird der Vorgang wiederholt.

Methode B: Auftrennung mittels Säulenchromatographie, FM: EA/EtOH (9+1)

Eine weitere Möglichkeit der Aufarbeitung stellt die säulenchromatographische Auftrennung an Kieselgel dar. Als FM wird EA/EtOH (9+1) eingesetzt.

Methode C: Auftrennung mittels Säulenchromatographie, FM: EA/n-Hexan (9+1)

Die Auftrennung der Reaktionsgemische der *N*-alkylierten BBIs erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel. Als FM wird EA/n-Hexan (9+1) eingesetzt.

Tautomer5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol**24**

Aus 2 mmol (276 mg) 4-Methoxy-*o*-phenyldiamin und 1 mmol (0,12 mL) TCA:

**24**: Beiger Feststoff, Smb.: 328-331 °C, Ausbeute: 0,70 mmol (206 mg, 70 %)

C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (294,11 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): 294,1117

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D6]-Aceton): δ = 3,86 (s, 6H, 5,5'/5,6'/6,6'-OCH<sub>3</sub>), δ = 6,93 (dd, <sup>3</sup>J = 8,81 Hz, <sup>4</sup>J = 2,67 Hz, 2H, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>), δ = 7,17 (d, <sup>4</sup>J = 1,85 Hz, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>), δ = 7,57 (d, <sup>3</sup>J = 8,80 Hz, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>)

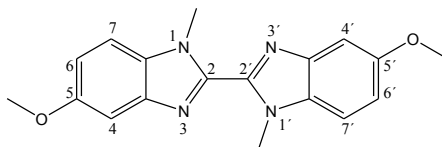
**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D6]-DMSO): δ = 3,82 (s, 6H, 5,5'/5,6'/6,6'-OCH<sub>3</sub>), δ = 6,90 (dd, <sup>3</sup>J = 8,46 Hz, <sup>4</sup>J = 2,19 Hz, 2H, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>); im <sup>1</sup>H-HT-NMR bei 90 °C: dd, <sup>3</sup>J = 8,78 Hz, <sup>4</sup>J = 2,44 Hz), δ = 7,11 (d, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>); im <sup>1</sup>H-HT-NMR bei 90 °C: d, <sup>4</sup>J = 2,32 Hz), δ = 7,52 (2 d, <sup>3</sup>J = 8,60 Hz, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>); im <sup>1</sup>H-HT-NMR bei 90 °C: d, <sup>3</sup>J = 8,79 Hz), δ = 13,28 (bs, 2H, NH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D4]-MeOD): δ = 3,88 (s, 6H, 5,5'/5,6'/6,6'-OCH<sub>3</sub>), δ = 6,99 (dd, <sup>3</sup>J = 8,87 Hz, <sup>4</sup>J = 2,35 Hz, 2H, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>), δ = 7,17 (d, <sup>4</sup>J = 2,20 Hz, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>), δ = 7,59 (d, <sup>3</sup>J = 8,87 Hz, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>)

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D6]-Aceton/[D4]-MeOD 1+1): δ = 3,88 (s, 6H, 5,5'/5,6'/6,6'-OCH<sub>3</sub>), δ = 6,96 (dd, <sup>3</sup>J = 8,80 Hz, <sup>4</sup>J = 2,09 Hz, 2H, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>), δ = 7,18 (s, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>), δ = 7,59 (d, <sup>3</sup>J = 7,98 Hz, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>)

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3100-2700 (b), 1619 (s), 1292 (s), 1202 (s)



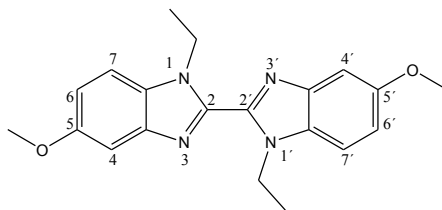
1,1'-Dialkylierte 5,5'-Dimethoxy-2,2'-bisbenzimidazole5,5'-Dimethoxy-1,1'-dimethyl-2,2'-bi-1H-benzimidazol**25**

Aus 2 mmol (304 mg) 4-Methoxy-*N*<sup>1</sup>-methyl-*o*-phenylendiamin (**13**) und 1 mmol (0,12 mL) TCA:

**25**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,65 mmol (209 mg, 65 %)

C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (322,14 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 3,83 (s, 6H, 5/5'-OCH<sub>3</sub>), δ = 4,24 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), δ = 7,03 (dd, <sup>3</sup>J = 8,84 Hz, <sup>4</sup>J = 2,30 Hz, 2H, H<sub>6</sub>, H<sub>6'</sub>), δ = 7,32 (d, <sup>4</sup>J = 2,20 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>4'</sub>), δ = 7,61 (d, <sup>3</sup>J = 8,88 Hz, 2H, H<sub>7</sub>, H<sub>7'</sub>)

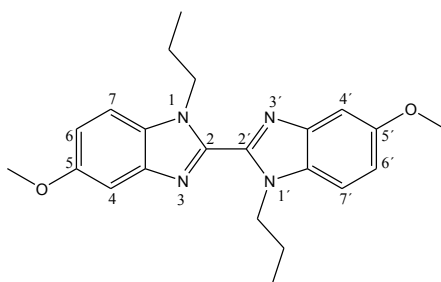
1,1'-Diethyl-5,5'-dimethoxy-2,2'-bi-1H-benzimidazol**26**

Aus 2 mmol (332 mg) *N*<sup>1</sup>-Ethyl-4-methoxy-*o*-phenylendiamin (**14**) und 1 mmol (0,12 mL) TCA:

**26**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,62 mmol (217 mg, 62 %)

C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (350,17 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 1,40 (t, 6H, CH<sub>3</sub>), δ = 3,84 (s, 6H, 5/5'-OCH<sub>3</sub>), δ = 4,84 (q, 4H, CH<sub>2</sub>), δ = 7,02 (dd, <sup>3</sup>J = 8,85 Hz, <sup>4</sup>J = 2,33 Hz, 2H, H<sub>6</sub>, H<sub>6'</sub>), δ = 7,31 (d, <sup>4</sup>J = 2,24 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>4'</sub>), δ = 7,64 (d, <sup>3</sup>J = 8,88 Hz, 2H, H<sub>7</sub>, H<sub>7'</sub>)

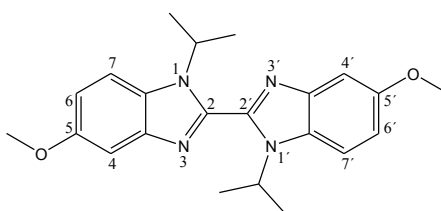
5,5'-Dimethoxy-1,1'-dipropyl-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol**27**

Aus 2 mmol (360 mg) 4-Methoxy-*N*<sup>1</sup>-propyl-*o*-phenylendiamin (**15**) und 1 mmol (0,12 mL) TCA:

**27**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,51 mmol (193 mg, 51 %)

$C_{22}H_{26}N_4O_2$  (378,21 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D6]-DMSO): δ = 0,81 (t, 6H, CH<sub>3</sub>), δ = 1,79 (sext, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), δ = 3,84 (s, 6H, 5/5'-OCH<sub>3</sub>), δ = 4,80 (t, 4H, CH<sub>2</sub>), δ = 7,01 (dd, <sup>3</sup>J = 8,87 Hz, <sup>4</sup>J = 2,31 Hz, 2H, H<sub>6</sub>, H<sub>6'</sub>), δ = 7,29 (d, <sup>4</sup>J = 2,21 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>4'</sub>), δ = 7,64 (d, <sup>3</sup>J = 8,89 Hz, 2H, H<sub>7</sub>, H<sub>7'</sub>)

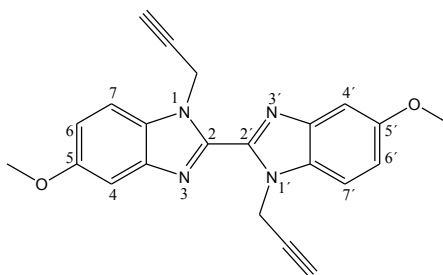
5,5'-Dimethoxy-1,1'-di-(1-methylethyl)-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol**28**

Aus 2 mmol (360 mg) 4-Methoxy-*N*<sup>1</sup>-(1-methylethyl)-*o*-phenylendiamin (**16**) und 1 mmol (0,12 mL) TCA:

**28**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,42 mmol (159 mg, 42 %)

$C_{22}H_{26}N_4O_2$  (378,21 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D6]-DMSO): δ = 1,59 (d, 6H, CH<sub>3</sub>), δ = 3,83 (s, 6H, 5/5'-OCH<sub>3</sub>), δ = 4,35 (sept, 2H, CH), δ = 6,98 (dd, <sup>3</sup>J = 8,87 Hz, <sup>4</sup>J = 1,93 Hz, 2H, H<sub>6</sub>, H<sub>6'</sub>), δ = 7,32 (d, <sup>4</sup>J = 2,00 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>4'</sub>), δ = 7,80 (d, <sup>3</sup>J = 8,94 Hz, 2H, H<sub>7</sub>, H<sub>7'</sub>)

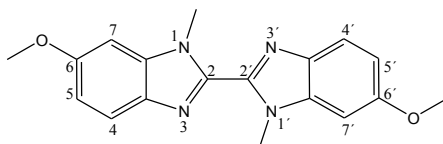
5,5'-Dimethoxy-1,1'-dipropargyl-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol**29**

Aus 2 mmol (352 mg) 4-Methoxy-*N*<sup>1</sup>-propargyl-*o*-phenylendiamin (**22**) und 1 mmol (0,12 mL) TCA:

**29**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,38 mmol (141 mg, 38 %)

C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (370,14 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 3,34 (t, 2H, CH), δ = 3,85 (s, 6H, 5/5'-OCH<sub>3</sub>), δ = 5,94 (d, 4H, CH<sub>2</sub>), δ = 7,09 (dd, <sup>3</sup>J = 8,88 Hz, <sup>4</sup>J = 2,38 Hz, 2H, H<sub>6</sub>, H<sub>6'</sub>), δ = 7,38 (d, <sup>4</sup>J = 2,29 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>4'</sub>), δ = 7,68 (d, <sup>3</sup>J = 8,83 Hz, 2H, H<sub>7</sub>, H<sub>7'</sub>)

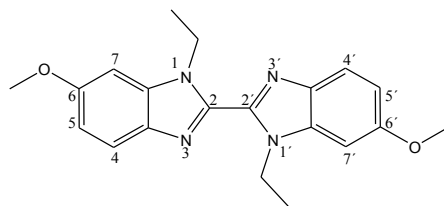
1,1'-Dialkylierte 6,6'-Dimethoxy-2,2'-bisbenzimidazole6,6'-Dimethoxy-1,1'-dimethyl-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol**30**

Aus 2 mmol (304 mg) 5-Methoxy-*N*<sup>1</sup>-methyl-*o*-phenylendiamin (**17**) und 1 mmol (0,12 mL) TCA:

**30**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,61 mmol (197 mg, 61 %)

C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (322,14 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 3,88 (s, 6H, 6/6'-OCH<sub>3</sub>), δ = 4,23 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), δ = 6,94 (dd, <sup>3</sup>J = 8,80 Hz, <sup>4</sup>J = 2,32 Hz, 2H, H<sub>5</sub>, H<sub>5'</sub>), δ = 7,23 (d, <sup>4</sup>J = 2,32 Hz, 2H, H<sub>7</sub>, H<sub>7'</sub>), δ = 7,67 (d, <sup>3</sup>J = 8,79 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>4'</sub>)

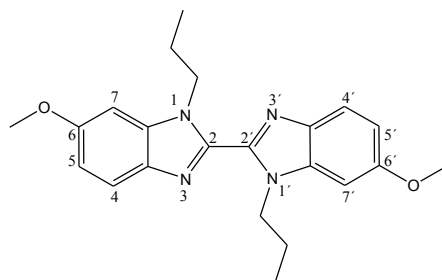
1,1'-Diethyl-6,6'-dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol**31**

Aus 2 mmol (332 mg) *N*<sup>1</sup>-Ethyl-5-methoxy-*o*-phenylendiamin (**18**) und 1 mmol (0,12 mL) TCA:

**31**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,57 mmol (200 mg, 57 %)

C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (350,17 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 1,35 (t, 6H, CH<sub>3</sub>), δ = 3,86 (s, 6H, 6/6'-OCH<sub>3</sub>), δ = 4,61 (q, 4H, CH<sub>2</sub>), δ = 6,96 (dd, <sup>3</sup>J = 8,92 Hz, <sup>4</sup>J = 2,14 Hz, 2H, H<sub>5</sub>, H<sub>5'</sub>), δ = 7,23 (d, <sup>4</sup>J = 2,06 Hz, 2H, H<sub>7</sub>, H<sub>7'</sub>), δ = 7,64 (d, <sup>3</sup>J = 8,91 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>4'</sub>)

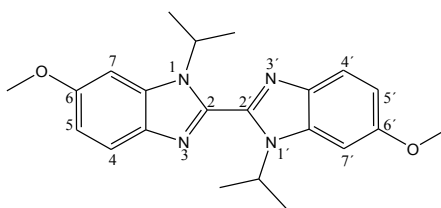
6,6'-Dimethoxy-1,1'-dipropyl-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol**32**

Aus 2 mmol (360 mg) 5-Methoxy-*N*<sup>1</sup>-propyl-*o*-phenylendiamin (**19**) und 1 mmol (0,12 mL) TCA:

**32**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,47 mmol (178 mg, 47 %)

C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (378,21 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 0,82 (t, 6H, CH<sub>3</sub>), δ = 1,78 (sext, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), δ = 3,87 (s, 6H, 6/6'-OCH<sub>3</sub>), δ = 4,79 (t, 4H, CH<sub>2</sub>), δ = 6,92 (dd, <sup>3</sup>J = 8,80 Hz, <sup>4</sup>J = 2,25 Hz, 2H, H<sub>5</sub>, H<sub>5'</sub>), δ = 7,25 (d, <sup>4</sup>J = 2,23 Hz, 2H, H<sub>7</sub>, H<sub>7'</sub>), δ = 7,65 (d, <sup>3</sup>J = 8,85 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>4'</sub>)

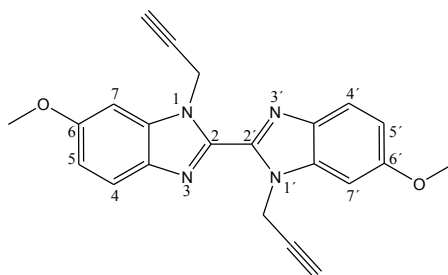
6,6'-Dimethoxy-1,1'-di-(1-methylethyl)-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol**33**

Aus 2 mmol (360 mg) 5-Methoxy-*N*<sup>1</sup>-(1-methylethyl)-*o*-phenylendiamin (**20**) und 1 mmol (0,12 mL) TCA:

**33**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,36 mmol (136 mg, 36 %)

C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (378,21 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 1,55 (d, 6H, CH<sub>3</sub>), δ = 3,84 (s, 6H, 6/6'-OCH<sub>3</sub>), δ = 5,36 (sept, 2H, CH), δ = 6,88 (dd, <sup>3</sup>J = 8,37 Hz, <sup>4</sup>J = 2,11 Hz, 2H, H<sub>5</sub>, H<sub>5'</sub>), δ = 7,17 (d, <sup>4</sup>J = 2,05 Hz, 2H, H<sub>7</sub>, H<sub>7'</sub>), δ = 7,57 (d, <sup>3</sup>J = 8,68 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>4'</sub>)

6,6'-Dimethoxy-1,1'-dipropargyl-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol**34**

Aus 2 mmol (352 mg) 5-Methoxy-*N*<sup>1</sup>-propargyl-*o*-phenylendiamin (**23**) und 1 mmol (0,12 mL) TCA:

**34**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,32 mmol (118 mg, 32 %)

C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (370,14 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 3,31 (t, 2H, CH), δ = 3,87 (s, 6H, 6/6'-OCH<sub>3</sub>), δ = 5,92 (d, 4H, CH<sub>2</sub>), δ = 6,99 (dd, <sup>3</sup>J = 8,78 Hz, <sup>4</sup>J = 2,29 Hz, 2H, H<sub>5</sub>, H<sub>5'</sub>), δ = 7,31 (d, <sup>4</sup>J = 2,38 Hz, 2H, H<sub>7</sub>, H<sub>7'</sub>), δ = 7,73 (d, <sup>3</sup>J = 8,81 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>4'</sub>)

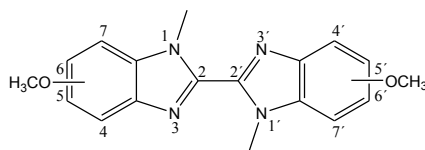
Synthese von N-substituierten 2,2'-Bisbenzimidazolen aus 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1H-benzimidazol

Allgemeine Vorschriften (Methoden A und B) zur N-Substitution von 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1H-benzimidazol

Methode A: N-Alkylierung mit Hilfe von 18-Krone-6 und Kaliumcarbonat

Zu einer Suspension von 2 mmol (600 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1H-benzimidazol (**24**) in 20 mL ACN werden 2 Spatelspitzen 18-Krone-6 und 2 Spatelspitzen  $K_2CO_3$  sowie 6 mmol des entsprechenden Alkylhalogenids (1,5facher Überschuss) gegeben. Der Ansatz wird in einem 50 mL druckstabilen Quarzreaktorsystem im monoPREP<sup>®</sup> in der Synthesemikrowelle nach einer 6minütigen Aufheizphase für 30 min (Plateauphase) bei 122 °C mit einer eingestellten Maximalleistung von 300 W erhitzt. Anschließend wird das LM im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel. Als mobile Phase dient ein FM aus EA/n-Hexan (9+1) (Kap. 2.1.6.2).

5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-1,1'-dimethyl-2,2'-bi-1H-benzimidazol



**35**

Aus 2 mmol (600 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1H-benzimidazol (**24**) und 6 mmol (0,4 mL) Iodmethan:

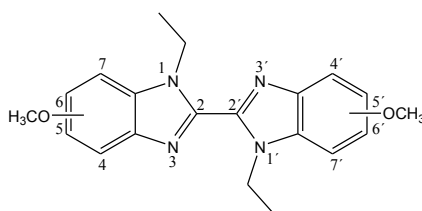
**35**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 1,38 mmol (444 mg, 69 %)

$C_{18}H_{18}N_4O_2$  (322,14 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D6]-DMSO):  $\delta$  = 3,82-3,89 (m, 6H, 5,5'/5,6'/6,6'-OCH<sub>3</sub>),  $\delta$  = 4,21-4,25 (m, 6H, CH<sub>3</sub>),  $\delta$  = 6,92-7,05 (m, 2H, H5,H5' / H5,H6' / H6,H6'),  $\delta$  = 7,23-7,33 (m, 2H, H4,H4' / H4,H7' / H7,H7'),  $\delta$  = 7,58-7,69 (m, 2H, H4,H4' / H4,H7' / H7,H7')

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D4]-MeOD):  $\delta$  = 3,87-3,94 (m, 6H, 5,5'/5,6'/6,6'-OCH<sub>3</sub>),  $\delta$  = 4,09-4,12 (m, 6H, CH<sub>3</sub>),  $\delta$  = 7,00-7,11 (m, 2H, H5,H5' / H5,H6' / H6,H6'),  $\delta$  = 7,14-7,28 (m, 2H, H4,H4' / H4,H7' / H7,H7'),  $\delta$  = 7,53-7,67 (m, 2H, H4,H4' / H4,H7' / H7,H7')

IR (cm<sup>-1</sup>): 2944 (b), 2837 (s), 1618 (m), 1493 (s), 1391 (s), 1197 (s), 1024 (s), 792 (s)

1,1'-Diethyl-5,5'/5,6'/6,6'-dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol**36**

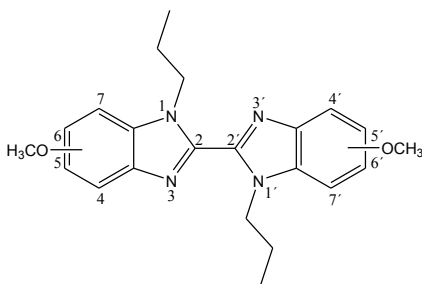
Aus 2 mmol (600 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**24**) und 6 mmol (0,5 mL) Iodethan:

**36**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 1,24 mmol (434 mg, 62 %)

$C_{20}H_{22}N_4O_2$  (350,17 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 1,36-1,43 (m, 6H, CH<sub>3</sub>), δ = 3,82-3,90 (m, 6H, 5,5'/5,6'/6,6'-OCH<sub>3</sub>), δ = 4,78-4,89 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), δ = 6,91-7,04 (m, 2H, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>), δ = 7,24-7,32 (m, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>), δ = 7,61-7,69 (m, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>4</sub>]-MeOD): δ = 1,36-1,43 (m, 6H, CH<sub>3</sub>), δ = 3,87-3,94 (m, 6H, 5,5'/5,6'/6,6'-OCH<sub>3</sub>), δ = 4,61-4,69 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), δ = 6,99-7,11 (m, 2H, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>), δ = 7,15-7,29 (m, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>), δ = 7,55-7,68 (m, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>)

5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-1,1'-dipropyl-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol**37**

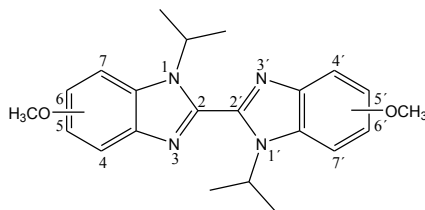
Aus 2 mmol (600 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**24**) und 6 mmol (0,6 mL) 1-Iodpropan:

**37**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 1,1 mmol (416 mg, 55 %)

$C_{22}H_{26}N_4O_2$  (378,21 g·mol<sup>-1</sup>)

$^1\text{H-NMR}_{400\text{ MHz}}$  ([D6]-DMSO):  $\delta = 0,77\text{-}0,86$  (m, 6H,  $\text{CH}_3$ ),  $\delta = 1,73\text{-}1,85$  (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ),  $\delta = 3,82\text{-}3,89$  (m, 6H, 5,5'/5,6'/6,6'- $\text{OCH}_3$ ),  $\delta = 4,75\text{-}4,84$  (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta = 6,91\text{-}7,03$  (m, 2H,  $\text{H}_5, \text{H}_5' / \text{H}_5, \text{H}_6' / \text{H}_6, \text{H}_6'$ ),  $\delta = 7,24\text{-}7,30$  (m, 2H,  $\text{H}_4, \text{H}_4' / \text{H}_4, \text{H}_7' / \text{H}_7, \text{H}_7'$ ),  $\delta = 7,62\text{-}7,68$  (m, 2H,  $\text{H}_4, \text{H}_4' / \text{H}_4, \text{H}_7' / \text{H}_7, \text{H}_7'$ )

5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-1,1'-di-(1-methylethyl)-2,2'-bi-1H-benzimidazol



**38**

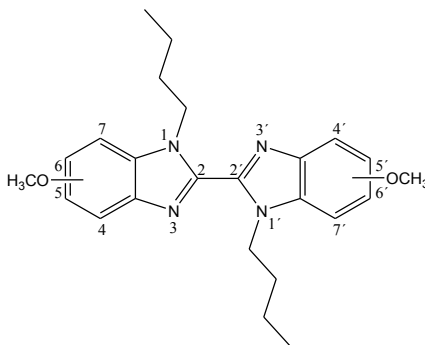
Aus 2 mmol (600 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1H-benzimidazol (**24**) und 6 mmol (0,6 mL) 2-Iodpropan:

**38**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 1,02 mmol (386 mg, 51 %)

$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_2$  (378,21  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

$^1\text{H-NMR}_{400\text{ MHz}}$  ([D6]-DMSO):  $\delta = 1,55\text{-}1,61$  (m, 12H,  $\text{CH}_3$ ),  $\delta = 3,81\text{-}3,89$  (m, 6H, 5,5'/5,6'/6,6'- $\text{OCH}_3$ ),  $\delta = 5,19\text{-}5,38$  (m, 2H, CH),  $\delta = 6,93\text{-}6,99$  (m, 2H,  $\text{H}_5, \text{H}_5' / \text{H}_5, \text{H}_6' / \text{H}_6, \text{H}_6'$ ),  $\delta = 7,27\text{-}7,33$  (m, 2H,  $\text{H}_4, \text{H}_4' / \text{H}_4, \text{H}_7' / \text{H}_7, \text{H}_7'$ ),  $\delta = 7,66\text{-}7,81$  (m, 2H,  $\text{H}_4, \text{H}_4' / \text{H}_4, \text{H}_7' / \text{H}_7, \text{H}_7'$ )

1,1'-Dibutyl-5,5'/5,6'/6,6'-dimethoxy-2,2'-bi-1H-benzimidazol



**39**

Aus 2 mmol (600 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1H-benzimidazol (**24**) und 6 mmol (0,7 mL) 1-Iodbutan:

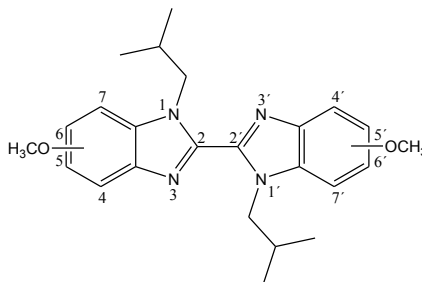
**39**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,39 mmol (158 mg, 39 %)

$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_2$  (406,24  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )



**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>4</sub>]-MeOD): δ = 0,80-0,85 (m, 6H, CH<sub>3</sub>), δ = 1,18-1,29 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), δ = 1,68-1,78 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), δ = 3,87-3,93 (m, 6H, 5,5'/5,6'/6,6'-OCH<sub>3</sub>), δ = 4,63-4,71 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), δ = 6,99-7,10 (m, 2H, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>), δ = 7,13-7,27 (m, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>), δ = 7,54-7,67 (d, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>)

5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-1,1'-di-(2-methylpropyl)-2,2'-bi-1H-benzimidazol



**40**

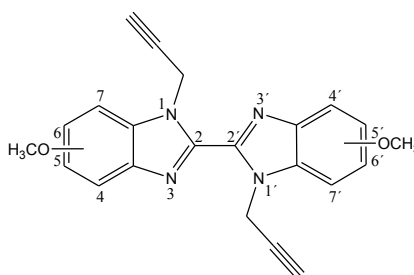
Aus 2 mmol (600 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1H-benzimidazol (**24**) und 6 mmol (0,7 mL) 1-Iod-2-methylpropan:

**40**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,66 mmol (168 mg, 33 %)

C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (406,24 g·mol<sup>-1</sup>)

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 0,76-0,81 (m, 12H, CH<sub>3</sub>), δ = 2,05-2,15 (m, 2H, CH), δ = 3,83-3,87 (m, 6H, 5,5'/5,6'/6,6'-OCH<sub>3</sub>), δ = 4,68-4,76 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), δ = 6,90-7,02 (m, 2H, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>), δ = 7,24-7,29 (m, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>), δ = 7,61-7,67 (m, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>)

5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-1,1'-dipropargyl-2,2'-bi-1H-benzimidazol



**41**

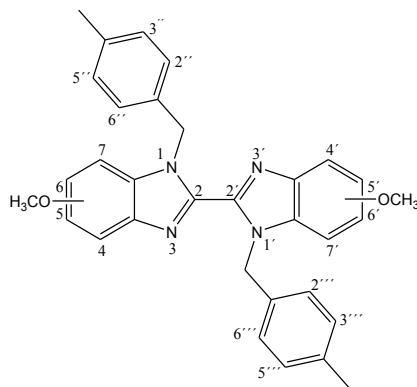
Aus 2 mmol (600 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1H-benzimidazol (**24**) und 6 mmol (1,0 mL) Propargylbromid (80 %ige Lösung in Toluol):

**41**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,72 mmol (266 mg, 36 %)

C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (370,14 g·mol<sup>-1</sup>)

$^1\text{H-NMR}_{400\text{ MHz}}$  ([D6]-DMSO):  $\delta = 3,33\text{-}3,35$  (m, 2H, CH),  $\delta = 3,83\text{-}3,90$  (m, 6H, 5,5'/5,6'/6,6'-OCH<sub>3</sub>),  $\delta = 5,90\text{-}5,97$  (m, 4H, CH<sub>2</sub>),  $\delta = 6,98\text{-}7,11$  (m, 2H, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>),  $\delta = 7,30\text{-}7,38$  (m, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>),  $\delta = 7,65\text{-}7,76$  (m, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>)

5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-1,1'-di-(4-methylbenzyl)-2,2'-bi-1H-benzimidazol



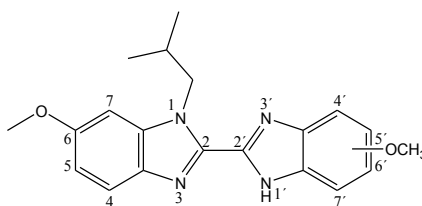
**42**

Aus 2 mmol (600 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1H-benzimidazol (**24**) und 6 mmol (0,7 mL) 4-Methylbenzylbromid:

**42**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,36 mmol (180 mg, 18 %)

C<sub>32</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (502,24 g·mol<sup>-1</sup>)

$^1\text{H-NMR}_{400\text{ MHz}}$  ([D6]-DMSO):  $\delta = 2,18\text{-}2,21$  (2 s, 9H, CH<sub>3</sub>),  $\delta = 3,79$  (s, 6H, 5,5'/5,6'/6,6'-OCH<sub>3</sub>),  $\delta = 3,80$  (s, 3H, 5,5'/5,6'/6,6'-OCH<sub>3</sub>),  $\delta = 6,14\text{-}6,21$  (m, 6H, CH<sub>2</sub>),  $\delta = 6,90\text{-}7,00$  (m, 12H, H<sub>2''</sub>, H<sub>2'''</sub>, H<sub>3''</sub>, H<sub>3'''</sub>, H<sub>5''</sub>, H<sub>5'''</sub>, H<sub>2''</sub>, H<sub>2'''</sub>),  $\delta = 7,17$  (pt, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>),  $\delta = 7,29$  (pt, <sup>4</sup>J = 2,49+2,47 Hz, 1H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>),  $\delta = 7,49$  (d, <sup>3</sup>J = 8,94 Hz, 1H, H<sub>5</sub>,H<sub>6</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>),  $\delta = 7,67$  (d, <sup>3</sup>J = 8,85 Hz, 2H, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>)

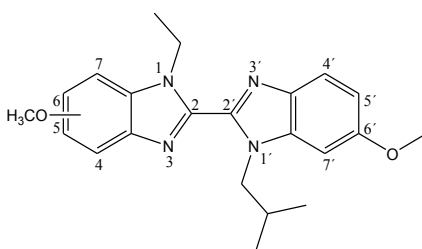
6,5'/6'-Dimethoxy-1-(2-methylpropyl)-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol**43**

Aus 1 mmol (406 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-1,1'-di-(2-methylpropyl)-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**40**, Stellungsisomerengemisch) isoliert:

**43**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,15 mmol (61 mg, 15 %)

$C_{20}H_{22}N_4O_2$  (350,17 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 0,89 (d, 6H, CH<sub>3</sub>), δ = 2,33 (oct, 1H, CH), δ = 3,82 (s, 6H, 5'/6'-OCH<sub>3</sub>), δ = 3,87 (s, 6H, 6-OCH<sub>3</sub>), δ = 4,80 (d, 2H, CH<sub>2</sub>), δ = 6,91-7,04 (m, 2H, H5'/H6', H5), δ = 7,23-7,31 (m, 1H, H4'/H7', H7), δ = 7,61-7,69 (m, 1H, H4'/H7', H4), δ = 13,15 (s, 1H, NH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

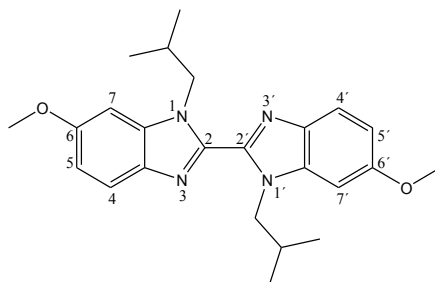
5/6,6'-Dimethoxy-1-ethyl-1'-(2-methylpropyl)-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol**44**

Aus 1 mmol (406 mg) 5/6,6'-Dimethoxy-1-(2-methylpropyl)-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**43**) und 3 mmol (0,2 mL) Iodethan:

**44**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,62 mmol (252 mg, 62 %)

$C_{22}H_{26}N_4O_2$  (378,21 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 0,73-0,80 (m, 6H, CH<sub>3</sub>), δ = 1,37-1,41 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), δ = 2,12 (oct, 1H, CH), δ = 3,81-3,90 (m, 6H, 5/6,6'-OCH<sub>3</sub>), δ = 4,67-4,89 (m, 4H, CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), δ = 6,91-7,04 (m, 2H, H5'/H6, H5'), δ = 7,23-7,31 (m, 1H, H4'/H7, H7'), δ = 7,61-7,69 (m, 1H, H4'/H7, H4')

6,6'-Dimethoxy-1,1'-di-2-methylpropyl-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol**45**

Aus 1 mmol (406 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-1,1'-di-(2-methylpropyl)-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**40**, Stellungsisomerengemisch) isoliert:

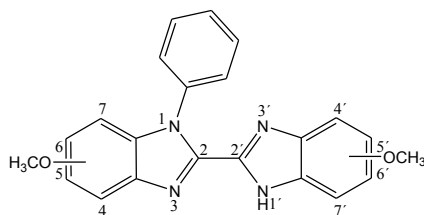
**45**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,11 mmol (45 mg, 11 %)

$C_{24}H_{30}N_4O_2$  (406,24 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 0,75-0,81 (m, 6H, CH<sub>3</sub>), δ = 2,05-2,15 (m, 2H, CH), δ = 3,85 (d, 6H, 6,6'-OCH<sub>3</sub>), δ = 4,72 (q, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), δ = 6,90-7,02 (m, 2H, H<sub>5</sub>, H<sub>5'</sub>), δ = 7,26 (td, 1H, H<sub>7</sub>, H<sub>7'</sub>), δ = 7,61-7,67 (m, 1H, H<sub>4</sub>, H<sub>4'</sub>)

Methode B: Kupfer(I)-iodid-katalysierte N-Arylierung

Zu einer Suspension von 2 mmol (600 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**24**) in 2 mL NMP werden 2 Spatelspitzen K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 2 Spatelspitzen CuI sowie 6 mmol des entsprechenden Arylhalogenids (Überschuss) zugegeben. Der Ansatz wird in einem 5 mL druckstabilen Quarzreaktorsystem im Magnetfeld-Vibrations-Homogenisierer (MVH)-1000<sup>®</sup> in der Synthesemikrowelle nach einer 10minütigen Aufheizphase für 2 h (Plateauphase) bei 195 °C mit einer eingestellten Maximalleistung von 300 W erhitzt (Kap. 2.1.6.2). Anschließend wird das LM im Vakuum im Kugelrohrföfen entfernt. Die Aufreinigung erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel. Als mobile Phase dient ein FM aus EA/n-Hexan (9+1). Das Trennverhalten der Substanzen zeigt sich dabei wie bei den N-alkylierten Verbindungen.

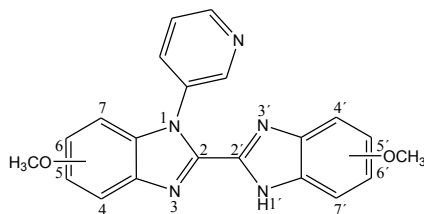
5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-1-phenyl-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol**46**

Aus 1 mmol (294 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**24**) und 6 mmol (0,6 mL) Phenylbromid:

**46**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,08 mmol (30 mg, 8 %)

$C_{22}H_{18}N_4O_2$  (370,14 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 3,70-3,90 (m, 6H, 5,5'/5,6'/6,6'-OCH<sub>3</sub>), δ = 6,55-7,77 (m, 11H, Aromaten-*H*), δ = 13,20-13,30 (m, 1H, NH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-1-(3-pyridinyl)-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol**47**

Aus 1 mmol (294 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**24**) und 6 mmol (0,6 mL) 3-Brompyridin:

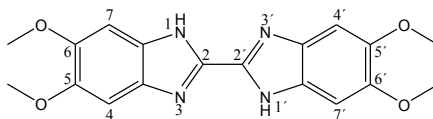
**47**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,07 mmol (26 mg, 7 %)

$C_{21}H_{17}N_5O_2$  (371,14 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 3,70-3,90 (m, 6H, 5,5'/5,6'/6,6'-OCH<sub>3</sub>), δ = 6,61-8,10 (m, 10H, Aromaten-*H*), δ = 13,25-13,30 (m, 1H, NH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

### 5.1.3.7 Synthese von 5,5',6,6'-Tetramethoxy-2,2'-bisbenzimidazolen

#### 5,5',6,6'-Tetramethoxy-2,2'-bi-1H-benzimidazol



**48**

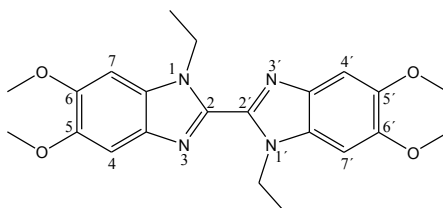
Aus 2 mmol (336 mg) 4,5-Dimethoxy-*o*-phenyldiamin (**21**) und 1 mmol (0,12 mL) TCA, Synthesevorschrift: „Allgemeine Vorschrift zur Synthese von 2,2'-Bisbenzimidazolen aus *o*-Phenyldiaminen“, Aufarbeitung: Methode A oder B

**48**: Brauner Feststoff, Ausbeute: 0,44 mmol (156 mg, 44 %)

$C_{18}H_{18}N_4O_4$  (354,13 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D6]-DMSO):  $\delta = 3,82$  (s, 12H, 5,5',6,6'-OCH<sub>3</sub>),  $\delta = 6,96-7,09$  (m, 2H, H4 / H7, H4' / H7'),  $\delta = 7,15-7,25$  (m, 2H, H4 / H7, H4' / H7'),  $\delta = 11,85-12,30$  (m, 2H, NH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

#### 1,1'-Diethyl-5,5',6,6'-tetramethoxy-2,2'-bi-1H-benzimidazol



**49**

Aus 1 mmol (354 mg) 5,5',6,6'-Tetramethoxy-2,2'-bi-1H-benzimidazol (**48**) und 3 mmol (0,2 mL) Iodethan, Synthesevorschrift: „Synthese von *N*-substituierten 2,2'-Bisbenzimidazolen aus 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1H-benzimidazol“, Methode A, anstelle von 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1H-benzimidazol (**24**) wird 5,5',6,6'-Tetramethoxy-2,2'-bi-1H-benzimidazol (**48**) eingesetzt

**49**: Brauner Feststoff, Ausbeute: 0,55 mmol (226 mg, 55 %)

$C_{22}H_{26}N_4O_4$  (410,20 g·mol<sup>-1</sup>)

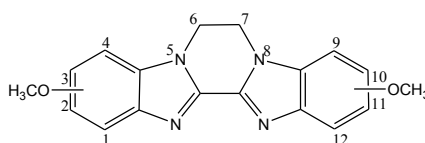
<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D6]-DMSO):  $\delta = 1,38$  (t, 6H, CH<sub>3</sub>),  $\delta = 3,84$  (s, 6H, 6,6'-OCH<sub>3</sub>),  $\delta = 3,89$  (s, 6H, 5,5'-OCH<sub>3</sub>),  $\delta = 4,83$  (q, 4H, CH<sub>2</sub>),  $\delta = 7,26$  (s, 2H, H7, H7'),  $\delta = 7,28$  (s, H4, H4')

### 5.1.3.8 Synthese von *N,N'*-verbrückten 2,2'-Bisbenzimidazolen

#### Allgemeine Vorschrift zur Synthese von *N,N'*-verbrückten 2,2'-Bisbenzimidazolen

Zu einer Suspension von 2 mmol (600 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**24**) in 50 mL ACN werden 2 Spatelspitzen 18-Krone-6 und 2 Spatelspitzen  $K_2CO_3$  sowie 3 mmol des entsprechenden Halongenalkylhalogenids (1,5facher Überschuss) gegeben. Der Ansatz wird in einem 100 mL Rundkolben für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird das LM im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel. Als mobile Phase dient ein FM aus EA/n-Hexan (9+1).

#### 6,7-Dihydro-2/3,10/11-dimethoxy-pyrazino[1,2-a:4,3-a']bisbenzimidazol



**50**

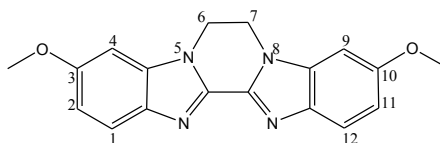
Aus 2 mmol (600 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**24**) und 3 mmol (0,3 mL) 1,2-Dibromethan:

**50**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,34 mmol (109 mg, 17 %)

$C_{18}H_{16}N_4O_2$  (320,13 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 3,81-3,87 (m, 6H, 2/3, 10/11-OCH<sub>3</sub>), δ = 4,71-4,75 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), δ = 6,90-7,03 (m, 2H, H<sub>2</sub>/H<sub>3</sub>, H<sub>10</sub>/H<sub>11</sub>), δ = 7,27-7,33 (m, 2H, H<sub>1</sub>/H<sub>4</sub>, H<sub>9</sub>/H<sub>12</sub>), δ = 7,60-7,67 (m, 2H, H<sub>1</sub>/H<sub>4</sub>, H<sub>9</sub>/H<sub>12</sub>)

#### 6,7-Dihydro-3,10-dimethoxy-pyrazino[1,2-a:4,3-a']bisbenzimidazol



**51**

Aus 0,5 mmol (160 mg) 6,7-Dihydro-2/3,10/11-dimethoxy-pyrazino[1,2-a:4,3-a']bisbenzimidazol (**50**, Stellungsisomerengemisch) isoliert:

**51**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,09 mmol (29 mg, 18 %)

$C_{18}H_{16}N_4O_2$  (320,13 g·mol<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 3,87 (s, 6H, 3,10-OCH<sub>3</sub>), δ = 4,74 (s, 4H, CH<sub>2</sub>), δ = 6,92 (dd, <sup>3</sup>J = 8,81 Hz, <sup>4</sup>J = 2,32 Hz, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>11</sub>), δ = 7,31 (d, <sup>4</sup>J = 2,23 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>9</sub>), δ = 7,65 (d, <sup>3</sup>J = 8,83 Hz, 2H, H<sub>1</sub>, H<sub>12</sub>)

### 5.1.3.9 Synthese von 2,2'-überbrückten Benzimidazolen

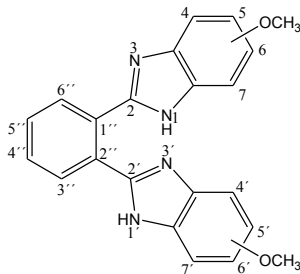
#### Allgemeine Vorschrift zur Synthese 2,2'-überbrückter Benzimidazole

Für die Feststoffsynthese werden 3 mmol (414 mg) 4-Methoxy-*o*-phenylendiamin (1,5facher Überschuss) und 2 mmol *o*-Dicarbonsäure in einen 50 mL Rundkolben gegeben und 10 min rühren gelassen. Dann wird die Mischung langsam mit Hilfe eines Ölbades auf 45-50 °C erwärmt. Bei guter Homogenisierung wird langsam weiter erwärmt bis die Mischung eine breiige Form annimmt. Die erreichte Temperatur entspricht ca. dem Schmelzpunkt der verwendeten *o*-Dicarbonsäure. Diese Temperatur wird für 30 min gehalten. Danach kühlt die Mischung langsam auf RT ab. Dem Reaktionsgemisch werden Kieselgel und Aceton zugesetzt. Das LM wird anschließend im Vakuum entfernt.

Die Auftrennung erfolgt zunächst säulenchromatographisch an Kieselgel, dabei dient DM/MeOH (9+1) als FM. Das gewünschte Produkt befindet sich auf der DC-Platte nach dem Entwickeln auf ca. halber Höhe der Entfernung der Fließmittelfront vom Start und zeigt bei einer Wellenlänge von 254 nm unter dem UV-Betrachter blaue Fluoreszenz. Die entsprechenden Fraktionen werden vereint und das LM im Vakuum entfernt.

Anschließend wird aus EtOH umkristallisiert. Dafür werden dem erhaltenen Feststoffgemisch (dunkelbraun) 10 mL EtOH und 2 Spatelspitzen Aktivkohle zugesetzt. Diese Mischung rührt ca. 1 h und wird anschließend über Celite® abfiltriert. Das Filtrat wird eingeeengt bis 2-3 mL LM verbleiben. Die Mischung wird mit EtOH auf 10 mL aufgefüllt und langsam im Wasserbad erwärmt. Dabei ist die Mischung zu schwenken. Wenn in der Lösung Gasblasen aufsteigen, wird das Gemisch aus dem Wasserbad genommen und langsam abkühlen gelassen. Es entsteht ein beigefarbener Feststoff, der noch mit EtOH gewaschen wird, so dass das 2,2'-überbrückte Benzimidazol schließlich in reiner Form vorliegt.

#### 2,2'-(1,2-Phenylen)bis[5/6-methoxy-1*H*-benzimidazol]



**52**

Aus 3 mmol (414 mg) 4-Methoxy-*o*-phenylendiamin und 1 mmol (166 mg) *o*-Phthalsäure:

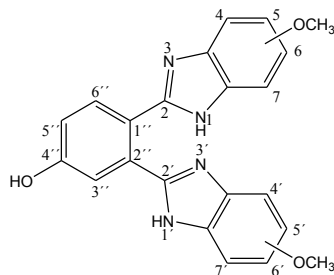
**52:** Brauner Feststoff, Ausbeute: 0,33 mmol (122 mg, 33 %)

$C_{22}H_{18}N_4O_2$  (370,14 g·mol<sup>-1</sup>)



**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO):  $\delta = 3,80$  (s, 3H, 5,5'/5,6'/6,6'-OCH<sub>3</sub>),  $\delta = 6,82$  (dd, <sup>3</sup>J = 8,77 Hz, <sup>4</sup>J = 2,36 Hz, 2H, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>),  $\delta = 7,15$  (bs, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>) (im <sup>1</sup>H-HT-NMR bei 150 °C: d, <sup>4</sup>J = 1,72 Hz),  $\delta = 7,53$  (bs, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>) (im <sup>1</sup>H-HT-NMR bei 150 °C: d, <sup>3</sup>J = 8,70 Hz),  $\delta = 7,67$  (q, J = 3,38+5,87+9,25 Hz, 2H, H<sub>3</sub><sup>\*</sup>, H<sub>6</sub><sup>\*</sup>),  $\delta = 8,15$  (q, J = 3,37+5,88+9,26 Hz, 2H, H<sub>4</sub><sup>\*</sup>, H<sub>5</sub><sup>\*</sup>),  $\delta = 13,37$  (bs, 2H, NH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

2,2'-(4-Hydroxy-1,2-phenylen)bis[5/6-dimethoxy-1H-benzimidazol]



**53**

Aus 3 mmol (414 mg) 4-Methoxy-*o*-phenylendiamin und 1 mmol (182 mg) 4-Hydroxy-*o*-phthalsäure:

**53**: Brauner Feststoff, Ausbeute: 0,28 mmol (108 mg, 28 %)

C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> (386,14 g·mol<sup>-1</sup>)

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO):  $\delta = 3,81$  (s, 3H, 5,5'/5,6'/6,6'-OCH<sub>3</sub>),  $\delta = 3,80$  (s, 3H, 5,5'/5,6'/6,6'-OCH<sub>3</sub>),  $\delta = 6,82 - 6,88$  (2 dd, <sup>3</sup>J = 8,87 Hz, <sup>4</sup>J = 2,42 Hz, 2H, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>),  $\delta = 7,06$  (dd, <sup>3</sup>J = 8,62 Hz, <sup>4</sup>J = 2,61 Hz, 1H, H<sub>5''</sub>),  $\delta = 7,10-7,20$  (d, J = 11,81 Hz, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>) (im <sup>1</sup>H-HT-NMR bei 90 °C: 2 d bei 7,12 ppm, 7,15 ppm, <sup>4</sup>J = 2,34 Hz + <sup>4</sup>J = 2,28 Hz),  $\delta = 7,50-7,59$  (pt, J = 8,51+8,72 Hz, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>) (im <sup>1</sup>H-HT-NMR bei 90 °C: 2 d bei 7,48-7,54 ppm, <sup>3</sup>J = 9,03 Hz + <sup>3</sup>J = 9,35 Hz),  $\delta = 7,61$  (d, <sup>4</sup>J = 2,59 Hz, 1H, H<sub>3''</sub>),  $\delta = 7,94$  (d, <sup>3</sup>J = 8,61 Hz, 1H, H<sub>6''</sub>),  $\delta = 10,22$  (s, 1H, OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O),  $\delta = 13,55$  (bs, 2H, NH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

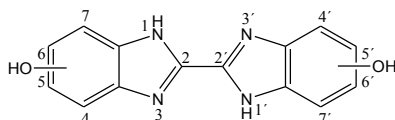
**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>4</sub>]-MeOH):  $\delta = 3,80-3,82$  (2 s, 6H, 5,5'/5,6'/6,6'-OCH<sub>3</sub>),  $\delta = 6,83-6,89$  (qd, <sup>3</sup>J = 8,77 Hz, <sup>4</sup>J = 2,42 Hz, 2H, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>),  $\delta = 7,00-7,04$  (2 d, <sup>4</sup>J = 2,24+2,26 Hz, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>),  $\delta = 7,06$  (dd, <sup>3</sup>J = 8,57 Hz, <sup>4</sup>J = 2,59 Hz, 1H, H<sub>5''</sub>),  $\delta = 7,37$  (d, <sup>4</sup>J = 2,51 Hz, 1H, H<sub>3''</sub>),  $\delta = 7,40-7,46$  (d, <sup>3</sup>J = 8,83+8,85 Hz, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>),  $\delta = 7,80$  (d, <sup>3</sup>J = 8,56 Hz, 1H, H<sub>6''</sub>)

### 5.1.3.10 Etherspaltung von Methoxyschutzgruppen

#### Allgemeine Vorschrift zur Etherspaltung der Bisbenzimidazole

0,5 mmol des umzusetzenden Bisbenzimidazols werden in einem 50 mL Schlenkkolben in 15 mL absolutem Dichlormethan unter Stickstoffatmosphäre gelöst oder suspendiert. Bei einer Reaktionstemperatur von 0 °C werden 3 mmol (400 mg)  $\text{AlCl}_3$  und 3 mmol (0,22 mL) Ethanthiol (äquimolar bis Überschuss) zugegeben. Der Ansatz wird 30 min bei 0 °C und weitere 30 min bei RT gerührt. Anschließend wird die Reaktion durch die vorsichtige Zugabe von 10 mL Wasser beendet. Nach der dreimaligen Extraktion mit Dichlormethan werden die vereinigten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das LM im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel. Als mobile Phase dient ein FM aus DM/MeOH (9+1).

#### [2,2'-Bi-1*H*-benzimidazol]-5,5'/5,6'/6,6'-diol



**54**

Aus 0,5 mmol (147 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**24**):

**54**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,2 mmol (52 mg, 39 %)

$\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$  (266,08  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

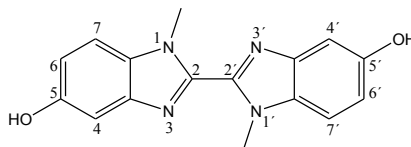
**MS** (ESI): ber.: 267,0804, gef.: 267,0824, Abweichung: 7 ppm

**$^1\text{H-NMR}$** <sub>400 MHz</sub> ([D6]-DMSO):  $\delta = 6,76$  (dd,  $^3\text{J} = 8,66$  Hz,  $^4\text{J} = 2,28$  Hz, 2H,  $\text{H}_5, \text{H}_5' / \text{H}_5, \text{H}_6' / \text{H}_6, \text{H}_6'$ ),  $\delta = 6,92$  (d,  $^4\text{J} = 1,80$  Hz, 2H,  $\text{H}_4, \text{H}_4' / \text{H}_4, \text{H}_7' / \text{H}_7, \text{H}_7'$ ),  $\delta = 7,44$  (d,  $^3\text{J} = 8,67$  Hz, 1H,  $\text{H}_4, \text{H}_4' / \text{H}_4, \text{H}_7' / \text{H}_7, \text{H}_7'$ ),  $\delta = 9,32$  (s, 2H, 5,5'/5,6'/6,6'-OH, austauschbar mit  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta = 13,00$  (s, 2H, NH, austauschbar mit  $\text{D}_2\text{O}$ )

**$^1\text{H-NMR}$** <sub>400 MHz</sub> ([D4]-MeOD):  $\delta = 7,08$  (dd,  $^3\text{J} = 8,88$  Hz,  $^4\text{J} = 2,25$  Hz, 2H,  $\text{H}_5, \text{H}_5' / \text{H}_5, \text{H}_6' / \text{H}_6, \text{H}_6'$ ),  $\delta = 7,12$  (d,  $^4\text{J} = 1,92$  Hz, 2H,  $\text{H}_4, \text{H}_4' / \text{H}_4, \text{H}_7' / \text{H}_7, \text{H}_7'$ ),  $\delta = 7,67$  (d,  $^3\text{J} = 8,84$  Hz, 2H,  $\text{H}_4, \text{H}_4' / \text{H}_4, \text{H}_7' / \text{H}_7, \text{H}_7'$ )

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3500-2500 (b), 1620 (s-m), 1169 (s-m), 1122 (s)

**CHN** (%): ber.: C 50,00 H 4,80 N 16,66, gef.: C 50,03 H 4,89 N 16,69

1,1'-Dialkylierte 2,2'-Bisbenzimidazol-5,5'-diol1,1'-Dimethyl-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-5,5'-diol**55**

Aus 0,5 mmol (161 mg) 5,5'-Dimethoxy-1,1'-dimethyl-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**25**):

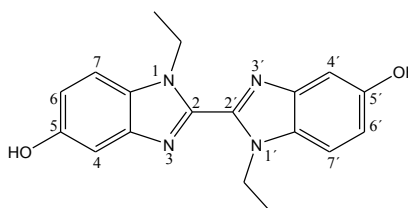
**55**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,18 mmol (52 mg, 35 %)

$C_{16}H_{14}N_4O_2$  (294,11 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 295,1117, gef.: 295,1135, Abweichung: 6 ppm

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 4,18 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), δ = 6,91 (dd, <sup>3</sup>J = 8,73 Hz, <sup>4</sup>J = 2,23 Hz, 2H, H<sub>6</sub>, H<sub>6'</sub>), δ = 7,08 (d, <sup>4</sup>J = 2,10 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>4'</sub>), δ = 7,49 (d, <sup>3</sup>J = 8,76 Hz, 2H, H<sub>7</sub>, H<sub>7'</sub>), δ = 9,31 (bs, 2H, 5,5'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3174 (b), 2955 (s-m), 1620 (s), 1492 (s), 1435 (s), 1377 (s), 1224 (s), 1173 (s)

1,1'-Diethyl-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-5,5'-diol**56**

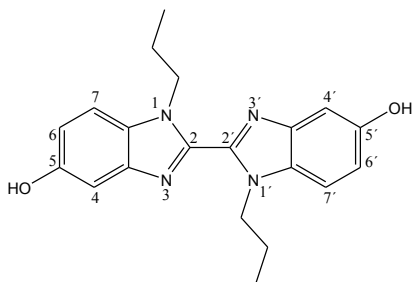
Aus 0,5 mmol (175 mg) 1,1'-Diethyl-5,5'-dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**26**):

**56**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,16 mmol (50 mg, 31 %)

$C_{18}H_{18}N_4O_2$  (322,14 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 323,1430, gef.: 323,1450, Abweichung: 6 ppm

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 1,37 (t, 6H, CH<sub>3</sub>), δ = 4,78 (q, 4H, CH<sub>2</sub>), δ = 6,89 (dd, <sup>3</sup>J = 8,72 Hz, <sup>4</sup>J = 2,15 Hz, 2H, H<sub>6</sub>, H<sub>6'</sub>), δ = 7,06 (d, <sup>4</sup>J = 2,06 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>4'</sub>), δ = 7,51 (d, <sup>3</sup>J = 8,74 Hz, 2H, H<sub>7</sub>, H<sub>7'</sub>), δ = 9,24 (s, 2H, 5,5'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

1,1'-Dipropyl-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-5,5'-diol**57**

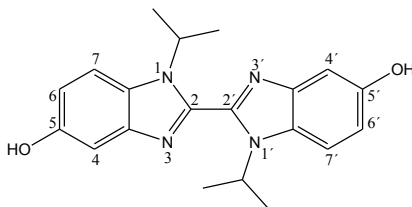
Aus 0,5 mmol (189 mg) 5,5'-Dimethoxy-1,1'-dipropyl-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**27**):

**57**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,1 mmol (32 mg, 18 %)

$C_{20}H_{22}N_4O_2$  (350,17 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 351,1743, gef.: 351,1717, Abweichung: 7 ppm

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D6]-DMSO):  $\delta$  = 0,78 (t, 6H, CH<sub>3</sub>),  $\delta$  = 1,75 (sext, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>),  $\delta$  = 4,71 (t, 4H, CH<sub>2</sub>),  $\delta$  = 6,90 (dd, <sup>3</sup>J = 8,74 Hz, <sup>4</sup>J = 2,09 Hz, 2H, H<sub>6</sub>, H<sub>6'</sub>),  $\delta$  = 7,07 (d, <sup>4</sup>J = 2,00 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>4'</sub>),  $\delta$  = 7,54 (d, <sup>3</sup>J = 8,78 Hz, 2H, H<sub>7</sub>, H<sub>7'</sub>),  $\delta$  = 9,35 (bs, 2H, 5,5'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

1,1'-Di-(1-methylethyl)-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-5,5'-diol**58**

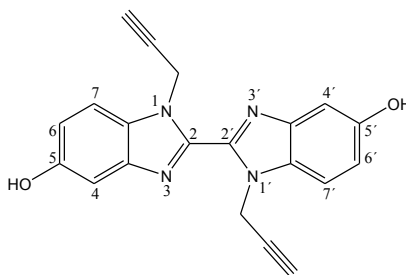
Aus 0,5 mmol (189 mg) 5,5'-Dimethoxy-1,1'-di-(1-methylethyl)-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**28**):

**58**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,1 mmol (25 mg, 14 %)

$C_{20}H_{22}N_4O_2$  (350,17 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 351,1743, gef.: 351,1752, Abweichung: 3 ppm

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D6]-DMSO):  $\delta$  = 1,56 (d, 6H, CH<sub>3</sub>),  $\delta$  = 5,18 (sept, 2H, CH),  $\delta$  = 6,88 (dd, <sup>3</sup>J = 8,89 Hz, <sup>4</sup>J = 2,28 Hz, 2H, H<sub>6</sub>, H<sub>6'</sub>),  $\delta$  = 7,07 (d, <sup>4</sup>J = 2,31 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>4'</sub>),  $\delta$  = 7,70 (d, <sup>3</sup>J = 8,82 Hz, 2H, H<sub>7</sub>, H<sub>7'</sub>),  $\delta$  = 9,37 (bs, 2H, 5,5'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

1,1'-Dipropargyl-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-5,5'-diol**59**

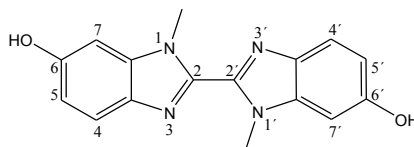
Aus 0,5 mmol (185 mg) 5,5'-Dimethoxy-1,1'-dipropargyl-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**29**):

**59**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,1 mmol (21 mg, 12 %)

$C_{20}H_{14}N_4O_2$  (342,11 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 343,1117, gef.: 343,1123, Abweichung: 2 ppm

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 3,32 (t, 2H, CH), δ = 5,89 (d, 4H, CH<sub>2</sub>), δ = 6,95 (dd, <sup>3</sup>J = 8,72 Hz, <sup>4</sup>J = 2,25 Hz, 2H, H<sub>6</sub>, H<sub>6'</sub>), δ = 7,11 (d, <sup>4</sup>J = 2,28 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>4'</sub>), δ = 7,56 (d, <sup>3</sup>J = 8,70 Hz, 2H, H<sub>7</sub>, H<sub>7'</sub>), δ = 9,38 (s, 2H, 5,5'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

1,1'-Dialkylierte 2,2'-Bisbenzimidazol-6,6'-diol1,1'-Dimethyl-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-6,6'-diol**60**

Aus 0,5 mmol (161 mg) 6,6'-Dimethoxy-1,1'-dimethyl-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**30**):

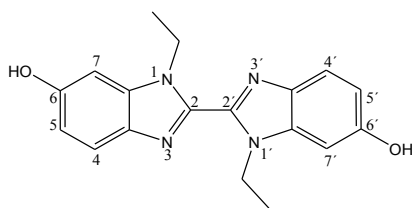
**60**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,2 mmol (53 mg, 36 %)

$C_{16}H_{14}N_4O_2$  (294,11 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 295,1117, gef.: 295,1125, Abweichung: 3 ppm

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 4,13 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), δ = 6,81 (dd, <sup>3</sup>J = 8,69 Hz, <sup>4</sup>J = 2,26 Hz, 2H, H<sub>5</sub>, H<sub>5'</sub>), δ = 6,91 (d, <sup>4</sup>J = 2,18 Hz, 2H, H<sub>7</sub>, H<sub>7'</sub>), δ = 7,57 (d, <sup>3</sup>J = 8,69 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>4'</sub>), δ = 9,31 (bs, 2H, 6,6'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3288 (b), 2925 (b-m), 1620 (s), 1409 (s), 1381 (s), 1223 (s), 1023 (s)

1,1'-Diethyl-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-6,6'-diol**61**

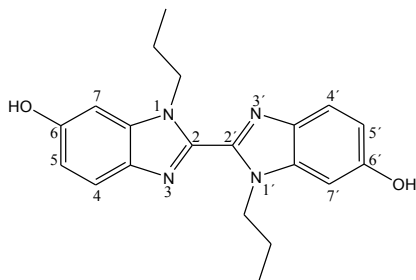
Aus 0,5 mmol (175 mg) 1,1'-Diethyl-6,6'-dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**31**):

**61**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,2 mmol (47 mg, 29 %)

$C_{18}H_{18}N_4O_2$  (322,14 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 323,1430, gef.: 323,1441, Abweichung: 3 ppm

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D6]-DMSO):  $\delta = 1,36$  (t, 6H,  $CH_3$ ),  $\delta = 4,72$  (q, 4H,  $CH_2$ ),  $\delta = 6,82$  (dd,  $^3J = 8,69$  Hz,  $^4J = 2,17$  Hz, 2H,  $H5, H5'$ ),  $\delta = 6,94$  (d,  $^4J = 2,06$  Hz, 2H,  $H7, H7'$ ),  $\delta = 7,57$  (d,  $^3J = 8,69$  Hz, 2H,  $H4, H4'$ ),  $\delta = 9,60$  (bs, 2H, 6,6'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

1,1'-Dipropyl-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-6,6'-diol**62**

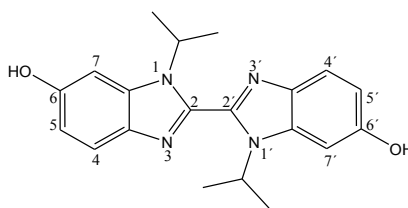
Aus 0,5 mmol (189 mg) 6,6'-Dimethoxy-1,1'-dipropyl-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**32**):

**62**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,1 mmol (33 mg, 19 %)

$C_{20}H_{22}N_4O_2$  (350,17 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 351,1743, gef.: 351,1751, Abweichung: 2 ppm

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D6]-DMSO):  $\delta = 0,80$  (t, 6H,  $CH_3$ ),  $\delta = 1,76$  (sext, 4H,  $CH_2CH_3$ ),  $\delta = 4,69$  (t, 4H,  $CH_2$ ),  $\delta = 6,80$  (dd,  $^3J = 8,69$  Hz,  $^4J = 2,21$  Hz, 2H,  $H5, H5'$ ),  $\delta = 6,94$  (d,  $^4J = 2,17$  Hz, 2H,  $H7, H7'$ ),  $\delta = 7,55$  (d,  $^3J = 8,68$  Hz, 2H,  $H4, H4'$ ),  $\delta = 9,50$  (s, 2H, 6,6'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

1,1'-Di-(1-methylethyl)-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-6,6'-diol**63**

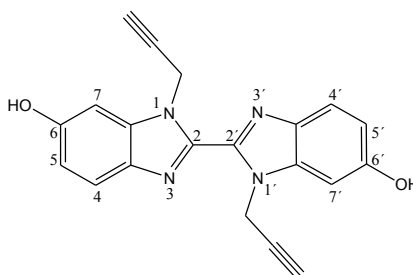
Aus 0,5 mmol (189 mg) 6,6'-Dimethoxy-1,1'-di-(1-methylethyl)-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**33**):

**63**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,1 mmol (26 mg, 15 %)

$C_{20}H_{22}N_4O_2$  (350,17  $g \cdot mol^{-1}$ )

**MS** (ESI): ber.: 351,1743, gef.: 351,1753, Abweichung: 3 ppm

**$^1H$ -NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO):  $\delta$  = 1,54 (d, 6H,  $CH_3$ ),  $\delta$  = 5,26 (sept, 2H,  $CH$ ),  $\delta$  = 6,81 (dd,  $^3J$  = 8,74 Hz,  $^4J$  = 1,89 Hz, 2H,  $H5$ ,  $H5'$ ),  $\delta$  = 7,11 (d,  $^4J$  = 1,69 Hz, 2H,  $H7$ ,  $H7'$ ),  $\delta$  = 7,57 (d,  $^3J$  = 8,71 Hz, 2H,  $H4$ ,  $H4'$ ),  $\delta$  = 9,51 (bs, 2H, 6,6'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

1,1'-Dipropargyl-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-6,6'-diol**64**

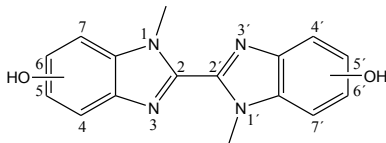
Aus 0,5 mmol (185 mg) 6,6'-Dimethoxy-1,1'-dipropargyl-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**34**):

**64**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,1 mmol (17 mg, 10 %)

$C_{20}H_{14}N_4O_2$  (342,11  $g \cdot mol^{-1}$ )

**MS** (ESI): ber.: 343,1117, gef.: 343,1133, Abweichung: 5 ppm

**$^1H$ -NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO):  $\delta$  = 3,33 (t, 2H,  $CH$ ),  $\delta$  = 5,85 (d, 4H,  $CH_2$ ),  $\delta$  = 6,86 (dd,  $^3J$  = 8,71 Hz,  $^4J$  = 2,28 Hz, 2H,  $H5$ ,  $H5'$ ),  $\delta$  = 7,02 (d,  $^4J$  = 2,28 Hz, 2H,  $H7$ ,  $H7'$ ),  $\delta$  = 7,62 (d,  $^3J$  = 8,77 Hz, 2H,  $H4$ ,  $H4'$ ),  $\delta$  = 9,69 (s, 2H, 6,6'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

1,1'-Dialkylierte 2,2'-Bisbenzimidazol-5,5'/5,6'/6,6'-diol1,1'-Dimethyl-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-5,5'/5,6'/6,6'-diol**65**

Aus 0,5 mmol (161 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-1,1'-dimethyl-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**35**):

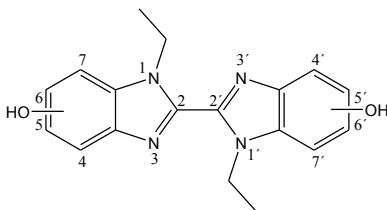
**65**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,2 mmol (53 mg, 36 %)

$C_{16}H_{14}N_4O_2$  (294,11 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 295,1117, gef.: 295,1132, Abweichung: 5 ppm

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D4]-MeOD):  $\delta$  = 4,02-4,07 (m, 6H, CH<sub>3</sub>),  $\delta$  = 6,78-6,89 (m, 2H, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>),  $\delta$  = 6,93-7,04 (m, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>),  $\delta$  = 7,45-7,61 (m, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>)

**IR** (cm<sup>-1</sup>): 3061 (b), 2961 (s), 1628 (s), 1592 (s), 1438 (s), 1676 (s-m), 1255 (s), 1089 (s)

1,1'-Diethyl-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-5,5'/5,6'/6,6'-diol**66**

Aus 0,5 mmol (175 mg) 1,1'-Diethyl-5,5'/5,6'/6,6'-dimethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**36**):

**66**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,2 mmol (56 mg, 35 %)

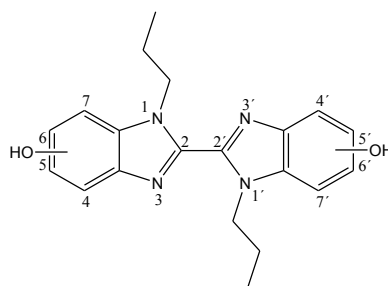
$C_{18}H_{18}N_4O_2$  (322,14 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 323,1430, gef.: 323,1444, Abweichung: 4 ppm

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D6]-DMSO):  $\delta$  = 1,34-1,39 (m, 6H, CH<sub>3</sub>),  $\delta$  = 4,70-4,82 (m, 4H, CH<sub>2</sub>),  $\delta$  = 6,79-6,90 (m, 2H, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>),  $\delta$  = 6,93-7,07 (m, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>),  $\delta$  = 7,48-7,59 (m, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>),  $\delta$  = 9,23-9,57 (m, 2H, 5,5'/5,6'/6,6'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D4]-MeOD):  $\delta$  = 1,33-1,40 (m, 6H, CH<sub>3</sub>),  $\delta$  = 4,51-4,62 (m, 4H, CH<sub>2</sub>),  $\delta$  = 6,88-7,15 (m, 4H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>),  $\delta$  = 7,47-7,61 (m, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>)



1,1'-Dipropyl-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-5,5'/5,6'/6,6'-diol**67**

Aus 0,5 mmol (189 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-1,1'-dipropyl-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**37**):

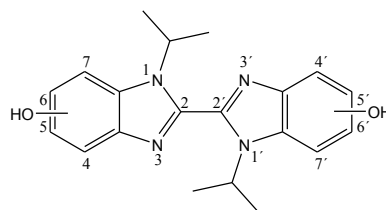
**67**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,1 mmol (35 mg, 20 %)

$C_{20}H_{22}N_4O_2$  (350,17 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 351,1743, gef.: 351,1760, Abweichung: 5 ppm

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 0,75-0,84 (m, 6H, CH<sub>3</sub>), δ = 1,70-1,81 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), δ = 4,66-4,77 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), δ = 6,78-6,89 (m, 2H, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>), δ = 6,93-7,05 (m, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>), δ = 7,48-7,57 (m, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>), δ = 9,21-9,53 (m, 2H, 5,5'/5,6'/6,6'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>4</sub>]-MeOD): δ = 0,80-0,85 (m, 6H, CH<sub>3</sub>), δ = 1,71-1,82 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), δ = 4,49-4,58 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), δ = 6,88-7,14 (m, 4H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>), δ = 7,48-7,60 (m, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>)

1,1'-Di-(1-methylethyl)-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-5,5'/5,6'/6,6'-diol**68**

Aus 0,5 mmol (189 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-1,1'-di-(1-methylethyl)-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**38**):

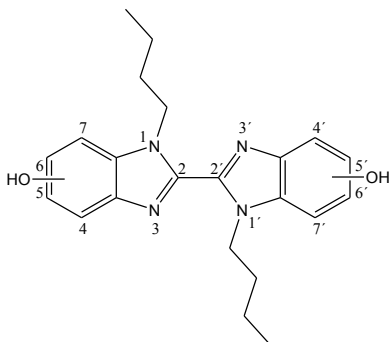
**68**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,05 mmol (16 mg, 9 %)

$C_{20}H_{22}N_4O_2$  (350,17 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 351,1743, gef.: 351,1757, Abweichung: 4 ppm

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D6]-DMSO):  $\delta = 1,52-1,58$  (m, 12H, CH<sub>3</sub>),  $\delta = 5,20-5,32$  (m, 2H, CH),  $\delta = 6,78-6,86$  (m, 2H, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>),  $\delta = 7,04-7,12$  (m, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>),  $\delta = 7,55-7,69$  (m, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>),  $\delta = 9,21-9,48$  (m, 2H, 5,5'/5,6'/6,6'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

1,1'-Dibutyl-[2,2'-bi-1H-benzimidazol]-5,5'/5,6'/6,6'-diol



**69**

Aus 0,5 mmol (203 mg) 1,1'-Dibutyl-5,5'/5,6'/6,6'-dimethoxy-2,2'-bi-1H-benzimidazol (**39**):

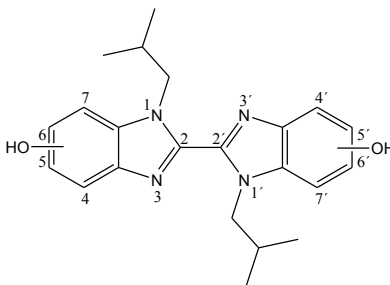
**69**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,04 mmol (15 mg, 8 %)

C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (378,21 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 379,2056, gef.: 379,2071, Abweichung: 4 ppm

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D6]-DMSO):  $\delta = 0,78-0,85$  (m, 6H, CH<sub>3</sub>),  $\delta = 1,21-1,25$  (m, 4H, CH<sub>2</sub>),  $\delta = 1,67-1,74$  (m, 4H, CH<sub>2</sub>),  $\delta = 4,72-4,82$  (m, 4H, CH<sub>2</sub>),  $\delta = 6,78-6,89$  (m, 2H, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>),  $\delta = 6,92-7,05$  (m, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>),  $\delta = 7,47-7,58$  (d, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>),  $\delta = 9,19-9,52$  (m, 2H, 5,5'/5,6'/6,6'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

1,1'-Di-(2-methylpropyl)-[2,2'-bi-1H-benzimidazol]-5,5'/5,6'/6,6'-diol



**70**

Aus 0,5 mmol (203 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-1,1'-di-(2-methylpropyl)-2,2'-bi-1H-benzimidazol (**40**):

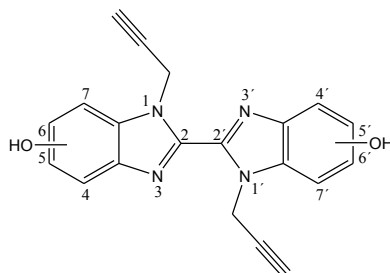
**70**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,05 mmol (17 mg, 9 %)

C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (378,21 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 379,2056, gef.: 379,2076, Abweichung: 5 ppm

**$^1\text{H-NMR}$** <sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO):  $\delta = 0,75\text{-}0,79$  (m, 12H, CH<sub>3</sub>),  $\delta = 2,03\text{-}2,13$  (m, 2H, CH),  $\delta = 4,59\text{-}4,67$  (m, 4H, CH<sub>2</sub>),  $\delta = 6,78\text{-}6,89$  (m, 2H, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>),  $\delta = 6,93\text{-}7,04$  (m, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>),  $\delta = 7,49\text{-}7,58$  (d, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>),  $\delta = 9,19\text{-}9,60$  (m, 2H, 5,5'/5,6'/6,6'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

1,1'-Dipropargyl-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-5,5'/5,6'/6,6'-diol



**71**

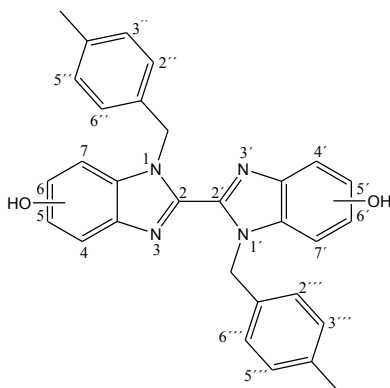
Aus 0,5 mmol (185 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-1,1'-dipropargyl-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**41**):

**71**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,05 mmol (17 mg, 10 %)

C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (342,11 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 343,1117, gef.: 343,1119, Abweichung: 1 ppm

**$^1\text{H-NMR}$** <sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO):  $\delta = 3,30\text{-}3,33$  (m, 2H, CH),  $\delta = 5,85\text{-}5,91$  (m, 4H, CH<sub>2</sub>),  $\delta = 6,85\text{-}6,97$  (m, 2H, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>),  $\delta = 7,02\text{-}7,12$  (m, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>),  $\delta = 7,53\text{-}7,65$  (m, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>),  $\delta = 9,30\text{-}9,80$  (m, 2H, 5,5'/5,6'/6,6'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

1,1'-Di-(4-methylbenzyl)-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-5,5'/5,6'/6,6'-diol**72**

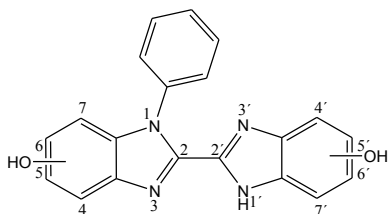
Aus 0,5 mmol (251 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-1,1'-di-(4-methylbenzyl)-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**42**):

**72**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,03 mmol (14 mg, 6 %)

$C_{30}H_{26}N_4O_2$  (474,21 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 475,2056, gef.: 475,2051, Abweichung: 1 ppm

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 2,20 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), δ = 2,21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), δ = 6,08-6,13 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), δ = 6,75-6,83 (m, 3H, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>), δ = 6,90-7,05 (m, 15H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>, H<sub>2</sub>'', H<sub>2</sub>'', H<sub>3</sub>'', H<sub>3</sub>'', H<sub>5</sub>'', H<sub>5</sub>'', H<sub>2</sub>'', H<sub>2</sub>''), δ = 7,39 (pt, <sup>3</sup>J = 7,98+8,68 Hz, 1H, H<sub>4</sub>,H<sub>7</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>4'</sub>,H<sub>7'</sub>), δ = 7,52-7,57 (2 d, <sup>3</sup>J = 8,50+8,76 Hz, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>), δ = 9,25 (d, 1H, 5,5'/5,6'/6,6'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O), δ = 9,50 (d, 2H, 5,5'/5,6'/6,6'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

Weitere 2,2'-Bisbenzimidazol-5,5'/5,6'/6,6'-diol1-Phenyl-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-5,5'/5,6'/6,6'-diol**73**

Aus 0,5 mmol (185 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-1-phenyl-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**46**):

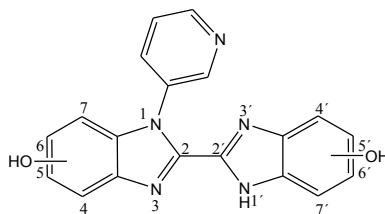
**73**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,08 mmol (26 mg, 15 %)

$C_{20}H_{14}N_4O_2$  (342,11 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 343,1117, gef.: 343,1141, Abweichung: 7 ppm

**$^1\text{H-NMR}$** <sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO):  $\delta$  = 6,45-7,65 (m, 11H, Aromaten-*H*),  $\delta$  = 9,10-9,60 (m, 2H, *OH*, austauschbar mit D<sub>2</sub>O),  $\delta$  = 12,90-13,10 (m, 1H, *NH*, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

1-(3-Pyridinyl)-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-5,5'/5,6'/6,6'-diol



**74**

Aus 0,5 mmol (186 mg) 5,5'/5,6'/6,6'-Dimethoxy-1-(3-pyridinyl)-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**47**):

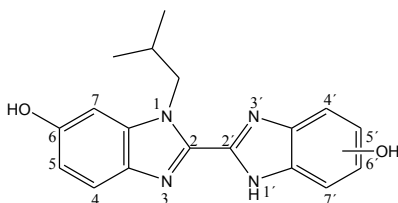
**74**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,06 mmol (21 mg, 12 %)

$\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2$  (343,11 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 344,1069, gef.: 344,1044, Abweichung: 7 ppm

**$^1\text{H-NMR}$** <sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO):  $\delta$  = 6,55-8,07 (m, 10H, Aromaten-*H*),  $\delta$  = 9,00-9,60 (m, 2H, *OH*, austauschbar mit D<sub>2</sub>O),  $\delta$  = 12,94-13,10 (m, 1H, *NH*, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

1-(2-Methylpropyl)-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-6,5'/6'-diol



**75**

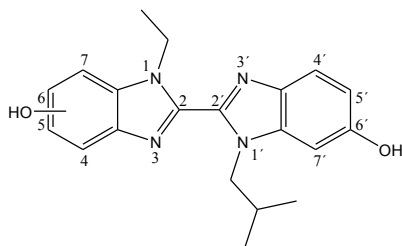
Aus 0,5 mmol (175 mg) 6,5'/6'-Dimethoxy-1-(2-methylpropyl)-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**43**):

**75**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,1 mmol (31 mg, 19 %)

$\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$  (322,14 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 323,1430, gef.: 323,1445, Abweichung: 5 ppm

**$^1\text{H-NMR}$** <sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO):  $\delta$  = 0,88 (d, 6H, *CH*<sub>3</sub>),  $\delta$  = 2,28 (oct, 1H, *CH*),  $\delta$  = 4,71 (d, 2H, *CH*<sub>2</sub>),  $\delta$  = 6,73 (dd, <sup>3</sup>*J* = 8,49 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1,91 Hz, 1H, *H*<sub>5'/H</sub>6'),  $\delta$  = 6,81 (dd, <sup>3</sup>*J* = 8,70 Hz, <sup>4</sup>*J* = 2,16 Hz, 1H, *H*<sub>5</sub>),  $\delta$  = 6,91 (bs, 1H, *H*<sub>4'/H</sub>7'),  $\delta$  = 6,94 (d, <sup>4</sup>*J* = 1,91 Hz, 1H, *H*<sub>7</sub>),  $\delta$  = 7,45 (d, <sup>3</sup>*J* = 8,61 Hz, 1H, *H*<sub>4'/H</sub>7'),  $\delta$  = 7,53 (d, <sup>3</sup>*J* = 8,69 Hz, 1H, *H*<sub>4'</sub>, *H*<sub>4</sub>),  $\delta$  = 9,30 (bs, 1H, 5'/6'-*OH*, austauschbar mit D<sub>2</sub>O),  $\delta$  = 9,47 (s, 1H, 6-*OH*, austauschbar mit D<sub>2</sub>O),  $\delta$  = 13,00 (s, 2H, *NH*, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

1-Ethyl-1'-(2-methylpropyl)-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-5/6,6'-diol**76**

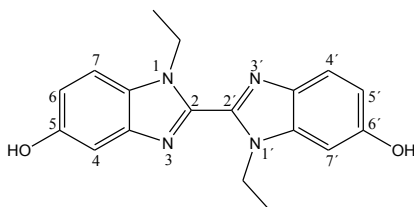
Aus 0,5 mmol (189 mg) 5/6,6'-Dimethoxy-1-ethyl-1'-(2-methylpropyl)-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**44**):

**76**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,1 mmol (35 mg, 20 %)

$C_{20}H_{22}N_4O_2$  (350,17 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 351,1743, gef.: 351,1743, Abweichung: 0 ppm

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D6]-DMSO):  $\delta$  = 0,74-0,79 (m, 6H, CH<sub>3</sub>),  $\delta$  = 1,32-1,37 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>),  $\delta$  = 2,08-2,15 (m, 1H, CH),  $\delta$  = 4,59-4,67 (m, 2H, CH<sub>2</sub>),  $\delta$  = 4,69-4,81 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>),  $\delta$  = 6,79-6,83 (m, 1H, H<sub>5</sub>/H<sub>6</sub>),  $\delta$  = 6,84-6,90 (m, 1H, H<sub>5'</sub>),  $\delta$  = 6,92-6,96 (m, 1H, H<sub>4</sub>/H<sub>7</sub>),  $\delta$  = 7,04-7,06 (m, 1H, H<sub>7'</sub>),  $\delta$  = 7,47-7,53 (m, 1H, H<sub>4</sub>/H<sub>7</sub>),  $\delta$  = 7,53-7,58 (m, 1H, H<sub>4'</sub>),  $\delta$  = 9,19-9,23 (m, 1H, 6'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O),  $\delta$  = 9,47-9,52 (m, 1H, 5/6-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

1,1'-Diethyl-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-5,6'-diol**77**

Aus 0,5 mmol (161 mg) 1,1'-Diethyl-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-5,5'/5,6'/6,6'-diol (**66**, Stellungsisomerengemisch) isoliert:

**77**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,03 mmol (8 mg, 5 %)

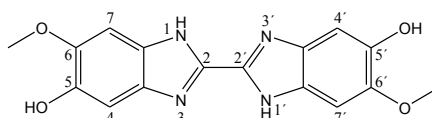
$C_{18}H_{18}N_4O_2$  (322,14 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 323,1430, gef.: 323,1437, Abweichung: 2 ppm

**$^1\text{H-NMR}$** <sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO):  $\delta = 1,36$  (dt, 6H, CH<sub>3</sub>),  $\delta = 4,76$  (q, 4H, CH<sub>2</sub>),  $\delta = 6,82$  (dd,  $^3J = 8,67$  Hz,  $^4J = 2,10$  Hz, 2H, H6'),  $\delta = 6,88$  (dd,  $^3J = 8,69$  Hz,  $^4J = 2,13$  Hz, 2H, H6),  $\delta = 6,94$  (d,  $^4J = 1,97$  Hz, 2H, H7'),  $\delta = 7,05$  (d,  $^4J = 2,06$  Hz, 2H, H4),  $\delta = 7,50$  (d,  $^3J = 8,73$  Hz, 2H, H7),  $\delta = 7,57$  (d,  $^3J = 8,69$  Hz, 2H, H4'),  $\delta = 9,24$  (s, 2H, 5-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O),  $\delta = 9,56$  (s, 2H, 6'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

6,6'-Dimethoxy-[2,2'-Bi-1*H*-benzimidazol]-5,5'-diole

6,6'-Dimethoxy-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-5,5'-diol



**78**

Aus 0,5 mmol (177 mg) 5,5',6,6'-Tetramethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**48**):

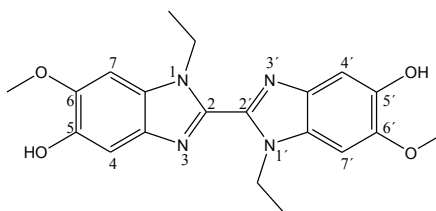
**78**: Brauner Feststoff, Ausbeute: 0,08 mmol (24 mg, 15 %)

C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (326,10 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 327,1015, gef.: 327,1026, Abweichung: 3 ppm

**$^1\text{H-NMR}$** <sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO):  $\delta = 3,82$  (s, 6H, 5,5'/5,6'/6,6'-OCH<sub>3</sub>),  $\delta = 6,97$ -7,36 (m, 4H, H4, H7, H4', H7'),  $\delta = 8,35$ -8,40 (s, 2H, 5,5'/5,6'/6,6'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O),  $\delta = 13,07$ -13,36 (m, 2H, NH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

1,1'-Diethyl-6,6'-dimethoxy-[2,2'-bi-1*H*-benzimidazol]-5,5'-diol



**79**

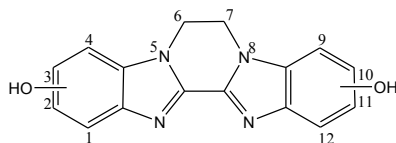
Aus 0,5 mmol (205 mg) 1,1'-Diethyl-5,5',6,6'-tetramethoxy-2,2'-bi-1*H*-benzimidazol (**49**):

**79**: Brauner Feststoff, Ausbeute: 0,04 mmol (15 mg, 8 %)

C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (382,16 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 383,1641, gef.: 383,1649, Abweichung: 2 ppm

**$^1\text{H-NMR}$** <sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO):  $\delta = 1,35$  (t, 6H, CH<sub>3</sub>),  $\delta = 3,85$  (s, 6H, 6,6'-OCH<sub>3</sub>),  $\delta = 4,73$  (q, 4H, CH<sub>2</sub>),  $\delta = 7,00$  (s, 2H, H7, H7'),  $\delta = 7,26$  (s, H4, H4'),  $\delta = 9,08$  (s, 2H, 5,5'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

*N,N'*-Ethanverbrückte 2,2'-Bisbenzimidazol-2/3,10/11-diole6,7-Dihydro-pyrazino[1,2-a:4,3-a']bisbenzimidazol-2/3,10/11-diol**80**

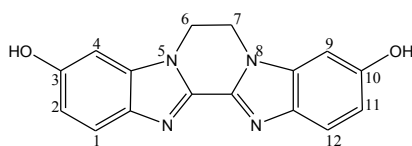
Aus 0,5 mmol (160 mg) 6,7-Dihydro-2/3,10/11-dimethoxy-pyrazino[1,2-a:4,3-a']bisbenzimidazol (**50**), SC abweichend von der allgemeinen Vorschrift mit DM/MeOH (95:5):

**80**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,05 mmol (13 mg, 9 %)

$C_{16}H_{12}N_4O_2$  (292,10 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 293,0960, gef.: 293,0979, Abweichung: 6 ppm

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D6]-DMSO):  $\delta$  = 4,61-4,71 (m, 4H, CH<sub>2</sub>),  $\delta$  = 6,80-6,91 (m, 2H, H<sub>2</sub>/H<sub>3</sub>, H<sub>10</sub>/H<sub>11</sub>),  $\delta$  = 6,97-7,07 (m, 2H, H<sub>1</sub>/H<sub>4</sub>, H<sub>9</sub>/H<sub>12</sub>),  $\delta$  = 7,51-7,58 (m, 2H, H<sub>1</sub>/H<sub>4</sub>, H<sub>9</sub>/H<sub>12</sub>),  $\delta$  = 9,30-9,63 (m, 2H, 2/3,10/11-OH)

6,7-Dihydro-pyrazino[1,2-a:4,3-a']bisbenzimidazol-3,10-diol**81**

Aus 0,5 mmol (160 mg) 6,7-Dihydro-3,10-dimethoxy-pyrazino[1,2-a:4,3-a']bisbenzimidazol (**51**), SC abweichend von der allgemeinen Vorschrift mit DM/MeOH (95:5):

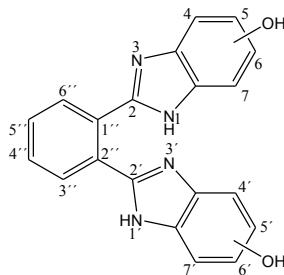
**81**: Beiger Feststoff, Ausbeute: 0,03 mmol (7 mg, 5 %)

$C_{16}H_{12}N_4O_2$  (292,10 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 293,0960, gef.: 293,0978, Abweichung: 6 ppm

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D6]-DMSO):  $\delta$  = 4,65 (q, 4H, CH<sub>2</sub>),  $\delta$  = 6,98 (dd, <sup>3</sup>J = 8,79 Hz, <sup>4</sup>J = 2,71 Hz, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>11</sub>),  $\delta$  = 7,23 (d, <sup>4</sup>J = 2,82 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>9</sub>),  $\delta$  = 7,52 (d, <sup>3</sup>J = 8,08 Hz, 2H, H<sub>1</sub>, H<sub>12</sub>),  $\delta$  = 9,64 (s, 2H, 3,10-OH)



2,2'-Überbrückte Benzimidazol-5,5'/5,6'/6,6'-diol2,2'-(1,2-Phenylen)bis-1H-benzimidazol-5,5'/5,6'/6,6'-diol**82**

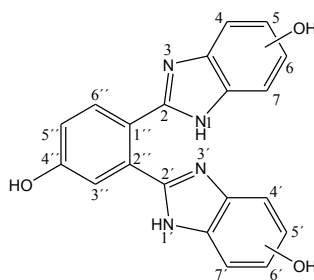
Aus 0,5 mmol (185 mg) 2,2'-(1,2-Phenylen)bis[5/6-dimethoxy-1H-benzimidazol] (**52**):

**82**: Brauner Feststoff, Ausbeute: 0,1 mmol (27 mg, 16 %)

$C_{20}H_{14}N_4O_2$  (342,11 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 343,1117, gef.: 343,1124, Abweichung: 2 ppm

**<sup>1</sup>H-NMR**<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO): δ = 6,86 (dd, <sup>3</sup>J = 8,76 Hz, <sup>4</sup>J = 2,17 Hz, 2H, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub> / H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub> / H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>), δ = 6,95 (d, <sup>4</sup>J = 2,07 Hz, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>), δ = 7,44 (2 d, <sup>3</sup>J = 8,77 Hz, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub> / H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub> / H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>), δ = 7,83 (q, J = 3,35+5,73+9,01 Hz, 2H, H<sub>3''</sub>, H<sub>6''</sub>), δ = 8,08 (q, J = 3,37+5,80+9,10 Hz, 2H, H<sub>4''</sub>, H<sub>5''</sub>), δ = 9,67 (s, 2H, 5,5'/5,6'/6,6'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

2,2'-(4-Hydroxy-1,2-phenylen)bis-1H-benzimidazol-5,5'/5,6'/6,6'-diol**83**

Aus 0,5 mmol (193 mg) 2,2'-(4-Hydroxy-1,2-phenylen)bis[5/6-dimethoxy-1H-benzimidazol] (**53**):

**83**: Brauner Feststoff, Ausbeute: 0,05 mmol (16 mg, 9 %)

$C_{20}H_{14}N_4O_3$  (358,11 g·mol<sup>-1</sup>)

**MS** (ESI): ber.: 359,1066, gef.: 359,1090, Abweichung: 7 ppm

<sup>1</sup>H-NMR<sub>400 MHz</sub> ([D<sub>6</sub>]-DMSO):  $\delta = 6,69-6,74$  (2 dd, <sup>3</sup>J = 8,61 Hz, <sup>4</sup>J = 2,29 Hz, 2H, H<sub>5</sub>,H<sub>5'</sub>/H<sub>5</sub>,H<sub>6'</sub>/H<sub>6</sub>,H<sub>6'</sub>),  $\delta = 6,89-6,94$  (2 d, <sup>4</sup>J = 1,62, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub>/H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub>/H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>),  $\delta = 7,04$  (dd, <sup>3</sup>J = 8,62 Hz, <sup>4</sup>J = 2,62 Hz, 1H, H<sub>5''</sub>),  $\delta = 7,41-7,47$  (2 d, <sup>3</sup>J = 8,37 Hz, 2H, H<sub>4</sub>,H<sub>4'</sub>/H<sub>4</sub>,H<sub>7'</sub>/H<sub>7</sub>,H<sub>7'</sub>),  $\delta = 7,58$  (d, <sup>4</sup>J = 2,48 Hz, 1H, H<sub>3''</sub>),  $\delta = 7,91$  (d, <sup>3</sup>J = 8,60 Hz, 1H, H<sub>6''</sub>),  $\delta = 9,13-9,21$  (2 s, 2H, 5,5'/5,6'/6,6'-OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O),  $\delta = 10,20$  (s, 1H, OH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O),  $\delta = 13,45$  (bs, 2H, NH, austauschbar mit D<sub>2</sub>O)

### 5.1.3.11 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie zur Isomerentrennung

#### Analytische HPLC

Eurospher 100-5 C18 Säule, 250 mm, 4 mm ID	Knauer
Eurospher 100-5 C18 Vorsäule, 4 mm ID	Knauer
Kroma System 2000 Software	Biotek Kontron
HPLC-Pumpe 522	Biotek Kontron
HPLC-UV-Detektor 535	Biotek Kontron

#### Präparative HPLC (Knauer Smartline)

Eurospher 100-10 C18 Säule, 250 mm, 16 mm ID	Knauer
Eurospher 100-10 C18 Säule, 30 mm, 16 mm ID	Knauer
Smartline-Pumpe 1000	Knauer
HPLC-UV-Detektor 2500	Knauer
HPLC-Autosampler	Knauer

#### Mobile Phase

Als mobile Phase wird ein Gemisch aus zwei Komponenten gewählt: Komponente A: Wasser und Komponente B: MeOH, mit der Zusammensetzung Wasser/MeOH (55:45). Die Trennung erfolgt mittels isokratischer Elution.

#### Probenvorbereitung

Für die analytische HPLC werden aus einer 10<sup>-2</sup> M methanolischen Stammlösung durch 1:10 Verdünnung eine 10<sup>-3</sup> M Lösung der entsprechenden Verbindung hergestellt und vor der Injektion filtriert.

Für die präparative HPLC werden 80 mg Substanz in 5,0 mL MeOH suspendiert und vor der Injektion filtriert. Nach erfolgter Trennung werden die entsprechenden Fraktionen vereint. Durch Entfernen des LM im Vakuum erhält man die reinen Isomere.

Zuspiken

10  $\mu\text{L}$  der  $10^{-3}$  M methanolischen Lösung des entsprechenden Isomers werden zu jeweils 300  $\mu\text{L}$  der  $10^{-3}$  M methanolischen Lösung des Isomerengemisches gegeben.

Versuchsbedingungen

	Analytische Säule	Präparative Säule
<b>Flussrate</b>	0,8 mL/min	6 mL/min
<b>Säulentemperatur</b>	RT	RT
<b>Injektionsvolumen</b>	20 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$
<b>Detektionswellenlänge</b>	300 nm	300 nm

**5.2 Strukturuntersuchungen**

Alle Messungen werden dreimal durchgeführt. Die angegebenen Werte stellen die Mittelwerte dar. Eine statistische Auswertung wird aufgrund der geringen Anzahl der Durchführungen nicht angewandt.

Verbrauchsmaterialien und Geräte sind den Kap. 5.1 und 5.3 gelistet.

**5.2.1 UV-spektroskopische Untersuchungen**pH-abhängige AbsorptionsspektroskopieProbenvorbereitung

Die Substanz wird in 0,1 M HCl suspendiert und durch vorsichtiges Erwärmen gelöst, so dass eine  $10^{-4}$  M Lösung vorliegt. Für die Aufnahmen der Absorptionsspektren wird ein Aliquot von 20 mL der entsprechenden Verbindung verwendet. Bei Verbindung **55** wird eine 1:2 Verdünnung, also eine  $5 \cdot 10^{-5}$  M Lösung hergestellt, da die Absorption in etwa 1,0 nicht wesentlich überschreiten sollte.

Versuchsbedingungen

Folgende Versuchsbedingungen werden gewählt: Temp.: 20 °C; Probenvolumen: 20 mL, Gefäß: Erlenmeyerkolben mit Rührfisch, LM: wässrig. Die Volumenzunahme durch Zugabe der wässrigen NaOH-Lösung soll < 10 % liegen, deshalb werden wässrige NaOH-Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,01 M, 0,025 M, 0,05 M, 0,1 M, 1 M) hergestellt und in kleinen Volumina (2,5-50  $\mu\text{L}$ ) zugegeben.

### Durchführung

Der pH-Wert wird schrittweise durch Zugabe wässriger NaOH-Lösung erhöht. Bei unterschiedlichen pH-Werten werden Absorptionsspektren mit Hilfe des UV-Spektrometers aufgenommen. Die hierfür entnommene Probe wird der Lösung vor erneuter pH-Wertänderung wieder zugeführt. Nach Erreichen des höchsten pH-Wertes wird die Lösung mit 1 M HCl wieder auf den Ausgangs-pH-Wert eingestellt und erneut UV-spektroskopisch vermessen.

### Absorptionsspektren ausgewählter 2,2'-Bisbenzimidazolderivate

#### Probenvorbereitung

Es werden aus einer  $10^{-2}$  M Stammlösung in DMSO durch Verdünnung mit dem entsprechenden LM (MeOH, 0,1 M HCl, 0,1 M NaOH, PBS) Lösungen in einem Konzentrationsbereich zwischen  $10^{-5}$  M und  $10^{-4}$  M hergestellt. Die Konzentration innerhalb einer Messreihe wird dabei möglichst gleich gewählt, damit die Absorptionswerte vergleichbar sind und annähernd innerhalb eines Absorptionsbereichs zwischen 0,2 und 0,8 liegen.

#### Durchführung

Die Vermessung der jeweiligen Proben erfolgt mit Hilfe des UV-Spektrometers.

## **5.2.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen**

Für Standardmessungen wird eine Standardküvette (Rhodamin B) von PerkinElmer verwendet.

Es werden aus einer  $10^{-2}$  M Stammlösung in DMSO durch Verdünnung mit dem entsprechenden LM (MeOH, 0,1 M HCl, 0,1 M NaOH, PBS) Lösungen in einem Konzentrationsbereich zwischen  $10^{-7}$  M und  $10^{-4}$  M hergestellt. Die Konzentration innerhalb einer Messreihe wird dabei möglichst gleich gewählt, damit die Werte der relativen Fluoreszenzintensitäten innerhalb einer Messreihe vergleichbar sind. Die Messungen werden mit einer Scangeschwindigkeit von  $240 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$  (2D) und  $2400 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$  (3D) sowie einem Anregungs- und Emissionsspalt von je 5,0 nm durchgeführt.

### 5.3 Pharmakologischer Teil

Alle Messungen werden dreimal durchgeführt. Die angegebenen Werte stellen die Mittelwerte dar. Eine statistische Auswertung wird aufgrund der geringen Anzahl der Durchführungen nicht angewandt.

#### 5.3.1 Verbrauchsmaterialien

##### Allgemein: Chemikalien, Lösungen und Reagenzien

Alle für die Testungen verwendeten Chemikalien, Lösungen und Reagenzien sind von den Firmen Akadia-Chemie, Biochrom, Fluka, Invitrogen, Merck, Mirus, National Diagnostics, PAA Laboratories, PerkinElmer, Promega, Roth, SantaCruz (Biotec), Serva, Sigma-Aldrich und VWR.

##### Antikörper

Aktin-Antikörper: Anti-Actin, Clone C4 (1 mg / 1 mL) (Millipore),

ER $\alpha$ -Antikörper: ER $\alpha$  (F-10): sc-8002 (200  $\mu$ g / 1 mL) (SantaCruz),

Anti-Maus-Antikörper: goat Anti-mouse IgG-HRP sc-2005 (200  $\mu$ g / 0,5 mL) (SantaCruz)

##### Bright Glo-Luciferase Assay System

(Promega)

##### Einmalkanülen und -spritzen

Es werden verschiedene Größen und Volumina (B. Braun) verwendet.

##### Einmalküvetten

Polystyrol (Sarstedt)

##### Membranfilter

0,2  $\mu$ m Ø 50 mm, 0,45  $\mu$ m Ø 50 mm (Sartorius)

##### Kulturplatten

12-Loch-Kulturplatte, klar, steril (Nunc)

96-Loch-Kulturplatte, klar, steril (Nunc)

96-Loch-Kulturplatte, weiß, steril (für Chemilumineszenzmessung) (Fisher Scientific)

6-Loch-Makroplatten, klar, steril (TPP)

Nachfolgend sind klare Kulturplatten gemeint, wenn es nicht anders angegeben wird.

Pasteurpipetten

(Braun)

Pipettenspitzen

(Eppendorf)

Plasmide

p(ERE)<sub>2</sub>luc<sup>+</sup>, pSG5-ER $\alpha$ , pSG5-ER $\beta$  (Schering AG Berlin)

Reaktionsgefäße

1,5 mL, 2,0 mL (Eppendorf)

Serologische Pipetten

verschiedene Volumina (Sarstedt)

Sterilfilter für Einmalspritzen

0,2  $\mu$ m (Nalgene)

Zellkulturflaschen

25 cm<sup>2</sup> steril (Sarstedt), 75 cm<sup>2</sup> steril (Nunc)

Zellkulturmedien

DMEM (inkl. 4,5 g Glucose) ohne oder mit Phenolrot (PAA)

Nachfolgend ist DMEM mit Phenolrot gemeint, wenn es nicht anders angegeben wird.

Zelllinien

MCF-7-Zellen (DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

MDA-MB-231-Zellen (ATCC: American Type Culture Collection)

U2OS-Zellen (Schering AG, Berlin)

Zentrifugenröhrchen

konisch 15 mL, 50 mL (Sarstedt)

### 5.3.2 Geräte

#### Absauger

Vacuboy (mit Handoperator, 8-Kanaladapter und Absaug-System) (Integra)

#### Analysenwaage

BP 211D (Sartorius)

#### Autoklav

Systemec 2.540 EL (Systemec)

#### Brutschrank

HERAcell 240 CO<sub>2</sub> Incubator (Heraeus)

#### Ein- und Mehrkanalpipetten

(Eppendorf)

#### Filter

Filter set 49 für das Inversmikroskop Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss Jena)

#### Inversmikroskop

Axiovert 40 CFL (mit Mikroskop-Beleuchtungseinrichtung HBO 50) (Carl Zeiss Jena)

#### Luminometer

VICTOR<sup>2</sup> Multilabel Counter 1.420 (PerkinElmer)

#### Magnetrührer

IKAMAG RCT (IKA Labortechnik)

#### pH-Meter

Batterie-Konduktometer-Portamess (Knick, Berlin)

#### Pipettierhilfe

PIPETBOY acu (IBS Integra Biosciences)

#### Schüttler

Schüttelmaschine TiMix (Edmund Bühler)

Sicherheitsbunsenbrenner

Fireboy plus (Integra)

Sterilwerkbank

HERAsafe (Heraeus)

Stickstofftank

GT11 (Air Liquide)

Ultraschallbad

(Kontron)

UV-Spektroskopie

UVIKON<sup>®</sup> 930 (Kontron Instruments)

Vortexer

Genie<sup>®</sup> 2 (Roth)

Wasserbad

SW-21C (Julabo Labortechnik)

Zählkammer

Neubauer (0,100 mm, 0,0025 mm<sup>2</sup>) (Carl Zeis Jena)

Zentrifuge

Multifuge 3SR + (Thermo Scientific<sup>®</sup>)

### **5.3.3 Pharmakologische Methoden**

#### **5.3.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften**

Alle Arbeiten mit den Zellen werden bis zum Abstoppen eines Zelltests in einer Sterilwerkbank durchgeführt.

Allgemeine Kulturbedingungen

Für alle verwendeten Zelllinien wird DMEM mit einem Zusatz von 5 % FCS (siehe Zellkulturmedien) verwendet. Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgt in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt. Es werden Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm<sup>2</sup> verwendet.



### Auftauen der Zellen

Zum Auftauen werden die Kryoröhrchen in 70 %igen Isopropanol gelegt und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Inkubation der Zellsuspension erfolgt nach Überführung in eine Kulturflasche, wie bei „Passagieren der Zellen“ angegeben. Nach 6 h erfolgt ein Wechsel des Mediums.

### ct-FCS

Da das verwendete FCS neben Wachstumsfaktoren auch endogene Steroide enthält, die die Testung der agonistischen und antagonistischen Wirkung verfälschen würden, müssen diese zuvor durch Adsorption an dextranbeschichtete Aktivkohle entfernt werden. Dazu werden 10 g Aktivkohle (NoritA) mit wenig Tris-Puffer für ca. 1 min verrieben, in ein Becherglas überführt, mit Tris-Puffer auf 200 mL aufgefüllt, bei 4 °C für 3 h gerührt und über Nacht bei 4 °C stehengelassen. Nicht benetzte Aktivkohle wird vorsichtig von der Oberfläche abgesaugt.

Nach der Zugabe von 100 mg Dextran wird die Kohlesuspension 20 min bei RT gerührt und anschließend zentrifugiert (4 °C, 10 min, 4.000 rpm). Danach wird der Überstand abdekantiert. Die Hälfte des erhaltenen Aktivkohlepellets wird in zuvor im Wasserbad (56 °C, 45 min) inaktiviertem FCS (500 mL) resuspendiert. Nach dem Rühren der Suspension (4 °C, 3 h) und erneutem Zentrifugieren (4 °C, 20 min, 4.000 rpm) wird der Überstand mit dem verbliebenen Aktivkohlepellet versetzt und abermals nach obiger Prozedur verfahren. Bei Bedarf wird das Vorgehen wiederholt. Der erhaltene Überstand wird über einen 0,2 µm Membranfilter sterilfiltriert. Das erhaltene ct-FCS wird bis zu Verwendung bei -20 °C gelagert.

### Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren werden kurz vor der Konfluenz stehende Zellen trypsinisiert und in 5 mL Medium pro Kulturflasche aufgenommen. Die Zellsuspension wird in einem konischen Zentrifugenröhrchen zentrifugiert (5 min, 2.000 rpm, RT). Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 3 mL Einfriermedium (80 % DMEM, 10 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert und je 1 mL in drei sterile Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen werden in eine Einfrierbox gestellt, bei -80°C vorgefroren und im Anschluss (nach ca. 24 h) in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

### Glutardialdehydlösung 1 %

Eine 25 %ige wässrige Lösung wird entsprechend mit PBS verdünnt.

### Kristallviolettlösung 0,02 %

Lösung in Aqua bidest.

### Mediumwechsel

Ein Mediumwechsel wird drei bis vier Tage nach dem Passagieren der Zellen (siehe dort) vorgenommen: Das alte Medium wird abgesaugt und durch 5 mL frisches Medium ersetzt. Im Fall der Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 75 cm<sup>2</sup> werden 15 mL Medium verwendet.

### Passagieren der Zellen

Die Passage der Zellkulturen erfolgt beim Erreichen von 70-90 % Konfluenz ca. einmal wöchentlich. Dazu wird das Medium aus den 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen abgesaugt und die anhaftenden Zellen mit 5 mL PBS gewaschen. Nach Entfernung des PBS wird 1 mL Trypsin zugegeben, die Zellen gut benetzt und das Trypsin wieder vollständig abgesaugt. Nach 2 min Inkubation im Brutschrank werden 5 mL frisches Medium zugegeben und die Zellen durch Spülen des Flaschenbodens abgelöst. Durch mehrmaliges Aufsaugen und Ausstoßen der Zellsuspension werden die Zellen vereinzelt.

Je nach Zelllinie wird eine bestimmte Menge Zellsuspension entnommen (MCF-7: ca. 0,5 mL, MDA-MB-231: ca. 0,5 mL, U2OS: ca. 0,3 mL) und in eine neue Kulturflasche, die 5 mL frisches Medium enthält, überführt.

Für die Testung auf (Anti-)Estrogenität und Herabregulation des ER $\alpha$  werden die Zellen in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 15 mL Zellkulturmedium überführt. Hierfür wird das Zellkulturmedium ohne Phenolrot mit 5 % ct-FCS und 1 % Natriumpyruvat verwendet. So sind die Zellen vier Tage vor Aussaat eines Tests auf dieses Medium umgestellt. Es wird wie oben beschrieben vorgegangen, unter Verwendung von 2 mL Trypsin und 10 mL Medium, in dem die trypsinierten Zellen aufgenommen werden.

### PBS (pH 7,4)

2,7 mM KCl, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl und 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O in bidest. Wasser lösen

### Tris-Puffer (pH 7,4)

0,1 mM Tris-HCl und 0,1 mM NaCl in 900 mL bidest. Wasser lösen, den pH-Wert mit 1M HCl auf 7,4 einstellen, am nächsten Tag nachstellen und auf 1.000 mL auffüllen.

### Trypsinlösung

0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS

### Waschlösung

Tris-Puffer mit 1 % Tween 20 (Enzymimmunoassay) / mit 1 % Tween 80 (Rezeptorbindung)

### Zellkulturmedien

DMEM mit Phenolrot wird für die Kultivierung, für die Testung auf Zellproliferation und für die Zellaufnahmen verwendet. Hier wird 5 % FCS (BIOCHROM) zugesetzt.

DMEM ohne Phenolrot wird für den Transaktivierungsassay und für den Enzymimmunoassay verwendet. Hier wird 5 % ct-FCS sowie 1 % Natriumpyruvat (Gibco) zugesetzt.

### Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Sie besitzt acht Quadrate mit einem jeweiligen Füllvolumen von 0,1  $\mu\text{L}$ . Nach Befeuchtung der Ränder wird ein Deckgläschen vorsichtig bis zur Ausbildung Newtonscher Ringe auf die Zählkammer gedrückt. Die Kammer wird mit einer homogenen Zellsuspension beschickt und die Zellen in den definierten Bereichen unter dem Lichtmikroskop gezählt und gemittelt.

Die Zellzahl pro mL lässt sich nach folgender Gleichung berechnen:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}} = \frac{\text{Zellzahl (gezählt)}}{\text{Zahl der Quadranten}} \cdot 10^4$$

### Verdünnung

Beispielsweise steht eine 1:2 Verdünnung für die Zusammenführung gleicher Volumina, so dass sich das Volumen verdoppelt, die Konzentration wird dabei halbiert.

### 5.3.3.2 Testung auf Hemmung der Zellproliferation

#### Aussaat und Kultivierung der Zellen

Die Passage der Zellen erfolgt wie unter Kap. 5.3.3.1 beschrieben. Bei Erreichen von 90 % eines konfluenten Zellrasens werden die Zellen trypsiniert. Die Zellzahl wird wie unter Kap. 5.3.3.1 beschrieben, ermittelt. Die Aussaat der Zellen findet in 96-Loch-Kulturplatten statt: Mit Hilfe einer Mehrkanalpipette werden pro Vertiefung 750 MCF-7-, 750 MDA-MB-231- oder 400 U2OS-Zellen in 100  $\mu$ L Medium ausgesät. Die Platten werden anschließend drei Tage im Brutschrank inkubiert.

#### Substanzzugabe

Es werden 10 mM Stammlösungen der Testsubstanzen in DMSO hergestellt. Ausgehend von diesen Stammlösungen werden für die Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes 5 mM, 2,5 mM und 1,25 mM Verdünnungen in DMSO hergestellt. Für Cisplatin als Vergleich (Positivkontrolle) wird DMF als LM verwendet und aus einer 10 mM Stammlösung entsprechend verdünnt, so dass eine 5 mM, eine 2,5 mM, eine 1,25 mM und eine 0,63 mM Lösung erhalten werden. Vor der Substanzzugabe werden 5  $\mu$ l der jeweiligen Verdünnungsstufe nochmals mit 2,5 mL Medium verdünnt (1:500). 100  $\mu$ l dieser Lösung werden pro Loch auf die Zellen gegeben. Aus den bereits im Loch enthaltenen 100  $\mu$ L (Medium) und den zugegebenen 100  $\mu$ L Lösung (Substanz) ergeben sich ein Gesamtvolumen von 200  $\mu$ L und somit Testkonzentrationen von 20  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M und 1,25  $\mu$ M für die zu untersuchenden Verbindungen oder von 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 1,25  $\mu$ M und 0,63  $\mu$ M für Cisplatin. Für die 20  $\mu$ M Testkonzentrationen der Testsubstanz werden zweimal 5  $\mu$ l der 10 mM Stammlösung eingesetzt.

Für die Voruntersuchung werden von den zu untersuchenden Substanzen die 10  $\mu$ M und die 20  $\mu$ M Testkonzentration verwendet. Die Blindwertbestimmung erfolgt mit Hilfe der Negativkontrolle: Es werden die verwendeten LM (DMF und DMSO) sowohl mit einer 0,1 %igen als auch mit einer 0,2 %igen Lösung in Medium eingesetzt. Die Plattenbelegung erfolgt nach in Abb. 101 und Abb. 102 dargestelltem Pipettierschema. Nach vollendeter Substanzzugabe werden die Kulturplatten für 96 h im Brutschrank inkubiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMF	<u>Cisplatin</u>					0,1 % DMSO	0,2 % DMSO	<u>Substanz 1</u>			
B		0,63	1,25	2,5	5	10			10	10	10	10
C		0,63	1,25	2,5	5	10			<u>Substanz 2</u>			
D		0,63	1,25	2,5	5	10			20	20	20	20
E	<u>Substanz 3</u>				<u>Substanz 4</u>				<u>Substanz 5</u>			
F	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
G	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
H	<u>Substanz 6</u>				<u>Substanz 7</u>				<u>Substanz 8</u>			
	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

**Abb. 101:** Pipettierschema der Voruntersuchung; c in  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMF	<u>Cisplatin</u>					0,1 % DMSO	<u>Substanz 1</u>				
B		0,63	1,25	2,5	5	10		1,25	2,5	5	10	20
C		0,63	1,25	2,5	5	10		1,25	2,5	5	10	20
D		0,63	1,25	2,5	5	10		1,25	2,5	5	10	20
E	0,2 % DMSO	<u>Substanz 2</u>					0,2 % DMSO	<u>Substanz 3</u>				
F		1,25	2,5	5	10	20		1,25	2,5	5	10	20
G		1,25	2,5	5	10	20		1,25	2,5	5	10	20
H		1,25	2,5	5	10	20		1,25	2,5	5	10	20

**Abb. 102:** Pipettierschema zur  $\text{IC}_{50}$ -Bestimmung; c in  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

### Abstoppen des Zelltests

Das Medium wird aus den Vertiefungen abgesaugt und die am Boden haftenden Zellen mit 100 µl einer 1 %igen Glutardialdehydlösung in PBS fixiert. Nach 30 min bei RT wird die Glutardialdehydlösung abgeschüttelt. Die fixierten Zellen werden mit 180 µl PBS pro Loch überschichtet und können so bei 4 °C im Kühlschrank bis zum Färben mit Kristallviolett (siehe: Bestimmung der Zellmasse im Kristallviolettassay) aufbewahrt werden.

### Bestimmung der Zellmasse im Kristallviolettassay

Das PBS wird von den Platten abgeschüttelt. Es werden 100 µl einer 0,02 %igen Kristallviolettlösung in jede Vertiefung pipettiert. Nach einer Einwirkzeit von 30 min wird das Kristallviolett abgeschüttelt und die Platten zweimal mit Wasser gewaschen. Die Platten werden mit Wasser überschichtet und 15 min stehen gelassen. Dann wird das Wasser abgeschüttelt und die Platten auf Zellstoff gut ausgeklopft. Die Plattendeckel werden ebenfalls abgetrocknet. Die Extraktion des Farbstoffs aus den Zellen erfolgt durch Zugabe von 180 µl einer 70 %igen wässrigen EtOH-Lösung pro Vertiefung. Anschließend verbleiben die Platten für 3 h bei RT auf dem Schüttler. Die Absorptionen der ethanolischen Lösungen werden photometrisch bei 590 nm gemessen.

### Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte

Für jede Substanz werden der Mittelwert und die prozentuale Standardabweichung aus den Einzelwerten ermittelt. Der C<sub>0</sub>-Wert ergibt sich aus dem Mittelwert der 96 Einzelwerte. Die Berechnung der relativen prozentualen Wachstumshemmung (T/C<sub>corr</sub>) und der IC<sub>50</sub>-Werte erfolgt wie in Kap. 2.3.2 beschrieben.

### **5.3.3.3 Bestimmung der estrogenen und antiestrogenen Wirkung**

#### Testung auf Estrogenität

#### Aussaat und Kultivierung der Zellen

Die U2OS-Zellen werden wie bei den allgemeinen Arbeitsvorschriften (Kap. 5.3.3.1) beschrieben kultiviert und passagiert. Die Aussaat der Zellen erfolgt, wenn 70-80 %ige Konfluenz erreicht ist. Es werden 10.000 Zellen in 60 µL Medium pro Vertiefung (Zellzahlbestimmung, Kap. 5.3.3.1) in weiße 96-Loch-Kulturplatten (Testplatte) ausgesät und diese für 24 h im Brutschrank inkubiert.

Transfektion

Die im Folgenden angegebenen Mengen gelten für eine 96-Loch-Kulturplatte (weiß): Für die Transfektion werden 54,1  $\mu\text{L}$  PBS mit 18,8  $\mu\text{L}$  Transfektionsreagenz (TransIT<sup>®</sup>) gemischt. Als zweite Mischung werden 31,8  $\mu\text{L}$  PBS, 5,3  $\mu\text{L}$  Reporterplasmid p(ERE)<sub>2</sub>-luc<sup>+</sup> und entweder 1,06  $\mu\text{L}$  pSG5-ER $\alpha$  oder 1,06  $\mu\text{L}$  pSG5-ER $\beta$  vereint. Das zweite Gemisch wird dann zu der Lösung aus PBS und Transfektionsreagenz gegeben. Nach 20 min werden 6,3 mL Medium vorsichtig dazugegeben, gemischt und 60  $\mu\text{L}$  dieser Lösung in jedes Loch auf die Zellen pipettiert. Anschließend wird für 5-6 h im Brutschrank inkubiert.

Substanzzugabe

Vor der Substanzzugabe wird zunächst eine Verdünnungsplatte hergestellt. Dazu werden 90  $\mu\text{L}$  PBS in jede Vertiefung einer 96-Loch-Kulturplatte vorgelegt. Anschließend erfolgt in Reihe A die Zugabe von 10  $\mu\text{L}$  der entsprechenden Stammlösung in DMSO: Im Fall des Vergleichs (Positivkontrolle) E2 wird eine  $10^{-5}$  M und im Fall der zu untersuchenden Substanzen wird jeweils eine  $10^{-2}$  M Stammlösung eingesetzt. Im Anschluss werden die Lösungen in Reihe A mit einer 12-Kanal-Pipette gut durchmischt und 10  $\mu\text{L}$  je Loch in Reihe B übertragen, so dass eine 1:10 Verdünnung erfolgt. In gleicher Weise wird bis zur Reihe H verfahren. So ergeben sich die im Pipettierschema der Verdünnungsplatte angegebenen Konzentrationen (Abb. 103).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<u>E2</u>			<u>Substanz 1</u>			<u>Substanz 2</u>			<u>Substanz 3</u>		
	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$
B	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-4}$	$10^{-4}$	$10^{-4}$	$10^{-4}$	$10^{-4}$	$10^{-4}$	$10^{-4}$	$10^{-4}$	$10^{-4}$
C	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$
D	$10^{-9}$	$10^{-9}$	$10^{-9}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$
E	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$
F	$10^{-11}$	$10^{-11}$	$10^{-11}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$
G	$10^{-12}$	$10^{-12}$	$10^{-12}$	$10^{-9}$	$10^{-9}$	$10^{-9}$	$10^{-9}$	$10^{-9}$	$10^{-9}$	$10^{-9}$	$10^{-9}$	$10^{-9}$
H	$10^{-13}$	$10^{-13}$	$10^{-13}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$

**Abb. 103:** Pipettierschema der Verdünnungsplatte; c in mol·L<sup>-1</sup>

Für die Substanzzugabe wird das alte Medium abgesaugt und durch frisches Medium (90  $\mu\text{L}$  pro Loch) ersetzt. In das frische Medium wird nun die entsprechende Lösung der Substanz gegeben: Von den Reihen B bis H der Verdünnungsplatte werden mit einer 12-Kanal-Pipette je 10  $\mu\text{L}$  pro Loch auf die gleichen Reihen der Testplatte übertragen. Durch diese 1:10 Verdünnung werden die angegebenen Testkonzentrationen erhalten (Abb. 104). In Reihe A werden 10  $\mu\text{L}$  je Loch einer 0,1 %igen DMSO-Lösung als Negativkontrolle pipettiert. Nach vollendeter Substanzzugabe wird die Testplatte für 21 h im Brutschrank inkubiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,01 % DMSO											
B	<u>E2</u>			<u>Substanz 1</u>			<u>Substanz 2</u>			<u>Substanz 3</u>		
	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$
C	$10^{-9}$	$10^{-9}$	$10^{-9}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$
D	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$
E	$10^{-11}$	$10^{-11}$	$10^{-11}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$
F	$10^{-12}$	$10^{-12}$	$10^{-12}$	$10^{-9}$	$10^{-9}$	$10^{-9}$	$10^{-9}$	$10^{-9}$	$10^{-9}$	$10^{-9}$	$10^{-9}$	$10^{-9}$
G	$10^{-13}$	$10^{-13}$	$10^{-13}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$
H	$10^{-14}$	$10^{-14}$	$10^{-14}$	$10^{-11}$	$10^{-11}$	$10^{-11}$	$10^{-11}$	$10^{-11}$	$10^{-11}$	$10^{-11}$	$10^{-11}$	$10^{-11}$

**Abb. 104:** Testplatte, schematische Darstellung; c in  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

Für die Durchführung der Voruntersuchung wird in analoger Weise verfahren und nach dem in Abb. 105 dargestellten Pipettierschema der Testplatte gearbeitet.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,01 % DMSO			<u>Substanz 1</u>			<u>Substanz 3</u>			<u>Substanz 5</u>		
				$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$
B	<u>E2</u>											
	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$
C	$10^{-9}$	$10^{-9}$	$10^{-9}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$
D	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$
E				<u>Substanz 2</u>			<u>Substanz 4</u>			<u>Substanz 6</u>		
	$10^{-11}$	$10^{-11}$	$10^{-11}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$
F	$10^{-12}$	$10^{-12}$	$10^{-12}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$
G	$10^{-13}$	$10^{-13}$	$10^{-13}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-7}$
H	$10^{-14}$	$10^{-14}$	$10^{-14}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$

**Abb. 105:** Testplatte der Voruntersuchung, schematische Darstellung; c in mol·L<sup>-1</sup>

#### Abstoppen des Tests und Messung der Lumineszenz

Die Testplatte wird abgesaugt und in jede Vertiefung 30 µl Lysepuffer (Cell Culture Lysis Reagent, Promega) pipettiert. Die Platte wird bei 600 min<sup>-1</sup> für 20 min geschüttelt. Im Anschluss wird jede Reihe der Testplatte nach Zugabe von 30 µl Reagenz (Luciferase Assay Reagent, Promega) pro Loch in einem Luminometer vermessen. Die Messung des emittierten Lichtes erfolgt unmittelbar nach Reagenzzugabe.

#### Testung auf Antiestrogenität

Die Bestimmung der Antiestrogenität erfolgt analog der Estrogenitätsbestimmung, nur dass das frische Medium zusätzlich mit einer bestimmten Menge E2 versetzt wird: Für die Testung an ER $\alpha$  wird eine Konzentration von  $3 \cdot 10^{-11}$  M und an ER $\beta$  von  $3 \cdot 10^{-10}$  M eingesetzt.

### 5.3.3.4 Herabregulation des ER $\alpha$

#### Aussaat und Kultivierung der Zellen

Die MCF-7-Zellen werden wie bei den allgemeinen Arbeitsvorschriften (Kap. 5.3.3.1) beschrieben kultiviert und passagiert. Die Aussaat der Zellen erfolgt, wenn 90 %ige Konfluenz erreicht ist. Es werden 500.000 Zellen in 2 mL Medium pro Vertiefung (Zellzahlbestimmung, Kap. 5.3.3.1) in eine 6-Loch-Kulturplatte ausgesät und diese für 24 h im Brutschrank inkubiert.

#### Substanzzugabe

Es werden 10 mM Stammlösungen der Substanzen in DMSO hergestellt. Ausgehend von diesen Stammlösungen werden E2 als Vergleich (Positivkontrolle), LM (DMSO) als Negativkontrolle und die entsprechenden Lösungen der Substanzen nach dargestelltem Pipettierschema (Abb. 106) zugegeben.

	1	2	3
A	<u>E2</u> 10 <sup>-7</sup> M	<u>Substanz 1</u> 10 <sup>-5</sup> M	<u>Substanz 3</u> 10 <sup>-5</sup> M
B	DMSO 0,1 %	<u>Substanz 2</u> 10 <sup>-5</sup> M	<u>Substanz 4</u> 10 <sup>-5</sup> M

**Abb. 106:** Pipettierschema

Nach vollendeter Substanzzugabe wird die Kulturplatte für 24 h im Brutschrank inkubiert.

#### Abstoppen des Zelltests

Das Medium wird aus den Vertiefungen abgesaugt und die Zellen zweimal mit 1 mL PBS gewaschen.

Alle weiteren Arbeitsschritte finden unter Eiskühlung (4 °C) statt.

Die Zellen werden mit 300  $\mu$ L Lysepuffer benetzt. Nach 20 min werden die lysierten Zellen vom Boden abgeschabt und je Vertiefung in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Vereinzelnung erfolgt mit Hilfe einer Sonotrode. Anschließend wird zentrifugiert (30 min, 14.000 rpm, 4 °C) und vom Überstand Aliquote (50  $\mu$ L und 100  $\mu$ L) in je ein weiteres Reaktionsgefäß pipettiert. Zu dem Aliquot mit einem Volumen von 100  $\mu$ L werden anschließend je 37  $\mu$ L Loading-Puffer und 11  $\mu$ L Reducing-Puffer pipettiert. Diese Mischungen werden für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend bis zur Durchführung der Elektrophorese eingefroren.

### Bestimmung des Proteingehalts

Die Reaktionsgefäße mit dem Aliquot des Überstands mit einem Volumen von 50  $\mu\text{L}$  dienen zur Bestimmung der Proteinmasse. Dazu werden je 50  $\mu\text{L}$  Aqua bidest. zugesetzt und gut gemischt. Davon werden jeweils 20  $\mu\text{L}$  in eine 96-Loch-Kulturplatte im Sinne einer Dreifachbestimmung pipettiert. Separat werden je 20  $\mu\text{L}$  einer Standardreihe mit Rinderserumalbumin ( $2.000-0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) sowie 20  $\mu\text{L}$  Lysepuffer in die Vertiefungen pipettiert. Anschließend wird jedes Loch mit 200  $\mu\text{L}$  Lösung des Bicinchoninsäure Protein Assay Reagenzes versetzt und die Kulturplatte für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wird UV-spektroskopisch bei 550 nm vermessen. Aus den erhaltenen Absorptionswerten wird der Gesamtproteingehalt der jeweiligen Probe bestimmt.

### Gelelektrophorese

Aus dem Gesamtproteingehalt der jeweiligen Probe wird das Ladevolumen für das Elektrophoresegel so berechnet, dass in jede Startposition der gleiche Proteingehalt von 5  $\mu\text{g}$  pipettiert wird.

Das Elektrophoresegel wird in die Elektrophoresekammer gespannt. Die Kammer wird mit Laufpuffer befüllt und 500  $\mu\text{L}$  NuPage<sup>®</sup> Antioxidant zupipettiert. Die berechneten Volumina der Lösungen werden in die Startpositionen pipettiert. Zusätzlich wird ein Aliquot Proteingewichtsstandard mitgeführt. Leere Taschen werden mit einem Aliquot aus Lysepuffer (65 %), Reducing-Puffer (10 %) und Loading-Puffer (25 %) befüllt. Die Elektrophorese wird gestartet (200 V, 75 mA) und eine Laufzeit von 1,0-1,5 h eingeplant.

### Western Blot

Nach beendeter elektrophoretischer Auftrennung werden die auf dem Gel befindlichen Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dazu wird eine Anode mit Anodenpuffer bestrichen und die mit Anodenpuffer behandelte Nitrocellulosemembran aufgebracht. Auf diese wird das mit Kathodenpuffer behandelte Gel gelegt und die mit Kathodenpuffer bestrichene Kathode angebracht. Nach erfolgtem Transfer (60 min, 24 V, 0,3 A) wird die Membran mit Ponceau S red<sup>®</sup>-Lösung angefärbt, um den Erfolg der elektrophoretischen Auftrennung und der Membranübertragung zu überprüfen.

### Enzymimmunoassay

Die Membran wird mit Waschlösung gewaschen. Zur Sättigung der nicht spezifischen Proteinbindungen wird die Membran in eine 5 %ige Tris-Puffer/Tween-Magermilchlösung gelegt und für 2 h leicht geschüttelt. Die verbrauchte Lösung wird ersetzt. In die frische Lösung werden die murinen Antikörper pipettiert. Im Fall des Aktin-Antikörpers wird eine 1:1.000 und im Fall des ER $\alpha$ -Antikörpers wird eine 1:2.000 Verdünnung eingesetzt. Anschließend wird über Nacht bei 4 °C inkubiert, dabei wird die Lösung leicht geschüttelt. Nach der Inkubation wird zweimal mit Waschlösung gewaschen und danach dreimal je 5 min in jeweils frischer Waschlösung geschwenkt. Dann wird der mit HRP gekoppelte Anti-Maus-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1.000 in 5 %iger Tris-Puffer/Tween-Magermilchlösung zugesetzt und für weitere 2 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wird erneut dreimal für je 10 min mit Waschlösung gewaschen, die Membran abgetropft und auf eine glatte Unterlage gelegt. Danach wird mit SuperSignal®-Lösung überschichtet, 3-5 min inkubiert und die überstehende Lösung abgetropft. Anschließend werden die Proteinbanden mit Hilfe eines optischen Kamerasystems detektiert. Die Membran wird mit einer Klarsichtfolie überzogen.

### Auswertung

Die Intensitäten der Proteinbanden werden auf Filmmaterial eines optischen Kamerasystems festgehalten. Mit Hilfe des Größen-Markers findet die Zuordnung der erhaltenen Proteinbanden statt. Aktin fungiert dabei als Bezugsgröße.

#### **5.3.3.5 Rezeptorbindung**

Aufgrund der Empfindlichkeit des ER-Proteins werden, wenn nicht anders angegeben, sämtliche Schritte des Versuchs bei 4 °C durchgeführt.

### HAP-Matrix

HAP wird im Verhältnis 1:6 mit Tris-Puffer versetzt, für 2 min gut geschüttelt und für 10 min stehen gelassen. Anschließend wird der Überstand abgesaugt und der Vorgang zweimal wiederholt. Es wird erneut Tris-Puffer zugegeben, so dass 7,5 mL Puffer pro 1 g HAP für die Bildung einer Suspension eingesetzt werden. 100  $\mu$ L dieser Suspension werden in jedes Loch einer 96-Loch-Kulturplatte (Testplatte) pipettiert. Dabei wird die zuzugebende Suspension regelmäßig geschüttelt, um eine homogene Verteilung in den einzelnen Vertiefungen zu erhalten. Die Platte kann bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Vorbereitung der Testplatten

Unmittelbar vor der Anwendung wird die Platte zentrifugiert (3.000 rpm, 10 min) und der Überstand abgesaugt. Zur HAP-Matrix werden pro Loch 40  $\mu\text{L}$  einer 10 nM Rezeptorlösung (in Tris-Puffer) mit  $\text{ER}\alpha$  /  $\text{ER}\beta$  oder reiner Tris-Puffer gemäß Pipettierschema zur Herstellung einer Testplatte (Abb. 107) zugegeben.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<u><math>\text{ER}\alpha</math></u> (in Tris-Puffer) 10 nM Rezeptorlösung				<u><math>\text{ER}\beta</math></u> (in Tris-Puffer) 10 nM Rezeptorlösung				Tris-Puffer			
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Abb. 107:** Pipettierschema zur Herstellung der Testplatte

Substanzzugabe

Vor der Substanzzugabe wird zunächst eine Verdünnungsplatte hergestellt. Dazu werden die Verdünnungen mit Tris-Puffer zu  $2 \cdot 10^{-5}$  M und  $2 \cdot 10^{-6}$  M verdünnt. Für E2 wird eine Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von  $2 \cdot 10^{-11}$ - $2 \cdot 10^{-5}$  M in Tris-Puffer hergestellt. In jede Vertiefung einer 96-Loch-Kulturplatte werden 25  $\mu\text{L}$  Tris-Puffer, E2- oder Substanzlösung und 25  $\mu\text{L}$  einer 10 nM [ $^3\text{H}$ ]-E2-Lösung (in Tris-Puffer) pipettiert, so dass ein Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{L}$  pro Loch und damit eine 1:2 Verdünnung vorliegt. So ergeben sich die im Pipettierschema der Testplatte angegebenen Konzentrationen (Abb. 108). Durch Auf- und Abpipettieren werden die Lösungen in den Vertiefungen gemischt und 40  $\mu\text{L}$  je Loch auf die vorbereitete Testplatte übertragen. Die Testplatte wird für 4 h bei RT inkubiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<u>E2</u> $10^{-5}$   $10^{-5}$		<u>Substanz 1</u> $10^{-5}$   $10^{-5}$		<u>E2</u> $10^{-5}$   $10^{-5}$		<u>Substanz 1</u> $10^{-5}$   $10^{-5}$		<u>E2</u> $10^{-5}$   $10^{-5}$		<u>Substanz 1</u> $10^{-5}$   $10^{-5}$	
B	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$
C	$10^{-7}$	$10^{-7}$	<u>Substanz 2</u> $10^{-5}$   $10^{-5}$		$10^{-7}$	$10^{-7}$	<u>Substanz 2</u> $10^{-5}$   $10^{-5}$		$10^{-7}$	$10^{-7}$	<u>Substanz 2</u> $10^{-5}$   $10^{-5}$	
D	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$
E	$10^{-9}$	$10^{-9}$	<u>Substanz 3</u> $10^{-5}$   $10^{-5}$		$10^{-9}$	$10^{-9}$	<u>Substanz 3</u> $10^{-5}$   $10^{-5}$		$10^{-9}$	$10^{-9}$	<u>Substanz 3</u> $10^{-5}$   $10^{-5}$	
F	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$
G	$10^{-11}$	$10^{-11}$	<u>Substanz 4</u> $10^{-5}$   $10^{-5}$		$10^{-11}$	$10^{-11}$	<u>Substanz 4</u> $10^{-5}$   $10^{-5}$		$10^{-11}$	$10^{-11}$	<u>Substanz 4</u> $10^{-5}$   $10^{-5}$	
H	Tris-Puffer		$10^{-6}$	$10^{-6}$	Tris-Puffer		$10^{-6}$	$10^{-6}$	Tris-Puffer		$10^{-6}$	$10^{-6}$

**Abb. 108:** Pipettierschema der Testplatte (mit vorbereiteter HAP-Matrix),  $c$  in  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  
in jedem Loch ist zusätzlich  $^3\text{H}$ -E2 in einer Konzentration von  $5\cdot 10^{-9}$  M enthalten

### Probengewinnung und Quantifizierung

Die Testplatte wird zentrifugiert (3.000 rpm, 10 min) und der Überstand abgesaugt. In jedes Loch werden 200  $\mu\text{L}$  Waschlösung gegeben. Es wird erneut zentrifugiert und Waschlösung zugegeben. Der Waschvorgang wird zweimal wiederholt. Nach Absaugen der Waschlösung werden pro Loch 50  $\mu\text{L}$  EtOH zugegeben und die Testplatte für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 20  $\mu\text{L}$  je Loch auf eine Messplatte überführt und in jedes Loch 180  $\mu\text{L}$  Szintillationsflüssigkeit pipettiert. Nach dem Abkleben der Messplatte kann diese im Szintillationszähler vermessen werden.

### Auswertung

Die Spalten 1-4 dienen der Ermittlung der relativen Bindungsaffinität am  $\text{ER}\alpha$  und die Spalten 5-8 am  $\text{ER}\beta$ . Sie widerspiegeln die Gesamtbindung, d. h. das der gemessene Wert sowohl die spezifische als auch die nicht spezifische Bindung beinhaltet. Die Spalten 9-12 dienen der Bestimmung der nicht spezifischen Bindung. Die weitere Berechnung ist in Kap. 2.3.6 beschrieben.

### 5.3.3.6 Mikroskopische Zellbeobachtungen

Die MCF-7-Zellen werden wie unter Kap. 5.3.3.1 beschrieben passagiert. Pro Loch werden jeweils 25.000 MCF-7-, MDA-MB-231- oder U2OS-Zellen in 0,5 mL Medium in eine 24-Loch-Kulturplatte pipettiert. Nach einer Anwachszeit von 24 h wird das überstehende Medium abgesaugt und durch 0,5 mL der Substanzlösung im Medium ersetzt, so dass eine Testkonzentration von  $10^{-4}$  M vorliegt. In zwei der Löcher wird neues Medium ohne Substanz gegeben. Sie dienen als Vergleich für normal wachsende Zellen. Zwei weitere Löcher werden mit frischem Medium und LM versetzt: In das erste Loch werden 0,5 % und in das zweite 1 % LM gegeben. Auf diese Weise kann beobachtet werden, dass die Zellen in ihrem Wachstum nicht durch das LM beeinflusst werden. Die Kulturplatte wird weiter inkubiert und kann zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe eines Inversmikroskopes betrachtet werden. Zu Beginn erfolgt stündlich eine visuelle Beobachtung. Da keine Veränderungen auftreten, werden die Aufnahmen erst nach 6 h gemacht. Die sich in Lösung befindlichen Moleküle stören die Fluoreszenzaufnahmen, deshalb wird der Überstand im entsprechenden Loch abgesaugt. Durch zügiges Arbeiten kann auf das Fixieren von Zellen verzichtet werden.

#### Einstellungen des Mikroskops

Die Quecksilber-Kurzbogenlampe ist mindestens 30 min vor Gebrauch einzuschalten. Das Mikroskop wird auf die Benutzung mittels Computer umgestellt und mit dem entsprechenden Programm weitergearbeitet. Es wird die 40fache Vergrößerung (Blau) gewählt. Die Phasenkontrastaufnahmen (1/8 s Belichtungszeit) werden ohne Filter aufgenommen. Die Fluoreszenzaufnahmen (1/8-1/4 s Belichtungszeit) erfolgen mit dem Filter 3 des Filtersets (Filter set 49 der Firma Zeiss [488049 – 0000, Excitation: G 365, Beam Splitter: FT 395, Emission: BP 445/50]). Zur Optimierung der Aufnahmen werden der Kondensator (Höhen-einstellung), der Schieber, der Filterschieber und die Aperturblende (Kontrast) eingestellt. Es erfolgt die Einstrahlung von Anregungslicht auf die Probe und sofortiges Auslösen der Bildaufnahme.





## 6 Literaturverzeichnis

### Quellenangaben der Abbildungen

Die Abbildungen sind entweder selbst erstellt oder mit Quellenangaben versehen. Die Quellenangaben werden jeweils bei der Abbildungsbezeichnung angegeben und im Literaturverzeichnis aufgelistet. Die eigenständig erstellten Abbildungen sind mit Hilfe folgender Programme erstellt worden: alle Strukturformeln sind mit ChemDraw Ultra 8.0 (CambridgeSoft) und alle <sup>1</sup>H-NMR-Spektren sind mit MestReC Version 4.8.6.0 (MESTRELAB) erstellt worden. Des Weiteren wurde für die graphische Darstellung der Leistungs- und Temperaturkurven, der Absorptions- und Emissionskurven sowie für die graphische Darstellung der Zelltests das Programm OriginPro<sup>®</sup> 8G (OriginLab<sup>®</sup>) verwendet. Die Fotos der Synthesemikrowelle sind selbst aufgenommen worden. Für die 2D-ROESY-NMR-Darstellungen sind die Abbildungen aus dem Programm TopSpin<sup>®</sup> (Bruker) herangezogen worden. Die Abbildungen der HPLC-Chromatogramme wurden mit Hilfe der Software von KromaSystem 2000 (BioTek Kontron) erstellt. Die Abbildungen der 2D- und 3D-Fluoreszenzspektren wurden dem Programm FL Solutions des F-4.500 Spektrophotometers (Hitachi) entnommen. Die Molecular-Modelling-Abbildungen sind in Kooperation mit dem Arbeitskreis um Prof. Wolber entstanden: Marcel Bermudez Sasso hat für das Docking 1A52 (ER $\alpha$ -LBD mit E2, DOI:10.2210/pdb1a52/pdb) aus der „Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RSCB) protein database (PDB)“ verwendet. Die Zellfotos wurden mit Hilfe der Software EasyMeasure<sup>®</sup> Version 1.4 (INTEQ<sup>®</sup>, Berlin) mit dem Mikroskop Axiovert 135 (Carl Zeiss Jena) aufgenommen.

### Literaturverzeichnis

1. RKI, *Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2008 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs)*, 2012.
2. Foekens, J.A., van, P.W.L., et al., *Prognostic value of PS2 and cathepsin D in 710 human primary breast tumors: multivariate analysis*. J Clin Oncol, 1993, 11: S. 899-908.
3. Gatzemeier, W., Liersch, T., et al., *Preoperative MR mammography in breast carcinoma. Effect on operative treatment from the surgical viewpoint*. Chirurg, 1999, 70: S. 1460-8.
4. Parker, M.G., *Steroid and related receptors*. Curr Opin Cell Biol, 1993, 5: S. 499-504.
5. Enmark, E., Peltö-Huikko, M., et al., *Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern*. J Clin Endocrinol Metab, 1997, 82: S. 4258-65.

6. Gosden, J.R., Middleton, P.G., et al., *Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24----q27 by in situ hybridization*. Cytogenet Cell Genet, 1986, 43: S. 218-20.
7. Kuiper, G.G., Carlsson, B., et al., *Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta*. Endocrinology, 1997, 138: S. 863-70.
8. Monje, P., Zanello, S., et al., *Differential cellular localization of estrogen receptor  $\alpha$  in uterine and mammary cells*. Mol. Cell. Endocrinol., 2001, 181: S. 117-129.
9. Roger, P., Sahla, M.E., et al., *Decreased expression of estrogen receptor  $\beta$  protein in proliferative preinvasive mammary tumors*. Cancer Res., 2001, 61: S. 2537-2541.
10. Tsai, M.J. und O'Malley, B.W., *Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members*. Annu. Rev. Biochem., 1994, 63: S. 451-86.
11. Bai, Z. und Gust, R., *Breast cancer, estrogen receptor and ligands*. Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.), 2009, 342: S. 133-149.
12. Bourgoin-Voillard, S., Gallo, D., et al., *Capacity of type I and II ligands to confer to estrogen receptor alpha an appropriate conformation for the recruitment of coactivators containing a LxxLL motif-Relationship with the regulation of receptor level and ERE-dependent transcription in MCF-7 cells*. Biochem. Pharmacol., 2010, 79: S. 746-757.
13. Bramley, M., Clarke, R.B., et al., *Effects of estrogens and anti-estrogens on normal breast tissue from women bearing BRCA1 and BRCA2 mutations*. Br. J. Cancer, 2006, 94: S. 1021-1028.
14. Flamini, M.I., Sanchez, A.M., et al., *Differential actions of estrogen and SERMs in regulation of the actin cytoskeleton of endometrial cells*. Mol Hum Reprod, 2009, 15: S. 675-85.
15. Katzenellenbogen, B.S., Choi, I., et al., *Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 2000, 74: S. 279-285.
16. Gust, R., Keilitz, R., et al., *Investigations of New Lead Structures for the Design of Selective Estrogen Receptor Modulators*. J. Med. Chem., 2001, 44: S. 1963-1970.
17. Pink, J.J. und Jordan, V.C., *Models of estrogen receptor regulation by estrogens and antiestrogens in breast cancer cell lines*. Cancer Res., 1996, 56: S. 2321-2330.
18. Devin-Leclerc, J., Meng, X., et al., *Interaction and dissociation by ligands of estrogen receptor and Hsp90: the antiestrogen RU 58668 induces a protein synthesis-dependent clustering of the receptor in the cytoplasm*. Mol. Endocrinol., 1998, 12: S. 842-854.
19. Levenson, A.S. und Jordan, V.C., *Selective oestrogen receptor modulation: molecular pharmacology for the millennium*. Eur. J. Cancer, 1999, 35: S. 1628-1639.
20. Tamrazi, A., Carlson, K.E., et al., *Estrogen receptor dimerization: ligand binding regulates dimer affinity and dimer dissociation rate*. Mol. Endocrinol., 2002, 16: S. 2706-2719.
21. Ogawa, S., Inoue, S., et al., *The complete primary structure of human estrogen receptor  $\beta$  (hER $\beta$ ) and its heterodimerization with ER  $\alpha$  in vivo and in vitro*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1998, 243: S. 122-126.
22. Katzenellenbogen, B.S., Montano, M.M., et al., *Antiestrogens: mechanisms of action and resistance in breast cancer*. Breast Cancer Res. Treat., 1997, 44: S. 23-38.

23. McKay, L.I. und Cidlowski, J.A., *Cross-talk between nuclear factor- $\kappa$ B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism*. Mol. Endocrinol., 1998, 12: S. 45-56.
24. Lubczyk, V., *1,1,2-Triarylalkene als "passive" Estrogenrezeptorantagonisten Synthese und pharmakologische Untersuchungen*, in *Fachbereich Pharmazie 2002*, Freie Universität Berlin: Berlin.
25. Bowen, C.M. und Katzenellenbogen, J.A., *Synthesis and Spectroscopic Characterization of Two Azatetrahydrochrysenes as Potential Fluorescent Ligands for the Estrogen Receptor*. J. Org. Chem., 1997, 62: S. 7650-7657.
26. Fuchs, S., Kapp, T., et al., *Synthesis of a new set of polyamidoamine dendrimers and dendritic building blocks with potential application as carrier molecules for anticancer therapeutics*. PMSE Prepr., 2003, 88: S. 422-423.
27. Kapp, T., *Investigations on optimization of the biological activity of antitumoral platinum(II) drugs by building polynuclear complexes or macromolecule-drug-conjugates*, 2006.
28. Chamness, G.C., Mercer, W.D., et al., *Are histochemical methods for estrogen receptor valid?* J Histochem Cytochem, 1980, 28: S. 792-8.
29. Choi, I., Ko, C., et al., *Human estrogen receptor beta-specific monoclonal antibodies: characterization and use in studies of estrogen receptor beta protein expression in reproductive tissues*. Mol. Cell. Endocrinol., 2001, 181: S. 139-150.
30. Buell, R.H. und Tremblay, G., *Autoradiographic demonstration of estrogen binding in human breast cancer after in vitro incubation*. Cancer Res, 1985, 45: S. 4278-84.
31. Martin, P.M. und Sheridan, P.J., *Intracellular localization of steroid hormone receptors. A challenging problem. Autoradiographic and biochemical study*. Ann Pathol, 1986, 6: S. 115-29.
32. Pertschuk, L.P., Gaetjens, E., et al., *Histochemistry of steroid receptors in breast cancer: an overview*. Ann. Clin. Lab. Sci., 1979, 9: S. 219-24.
33. Kasiotis, K.M. und Haroutounian, S.A., *2-Pyridin-2-yl-1H-indole derivatives: Synthesis, estrogen receptor binding affinity, and photophysical properties*. Bioorg. Chem., 2006, 34: S. 1-14.
34. Rao, B.R., Fry, C.G., et al., *A fluorescent probe for rapid detection of estrogen receptors*. Cancer (Philadelphia), 1980, 46: S. 2902-6.
35. Fevig, T.L., Lloyd, J.E., et al., *Preparation, receptor binding, and fluorescence properties of hexestrol-fluorophore conjugates: evaluation of site of attachment, fluorophore structure, and fluorophore-ligand spacing*. J. Med. Chem., 1987, 30: S. 156-65.
36. Adamczyk, M., Reddy, R.E., et al., *Synthesis of a novel fluorescent probe for estrogen receptor*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2002, 12: S. 1283-1285.
37. Scribner, A.W., Haroutounian, S.A., et al., *1-Aryl-2-pyridyl-3,4-dihydronaphthalenes: Photofluorogenic Ligands for the Estrogen Receptor*. J. Org. Chem., 1997, 62: S. 1043-1057.
38. Bindal, R.D. und Katzenellenbogen, J.A., *1,2-bis(4-Hydroxyphenyl)-3,4-dihydro-6-hydroxynaphthalene, a photofluorogenic ligand for the estrogen receptor*. Photochem Photobiol, 1986, 43: S. 121-6.
39. Stearns, V., Johnson, M.D., et al., *Active Tamoxifen Metabolite Plasma Concentrations After Coadministration of Tamoxifen and the Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Paroxetine*. J. Natl. Cancer Inst., 2003, 95: S. 1758-1764.

40. Nieder, M. und Jaeger, H., *Quantification of tamoxifen and N-desmethyltamoxifen in human plasma by high-performance liquid chromatography, photochemical reaction and fluorescence detection, and its application to biopharmaceutic investigations.* J Chromatogr, 1987, 413: S. 207-17.
41. Anstead, G.M., Hwang, K.J., et al., *Characterization of the spectroscopic properties of a tetrahydrochrysene system containing a rigidified hydroxynitrostilbene chromophore: an inherently fluorescent ligand designed for the estrogen receptor.* Photochem. Photobiol., 1993, 57: S. 616-28.
42. Anstead, G.M., Peterson, C.S., et al., *Hydroxylated 2,3-diarylindenes: synthesis, estrogen receptor binding affinity, and binding orientation considerations.* J. Steroid Biochem., 1989, 33: S. 877-87.
43. Clegg, N.J., Paruthiyil, S., et al., *Differential response of estrogen receptor subtypes to 1,3-diarylindene and 2,3-diarylindene ligands.* J Med Chem, 2005, 48: S. 5989-6003.
44. Meyers, M.J., Carlson, K.E., et al., *Facile synthesis of high affinity styrylpyridine systems as inherently fluorescent ligands for the estrogen receptor.* Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8: S. 3589-3594.
45. Ghosh, U., Ganessunker, D., et al., *Estrogenic diazenes: heterocyclic non-steroidal estrogens of unusual structure with selectivity for estrogen receptor subtypes.* Bioorg. Med. Chem., 2003, 11: S. 629-657.
46. Koulocheri, S.D. und Haroutounian, S.A., *Ultrasound-promoted synthesis of 2,3-bis(4-hydroxyphenyl)indole derivatives as inherently fluorescent ligands for the estrogen receptor.* Eur. J. Org. Chem., 2001: S. 1723-1729.
47. Anstead, G.M. und Katzenellenbogen, J.A., *Design of integrated fluorescent estrogens: the second donor effect on absorption, fluorescence, and ground-state molecular orbital properties of trans-4,4'-methoxynitrostilbene systems.* J. Phys. Chem., 1990, 94: S. 1328-34.
48. Miksicek, R.J., Carlson, K.E., et al., *Studies using fluorescent tetrahydrochrysene estrogens for in situ visualization of the estrogen receptor in living cells.* Mol. Endocrinol., 1995, 9: S. 592-604.
49. Hwang, K.J., Carlson, K.E., et al., *Donor-acceptor tetrahydrochrysenes, inherently fluorescent, high-affinity ligands for the estrogen receptor: binding and fluorescence characteristics and fluorometric assay of receptor.* Biochemistry, 1992, 31: S. 11536-45.
50. Anstead, G.M. und Katzenellenbogen, J.A., *Optimizing of 2,3-diarylindenes as fluorescent estrogens. Variation of the acceptor group, ortho substitution of the 2-ring, and C-1 methylation.* J. Med. Chem., 1988, 31: S. 1754-61.
51. Dobrydneva, Y., Williams, R.L., et al., *Diethylstilbestrol and tetrahydrochrysenes are calcium channel blockers in human platelets: relationship to the stilbene pharmacophore.* Thromb. Res., 2003, 110: S. 23-31.
52. Griekspoor, A., Zwart, W., et al., *Visualizing the action of steroid hormone receptors in living cells.* Nucl. Recept. Signaling, 2007, 5.
53. Martin, P.M., Magdelenat, H.P., et al., *New approach for visualizing estrogen receptors in target cells using inherently fluorescent ligands and image intensification.* Cancer Res., 1983, 43: S. 4956-65.
54. Millon, S.R., Ostrander, J.H., et al., *Preferential accumulation of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in breast cancer: A comprehensive study on six breast cell lines with varying phenotypes.* J. Biomed. Opt., 2010, 15: S. 018002/1-018002/8.

55. Fang, H., Tong, W., et al., *Structure-Activity Relationships for a Large Diverse Set of Natural, Synthetic, and Environmental Estrogens*. Chem. Res. Toxicol., 2001, 14: S. 280-294.
56. Dettmann, S., *Synthesis and pharmacological investigations of novel benzimidazoles as fluorescent ligands of the estrogen receptor*, 2006.
57. Dettmann, S., Szymanowitz, K., et al., *2-Phenyl-1-[4-(2-piperidine-1-yl-ethoxy)benzyl]-1H-benzimidazoles as ligands for the estrogen receptor: Synthesis and pharmacological evaluation*. Bioorg. Med. Chem., 2010, 18: S. 4905-4916.
58. Nozary, H., Pigué, C., et al., *Extended Rodlike Polyaromatic Receptors with Bent Tridentate Units Complexed to Lanthanide Metal Ions*. Inorg. Chem., 2000, 39: S. 5286-5298.
59. Lueth, A., *Synthesis of substituted 4-(indol-3-yl)quinazolines, a new class of EGFR-tyrosine-kinase-inhibitors*, 2006.
60. Buddrus, *Grundlagen der Organischen Chemie*, Vol. 3. Aufl. 2003: de Gruyter.
61. Beyer, W., *Lehrbuch der organischen Chemie*, Vol. 24. Aufl. 2004: S. Hirzel Verlag Stuttgart, Leipzig.
62. Pedersen, C.J., *The discovery of crown ethers (Nobel address)*. Angew. Chem., 1988, 100: S. 1053-9.
63. Hantzsch, A., *Chromisomerism and Homochromisomerism of Nitroanilines*. Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1910, 43: S. 1662-85.
64. Ehrlich, J. und Bogert, M.T., *Experiments in the veratrole and quinoxaline groups*. J. Org. Chem., 1947, 12: S. 522-34.
65. Katritzky, A.R., Rachwal, S., et al., *New routes to selectively methylated benzimidazoles*. J. Heterocycl. Chem., 1994, 31: S. 775-9.
66. Cai, T.B., Zou, Z., et al., *Synthesis and in vitro opioid receptor functional antagonism of analogues of the selective kappa opioid receptor antagonist (3R)-7-Hydroxy-N-((1S)-1-[[[(3R,4R)-4-(3-hydroxyphenyl)-3,4-dimethyl-1-piperidinyl]methyl]-2-methylpropyl]-1,2,3,4-tetrahydro-3-isoquinolinecarboxamide (JDTic)*. J. Med. Chem., 2008, 51: S. 1849-1860.
67. Holan, G., Samuel, E.L., et al., *2-trihalogenomethylbenzazoles. I. Formation*. J Chem Soc Perkin 1, 1967, 1: S. 20-5.
68. Bellamy, F.D. und Ou, K., *Selective reduction of aromatic nitro compounds with stannous chloride in nonacidic and nonaqueous medium*. Tetrahedron Lett., 1984, 25: S. 839-42.
69. Phillips, M.A., *Formation of 2-substituted benzimidazoles*. J. Chem. Soc., 1928: S. 2393-9.
70. Jing, X., Zhu, Q., et al., *Rapid one-pot preparation of 2-substituted benzimidazoles from esters using microwave conditions*. Synth. Commun., 2006, 36: S. 2597-2601.
71. Tang, H.-j., Zhang, Z.-g., et al., *Synthesis of 2,2'-bi-1H-benzimidazole*. Huaxue Shiji, 2007, 29: S. 733-735.
72. Rezende, M.C., Dall'Oglio, E.L., et al., *An alternative preparation of bisbenzimidazoles*. Synth. Commun., 2001, 31: S. 607-613.
73. Dyllal, L.K., Harvey, J.J., et al., *Oxidative cyclizations. VIII. Mechanisms of oxidation of ortho-substituted benzenamines and improved cyclizations by bis(acetato-O-)phenyliodine*. Aust. J. Chem., 1992, 45: S. 371-84.

74. Yin, J. und Elsenbaumer, R.L., *Efficient Synthesis and Characterization of Novel Bibenzimidazole Oligomers and Polymers as Potential Conjugated Chelating Ligands*. J. Org. Chem., 2005, 70: S. 9436-9446.
75. Dall'Oglio, E., Caro, M.B., et al., *The influence of substituents on the tautomerism of symmetrically substituted 2,2'-bis-benzimidazoles*. J. Braz. Chem. Soc., 2002, 13: S. 251-259.
76. Hunnius, *Pharmazeutisches Wörterbuch*, Vol. 9. Aufl. 2004: de Gruyter.
77. Wu, Y.-J., He, H., et al., *Copper-catalyzed coupling of (S)-1-(3-bromophenyl)-ethylamine and N-H containing heteroarenes using microwave heating*. Tetrahedron Lett., 2003, 44: S. 4217-4218.
78. Wang, Z.-Y. und Wang, L.-G., *Synthesis and crystal structure of 1,2-bis(2-benzimidazolyl)benzene*. Chin. J. Struct. Chem., 2005, 24: S. 35-38.
79. Wu, W., Grimsdale, A.C., et al., *Cyclodehydrogenation of di- and tetra(benzimidazol-2-yl)benzenes to give model heteroaromatic discotic systems*. Chem. Commun. (Cambridge, U. K.), 2003: S. 1044-1045.
80. Li, G., Huang, J., et al., *Bis(benzimidazole)pyridine derivative as a new class of G-quadruplex inducing and stabilizing ligand*. Chem. Commun. (Cambridge, U. K.), 2008: S. 4564-4566.
81. Benton, F.L. und Dillon, T.E., *Cleavage of ethers with boron bromide. I. Some common ethers*. J. Am. Chem. Soc., 1942, 64: S. 1128-9.
82. Grese, T.A., Cho, S., et al., *Structure-activity relationships of selective estrogen receptor modulators: modifications to the 2-arylbenzothiophene core of raloxifene*. J Med Chem, 1997, 40: S. 146-67.
83. Node, M., Nishide, K., et al., *Hard acid and soft nucleophile systems. 5. Ring-opening reaction of lactones to  $\omega$ -alkylthio- or  $\omega$ -arylthio carboxylic acids with aluminum halide and thiol*. J. Org. Chem., 1981, 46: S. 5163-6.
84. Rücker, N., Willems, *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*, Vol. 4. Aufl.: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
85. Anet, F.A.L. und Bourn, A.J.R., *Nuclear magnetic resonance spectral assignments from nuclear Overhauser effects*. J. Am. Chem. Soc., 1965, 87: S. 5250-1.
86. Overhauser, A.W., *Polarization of nuclei in metals*. Phys. Rev., 1953, 92: S. 411-15.
87. Rogers, K.S. und Clayton, C.C., *Effects of pH on benzimidazole fluorescence*. Anal. Biochem., 1972, 48: S. 199-201.
88. Soule, H.D., Vazquez, J., et al., *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1973, 51: S. 1409-16.
89. Schrey, M.P. und Patel, K.V., *Prostaglandin E2 production and metabolism in human breast cancer cells and breast fibroblasts. Regulation by inflammatory mediators*. Br. J. Cancer, 1995, 72: S. 1412-19.
90. Horwitz, K.B., Costlow, M.E., et al., *MCF-7: a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors*. Steroids, 1975, 26: S. 785-95.
91. Kurebayashi, J., Kurosumi, M., et al., *A new human breast cancer cell line, KPL-1 secretes tumor-associated antigens and grows rapidly in female athymic nude mice*. Br. J. Cancer, 1995, 71: S. 845-53.
92. Watanabe, T., Inoue, S., et al., *Agonistic effect of tamoxifen is dependent on cell type, ERE-promoter context, and estrogen receptor subtype: functional difference*

- between estrogen receptors alpha and beta*. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 236: S. 140-5.
93. Brinkley, B.R., Beall, P.T., et al., *Variations in cell form and cytoskeleton in human breast carcinoma cells in vitro*. Cancer Res, 1980, 40: S. 3118-29.
94. Engel, L.W. und Young, N.A., *Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review*. Cancer Res., 1978, 38: S. 4327-39.
95. Cailleau, R., Young, R., et al., *Breast tumor cell lines from pleural effusions*. J Natl Cancer Inst, 1974, 53: S. 661-74.
96. Ponten, J. und Saksela, E., *Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours*. Int J Cancer, 1967, 2: S. 434-47.
97. Gillies, R.J., Didier, N., et al., *Determination of cell number in monolayer cultures*. Anal. Biochem., 1986, 159: S. 109-13.
98. Schaefer, A., Wellner, A., et al., *Development of 2,3,5-Triaryl-1H-pyrroles as Estrogen Receptor  $\alpha$  Selective Ligands*. Chemmedchem, 2011, 6: S. 2055-2062.
99. Laios, I., Cleeren, A., et al., *Effects of (R,S)/(S,R)-4,5-bis(2-chloro-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolines and (R,S)/(S,R)-2,3-bis(2-chloro-4-hydroxyphenyl)piperazines on estrogen receptor alpha level and transcriptional activity in MCF-7 cells*. Biochem. Pharmacol., 2007, 74: S. 1029-1038.
100. Biberger, C. und Von, A.E., *1-Benzyl-2-phenylindole- and 1,2-diphenylindole-based antiestrogens. Estimation of agonist and antagonist activities in transfection assays*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1998, 64: S. 277-285.
101. De, W.J.R., Wood, K.V., et al., *Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells*. Mol. Cell. Biol., 1987, 7: S. 725-37.
102. Busch, S.V., *Structure-Activity-Relationship of Estrogenic Compounds with 1,2-Diarylethane Moiety*, 2006.
103. Wood, K.V. *The origin of beetle luciferases*. 1991. Wiley.
104. Nonclercq, D., Journe, F., et al., *Effect of nuclear export inhibition on estrogen receptor regulation in breast cancer cells*. J. Mol. Endocrinol., 2007, 39: S. 105-118.
105. Borrás, M., Hardy, L., et al., *Estradiol-induced down-regulation of estrogen receptor. Effect of various modulators of protein synthesis and expression*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1994, 48: S. 325-36.
106. Hoffmann, R., *Synthesis and pharmacological evaluation of novel triaryl-1H-pyrroles with estrogenic, cytotoxic and COX-inhibitory properties*, 2003.
107. Katzenellenbogen, B.S., Kendra, K.L., et al., *Proliferation, hormonal responsiveness, and estrogen receptor content of MCF-7 human breast cancer cells grown in the short-term and long-term absence of estrogens*. Cancer Res., 1987, 47: S. 4355-60.
108. Scutaru, A.M., Kruger, M., et al., *Investigations on the Use of Fluorescence Dyes for Labeling Dendrimers: Cytotoxicity, Accumulation Kinetics, and Intracellular Distribution*. Bioconjugate Chem., 2010, 21: S. 2222-2226.
109. Bone, A., *5-ALA induced fluorescence cytology and -spectrometry for the diagnostics of bladder carcinoma*, 2007.





## 7 Publikationsverzeichnis

### Posterpräsentationen

K. Szymanowitz, A. Wellner, R. Gust: „Synthese hormonell aktiver Bibenzimidazol-Derivate zur Untersuchung des Estrogenrezeptors“, DPhG (Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft) - Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor, 14.Juli 2006, Berlin

K. Szymanowitz, A. Wellner, R. Gust: „Synthesis of hormonally active bisbenzimidazol derivatives for visualising the estrogen receptors in cancer cells“, 18th INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF THE JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, 18.-21.September 2008, Seefeld (Österreich)

K. Szymanowitz, A. Wellner, R. Gust: „Hormonally active bisbenzimidazol derivatives for visualising the estrogen receptors in cancer cells“, DPhG-Jahrestagung 2008, 8.-11.Oktober 2008, Bonn

K. Szymanowitz, A. Wellner, R. Gust: „Fluorescent 1,1'-alkyl-bridged-2,2'-bisbenzimidazole derivatives for visualising the estrogen receptors in human cancer cells“, DPhG-Jahrestagung 2009, 1.Oktober 2009, Jena

K. Szymanowitz, A. Wellner, R. Gust: „Synthesis of 1,1'-dialkyl- and 1,1'-alkyl-bridged 2,2'-bisbenzimidazole derivatives for visualising the estrogen receptors in human cancer cells“, FRONTIERS IN MEDICINAL CHEMISTRY, EFMC (European Federation for Medicinal Chemistry), 4.Oktober 2009, Barcelona (Spanien)

K. Szymanowitz, A. Wellner, R. Gust: „Symmetrical 1,1'-dialkyl-2,2'-bisbenzimidazole derivatives for visualising the estrogen receptors in human cancer cells“, DPhG - Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor, 2.Juli 2010, Berlin

K. Szymanowitz, A. Wellner, R. Gust: „Investigation of the influence of the positions of the phenolic hydroxyl groups in 2,2'-bisbenzimidazoles concerning the effect on fluorescent properties“, DPhG-Jahrestagung 2010, 4.-6.Oktober 2010, Braunschweig

### Postervortrag

K. Szymanowitz: „Symmetrical substituted 2,2'-bisbenzimidazole derivatives for visualising the estrogen receptors in human cancer cells - Symmetrisch substituierte 2,2'-Bisbenzimidazol-derivate. Versuche zur Visualisierung des Estrogenrezeptors in humanen Tumorzellen“, DKG (Deutsche Krebsgesellschaft) – DKK (Deutscher Krebskongress), 27.Februar 2010, Berlin

Publikation

S. Dettmann, K. Szymanowitz, A. Wellner, A. Schiedel, C. E. Müller, R. Gust: „2-Phenyl-1-[4-(2-piperidine1yl-ethoxy)benzyl]-1*H*-benzimidazoles as ligand for the estrogen receptor: Synthesis and pharmacological evaluation“, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, p. 4905-4916

Vortrag

K. Szymanowitz: „Synthese hormonell aktiver Bisbenzimidazol-Derivate zur Visualisierung des Estrogenrezeptors in Tumorzellen“, DPhG - Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor, 4. Juli 2008, Berlin

## 8 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version  
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.