

Synthese und Struktur-Wirkungsuntersuchungen von 2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen

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

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

vorgelegt von

SABRINA ELSNER

aus Burg (Magdeburg)

Berlin 2013

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 2008 bis April 2013 unter der Leitung von Prof. Dr. Ronald Gust am Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ronald Gust
2. Gutachter: Prof. Dr. Maria Kristina Parr

Disputation am 02.07.2013

Mein herzlicher Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Ronald Gust für die Überlassung dieses interessanten Themas, das entgegengebrachte Vertrauen und den gewährten kreativen Freiraum,

allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises um Prof. Gust für das angenehme Arbeitsklima, ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie für die gute Zusammenarbeit,

insbesondere Thomas Rudolf für die Unterstützung bei der Synthese, Maxi Wenzel und Silke Bergemann für die Unterstützung bei den Zelltestungen, sowie M.-Véronique vom Bauer für ihre große Hilfsbereitschaft in formalen Angelegenheiten,

allen Mitarbeitern der Analytikabteilung des Instituts für Pharmazie für die Aufnahme der Kernresonanz- und Massenspektren sowie für die Ausführung der Elementaranalyse.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinen Freunden, meiner Familie, besonders meinen Eltern und meinem Partner Robin Fey, die mir mit ihrer liebevollen Unterstützung immer Halt geben.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Krebs und seine Entstehung	1
1.2	Zelltod	2
1.3	Molekulare Mechanismen der Apoptose	4
1.3.1	Proteine der Caspase-Familie	5
1.3.2	Der Tumorsuppressor p53 und sein Gegenspieler Hdm2	7
1.4	Bedeutung von p53/Hdm2 für die Karzinogenese	9
1.5	Hdm2-Inhibitoren	9
1.5.1	Inhibitoren der Hdm2-E3-Ligasefunktion	10
1.5.2	Inhibitoren der Hdm2-p53-Interaktion	11
1.5.2.1	p53 als Target	11
1.5.2.2	Hdm2 als Target	12
1.6	Problemstellung	14
2	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	17
2.1	Synthese	17
2.1.1	Übersicht der Synthesewege und der synthetisierten Verbindungen	17
2.1.2	Synthese der (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)/(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-1,2-Diamino-1,2-diarylethane und deren Vorstufen	23
2.1.2.1	Synthese des (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)/(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-1,2-Diamino-1,2-bis-(2-hydroxyphenyl)ethans	23
2.1.2.2	Synthese der (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)/(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-1,2-Diamino-1,2-diarylethane	24
2.1.3	Synthese der (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline und deren Vorstufen	28
2.1.3.1	Synthese der 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadiene	29
2.1.3.2	Synthese der (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline aus den 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadienen	31
2.1.3.3	Synthese der (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit Hexamethyldisilazan	32
2.1.3.4	Synthese der (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit den (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)/(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-1,2-Diamino-1,2-diarylethanen	33
2.1.4	Synthese des (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2,4,5-Tris(4-aminophenyl)-2-imidazolins aus dem (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2,4,5-Tris(4-acetamidophenyl)-2-imidazolin	36
2.1.5	Synthese der (4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline aus den (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen	37
2.1.6	Synthese der <i>N</i> -Alkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoline und <i>N,N'</i> -Dialkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoliniumiodide	38
2.1.6.1	Synthese der <i>N</i> -Alkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoline	38
2.1.6.2	Synthese der <i>N,N'</i> -Dialkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoliniumiodide	40

2.2	Strukturuntersuchungen der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline	43
2.2.1	Protonenresonanzspektroskopie	43
2.2.2	Infrarotspektroskopie	49
2.2.3	Polarimetrie	57
2.2.4	Nachweis der Iodid-Ionen	58
2.2.5	Lipophilie	58
2.2.6	Basizität	60
2.3	Stabilität der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline	65
2.4	Pharmakologische Untersuchungen	66
2.4.1	Verwendete Zelllinien	66
2.4.2	Testung auf Hemmung der Zellproliferation	67
2.4.3	Änderung der Zellmorphologie unter Substanzeinwirkung	82
2.4.4	Untersuchung der Apoptose	90
2.4.4.1	Bestimmung der Caspase-3-Aktivität	90
2.4.4.2	Nachweis von Einzelstrang-DNA	98
2.4.4.3	Immunhistochemische Quantifizierung von p53 und Hdm2	102
3	ZUSAMMENFASSUNG	111
4	SUMMARY	113
5	EXPERIMENTELLER TEIL	115
5.1	Synthetischer und analytischer Teil	115
5.1.1	Verbrauchsmaterialien	115
5.1.2	Verwendete Geräte	115
5.1.3	Synthesvorschriften und analytische Daten	117
5.1.3.1	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)/(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-1,2-Diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)-ethan	117
5.1.3.2	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)/(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-1,2-Diamino-1,2-diarylethane	119
5.1.3.3	1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadiene	122
5.1.3.4	Synthese der (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline aus 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadienen	126
5.1.3.5	Synthese der (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit Hexamethyldisilazan	131
5.1.3.6	Synthese der (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)/(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-1,2-Diamino-1,2-diarylethanen	132
5.1.3.7	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2,4,5-Tris(4-Aminophenyl)-2-imidazolin	138
5.1.3.8	Synthese der (4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline aus den (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen	139
5.1.3.9	Synthese der <i>N</i> -Alkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoline	140
5.1.3.10	Synthese der <i>N,N'</i> -Dialkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazolinium-iodide	151
5.1.4	Polarimetrische Untersuchungen	162
5.1.5	Nachweis der Iodid-Ionen	162
5.1.6	UV-spektroskopische Untersuchungen	163
5.2	Pharmakologischer und biochemischer Teil	164
5.2.1	Verbrauchsmaterialien	164
5.2.2	Verwendete Geräte	166
5.2.3	Pharmakologische Methoden	168

Inhaltsverzeichnis

5.2.3.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften	168
5.2.3.2	Testung auf Hemmung der Zellproliferation	169
5.2.3.3	Änderung der Zellmorphologie unter Substanzeinwirkung	172
5.2.3.4	Bestimmung der Caspase-3-Aktivität	173
5.2.3.5	Nachweis von Einzelstrang-DNA	174
5.2.3.6	Immunhistochemische Quantifizierung von p53 und Hdm2	175
6	LITERATURVERZEICHNIS	179
7	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	187
8	LEBENS LAUF	189

Abkürzungsverzeichnis

ϵ_r	Permittivität
δ	chemische Verschiebung
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
ν	Valenzschwingung
δ	Deformationsschwingung
λ_{\max}	Wellenlänge eines Absorptionsmaximums
[D6]-DMSO	Dimethylsulfoxid, deuteriert
abs.	absolut (wasserfreies Lösungsmittel)
Abw.	Abweichung
Ac-DEVD-AMC	<i>N</i> -Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-amido-4-methylcumarin
ACN	Acetonitril
aliph.	aliphatisch
Apaf-1	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Aqua dem.	demineralisiertes Wasser
Ar	Aromat
ArH	aromatische Protonen
ArCH	Methinprotonen
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	abgeschwächte Totalreflexion
Bax	Bcl-2 assoziiertes X Protein
ber.	berechnet
CARD	Caspase-Rekrutierungs-Domäne
D ₂ O	Wasser, deuteriert
DD	Todesdomäne (death domain)
DED	Todeseffektordomäne (death effector domain)
DC	Dünnschichtchromatographie

DISC	Tod-induzierender Signalkomplex (Death-inducing signal complex)
DMEM	Dulbecco 's Modified Eagle 's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC ₅₀	halbmaximale effektive Konzentration
ee	Enantiomerenüberschuss
ESI-TOF-MS	Elektrosprayionisierung-Flugzeitmassenspektrometer
FADD	Fas-Rezeptor assoziiertes Protein mit Todesdomäne
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarot
F _x	Faktor x
gef.	gefunden
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ICAD	Inhibitor of Caspase-Activated Desoxyribonuklease
ICD-10	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme; Diagnoseklassifikationssystem der WHO
IR	Infrarot
Kap.	Kapitel/Kapiteln
Konz.	Konzentration
K _{ow}	1-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
Hdm2	Human Double Minute 2
monoPrep	Halterung in der Synthesemikrowelle
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
o.o.p.	aus der Ringebene heraus (out of plane)
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
pK _b	negativer dekadischer Logarithmus der Basenkonstante
pK _s	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
PLB	Passiver Lysepuffer (passive lysis buffer)
ppm	parts per million

Abkürzungsverzeichnis

RGT-Regel	Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel
QRS	Quarzreaktorsystem (Gefäß der Synthesemikrowelle)
RT	Raumtemperatur
SI	internationales Einheitensystem (Système international d'unités)
Smp.	Schmelzpunkt
ssDNA	Einzelstrang-DNA (single-stranded-DNA)
TA	Transaktivierungsdomäne
Tab.	Tabelle/Tabellen
TMS	Tetramethylsilan
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
UV	Ultraviolett
Verb.	Verbindung
wt	Wildtyp

In der folgenden Arbeit gelten die SI-Einheiten sowie die SI-Ableitungen und SI-Präfixe. Des Weiteren werden allgemein gebräuchliche Abkürzungen des Dudens sowie der internationale Ein- und Dreibuchstaben Code der Aminosäuren verwendet.

1 Einleitung

1.1 Krebs und seine Entstehung

Nach den neuesten Daten des Robert-Koch-Institutes erkrankten im Jahr 2008 in Deutschland etwa 223 100 Frauen und 246 700 Männer erstmalig an Krebs. Schätzungen zufolge werden für das Jahr 2012 rund 486 000 neue Krebserkrankungen erwartet. Damit wird die Neuerkrankungsrate sogar noch um 17 000 Patienten steigen. ^[1]

Betrachtet man darüber hinaus die Krebserkrankungsrate in Zusammenhang mit dem Alter, so wird deutlich, dass mit zunehmendem Alter die Wahrscheinlichkeit an Krebs zu erkranken immer größer wird (Abb. 1). Im Durchschnitt diagnostizieren die Ärzte bei Frauen und Männern in Deutschland den Krebs mit 69 Jahren. ^[1]

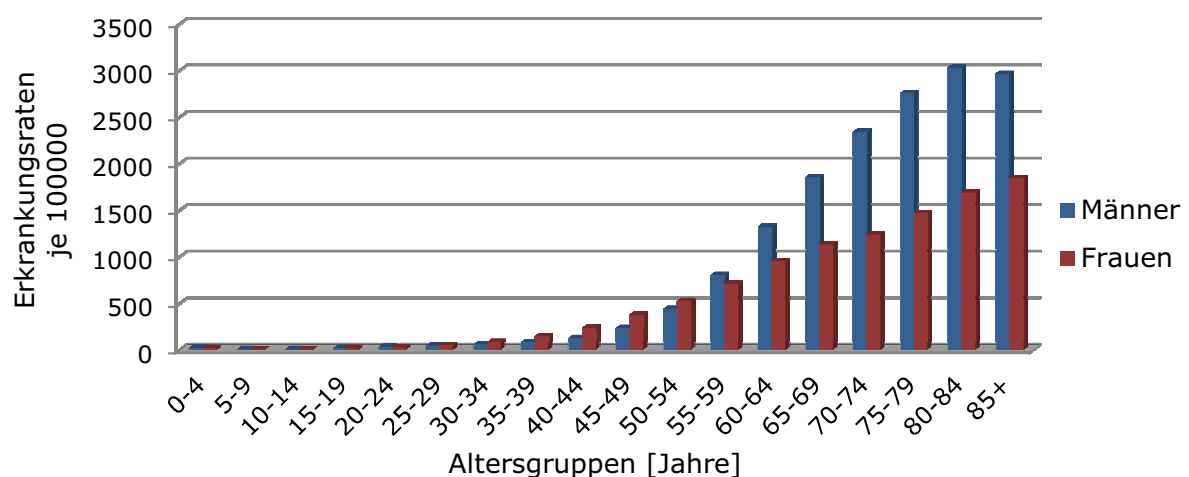


Abb. 1: Altersspezifische Krebserkrankungsraten nach dem Geschlecht (ICD-10 C00-94 ohne C44), 2007-2008 ^[1]

Im Jahr 2011 war in Deutschland etwa jeder vierte Todesfall durch Krebs bedingt, denn insgesamt starben 221 591 Menschen an dieser Erkrankung. ^[2] Daneben lebten insgesamt etwa 1.33 Millionen Krebskranke, deren Diagnose nicht länger als fünf Jahre zurück lag. ^[1] Prävention und Früherkennung von Krebs, aber auch Therapiemaßnahmen stehen daher mehr denn je im Blickpunkt der Forschung.

Für das Verständnis der Krebsentstehung ist das Wissen über die Regulationsmechanismen des Zellzyklus von großer Bedeutung und stellt die Voraussetzung zur Bekämpfung von Krebs dar.

Der Zellzyklus einer normalen gesunden Zelle unterliegt einer präzisen Steuerung. Daher können Störungen in der Regulation zur Entstehung von bösartigen

Tumoren führen. Krebszellen teilen sich autonom, das bedeutet der Zellzyklus wird nicht mehr durch den Organismus kontrolliert. Außerdem ist bei vielen Tumorzellen die Dauer eines Zyklus gegenüber den normalen Zellen verkürzt und die Zellteilungsrate erhöht.

Bei der Suche nach den möglichen Auslösern dieser malignen Entartung der Zellen spielen sogenannte Protoonkogene eine wichtige Rolle. Es handelt sich dabei um Vorstufen von Onkogenen. Diese entstehen erst durch schädliche Einflüsse wie beispielsweise UV-Strahlung, chemische Substanzen oder Viren. Protoonkogene kommen in jeder Zelle als normale Gene vor. Die daraus kodierten Proteine sind an der Steuerung und Kontrolle von Wachstum, Teilung und Differenzierung einer Zelle beteiligt. Wenn ein Protoonkogen mutiert, wird im schlimmsten Fall die Zellteilung gefördert und es ist eine Tumorzelle entstanden. ^[3]

Zudem spielen neben den Protoonkogenen die Tumorsuppressorgene eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Krebs. Tumorsuppressoren sind Proteine, die den Zellzyklus kontrollieren und die unkontrollierte Teilung genomisch geschädigter Zellen unterdrücken. Dadurch wird eine Entartung der Zellen verhindert. Mutationen in den Genen führen demzufolge unweigerlich zur malignen Transformation der Zelle. Die aus den Genen resultierenden defekten Proteine sind unfähig gegen eine Zellentartung frühzeitig vorzugehen und ein malignes Wachstum zu verhindern. Ein wichtiger Tumorsuppressor ist das Protein 53 (p53), welches den Zellzyklus-Arrest und bei irreparablen Schäden die Apoptose einleiten kann. Die Bedeutung und Funktion dieses Proteins wird im Kap. 1.3.2 näher erläutert.

1.2 Zelltod

Das Absterben von Zellen ist ein physiologischer Vorgang, der aus zellbiologischer Sicht unerlässlich für den Organismus ist. Die Zellneubildung und Eliminierung stehen im Gleichgewicht, wodurch die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase gewährleistet wird. Wenn dieses Gleichgewicht außer Kontrolle gerät, kommt es zu krankhaften Veränderungen, die z. B. zu Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer führen können. Man vermutet dabei als Ursache einen erhöhten Untergang von spezifischen Neuronen. ^[4] Des Weiteren kann bei einer Hemmung des Zelltods die Zellproliferation fehlreguliert werden und damit zur Entstehung von Krebs beitragen.

Man unterscheidet hauptsächlich zwei Arten des Zelltods, die Apoptose und die Nekrose. Der programmierte Zelltod wird genetisch gesteuert und unterscheidet sich durch bestimmte biochemische und morphologische Merkmale von der Nekrose. Durch Apoptose können irreversibel geschädigte oder nicht mehr benötigte Zellen aus dem Organismus entfernt werden. Eine Entzündungsreaktion bleibt dabei aus, da das gesamte intrazelluläre Material in Membranvesikel

verpackt wird, die sogenannten apoptotischen Körperchen. In vivo werden diese durch z. B. Makrophagen phagocytiert und abgebaut, bevor es zur Zellyse kommt. Die Nekrose hingegen ist ein passiver Vorgang, der durch exogene Noxen verursacht wird. Die Zellen werden so stark geschädigt, dass ein kontrolliertes Absterben nicht mehr möglich ist. Ursachen für die Entstehung einer Nekrose können z. B. mechanische Verletzungen, Hitzeeinwirkungen, Vergiftungen oder radioaktive Strahlen sein. Die Folge ist eine Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe. ^[3, 5]

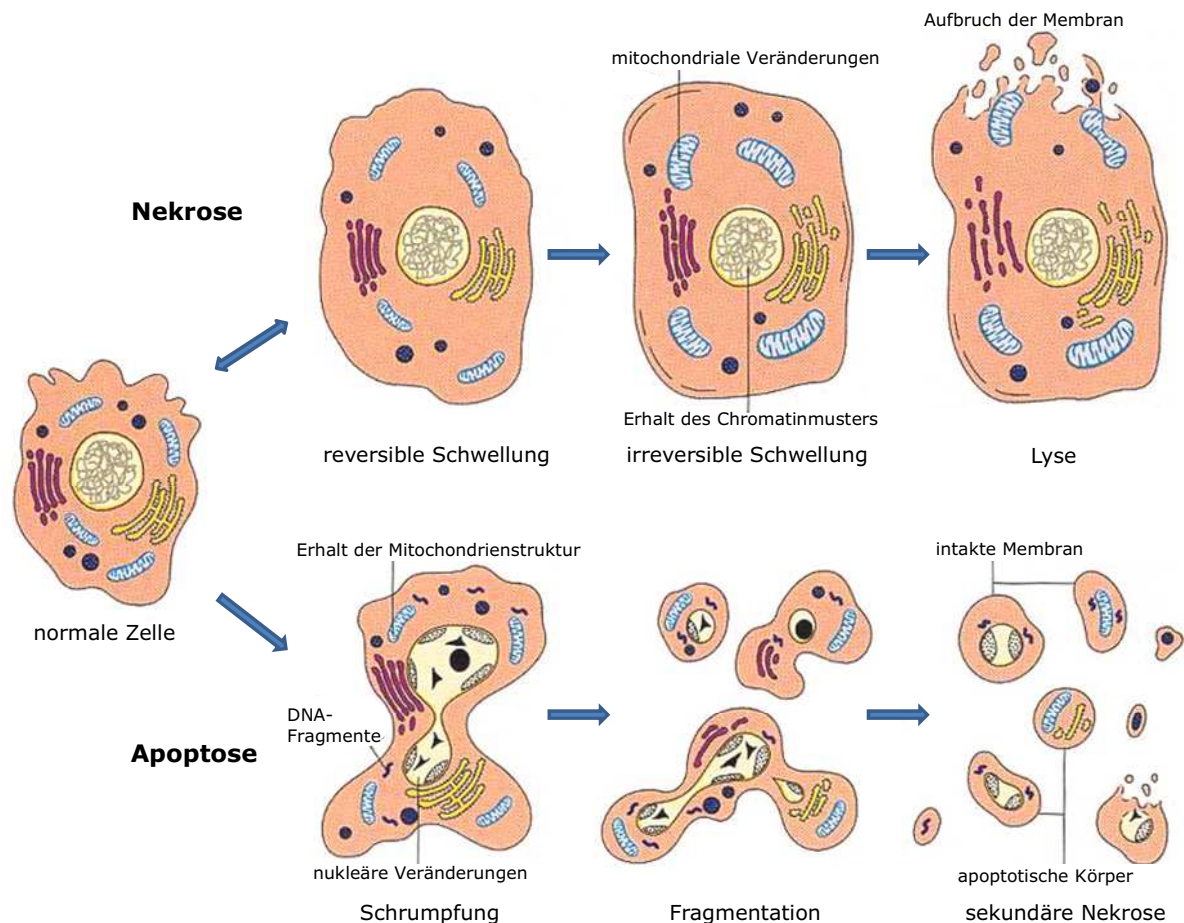


Abb. 2: Morphologischer Vergleich von Apoptose und Nekrose ^[6]

Ein morphologischer Vergleich von Apoptose und Nekrose ist in der Abb. 2 dargestellt. Beim physiologischen Zelltod sind charakteristischerweise nur einzelne Zellen betroffen, die sich aus dem Gewebeverband lösen. Die apoptotische Zelle wird rund und bildet an der Oberfläche Bläschen aus. Außerdem kommt es zu einer Verdichtung des Chromatins im Zellkern bis schließlich die Kernfragmentation eintritt. Die Zelle schrumpft und schnürt kleine membranumhüllte Vesikel ab, die Zytosol und teilweise Kernfragmente enthalten. Nekrotische Zellen verlieren hingegen ihre Fähigkeit den Wasser- und Elektrolythaushalt zu steuern, daher beginnen sie zu quellen bis zum Bersten (Abb. 2). ^[7] Ein nekrotischer Zelltod kann einem apoptotischen Zelltod folgen (sekundäre Nekrose), wenn die apoptotischen Körperchen nicht durch Phagozytose aufgenommen werden. ^[8]

1.3 Molekulare Mechanismen der Apoptose

Apoptose und Nekrose lassen sich nicht nur morphologisch, sondern auch biochemisch voneinander abgrenzen. Apoptose ist ein aktiver und energieabhängiger Prozess der Zelle, der durch unterschiedliche Signaltransduktionswege ausgelöst werden kann.

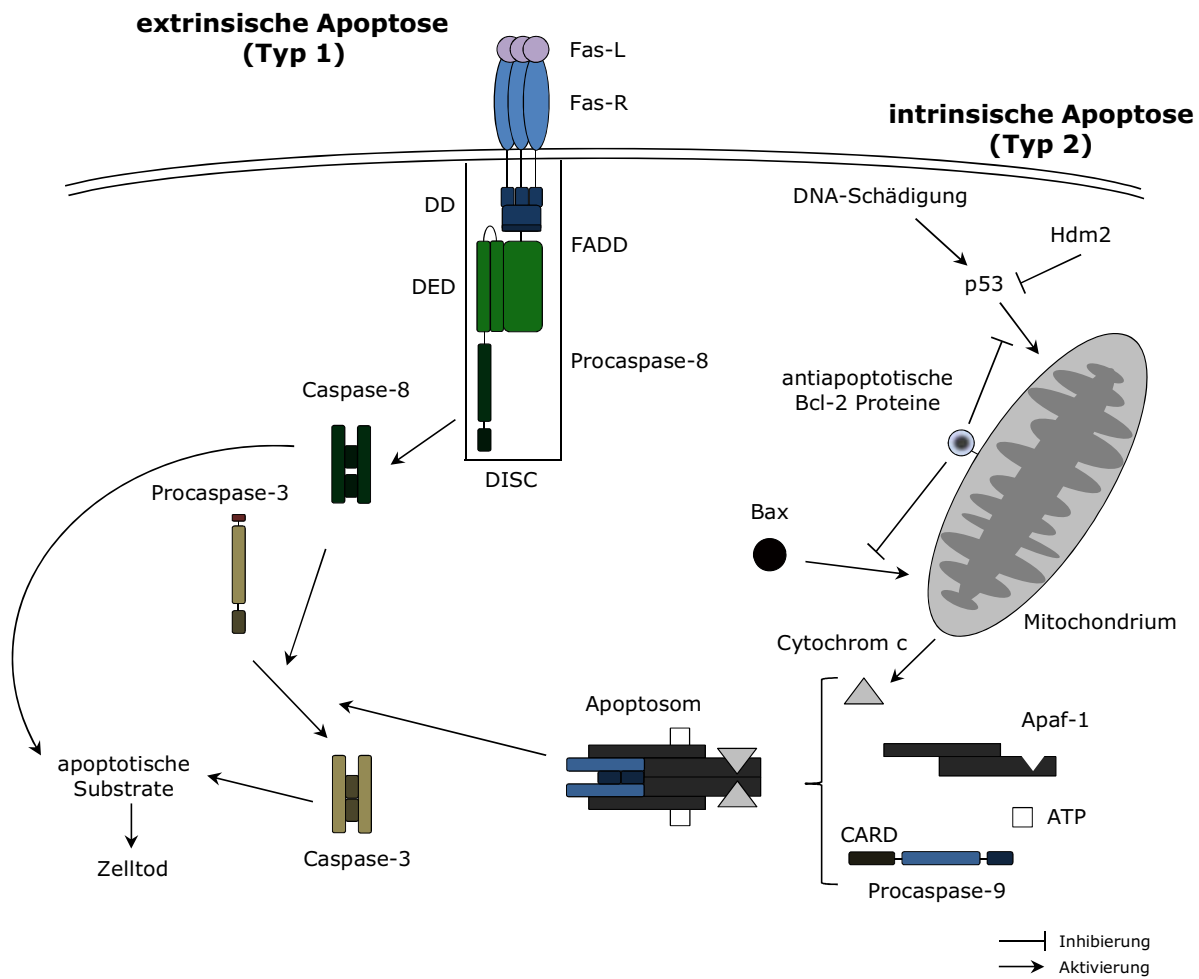


Abb. 3: Signaltransduktionswege der Apoptose: Verlauf entweder über den todesrezeptorvermittelten Signalweg (z. B. Fas-Rezeptor) oder über die rezeptorunabhängige, mitochondriale Signalkaskade (z. B. induziert durch p53)

Allgemein lässt sich der Vorgang der Apoptose in zwei Phasen unterteilen, die Initiations- und die Effektorphase. Die Initiationsphase kann auf dem extrinsischen (Typ 1) oder dem intrinsischen Signalweg (Typ 2) verlaufen (Abb. 3).

Der extrinsische Weg erfolgt über die Trimerisierung sogenannter Todesrezeptoren (z. B. Fas-Rezeptor, TNF-R1, TNF-R2), die zur Tumornekrosefaktor-Rezeptorfamilie gehören. Liganden dieser Rezeptoren sind beispielsweise TNF- α (Tumornekrosefaktor-alpha), Fas-Ligand und andere Zytokine. Die Todesrezeptoren besitzen im Zytoplasma eine Todesdomäne (DD), an die nach Trimerisierung Adaptermoleküle wie das FADD (Fas-Rezeptor assoziiertes Protein mit

Todesdomäne) mit seiner eigenen Todesdomäne binden. Das FADD weist außerdem noch eine Todeseffektordomäne (DED) auf, an die sich die Procaspase-8 mit ihrer analogen Domäne heftet. Es ist somit ein Tod-induzierender Signalkomplex (DISC) im Zytoplasma entstanden. Durch autokatalytische Spaltung der Procaspase-8 wird die Initiatorcaspase-8 aktiviert und über die Caspase-Kaskade der damit verbundene Zelltod ausgelöst.^[9-12]

Der Weg der intrinsischen Signaltransduktion verläuft über noch nicht genau bekannte Mechanismen, die zur Freisetzung von proapoptischen Proteinen wie dem Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytoplasma führen. Diese Signalübermittlung kann durch Tumorsuppressoren wie dem p53 verursacht werden, welches beispielsweise durch eine starke DNA-Schädigung aktiviert wurde.^[13] Cytochrom c bildet mit dem apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1 (Apaf-1) und Adenosintriphosphat (ATP) einen oligomeren Komplex, welcher nach Konformationsänderung die Procaspase-9 mit Hilfe der Caspase-Rekrutierungs-Domäne (CARD) binden kann. Der dadurch entstandene Komplex wird als Apoptosom bezeichnet. Es handelt sich dabei um die aktive Form der Caspase-9, die zur Initiierung von weiteren Caspasen und demzufolge zum Tod der Zelle führt (Abb. 3).^[14]

Die Effektorphase ist letztendlich die Ausführung der Caspase-Kaskade mit dem Zelltod als Folge. Die sogenannten Effektorcaspasen (Caspase-3, 6 und 7) sind dabei aktiv am Abbau der Zellkernmembran und des Zytoskeletts beteiligt.^[15]

1.3.1 Proteine der Caspase-Familie

Caspasen sind Cystein-Proteasen, die vor allem bei der Kontrolle und Steuerung des programmierten Zelltods eine Schlüsselrolle einnehmen. Charakteristisch für diese katalytische Protease-Familie ist die Spaltung am C-terminalen Ende einer Aspartateinheit. Es sind derzeit mehr als 14 verschiedene Caspasen bekannt.^[16]

Die Caspase-Familie unterteilt sich in inflammatorische (ICE – Interleukin Converting Enzyme) und proapoptische Caspasen. Dabei zählen zu den proapoptischen Caspasen die Initiator- und die Effektorcaspasen. Die Initiatorcaspasen sind durch große regulatorische Domänen wie DED (z. B. Caspase-8) oder CARD (z. B. Caspase-9) gekennzeichnet. Die Effektorcaspasen besitzen im Gegensatz dazu lediglich eine kleine Prodomäne (z. B. Caspase-3). Neben diesen Prodomänen am N-Terminus weisen die Caspasen eine große Untereinheit (ca. 20 kDa) und eine kleine Einheit mit einer Größe von ca. 10 kDa am C-terminalen Ende auf (Abb. 4).^[15, 16]

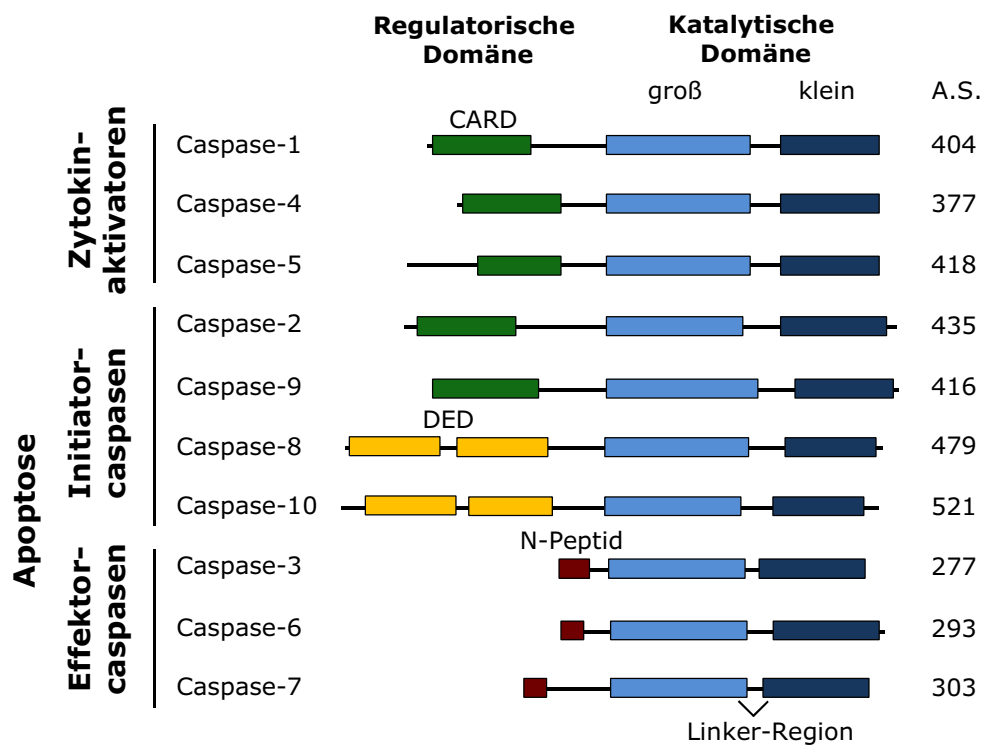


Abb. 4: Schematische Darstellung der primären Strukturen der Caspasen (Procaspasen); Rechts ist die Anzahl der Aminosäuren (A.S.) der längsten bekannten Isoform des jeweiligen Humanproteins dargestellt. ^[16]

Die Aktivierung der Proteasen erfolgt in der Regel durch Selbstprozessierung oder andere Caspasen. Dabei wird die N-terminale Prodomäne abgespalten und die kleine und große Untereinheit voneinander getrennt. Die bisherigen Untersuchungen ergaben, dass die aktive Caspase ein Heterotetramer darstellt, welches aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten besteht. Jeweils ein aktives Zentrum befindet sich auf den großen Untereinheiten. Es enthält Cystein in einem konservierten QACXG-Motiv (X = R, Q oder G). Diese Aminosäuresequenzen sind bei der Interaktion mit einem Substrat und bei der enzymatischen Spaltung von entscheidender Bedeutung. Die Substratspezifität hängt zum einen von der vor der Aspartateinheit stehenden Aminosäuresequenz und zum anderen von der Tertiärstruktur des Substrat-Polypeptids ab. Beispielsweise findet bei der Caspase-1 die Proteolyse nach einer YVAD-Sequenz statt, hingegen schneidet die Caspase-3 nach einer DEVD-Einheit. ^[15]

Die Caspase-3 besitzt als Effektorprotease eine Schlüsselrolle in der Endphase des Apoptoseprozesses. Sie kann sowohl durch die Caspase-8 als auch durch die Caspase-9 aktiviert werden (Abb. 3). Ein Substrat ist die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), ein in Eukaryoten hochkonserviertes Zellkernenzym, das durch die Bindung an die DNA in der Lage ist Strangbrüche zu erkennen und zu beheben. PARP wird in ein 85-89 kDa und ein 27-31 kDa großes Fragment gespalten und ist aufgrund dessen funktionslos. ^[17] Ein weiterer wesentlicher Schritt im Verlauf der Apoptose erfolgt durch die Proteolyse des DNase-Inhibitors ICAD durch die Caspase-3. Das führt zur Freisetzung der zuvor durch ICAD blo-

ckierten Nuklease CAD (Caspase-Activated Desoxyribonuklease). Infolgedessen kommt es zur Fragmentierung der chromosomalen DNA im Zellkern.^[18] Darüber hinaus werden auch bestimmte Zellstrukturproteine wie Fodrin, Lamin und Gelsolin gespalten.^[19] Letztendlich resultieren aus der Vielzahl der Signalübertragungen der Abbau und das Auflösen der Zelle.

1.3.2 Der Tumorsuppressor p53 und sein Gegenspieler Hdm2

Das Protein 53 oder kurz p53 ist ein Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor, der auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wird. Die zentrale Aufgabe dieses Proteins besteht darin, die Entstehung von potenziellen Tumorzellen zu verhindern, in dem entweder der Zellzyklus arretiert bis die DNA-Schäden behoben wurden oder bei irreparablen Fehlern des Genoms den programmierten Zelltod auszulösen.^[20]

Das entsprechende p53-Gen ist auf dem Chromosom 17p13 lokalisiert und kodiert einen Transkriptionsfaktor mit drei verschiedenen Funktionsdomänen, die in Abb. 5 dargestellt sind.^[21, 22]

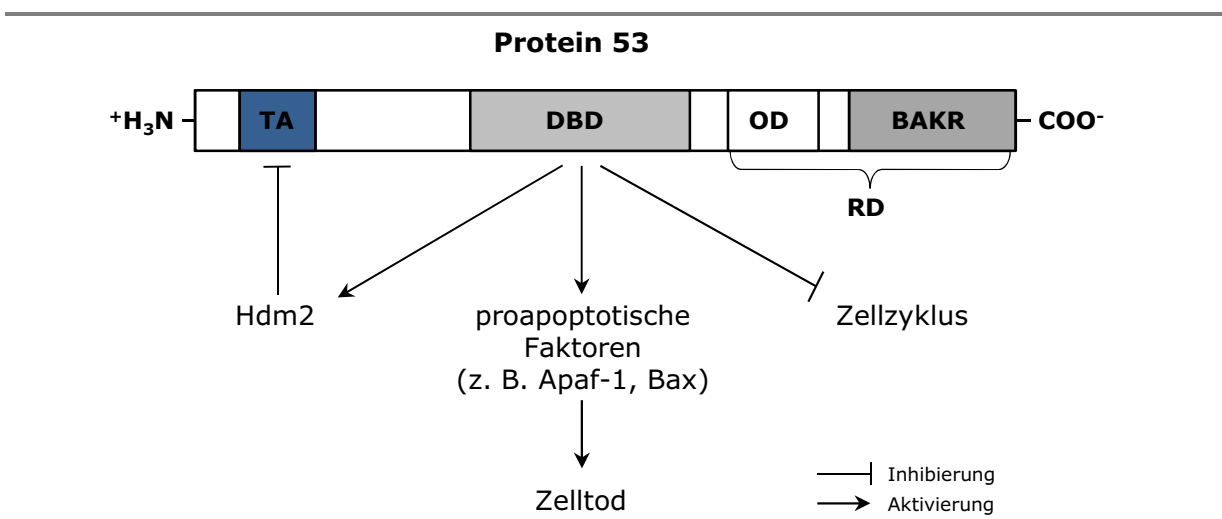


Abb. 5: Regulation und Funktion des p53

TA: Transaktivierungsdomäne; DBD: DNA-bindende Domäne; RD: Regulator-domäne, die eine Oligomerisierungsdomäne (OD) und eine basische allosterische Kontrollregion (BAKR) beinhaltet.^[22]

Am N-terminalen Ende befindet sich eine Transaktivierungsdomäne. Dieser folgt die zentrale DNA-Bindungsdomäne und die komplexe C-terminale Regulator-domäne, die eine Oligomerisierungsdomäne sowie eine basische Domäne zur Feinregulation der DNA-Bindung enthält. Insgesamt besteht das Protein 53 aus 393 Aminosäuren.^[22]

Als Antwort auf zelluläre Stresssignale wird das p53 aktiviert und akkumuliert im Kern der Zelle. Es bindet als Tetramer an die DNA und kontrolliert die Expression einer großen Anzahl von Genen, die eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des

Zellzyklus und der Induktion der Apoptose spielen.^[23, 24] Wenn keine DNA-Schädigungen auftreten, wird die p53-Transkriptionsaktivität auf sehr geringem Niveau gehalten und das Protein unterliegt einer engen, multifaktoriellen Kontrolle um das normale Zellwachstum und die Entwicklung der Zelle nicht zu gefährden. Das Hdm2-Protein (Human Double Minute 2) fungiert dabei als wichtigster Bindungspartner.^[25] Durch die Interaktion von Hdm2 mit der N-terminalen Transaktivierungsdomäne des p53 kommt es zu einer Blockade der p53-Transkription. Außerdem ubiquitinyliert Hdm2 als E3-Ligase das p53 am Carboxylende und exportiert es anschließend aus dem Nukleus ins Zytoplasma, was den Abbau von p53 durch das Ubiquitin-Proteasom-System zur Folge hat. Darüber hinaus ist das Hdm2-Gen auch ein Transkriptionstarget von p53. Daher entsteht ein autoregulatorischer Feedback-Mechanismus, bei dem p53 die Expression seines eigenen negativen Regulators aktiviert (Abb. 5).^[26, 27]

Es liegt immer ein geringer Anteil an p53-Monomeren in der Zelle vor, dadurch kann im Fall einer DNA-Schädigung eine sofortige Aktivierung des Proteins gewährleistet werden.^[28] Zusätzlich erfolgt eine p53-Aktivierung nach Phosphorylierung des Proteins in der N-terminalen Transaktivierungsdomäne. Dadurch verringert sich die Bindungsaffinität von p53 an Hdm2 und als Folge führt das zu einer Dissoziation des Hdm2-p53-Komplexes.^[29]

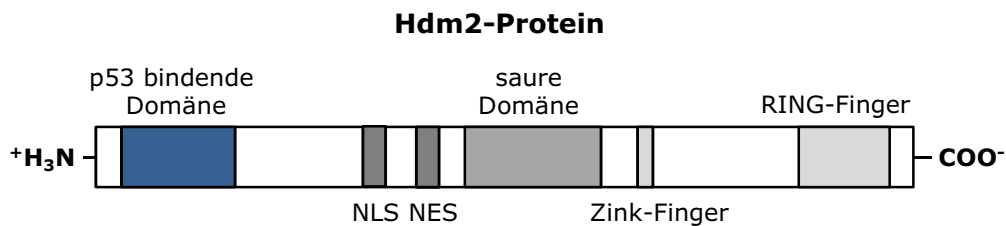


Abb. 6: Aufbau des Hdm2-Proteins

NLS: nukleäre Lokalisationssequenz; NES: nukleäre Exportsequenz

Das Hdm2-Gen konnte auf dem Chromosom 12q14.3-15 lokalisiert werden. Das daraus kodierte Protein besteht aus 491 Aminosäuren und ist aus mehreren Domänen aufgebaut (Abb. 6).^[30] Die N-terminale Domäne interagiert mit der TA des p53. Dabei scheint eine Oligomerisierung von p53 sowohl für die Bindung als auch für eine optimale Ubiquitinierung notwendig zu sein.^[31]

Das Hdm2 besitzt eine Zink-Finger Domäne sowie nukleäre Import- und Exportsequenzen (NLS, NES), die dem Protein einen Transfer zwischen dem Zellkern und dem Zytosol ermöglichen. Weiterhin ist eine zentrale saure Domäne für die Bindung anderer interagierender Proteine erforderlich. Das RING-Finger-Motiv am C-Terminus ist für die Ubiquitin-Ligase-Aktivität verantwortlich.^[32]

1.4 Bedeutung von p53/Hdm2 für die Karzinogenese

Über 50 % der menschlichen Tumore zeigen p53-Genmutationen oder Defekte in der p53-vermittelten Signaltransduktion. Insbesondere Kolon-, Bronchial- und Mammakarzinome weisen diese Art von genetischer Veränderung in großer Zahl auf.^[33] Die p53-Genmutationen befinden sich überwiegend in der DNA-bindenden Domäne, was eine Transaktivierung wichtiger Gene verhindert. Aufgrund dessen wird sowohl die Zelltransformation als auch die Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Angriffen stark begünstigt. Des Weiteren geht die Feststellung einer Mutation im p53-Gen oft mit einer schlechten Prognose und einer hohen Rezidivwahrscheinlichkeit einher.^[34]

Der Tumorentwicklung muss nicht zwangsweise eine p53-Genmutation zugrunde liegen. Es kann bei einem vorliegenden p53-Wildtyp auch auf Defekten in der Expression von p53-regulierenden Proteinen beruhen.^[35] Beispielsweise kann eine anomale Akkumulation von Hdm2-Proteinen in einer Vielzahl von Tumoren beobachtet werden. Vor allem Weichteilsarkome, maligne Melanome, kolorektale Karzinome sowie Adeno- und Mammakarzinome zählen zu den Tumoren, die eine Hdm2-Überexpression aufweisen. Je nach Tumorart kann das Outcome sowohl negativ als auch positiv für den Patienten ausfallen. Es ist demnach nicht konsistent mit einer schlechten Prognose verbunden. Die Ursache der gesteigerten Proteinproduktion kann auf eine gezielte Vermehrung von DNA-Abschnitten des Hdm2-Gens, eine verstärkte Transkription dieses Gens oder eine vermehrte Translation der m-RNA zurückgeführt werden.^[36] Man würde vermuten, dass die Tumore mit einer erhöhten Hdm2-Aktivität das p53 in sehr geringer Konzentration enthalten, da der Abbau durch das Hdm2 reguliert wird. Gefunden wird jedoch der gegenteilige Effekt, denn bei der Mehrheit dieser Tumore wird nicht nur Hdm2, sondern auch p53 überexprimiert. Die Gründe für dieses scheinbare Paradoxon sind noch nicht geklärt. In der Inhibition des Hdm2-Proteins und der damit verbundenen Aktivierung des p53-vermittelten Apoptoseweges liegt eine mögliche therapeutische Strategie zur Bekämpfung dieser Tumore. Ziel der derzeitigen Forschung ist es Wege zu finden, um den Zelltod bei Krebserkrankungen gezielt auszulösen. Denn in der Regel stören die üblichen Zytostatika den Zellstoffwechsel der Tumorzellen oder behindern deren Zellteilung, die eigentliche Ursache, die Störung in den Apoptosemechanismen, bleibt bei den bisher etablierten Therapieschemata noch unberücksichtigt.^[37, 38]

1.5 Hdm2-Inhibitoren

Die Hdm2-Inhibitoren können in drei Hauptkategorien eingeteilt werden. Die Hemmung kann sich zum einen auf die Hdm2-Ubiquitin-Ligasefunktion beziehen und zum anderen durch die Inhibition der Hdm2-p53-Wechselwirkung erfolgen, speziell mit dem Target p53 oder Hdm2.^[39] Sowohl Makromoleküle als auch

niedermolekulare Verbindungen sind für den Einsatz als Inhibitoren denkbar. Versuche mit p53-abgeleiteten Peptiden haben gezeigt, dass diese beim Design von Inhibitoren der p53-Hdm2-Interaktion verwendet werden könnten.^[37] Ungeachtet dessen wird sich im Folgenden eingehender mit den selektiven niedermolekularen Hemmstoffen beschäftigt.

1.5.1 Inhibitoren der Hdm2-E3-Ligasefunktion

Serdementan

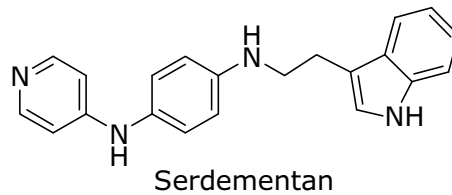


Abb. 7: Oraler Hdm2-Inhibitor Serdementan (JNJ-26854165)

Die E3-Ligasefunktion des Hdm2-Proteins kann beispielsweise durch das Tryptaminderivat Serdementan (JNJ-26854165) gehemmt werden (Abb. 7). Präklinische Studien haben gezeigt, dass die Bindung von Serdementan an der RING-Domäne von Hdm2 erfolgt und infolgedessen die Ubiquitinierung von p53 verhindert wird. Dadurch findet kein Abbau des p53 durch das 26S Proteasom statt und das Level des Proteins erhöht sich in der Zelle.^[39] Die Verbindung hemmt die Zellproliferation und induziert Apoptose in akuten myeloischen und lymphoiden Leukämie Zelllinien mit einer wt-p53-Expression. Des Weiteren zeigt Serdementan auch vielversprechende Wirkungen gegenüber p53-mutierten Zelllinien. Neuere Studien deuten bei diesen Zelllinien auf einen Hdm2 unabhängigen Mechanismus hin.^[40] Die Verbindung befindet sich bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren bereits in der Phase-I-Studie.^[39]

HLI98 Verbindungen

Weitere Vertreter der Hdm2-E3-Ligaseinhibitoren sind die HLI98 Verbindungen, die als Grundstruktur ein 7-Nitro-10-aryl-5-desazaflavin aufweisen (Abb. 8). Ob die Hemmung der Hdm2-vermittelten Ubiquitinierung durch eine Blockade der E2-E3-Wechselwirkung oder durch eine Veränderung der RING-Finger-Struktur verursacht wird, muss noch bestimmt werden. In jedem Fall führt die Inhibition zu einer bevorzugten Abtötung von wt-p53-exprimierenden Tumorzellen.^[41, 42]

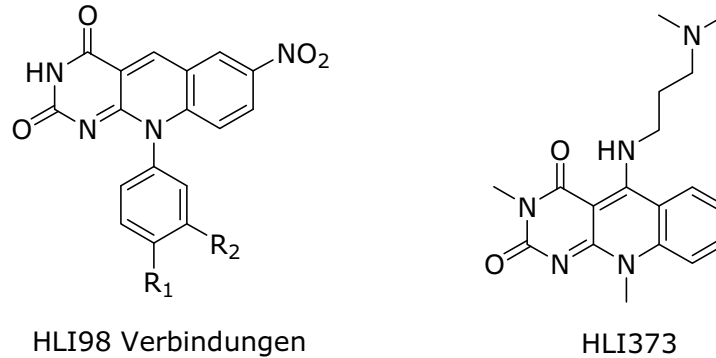


Abb. 8: HLI98 Verbindungen (z. B. HLI98D: $R_1 = \text{Cl}$, $R_2 = \text{H}$; HLI98E: $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$) und das Analogon HLI373

Ein wesentlicher Nachteil der HLI98 Verbindungen ist ihre geringe Löslichkeit im wässrigen Medium. Daher ist ihre Anwendung bei in vivo Studien begrenzt. Aufgrund dessen wurde das Analogon HLI373 mit einer sehr guten Wasserlöslichkeit entwickelt (Abb. 8). Es besitzt eine 5-Dimethylaminopropylamino-Seitenkette und verfügt nicht mehr über den Arylrest in Position 10. HLI373 ist sowohl in vitro als auch in vivo ein wesentlich potenterer Inhibitor als die HLI98 Verbindungen. ^[41, 43]

1.5.2 Inhibitoren der Hdm2-p53-Interaktion

1.5.2.1 p53 als Target

RITA

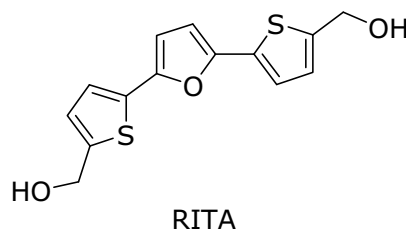


Abb. 9: RITA (Reaktivierung von p53 und Induktion der Tumorzell-Apoptose)

Die Verbindung RITA (NSC 652287) stellt in wt-p53-exprimierenden Tumorzelllinien die apoptoseinduzierende Funktion von p53 wieder her. Es bindet am N-Terminus von p53 und blockiert infolge einer Konformationsänderung des Proteins die p53-Hdm2-Interaktion. Dadurch ist p53 vor dem Hdm2-vermittelten Abbau geschützt und es kommt zu einer erhöhten intrazellulären Akkumulation und transkriptionellen Aktivität von p53. Die apoptoseauslösende Wirkung von RITA konnte in einer Reihe von Tumorzelllinien in vitro und in vivo gezeigt werden, beispielsweise in Lymphomen sowie in Dickdarm-, Lungen-, Haut-, Brust- und Hals-Karzinomen. ^[44, 45]

1.5.2.2 Hdm2 als Target

Aus der Kristallstruktur des Hdm2-p53-Komplexes geht hervor, dass die drei Aminosäuren Phe19, Trp23 und Leu26 der TA von p53 für die Interaktion mit Hdm2 verantwortlich sind (Abb. 10). Hdm2 besitzt am N-Terminus eine sehr hydrophobe Bindungstasche für diese Wechselwirkung. ^[46, 47]

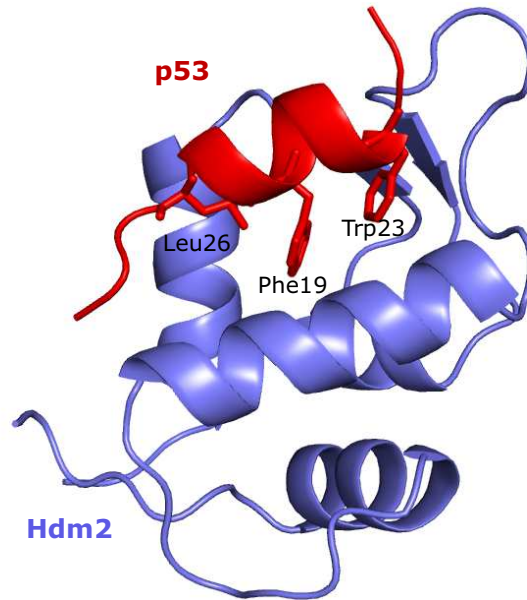


Abb. 10: Kristallstruktur des Hdm2-p53-Komplexes ^[47]

Das Wirkungsprinzip dieser Gruppe von Hdm2-Inhibitoren beruht auf der Nachahmung dieser Wechselwirkung. Durch Hemmung der hydrophoben Bindungstasche des Hdm2-Proteins bleibt die Bildung des Hdm2-p53-Komplexes aus und es kommt zur Stabilisierung des p53-Spiegels in der Zelle und somit zur Aktivierung der p53-Signalkaskade. Die Spiro-Oxindole wurden beispielsweise gezielt entwickelt um die Interaktion zwischen der Aminosäure Trp23 und dem Hdm2 zu imitieren. Zusätzlich konnten durch die Einführung eines Spiro-Pyrrolidinringes auch die Wechselwirkungen mit den Seitenketten der Aminosäuren Phe19 und Leu26 nachgebildet werden. ^[43] Vielversprechende Vertreter dieser Stoffgruppe sind die Verbindungen MI-219 und MI-319, die in einem auf Fluoreszenz-polarisation basierenden Hdm2-Bindungsassay 500-mal stärker wirksam waren als das natürliche Peptid p53. Die beiden MI-Verbindungen (Abb. 11) sehen sich strukturell sehr ähnlich und induzieren sowohl den Zellzyklusarrest als auch den programmierten Zelltod in der folliculären B-Zell Lymphom Zelllinie FSCCL. ^[48]

Die Verbindung TDP665759 weist eine Benzodiazepingrundstruktur auf und ist ebenfalls in der Lage p53 in wt-p53-exprimierenden Tumoren zu aktivieren (Abb. 11). Bei einer A375 Xenotransplantat-Studie an Nacktmäusen konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass eine Kombination von TDP665759 mit einer allein unwirksamen Dosis von Doxorubicin den gleichen Effekt bewirkt wie die maximal tolerierbare Konzentration von Doxorubicin. ^[43, 49]

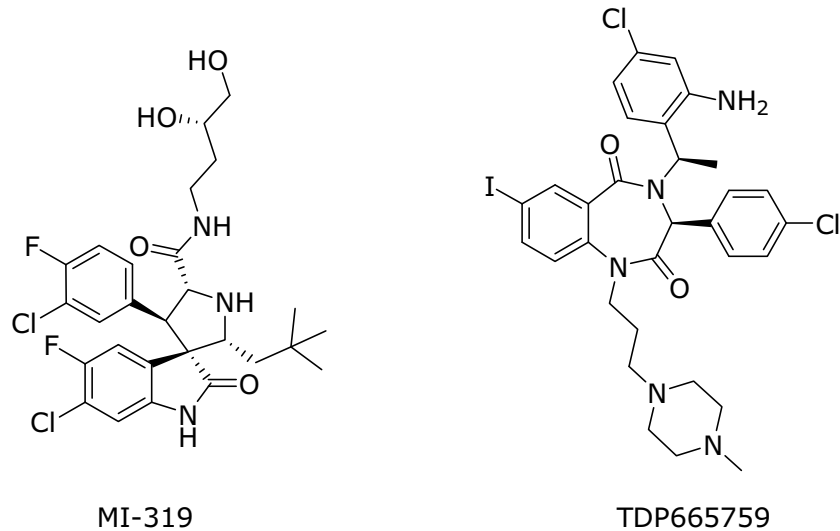


Abb. 11: Spiro-Oxindol-Verbindung MI-319 und Benzodiazepinabkömmling TDP665759

Nutline

Zu einer sehr potenten und selektiven Verbindungsklasse gehören die (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-2-imidazolin-Analoga, die den Namen Nutline (Nutley Inhibitor) tragen. Diese Verbindungen verdrängen rekombinantes p53 aus dem Hdm2-p53-Komplex mit einer mittleren Hemmkonzentration im Bereich von 100-300 nmol/l. Die 2-Imidazoline wurden als racemische Mischungen synthetisiert. Die einzelnen Enantiomere wurden anschließend an chiralen Säulen getrennt und untersucht. Beispielsweise bindet das Nutlin-3a 150-mal stärker an Hdm2 als das Enantiomer Nutlin-3b (Abb. 12).^[50]

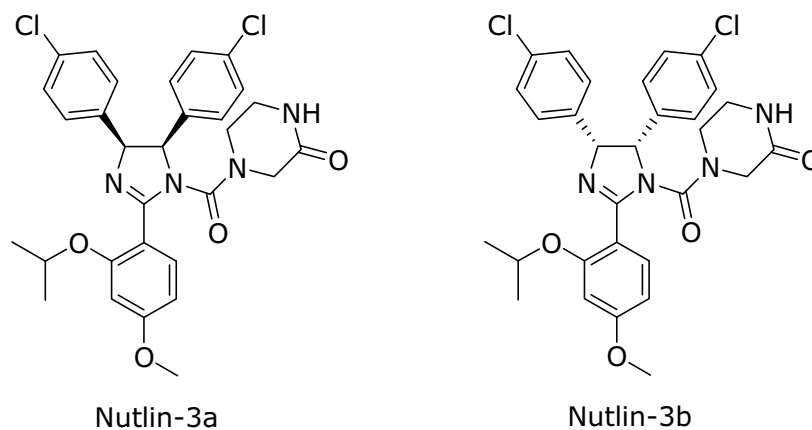


Abb. 12: Enantiomere a und b von Nutlin-3

Die präklinischen Studien an Nacktmäusen mit einem Xenotransplantat der Osteosarkom-Zelllinie SJSA-1 zeigten für das Nutlin-3a (2x200 mg/kg tgl.; oral) eine 90%ige Wachstumshemmung der Tumore. Im Vergleich dazu wurde das Tumorstadium durch die maximal tolerierbare Konzentration von Doxorubicin (10 mg/kg tgl.; i.v.) lediglich um 81 % gehemmt.^[50] Aufgrund der vielver-

sprechenden Ergebnisse der *in-vivo* und *in-vitro* Untersuchungen befindet sich eine orale Formulierung des Nutlin-3a (RO5045337) derzeit in mehreren klinischen Studien. Die klinische Testung erfolgt als Monotherapie z. B. an Patienten mit soliden Tumoren und hämatologischen Neoplasien. Dabei erhalten die Patienten täglich eine Dosis von 20 mg/m² für zehn Tage innerhalb eines 28 Tage Zyklus. Des Weiteren werden gegenwärtig neue Probanden für die Untersuchung der Sicherheit, Pharmakokinetik und Wirksamkeit der Kombinationstherapie von RO5045337 und Doxorubicin bei Weichteilsarkomen rekrutiert. ^[51]

1.6 Problemstellung

In vorhergehenden Arbeiten konnten Imidazolinderivate mit interessanten pharmakologischen Eigenschaften synthetisiert werden. So wurden zum Beispiel 4,5-Diaryl-2-imidazoline als selektive Estrogenrezeptormodulatoren (SERMs) entwickelt, die zielgerichtet estrogenabhängige Mammakarzinomzellen angreifen können (Abb. 13). ^[52]

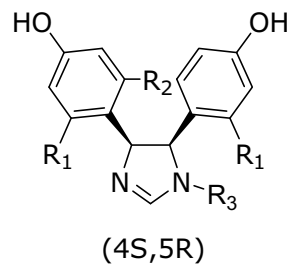


Abb. 13: z.B. (4R,5S)/(4S,5R)-*N*-Ethyl-4,5-bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin
 $R_1 = \text{Cl}$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_3$ (EC_{50} : 15 nmol/l an MCF-7/2a Zellen mit
 Estrogenrezeptor α , Relative Bindungsaffinität zum
 Estrogenrezeptor: < 0,1 %) ^[53, 54]

Durch Substitution eines dritten aromatischen Restes in Position 2 des Imidazolinringes kommt es zum Verlust der estrogenen Eigenschaften. ^[53] Dennoch wurden in einer dieser Arbeiten (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline synthetisiert, die in Abhängigkeit vom Substitutionsmuster der Aromaten an Krebszellen ausgeprägt zytotoxische Wirkungen aufweisen. Zu diesen (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen gehören insbesondere die Verbindungen mit lipophilen Substituenten wie Methyl, Methoxy oder Chlor an den Aromaten in Position 2, 4 und 5 des Imidazolinringes. Des Weiteren wurden auch antiproliferative Effekte der hydrophileren 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline festgestellt, die an den Aromaten mit einer basischen Seitenkette wie beispielsweise *N*-Ethylmorpholin verethert sind. ^[55]

Ziel dieser Arbeit soll es sein, genauere Struktur-Wirkungsbeziehungen der zytotoxisch wirkenden 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline zu erstellen, da diese Strukturen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu bestimmten Hdm2-Inhibitoren, den Nutlinen,

vielversprechende potentielle Wirkstoffe gegen Krebs darstellen. Dazu sollen neue Derivate der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline insbesondere unter Berücksichtigung der *N*-Alkylierung und *N,N'*-Dialkylierung der Verbindungen mit lipophilem Substitutionsmuster der Aromaten synthetisiert werden. Dabei soll gleichzeitig mit Hilfe der Mikrowellentechnologie eine Synthesemethode entwickelt werden, die schneller und effizienter zu den angestrebten Zielstrukturen führt. Zusätzlich soll untersucht werden, ob sich die *(4R,5S)/(4S,5R)*- von den *(4R,5R)/(4S,5S)*-konfigurierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen in ihren antiproliferativen Eigenschaften unterscheiden (Abb. 14).

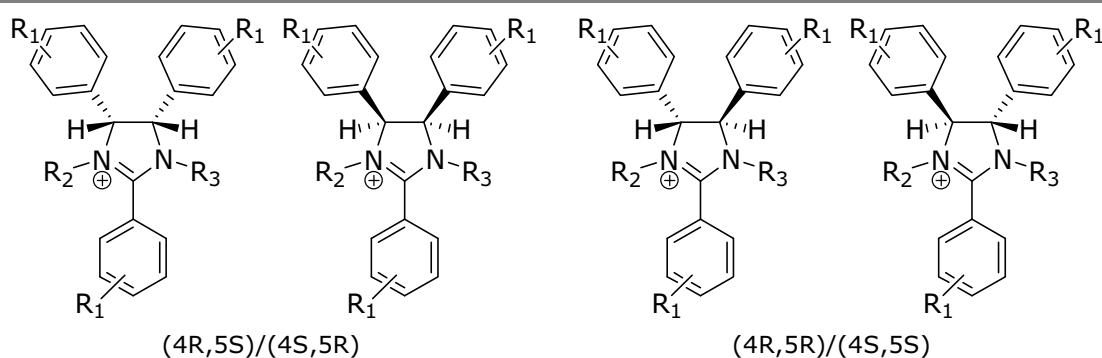


Abb. 14: *(4R,5S)/(4S,5R)*- und *(4R,5R)/(4S,5S)*-konfigurierte 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (z. B.: R₁ = 4-CH₃, 4-Cl; R₂ = CH₃, CH₂CH₃; R₃ = H, R₂)

Darüber hinaus ist beabsichtigt *(4R,5S)/(4S,5R)*-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit stickstoffhaltigen Substituenten an den 2,4,5-positionierten Aromaten zu synthetisieren und ihre pharmakologischen Wirkungen zu analysieren.

Die Verbindungen sollen genau auf ihre zellulären Wirkungen getestet werden. So soll festgestellt werden, ob die 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline in der Lage sind, Apoptose auszulösen. Diese Testung soll sowohl durch die Betrachtung zellmorphologischer Veränderungen als auch durch die Bestimmung der Caspase-3 Aktivität erfolgen. Des Weiteren soll mit Hilfe eines zellulären Hdm2- und p53-Assays eine mögliche Inhibition des Hdm2-Proteins durch die 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline und dem damit verbundenen p53-vermittelten Zelltod untersucht werden.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Synthese

2.1.1 Übersicht der Synthesewege und der synthetisierten Verbindungen

Die folgende Abb. 15 zeigt einen Überblick der grundlegenden Syntheseschritte der in dieser Arbeit synthetisierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline.

$(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline können auf drei unterschiedlichen Synthesewegen hergestellt werden. Es ist beispielsweise möglich, den jeweiligen Benzaldehyd mit Hexamethyldisilazan zum $(4R,5S)/(4S,5R)$ -konfigurierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazolin umzusetzen. Des Weiteren reagieren $(1R,2S)/(1S,2R)$ -1,2-Diamino-1,2-diarylethane, unter Erhalt der Konfiguration, mit den jeweiligen Benzaldehyden und *N*-Bromsuccinimid ebenfalls zu 2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die im Vorfeld synthetisierten 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadiene mit starken Basen umzusetzen. Die jeweiligen 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadiene werden durch Reaktion eines bestimmten Benzaldehyds mit Ammoniak erhalten.

Aus $(4R,5S)/(4S,5R)$ -konfigurierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen lassen sich mit Hilfe der Synthesemikrowelle $(4R,5R)/(4S,5S)$ -konfigurierte 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline darstellen.

Die erhaltenen 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline wurden durch *N*-Alkylierung und *N,N'*-Dialkylierung weiter modifiziert.

Genauere Erläuterungen zu den einzelnen Syntheseschritten und deren Mechanismen werden in den Kap. 2.1.2 bis 2.1.6 beschrieben. Des Weiteren werden die detaillierten Angaben zur Durchführung der jeweiligen Synthese im experimentellen Teil im Kap. 3.1.3 aufgeführt.

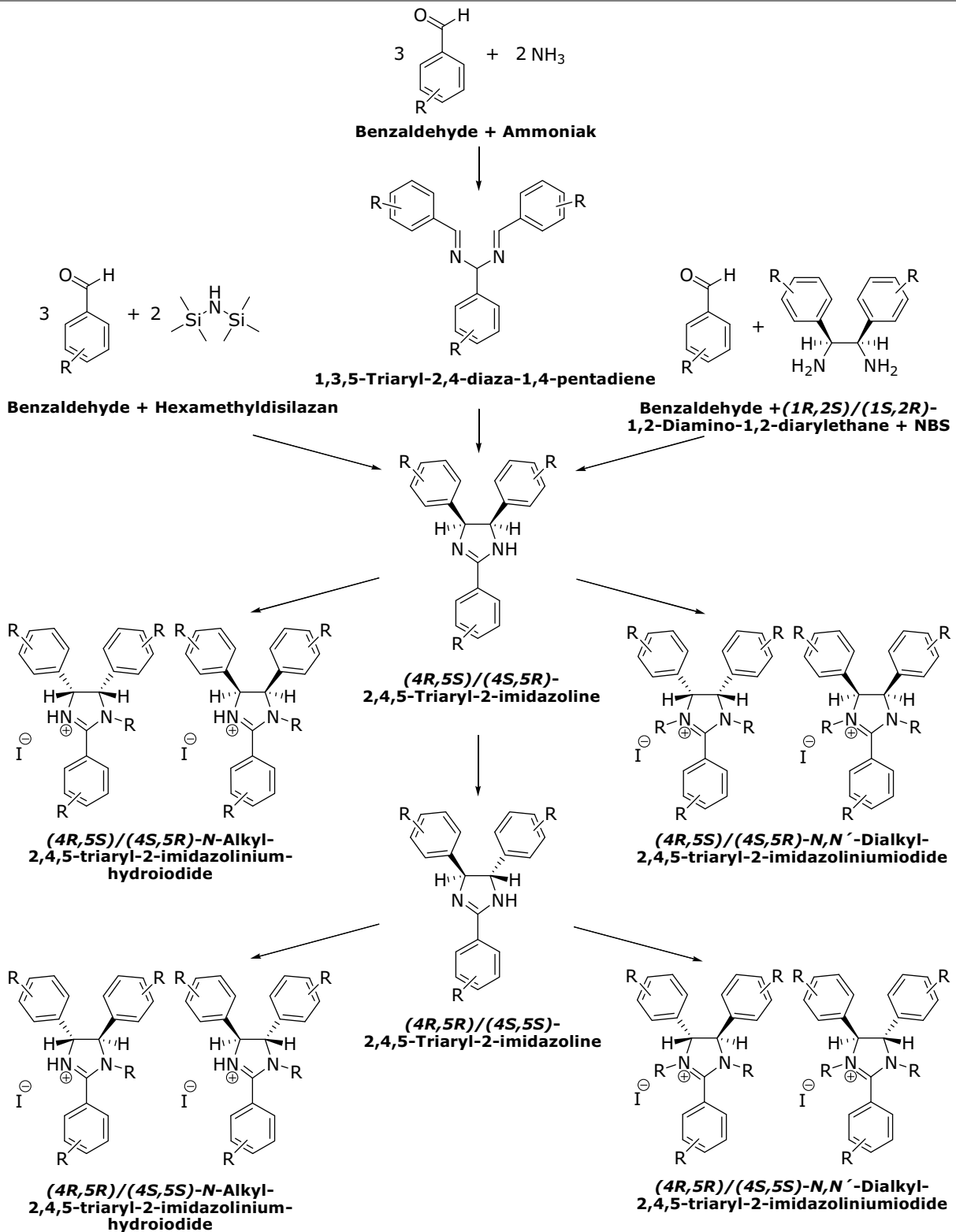
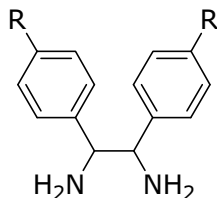


Abb. 15: Übersicht der Synthesewege der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline;

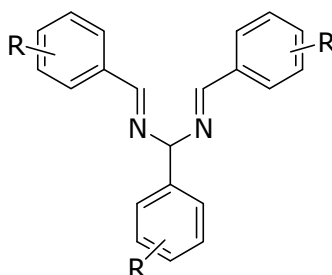
Von den abgebildeten allgemeinen Strukturen der nicht alkylierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline ist die (4S,5R)- und (4S,5S)-Konfiguration sowie die (1S,2R)-Konfiguration des Diarylethans dargestellt. R - kann sowohl identische als auch unterschiedliche Substituenten beschreiben.

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Verbindungen sind in Tab. 1 bis Tab. 5 aufgeführt. Die pharmakologische Testung erfolgte ausschließlich an den Endverbindungen, den 2,4,5-Triaryl-2-imidazolininen.



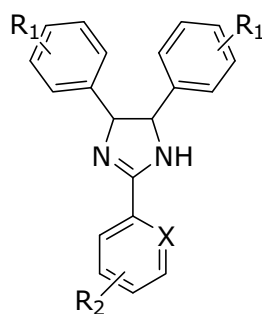
Tab. 1: (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-diarylethane (**7-9**)

R	Verbindung
OCH ₃	7
NO ₂	8
CN	9

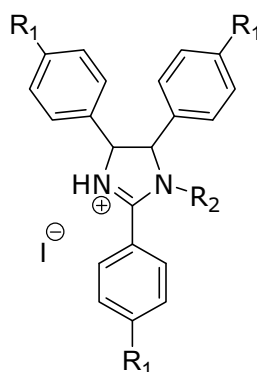


Tab. 2: 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadiene (**10-16**)

R	Verbindung
4-CH ₃	10
4-CH ₂ CH ₃	11
4-SCH ₃	12
4-Cl	13
4-Cl, 2-OCH ₃	14
3-OCH ₃	15
3-Cl	16

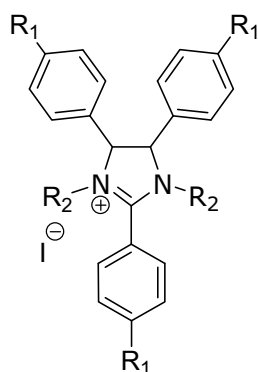
**Tab. 3:** 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**17-36**)

R₁	R₂	X	Konfiguration	Verbindung
4-CH ₃	4-CH ₃	CH	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	17
4-CH ₂ CH ₃	4-CH ₂ CH ₃	CH	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	18
4-SCH ₃	4-SCH ₃	CH	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	19
4-Cl	4-Cl	CH	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	20
4-Cl, 2-OCH ₃	4-Cl, 2-OCH ₃	CH	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	21
3-OCH ₃	3-OCH ₃	CH	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	22
3-Cl	3-Cl	CH	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	23
4-NHAc	4-NHAc	CH	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	24
2,4-Cl ₂ , 6-OCH ₃	2,4-Cl ₂ , 6-OCH ₃	CH	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	25
4-OCH ₃	H	N	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	26
4-OCH ₃	4-NHAc	CH	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	27
4-OCH ₃	4-NO ₂	CH	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	28
4-OCH ₃	4-CN	CH	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	29
4-NO ₂	4-NO ₂	CH	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	30
4-NO ₂	4-OCH ₃	CH	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	31
4-NO ₂	4-CN	CH	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	32
4-CN	4-CN	CH	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	33
4-NH ₂	4-NH ₂	CH	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	34
4-CH ₃	4-CH ₃	CH	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	35
4-CH ₂ CH ₃	4-CH ₂ CH ₃	CH	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	36



Tab. 4: *N*-Alkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoline (**37-51**)

R₁	R₂	Konfiguration	Verbindung
CH ₃	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	37
CH ₃	CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	38
CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	39
CH ₂ CH ₃	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	40
CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	41
CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	42
Cl	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	43
Cl	CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	44
NO ₂	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	45
CH ₃	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	46
CH ₃	CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	47
CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	48
CH ₂ CH ₃	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	49
CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	50
CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	51



Tab. 5: *N,N'*-Dialkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoline (**52-66**)

R₁	R₂	Konfiguration	Verbindung
CH ₃	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	52
CH ₃	CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	53
CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	54
CH ₂ CH ₃	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	55
CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	56
CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	57
Cl	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	58
Cl	CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	59
NO ₂	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	60
CH ₃	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	61
CH ₃	CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	62
CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	63
CH ₂ CH ₃	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	64
CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	65
CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	66

2.1.2 Synthese der (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-diarylethane und deren Vorstufen

Aus (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-diarylethanen lassen sich (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline darstellen, die gleich oder unterschiedlich substituierte Aromaten in den Positionen 2, 4 und 5 des Imidazolinringes tragen. Die Synthese der (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-diarylethane basiert auf der Grundlage von Vögtle und Goldschmitt^[56]. Dazu können zwei unterschiedliche Herstellungsverfahren eingesetzt werden: zum einen das konventionelle Verfahren, wie es Vögtle und Goldschmitt benutzten und zum anderen das Arbeiten über Normaldruck mit Hilfe der Synthesemikrowelle. Im Folgenden wird gezeigt, dass bei beiden Methoden eine aufwendige Stereoisomerentrennung nicht notwendig ist.

2.1.2.1 Synthese des (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethans

Die Ausgangsverbindung zur Darstellung der (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-diarylethane (**7-9**) ist das (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan **3**, das stereoisomerenrein erhalten werden kann (Abb. 16).^[56]

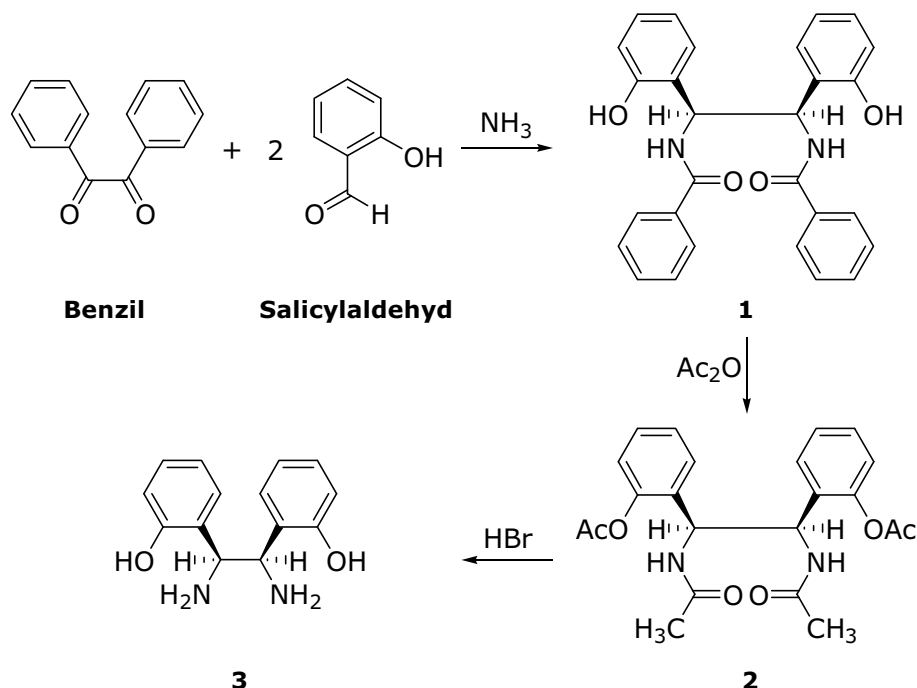


Abb. 16: Synthese des (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethans **3**

Dabei wird im ersten Syntheseschritt zu einer ethanolischen Lösung aus Benzil und Salicylaldehyd eine wässrige 25%ige Ammoniaklösung zugesetzt. Das Zwischenprodukt Salicylideneimin entsteht nach Vögtle und Goldschmitt^[56] bei

der Reaktion von Ammoniak und Salicylaldehyd. Anschließend reagieren zwei Äquivalente Salicylidenimin mit einem Äquivalent Benzil zu einem 1,5-unge-sättigtem Diol, das in einer [3.3']-sigmatropen Umwandlung in ein Tautomer des $(1R,2S)/(1S,2R)$ -1,2-Diamino- N,N' -dibenzoyl-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethans **1** übergeht. Im Folgenden entsteht durch irreversible Protonenwanderung aus dem Tautomer die Verbindung **1**, welche im nächsten Syntheseschritt mit Hilfe von Essigsäureanhydrid zur Verbindung **2** umgesetzt wird.

Das entstandene $(1R,2S)/(1S,2R)$ - O,O',N,N' -Tetraacetyl-1,2-diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan **2** lässt sich mit Bromwasserstoffsäure zum $(1R,2S)/(1S,2R)$ -1,2-Diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan **3** hydrolysieren.

2.1.2.2 Synthese der $(1R,2S)/(1S,2R)$ -1,2-Diamino-1,2-diarylethane

Die Synthese der $(1R,2S)/(1S,2R)$ -1,2-Diamino-1,2-diarylethane (**7-9**) erfolgt durch Umsetzung des $(1R,2S)/(1S,2R)$ -1,2-Diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethans **3** mit den jeweiligen Benzaldehyden (Abb. 17). Je nach verwendeter Herstellungsmethode werden die entstehenden $(3R,4S)/(3S,4R)$ -3,4-Diaryl-1,6-bis(2-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-diene (**4-6**) als Zwischenprodukt isoliert oder im Reaktionsgemisch gleich weiterverarbeitet. Im Folgenden werden die zwei durchgeführten Synthesewege etwas genauer beschrieben.

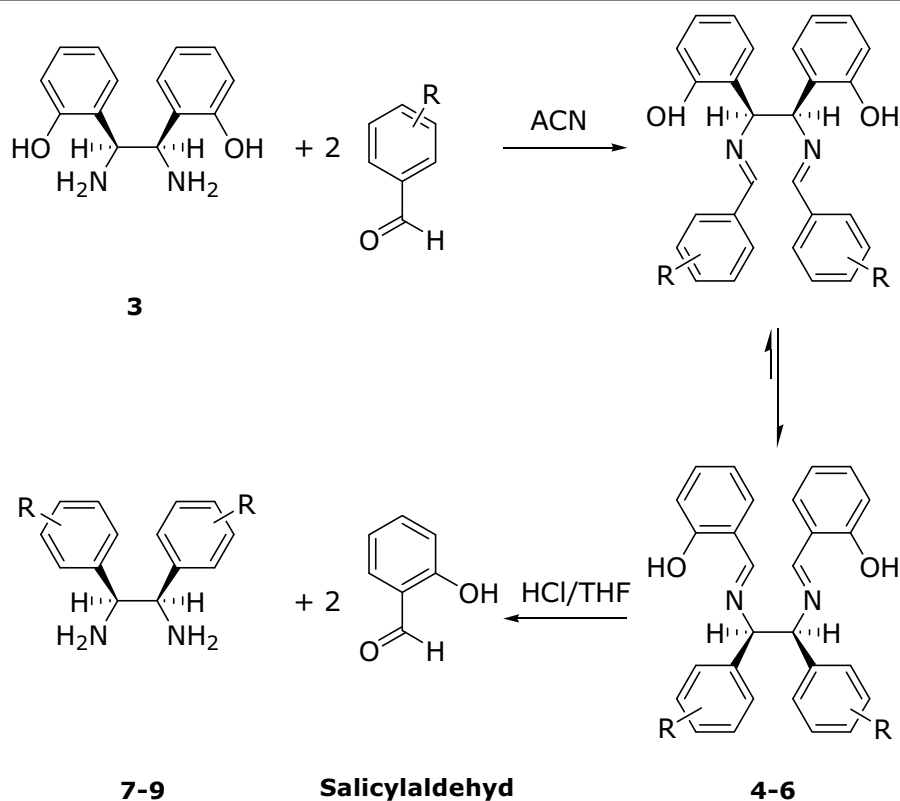


Abb. 17: Synthese der $(1R,2S)/(1S,2R)$ -1,2-Diamino-1,2-diarylethane (**7-9**)
(R siehe Tab. 6)

Tab. 6: $(3R,4S)/(3S,4R)$ -3,4-Diaryl-1,6-bis(2-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-diene (**4-6**) und $(1R,2S)/(1S,2R)$ -1,2-Diamino-1,2-diarylethane (**7-9**)

R	$(3R,4S)/(3S,4R)$ -3,4-Diaryl-1,6-bis(2-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-diene	$(1R,2S)/(1S,2R)$ -1,2-Diamino-1,2-diarylethane
4-OCH ₃	4	7
4-NO ₂	5	8
4-CN	6	9

Herstellung durch Verwendung der konventionellen Methode

Bei der konventionellen Methode erfolgt die Umsetzung des $(1R,2S)/(1S,2R)$ -1,2-Diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethans **3** mit dem entsprechenden Benzaldehyden im einfachen Rundkolben und unter Standardlaborbedingungen bei Normaldruck.

Das Reaktionsgemisch wird in Acetonitril unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Die Reaktionszeit richtet sich nach der Geschwindigkeit der thermischen Valenzisomerisierung, die beim Erhitzen stattfindet. Es handelt sich dabei um eine [3.3']-sigmatrope Diaza-Cope-Umlagerung der $(3R,4S)/(3S,4R)$ -1,6-Diaryl-3,4-bis(2-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-diene in die $(3R,4S)/(3S,4R)$ -3,4-Diaryl-1,6-bis(2-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-diene (**4-6**). Der sogenannte Salicyleffekt wird einerseits durch die Ausbildung energetisch günstiger Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxygruppen und den Iminstickstoffen begründet und andererseits durch die Protonenkatalyse der phenolischen Hydroxygruppen. Dabei verläuft die sterechemische Umwandlung vergleichbar mit der Stereochemie bei der Synthese der Verbindung **3** (Abb. 16).^[56]

Für die Synthese des $(3R,4S)/(3S,4R)$ -1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-bis(4-methoxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-diens **4** stellte sich eine Reaktionszeit von 72 h als optimal heraus. Die Umsetzung mit 4-Nitrobenzaldehyd und 4-Cyanobenzaldehyd erfolgte innerhalb von 24 h.

Die entstandenen 2-Hydroxyphenyl-substituierten Diimine (**4-6**) werden nach der Aufreinigung innerhalb von 24 h bei Raumtemperatur in salzsaurem Tetrahydrofuran hydrolysiert. Anschließend werden die Dihydrochloride der $(1R,2S)/(1S,2R)$ -1,2-Diamino-1,2-diarylethane (**7-9**) mit wässriger Natronlauge in die freien Basen überführt und durch Extraktion mit Dichlormethan gewonnen.

Herstellung durch Verwendung der Synthesemikrowelle

Die Durchführungen von mikrowellenunterstützten Synthesen gewinnen in der organischen Chemie immer mehr an Bedeutung, da die Reaktionszeiten gegenüber den konventionellen Methoden oft um ein Vielfaches verkürzt werden können.

Bei den Mikrowellen handelt es sich um elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich zwischen 1 m und 1 mm, deren Energie zum Spalten kovalenter Bindungen zu niedrig ist. Moleküle werden durch Mikrowellen zum Rotieren angeregt, wodurch sich das Reaktionsgemisch aufgrund von Reibung gleichmäßig erwärmt. Voraussetzung dafür ist, dass das Reaktionsgemisch ausreichend polare Eigenschaften besitzt, um die Mikrowellenstrahlung absorbieren zu können. Mit Hilfe der relativen Permittivität (ϵ_r) eines Stoffes kann abgeschätzt werden, wie groß die Fähigkeit des Stoffes ist, elektromagnetische Feldenergie bei hoher Frequenz in Wärmeenergie umzuwandeln. Das bedeutet, je höher die relative Permittivität eines Stoffes ist, desto besser werden die Mikrowellen absorbiert. [57]

Vor Beginn der Reaktion müssen die einzelnen Parameter wie Reaktionstemperatur, Reaktionszeit und Leistung der Synthesemikrowelle festgelegt werden. Die Reaktionstemperatur orientiert sich in erster Linie an der Siedetemperatur des verwendeten Lösungsmittels und wird entsprechend mit Hilfe der Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel (RGT-Regel) von Van 't Hoff zu Gunsten der Reaktionszeit verändert. Bei einer Temperaturerhöhung um 10 K kann sich demzufolge die Reaktionsgeschwindigkeit verdoppeln bis vervierfachen. Zu beachten ist, dass Temperaturerhöhungen über den Siedepunkt hinaus einen Druckanstieg im Reaktionsgefäß nach sich ziehen. Es werden daher für die Synthesemikrowelle Quarzgefäße verwendet, deren maximaler Arbeitsdruck 15 bar beträgt. Die daraus resultierende maximale Arbeitstemperatur für eine Mikrowellenreaktion ist den jeweiligen Temperatur-Druck-Diagrammen der verwendeten Lösungsmittel zu entnehmen.

Exemplarisch für die mikrowellenunterstützte Synthese der *(1R,2S)/(1S,2R)*-1,2-Diamino-1,2-diarylethane (**7-9**) wird im Folgenden die Herstellung von *(1R,2S)/(1S,2R)*-1,2-Diamino-1,2-bis(4-nitrophenyl)ethan **8** beschrieben.

Acetonitril kann die Mikrowellen gut absorbieren ($\epsilon_r = 38$) und ist daher als Lösungsmittel für die Mikrowellensynthese geeignet. *(1R,2S)/(1S,2R)*-1,2-Diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan **3** und 4-Nitrobenzaldehyd werden mit dem Lösungsmittel in ein Quarzgefäß mit Silikonschutzüberzug gebracht und mit einem speziellen druckstabilen Deckel verschlossen (Abb. 18). Anschließend wird das Quarzreaktorsystem (QRS) in die entsprechende Halterung (monoPREP; Abb. 4) und in die Synthesemikrowelle eingesetzt. Die Temperaturkontrolle erfolgt zum einen mit einem faseroptischen Sensor (Abb. 18) im Inneren des Reaktionsgefäßes (T1) und zum anderen mit einem Infrarotsensor an der Gefäßwand (T2).



Abb. 18: MonoPREP in der Synthesemikrowelle, Quarzreaktorsystem mit Thermorohr, Faseroptiksensoren (von links nach rechts)

Die festgelegten Parameter und der Verlauf des ersten Syntheseteilschrittes zur Synthese des $(1R,2S)/(1S,2R)$ -1,2-Diamino-1,2-bis(4-nitrophenyl)ethans **8** sind in Tab. 7 und Abb. 19 aufgeführt.

Tab. 7 : Festgelegte Parameter der mikrowellenunterstützten Synthese des $(1R,2S)/(1S,2R)$ -1,2-Diamino-1,2-bis(4-nitrophenyl)ethans **8**

Phase \ Parameter	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Leistung [W]
Aufheizen (I)	4	81	300
	5	140	300
Plateau (II)	15	140	300
Abkühlen (III)	10	-	0

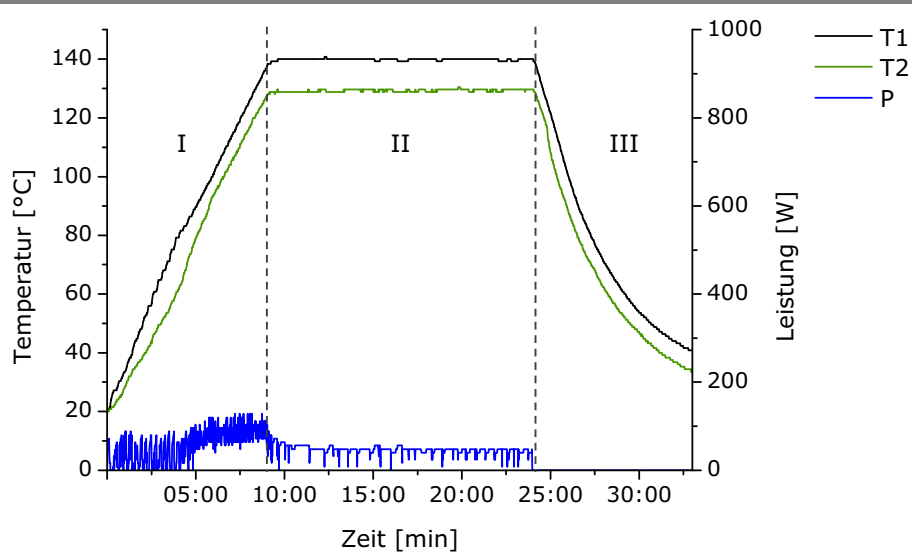


Abb. 19: Verlauf der mikrowellenunterstützten Synthese des $(1R,2S)/(1S,2R)$ -1,2-Diamino-1,2-bis(4-nitrophenyl)ethans **8**; T1 - Innentemperatur, T2 - Temperatur an der Gefäßwand, P - gebrauchte Synthesemikrowellenleistung; I-III - Reaktionsverlaufphasen

Die sogenannte Aufheizphase erfolgt in zwei Schritten. Als erstes kann das Reaktionsgemisch rasch auf die Siedetemperatur des Lösungsmittels erwärmt werden. Das Erhitzen über den Siedepunkt hinaus geschieht mit 12 K/min. Aus Sicherheitsgründen wird die maximal verwendete Leistung der Synthesemikrowelle auf 300 W begrenzt. Da das Reaktionsgut die Mikrowellen gut absorbiert und die Wärme im Reaktionsgefäß gut verteilt wird, ist zum Erhitzen weitaus weniger Leistung notwendig als maximal vorgegeben (Abb. 19).

Die Reaktionstemperatur in der Plateauphase liegt 60 K über dem Siedepunkt von Acetonitril. Bei der konventionellen Methode erwies sich eine Reaktionszeit von 14 h als optimal, dementsprechend ist nach der RGT-Regel mit einer Reaktionszeit von 10-15 min in der Synthesemikrowelle zu rechnen. Eine Plateauzeit von 15 min stellte sich für eine vollständige thermische Valenzisomerisierung als ideal heraus.

Nach dem Abkühlen des Reaktionsgemisches wird eine wässrige 36%ige Salzsäurelösung zum Reaktionsgemisch zugesetzt. Zur schnellen Hydrolyse des entstandenen *(3R,4S)/(3S,4R)*-1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-bis(4-nitrophenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien **5** wird das Gemisch für weitere 10 min bei 120 °C in der Synthesemikrowelle erhitzt. Anschließend wird der Reaktionsansatz heiß filtriert, um das schwer lösliche Dihydrochlorid des *(1R,2S)/(1S,2R)*-1,2-Diamino-1,2-bis(4-nitrophenyl)ethans **8** zu erhalten. Bei der Synthese entsteht zu einem geringen Teil durch Stereoisomerisierung auch *(1R,2R)/(1S,2S)*-1,2-Diamino-1,2-bis(4-nitrophenyl)ethan. Das *(1R,2R)/(1S,2S)*-1,2-Diarylethylendiamin kristallisiert erst im erkalteten Filtrat aus und stört daher nicht bei der Aufarbeitung des *(1R,2S)/(1S,2R)*-1,2-Diarylethylendiamins. Abschließend wird das Salz in die freie Base überführt.

Die Ausbeuten der Verbindungen **7** und **8** sind bei beiden Methoden vergleichbar. Mit Hilfe der Synthesemikrowelle konnte die Reaktionszeit bei der Synthese des *(1R,2S)/(1S,2R)*-1,2-Diamino-1,2-bis(4-nitrophenyl)ethans **8** auf 1/50stel verkürzt werden. Bei der Herstellung des *(1R,2S)/(1S,2R)*-1,2-Diamino-1,2-bis(4-methoxyphenyl)ethans **7** ergab sich eine Zeitverkürzung um den Faktor 150.

2.1.3 Synthese der *(4R,5S)/(4S,5R)*-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline und deren Vorstufen

Die *(4R,5S)/(4S,5R)*-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline können auf drei unterschiedlichen Synthesewegen erhalten werden. Im Folgenden werden die einzelnen Reaktionsmechanismen und die bei der Synthese verwendeten Reaktanden genauer beschrieben.

2.1.3.1 Synthese der 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadiene

Mit Hilfe der 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadiene (**10-16**) als Ausgangsverbindungen lassen sich (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**17-23**) darstellen.

Die Reaktion zwischen Benzaldehyden und Ammoniak ist bereits seit dem Jahr 1837 bekannt.^[58] Bei der Umsetzung des jeweiligen Benzaldehyds in einer gesättigten wässrigen Ammoniaklösung entsteht das Hydrobenzamid (Abb. 20).

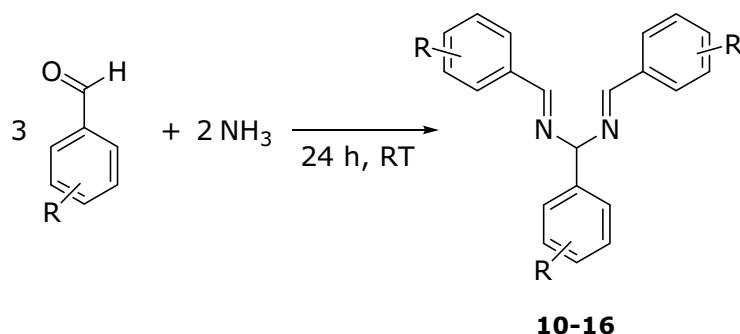


Abb. 20: Synthese der 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadiene (**10-16**)
(R siehe Tab. 8)

Tab. 8: Synthetisierte 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadiene (**10-16**)

R	1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadiene
4-CH ₃	10
4-CH ₂ CH ₃	11
4-SCH ₃	12
4-Cl	13
4-Cl, 2-OCH ₃	14
3-OCH ₃	15
3-Cl	16

Die Reaktion verläuft nach einer Kinetik zweiter Ordnung, dementsprechend ist die Reaktionsgeschwindigkeit abhängig von den Konzentrationen der Ausgangsstoffe.^[59] Die 25%ige Ammoniaklösung wird in einem geringen Überschuss zum Aldehyd zugesetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt.

In der Abb. 21 ist der Reaktionsmechanismus der Synthese nach Ogata et al. dargestellt.^[60] Durch Addition eines Ammoniakmoleküls an den jeweiligen Benzaldehyd kommt es zur Bildung des entsprechenden α -Aminobenzylalkohols (I). Nach Dehydratisierung entsteht daraus ein Benzylidenimin (II), welches mit einem weiteren Äquivalent des gleichen Benzaldehyds zur Verbindung IV und anschließend mit einem weiteren Benzylidenimin-Molekül (II) zum betreffenden 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadien (**10-16**) kondensiert. Dieser Reaktionsschritt läuft bevorzugt in einer verdünnten Lösung ab. Wenn die anfängliche

Konzentration des Benzaldehyds größer ist als die der Ammoniaklösung im Reaktionsgemisch, reagiert der zuvor entstandene α -Aminobenzylalkohol (I) vorzugsweise zum jeweiligen α,α' -Dihydroxydibenzylamin (III) weiter.^[61] Nach Abspaltung von Wasser und einer weiterer Addition des dementsprechenden Benzylidenimins würde auch auf diesem Reaktionsweg das diesbezügliche 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadien (**10-16**) entstehen.

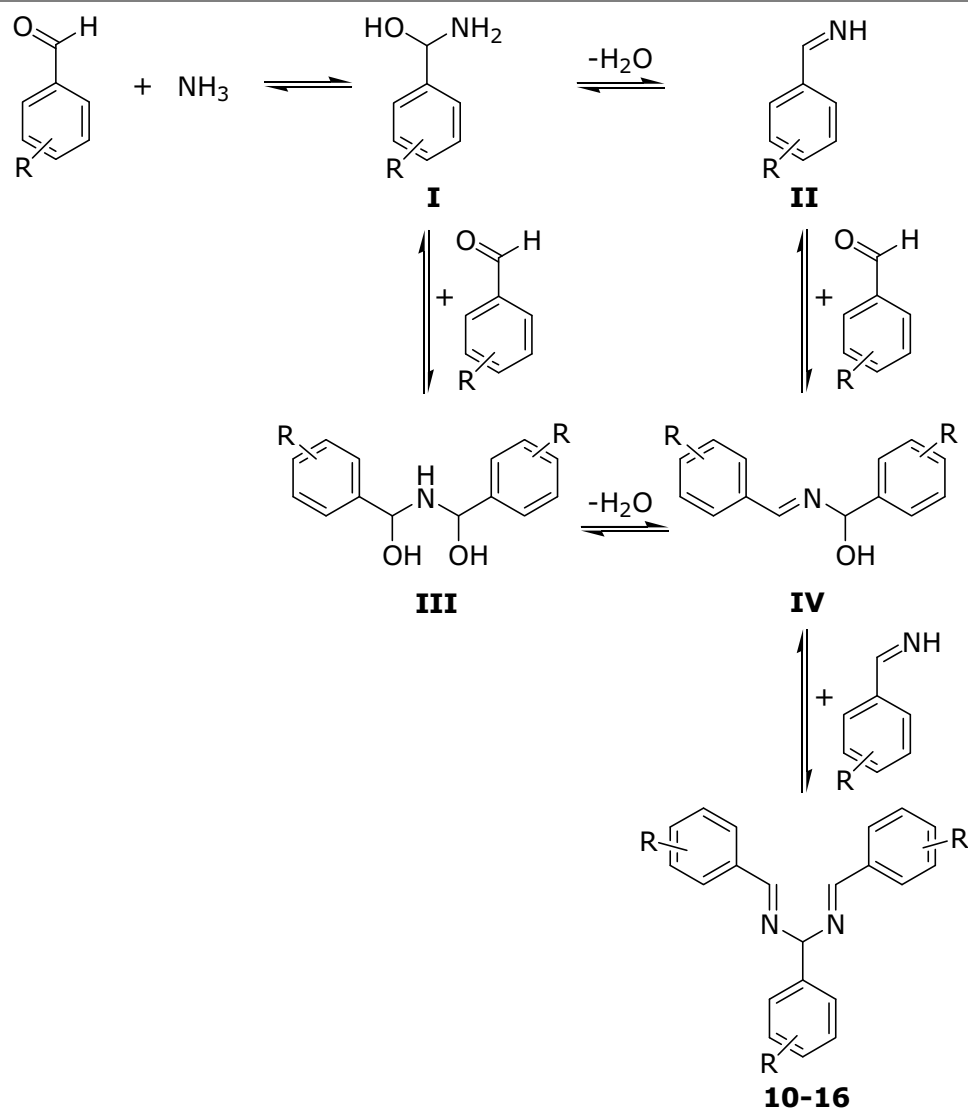


Abb. 21: Schematische Darstellung vom Reaktionsmechanismus zur Bildung der 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadiene (**10-16**) nach Ogata et al.^[60]

Die Umsetzung von Methyl- und Ethylbenzaldehyd lieferte angemessene Mengen der entsprechenden 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadiene (**10, 11**). Ein 1,3,5-Tris(4-cyanophenyl)-2,4-diaza-1,4-pentadien und ein 1,3,5-Tris(4-nitrophenyl)-2,4-diaza-1,4-pentadien waren unter den gegebenen Reaktionsbedingungen nicht zugänglich. Dies lässt sich vermutlich auf die starken elektronenziehenden Effekte der Cyano- und Nitro-Gruppe zurückführen, da sich elektronenziehende Substituenten ungünstig auf die Bildung des Hydrobenzamids auswirken.^[60]

Mit Ausnahme des 4-Chlor-2-methoxybenzaldehyds sind alle für die Synthese verwendeten Aldehyde im Handel erhältlich. Dieser Benzaldehyd wurde im eigenen Arbeitskreis von Dr. Miriam Schlenk im Rahmen ihrer Promotionsarbeit als Nebenprodukt bei der Synthese des 2-Chlor-4-methoxybenzaldehyds gewonnen und zur weiteren Verwendung überlassen.^[62]

2.1.3.2 Synthese der $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline aus den 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadienen

Die synthetisierten 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadiene (**10-16**) können mit starken Basen stereoselektiv in die $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**17-23**) umgesetzt werden (Abb. 22).^[63, 64] Bei der Reaktion in Tetrahydrofuran wird das gelöste Kalium-*tert*-Butanolat solange zum 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadien zugegeben, bis sich ein farbiges Carbanion bildet. Das blaue Carbanion zyklisiert anschließend unter erneuter Farbveränderung rasch weiter zum gelben 2-Imidazolin.^[64] Im Anschluss wird der Reaktionsansatz bis zum vollständigen Auskristallisieren der $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**17-23**) in einem großen Überschuss an Wasser 24 h gerührt.

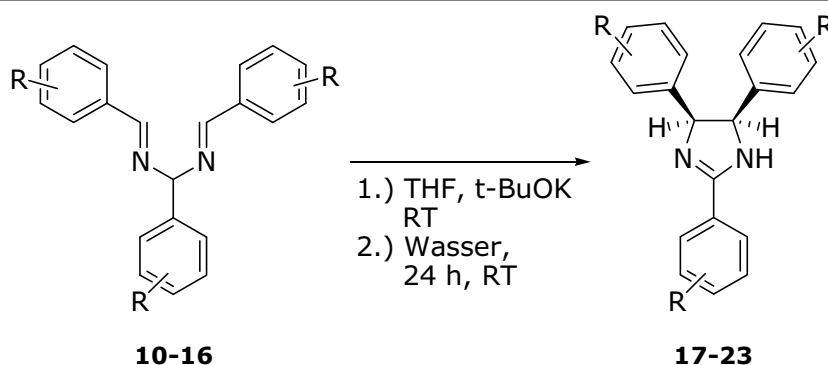


Abb. 22: Synthese der $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**17-23**) aus 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadienen (**10-16**) (R siehe Tab. 9)

Die gewählten Reaktionsbedingungen sind entscheidend bei der Umsetzung mit Kalium-*tert*-Butanolat. Um das $(4R,5S)/(4S,5R)$ -konfigurierte Triaryl-2-imidazolin zu erhalten ist eine Reaktionstemperatur zwischen 0-20 °C erforderlich, denn bei einer Veränderung der Reaktionstemperatur auf beispielsweise 60 °C entsteht als Produkt das Stereoisomer mit der Konfiguration $(4R,5R)/(4S,5S)$.^[65] Des Weiteren werden bei der Synthese 2,4,5-Triaryl-2-imidazole isoliert, wenn als Lösungsmittel Dimethylsulfoxid und eine Reaktionstemperatur von 60-120 °C gewählt wird.^[65]

Die Tab. 9 zeigt die aus den 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadienen (**10-16**) hergestellten $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**17-23**). Mit dieser Zyklisierungsreaktion ist es möglich, $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline

zu synthetisieren, die in den Positionen 2, 4 und 5 des Imidazolinringes gleich substituierte Aromaten tragen.

Tab. 9: *(4R,5S)/(4S,5R)*-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**17-23**) synthetisiert aus den 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadienen (**10-16**)

R	1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadiene	<i>(4R,5S)/(4S,5R)</i>-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline
4-CH ₃	10	17
4-CH ₂ CH ₃	11	18
4-SCH ₃	12	19
4-Cl	13	20
4-Cl, 2-OCH ₃	14	21
3-OCH ₃	15	22
3-Cl	16	23

2.1.3.3 Synthese der *(4R,5S)/(4S,5R)*-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit Hilfe von Hexamethyldisilazan

Ein weiterer Syntheseweg für die Herstellung der *(4R,5S)/(4S,5R)*-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline ist die Reaktion von Benzaldehyden und Hexamethyldisilazan. [66-70] Die Reaktion verläuft analog zum Mechanismus der Reaktion der Benzaldehyde mit Ammoniak (Kap. 2.1.3.1). [66]

Bei einer Reaktionstemperatur von 60 °C werden 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadiene isoliert, die anschließend zu den entsprechenden 2-Imidazolinen umgesetzt werden können. [69, 70] Wird die Reaktionstemperatur zwischen 100-120 °C gewählt, werden stereoselektiv die *(4R,5S)/(4S,5R)*-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline gebildet (Abb. 23). Da es sich dabei um eine sogenannte One-pot-Synthese handelt, sind die Ausbeuten denkbar höher als bei der Zwei-Stufen-Herstellung. [70]

Die Reaktion mit Hexamethyldisilazan wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Darstellung des *(4R,5S)/(4S,5R)*-2,4,5-Tris(4-acetamidophenyl)-2-imidazolins **24** und des *(4R,5S)/(4S,5R)*-2,4,5-Tris(2,4-dichlor-6-methoxyphenyl)-2-imidazolins **25** gewählt (Tab. 10), da die 2-Imidazoline bei der Umsetzung der jeweiligen Benzaldehyde mit Ammoniak nicht zugänglich waren.

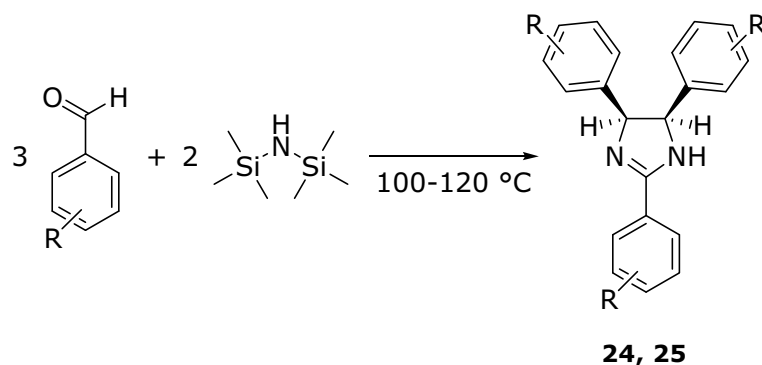


Abb. 23: Synthese der $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**24, 25**) mit Hilfe von Hexamethyldisilazan (R siehe Tab. 10)

Tab. 10: $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**24, 25**) synthetisiert mit Hilfe von Hexamethyldisilazan

R	$(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline
4-NHAc	24
2,4-Cl ₂ , 6-OCH ₃	25

Der 4-Acetamidobenzaldehyd ist kommerziell erhältlich und der 2,4-Dichlor-6-methoxybenzaldehyd wurde im eigenen Arbeitskreis von Dr. Miriam Schlenk im Rahmen ihrer Promotionsarbeit als Nebenprodukt bei der Synthese des 2,6-Dichlor-4-methoxybenzaldehyds gewonnen und zur weiteren Verwendung überlassen.^[62]

2.1.3.4 Synthese der $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit den $(1R,2S)/(1S,2R)$ -1,2-Diamino-1,2-diarylethanen

Die Umsetzung von Diaminoethanen mit Aldehyden zu 2-Imidazolinen wird in einer Vielzahl von Publikationen beschrieben.^[71-77] Beispielsweise beschreibt Ishihara et al. die Synthese der 2-Imidazoline mit Diaminoethanen und sowohl aliphatischen als auch aromatischen Aldehyden in einer alkoholischen Iodlösung.^[73] Bei weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass der Austausch von Iod gegen *tert*-Butylhypochlorit bessere Ausbeuten bei der Umsetzung mit aliphatischen Aldehyden liefert.^[78]

Als sehr vielversprechende Oxidationsmittel für die Synthese der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline werden die *N*-Halosuccinimide von Fujioka et al. dargestellt.^[71] Diese Arbeitsgruppe konnte aufführen, dass unter sehr milden Reaktionsbedingungen hohe Ausbeuten an 2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen erhalten werden.^[71] Die Herstellung der nachfolgenden $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**26-33**) erfolgt in Anlehnung an die Methode von Fujioka et al. (Abb. 24).^[71] Mit Hilfe dieser Synthese können insbesondere 2-Imidazoline

dargestellt werden, bei denen das Substitutionsmuster der 4,5-Diaryle gegenüber dem Aromaten in Position 2 variiert (**26-29**, **31** und **32**).

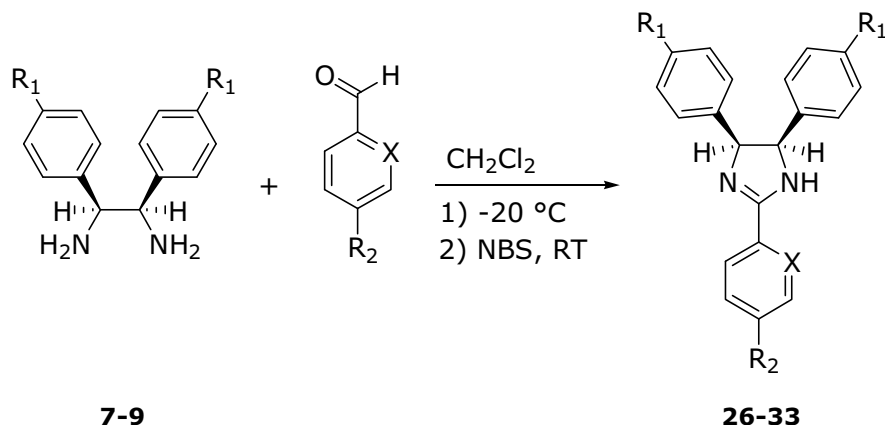


Abb. 24: Reaktion der $(1R,2S)/(1S,2R)$ -1,2-Diamino-1,2-diarylethane (**7-9**) mit dem jeweiligen Benzaldehyd und anschließender Oxidation mit *N*-Bromsuccinimid (NBS) zu den $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen (**26-33**) (R_1 , R_2 und X siehe Tab. 11)

Der erste Syntheseschritt ist die Kondensation der entsprechenden $(1R,2S)/(1S,2R)$ -1,2-Diamino-1,2-diarylethane (**7-9**) mit dem jeweiligen Benzaldehyden in Dichlormethan statt. Eine Reaktionstemperatur von -20 °C erwies sich als vorteilhaft für den Ringschluss. Die daraus resultierenden 2-Imidazolidine wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht isoliert. Die Bildung dieser Zwischenstufe konnte mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie lediglich für die Verbindung **26** bestätigt werden.

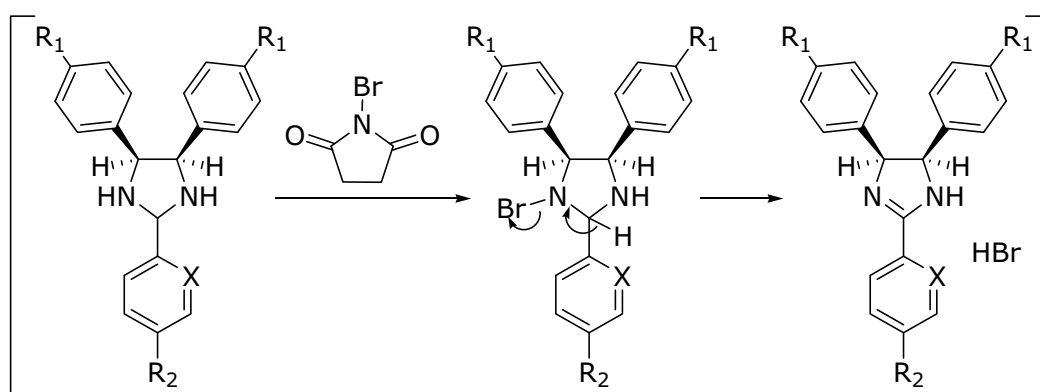


Abb. 25: Schematische Darstellung der Iminbildung des jeweiligen $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazolins^[71] (R_1 , R_2 und X siehe Tab. 11)

Zur Entstehung des 2-Imidazolins wird zum Reaktionsgemisch *N*-Bromsuccinimid zugegeben. Die Abb. 25 zeigt den ablaufenden Reaktionsmechanismus der Iminbildung.^[71] Nach der Eliminierung des Hydrobromids liegt die Verbindung aufgrund des sauren Milieus als Salz vor. Um die freie Base des jeweiligen $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazolins zu erhalten, wird das Reaktions-

gemischt durch eine wässrige Natriumhydroxidlösung alkalisiert und mit Dichlormethan extrahiert.

Die Tab. 11 zeigt die über diesen Syntheseweg hergestellten $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**26-33**) und die dazugehörigen $(1R,2S)/(1S,2R)$ -1,2-Diamino-1,2-diarylethane (**7-9**). Mit dieser Reaktionsmethode ist es auch möglich $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline zu synthetisieren, die in den Positionen 2, 4 und 5 des Imidazolinringes gleich substituierte Aromaten tragen. Die Verbindung **30** und **33** konnten darüber hinaus lediglich über diesen Reaktionsweg erhalten werden.

Tab. 11: $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**26-33**) synthetisiert aus den jeweiligen $(1R,2S)/(1S,2R)$ -1,2-Diamino-1,2-diarylethanen (**7-9**)

R₁	R₂	X	(1R,2S)/(1S,2R)- 1,2-Diamino- 1,2-diarylethane	(4R,5S)/(4S,5R)- 2,4,5-Triaryl- 2-imidazolin
OCH ₃	H	N	7	26
OCH ₃	NHAc	CH	7	27
OCH ₃	NO ₂	CH	7	28
OCH ₃	CN	CH	7	29
NO ₂	NO ₂	CH	8	30
NO ₂	OCH ₃	CH	8	31
NO ₂	CN	CH	8	32
CN	CN	CH	9	33

Die Ausbeuten der synthetisierten Verbindungen sind bei den gewählten Reaktionsbedingungen eher moderat (ca. 30 %). Für höhere Ausbeuten empfiehlt sich eine individuelle Anpassung der Reaktionsbedingungen an die Reaktanden. Der entscheidende Reaktionsschritt ist die Bildung des 2-Imidazolidins in der Kälte. Bei der Synthese des $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Tris(4-nitrophenyl)-2-imidazolins **30** ist es gelungen die Ausbeute um 60 % zu steigern, in dem die Temperatur auf -70 °C gesenkt wurde. Bei einer Reaktionstemperatur von -20 °C betrug die maximal erreichte Ausbeute 26 %.

Weiterhin ist hervorzuheben, dass unter den milden Reaktionsbedingungen die Nitril-Gruppen vollständig erhalten bleiben. Wenn die Zugabe von *N*-Bromsuccinimid zum Reaktionsgemisch zu früh erfolgt, entsteht aus dem eingesetzten Aldehyd eine Carbonsäure.^[79] Der Benzaldehyd ist demzufolge für die Reaktion des Ringschlusses nicht mehr zugänglich. Des Weiteren sind der Zeitpunkt des Reaktionsabbruchs und die zugesetzte Menge an *N*-Bromsuccinimid von entscheidender Bedeutung. Bei einem zu großen Überschuss an *N*-Bromsuccinimid reagiert es weiter mit dem 2-Imidazolin zum 2-Imidazol. Das $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazol als Nebenprodukt konnte bei der Synthese der Verbindung **26** mit Hilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie identifiziert werden.

Für die allgemeine Durchführung der Synthese erwiesen sich äquimolare Mengen der Edukte und eine Reaktionszeit von 4 h nach Zugabe von *N*-Bromsuccinimid als vorteilhaft.

2.1.4 Synthese des (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-aminophenyl)-2-imidazolins aus dem (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-acetamidophenyl)-2-imidazolin

Um das (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-aminophenyl)-2-imidazolin **34** herstellen zu können, wurden mehrere Reaktionswege in Betracht gezogen. Beispielsweise wurde versucht aus dem (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-nitrophenyl)-2-imidazolin **30** durch Reduktion der Nitrogruppen mit Wasserstoff und Palladium/Kohle als Katalysator die freien Amine zu erhalten.^[80] Unter diesen starken Reduktionsbedingungen wurde das 2-Imidazolin vollständig zum Imidazolidin hydriert. Auch unter mildereren Reduktionsbedingungen wie mit Zinn-(II)-chlorid war es nicht möglich das gewünschte Produkt zu isolieren.^[81]

Eine weitere Möglichkeit der Darstellung des (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-aminophenyl)-2-imidazolins **34** ist die Umsetzung von 4-Aminobenzaldehyd mit Ammoniak oder Hexamethyldisilazan. Das primäre aromatische Amin muss dafür zuerst vor unerwünschten Reaktionen mit der Aldehydfunktion geschützt werden, denn es kommt sonst ebenfalls zu einer Iminbildung und das freie Amin ist nicht mehr zugänglich. Es gibt eine Vielzahl von möglichen Schutzgruppen für Amine wie beispielsweise die Bildung von Carbamaten mit der *t*-Butoxycarbonylschutzgruppe (Boc) oder der 9-Fluorenylmethylschutzgruppe (Fmoc). Des Weiteren ist die Bildung von Amiden, Imiden und Benzylaminen als Schutzgruppen möglich. Die gebildeten Schutzgruppen sind im Einzelnen unterschiedlich stabil unter bestimmten Reaktionsbedingungen.^[82] Die Amidschutzgruppe des käuflich zu erwerbenden 4-Acetamidobenzaldehyds stellt die einfachste und günstigste Methode zum Schutz der Aminfunktion dar. Das Acetamid ist erst unter einem langen Einfluss von starken Basen oder Säuren spaltbar. Der 4-Acetamidobenzaldehyd kann wie in Kap. 2.1.3.3 beschrieben, erfolgreich zum (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-acetamidophenyl)-2-imidazolin **24** umgesetzt werden.

Die Spaltung der Acetamidgruppe erfolgt unter milden Reaktionsbedingungen und durch die Verwendung von Bortribromid (Abb. 26).^[83] Dafür wird das (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-acetamidophenyl)-2-imidazolin **24** in absolutem Dichlormethan gelöst und vor der Zugabe von Bortribromid auf -70 °C gekühlt. Nach einer halben Stunde wird das Gemisch auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere drei Stunden gerührt. Das überschüssige Bortribromid kann mit Methanol hydrolysiert werden. Zum Erhalt der freien Base wird das Reaktionsgemisch mit einer wässrigen Natriumhydroxidlösung alkalisiert und mit Dichlormethan extrahiert.

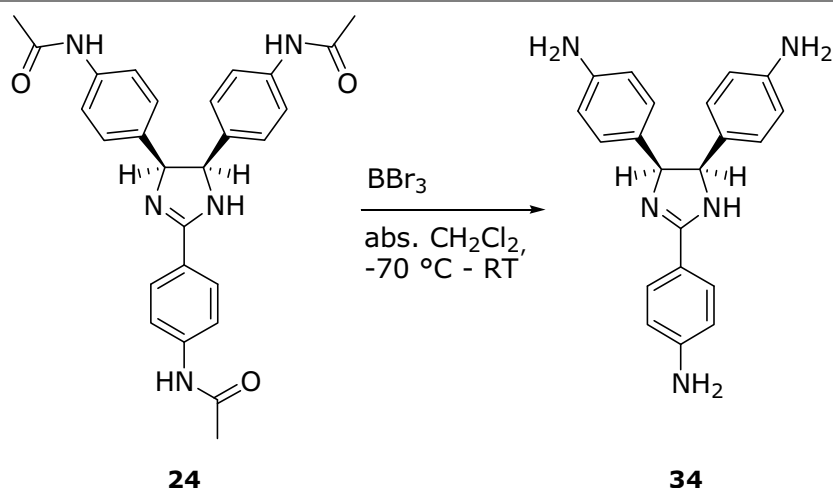


Abb. 26: Synthese des $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Tris(4-aminophenyl)-2-imidazolins **34**

2.1.5 Synthese der $(4R,5R)/(4S,5S)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline aus den $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen

Die Darstellung der $(4R,5R)/(4S,5S)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**35**, **36**) kann aus den $(4R,5S)/(4S,5R)$ -konfigurierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen (**17**, **18**) erfolgen.^[65] Die Umwandlung kann sowohl mit einer starken Base als auch durch Temperaturen über 120 °C durchgeführt werden.^[56, 84, 85] Die Stereoisomerisierung der Verbindungen **17** und **18** wurde in der Synthesemikrowelle bei 140 °C mit Kalium-*tert*-Butanolat in *tert*-Butanol durchgeführt (Abb. 27). Das Prinzip und die Vorteile der Verwendung einer Synthesemikrowelle sind bereits in Kap. 2.1.2.2 beschrieben worden.

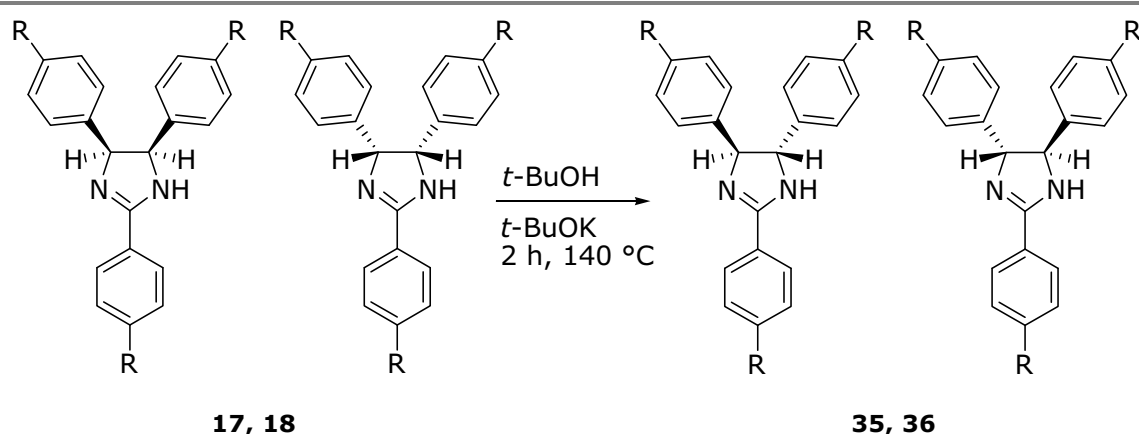


Abb. 27: Synthese der $(4R,5R)/(4S,5S)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**35**, **36**) aus den $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen (**17**, **18**) mit Hilfe der Synthesemikrowelle (R siehe Tab. 12)

Bei einer Reaktionszeit von zwei Stunden in der Synthesemikrowelle konnten die in Tab. 12 aufgeführten $(4R,5R)/(4S,5S)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**35**, **36**) quantitativ erhalten werden.

Tab. 12: $(4R,5R)/(4S,5S)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**35**, **36**) synthetisiert aus den jeweiligen $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen (**17**, **18**)

R	$(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazolin	$(4R,5R)/(4S,5S)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazolin
CH ₃	17	35
CH ₂ CH ₃	18	36

Die $(4R,5R)/(4S,5S)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**35**, **36**) unterscheiden sich im ¹H-NMR-Spektrum deutlich von den $(4R,5S)/(4S,5R)$ -konfigurierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen (**17**, **18**) (Kap. 2.2.1) aufgrund der chemischen Verschiebung der Protonen in Position 4 und 5 des Imidazolinringes. Des Weiteren können die $(4R,5R)/(4S,5S)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**35**, **36**) über ihre auffällig höheren Schmelzpunkte gegenüber den $(4R,5S)/(4S,5R)$ -konfigurierten Stereoisomeren identifiziert werden (Tab. 13).

Tab. 13: Schmelzpunkte der $(4R,5S)/(4S,5R)$ und $(4R,5R)/(4S,5S)$ -konfigurierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**17**, **18**, **35**, **36**)

Verbindung	Konfiguration	Schmelzpunkt [°C]
17	$(4R,5S)/(4S,5R)$	122
18	$(4R,5S)/(4S,5R)$	97
35	$(4R,5R)/(4S,5S)$	186
36	$(4R,5R)/(4S,5S)$	181

2.1.6 Synthese der *N*-Alkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoline und *N,N'*-Dialkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoliniumiodide

Die *N*-Alkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoline (**37-51**) und *N,N'*-Dialkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoliniumiodide (**52-66**) lassen sich durch Alkylierung deprotonierter 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline darstellen. Je nach gewählten Reaktionsbedingungen und verwendeter Base lassen sich gezielt entweder *N*-alkylierte oder *N,N'*-dialkylierte 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline herstellen.

2.1.6.1 Synthese der *N*-Alkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoline

Bei der *N*-Alkylierung ist es von Vorteil, dass das 2-Imidazolin schwach saure Eigenschaften besitzt und daher gut durch starke Basen wie beispielsweise Natriumhydrid deprotoniert werden kann (Abb. 28). Das mesomeriestabilisierte

Imidazolinid trägt eine negative Ladung, die über beide Stickstoffatome delokalisiert ist.

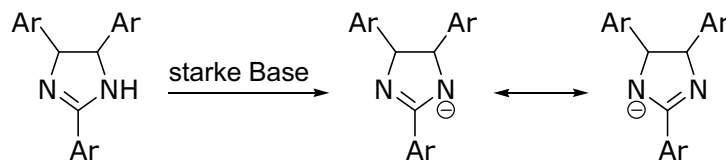


Abb. 28: Bildung und Stabilisierung des Imidazolinids

Das gebildete Imidazolinid reagiert als Nukleophil mit dem positivierten Kohlenstoffatom des Alkyljodid unter Austritt des Iodid-Ions zum entsprechenden *N*-Alkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazolin (Abb. 29). Zum Erhalt von ausschließlich monoalkylierten 2,4,5-Triaryl-2-Imidazolinen findet die Zugabe des Alkyljodids bei 0 °C und anschließender langsamer Erwärmung des Reaktionsgemisches auf Raumtemperatur statt. Aufgrund der gewählten Reaktionsbedingungen wird eine Dialkylierung verhindert und ein aufwendiges Trennen des Reaktionsgemisches kann umgangen werden.^[86] Die Reaktion folgt dem Mechanismus einer bimolekularen nukleophilen Substitutionsreaktion (S_N2 -Reaktion). Dementsprechend sind beide Reaktionspartner am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beteiligt. Der S_N2 -Mechanismus wird durch die Verwendung eines polar aprotischen Lösungsmittels wie dem absoluten Tetrahydrofuran gefördert.^[87] Nach erfolgter Reaktion wird das gewünschte Produkt säulenchromatographisch aufgereinigt und als Hydroiodid isoliert.

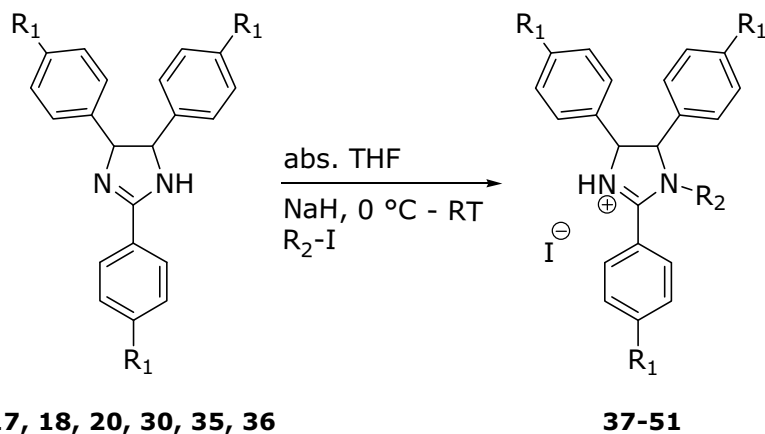


Abb. 29: Synthese der *N*-Alkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoline (**37-51**),
(R₁ und R₂ siehe Tab. 14)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Alkylierung Methyl-, Ethyl- und Propyljodid verwendet. Die Reaktionsausbeute war im Allgemeinen bei der Alkylierung mit Methyljodid am größten, denn mit zunehmender Länge der Kohlenstoffkette des Alkyljodids ist mit einer größer werdenden sterischen Hinderung bei der Substitutionsreaktion zu rechnen.

In Tab. 14 sind die synthetisierten *N*-Alkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoline aufgeführt. Anhand der Ausbeute der (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)- und (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-konfigurierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich eines besseren Syntheseverlaufs festgestellt werden.

Tab. 14: *N*-Alkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoline (**37-51**) synthetisiert aus den jeweiligen 2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen (**17, 18, 20, 30, 35, 36**); Angabe der Syntheseausbeute in % in Klammern

R₁	R₂	Konfiguration	2,4,5-Triaryl-2-imidazolin	<i>N</i>-Alkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazolin
CH ₃	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	17	37 (31 %)
CH ₃	CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	17	38 (29 %)
CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	17	39 (21 %)
CH ₂ CH ₃	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	18	40 (34 %)
CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	18	41 (27 %)
CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	18	42 (23 %)
Cl	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	20	43 (15 %)
Cl	CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	20	44 (17 %)
NO ₂	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	30	45 (11 %)
CH ₃	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	35	46 (18 %)
CH ₃	CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	35	47 (21 %)
CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	35	48 (17 %)
CH ₂ CH ₃	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	36	49 (26 %)
CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	36	50 (23 %)
CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	36	51 (15 %)

2.1.6.2 Synthese der *N,N'*-Dialkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoliniumiodide

Die Herstellung der *N,N'*-Dialkyl-2,4,5-Triaryl-2-imidazoliniumiodide (**52-66**) erfolgt am einfachsten mit Hilfe der Synthesemikrowelle. Zur Deprotonierung der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline zum Imidazolinid wird für die Dialkylierung ein frei vorliegendes Carbonat-Ion als starke Base verwendet. Diese Base ist zur Durchführung in der Synthesemikrowelle ungefährlicher und leichter zu handhaben als Natriumhydrid. Für die Bildung des freien Carbonat-Ions wird [18]-Krone-6 mit Kaliumcarbonat umgesetzt. Der zyklische Ether [18]-Krone-6 besteht aus einem gesättigten, achtzehngliedrigen Ring, der aus sechs aufeinanderfolgenden CH₂-O-CH₂-Einheiten aufgebaut ist, und kann als Komplexbildner für Kaliumcarbonat eingesetzt werden. ^[87]

Durch die Aufnahme des Kalium-Ions in den Hohlraum des Kronenethers bildet sich eine Komplexverbindung, die sowohl die Löslichkeit des anorganischen Salzes in Dichlormethan erhöht als auch die Basizität des freien Anions

(Abb. 30). Das frei vorliegende Carbonat-Ion kann schließlich das 2-Imidazolin deprotonieren.

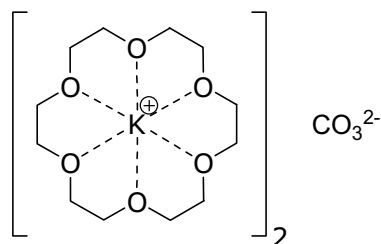


Abb. 30: Komplexverbindung aus [18]-Krone-6 und Kaliumcarbonat

Anschließend reagiert das entstandene Nukleophil analog der in Kap. 2.1.6.1 beschriebenen S_N2 -Reaktion mit dem Alkyljodid erst zum *N*-Alkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazolin und im weiteren Verlauf mit einem erneuten Alkyljodid zum *N,N'*-Di-alkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoliniumiodid (Abb. 31).

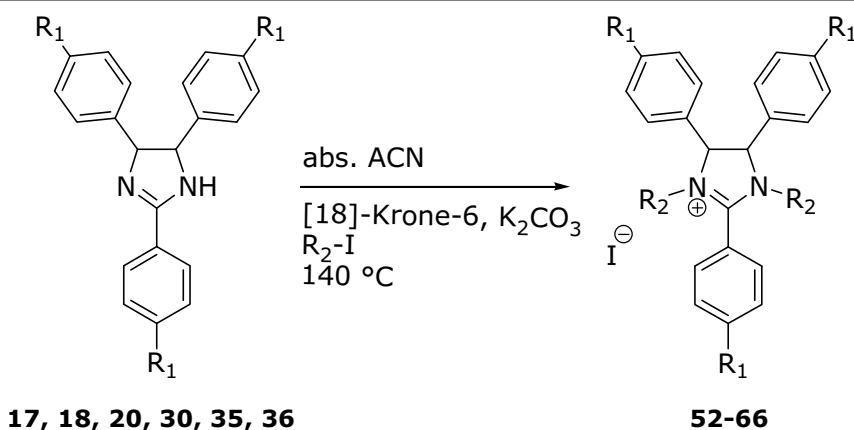


Abb. 31: Synthese der *N,N'*-Dialkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoliniumiodide (**52-66**), (R_1 und R_2 siehe Tab. 15)

Mit Hilfe der Synthesemikrowelle konnte eine quantitative Herstellung der *N,N'*-Dialkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoliniumiodide in Acetonitril bei 140 °C innerhalb von drei Stunden ermöglicht werden. Im Vergleich dazu wurde nach der konventionellen Methode beim Kochen unter Rückfluss für das (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-*N,N'*-Diethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliniumiodids **56** zum Beispiel nach 48 h immer noch mono- und nicht alkyliertes 2-Imidazolin isoliert. Eine aufwendige Trennung des Reaktionsgemisches kann dementsprechend durch Verwendung einer Synthesemikrowelle umgangen werden.

Gegenüber der Monoalkylierung wurden bei der Synthese der *N,N'*-Dialkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoliniumiodide deutlich höhere Ausbeuten erzielt. Ein Grund dafür könnte sein, dass die *N*-Alkyl-2-imidazoline bei höheren Temperaturen besser mit Alkyljodiden reagieren als die *N*-unsubstituierten 2-Imidazoline. ^[86]

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten *N,N'*-Dialkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoliumiodide sind in Tab. 15 aufgeführt. Die entstandenen dialkylierten Verbindungen liegen als Kationen vor, das Gegenion bildet synthesebedingt ein Iodid-Ion.

Tab. 15: *N,N'*-Dialkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoliumiodide (**52-66**) synthetisiert aus den jeweiligen 2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen (**17, 18, 20, 30, 35, 36**)

R₁	R₂	Konfiguration	2,4,5-Triaryl- 2-imidazolin	<i>N,N'</i>-Dialkyl- 2,4,5-triaryl- 2-imidazolium- iodid
CH ₃	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	17	52
CH ₃	CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	17	53
CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	17	54
CH ₂ CH ₃	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	18	55
CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	18	56
CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	18	57
Cl	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	20	58
Cl	CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	20	59
NO ₂	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	30	60
CH ₃	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	35	61
CH ₃	CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	35	62
CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	35	63
CH ₂ CH ₃	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	36	64
CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	36	65
CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	36	66

2.2 Strukturuntersuchungen der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline

Zur Strukturaufklärung der synthetisierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline wurden spektroskopische Methoden wie die Infrarot- und die Protonenresonanzspektroskopie verwendet. Darüber hinaus wurden zur weiteren Strukturuntersuchung die Elementaranalyse und Massenspektrometrie eingesetzt. Die analytischen Daten der einzelnen Verbindungen sind im experimentellen Teil (Kap. 3.1.3) dieser Arbeit aufgeführt.

2.2.1 Protonenresonanzspektroskopie

Im Folgenden werden die ^1H -NMR-Spektren ausgewählter 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline dargestellt und näher erläutert. Das Beispiel eines charakteristischen ^1H -NMR-Spektrums eines $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazolins zeigt die Abb. 32 (Verbindung **17**).

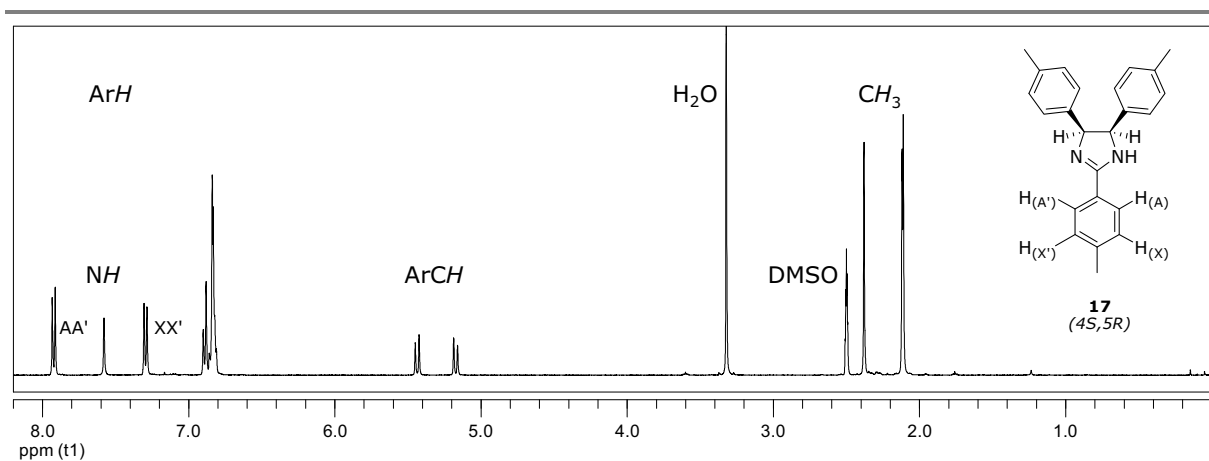


Abb. 32: ^1H -NMR-Spektrum des $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolins **17** in $[\text{D}_6]$ -DMSO

Wie zu erwarten befinden sich im Bereich von 6.5–8.0 ppm die Signale der aromatischen Protonen. Die Signallagen der Protonen der Aromaten in den Positionen 4 und 5 des 2-Imidazolinringes unterscheiden sich nur geringfügig voneinander und liegen daher sehr eng beieinander. Aufgrund der unterschiedlich großen Einflüsse der *para*-substituierten Reste weisen die Protonen des dritten Aromaten zum einen eine Tieffeldverschiebung und zum anderen die typische Aufspaltung einer AA'XX'-Kopplung auf ($^{\text{A}^{\text{X}}}\text{J} = ^{\text{A}'^{\text{X}'}\text{J}} = 8 \text{ Hz}$). Das Signal bei 7.59 ppm ist dem Proton am Stickstoff zuzuordnen, welches durch D_2O -Austausch entfällt.

In den ^1H -NMR-Spektren der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit identisch substituierten Aromaten in Position 4 und 5 zeigen sich die beiden Methinprotonen (ArCH) in $[\text{D}_6]$ -DMSO jeweils einzeln als Dubletts aufgespalten (Abb. 32). Ein

^1H -NMR-Spektrum mit dieser Art von Aufspaltung kann nur erhalten werden, wenn der 2-Imidazolinring unsymmetrisch aufgebaut ist. Das NH -Proton der freien Base scheint demnach auf ein Stickstoffatom festgelegt zu sein und nicht zwischen den beiden Stickstoffatomen zu wandern. Erst bei höheren Temperaturen ist eine Tautomerie möglich und es erfolgt ein schnellerer Austausch des NH -Protons. Dies verdeutlicht sich in den ^1H -NMR-Spektren in Abb. 33 durch die Vereinigung der Dublett-Signale der Methinprotonen zu einem Singulett durch stufenweise Erhöhung der Temperatur.

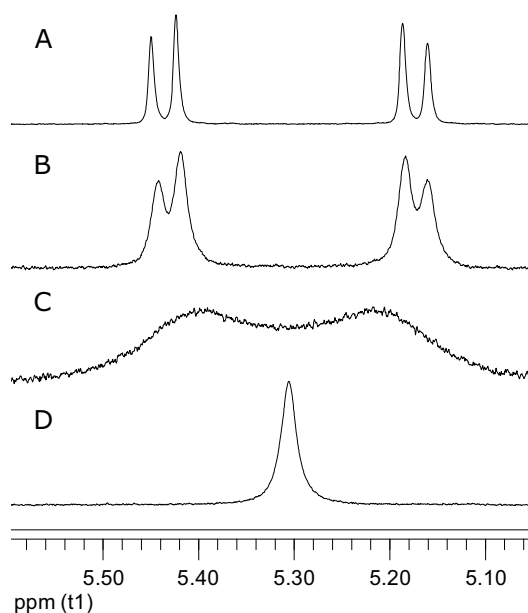


Abb. 33: ^1H -NMR-Spektren der Methinprotonen des $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Tris-(4-methylphenyl)-2-imidazolins **17** bei unterschiedlichen Temperaturen in $[\text{D}_6]$ -DMSO; Raumtemperatur (A); 90 °C (B); 120 °C (C); 150 °C (D)

Wenn die ^1H -NMR-Probe nach dem Erhitzen erneut bei Raumtemperatur vermessen wird, zeigen sich die Methinprotonen weiterhin chemisch und magnetisch äquivalent in Form eines Singulett-Signals. Des Weiteren wird das NH -Proton der freien Base im Spektrum aufgrund der zu schnellen Austauschprozesse nicht mehr detektiert.

Die Auswirkung auf die Resonanz der Methinprotonen im ^1H -NMR-Spektrum bei Verwendung von unterschiedlichen Lösungsmitteln ist in Abb. 34 dargestellt. Die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Methinprotonen und dem Medium führen zum einen zu unterschiedlichen chemischen Verschiebungen der Methin-Resonanzsignale und zum anderen zu unterschiedlich schnellen Austauschprozessen des NH -Protons. Das Aufspaltungsmuster in $[\text{D}_4]$ -Methanol zeigt gegenüber dem $[\text{D}_6]$ -DMSO-Spektrum ein weiter im Tieffeld befindliches Singulett (δ 5.39 ppm). Eine Linienverbreiterung kann in $[\text{D}_1]$ -Chloroform und $[\text{D}_6]$ -Aceton für die Resonanzen festgestellt werden. Die Wahl des richtigen deuterierten Lösungsmittels ist demzufolge entscheidend für die Lage und Aufspaltung der Protonensignale.

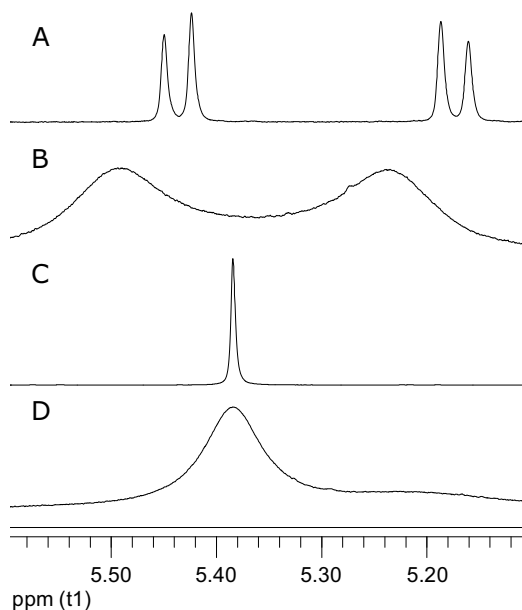


Abb. 34: ^1H -NMR-Spektren der Methinprotonen von $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Tris-(4-methylphenyl)-2-imidazolin **17** bei Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel; $[\text{D}_6]$ -DMSO (A); $[\text{D}_6]$ -Aceton (B); $[\text{D}_4]$ -Methanol (C); $[\text{D}_1]$ -Chloroform (D)

Ein ähnliches Bild im ^1H -NMR-Spektrum ergibt sich auch für die analog aufgebauten $(4R,5R)/(4S,5S)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline. Auffällig ist, dass die Resonanzen der aromatischen Protonen der Aromaten in der Position 4 und 5 aller $(4R,5R)/(4S,5S)$ -konfigurierten Verbindungen im Gegensatz zu den aromatischen Protonen der $(4R,5S)/(4S,5R)$ -konfigurierten Verbindungen ins Tieffeld verschoben sind (z. B. **17**: δ 6.80-6.91 ppm; **35**: δ 7.07-7.20 ppm). Allerdings weisen die Signale der Methinprotonen einen deutlichen Hochfeldshift auf (z. B. **17**: δ 5.17 ppm, 5.44 ppm; **35**: δ 4.55 ppm, 4.77 ppm) (Abb. 35).

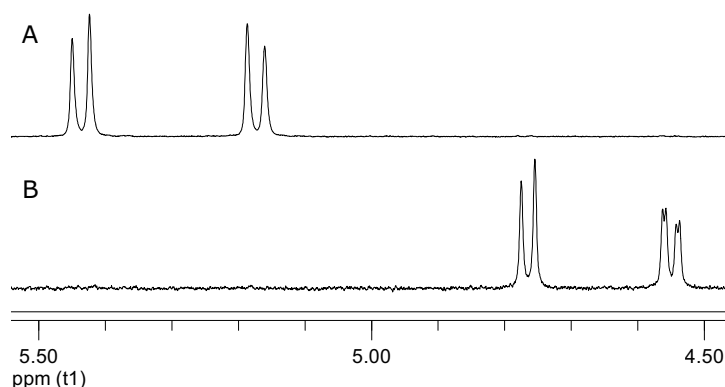


Abb. 35: Lage der Resonanzen der Methinprotonen im ^1H -NMR-Spektrum des $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolins **17** (A) und des $(4R,5R)/(4S,5S)$ -2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolins **35** (B) in $[\text{D}_6]$ -DMSO

Eine Begründung dafür lässt sich im räumlichen Aufbau der Verbindungen finden. Der fast planare 2-Imidazolinring mit den partiell sp^2 -hybridisierten Stickstoffen

bildet eine Raumebene, bei der die Aromaten in der Position 4 und 5 der $(4R,5S)/(4S,5R)$ -konfigurierten Verbindungen sich auf der gleichen Seite befinden. Dadurch werden die aromatischen Protonen des einen Aromaten durch den Ringstrom des anderen Aromaten abgeschirmt und ins Hochfeld verschoben. Andererseits befinden sich bei den $(4R,5R)/(4S,5S)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazolin jeweils ein Methinproton und ein Aromat auf einer Seite der 2-Imidazolinringebene. Die Methinprotonen liegen im Ringstrom der Aromaten. Sie werden daher abgeschirmt und das Signal tritt bei einem höheren Feld auf. ^[52]

Die Karplus-Beziehung kann zur Abschätzung der Diederwinkel anhand der vicinalen Kopplungskonstanten verwendet werden. Der Zusammenhang gilt formal nur für offenkettige Verbindungen und 6-Ringe, wird aber dennoch zur näherungsweisen Bestimmung des Diederwinkels der 2-Imidazoline im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt. ^[88] Beispielsweise liegt bei der $(4R,5S)/(4S,5R)$ -konfigurierten Verbindung **17** eine vicinale Kopplungskonstante der Methinprotonen von $^3J = 10.4$ Hz vor. Daraus ergibt sich ein Diederwinkelbereich von 0° bis 30° . ^[89] Bei dem analog aufgebauten $(4R,5R)/(4S,5S)$ -2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin **35** beträgt die vicinale Kopplung $J = 8.2$ Hz, was einem Diederwinkel der Methinprotonen von ca. 160° entspricht. ^[90] Des Weiteren tritt bei dieser Verbindung **35** eine Kopplung ($J = 2.0$ Hz) zwischen dem einen Methinproton und dem NH-Proton auf (Abb. 36). Diese Kopplung entfällt bei der Zugabe von deuteriertem Wasser.

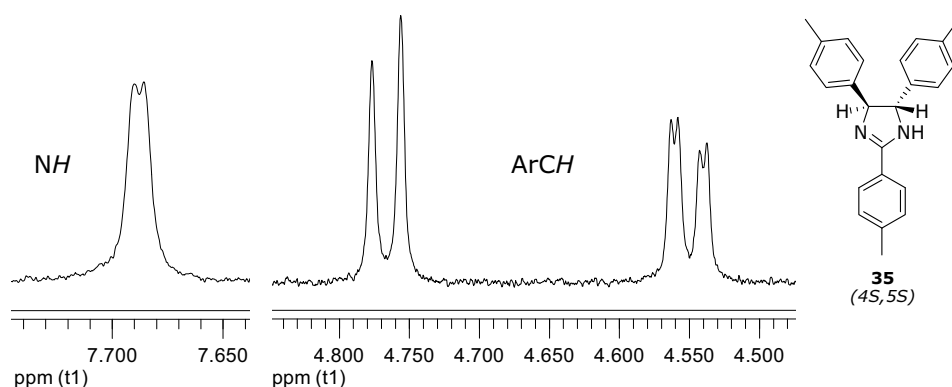


Abb. 36: Kopplung der Methinprotonen und des Protons am Stickstoff von $(4R,5R)/(4S,5S)$ -2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin **35** in $[D_6]$ -DMSO

Durch die *N*-Alkylierung und *N,N'*-Dialkylierung des 2-Imidazolins werden zum Teil aufgrund der Synthesebedingungen jeweils ionische Verbindungen erhalten (Abb. 37). Eine Unterscheidung der 1H -NMR-Spektren ist unter anderem anhand der Resonanz des NH^+ -Protons der monoalkylierten Verbindungen möglich, die als Hydroiodide vorliegen (Abb. 38). Des Weiteren ist das Signal dieses NH^+ -Protons gegenüber der Signallage des NH-Proton der nicht alkylierten Verbindung weiter ins Tieffeld verschoben (z. B. **17**: δ 7.59 ppm; **38**: δ 11.02 ppm).

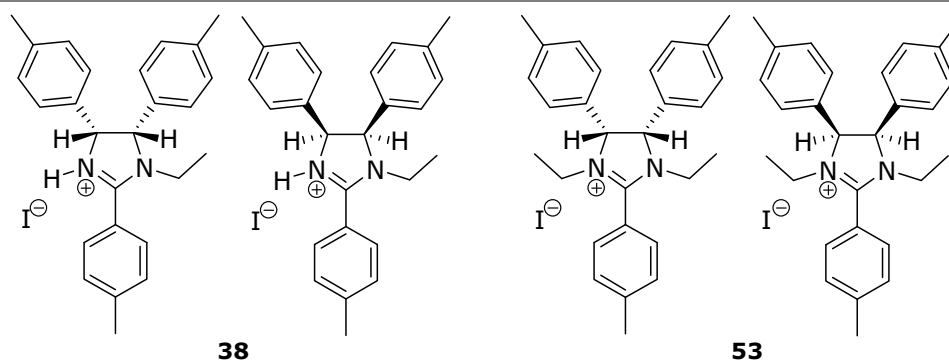


Abb. 37: $(4R,5S)/(4S,5R)$ -*N*-Ethyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoliniumhydroiodid **38** (links), $(4R,5S)/(4S,5R)$ -*N,N'*-Diethyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoliniumiodid **53** (rechts)

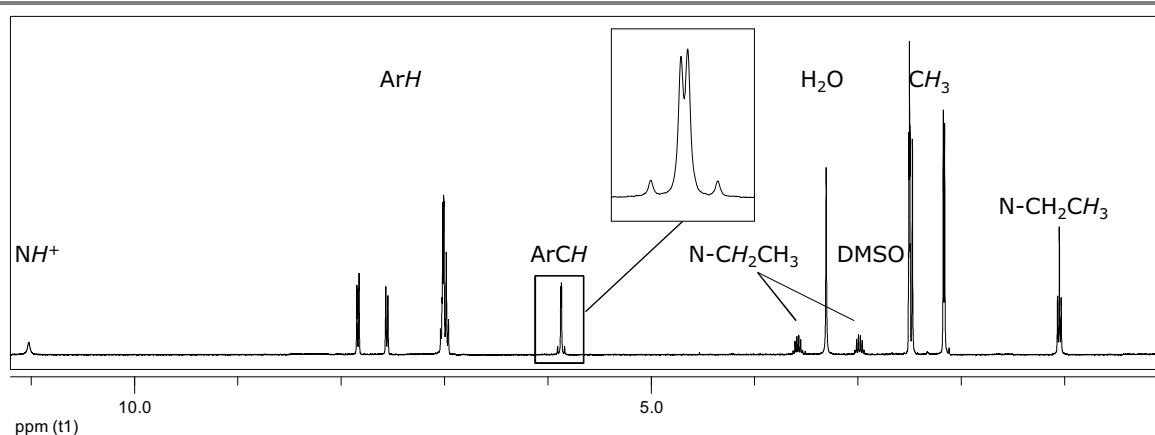


Abb. 38: ^1H -NMR-Spektrum des $(4R,5S)/(4S,5R)$ -*N*-Ethyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoliniumhydroiodid **38**

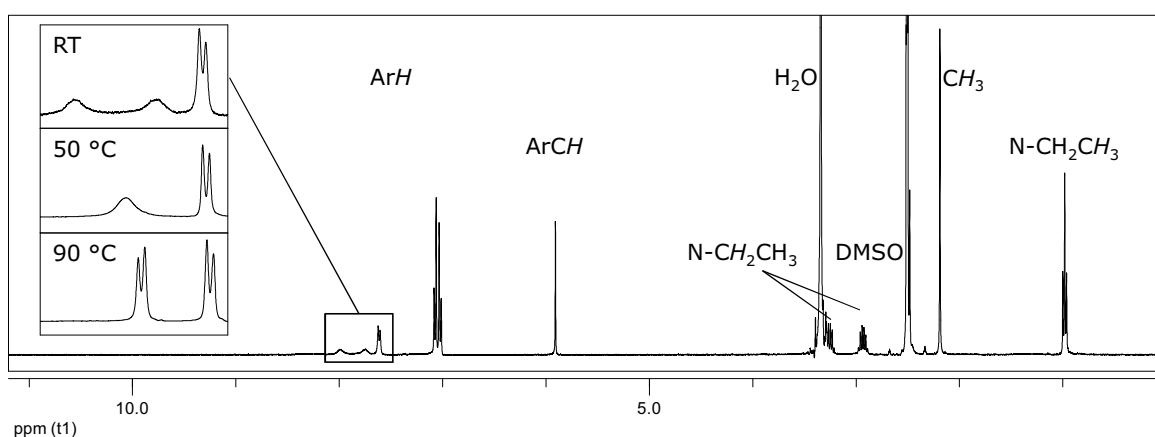


Abb. 39: ^1H -NMR-Spektrum des $(4R,5S)/(4S,5R)$ -*N,N'*-Diethyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoliniumiodid **53**; links: ^1H -Hochtemperatur-NMR-Spektren bei Raumtemperatur, 50 °C und 90 °C

Weiterhin unterscheiden sich die ^1H -NMR-Spektren in der Aufspaltung der Methinprotonen. Bei den monoalkylierten Verbindungen zeigen sich die Methinprotonen ebenfalls chemisch und magnetisch nicht äquivalent, im Gegensatz dazu ist bei den ^1H -NMR-Spektren der dialkylierten Verbindungen ein Singulett

zu finden (z. B. **38**: δ 5.84-5.91 ppm; **53**: δ 5.91 ppm) (Abb. 39). Bei einer *N,N'*-Dialkylierung führt die daraus resultierende permanente positive Ladung zu einer Entschirmung der aromatischen Protonen und damit gegenüber der einfach alkylierten Verbindung zu einer Verschiebung ins Tieffeld (z. B. **38**: δ 6.93-7.07 ppm, 7.55 ppm, 7.83 ppm; **53**: δ 6.98-7.12 ppm, 7.61 ppm, 7.75 ppm, 7.98 ppm).

Aufgrund der zweifachen Alkylierung ist eine deutliche Rotationseinschränkung des in Position 2 befindlichen Aromaten im ^1H -NMR-Spektrum erkennbar, da die *ortho*-ständigen Protonen sich einzeln als ein sehr breites Signal zeigen. Anhand von ^1H -Hochtemperatur-NMR-Messungen kann belegt werden, dass die Rotationseinschränkung des Aromaten in Position 2 mit zunehmender Temperatur aufgehoben werden kann. Bei einer Temperatur von 90 °C ist im ^1H -NMR-Spektrum das zu erwartende Aufspaltungsmuster eines AA'BB'-Spinsystems zu finden (Abb. 39).

Nach der durchgeführten Ethylierung bzw. Propylierung an den Stickstoffatomen stellen sich die Protonen der direkt am N1 bzw. N2 lokalisierten Methylengruppen als diastereotopie Wasserstoffatome dar (Abb. 40).

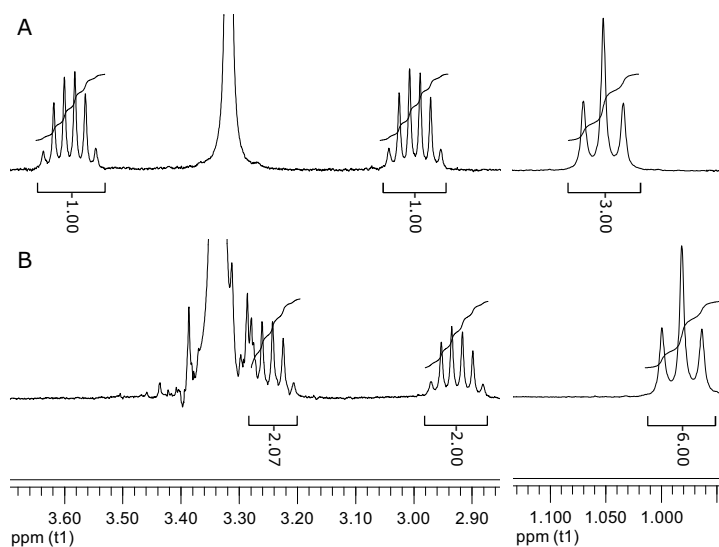


Abb. 40: ^1H -NMR-Spektren der Signale der Ethylgruppen des (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-*N*-Ethyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoliniumhydroiodid **38** (A) und des (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-*N,N'*-Diethyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoliniumiodids **53** (B)

Die Signale der Methylenprotonen erscheinen sowohl bei der monoalkylierten Verbindung als auch bei der dialkylierten Verbindung im ^1H -NMR-Spektrum in Form von jeweils zwei Pseudosextetten mit einer Intensität von entweder jeweils einem bzw. zwei Protonen. Im Allgemeinen befinden sich die Resonanzen der Alkylgruppen der einfach alkylierten Verbindungen weiter im Tieffeld als die Signale der dialkylierten Verbindungen (z. B. **38**: δ 1.04 ppm, 2.97 ppm, 3.57 ppm; **53**: δ 0.98 ppm, 2.93 ppm, 3.26 ppm).

2.2.2 Infrarotspektroskopie

Die folgenden IR-Spektren werden nicht als Absorptionsspektren, sondern als Transmissionsspektren dargestellt. Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte mit einem Einstrahl-Fourier-Transformations-Infrarot-Spektrometer, speziell mit Hilfe der Abgeschwächten Totalreflexion (ATR). Dabei wurde als optisch dichteres Medium ein Diamant verwendet. Es ergibt sich daher ein Durchlässigkeitsbereich mit einer Wellenzahlskala von $\tilde{\nu} = 4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ in den IR-Spektren. ^[89, 91]

Beim Betrachten des allgemeinen strukturellen Aufbaus der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (Abb. 41) sind im IR-Spektrum vor allem die charakteristischen Schwingungsbanden der Aromaten insbesondere der C-C- und C-H-Schwingungen zu erwarten. Des Weiteren handelt es sich um eine stickstoffhaltige Verbindung, demzufolge sind charakteristische Schwingungsbanden der Amin- und Iminstruktur zu finden.

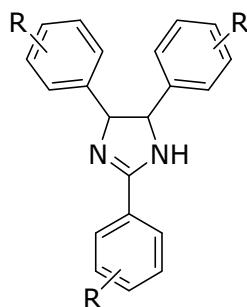


Abb. 41: Allgemeine Grundstruktur der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline

Das in Abb. 42 exemplarisch dargestellte IR-Spektrum ist charakteristisch für ein 2,4,5-Triaryl-2-imidazolin mit einfach substituierten Aromaten. Es handelt sich dabei um die Verbindung **17**, die an jedem aromatischen Ring in der Position 4 eine Methylgruppe trägt.

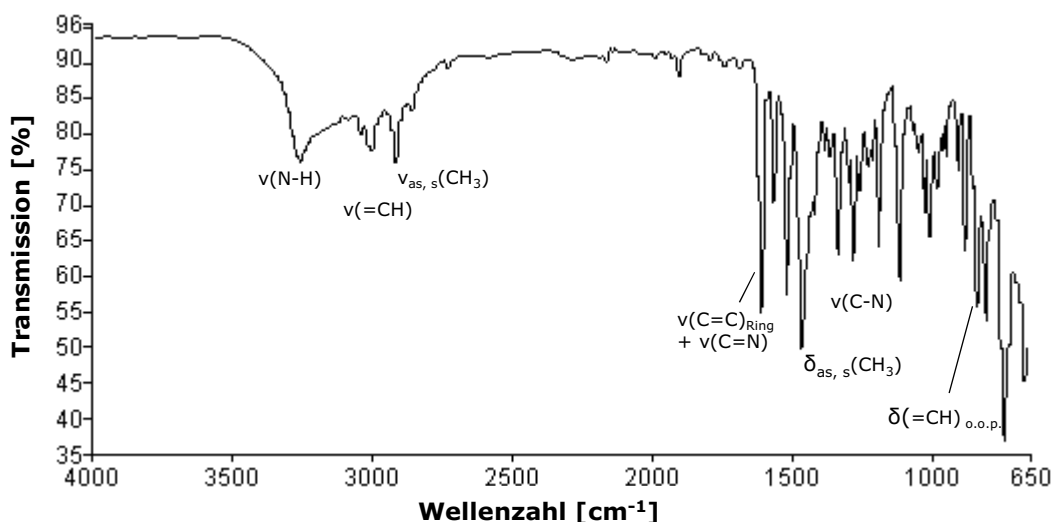


Abb. 42: IR-Spektrum des *(4R,5S)/(4S,5R)*-2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolins **17**

Im IR-Spektrum sind zwischen 3100 cm^{-1} und 3000 cm^{-1} die typischen C-H-Valenzschwingungen der Aromaten zu finden. Des Weiteren liegen die intensiveren C-C-Streckschwingungen des aromatischen Systems im Bereich von $1600\text{--}1585\text{ cm}^{-1}$ und $1500\text{--}1430\text{ cm}^{-1}$. Das Substitutionsmuster der Aromaten kann an der Lage der C-H-Deformationsschwingungen im Bereich zwischen 900 cm^{-1} und 660 cm^{-1} identifiziert werden. Die C-H-Deformationsbewegungen aus der Ringebene heraus (out of plane; o.o.p.) werden durch die Stellung der Substituenten beeinflusst. Die Bande bei 833 cm^{-1} ist demnach auf eine zweifache Substitution in *para*-Position zurückzuführen.^[89] Für die Bestimmung des Substitutionsgrades und der Stellung der Substituenten gibt außerdem das Gebiet zwischen 2000 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} Auskunft. Es handelt sich dabei um den sogenannten Benzolfinger, der durch Kombinationsschwingungen und $\delta(\text{C-H})_{\text{o.o.p.}}$ -Oberschwingungen verursacht wird.

Die Schwingungsbanden des Methyl-Substituenten sind zum einen durch die symmetrischen und asymmetrischen C-H-Valenzschwingungen bei 2921 cm^{-1} und 2862 cm^{-1} und zum anderen durch die symmetrischen und asymmetrischen CH_3 -Deformationsschwingungen bei 1470 cm^{-1} und 1380 cm^{-1} gekennzeichnet.

Die aromatischen C-C-Schwingungsbanden des Imidazolinringes wird im Bereich von 1600 cm^{-1} durch die C=N-Valenzschwingung überlagert. Hingegen ist die IR-Bande der N-H-Valenzschwingung bei 3270 cm^{-1} durch ihr ausgeprägte Form gut sichtbar. Bei den C-N-Streckschwingungen sollten starke massenabhängige Schwingungsbanden im Bereich von $1220\text{--}1020\text{ cm}^{-1}$ zu finden sein. Erkennbar sind Banden mit einer mittelstarken Absorption, die nicht eindeutig zuordenbar sind, da sich das Absorptionsgebiet mit dem Fingerprint-Bereich überschneidet.

Der Fingerprint-Bereich ist charakteristisch für die Schwingungen des Gesamtmoleküls. In diesem Bereich sind vorzugsweise Gerüstschwingungen zu finden, die wie ein Fingerabdruck zur Identifizierung der Verbindung herangezogen werden können. Dementsprechend unterscheiden sich alle im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline in diesem Bereich. Die Substitution am Aromaten, sowie die Alkylierung der Stickstoffe und die Konfiguration der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline zeigen sowohl im Fingerprint-Bereich als auch im Einzelnen typische Absorptionsbanden im IR-Spektrum.

Im Folgenden werden zur weiteren strukturellen Erläuterung insbesondere der unterschiedlichen funktionellen Gruppen der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline die IR-Spektren ausgewählter Verbindungen dargestellt.

In Abb. 43 stehen sich die IR-Spektren der Verbindungen **17** und **18** im Wellenzahlbereich zwischen 4000 cm^{-1} und 2500 cm^{-1} gegenüber. Die beiden Verbindungen unterscheiden sich strukturell lediglich in der *para*-Position der 2,4,5-Triaryle. Verbindung **18** besitzt gegenüber Verbindung **17** eine 4-Ethylgruppe anstatt einer 4-Methylgruppe (Abb. 41).

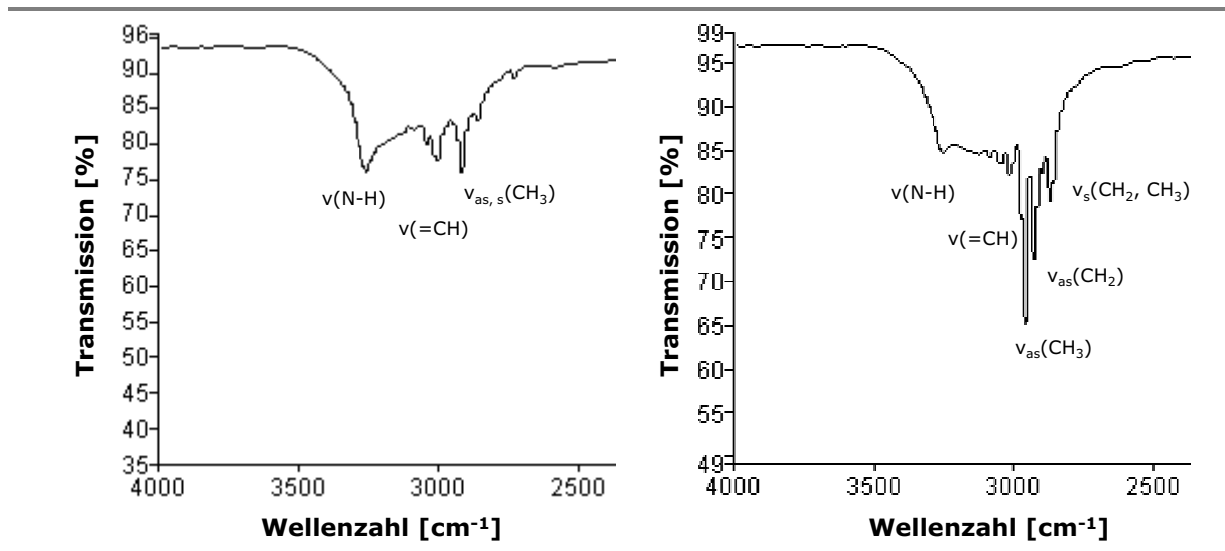


Abb. 43: IR-Spektrum des *(4R,5S)/(4S,5R)*-2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolins **17** (links) und des *(4R,5S)/(4S,5R)*-2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolins **18** (rechts) im Wellenzahlbereich zwischen 4000 cm⁻¹ und 2500 cm⁻¹

Dieser Unterschied ist unter anderem im IR-Spektrum der Verbindung **18** anhand der intensiveren C-H-Valenzschwingungen deutlich erkennbar. Grund dafür ist, dass neben den symmetrischen und asymmetrischen CH₃-Streckschwingungen bei 2870 cm⁻¹ und 2962 cm⁻¹, die symmetrischen und asymmetrischen Streckschwingungen der Methylengruppe bei 2929 cm⁻¹ und 2896 cm⁻¹ hinzukommen.

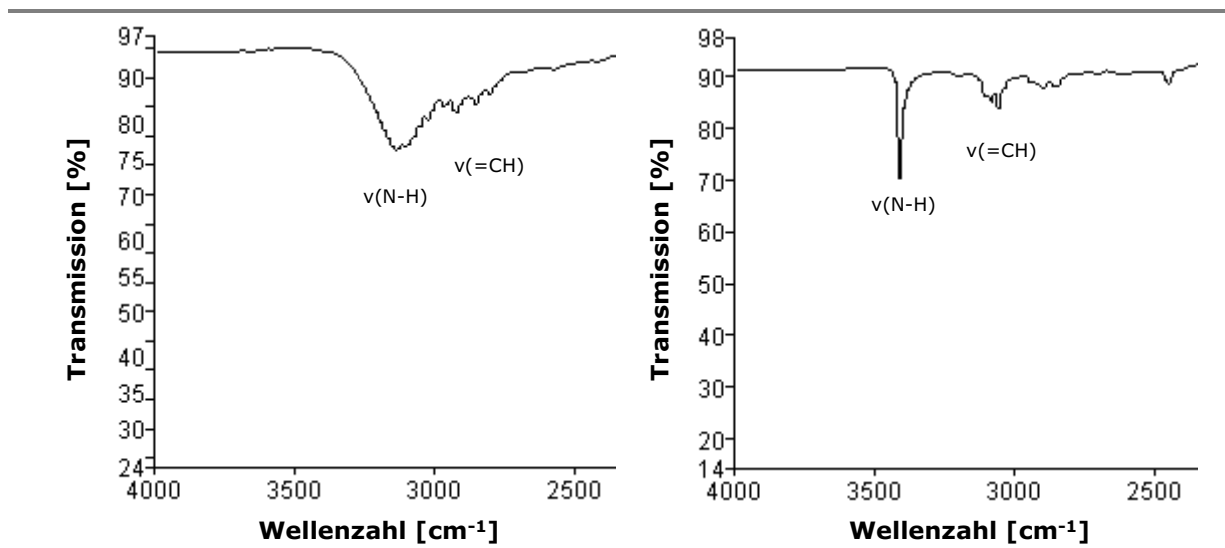


Abb. 44: IR-Spektrum des *(4R,5S)/(4S,5R)*-2,4,5-Tris(4-chlorphenyl)-2-imidazolins **20** (links) und des *(4R,5S)/(4S,5R)*-2,4,5-Tris(4-nitrophenyl)-2-imidazolins **30** (rechts) im Wellenzahlbereich zwischen 4000 cm⁻¹ und 2500 cm⁻¹

Im Vergleich dazu fehlen diese C-H-Valenzschwingungen bei den Verbindungen **20** und **30**, da die Alkylgruppen durch Chloratome bzw. Nitrogruppen ersetzt sind (Abb. 44). Des Weiteren ist auffällig, dass bei dem *(4R,5S)/*

(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-nitrophenyl)-2-imidazolin **30** die N-H-Valenzschwingung bei 3418 cm^{-1} sehr scharf ausgebildet ist. Eine Begründung dafür könnte in dem sehr stark ausgeprägten negativen mesomeren Effekt der Nitrogruppe zu finden sein, da dadurch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen erschwert wird und somit keine breite Absorptionsbande auftritt. Weiterhin ist das IR-Spektrum der Verbindung **30** durch die zwei intensiven Banden der asymmetrischen (1524 cm^{-1}) und symmetrischen (1344 cm^{-1}) NO_2 -Valenzschwingungen gekennzeichnet (Abb. 45).

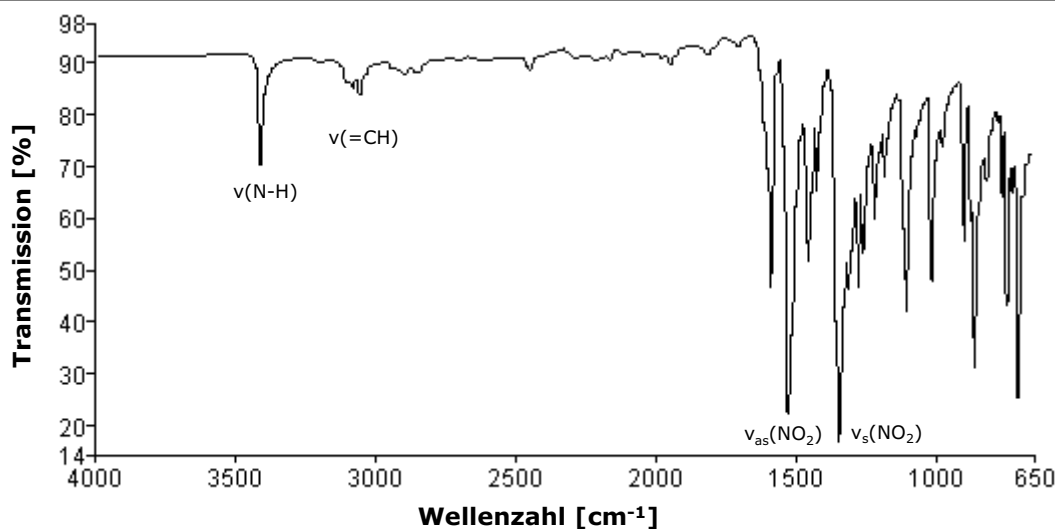


Abb. 45: IR-Spektrum des (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-nitrophenyl)-2-imidazolins **30**

Das IR-Spektrum des (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-chlorphenyl)-2-imidazolins **20** besitzt ebenfalls zwei für den Substituenten charakteristische Schwingungsbanden. Zu finden sind diese intensiven aromatischen C-Cl-Valenzschwingungen zum einen bei 1090 cm^{-1} und zum anderen bei 1013 cm^{-1} (Abb. 46).

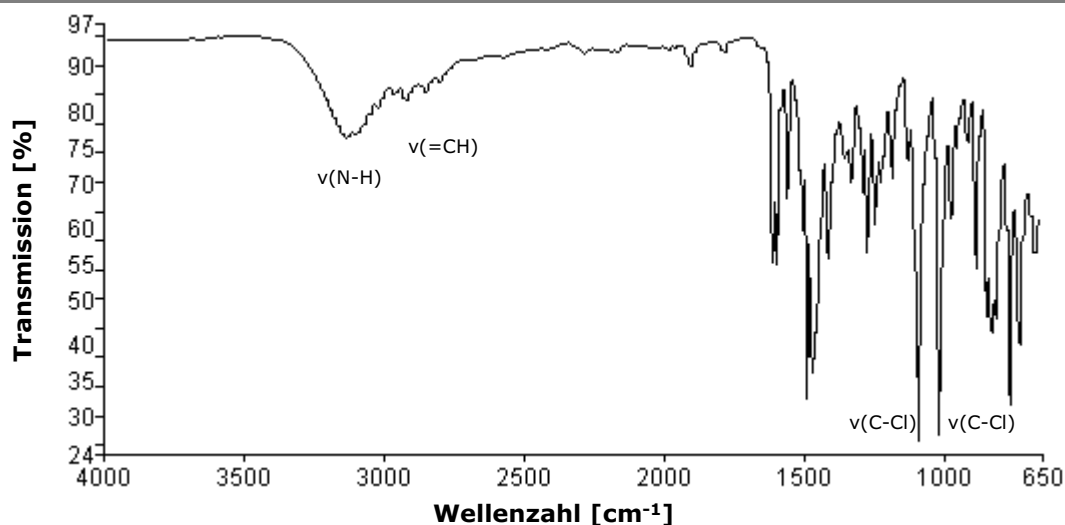


Abb. 46: IR-Spektrum des (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-chlorphenyl)-2-imidazolins **20**

Unproblematisch verläuft die Identifizierung von Verbindungen mit funktionellen Gruppen, wo die Zuordnung meist eindeutig ist, weil nur wenige Gruppen in diesem Gebiet die IR-Strahlung absorbieren. Diese Eindeutigkeit ist bei der Absorption von Dreifachbindungsschwingungen gegeben. Da es sich bei einer Dreifachbindung um eine festere Bindung handelt als bei einer Einfach- oder Doppelbindung, sind die Absorptionsbanden viel weiter zu höheren Wellenzahlen verschoben. Ein Beispiel mit einer Dreifachbindung stellt das *(4R,5S)/(4S,5R)*-2,4,5-Tris(4-cyanophenyl)-2-imidazolin **33** dar. Die Streckerschwingung des aromatischen Nitrils zeigt eine Absorption bei 2227 cm^{-1} und ist demnach sehr charakteristisch für diese Verbindung (Abb. 47).

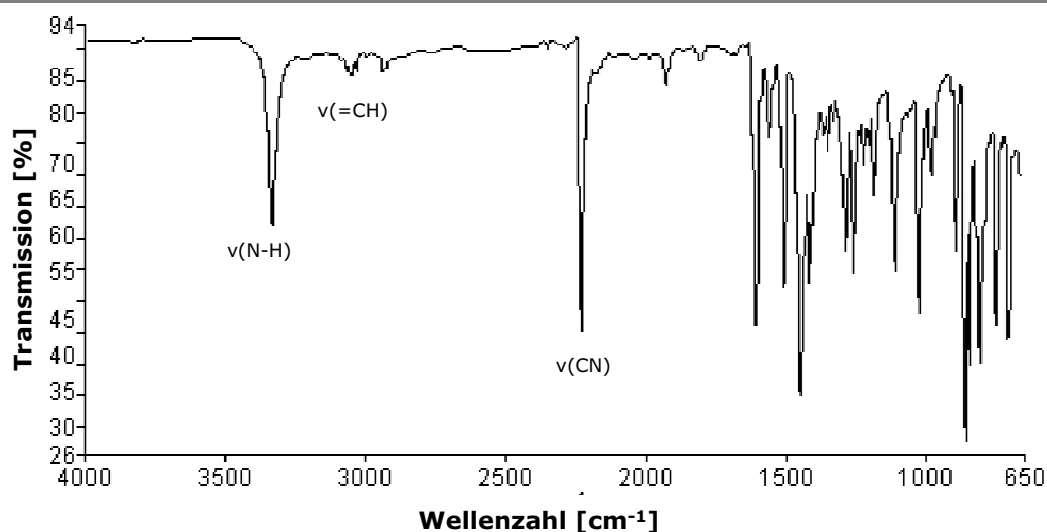


Abb. 47: IR-Spektrum des *(4R,5S)/(4S,5R)*-2,4,5-Tris(4-cyanophenyl)-2-imidazolins **33**

Ebenfalls gut zu interpretierende Schwingungsbanden weisen aromatische Methoxygruppen und Carbonylgruppen auf. Die Verbindung **27** ist exemplarisch für eine Struktur mit diesen funktionellen Gruppen (Abb. 48).

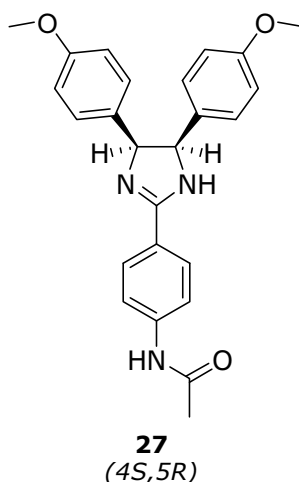


Abb. 48: *(4R,5S)/(4S,5R)*-2-(4-Acetamidophenyl)-4,5-bis(4-methoxyphenyl)-2-imidazolin **27**

Beim Betrachten des IR-Spektrums der Verbindung **27** in Abb. 49 fallen die zwei sehr starken C-O-Absorptionsbanden der Methoxygruppen bei 1240 cm^{-1} und 1034 cm^{-1} auf. Es handelt sich in beiden Fällen um asymmetrische C-O-C-Valenzschwingungen, da sich das Dipolmoment bei den symmetrischen C-O-C-Valenzschwingungen sehr viel weniger stark verändert und sich die Schwingungen daher im Spektrum als eher schwache Banden präsentieren würden. Die Schwingungsbande bei 1240 cm^{-1} ist aufgrund der Mesomeriestabilisierung der aromatischen C-O-Bindung zuzuschreiben. Die Bindung wird durch die Mesomeriestabilisierung gefestigt und ist daher stärker als eine Alkyl-O-Bindung. Demzufolge liegt die $\text{CH}_3\text{-O}$ -Streckschwingung bei 1034 cm^{-1} .

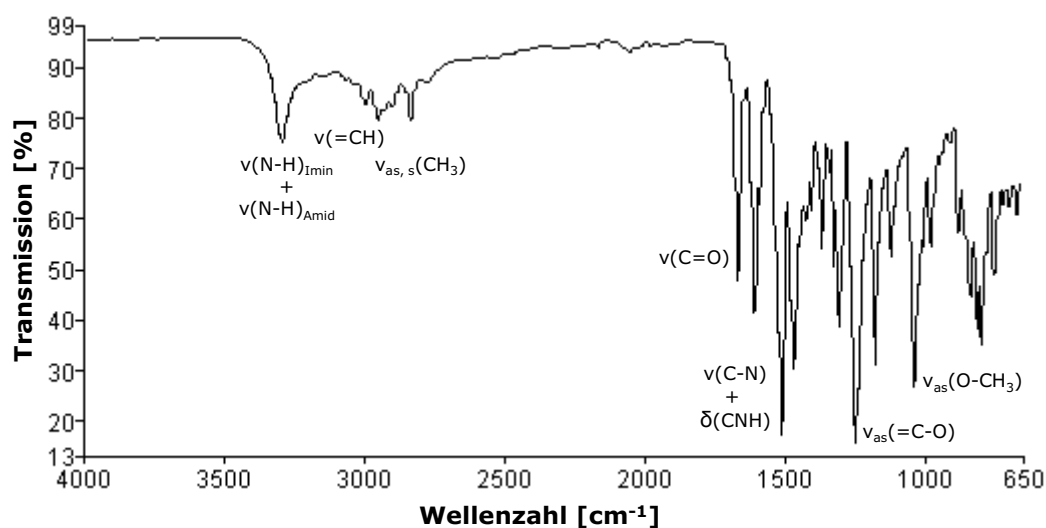


Abb. 49: IR-Spektrum des $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2-(4-Acetamidophenyl)-4,5-bis(4-methoxyphenyl)-2-imidazolins **27**

Für die Amidfunktion der Verbindung **27** gibt es eine Vielzahl von Schwingungsmöglichkeiten, wovon im Folgenden nur die wichtigsten aufgeführt werden. Die intensive C=O-Valenzschwingung zeigt sich bei 1667 cm^{-1} . Des Weiteren ist die starke Absorptionsbande bei 1509 cm^{-1} durch die Wechselwirkung der C-N-Valenzschwingung mit der C-N-H-Deformationsschwingung entstanden. Die Valenzschwingung der N-H-Amidbindung befindet sich bei 3302 cm^{-1} und überlagert die N-H-Bande des Imidazolinringes.

Natürlich wurden auch die Konfigurationsisomere mittels Infrarotspektroskopie untersucht. Als Beispiel für ein $(4R,5S)/(4S,5R)$ -konfiguriertes 2,4,5-Triaryl-2-imidazolin dient die Verbindung **17**. Das dazugehörige Isomer mit der Konfiguration $(4R,5R)/(4S,5S)$ ist die Verbindung **35**. Die chemischen Strukturen der Verbindungen **17** und **35** sind zum besseren Verständnis in Abb. 50 dargestellt. Eine Interpretation der entsprechenden IR-Spektren ist weitaus schwieriger als die Deutung der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (Kap. 2.2.1). Erst beim genauen Vergleich der einzelnen Absorptionsbanden im Fingerprint-Bereich fallen Unterschiede auf, die in Abb. 51 gezeigt werden. Etliche IR-Banden der Gerüstschwingungen sind bei der $(4R,5R)/(4S,5S)$ -konfigurierten Verbindung **35**

stärker ausgeprägt als bei dem $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazolin **17**, wie zum Beispiel die Absorptionsbanden bei 1325 cm^{-1} und 1217 cm^{-1} . Des Weiteren gibt es Unterschiede in der Bandenlage, so ist die Doppelbande der Verbindung **35** im Bereich von 1225 cm^{-1} weiter zu höheren Wellenzahlen verschoben als beim zugehörigen Isomer.

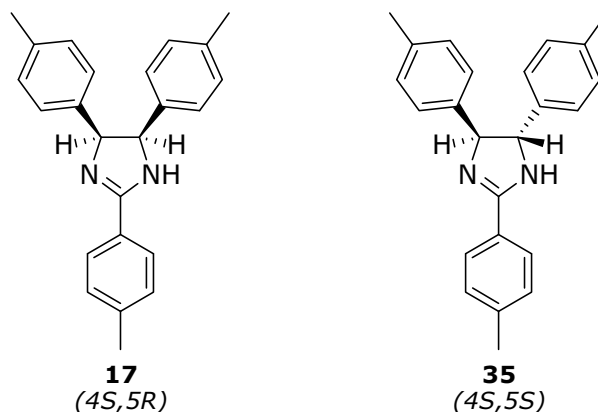


Abb. 50: $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin **17** (links) und $(4R,5R)/(4S,5S)$ -2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin **35** (rechts)

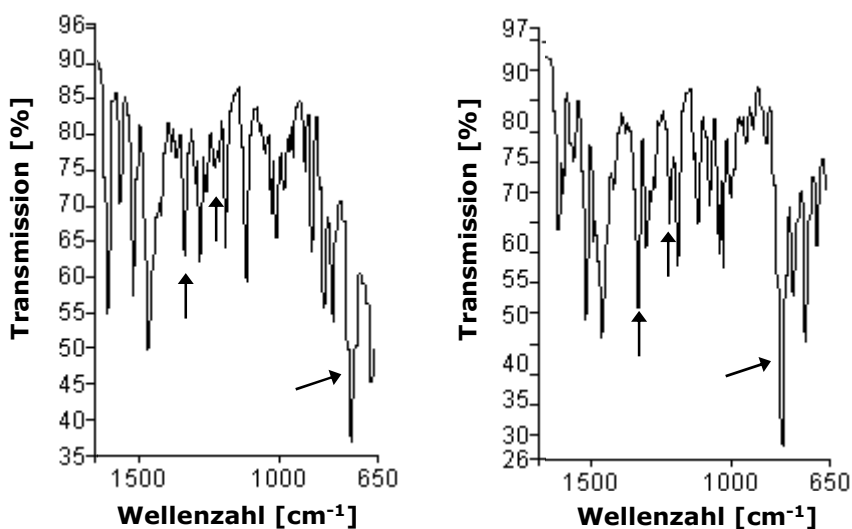


Abb. 51: IR-Spektrum des $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolins **17** (links) und des $(4R,5R)/(4S,5S)$ -2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolins **35** (rechts) im Wellenzahlbereich zwischen 1600 cm^{-1} und 650 cm^{-1} ; Pfeile markieren die Unterschiede der IR-Spektren in den Absorptionsbanden

Die Verbindungen, die aus einer *N*-Alkylierung hervorgehen, liegen synthesebedingt als Hydroiodide vor. Die daraus resultierende Ammoniumbande zeigt sich charakteristisch breit im Bereich von $2700\text{--}2300\text{ cm}^{-1}$. Das IR-Spektrum des $(4R,5S)/(4S,5R)$ -*N*-Propyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazolins **39** in der Abb. 52 veranschaulicht die typischen Absorptionsbanden eines monoalkylierten 2-Imidazolins.

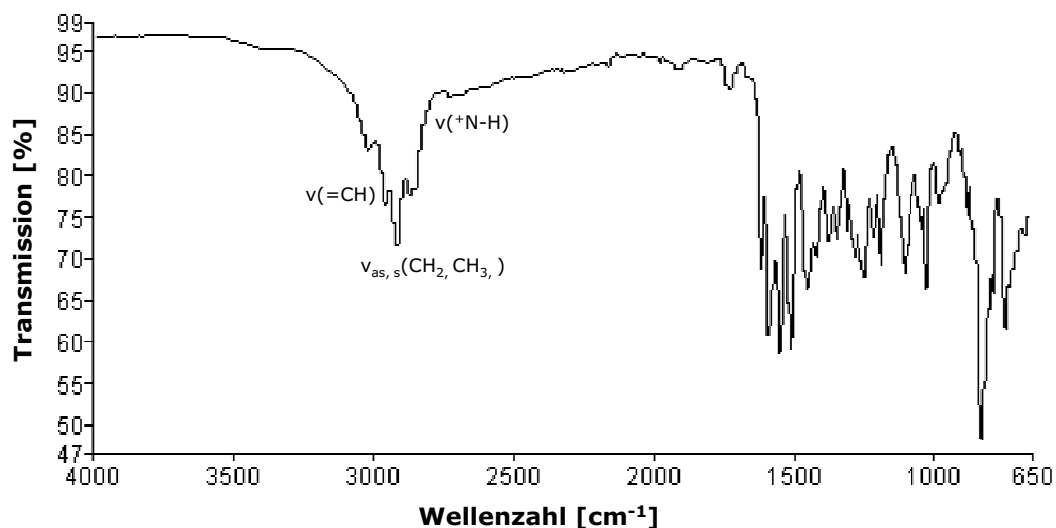


Abb. 52: IR-Spektrum des *(4R,5S)/(4S,5R)*-*N*-Propyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoliniumhydroiodid **39**

Im Vergleich zur monoalkylierten Verbindung **39** besitzt das quartäre Amin des dialkylierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazolins **54** keine auffallende Bande in diesem Bereich, da keine Protonierung vorliegt. Alle IR-Spektren der dialkylierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline weisen die intensiven Absorptionsbanden bei ca. 1590 cm^{-1} und 830 cm^{-1} auf (Abb. 53). Eine eindeutige Unterscheidung einer mono- oder dialkylierten Verbindung kann dementsprechend auch mit Hilfe der IR-Spektroskopie getroffen werden.

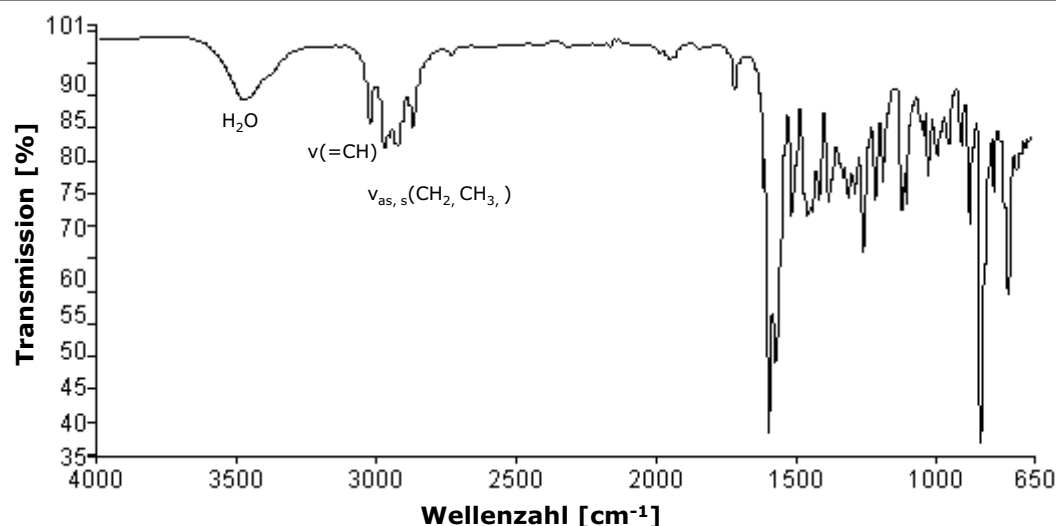


Abb. 53: IR-Spektrum des *(4R,5S)/(4S,5R)*-*N,N'*-Dipropyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoliniumiodids **54**

Für eine genaue Strukturaufklärung der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline stellt die IR-Spektroskopie insbesondere für den Nachweis der funktionellen Gruppen eine entscheidende Ergänzung zur ^1H -NMR-Spektroskopie dar.

2.2.3 Polarimetrie

Synthesebedingt liegen nach einer *N*-Alkylierung bzw. *N,N'*-Dialkylierung der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline die Verbindungen jeweils als ein Enantiomeren-gemisch vor (Abb. 54). Aufgrund dessen soll geklärt werden, in welchem Verhältnis das Enantiomeren-gemisch nach der Alkylierungsreaktion vorliegt.

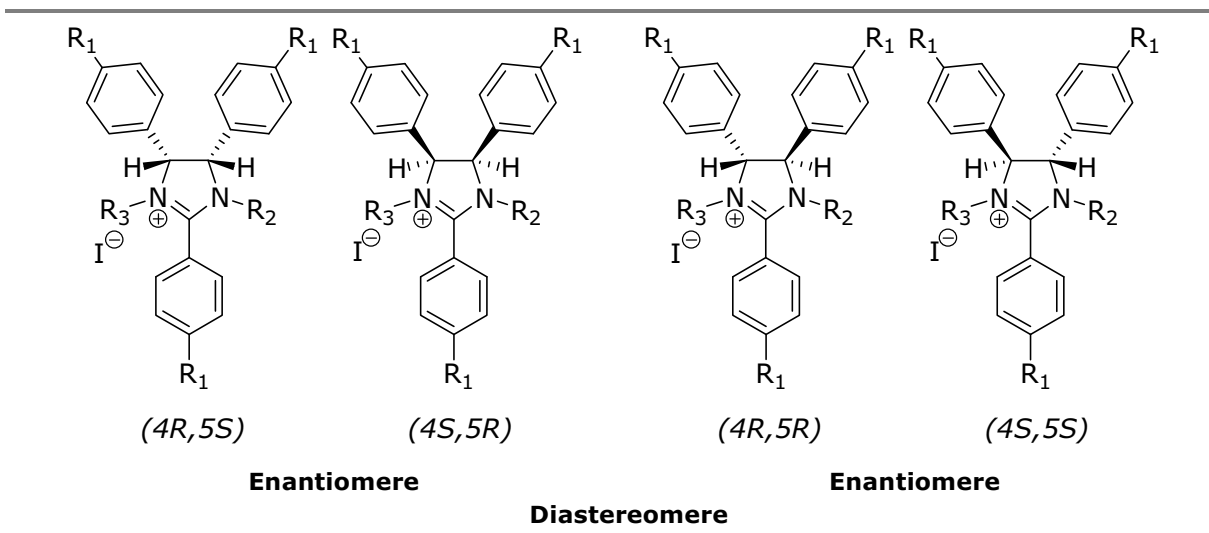


Abb. 54: Darstellung der möglichen Enantiomere der *N*-alkylierten bzw. *N,N'*-dialkylierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (R_1 : CH₃/CH₂CH₃; R_2 : CH₃/CH₂CH₃/CH₂CH₂CH₃; R_3 : H/ R_2)

Optisch aktive Substanzen drehen die Schwingungsebene des linearpolarisierten Lichtes um einen bestimmten Winkel, der charakteristisch für diese Verbindung ist. Da ein Racemat ein äquimolares Gemisch eines rechts- und linksdrehenden Enantiomers ist, besitzt es einen Drehungswinkel von 0° und ist dementsprechend optisch inaktiv.^[92] Basierend auf dieser Grundlage wurde der Drehungswinkel ausgewählter mono- und dialkylierter Verbindungen (**37**, **46**, **52**, **61**) gemessen. Die Messung erfolgte mit einer Mikroküvette, deren Schichtdicke 1 dm betrug und die Messlösungen hatten eine Konzentration von 1 g/100 ml. Des Weiteren wurde die Messung bei einer Temperatur von 20°C und einer Wellenlänge von 589 nm durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung der Versuchsdurchführung ist im Kap. 3.1.4 zu finden.

In Tab. 16 sind die gemessenen Drehungswinkel der untersuchten Verbindungen angegeben.

Tab. 16: Gemessene Drehungswinkel der (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)- bzw. (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-konfigurierten *N*-Methyl- bzw. *N,N'*-Dimethyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoline

Verbindung	Konfiguration	Drehungswinkel [°]
<u>Monoalkylierung</u>		
37	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	0.00
46	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	0.00
<u>Dialkylierung</u>		
52	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	0.00
61	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	0.00

Es liegen demnach sowohl bei den *N*-alkylierten als auch bei den *N,N'*-dialkylierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen wie vermutet Racemate vor, die optisch inaktiv sind.

2.2.4 Nachweis der Iodid-Ionen

Die 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline zeigen nach der *N*-Alkylierung im ¹H-NMR-Spektrum weiterhin eine *NH*-Resonanz, demnach liegen diese Verbindungen (**37-42**, **46-51**) als Salze vor. Synthesebedingt bietet sich als Gegenion lediglich ein Iodid-Ion an. Durch die Oxidation des Iodids zu Iod mit Hilfe von konzentrierter Schwefelsäure und der anschließenden positiven Iod-Stärke-Reaktion konnte diese Vermutung bestätigt werden (Kap. 3.1.5). In gleicher Weise konnte auch für die dialkylierten Verbindungen (**52-57**, **61-66**) Iodid als Gegenion identifiziert werden.

2.2.5 Lipophilie

Mit Hilfe des 1-Octanol-Wasser-Koeffizienten (K_{ow}) einer Verbindung können die lipophilen und hydrophilen Eigenschaften dieser Verbindung eingeschätzt werden. Des Weiteren kann mit diesem Koeffizienten die Verteilung der Substanz auch in anderen Systemen mit einer wässrigen und einer lipophilen Phase abgeschätzt werden. Das ist vor allem bedeutsam, wenn beurteilt werden soll, wie sich innerhalb einer Zelle eine Substanz zwischen den lipophilen Biomembranen und dem wässrigen Zytosol verteilt. Im Allgemeinen gilt für eine Verbindung mit einem positiven $\log K_{ow}$ -Wert, dass diese besser in lipophilen Lösungsmitteln löslich ist. Dementsprechend weisen hydrophile Verbindungen einen negativen $\log K_{ow}$ -Wert auf.^[93] Da nicht für alle Verbindungen ein 1-Octanol-Wasser-Koeffizient gemessen werden kann, gibt es verschiedene Modelle für eine Vorhersage. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die theoretische

Bestimmung der log K_{OW} -Werte einiger Verbindungen die Software des Projekts der Virtual Computational Chemistry Laboratory (VCCLAB) verwendet.^[94] Das Programm ALOGPS 2.1 berechnet zum einen den 1-Octanol-Wasser-Koeffizienten aus der atomaren Zusammensetzung der Verbindung und gibt zum anderen eine log K_{OW} -Wert-Übersicht anderer Vorhersagemodelle.^[95] In der Tab. 17 sind die log K_{OW} -Mittelwerte und deren Standardabweichung von ausgewählten Verbindungen angegeben.

Tab. 17: Übersicht der log K_{OW} -Mittelwerte^[94] ausgewählter (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline; (R gibt das Substitutionsmuster an den Aromaten und Stickstoffen wieder)

Verbindung	R	log K_{OW}	Standardabweichung
<u>Tautomer</u>			
17	4-CH ₃	5.81	0.88
18	4-CH ₂ CH ₃	7.01	1.09
19*	4-SCH ₃	4.85	1.77
20*	4-Cl	5.01	1.62
21*	4-Cl, 2-OCH ₃	4.71	1.48
24	4-NHAc	2.61	0.62
25	2,4-Cl ₂ , 6-OCH ₃	7.73	1.57
30	4-NO ₂	4.38	0.56
33	4-CN	3.71	0.52
34	4-NH ₂	2.43	0.48
<u>N-Alkylierung</u>			
37*	4-CH ₃ ; N-CH ₃	4.69	1.61
38*	4-CH ₃ ; N-CH ₂ CH ₃	5.04	1.66
39*	4-CH ₃ ; N-CH ₂ CH ₂ CH ₃	5.42	1.74
40*	4-CH ₂ CH ₃ ; N-CH ₃	5.79	1.82
41*	4-CH ₂ CH ₃ ; N-CH ₂ CH ₃	6.13	1.90
42*	4-CH ₂ CH ₃ ; N-CH ₂ CH ₂ CH ₃	6.51	2.00
<u>N,N'-Dialkylierung</u>			
52*	4-CH ₃ ; N,N'-CH ₃	4.82	1.99
53*	4-CH ₃ ; N,N'-CH ₂ CH ₃	5.59	1.95
54*	4-CH ₃ ; N,N'-CH ₂ CH ₂ CH ₃	6.38	2.07
55*	4-CH ₂ CH ₃ ; N,N'-CH ₃	6.03	1.98
56*	4-CH ₂ CH ₃ ; N,N'-CH ₂ CH ₃	6.79	1.97
57*	4-CH ₂ CH ₃ ; N,N'-CH ₂ CH ₂ CH ₃	7.56	2.16

* Verbindung liegt als Salz vor

Es ist von entscheidender Bedeutung für die Überwindung der Zellmembran und Verteilung im Zytoplasma, dass eine Verbindung sowohl lipophile als auch

hydrophile Strukturmerkmale aufweist. Im Allgemeinen verfügen die 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline über ein lipophiles Grundgerüst, was das nicht substituierte 2,4,5-Triphenyl-2-imidazolin mit einem $\log K_{OW}$ -Wert von 4.63 (± 0.63) aufzeigt. Durch Substitution von hydrophilen funktionellen Gruppen wie beispielsweise Amide, Amine sowie Nitro- oder Cyanogruppen verringert sich der $\log K_{OW}$ -Wert und die Verbindung wird hydrophiler (z. B. **24**: $\log K_{OW} = 2.61$; **33**: $\log K_{OW} = 3.71$; **34**: $\log K_{OW} = 2.43$). Des Weiteren erhöht die Bildung von Salzen ebenfalls den hydrophilen Charakter und verbessert das Lösungsvermögen der Verbindungen im Zellmedium. Die Voraussetzungen für eine Resorption und mögliche Interaktionen innerhalb der Zelle sind durch den strukturellen Aufbau der 2-Imidazoline gegeben und können anhand der pharmakologischen Untersuchungen (Kap. 3.2) bestätigt werden.

2.2.6 Basizität

Die 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline stellen im Allgemeinen mittelstarke Basen dar. In wässriger Lösung besteht dementsprechend ein Gleichgewicht zwischen der 2-Imidazolin-Base und der korrespondierenden Säure, dem Imidazolinium-Ion (Abb. 55). Durch Bestimmung der Basenkonstante (K_b) kann abgeschätzt werden, auf welche Seite die Gleichgewichtslage des Säure-Base-Paars im wässrigen Zellmedium verschoben wird. Die Lage des Gleichgewichts wirkt sich auf die Löslichkeit der Verbindungen aus. Die protonierte Form ist hydrophiler als die freie Base, demnach kann von einer besseren Löslichkeit im Zellmedium ausgegangen werden. Die Löslichkeit der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline im wässrigen Zellmedium ist die Voraussetzung für eine eventuelle Wirksamkeit der Verbindungen.

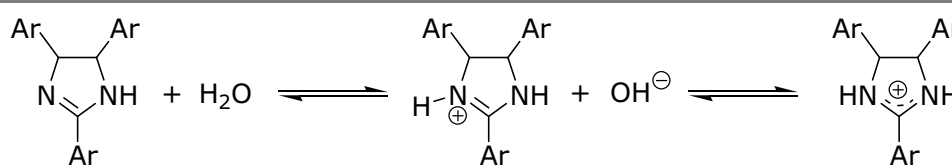


Abb. 55: Dissoziationsgleichgewicht in wässriger Lösung

Die Ultraviolett-spektroskopie kann zur Bestimmung des $\text{p}K_b$ -Wertes der 2-Imidazoline herangezogen werden.^[88] Bei der Methode wird die Verbindung in 0.1 M Salzsäure gelöst und die Lösung anschließend durch Zugabe von Lauge auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Die Probe wird im Spektrometer vermessen und im Anschluss wird der nächste pH-Wert eingestellt. Eine genaue Versuchsdurchführung ist im Kap. 3.1.6 beschrieben.

Wird die Absorption in Abhängigkeit vom pH-Wert gegen die Wellenlänge aufgetragen, ergibt sich eine Spektrenserie wie in Abb. 56 exemplarisch für das (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin **18** dargestellt. Die Ab-

sorption nimmt mit steigendem pH-Wert ab, da dem Protolysegleichgewicht das gelöste Imidazolium-Ion entzogen wird. Die im Alkalischen vorliegende freie Base zeigt im wässrigen Medium kein Absorptionsspektrum. Nach der erneuten Zugabe von Salzsäure und Einstellung auf einen pH-Wert von eins zeichnet sich im Spektrum das gleiche Bild wie am Anfang der Messung ab.

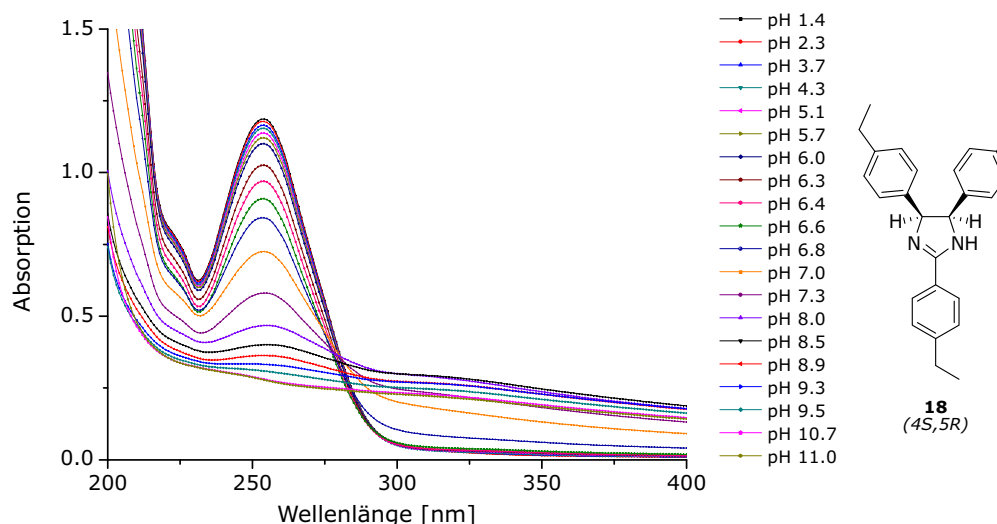


Abb. 56: pH-abhängige Absorptionsspektren des $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolins **18**; $\lambda_{\max} = 254 \text{ nm}$

Das Absorptionsmaximum (λ_{\max}) im Spektrum der Verbindung **18** befindet sich bei 254 nm. Der pK_s -Wert lässt sich graphisch bei dieser Wellenlänge aus dem Absorptions-pH-Diagramm durch Wendepunktanalyse bestimmen, denn bei einem einstufigen Protolysegleichgewicht gilt am Wendepunkt dieser Kurve: $\text{pH} = pK_s$ (Abb. 57).^[88]

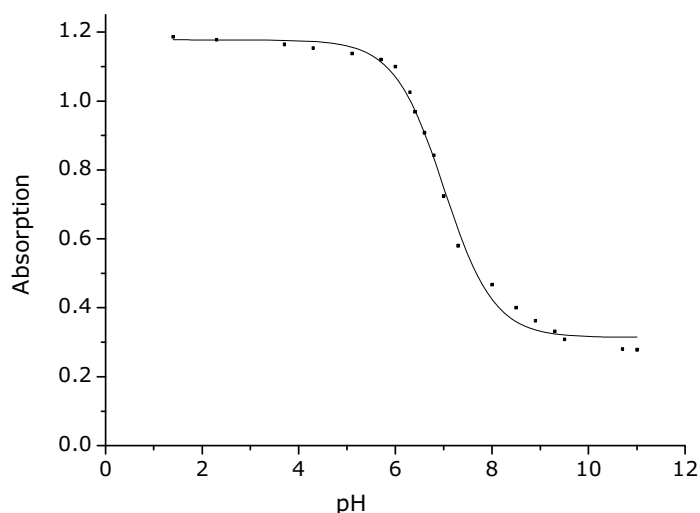


Abb. 57: Absorptions-pH-Diagramm des $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolins **18** bei $\lambda_{\max} = 254 \text{ nm}$; $pK_s = 7.0$; $pK_b = 7.0$

Für das $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin **18** ergibt sich auf diese Weise ein pK_s -Wert von 7.0 und damit ein ebenso großer pK_b -Wert.

Die Absorptionswerte im basischen Bereich sind kritisch zu betrachten, da die Verbindungen ab einem bestimmten pH-Wert fast vollständig ausfallen und die Messlösungen trüb werden. Für die Bestimmung des pK_s -Wertes sind sie dennoch unerlässlich.

Aus dem Massenwirkungsgesetz und der sich daraus ergebenden Henderson-Hasselbalch-Gleichung kann folgender Zusammenhang für mittelstarke Basen in verdünnten wässrigen Lösungen aufgestellt werden:

$$pOH = pK_b + \lg\left(\frac{c_{BH^+}}{c_B}\right)$$

pOH - negativer dekadischer Logarithmus der Aktivität der Hydroniumionen

pK_b - negativer dekadischer Logarithmus der Basenkonstanten (K_b)

c_{BH^+} - Konzentration der korrespondierenden Säure

c_B - Konzentration der Base

Der pH-Wert 7.4 des wässrigen Zellmediums entspricht einem pOH -Wert von 6.6 demzufolge ergibt sich nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung ein Säure-Base-Verhältnis von 2:5. Im Zellmedium liegt demnach das Protolysegleichgewicht etwas mehr auf der Seite der freien Base.

Vergleicht man die pH-abhängigen Absorptionsspektren der Verbindung **18** mit denen des entsprechenden Diastereomers **36** so wird deutlich, dass der Abfall des Absorptionsmaximums bei der $(4R,5R)/(4S,5S)$ -konfigurierten Verbindung **36** schon bei einem kleineren pH-Wert erfolgt (Abb. 58).

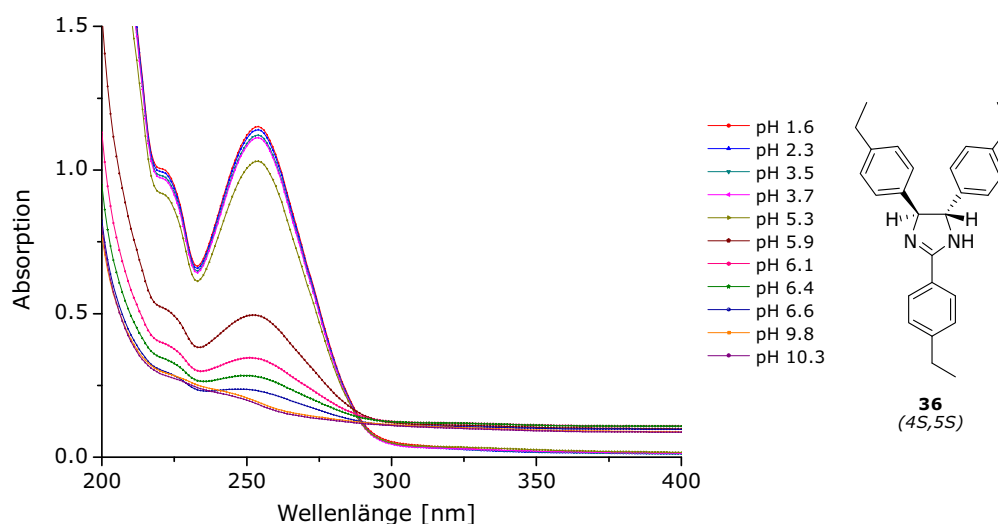


Abb. 58: pH-abhängige Absorptionsspektren des $(4R,5R)/(4S,5S)$ -2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolins **36**; $\lambda_{\max} = 254$ nm

Das Absorptionsmaximum des $(4R,5R)/(4S,5S)$ -konfigurierten Imidazolium-Ions befindet sich ebenfalls bei einer Wellenlänge von 254 nm. In Abb. 59 ist das

Absorptions-pH-Diagramm der Verbindung **36** bei dieser Wellenlänge dargestellt, daraus lässt sich ein pK_b -Wert von 8.3 ($pK_s = 5.7$) ermitteln. Demzufolge scheint die $(4R,5S)/(4S,5R)$ -konfigurierte Verbindung **18** stärker basische Eigenschaften aufzuweisen als das entsprechende Diastereomer **36**.

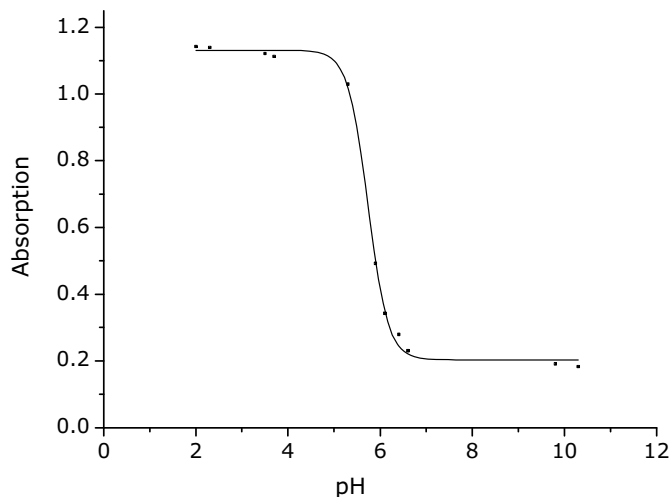


Abb. 59: Absorptions-pH-Diagramm des $(4R,5R)/(4S,5S)$ -2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolins **36** bei $\lambda_{\max} = 254 \text{ nm}$; $pK_s = 5.7$; $pK_b = 8.3$

Diese Tendenz der unterschiedlichen Basizität lässt sich auch bei den Konfigurationsisomeren der 2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazoline beobachten (**17**: $pK_b = 6.4$; **35**: $pK_b = 6.9$).

Des Weiteren finden sich diese Unterschiede auch bei den Konfigurationsisomeren der *N*-alkylierten Verbindungen. Beispielsweise weist das $(4R,5S)/(4S,5R)$ -*N*-Ethyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin **41** einen pK_b -Wert von 6.6 auf, wohingegen das zugehörige $(4R,5R)/(4S,5S)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazolin **50** einen pK_b -Wert von 7.5 besitzt und somit eine schwächere Base darstellt.

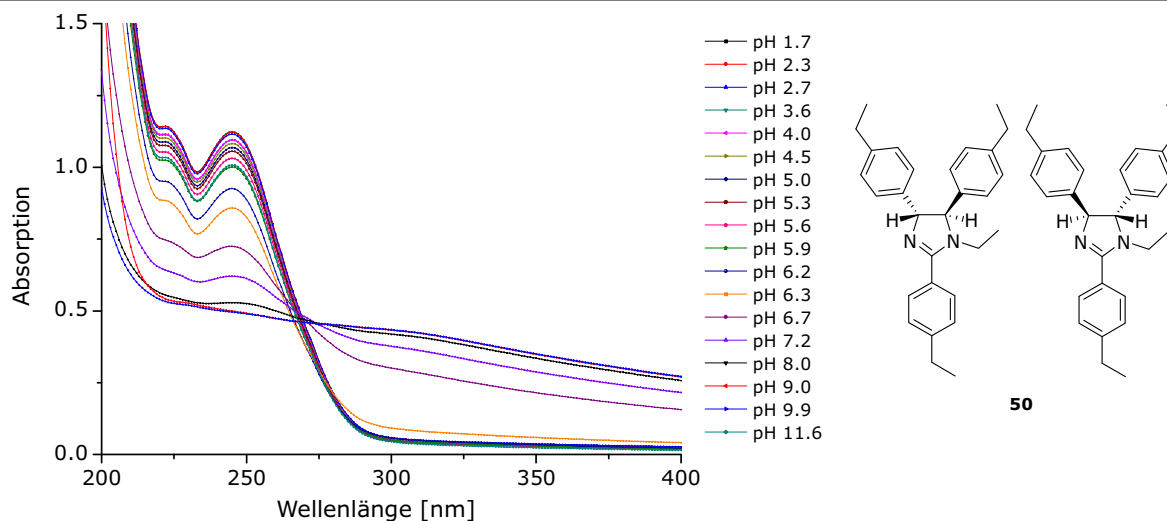


Abb. 60: pH-abhängige Absorptionsspektren des $(4R,5R)/(4S,5S)$ -*N*-Ethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolins **50**; $\lambda_{\max} = 245 \text{ nm}$

Die Abb. 60 zeigt zur Veranschaulichung die charakteristische Spektrenserie des $(4R,5R)/(4S,5S)$ -*N*-Ethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolins **50**.

Das Absorptionsmaximum dieser Verbindung liegt bei einer Wellenlänge von 245 nm und das dazugehörige Absorptions-pH-Diagramm ist in der Abb. 61 veranschaulicht.

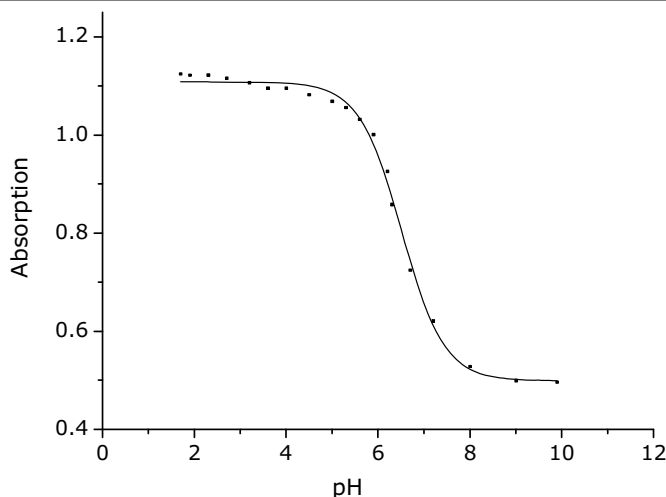


Abb. 61: Absorptions-pH-Diagramm des $(4R,5R)/(4S,5S)$ -*N*-Ethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolins **50** bei $\lambda_{\max} = 245$ nm; $pK_s = 6.5$; $pK_b = 7.5$

Für das $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Tris(4-nitrophenyl)-2-imidazolin **30** konnte ein pK_b -Wert von 8.1 ermittelt werden. Vermutlich kommt aufgrund der Substituenteneffekte der Nitrogruppen dieser relativ hohe pK_b -Wert zustande. Die Verbindung liegt dementsprechend im Zellmedium vorzugsweise als Base vor. Da das 2-Imidazolin ausreichend hydrophile Eigenschaften besitzt, ist genügend Substanz im wässrigen Zellmedium gelöst um eine eventuelle Wirkung auszuüben. Die pharmakologischen Untersuchungen der synthetisierten Verbindungen, insbesondere die zytotoxischen Wirkungen sowie mögliche Wirkmechanismen der Verbindungen werden im Kap. 2.4 dieser Arbeit aufgeführt.

2.3 Stabilität der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline

Im Allgemeinen hydrolysieren 2-Imidazoline in einer wässrigen Lösung unter Ringöffnung zu Amiden (Abb. 62). Die Hydrolyse ist von der Temperatur und dem pH-Wert der Lösung abhängig und kann zum Beispiel durch Erhöhung der beiden Parameter beschleunigt werden. ^[96]

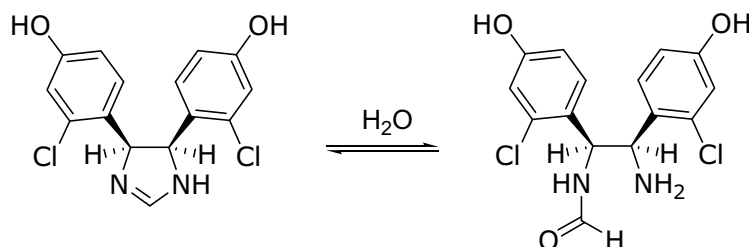


Abb. 62: Hydrolyse des $(4R,5S)/(4S,5R)$ -4,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolins in wässriger Lösung zum $(1R,2S)/(1S,2R)$ -1-Amino-2-formamido-1,2-bis-(2-chlor-4-hydroxyphenyl)ethan ^[54]

Des Weiteren wird die Stabilität des Imidazolinringes durch das Substitutionsmuster beeinflusst. Stabilitätsuntersuchungen der $(4R,5S)/(4S,5R)$ -4,5-Diaryl-2-imidazoline unter in vitro Bedingungen (37 °C, pH 7.4, in PBS) haben gezeigt, dass diese Verbindungen sehr hydrolyseempfindlich sind. Das $(4R,5S)/(4S,5R)$ -4,5-Bis(2-chlor-4-hydroxyphenyl)-2-imidazolin weist beispielsweise eine Halbwertszeit von 5.94 h auf. Im Gegensatz dazu erreicht man bereits durch eine einfache *N*-Ethylierung dieser Verbindung eine Halbwertszeit von 154.03 h. Bei der *N,N'*-diethylierten Verbindung wurde unter den durchgeführten Bedingungen kein Hydrolyseprodukt detektiert. Darüber hinaus führt eine C2-Substitution am 2-Imidazolinring mit einer Hydroxyethylgruppe ebenfalls zu einer hydrolysestabilen Verbindung. ^[54] Demzufolge lässt eine C2-Arylierung zum 2,4,5-Triaryl-2-imidazolin auch eine Stabilisierung des Heteroaromaten vermuten. Aus den Stabilitätsuntersuchungen der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline in einer vorhergehenden Arbeit resultiert, dass nach 72 h bei Raumtemperatur weder in PBS noch in einer 0.1 N Salzsäure- bzw. 0.1 N Natriumhydroxidlösung eine Hydrolyse der Verbindungen stattfindet. ^[55] Erst unter sehr drastischen Bedingungen ist es möglich die 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline zu hydrolysieren. ^[84, 90, 97] Im stark sauren Milieu (pH < 1) und bei hohen Temperaturen (> 100 °C) können auf diese Weise sogar enantiomerenreine 1,2-Diamino-1,2-diarylethane erhalten werden. ^[90, 97]

Aufgrund der Voruntersuchungen kann für die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline angenommen werden, dass alle ausgelösten pharmakologischen Effekte den getesteten Verbindungen zuzuschreiben sind und nicht den Hydrolyseprodukten.

2.4 Pharmakologische Untersuchungen

Es wurde der Einfluss der Strukturvariationen der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline auf die Hemmung der Zellproliferation untersucht. Dafür wurden insbesondere die Verbindungen mit lipophilen Substituenten an den Aromaten wie beispielsweise Chlor-, Alkyl-, oder Methoxygruppen und mit stickstoffhaltigen Substituenten wie Nitro-, Cyano- oder Aminogruppen näher betrachtet. Außerdem wurde die Zytotoxizität der nicht alkylierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit ihren *N*-alkylierten bzw. *N,N'*-dialkylierten Analoga verglichen.

Verbindungen mit vielversprechenden zytotoxischen Eigenschaften wurden darüber hinaus auf Apoptose induzierende Wirkungen getestet.

Die pharmakologischen Untersuchungen erfolgten unter Verwendung der Tumorzelllinien: A549, MCF-7, MDA-MB-231 und U2OS. Je nach verwendetem Testsystem wurden entweder alle vier Zelllinien oder nur für den Zelltest geeignete Zellen verwendet.

2.4.1 Verwendete Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien bestehen aus adhärent wachsenden Zellen und heften sich bevorzugt als Monolayer an die Kulturflächen.

A549

Bei den A549 Zellen handelt es sich um Epithelzellen eines basalen alveolaren Adenokarzinoms. 1972 wurden diese Zellen erstmals aus dem Lungengewebe eines 58-jährigen Kaukasiers isoliert und kultiviert.^[98] Die A549 Zellen sind wt-p53-exprimierende Tumorzellen und weisen zudem noch eine Hdm2-Überexpression auf.^[99]

MCF-7

1970 konnte diese Brustkrebs-Zelllinie aus einem Pleuraerguss einer 69-jährigen Kaukasierin gewonnen und erstmals kultiviert werden.^[100] Die Zellen sind in ihrem Wachstum estrogenabhängig und enthalten neben den Estrogenrezeptoren auch die Rezeptoren für Androgene und Progesteron.^[101] Des Weiteren sind die MCF-7 Zellen durch ein Fehlen der Caspase-3^[102, 103] und einer wt-p53-Expression^[104] gekennzeichnet.

MDA-MB-231

Diese Mammakarzinomzelllinie wurde 1973 aus einem Pleuraerguss einer 51-jährigen Kaukasierin isoliert.^[105] Da die Zelllinie kein ER α -Protein enthält wird sie auch unter anderem als hormonunabhängig bezeichnet.^[106, 107] Die MDA-MB-231 Zellen sind hochinvasiv, denn die Injektion der Zellen bei Nacktmäusen, führt zur

Bildung von Tumoren und Metastasen.^[108] Außerdem konnte das Vorhandensein der Caspase-3 bei dieser Zelllinie nachgewiesen werden^[109] sowie eine Mutation im p53-Gen.^[110, 111]

U2OS

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um mäßig differenzierte Osteosarkomzellen der Tibia einer 15 jährigen Patientin. Die Zellen wurden 1964 isoliert und etabliert.^[112] Die U2OS sind wt-p53-exprimierende Tumorzellen^[113] und verfügen über eine aktive Caspase-3.^[114]

2.4.2 Testung auf Hemmung der Zellproliferation

Der Einfluss der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline auf die Hemmung der Zellproliferation wurde an allen vier Zelllinien untersucht. Dafür wurden die jeweiligen Zellen über mehrere Tage mit den zu untersuchenden Verbindungen inkubiert. Anschließend wurden die noch lebenden Zellen mit Hilfe von Glutardialdehyd am Plattenboden fixiert und mit Kristallviolett angefärbt. Die Zellen wurden dann photometrisch bei 590 nm vermessen. Die gemessene Absorption korreliert mit der Zellmenge. Eine ausführlichere Beschreibung der Testdurchführung und Auswertung ist im experimentellen Teil im Kap. 5.2.3.2 dieser Arbeit aufgeführt.

Die Verbindungen werden nach den ermittelten T/C_{corr} - bzw. τ_{corr} -Werten der jeweiligen Testkonzentration folgendermaßen eingeteilt:

> 80 %	keine antiproliferative Wirkung
80-21 %	antiproliferative Wirkung
20-0 %	zytostatische Wirkung
< 0 %	zytotoxische Wirkung

Im Rahmen dieser Arbeit werden unter zytotoxischen Wirkungen jede negative Beeinflussung des Zellwachstums verstanden. Des Weiteren werden für die Verbindungen lediglich die IC_{50} -Werte < 20 $\mu\text{mol/l}$ angegeben. Verbindungen mit IC_{50} -Werten > 20 $\mu\text{mol/l}$ werden nicht weiter auf ihre zytotoxischen Eigenschaften untersucht.

Das Zytostatikum Cisplatin wurde als Vergleichssubstanz zur allgemeinen Einschätzung der zytotoxischen Wirkung mit den folgenden IC_{50} -Werten herangezogen:

A549	2.0 \pm 0.3 $\mu\text{mol/l}$
MCF-7	2.3 \pm 0.7 $\mu\text{mol/l}$
MDA-MB-231	4.3 \pm 1.3 $\mu\text{mol/l}$
U2OS	3.0 \pm 0.6 $\mu\text{mol/l}$

Darüber hinaus wurde das strukturverwandte Nutlin-3a unter den Bedingungen dieses Testsystems untersucht und folgende IC_{50} -Werte ermittelt:

A549	$0.9 \pm 0.05 \mu\text{mol/l}$
MCF-7	$0.7 \pm 0.2 \mu\text{mol/l}$
MDA-MB-231	$3.3 \pm 0.3 \mu\text{mol/l}$
U2OS	$0.9 \pm 0.1 \mu\text{mol/l}$

Das im Handel erhältliche Nutlin-3a als Hemmstoff der Interaktion zwischen Hdm2 und dem Tumorsuppressor p53 zeigte an den wt-p53-exprimierenden Zelllinien A549, MCF-7 und U2OS vergleichbare zytotoxische Eigenschaften. Eine deutlich geringere zytotoxische Wirkung erzielte die Verbindung an den MDA-MB-231 Zellen mit mutiertem p53-Gen (Abb. 63).

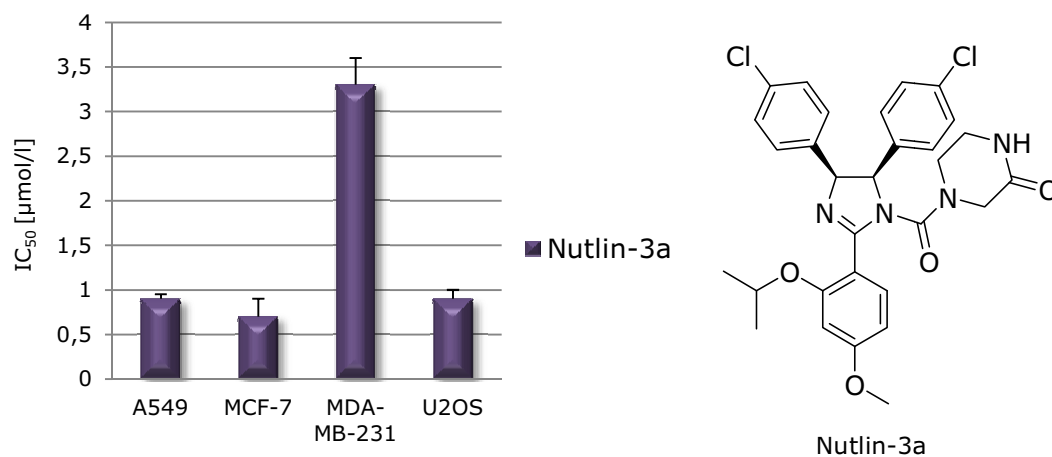
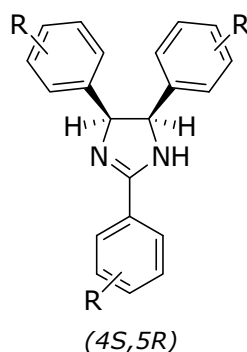


Abb. 63: Darstellung der IC_{50} -Werte des Nutlins-3a an den Zelllinien A549, MCF-7, MDA-MB-231 und U2OS

Im Folgenden werden die synthetisierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**17-66**) hinsichtlich ihrer Strukturvariation in Gruppen zusammengefasst und ihre ermittelten IC_{50} -Werte dargestellt.

(4R,5S)/(4S,5R)-konfigurierte Verbindungen mit lipophilen Substituenten an den Aromaten in Position 2, 4 und 5 des Imidazolinringes

Zunächst wurde der Einfluss der lipophilen Substituenten wie beispielsweise Chlor, Methyl, Ethyl und Methoxy an den Aromaten in Position 2, 4 und 5 des Imidazolinringes auf ihre zytotoxischen Eigenschaften untersucht. Die Ergebnisse der IC_{50} -Werte der getesteten Verbindungen (**17-23**, **25**, **FS1**, **FS6**, **FS13**) sind in Tab. 18 angegeben.



Tab. 18: IC₅₀-Werte der (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit lipophilem Substitutionsmuster an den Aromaten in Position 2, 4 und 5 (**17-23**, **25**, **FS1**, **FS6**, **FS13**)

Verb.	R	IC ₅₀ -Werte [μmol/l]			
		A549	MCF-7	MDA-MB-231	U2OS
17	4-CH ₃	2.4 ± 0.1	2.7 ± 0.1	3.7 ± 0.2	3.3 ± 0.2
18	4-CH ₂ CH ₃	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.9 ± 0.2
19	4-SCH ₃	1.6 ± 0.4	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.2	0.8 ± 0.1
20	4-Cl	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.2	3.6 ± 0.4	1.3 ± 0.2
21	4-Cl, 2-OCH ₃	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.1	3.3 ± 0.4	1.4 ± 0.3
22	3-OCH ₃	2.7 ± 0.3	4.9 ± 0.7	13.0 ± 1.3	7.8 ± 0.9
23	3-Cl	3.8 ± 0.5	0.2 ± 0.1	8.2 ± 0.8	4.1 ± 0.6
25	2,4-Cl ₂ , 6-OCH ₃	3.2 ± 0.4	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.2	1.9 ± 0.2
FS1 *	H	12.8 ± 0.8	13.7 ± 0.6	16.5 ± 0.9	11.1 ± 0.4
FS6 *	4-OCH ₃	8.7 ± 0.4	9.1 ± 0.2	12.0 ± 0.5	7.0 ± 0.2
FS13 *	2-Cl	5.3 ± 0.3	0.8 ± 0.1	5.4 ± 0.3	5.2 ± 0.2

* für die Zelltestung verwendete Substanz, synthetisiert von Dr. F. Schwegler^[55]

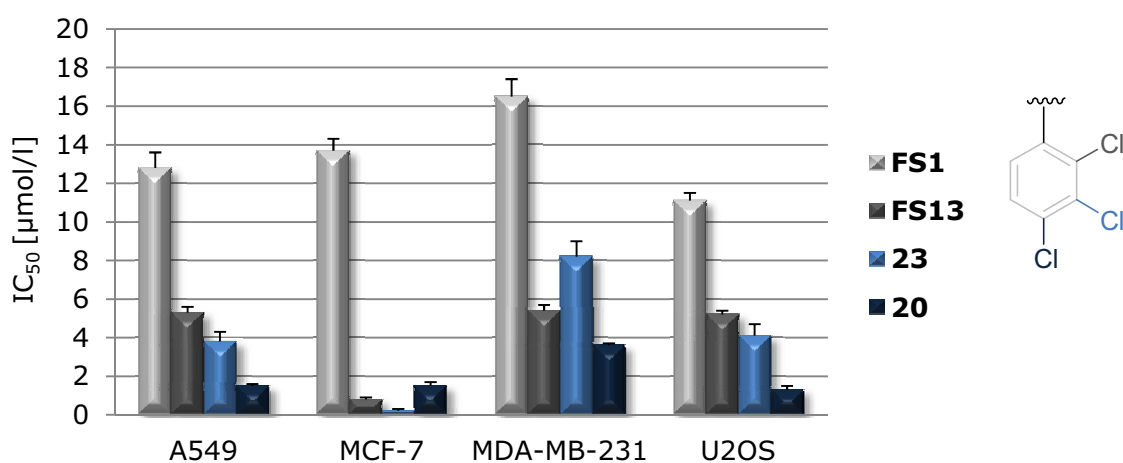


Abb. 64: Vergleich der IC₅₀-Werte des (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Triphenyl-2-imidazolins **FS1** mit den Chlor-substituierten (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen in *ortho*-, *meta*- bzw. *para*-Position der 2,4,5-Triaryle (**FS13**: *ortho*; **23**: *meta*; **20**: *para*) (Tab. 18)

Anhand der Chlor-substituierten $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline kann der Einfluss der Substituentenposition an den 2,4,5-Triarylen betrachtet werden. Dazu sind in Abb. 64 die ermittelten IC_{50} -Werte der *ortho*-, *meta*- und *para*-substituierten 2,4,5-Tris(chlorphenyl)-Verbindungen (**FS13**: *ortho*, **23**: *meta*, **20**: *para*) im Vergleich mit dem IC_{50} -Wert des $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triphenyl-2-imidazolins **FS1** graphisch dargestellt. Auffällig ist, dass durch das Vorhandensein eines Substituenten die Zytotoxizität um ein Vielfaches an allen verwendeten Zelllinien gesteigert werden kann.

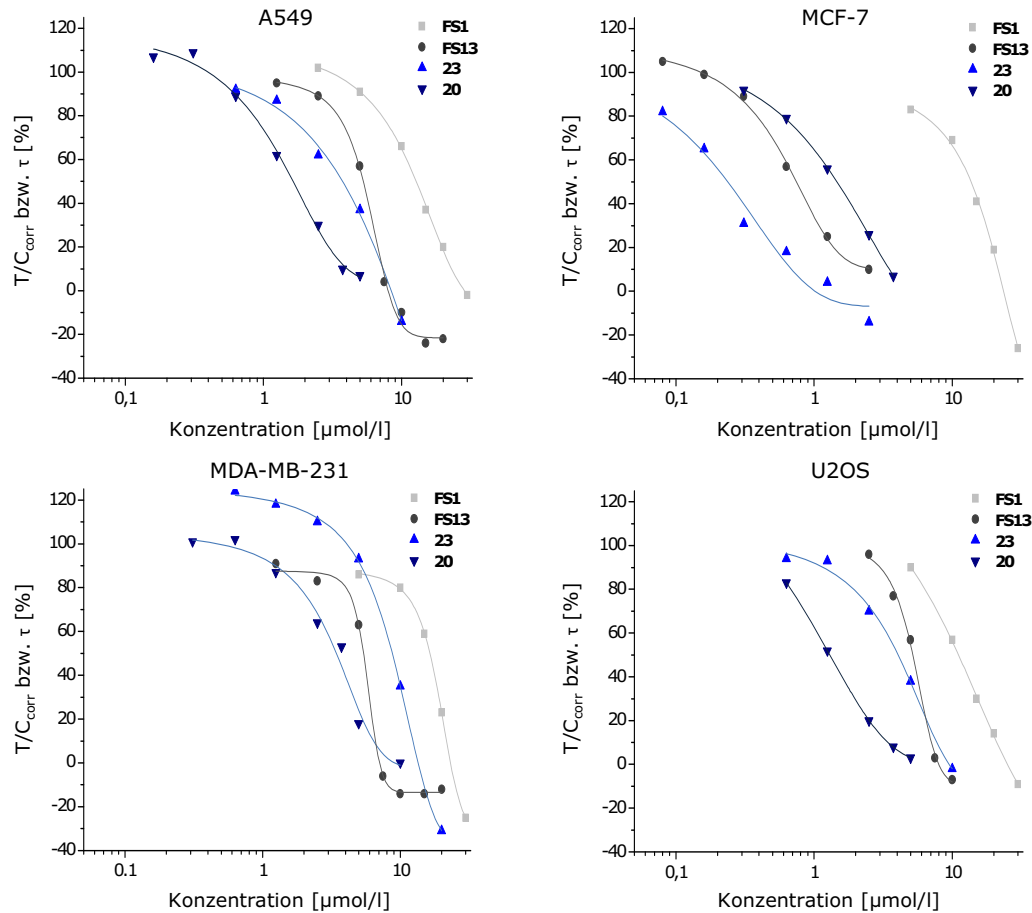


Abb. 65: Konzentrations-Wirkungskurven des $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triphenyl-2-imidazolins **FS1** und der Chlor-substituierten $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline in *ortho*-, *meta*- bzw. *para*-Position der 2,4,5-Triaryle (**FS13**: *ortho*; **23**: *meta*; **20**: *para*) (Die Werte werden im Einzelnen nicht aufgeführt.)

Des Weiteren lässt sich eine deutlich toxischere Wirkung bei der Verbindung **20** mit *para*-ständigen Chlor-Substituenten gegenüber den anderen Substituentenpositionen verzeichnen. Die Unterschiede zwischen den Verbindungen mit den *ortho*- und *meta*-ständigen Chlor-Substituenten (**FS13**, **23**) sind eher gering und lassen keine genaueren Schlussfolgerungen zu. Interessanterweise ist eine gewisse Selektivität dieser beiden Verbindungen (**FS13**, **23**) gegenüber den MCF-7 Zellen erkennbar (**FS13**: IC_{50} 0.8 $\mu\text{mol/l}$; **23**: IC_{50} 0.2 $\mu\text{mol/l}$), die bei der Verbindung **20** nicht vorhanden zu sein scheint. Die genannten Differenzen

spiegeln sich auch in den Konzentrations-Wirkungskurven der Verbindungen (**FS1**, **FS13**, **23**, **20**) in Abb. 65 wieder. Die Verbindung **20** zeigt an den MDA-MB-231 Zellen eine geringere Zytotoxizität mit einem IC_{50} -Wert von $3.6 \pm 0.4 \mu\text{mol/l}$ gegenüber den anderen drei Zelllinien mit IC_{50} -Werten von 1.3-1.5 $\mu\text{mol/l}$.

Aufgrund der allgemein stärkeren Wirksamkeit der *para*-ständigen Verbindung **20** gegenüber den anderen Substituentenpositionen an den Zelllinien wurde der Einfluss von lipophilen *para*-ständigen Substituenten im Folgenden eingehender untersucht.

In Abb. 66 sind die IC_{50} -Werte der $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit unterschiedlichen lipophilen Substituenten in *para*-Position der 2,4,5-Triaryle veranschaulicht. Auffällig ist, dass die Verbindung **FS6** mit dem 4-Methoxy-Substituenten die größten IC_{50} -Werte aufweist (IC_{50} 7.0-12.0 $\mu\text{mol/l}$). Des Weiteren zeigt die 4-Methyl-substituierte Verbindung **17** gegenüber den 4-Ethyl-, 4-Methylthio- und 4-Chlor-substituierten Verbindungen (**18-20**) an den Zelllinien die geringsten zytotoxischen Eigenschaften (**17**: IC_{50} 2.4-3.7 $\mu\text{mol/l}$). Wird die Methylgruppe durch eine Ethyl- (**18**) oder Methylthiogruppe (**19**) ersetzt, werden ähnliche IC_{50} -Werte von 0.8-1.6 $\mu\text{mol/l}$ ohne bevorzugte Präferenz einer bestimmten Zelllinie erhalten.

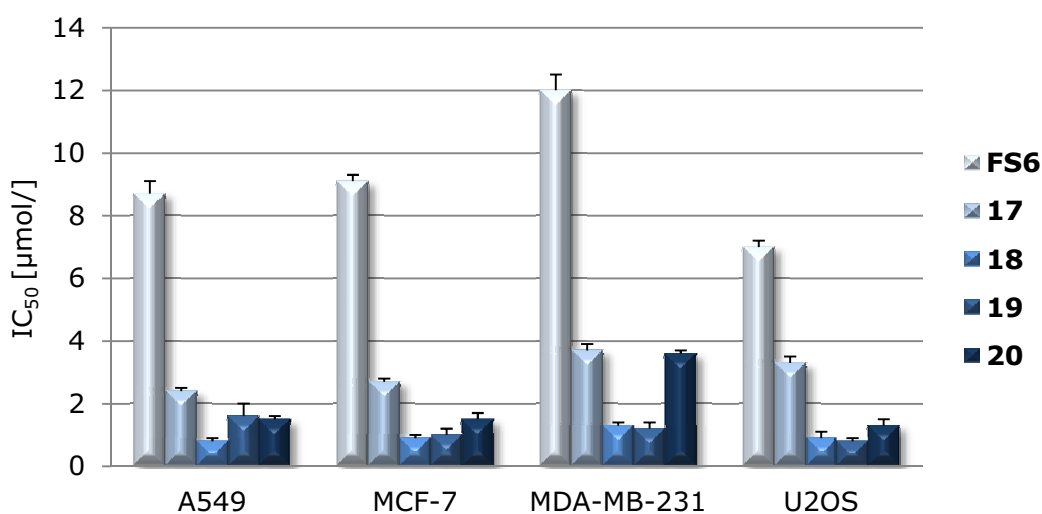


Abb. 66: Vergleich der IC_{50} -Werte der $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit lipophilem Substituenten in *para*-Position der 2,4,5-Triarylen (**FS6**: R = OCH₃; **17**: R = CH₃; **18**: R = CH₂CH₃; **19**: R = SCH₃; **20**: R = Cl) (Tab. 18)

Neben dem Einfluss des alleinigen *para*-ständigen Substituenten auf die Hemmung der Zellproliferation wurde zusätzlich die Auswirkung der Anzahl der lipophilen Substituenten an den 2,4,5-Triarylen untersucht. In Abb. 67 sind die IC_{50} -Werte der dafür synthetisierten $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**20**, **21**, **25**) graphisch dargestellt.

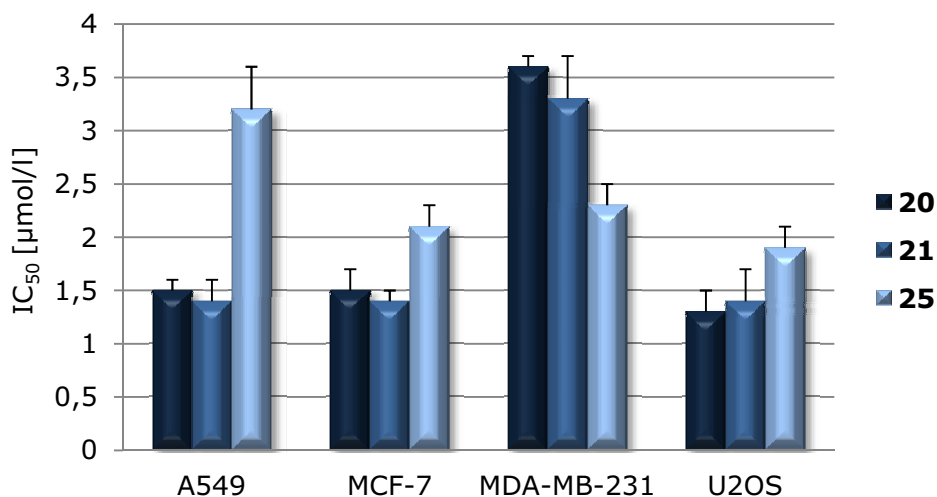
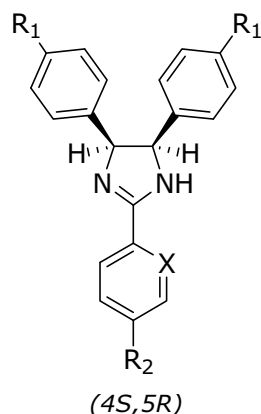


Abb. 67: Vergleich der IC₅₀-Werte der (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit zunehmender Anzahl an lipophilen Substituenten an den 2,4,5-Triarylen (**20**: R = 4-Cl; **21**: R = 4-Cl, 2-OCH₃; **25**: R = 2,4-Cl₂, 6-OCH₃) (Tab. 18)

Interessanterweise ist eine vermutete Steigerung der Zytotoxizität durch die Erhöhung der Substituentenzahl und der damit verbundenen größeren Lipophilie bei den Verbindungen nicht eingetroffen. Die Verbindung **20** mit nur einem *para*-ständigen Substituenten an den 2,4,5-Triarylen zeigt ähnliche IC₅₀-Werte wie die Verbindung **21** mit einem zusätzlichen 2-Methoxysubstituenten (IC₅₀ 1.3–3.3 µmol/l). Im Gegensatz dazu weist das (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(2,4-dichlor-6-methoxyphenyl)-2-imidazolins **25** außer an den MDA-MB-231 Zellen tendenziell größere IC₅₀-Werte auf.

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit stickstoffhaltigem Substituent an den Aromaten in Position 2, 4 und 5 des Imidazolinringes

Im Folgenden wird die Wirkung eines stickstoffhaltigen Substituenten an den 2,4,5-Triarylen der (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-konfigurierten 2-Imidazoline auf die Zelllinien betrachtet. Die Ergebnisse der IC₅₀-Werte der synthetisierten Verbindungen (**24**, **26–34**) können der Tab. 19 entnommen werden.



Tab. 19: IC₅₀-Werte der (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit stickstoffhaltigen Substituenten an den Aromaten in Position 2, 4 und 5 (**24**, **26-34**); X = CH: **24**, **27-34**; X = N: **26**

Verb.	R ₁	R ₂	IC ₅₀ -Werte [μmol/l]			
			A549	MCF-7	MDA-MB-231	U2OS
24	NHAc	NHAc	> 20	> 20	> 20	> 20
26	OCH ₃	H	7.6 ± 0.8	3.2 ± 0.2	14.4 ± 1.2	5.2 ± 0.4
27	OCH ₃	NHAc	5.1 ± 0.5	7.5 ± 0.6	10.6 ± 0.9	3.1 ± 0.2
28	OCH ₃	NO ₂	4.2 ± 0.3	3.9 ± 0.3	8.7 ± 0.7	9.2 ± 0.9
29	OCH ₃	CN	17.3 ± 1.6	12.3 ± 0.8	> 20	17.6 ± 1.2
30	NO ₂	NO ₂	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.2	1.6 ± 0.1	2.0 ± 0.2
31	NO ₂	OCH ₃	7.2 ± 0.5	3.8 ± 0.3	10.5 ± 1.0	4.2 ± 0.4
32	NO ₂	CN	4.8 ± 0.3	3.7 ± 0.3	9.6 ± 0.6	4.9 ± 0.3
33	CN	CN	4.6 ± 0.2	4.1 ± 0.4	6.8 ± 0.5	5.7 ± 0.2
34	NH ₂	NH ₂	> 20	> 20	> 20	> 20

Im Allgemeinen weisen die (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit stickstoffhaltigen Substituenten an den Aromaten (**24**, **26-34**) tendenziell größere IC₅₀-Werte auf als die zuvor beschriebenen 2-Imidazoline mit lipophilen Substituenten (**17-23**, **25**, **FS1**, **FS6**, **FS13**). Eine Ausnahme bildet das (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-nitrophenyl)-2-imidazolin **30**, das an den verwendeten Zelllinien IC₅₀-Werte zwischen 1.2 μmol/l und 2.0 μmol/l zeigt und damit vergleichbare zytotoxische Eigenschaften besitzt wie die lipophileren Verbindungen **18-20**.

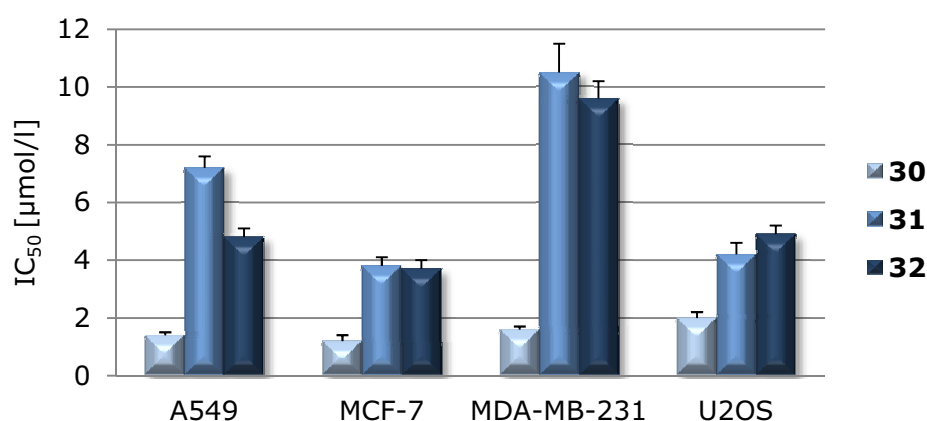


Abb. 68: Vergleich der IC₅₀-Werte der (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2-Aryl-4,5-bis(4-nitrophenyl)-2-imidazoline mit verändertem Substituent am Aromaten in Position 2 (**30**: R = NO₂; **31**: R = OCH₃; **32**: R = CN) (Tab. 19)

Wenn bei der Verbindung **30** der 4-Nitro-Substituent des Aromaten in Position 2 des Imidazolins durch eine Cyano- (**32**) oder Methoxygruppe (**31**) ersetzt wird, werden die IC₅₀-Werte um das Vier- bis Fünffache größer (Abb. 68). Durch

diesen Substituentenaustausch kommt es insbesondere an den A549 und MDA-MB-231 Zellen zu einem großen Zytotoxizitätsverlust.

Ein Austausch des 4-Methoxy-Substituenten am Aromaten in Position 2 des $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Tris(4-methoxyphenyl)-2-imidazolins **FS6** gegen eine Acetamid-, Nitro- oder Cyanogruppe scheint keinen verstärkenden Einfluss auf die proliferationshemmenden Eigenschaften der Verbindungen (**27-29**) auszuüben (Abb. 69). Im Gegenteil die Verbindung **29** mit einer 4-Cyanogruppe als Austauschsubstituent zeigt eine wesentlich geringere zytotoxische Wirkung an den verwendeten Zelllinien (IC_{50} -Werten $> 12 \mu\text{mol/l}$). Darüber hinaus führte der Ersatz des Aromaten in Position 2 des 2-Imidazolins gegen den Heteroaromaten 2-Pyridin (**26**) ebenfalls nicht zu einer ausgeprägten Zytotoxizitätssteigerung.

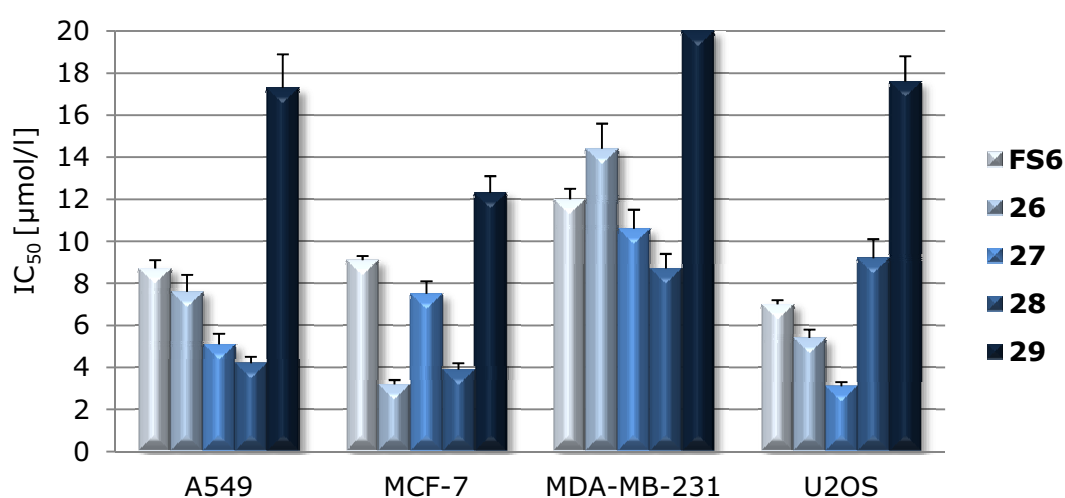
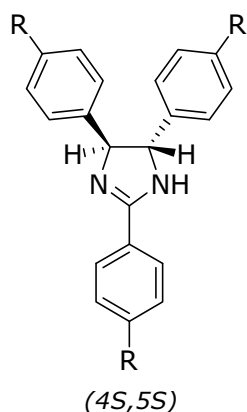


Abb. 69: Vergleich der IC_{50} -Werte der $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2-Aryl-4,5-bis(4-methoxyphenyl)-2-imidazoline mit verändertem Substituent am Aromaten in Position 2 (**FS6**: R = OCH_3 ; **26**: Ar = 2-Pyridin; **27**: R = NHAc ; **28**: R = NO_2 ; **29**: R = CN) (Tab. 19)

$(4R,5R)/(4S,5S)$ -konfigurierte Verbindungen mit lipophilem Substituent an den Aromaten in Position 2, 4 und 5 des Imidazolinringes

Neben der Beeinflussung der zytotoxischen Eigenschaften durch eine Veränderung des Substitutionsmusters an den 2,4,5-Triarylen sollen nun Aussagen über die toxischen Wirkungen aufgrund der veränderten Raumstruktur der Verbindungen getroffen werden. Dazu wurden neben dem $(4R,5S)/(4S,5R)$ -konfigurierten 2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin **17** und dem $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin **18** die diastereomeren Verbindungen **35** und **36** mit der Konfiguration $(4R,5R)/(4S,5S)$ untersucht.

In der Tab. 20 sind die IC_{50} -Werte der $(4R,5R)/(4S,5S)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**35**, **36**) aufgelistet.



Tab. 20: IC₅₀-Werte der (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**35**, **36**)

Verb.	R	IC ₅₀ -Werte [μmol/l]			
		A549	MCF-7	MDA-MB-231	U2OS
35	CH ₃	2.2 ± 0.1	2.1 ± 0.2	2.5 ± 0.1	2.2 ± 0.1
36	CH ₂ CH ₃	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1

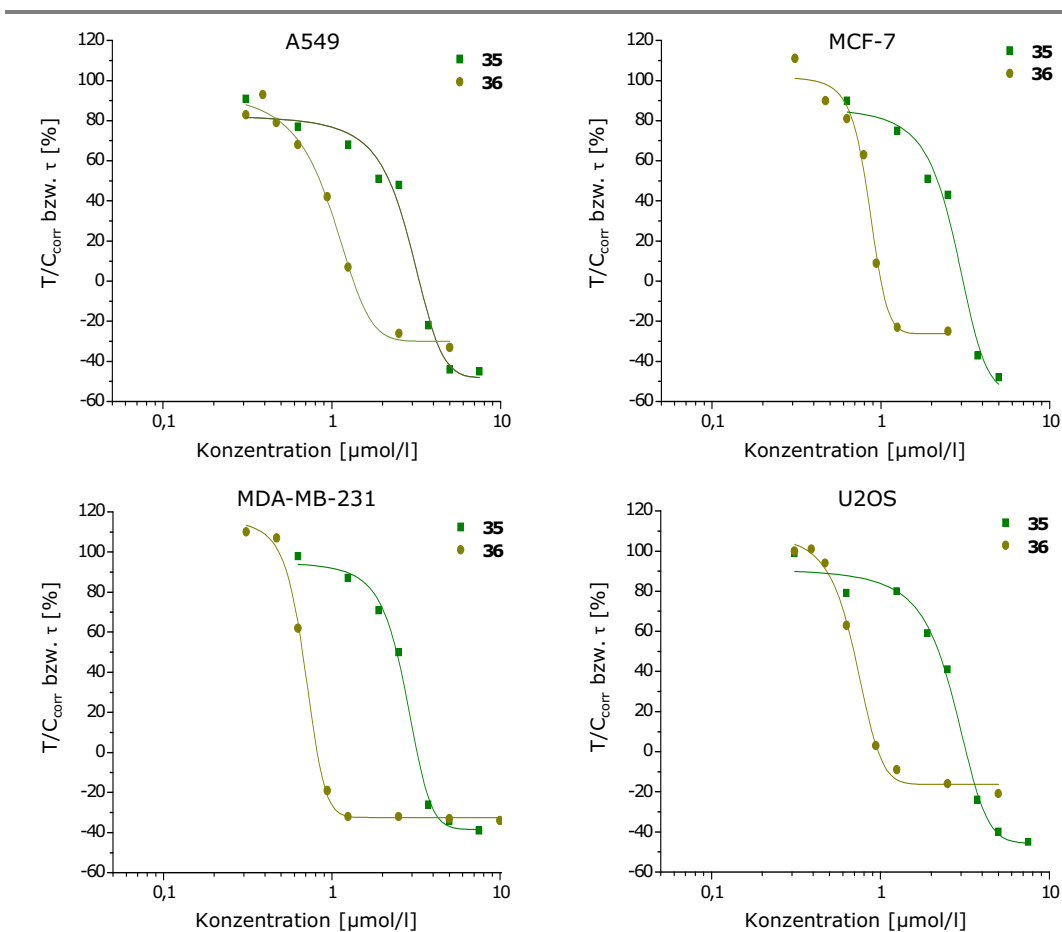


Abb. 70: Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven des (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Tris-(4-methylphenyl)-2-imidazolins **35** mit (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin **36** an A549-, MCF-7-, MDA-MB-231- und U2OS-Zellen (Die Werte werden im Einzelnen nicht aufgeführt.)

Die Konzentrations-Wirkungskurven in Abb. 70 der Verbindungen **35** und **36** lassen keine Präferenz für eine bestimmte Zelllinie zu, aber dafür spiegeln sich in den Grafen die eindeutig stärkeren zytotoxischen Effekte des $(4R,5R)/(4S,5S)$ -2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolins **36** wieder. Eine Begründung ist vermutlich in der größeren Lipophilie des 4-Ethyl-Substituenten gegenüber dem 4-Methyl-Substituenten der 2,4,5-Triaryle zu finden. Dieser Wirkungsunterschied wurde ebenfalls bei den analog aufgebauten Diastereomeren (**17**, **18**) festgestellt. Die 2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoline (**18**, **36**) sind im Durchschnitt an den vier Zelllinien dreimal toxischer als die 2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazoline (**17**, **35**).

Die Diastereomere **18** und **36** zeigen an den A549, MCF-7 und U2OS Zellen ähnliche IC_{50} -Werte von 0.7-0.9 $\mu\text{mol/l}$ (Abb. 71). Lediglich an den MDA-MB-231 Zellen scheint die $(4R,5R)/(4S,5S)$ -konfigurierte Verbindung **36** stärker toxisch zu sein (**18**: IC_{50} 1.3 ± 0.1 $\mu\text{mol/l}$; **36**: IC_{50} 0.5 ± 0.1 $\mu\text{mol/l}$).

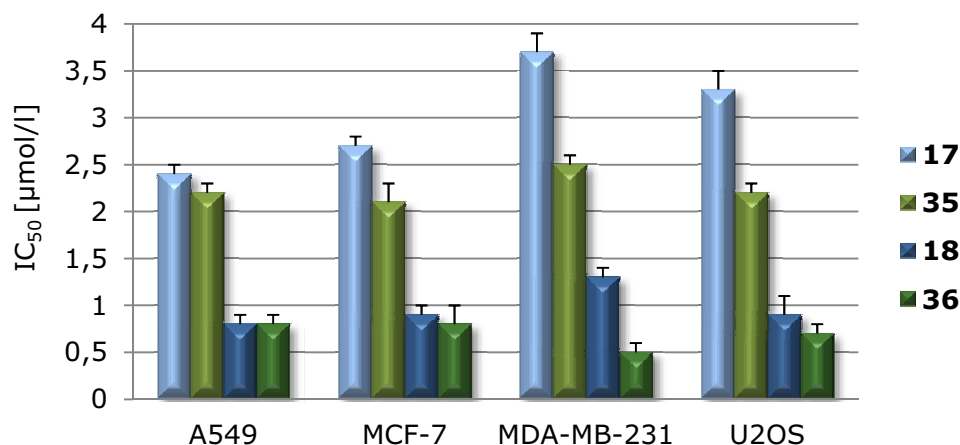
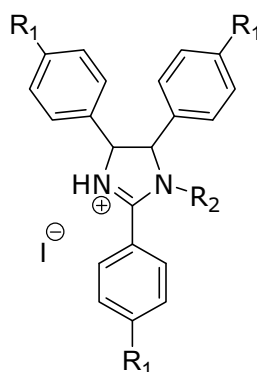


Abb. 71: Vergleich der IC_{50} -Werte der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit den Konfigurationen $(4R,5S)/(4S,5R)$ (**17**, **18**; blau) (Tab. 18) und $(4R,5R)/(4S,5S)$ (**35**, **36**; grün) (Tab. 20)

Die 2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazoline (**17**, **35**) weisen ebenfalls eine vergleichbare Zytotoxizität auf, dennoch erweckt die Verbindung **35** den Eindruck an den MDA-MB-231 und U2OS Zellen stärker wirksam zu sein (Abb. 71).

N-Alkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoline

Der Einfluss der N-Alkylierung der $(4R,5S)/(4R,5S)$ - und $(4R,5R)/(4S,5S)$ -konfigurierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**37-51**) auf die Hemmung der Zellproliferation wurde gleichermaßen untersucht. Die ermittelten IC_{50} -Werte sind in der Tab. 21 und Tab. 22 angegeben.



Tab. 21: IC₅₀-Werte der (4*R*,5*S*)/(4*R*,5*S*)-*N*-Alkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoline (**37-45**)

Verb.	R ₁	R ₂	IC ₅₀ -Werte [μmol/l]			
			A549	MCF-7	MDA- MB-231	U2OS
37	CH ₃	CH ₃	3.6 ± 0.1	2.7 ± 0.2	4.0 ± 0.2	3.6 ± 0.1
38	CH ₃	CH ₂ CH ₃	2.2 ± 0.1	2.5 ± 0.1	2.7 ± 0.2	2.4 ± 0.1
39	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1	2.0 ± 0.2	1.6 ± 0.1
40	CH ₂ CH ₃	CH ₃	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.2	1.6 ± 0.1
41	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.1
42	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1
43	Cl	CH ₃	8.5 ± 0.9	4.5 ± 0.6	> 20	10.4 ± 1.2
44	Cl	CH ₂ CH ₃	3.2 ± 0.4	2.4 ± 0.5	> 20	3.8 ± 0.7
45	NO ₂	CH ₃	> 20	> 20	> 20	> 20

Tab. 22: IC₅₀-Werte der (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-*N*-Alkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoline (**46-51**)

Verb.	R ₁	R ₂	IC ₅₀ -Werte [μmol/l]			
			A549	MCF-7	MDA- MB-231	U2OS
46	CH ₃	CH ₃	1.7 ± 0.2	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.2	1.3 ± 0.1
47	CH ₃	CH ₂ CH ₃	1.7 ± 0.1	1.4 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.1
48	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1
49	CH ₂ CH ₃	CH ₃	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.2
50	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	0.4 ± 0.06	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
51	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	0.3 ± 0.05	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.04

Im Allgemeinen kommt es durch eine *N*-Alkylierung der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**17**, **18**, **35**, **36**) zu einer Steigerung der Zytotoxizität. Ausnahmen bilden die 4-Chlor- und 4-Nitro-substituierten 2-Imidazoline (**20**, **30**), die durch *N*-Methyl- bzw. *N*-Ethylierung eine drastische Abschwächung der zytotoxischen Eigen-

schaften erfahren. Insbesondere für das *(4R,5S)/(4S,5R)*-*N*-Methyl-2,4,5-tris(4-nitrophenyl)-2-imidazolin **45** konnte an den vier Zelllinien bei den getesteten Konzentrationen keine Hemmung der Zellproliferation ermittelt werden ($IC_{50} > 20 \mu\text{mol/l}$). Die *N*-Ethylierung des *(4R,5S)/(4S,5R)*-2,4,5-Tris(4-chlorphenyl)-2-imidazolins **20** zur Verbindung **44** brachte gegenüber der *N*-Methylierung eine Steigerung der Zytotoxizität um mehr als 50 %. Jedoch liegt der IC_{50} -Wert auch bei der ethylierten Verbindung **44** bei den MDA-MB-231 Zellen über $20 \mu\text{mol/l}$.

In Abb. 72 stehen sich exemplarisch die IC_{50} -Werte der unterschiedlich *N*-alkylierten *(4R,5S)/(4R,5S)*- und *(4R,5R)/(4S,5S)*-konfigurierten 2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazoline (**37-39**, **46-48**) graphisch gegenüber.

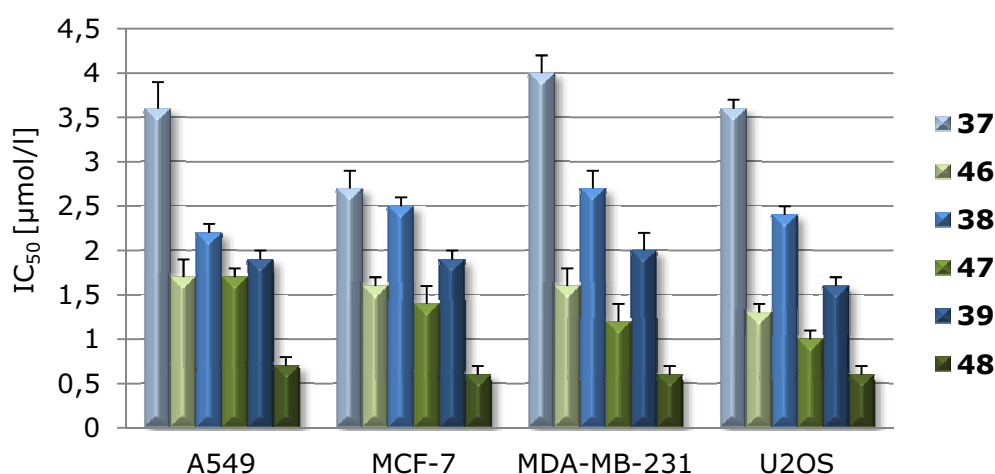


Abb. 72: Vergleich der IC_{50} -Werte der *N*-Alkyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoline mit den Konfigurationen *(4R,5S)/(4S,5R)* (**37-39**; blau) (Tab. 21) und *(4R,5R)/(4S,5S)* (**46-48**; grün) (Tab. 22)

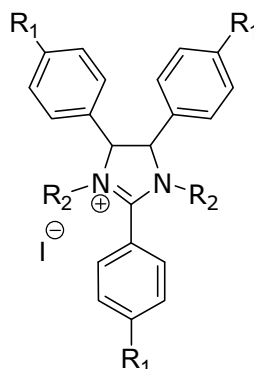
Mit zunehmender Länge der *N*-Alkylkette und der damit verbundenen Erhöhung der Lipophilie nehmen die IC_{50} -Werte im Allgemeinen deutlich ab. Darüber hinaus zeigen die *(4R,5R)/(4S,5S)*-konfigurierten Verbindungen (**46-48**) gegenüber den 2-Imidazolinen mit *(4R,5S)/(4S,5R)* Konfiguration (**37-39**) an den verwendeten Zelllinien eine ausgeprägte Zunahme der zytotoxischen Eigenschaften. Eine bevorzugte Tendenz für eine bestimmte Zelllinie ist nicht zu erkennen.

Es kann auch hier eine im Durchschnitt dreifach toxischere Wirkung der *N*-Alkyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoline (**40-42**, **49-51**) aufgrund des Austausches der 4-Methyl- gegen die 4-Ethyl-Gruppe an den 2,4,5-Triarylen festgestellt werden.

N,N'-Dialkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoliniumiodide

Neben dem zytotoxischen Einfluss durch die *N*-Alkylierung wird nun auch die Auswirkung der *N,N'*-Dialkylierung auf die Zelllinien näher betrachtet. Dazu sind

in der Tab. 23 und Tab. 24 die IC_{50} -Werte der N,N' -Dialkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoliumiodide (**52-66**) dargestellt.



Tab. 23: (*4R,5S*)/(*4S,5R*)- N,N' -Dialkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoliumiodide (**52-60**)

Verb.	R_1	R_2	IC_{50} -Werte [$\mu\text{mol/l}$]			
			A549	MCF-7	MDA- MB-231	U2OS
52	CH ₃	CH ₃	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.0 ± 0.2	2.3 ± 0.2
53	CH ₃	CH ₂ CH ₃	0.3 ± 0.06	0.3 ± 0.05	0.5 ± 0.1	1.0 ± 0.2
54	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	0.2 ± 0.03	0.1 ± 0.04	0.3 ± 0.05	0.6 ± 0.1
55	CH ₂ CH ₃	CH ₃	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.02	0.2 ± 0.05	0.3 ± 0.1
56	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.02	0.2 ± 0.03	0.2 ± 0.05
57	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	0.1 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.1 ± 0.03	0.2 ± 0.04
58	Cl	CH ₃	> 20	7.2 ± 1.5	> 20	> 20
59	Cl	CH ₂ CH ₃	11.8 ± 1.6	4.2 ± 0.8	11.1 ± 1.3	9.2 ± 0.9
60	NO ₂	CH ₃	> 20	> 20	> 20	> 20

Tab. 24: (*4R,5R*)/(*4S,5S*)- N,N' -Dialkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoliumiodide (**61-66**)

Verb.	R_1	R_2	IC_{50} -Werte [$\mu\text{mol/l}$]			
			A549	MCF-7	MDA- MB-231	U2OS
61	CH ₃	CH ₃	1.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	2.0 ± 0.2	2.3 ± 0.2
62	CH ₃	CH ₂ CH ₃	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.05	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.1
63	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	0.2 ± 0.06	0.1 ± 0.02	0.2 ± 0.04	0.3 ± 0.07
64	CH ₂ CH ₃	CH ₃	0.2 ± 0.04	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.05	0.3 ± 0.05
65	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	0.2 ± 0.03	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.03	0.2 ± 0.06
66	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.04	0.2 ± 0.05

Zunächst ist auffallend, dass die *N,N'*-Dialkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoliniumiodide (**52-66**) grundsätzlich um ein Vielfaches stärker zytotoxisch sind als die einfach alkylierten Verbindungen (**37-51**). Exemplarisch dazu sind in Abb. 73 die IC_{50} -Werte der (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-*N*-Alkyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoline (**37-39**) mit den (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-*N,N'*-Dialkyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoliniumiodide (**52-54**) gegenüber gestellt.

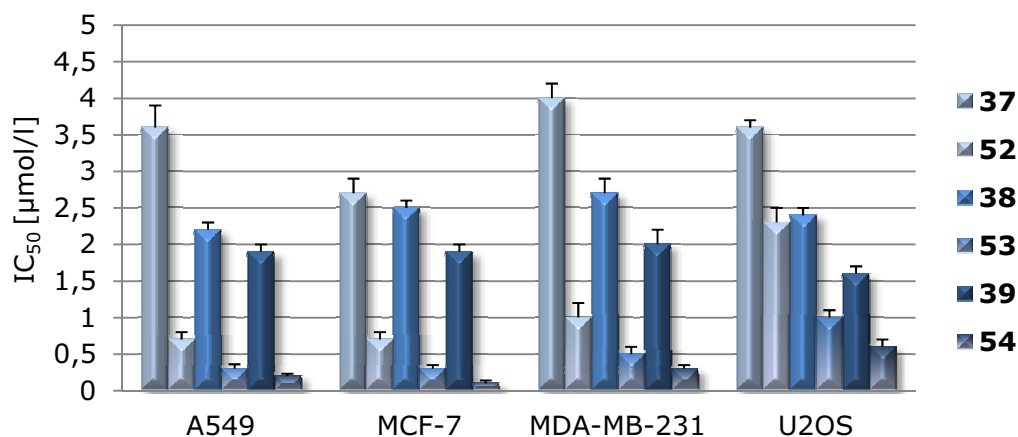


Abb. 73: Vergleich der IC_{50} -Werte der (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-*N*-Alkyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoline (**37-39**; blau) (Tab. 21) mit den (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-*N,N'*-Dialkyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoliniumiodide (**52-54**; graduell-blau) (Tab. 23)

Der Einfluss der Länge der *N*-Alkylkette auf die Zellwachstumshemmung ist auch bei den (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-*N,N'*-Dialkyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoliniumiodiden (**52-54**) ersichtlich. Eine Propylierung führt demzufolge wie bei den einfach alkylierten Verbindungen (**39, 42**) zu den größten zytotoxischen Eigenschaften (**39, 42**: IC_{50} 2.0-0.5 µmol/l; **54, 57**: IC_{50} 0.1-0.6 µmol/l).

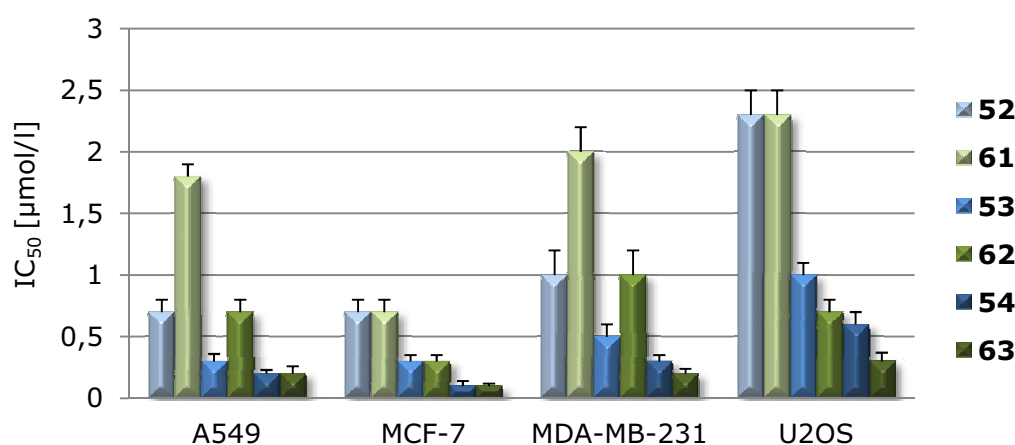


Abb. 74: Vergleich der IC_{50} -Werte der *N,N'*-Dialkyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoliniumiodide mit den Konfigurationen (*4R,5S*)/(*4S,5R*) (**52-54**; blau) (Tab. 23) und (*4R,5R*)/(*4S,5S*) (**61-63**; grün) (Tab. 24)

Die Tendenz der stärkeren Wirksamkeit der Verbindungen mit *(4R,5R)/(4S,5S)* Konfiguration lässt sich für die *N,N'*-Dialkyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoliniumiodide nicht bestätigen (Abb. 74). Im Gegenteil die *N,N'*-dimethyl- und *N,N'*-diethylierten *(4R,5R)/(4S,5S)*-Verbindungen (**61**, **62**) weisen an den A549 und MDA-MB-231 Zellen doppelt so große IC_{50} -Werte auf wie die entsprechenden Diastereomere (**52**, **53**). Erst durch *N,N'*-Dipropylierung ist eine gleichnamige Zytotoxizität der Verbindungen (**54**, **63**) erreicht. Die *N,N'*-Dimethyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoliniumiodide (**52**, **61**) zeigen an den U2OS Zellen die gleiche Toxizität mit den größten IC_{50} -Werten (IC_{50} 2.3 $\mu\text{mol/l}$) der *N,N'*-dialkylierten Verbindungen auf.

Die *N,N'*-dipropylierten 2-Imidazoline (**54**, **57**, **63**, **66**) sind die Verbindungen mit den stärksten zytotoxischen Eigenschaften von den im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten und getesteten Verbindungen. Beispielsweise wurde für die Verbindung **57** an den MCF-7 Zellen ein IC_{50} -Wert von 40 nmol/l ermittelt.

2.4.3 Änderung der Zellmorphologie unter Substanzeinwirkung

Mit Hilfe einer lichtmikroskopischen Untersuchungsmethode wird im Folgenden der Einfluss der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline auf die Zellmorphologie betrachtet. Durch die Substanzeinwirkung können in der Regel für zytotoxische Moleküle deutliche Veränderungen im Aussehen der Zelle wahrgenommen werden. Dadurch können Annahmen über apoptotische oder nekrotische Prozesse getroffen werden.

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden an den A549, MCF-7, MDA-MB-321 und U2OS Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen ausgesät und nach 24 h mit einer ausgewählten Verbindung inkubiert. Die Zellzahl ist je nach verwendeter Zelllinie zum Zeitpunkt der Aussaat um das 50- bis 70-fache größer als die Zellzahl nach der Testung auf Hemmung der Zellproliferation. Demzufolge befinden sich die Zellen am Tag der Substanzzugabe bei einer 60-70%igen Konfluenz. Die Zellfotos wurden unmittelbar nach der Substanzzugabe (0 h) sowie nach 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 24 h und 48 h aufgenommen. Die Aufnahmen erfolgten bei 40-facher Vergrößerung. Weitere Details über die Durchführung werden im Kap. 5.2.3.3 aufgeführt.

Exemplarisch werden die zellmorphologischen Veränderungen des *(4R,5S)/(4S,5R)-N,N'*-Diethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliumiodids **56** mit denen des einfach alkylierten *(4R,5S)/(4S,5R)-N*-Ethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolins **41** in der stark zytotoxischen Konzentration von 10 µmol/l gegenübergestellt (Abb. 75 bis Abb. 78). Bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen war die Änderung in der Zellmorphologie unter Einwirkung der *N,N'*-dialkylierten Verbindung **56** (B) am deutlichsten erkennbar. Innerhalb der ersten 2 h konnten an allen Zelllinien hell durchscheinende Vesikelbläschen beobachtet werden. An den MCF-7 und U2OS Zellen waren diese besonders groß ausgebildet (Abb. 76 und Abb. 78). Des Weiteren sah man nach längerer Inkubationszeit (8-24h) bei den vier Zelllinien eine Zunahme der Vesikelbildung sowie stark ausgedünnte Zellverbände und viele Zelltrümmer. Von den U2OS Zellen wiesen nach 24 h nur noch wenige Zellen klare intrazelluläre Strukturen wie Zellkerne und Kernkörperchen auf (Abb. 78). Die MDA-MB-231 und A549 Zellen zeigten nach 24 h eine deutliche Deformation im Vergleich zu ihrer natürlichen Zellform (Abb. 75 und Abb. 77). Beispielsweise wirkten die MDA-MB-231 Zellen eher zylinderförmig als flach und breit. Nach 48 h konnten bei allen Zelllinien am Boden lediglich Zellfragmente gefunden werden. Im Gegensatz dazu zeigten die Zelllinien auf die einfach alkylierte Verbindung **41** (A) eine viel langsamere Reaktion. Zum Beispiel wurde erst nach 24 h und nur an den A549 Zellen eine sehr feine Vesikelbläschenbildung beobachtet (Abb. 75). Zudem konnte auch bei den MDA-MB-231 Zellen eine Deformierung der Zellen erkannt werden (Abb. 77). Bei den vier Zelllinien sah man nach 24 h etliche hell durchscheinende Zellen im Medium schwimmen sowie vereinzelte Zelltrümmer. Eine Beobachtung über 48 h hinaus wurde nicht weiter verfolgt, da sich die Zellen bereits in vollständiger Konfluenz befanden.

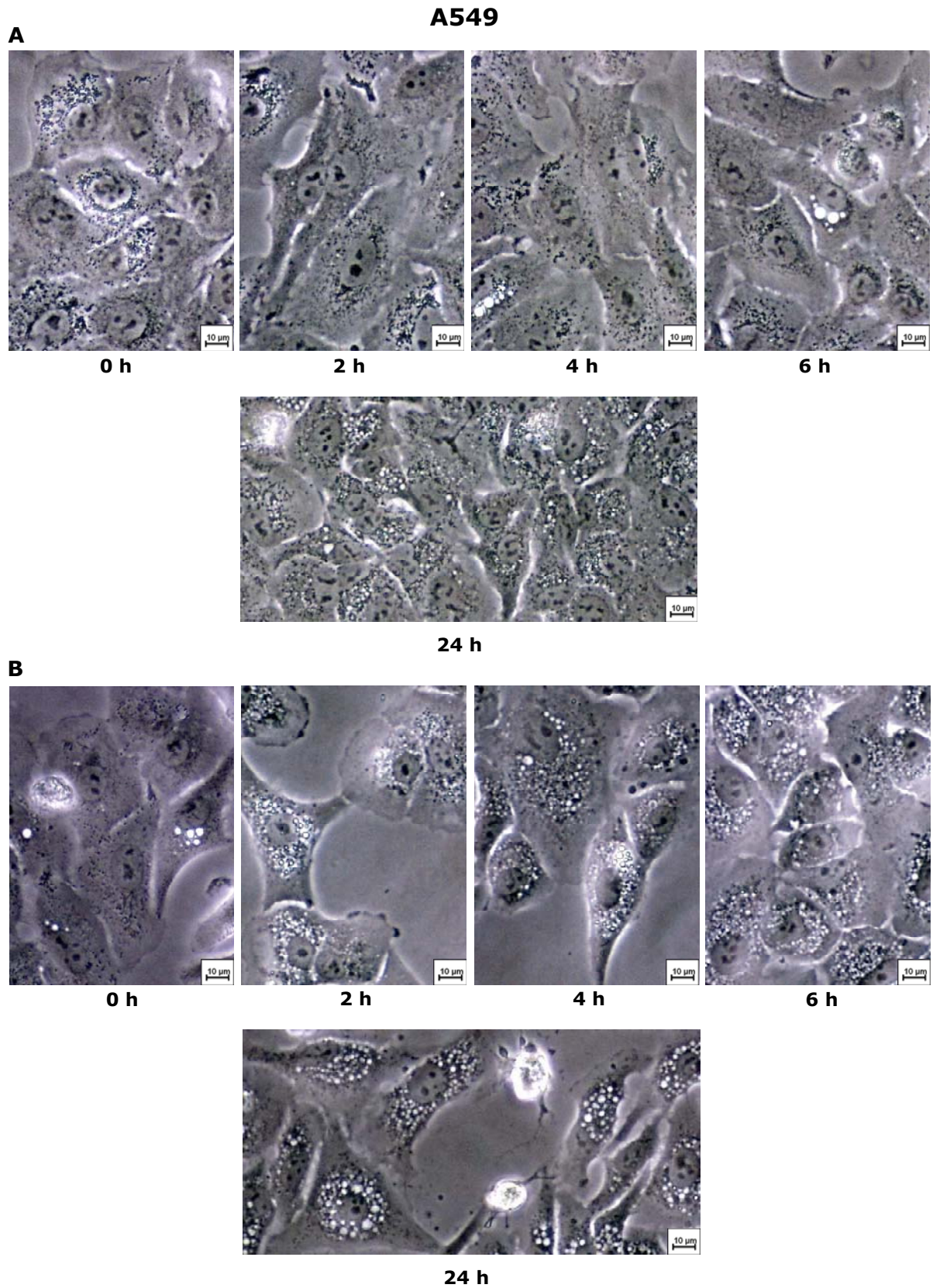


Abb. 75: Zellmorphologien der A549 Zellen nach 0 h, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h; Inkubation mit 10 µmol/l *(4R,5S)/(4S,5R)*-*N*-Ethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliniumhydroiodid **41** (A) und 10 µmol/l *(4R,5S)/(4S,5R)*-*N,N'*-Diethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliniumiodid **56** (B)

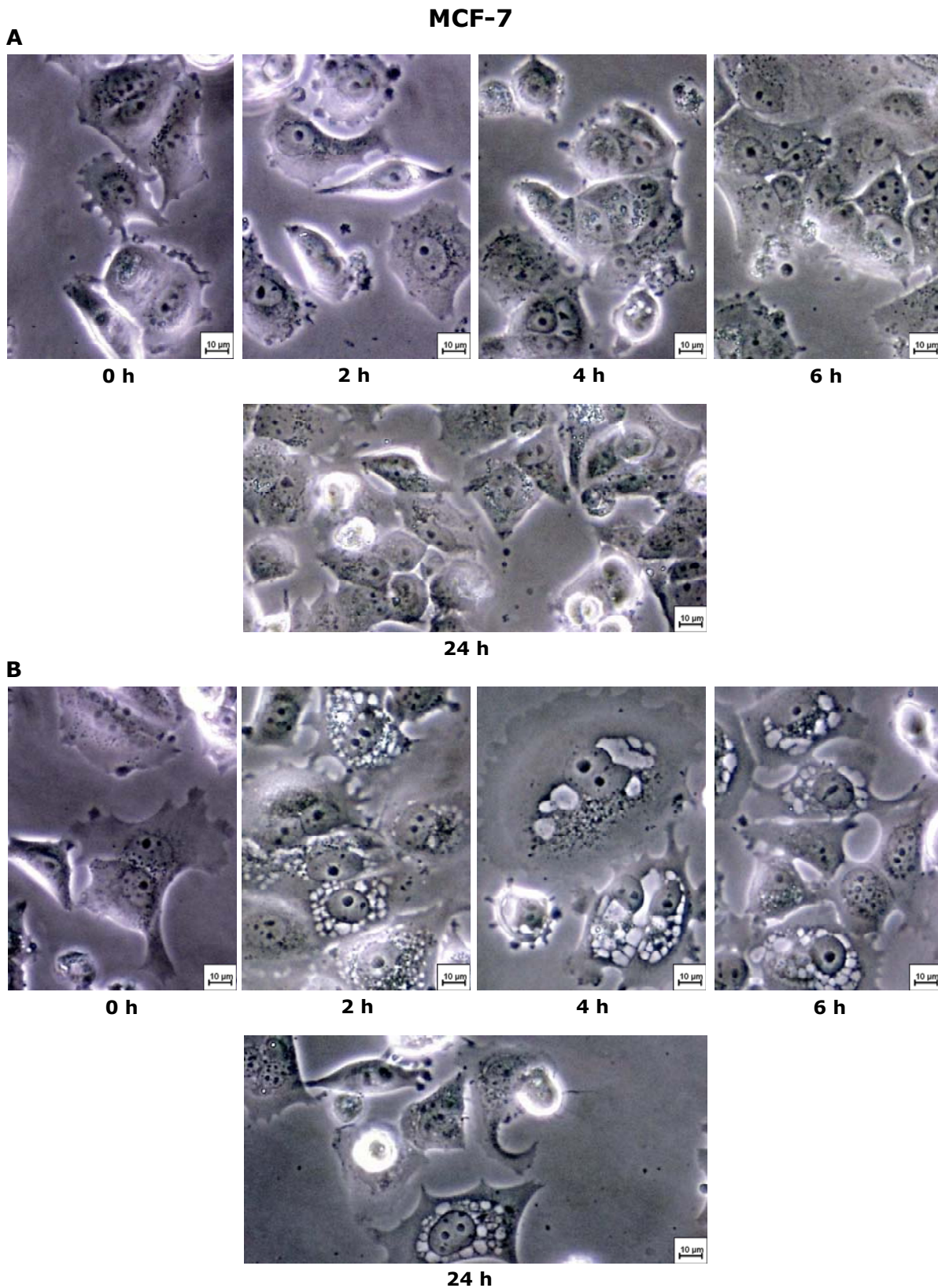


Abb. 76: Zellmorphologien der MCF-7 Zellen nach 0 h, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h; Inkubation mit 10 $\mu\text{mol/l}$ (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-*N*-Ethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliumhydroiodid **41** (A) und 10 $\mu\text{mol/l}$ (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-*N,N'*-Diethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliumiodid **56** (B)

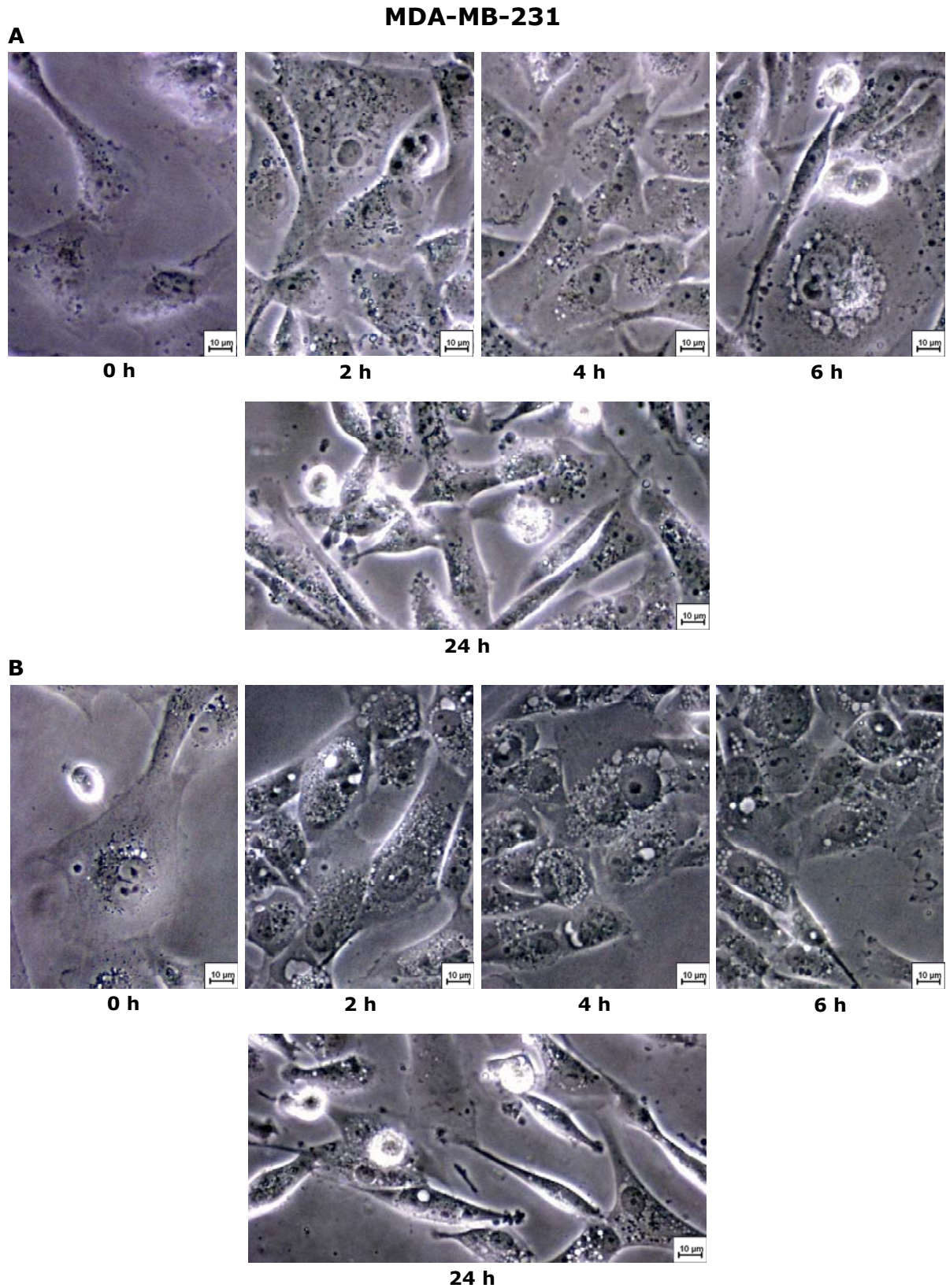


Abb. 77: Zellmorphologien der MDA-MB-231 Zellen nach 0 h, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h; Inkubation mit 10 µmol/l *(4R,5S)/(4S,5R)*-*N*-Ethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliniumhydroiodid **41** (A) und 10 µmol/l *(4R,5S)/(4S,5R)*-*N,N'*-Diethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliniumiodid **56** (B)

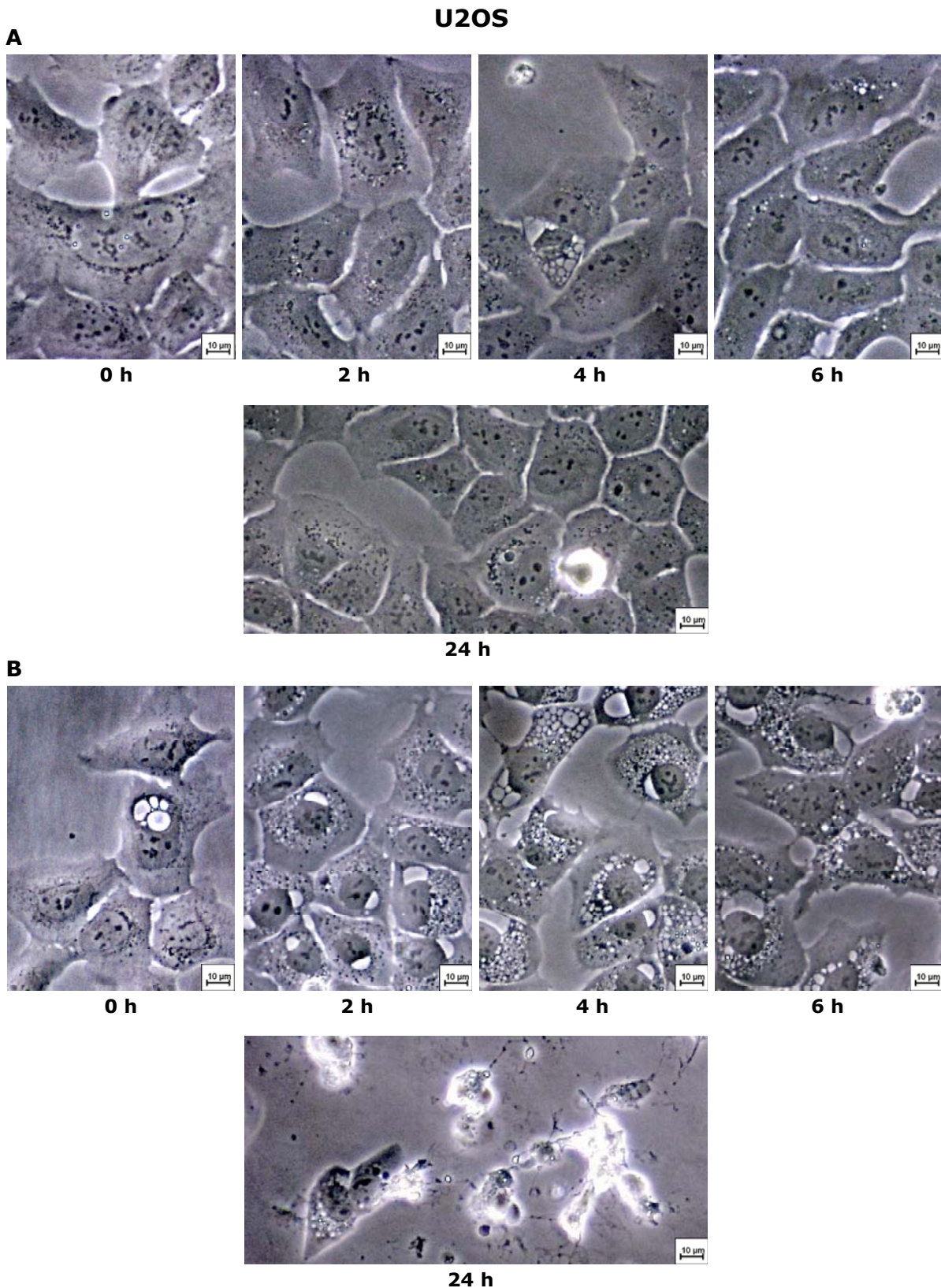


Abb. 78: Zellmorphologien der U2OS Zellen nach 0 h, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h; Inkubation mit 10 µmol/l (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-*N*-Ethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliumhydroiodid **41** (A) und 10 µmol/l (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-*N,N'*-Diethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliumiodid **56** (B)

Weiterhin wurden die zellmorphologischen Veränderungen ausgewählter 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit unterschiedlichen *para*-ständigen Substituenten an den 2,4,5-Triarylen (**19**, **20**, **30**) im Lichtmikroskop untersucht. Die 4-Methylthio-substituierte Verbindung **19** zeigte bei einer Testkonzentration von 20 $\mu\text{mol/l}$ innerhalb von 2-6 h je nach verwendeter Zelllinie hell durchscheinende Vesikelbläschen. Des Weiteren war die Zellzahl nach 24 h deutlich reduziert. Nach 48 h konnten keine lebenden Zellen mehr gefunden werden. Weniger ausgeprägt waren die Reaktionen der Zelllinien auf die 4-Chlor-substituierte Verbindung **20** (20 $\mu\text{mol/l}$), die erst nach 48 h eine beträchtliche Reduktion der Zellzahl aufwies. Mit Ausnahme der A549 Zellen, die präsentierten sich selbst nach 48 h in einem festen Zellverband (Konfluenz). Scheinbar kaum beeinträchtigt wurden die Zellen durch das (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-nitrophenyl)-2-imidazolin **30** (20 $\mu\text{mol/l}$). Darüber hinaus wurde der Einfluss der Diastereomere **18** und **36** auf die Zellmorphologie betrachtet. Die Abb. 79 verdeutlicht den sehr stark zytotoxischen Effekt der Verbindung **18** an den U2OS Zellen gegenüber der nur scheinbar hemmenden Wirkung der Verbindung **36**.

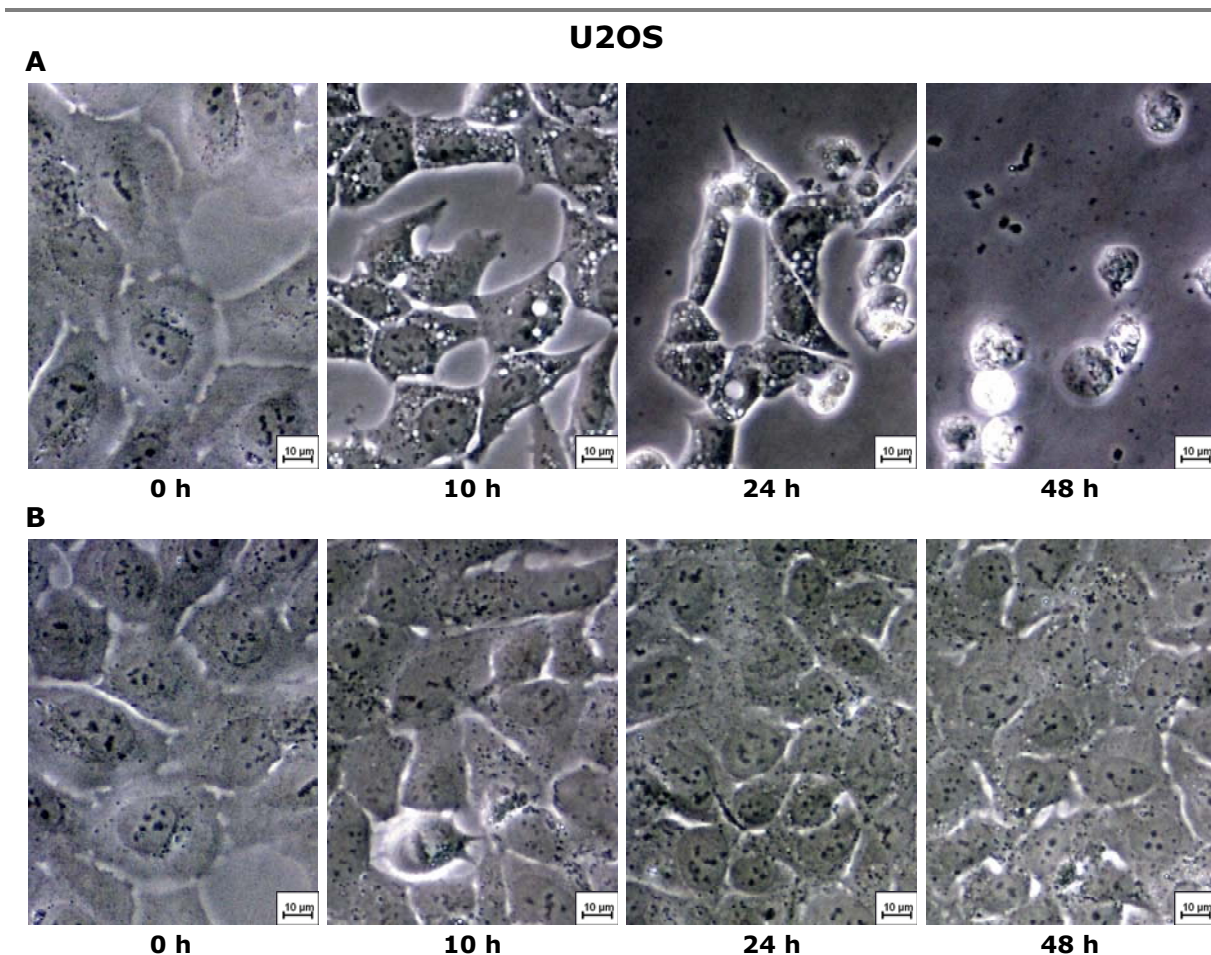


Abb. 79: Zellmorphologien der U2OS Zellen nach 0 h, 10 h, 24 h und 48 h; Inkubation mit 10 $\mu\text{mol/l}$ (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin **18** (A) und 10 $\mu\text{mol/l}$ (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin **36** (B)

Die U2OS Zellen waren durch das Einwirken der Verbindung **18** nach 10 h auf die Hälfte ihrer anfänglichen Größe geschrumpft und nach 48 h konnten lediglich tote Zellen identifiziert werden. An den übrigen Zelllinien war der Unterschied eher minimal. Beide Verbindungen (**18**, **36**) ließen sowohl an den MDA-MB-231 Zellen als auch an den MCF-7 Zellen nach einer Inkubation von 48 h kaum noch lebende Zellen erkennen. Die A549 Zellen befanden sich jeweils nach 48 h in der Konfluenz.

Die untersuchten Verbindungen zeigten besonders im Hinblick auf ihre zytotoxischen Eigenschaften an den einzelnen Zelllinien wider Erwarten stark unterschiedliche Ergebnisse. Denn es scheint als wären die proliferativen Wirkungen einiger Verbindungen (z. B. **20**, **30**, **41**) unter diesen Bedingungen gemindert, da den Zellen ein Wachstum bis zur Konfluenz in kürzester Zeit möglich war. Natürlich kann diese Untersuchungsmethode nicht mit den Testergebnissen aus der Testung auf Hemmung der Zellproliferation verglichen werden, da die Bedingungen vollkommen verschieden gewählt wurden.

Nichtsdestoweniger konnten insbesondere bei den hochtoxischen *N,N'*-dialkylierten Verbindungen (**56**, **65**) außerordentliche zellmorphologische Veränderungen wahrgenommen werden. Die behandelten Zellen wurden daraufhin genauer auf spezifische Merkmale der Apoptose untersucht. In der Abb. 80 sind zur Vereinfachung die morphologischen Veränderungen während der Apoptose skizziert auf denen ein besonderes Augenmerk lag.

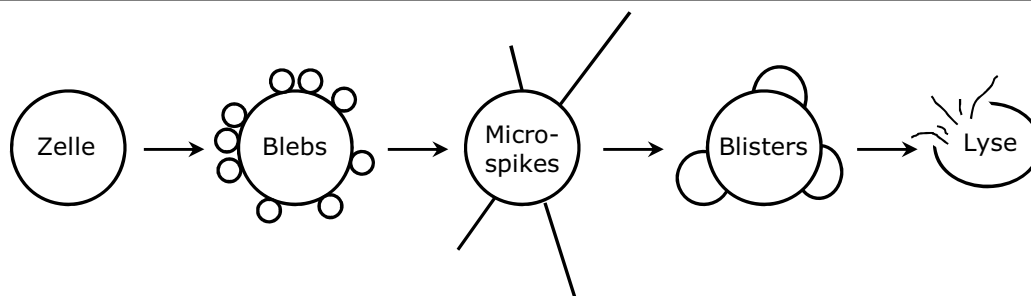


Abb. 80: Morphologische Veränderungen während der Apoptose nach Collins et al. ^[115]

Die vier Zelllinien zeigten durch die Inkubation mit der Verbindung **56** die Charakteristika einer Apoptose (Abb. 81). Vor allem die Ausbildung dünner Microspikes und die Bildung von großen Blasen (Blisters) konnte bei allen Zelllinien gut beobachtet werden. Da in vitro die apoptotische Zelle nicht durch Phagozytose abgebaut werden kann, findet am Ende des apoptotischen Prozesses die Lyse der Zelle statt. Die sich durch das Auslaufen des noch verbleibenden Zellinhalts kennzeichnet.

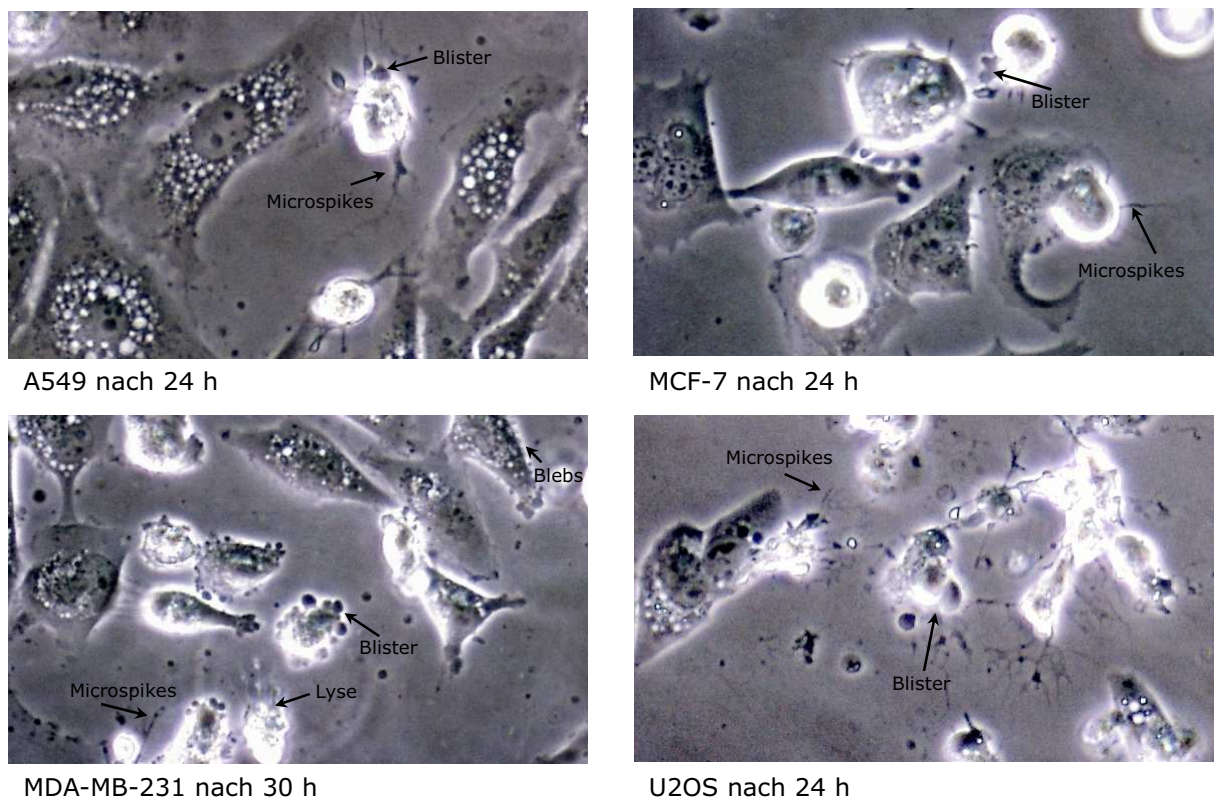


Abb. 81: Morphologische Veränderungen der Zellen während der Apoptose durch Inkubation mit $10 \mu\text{mol/l}$ $(4R,5S)/(4S,5R)$ - N,N' -Diethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliniumiodid **56**

Eine genaue Aussage über den Auslöser und den Mechanismus des apoptotischen Prozesses lässt sich jedoch nicht verfassen. Diese kann erst durch spezielle biochemische Untersuchungen getroffen werden.

2.4.4 Untersuchung der Apoptose

2.4.4.1 Bestimmung der Caspase-3-Aktivität

Die Induktion der Apoptose kann zur Aktivierung der Effektorcaspase-3 führen, die aktiv am Abbau der Zelle beteiligt ist. Die Bestimmung der Enzymaktivität der Caspase-3 erfolgte mit Hilfe einer fluorimetrischen Methode an den MDA-MB-231 und U2OS Zellen. Dafür wurden die Zellen 6-24 h mit den zu untersuchenden Verbindungen inkubiert und anschließend lysiert. Dem Zellextrakt wurde dann das Substrat Ac-DEVD-AMC zugesetzt, welches eine für die Caspase-3 spezifische Spaltungssequenz sowie den Fluorophor 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) enthält.

Wurde der Fluorophor durch die proteolytische Spaltung freigesetzt, kann AMC durch eine Wellenlänge von 380 nm angeregt und bei einer Emissionswellenlänge von 460 nm detektiert werden (Abb. 82).

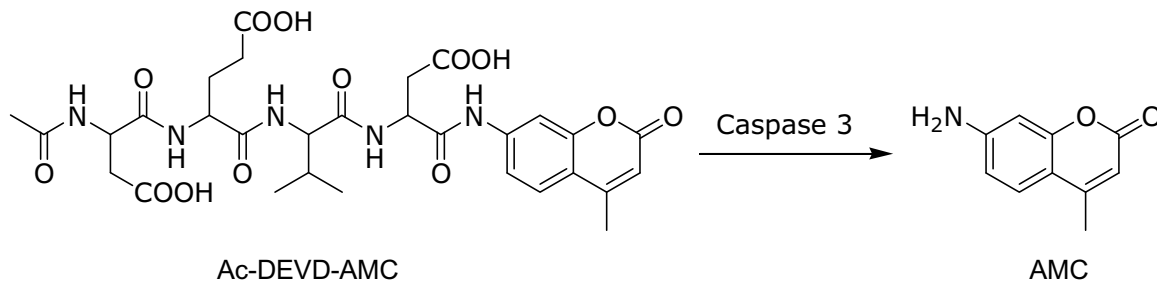


Abb. 82: Aktivierung des Fluoreszenzfarbstoffes 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC)
($\lambda_{\text{Absorption}} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 460 \text{ nm}$)

Die Fluoreszenzintensität kann als Maß für die Aktivität der Caspase-3 herangezogen werden. Eine detaillierte Beschreibung der Testdurchführung und die Berechnung der Enzymaktivität sind im experimentellen Teil im Kap. 5.2.3.4 dieser Arbeit zu finden. Zum Erhalt der Ergebnisse der Caspase-3-Aktivität wurden die Messwerte der Testsubstanzen mit den Messwerten der Lösungsmittelkontrolle in Beziehung gesetzt. Für die Enzymaktivität der Lösungsmittelkontrolle wird ein Wert von Eins angenommen. Die Testergebnisse entsprechen demnach dem x-fachen Wert der Lösungsmittelkontrolle. Die Caspase-3-Aktivität einer Testsubstanz sollte mindestens das 1.5-fache der Lösungsmittelkontrolle betragen, damit von einer Enzymaktivität ausgegangen werden kann.

Das Chinolinalkaloid Camptothecin ist ein hochpotenter Hemmstoff der Topoisomerase I und wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität als Vergleichssubstanz eingesetzt. Außerdem konnten mit Hilfe dieser Verbindung einzelne Testparameter wie Zellzahl, Inkubationszeit und Testkonzentrationen festgelegt werden. Es existieren in der Literatur keine Referenzwerte für die Caspase-3-Aktivität von Camptothecin an den verwendeten Zelllinien.

Unter den Bedingungen des Testsystems wurden an den MDA-MB-231 und U2OS Zellen nach einer Inkubationszeit von 6 h folgende Ergebnisse für Camptothecin ermittelt:

Testkonzentration [$\mu\text{mol/l}$]	MDA-MB-231	U2OS
0.65	1.1 ± 0.04	1.1 ± 0.05
1.25	1.2 ± 0.02	1.1 ± 0.05
2.5	1.4 ± 0.01	1.3 ± 0.1
5	2.4 ± 0.3	1.5 ± 0.1
10	7.6 ± 1.6	6.6 ± 1.9
20	23.9 ± 5.1	29.3 ± 5.8

Caspase-3-Aktivität nach 6 h

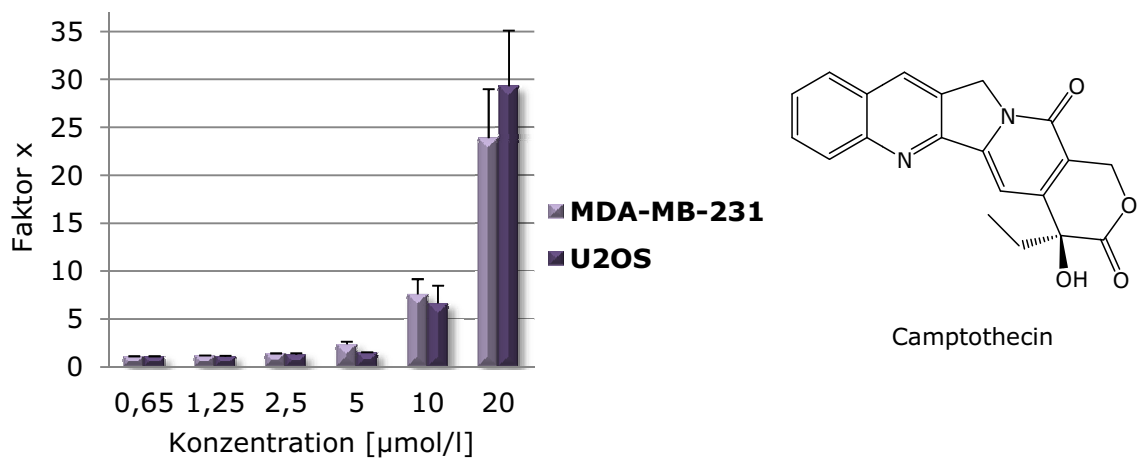


Abb. 83: Caspase-3-Aktivität von Camptothecin an MDA-MB-231 und U2OS Zellen nach einer Substanzinkubation von 6 h

Caspase-3-Aktivität MDA-MB-231

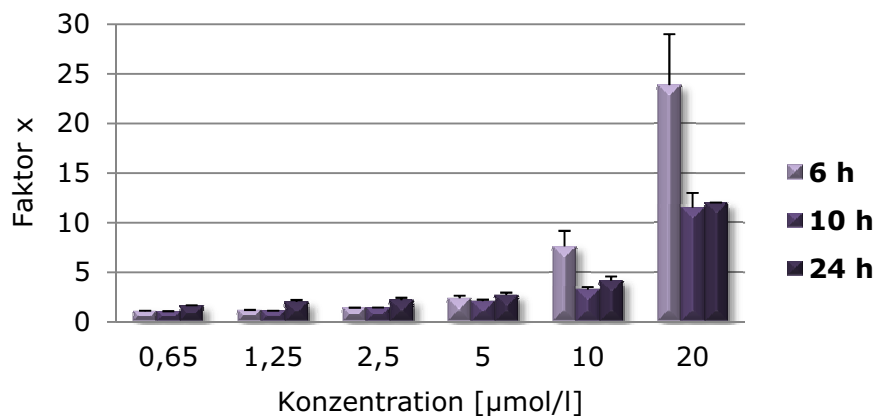
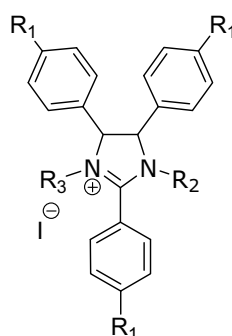


Abb. 84: Caspase-3-Aktivität von Camptothecin an MDA-MB-231 Zellen nach einer Substanzinkubation von 6 h, 10 h und 24 h (Die Werte werden im Einzelnen nicht aufgeführt.)

Eine Caspase-3-Aktivität ist bereits bei einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ Camptothecin nach einer sechsstündigen Inkubation an den MDA-MB-231 Zellen zu verzeichnen (2.4 ± 0.3) (Abb. 83). An den U2OS Zellen wird die Enzymaktivität erst bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ deutlich (6.6 ± 1.9). Verlängert man die Inkubationszeit auf 24 h zeigen auch die sehr gering konzentrierten Camptothecin-Lösungen an den MDA-MB-231 Zellen Caspase-3-Aktivitäten (0.65 $\mu\text{mol/l}$: 1.6 ± 0.1 ; 1.25 $\mu\text{mol/l}$: 2.0 ± 0.2 ; 2.5 $\mu\text{mol/l}$: 2.2 ± 0.2) (Abb. 84). Allerdings konnten die 6 h-Spitzenwerte der 10 $\mu\text{mol/l}$ und 20 $\mu\text{mol/l}$ Lösungen durch eine längere Einwirkzeit von 10 h oder 24 h nicht gehalten bzw. erhöht werden, im Gegenteil die Enzymaktivitäten haben sich drastisch verringert (10 h: 10 $\mu\text{mol/l}$: 3.3 ± 0.3 ; 20 $\mu\text{mol/l}$: 11.5 ± 1.5 ; 20 h: 10 $\mu\text{mol/l}$: 4.2 ± 0.4 ; 20 $\mu\text{mol/l}$: 12.0 ± 0.01). Ein Grund ist eventuell in den sehr stark zytotoxischen Effekten der Verbindung zu finden. Für die Ergebnisse der U2OS Zellen konnte eine ähnliche Entwicklung festgestellt werden. Dennoch sind die Caspase-3-Aktivitäten bei den geringen Konzentrationen deutlich niedriger und die 0.65 $\mu\text{mol/l}$ Testkonzentration von Camptothecin zeigte auch nach 24 h keine Wirksamkeit (Daten nicht gezeigt).

Anhand der Ergebnisse der Voruntersuchungen mit Camptothecin wurden die stark zytotoxisch wirkenden 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline ($\text{IC}_{50} \leq 4 \mu\text{mol/l}$) zu Beginn in sehr hohen Konzentrationen wie 10 $\mu\text{mol/l}$, 20 $\mu\text{mol/l}$ und zum Teil 40 $\mu\text{mol/l}$ mit einer Inkubationszeit von 6 h getestet. Außerdem wurden die Caspase-3-Aktivitäten einzelner Verbindungen bei geringeren Konzentrationen (5 $\mu\text{mol/l}$, 2.5 $\mu\text{mol/l}$ und 1.25 $\mu\text{mol/l}$) und bei längeren Inkubationszeiten von 10 h und 24 h bestimmt. Darüber hinaus wurden das strukturverwandte Nutlin-3a und Cisplatin unter den Bedingungen dieses Testsystems untersucht. Es konnte für beide Verbindungen in keiner der getesteten Konzentrationen (10 $\mu\text{mol/l}$, 20 $\mu\text{mol/l}$ und 40 $\mu\text{mol/l}$) eine Caspase-3-Aktivität ermittelt werden. Auch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 10 h und 24 h lieferte keine Enzymaktivität.

Die Ergebnisse der Caspase-3-Aktivität nach einer sechsstündigen Inkubation der (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-konfigurierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**17**, **18**, **20**, **30**, **37-42**, **52-57**) werden in der Tab. 25 dargestellt. Die dazugehörigen Caspase-3-Aktivitäten der (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**35**, **36**, **46-51**, **61-66**) sind in der Tab. 26 aufgelistet. Die Tab. 25 und Tab. 26 enthalten lediglich die prägnantesten Ergebnisse der getesteten Verbindungen. Auf die Präsentation aller Ergebnisse der einzelnen Testkonzentrationen (z. B. 5 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 20 $\mu\text{mol/l}$) einer Verbindung wurde verzichtet, da für die nicht angegebenen Konzentrationen keine Caspase-3-Aktivität beobachtet werden konnte.



Tab. 25: Caspase-3-Aktivität der (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**17**, **18**, **20**, **30**, **37-42**, **52-57**) nach einer Inkubation von 6 h

Verb.	R ₁	R ₂	R ₃	Konz. [μmol/l]	Caspase-3-Aktivität (Faktor x; keine Aktivität x = 1)	
					MDA-MB-231	U2OS
<u>Tautomer</u>						
17	CH ₃	H	-	20	1.0 ± 0.01	1.1 ± 0.01
18	CH ₂ CH ₃	H	-	20	2.3 ± 0.1	2.1 ± 0.2
20	Cl	H	-	20	1.2 ± 0.04	1.0 ± 0.1
30	NO ₂	H	-	20	1.1 ± 0.02	1.0 ± 0.01
<u>N-Alkylierung</u>						
37	CH ₃	CH ₃	H	40	1.2 ± 0.01	1.1 ± 0.07
38	CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	40	1.1 ± 0.02	1.6 ± 0.04
39	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	H	40	1.9 ± 0.1	2.1 ± 0.2
40	CH ₂ CH ₃	CH ₃	H	20	1.3 ± 0.05	1.2 ± 0.03
				40	-*	-*
41	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	20	1.3 ± 0.04	1.3 ± 0.02
				40	-*	-*
42	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	H	20	1.9 ± 0.1	2.0 ± 0.1
				40	-*	-*
<u>N,N'-Dialkylierung</u>						
52	CH ₃	CH ₃	CH ₃	20	1.1 ± 0.04	1.0 ± 0.03
53	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	20	1.0 ± 0.02	1.1 ± 0.04
54	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	20	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.1
55	CH ₂ CH ₃	CH ₃	CH ₃	10	1.8 ± 0.01	1.6 ± 0.04
				20	2.3 ± 0.05	2.0 ± 0.1
				40	-*	-*
56	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	10	2.0 ± 0.1	1.8 ± 0.05
				20	3.1 ± 0.2	3.1 ± 0.2
				40	-*	-*
57	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	5	2.2 ± 0.02	2.0 ± 0.1
				10	3.7 ± 0.3	3.2 ± 0.2
				20	-*	-*

* Messung ergab kein Messergebnis, da nach der Inkubation keine Zellen mehr in den Vertiefungen vorhanden waren.

Tab. 26: Caspase-3-Aktivität der (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**35**, **36**, **46-51**, **61-66**) nach einer Inkubation von 6 h

Verb.	R ₁	R ₂	R ₃	Konz. [μmol/l]	Caspase-3-Aktivität (Faktor x; keine Aktivität x = 1)	
					MDA-MB-231	U2OS
<u>Tautomer</u>						
35	CH ₃	H	-	20	1.2 ± 0.04	1.1 ± 0.02
36	CH ₂ CH ₃	H	-	20	1.3 ± 0.02	1.2 ± 0.03
<u>N-Alkylierung</u>						
46	CH ₃	CH ₃	H	20	1.7 ± 0.02	1.1 ± 0.01
				40	2.0 ± 0.05	1.4 ± 0.05
47	CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	20	1.7 ± 0.03	1.0 ± 0.04
				40	2.1 ± 0.1	1.3 ± 0.02
48	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	H	10	1.6 ± 0.02	1.1 ± 0.02
				20	2.0 ± 0.1	1.0 ± 0.01
				40	2.9 ± 0.2	1.4 ± 0.03
49	CH ₂ CH ₃	CH ₃	H	20	1.1 ± 0.02	1.1 ± 0.01
				40	-*	-*
50	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	20	1.5 ± 0.04	1.0 ± 0.02
				40	-*	-*
51	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	H	20	1.5 ± 0.01	1.2 ± 0.02
				40	-*	-*
<u>N,N'-Dialkylierung</u>						
61	CH ₃	CH ₃	CH ₃	20	1.0 ± 0.01	1.1 ± 0.03
62	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	20	1.2 ± 0.04	1.6 ± 0.05
63	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	20	1.0 ± 0.02	1.6 ± 0.04
64	CH ₂ CH ₃	CH ₃	CH ₃	10	1.6 ± 0.2	1.4 ± 0.05
				20	2.5 ± 0.2	2.5 ± 0.1
				40	-*	-*
65	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	10	1.6 ± 0.04	1.7 ± 0.02
				20	2.9 ± 0.2	2.7 ± 0.04
				40	-*	-*
66	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	10	1.8 ± 0.1	2.2 ± 0.05
				20	3.2 ± 0.2	2.4 ± 0.1
				40	-*	-*

* Messung ergab kein Messergebnis, da nach der Inkubation keine Zellen mehr in den Vertiefungen vorhanden waren.

Allgemein konnte eine Aktivierung der Caspase-3 für die Verbindungen aus den jeweiligen Verbindungsgruppen festgestellt werden, die sich bei der Testung auf Hemmung der Zellproliferation (Kap. 2.4.2) am effektivsten erwiesen.

Von den getesteten nicht alkylierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen (**17**, **18**, **20**, **30**) zeigt lediglich das (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin **18** nach einer Inkubation von 6 h an beiden Zelllinien eine Caspase-3-Aktivität (20 $\mu\text{mol/l}$: MDA-MB-231 2.3 ± 0.1 ; U2OS 2.1 ± 0.2). Für das entsprechende Diastereomer **36** konnte unter den gleichen Bedingungen keine Enzymaktivität nachgewiesen werden.

Bei den *N*-Alkyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazolinen (**37-39**, **46-48**) verursachten die (*4R,5R*)/(*4S,5S*)-konfigurierten Verbindungen (**46-48**) an den MDA-MB-231 Zellen deutliche Caspase-3-Effekte (Abb. 85). Insbesondere bei der *N*-propylierten Verbindung **48** kann die Caspase-3-Aktivität konzentrationsabhängig gesteigert werden (MDA-MB-231 10 $\mu\text{mol/l}$: 1.6 ± 0.02 ; 20 $\mu\text{mol/l}$: 2.0 ± 0.1 ; 40 $\mu\text{mol/l}$: 2.9 ± 0.2). Diese Ergebnisse wurden jedoch nur an den MDA-MB-231 Zellen erzielt, an den U2OS Zellen blieb eine Wirkung für alle (*4R,5R*)/(*4S,5S*)-*N*-Alkyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoline (**46-48**) aus.

Für die (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-konfigurierten Strukturanaloga (**37-39**) konnte sowohl an den MDA-MB-231 als auch an den U2OS Zellen keine Caspase-3-Aktivität verzeichnet werden (Abb. 85). Eine Ausnahme bildet das (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-*N*-Propyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin **39**. In der Testkonzentration von 40 $\mu\text{mol/l}$ erreicht diese Verbindung **39** an den MDA-MB-231 Zellen eine Enzymaktivität von 1.9 ± 0.1 und an den U2OS Zellen einen Wert von 2.1 ± 0.2 .

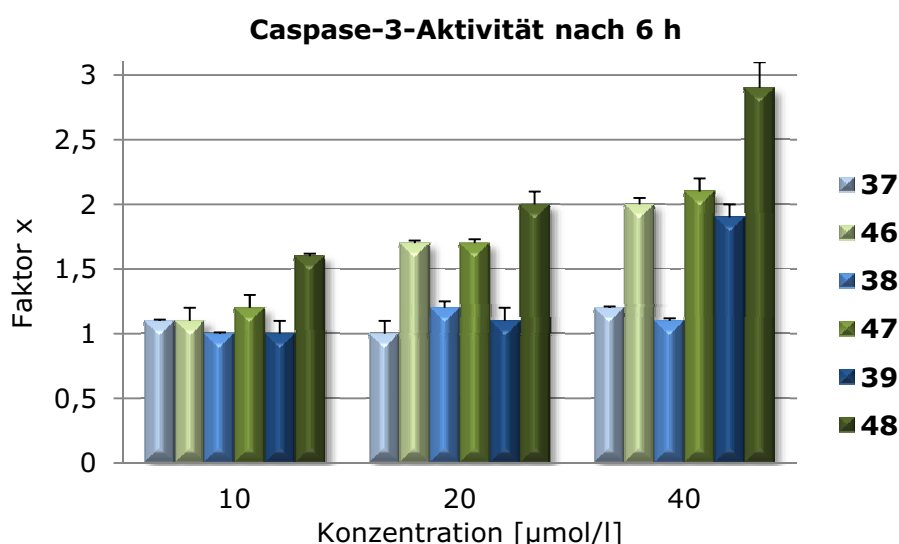


Abb. 85: Caspase-3-Aktivität nach einer Inkubation von 6 h der *N*-Alkyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoline mit den Konfigurationen (*4R,5S*)/(*4S,5R*) (**37-39**; blau) (Tab. 25) und (*4R,5R*)/(*4S,5S*) (**46-48**; grün) (Tab. 26) an den MDA-MB-231 Zellen (Nicht alle Werte werden im Einzelnen aufgeführt.)

Die stärker zytotoxisch wirkenden *N*-Alkyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoline (**40-42**, **49-51**) zeigen wider Erwarten keine Aktivitätssteigerung, sondern zum Teil bei der gleichen Konzentration geringere Werte. Bei einer Konzentration von 40 $\mu\text{mol/l}$ konnten keine Messergebnisse erhalten werden, da innerhalb der Inkubationszeit bereits alle Zellen abgestorben waren.

Die Caspase-3-Aktivitäten der (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-*N,N'*-Dialkyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliniumiodide (**55-57**) werden tendenziell mit zunehmender Alkylkettenlänge größer. Des Weiteren konnten die Messergebnisse durch eine Erhöhung der Konzentration gesteigert werden. In der Abb. 86 wird dieser Zusammenhang exemplarisch für die MDA-MB-231 Zellen nach einer Substanzinkubation von 6 h dargestellt.

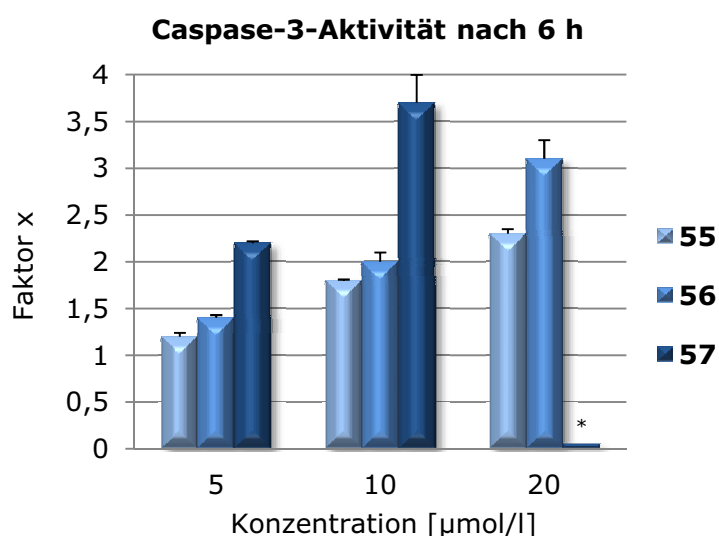


Abb. 86: Caspase-3-Aktivität nach einer Inkubation von 6 h der (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-*N,N'*-Dialkyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliniumiodide (**55-57**) an den MDA-MB-231 Zellen (Tab. 25) (* kein Messergebnis)

Das (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-*N,N'*-Dipropyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliniumiodid **57** wirkte unter den gewählten Bedingungen so stark zytotoxisch, dass aus der Testkonzentration von 20 $\mu\text{mol/l}$ kein Ergebnis resultierte. Das strukturanaloge Diastereomer **66** weist bei dieser Konzentration zum Beispiel an den MDA-MB-231 Zellen eine Caspase-3-Aktivität von 3.2 ± 0.2 auf. In einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ löst die Verbindung **66** hingegen keinen Effekt aus.

Sowohl die *N,N'*-dimethylierten (**55**, **64**) Konfigurationsisomere als auch die *N,N'*-diethylierten (**56**, **65**) 2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoline erreichten untereinander vergleichbare Messergebnisse. Ein Unterschied in der verwendeten Zelllinie ist ebenfalls nicht erkennbar. Für die *N,N'*-Dialkyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoliniumiodide (**52-54**, **61-63**) konnte unter den getesteten Bedingungen keine bzw. eine nur sehr geringe Caspase-3-Aktivität festgestellt werden (≤ 1.7).

In der Abb. 87 sind die Caspase-3-Aktivitäten des $(4R,5S)/(4S,5R)$ - N,N' -Diethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliniumiodids **56** nach unterschiedlich langen Substanzinkubationen an den MDA-MB-231 Zellen gegenübergestellt.

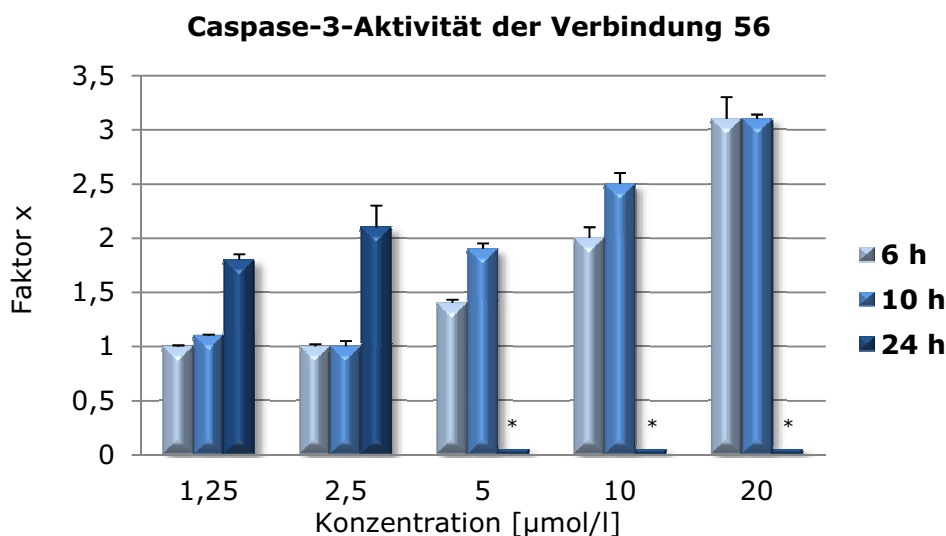


Abb. 87: Caspase-3-Aktivität nach einer Inkubation von 6 h, 10 h und 24 h des $(4R,5S)/(4S,5R)$ - N,N' -Diethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliniumiodids **56** in den Konzentrationen 1.25 $\mu\text{mol/l}$, 2.5 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$ und 20 $\mu\text{mol/l}$ an den MDA-MB-231 Zellen (Nicht alle Werte werden im Einzelnen aufgeführt.) (* kein Messergebnis)

Die Verbindung **56** erreicht bereits innerhalb von 6 h in den Konzentrationen 10 $\mu\text{mol/l}$ und 20 $\mu\text{mol/l}$ eine Aktivierung der Caspase-3 (10 $\mu\text{mol/l}$: 2.0 ± 0.1 ; 20 $\mu\text{mol/l}$: 3.1 ± 0.2). Durch Verlängerung der Inkubationszeit um weitere 4 h konnte auch ein Effekt für die 5 $\mu\text{mol/l}$ Testkonzentration gemessen werden (1.9 ± 0.05). Des Weiteren konnte sich der Wert der Enzymaktivität der 10 $\mu\text{mol/l}$ Konzentration durch das längere Einwirken um 25 % steigern (10 $\mu\text{mol/l}$: 2.5 ± 0.1). Der Messwert für die 20 $\mu\text{mol/l}$ Konzentration läge vermutlich ebenfalls deutlich höher, wenn die Zellzahl an beiden Zeitpunkten gleich groß gewesen wäre. In einem parallel laufenden Kristallviolett-Assay zur Bestimmung der noch lebenden Zellen konnte gezeigt werden, dass sich die Zellzahl nach einer Inkubation von 10 h gegenüber der Lösungsmittelkontrolle bereits um ca. 35 % reduziert hatte. Nach einer Inkubation von 6 h konnte keine nennenswerte Reduktion der Zellzahl gegenüber der Lösungsmittelkontrolle festgestellt werden. Als die MDA-MB-231 Zellen für 24 h mit diesen Testkonzentrationen inkubiert wurden, konnten keine lebenden Zellen mehr detektiert werden. Für die 1.25 $\mu\text{mol/l}$ und 2.5 $\mu\text{mol/l}$ Konzentration wurde nach 24 h keine nennenswerte Reduktion der Zellzahl erfasst, daher konnten die folgenden Caspase-3-Aktivitäten ermittelt werden: 1.25 $\mu\text{mol/l}$: 1.8 ± 0.05 ; 2.5 $\mu\text{mol/l}$: 2.1 ± 0.2 .

2.4.4.2 Nachweis von Einzelstrang-DNA

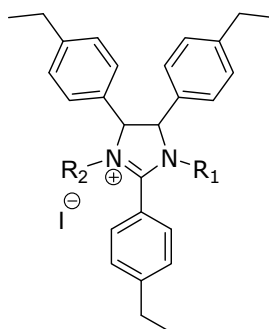
Eine Möglichkeit zwischen Apoptose und Nekrose zu unterscheiden, bietet der Nachweis der Einzelstrang-DNA. Mit Hilfe von Formamid kann die DNA in apoptotischen Zellen denaturiert werden. Die dabei entstehenden einzelsträngigen DNA-Bruchstücke auch single-stranded-DNA (ssDNA) genannt, können durch spezifische monoklonale Antikörper nachgewiesen werden. Nekrotische Zellen bilden im Gegensatz zu den apoptotischen Zellen vermehrt DNA-Doppelstrangbrüche, die durch die verwendeten ssDNA-Antikörper nicht erfasst werden können. ^[116]

Die Untersuchungen auf eine Apoptose induzierende Wirkung an den MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen erfolgte unter Verwendung eines ssDNA-Apoptose-Kits der Firma Chemcon International und wurde an der Medizinischen Universität Innsbruck durch Frau Univ. Doz. Dr. B. Kircher durchgeführt (Kap. 5.2.3.5).

Die MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen wurden für drei Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen ausgewählter 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturen entsprechend aufgearbeitet und vermessen. Die ermittelte Menge an ssDNA wurde durch die im EZ4U-Antiproliferations-Assay (Kap. 5.2.3.5) bestimmte Zelldichte korrigiert und die erhaltenen Werte auf einen Blindwert bezogen. Der Blindwert wurde durch die unbehandelten Zellkulturen erhalten, denen ein Wert von 1 als natürliche Apoptoserate zugeordnet wurde. Des Weiteren diente als Positivkontrolle eine Lösung von 30 ng ssDNA/100 μ l. Der Kontrollwert erreichte eine Apoptose-Induktion von zwei. ^[117]

Die Ergebnisse der ssDNA Untersuchung sind für die (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)- und (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-konfigurierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**18**, **36**, **40**, **49**, **55**, **64**) in der Tab. 27 aufgeführt.

Für die Apoptose induzierende Wirkung der getesteten Verbindungen ist eine deutliche Strukturabhängigkeit zu erkennen. Allgemein bewirkte eine *N*-Alkylierung bzw. eine *N,N'*-Dialkylierung des 2-Imidazolins sehr viel höhere ssDNA-Konzentrationen als die entsprechenden nicht alkylierten Verbindungen (**18**, **36**). Für das (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin **36** war in Konzentrationen von 5 μ mol/l und 10 μ mol/l keine Apoptose nachweisbar. Erst bei Inkubation der beiden Brustkrebszelllinien mit einer Testkonzentration von 25 μ mol/l und 50 μ mol/l konnte eine eindeutige Apoptose-Induktion festgestellt werden (MCF-7: 25 μ mol/l: 2.0 ± 0.5 ; 50 μ mol/l: 3.1 ± 0.7 ; MDA-MB-231: 25 μ mol/l: 3.2 ± 0.3 ; 50 μ mol/l: 5.7 ± 0.6). Das diastereomere Struktur analogon **18** zeigte bereits in den Konzentrationen 7.5 μ mol/l und 10 μ mol/l eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu den unbehandelten Zellkulturen (MCF-7: 7.5 μ mol/l: 1.5 ± 0.5 ; 10 μ mol/l: 2.8 ± 1.2 ; MDA-MB-231: 7.5 μ mol/l: 1.8 ± 0.5 ; 10 μ mol/l: 1.9 ± 0.4).



Tab. 27: Ergebnisse der ssDNA-Bestimmung der (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)- und (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-konfigurierten 2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoline (**18**, **36**, **40**, **49**, **55**, **64**)

Verb.	R ₁	R ₂	Konfiguration	Konz. [μmol/l]	ssDNA-Bestimmung (Faktor x; keine Aktivität x = 1)	
					MCF-7	MDA-MB-231
<u>Tautomer</u>						
18	H	-	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	5	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.1
				7.5	1.5 ± 0.5	1.8 ± 0.5
				10	2.8 ± 1.2	1.9 ± 0.4
36	H	-	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	5	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1
				10	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1
				25	2.0 ± 0.5	3.2 ± 0.3
				50	3.1 ± 0.7	5.7 ± 0.6
<u>N-Alkylierung</u>						
40	CH ₃	H	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	5	1.1 ± 0.05	2.0 ± 0.2
				10	5.9 ± 0.8	6.9 ± 0.8
				25*	13.4 ± 2.3	7.5 ± 0.4
				50*	9.9 ± 1.2	5.6 ± 0.2
49	CH ₃	H	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	5	2.5 ± 0.7	4.0 ± 0.2
				10	6.7 ± 1.2	7.6 ± 0.7
				25*	12.0 ± 1.6	7.9 ± 0.5
				50*	13.0 ± 1.2	6.8 ± 0.2
<u>N,N'-Dialkylierung</u>						
55	CH ₃	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	5	2.2 ± 0.4	2.7 ± 0.6
				10	2.3 ± 0.4	7.0 ± 0.8
				25*	6.0 ± 1.1	8.1 ± 0.6
				50*	13.3 ± 1.6	6.7 ± 0.2
64	CH ₃	CH ₃	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)/(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	5	1.8 ± 0.3	2.2 ± 0.4
				10	1.9 ± 0.4	5.7 ± 0.8
				25*	2.6 ± 0.4	6.5 ± 0.5
				50*	9.9 ± 1.7	8.1 ± 0.8

* Die metabolische Aktivität (EZ4U-Antiproliferations-Assay) ist bei dieser Konzentration der entsprechenden Verbindung ≤ 15 %.

Die Ergebnisse des ssDNA-Assays der *N*-Methyl- (**40**, **49**) bzw. *N,N'*-Dimethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoline (**55**, **64**) werden für die MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen in der Abb. 88 graphisch dargestellt.

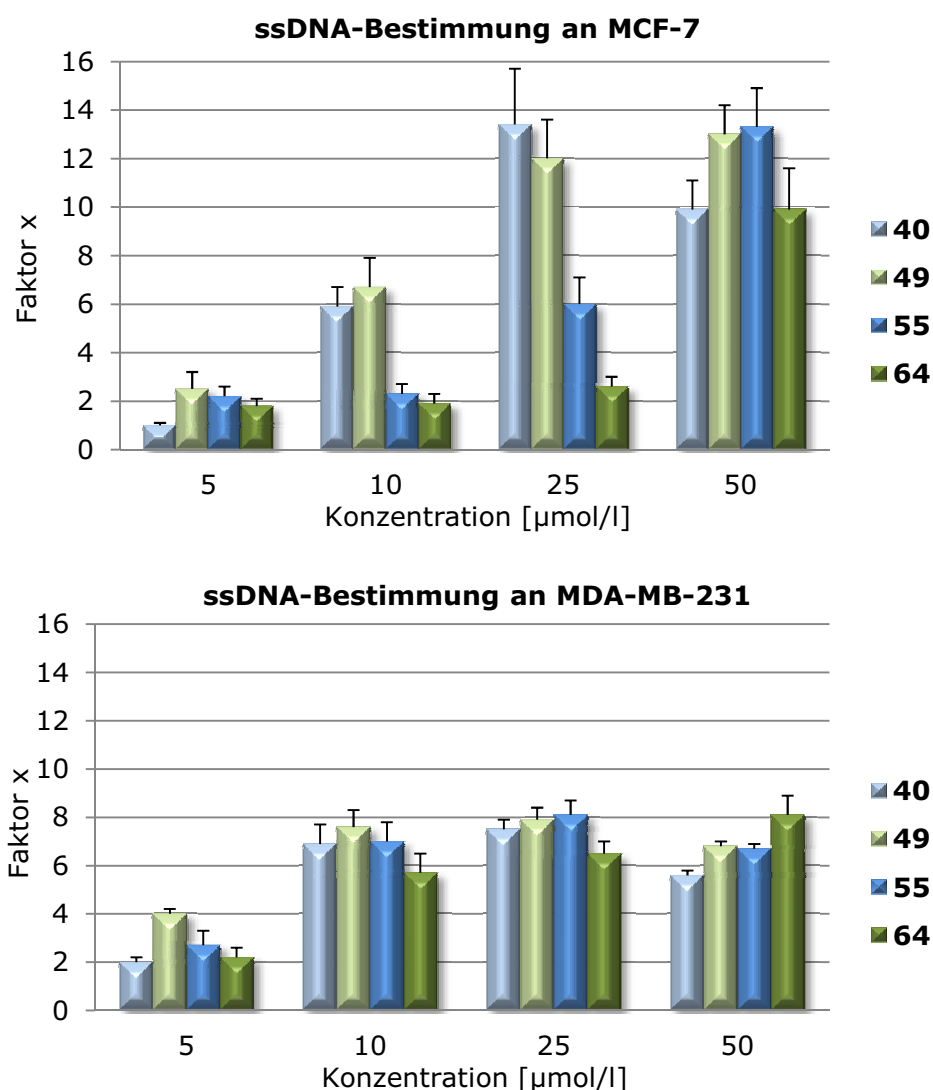
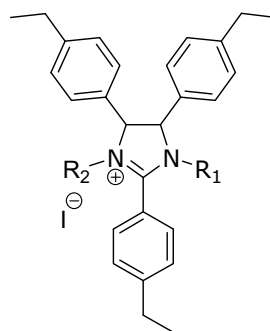


Abb. 88: Ergebnisse des ssDNA-Assays (Tab. 27) der *N*-Methyl- (**40**, **49**) bzw. *N,N'*-Dimethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoline (**55**, **64**) oben: an den MCF-7 Zellen; unten: an den MDA-MB-231 Zellen
Die (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-konfigurierten Verbindungen (**40**, **55**) sind blau und die (*4R,5R*)/(*4S,5S*) Konfigurationsisomere (**49**, **64**) sind grün dargestellt.

Die einfach methylierten Verbindungen (**40**, **49**) erzeugten an den MCF-7 Zellen in den Testkonzentrationen 10 µmol/l und 25 µmol/l im Durchschnitt dreimal größere ssDNA-Ergebnisse als die *N,N'*-dialkylierten Verbindungen (**55**, **64**). An den MDA-MB-231 Zellen konnte dieser Unterschied nicht dargelegt werden. In den geringeren Konzentrationen (5 µmol/l, 10 µmol/l) erzielten die getesteten Verbindungen an den MDA-MB-231 Zellen insgesamt höhere Apoptose-Induktionen als an der MCF-7 Zelllinie. Die Spitzenwerte von 13.4 ± 2.3 (**40**) und 12.0 ± 1.6 (**49**) der *N*-methylierten Verbindungen (**40**, **49**) in der Konzentration von 25 µmol/l konnte nur an den MCF-7 Zellen erreicht werden. An der anderen

Brustkrebszelllinie lag die Apoptoserate dieser beiden Verbindungen (**40**, **49**) unter acht. Des Weiteren ist auffällig, dass die Apoptoserate an den MDA-MB-231 Zellen bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$ nicht mehr anstieg, sondern wieder abnahm. Eine Ausnahme bildete das *(4R,5R)/(4S,5S)*-*N,N'*-Dimethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliniumiodid **64**, das durch die Konzentrationserhöhung einen ssDNA-Wert von 8.1 ± 0.8 erreichte (25 $\mu\text{mol/l}$: 6.5 ± 0.5). Diese Abnahme der ssDNA-Konzentration lässt sich durch eine Überlagerung von apoptotischen und nekrotischen Vorgängen erklären. Der gleichzeitig durchgeführte EZ4U-Antiproliferations-Assay zeigte bei einer Konzentration von 25 $\mu\text{mol/l}$ und 50 $\mu\text{mol/l}$ eine vergleichbare Reduktion der Zellmenge. Die DNA-Strangbrüche nekrotischer Zellen werden mit diesem Assay nicht erfasst, dementsprechend fallen die Apoptosewerte niedriger aus. An den MCF-7 Zellen konnte dieser Zusammenhang lediglich für das *(4R,5S)/(4S,5R)*-*N*-Methyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin **40** festgestellt werden. Bei den übrigen Verbindungen (**49**, **55**, **64**) kam es zu einer Zunahme der Apoptose-Induktion durch die Konzentrationssteigerung.



Tab. 28: Zusammenfassung der Zytotoxizitäts- und Apoptose-Untersuchungen der *(4R,5S)/(4S,5R)*- und *(4R,5R)/(4S,5S)*-konfigurierten 2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoline (**40**, **49**, **55**, **64**) an den MDA-MB-231 Zellen

Verb.	R ₁	R ₂	MDA-MB-231			
			IC ₅₀ [$\mu\text{mol/l}$]	Konz. [$\mu\text{mol/l}$]	Apoptose-Bestimmung (Faktor x; keine Aktivität x = 1)	
				Caspase-3	ssDNA	
<u>Konfiguration <i>(4R,5S)/(4S,5R)</i></u>						
40	CH ₃	H	0.9 \pm 0.2	10	1.0 \pm 0.02	6.9 \pm 0.8
				20/25	1.3 \pm 0.05	7.5 \pm 0.4
55	CH ₃	CH ₃	0.2 \pm 0.05	10	1.8 \pm 0.01	7.0 \pm 0.8
				20/25	2.3 \pm 0.05	8.1 \pm 0.6
<u>Konfiguration <i>(4R,5R)/(4S,5S)</i></u>						
49	CH ₃	H	0.5 \pm 0.1	10	1.0 \pm 0.01	7.6 \pm 0.7
				20/25	1.1 \pm 0.02	7.9 \pm 0.5
64	CH ₃	CH ₃	0.2 \pm 0.05	10	1.6 \pm 0.2	5.7 \pm 0.8
				20/25	2.5 \pm 0.2	6.5 \pm 0.5

Die Testergebnisse der bisherigen Apoptose-Untersuchungen zeigen, dass die 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline durchaus in der Lage sind den programmierten Zelltod auszulösen. Dennoch scheint die Apoptose in der ausführenden Phase nicht vornehmlich über die Effektorcaspase-3 zu verlaufen (Tab. 28). Für die *N*-methylierten Verbindungen **40** und **49** konnten unter den gewählten Testbedingungen keine Caspase-3-Aktivitäten jedoch eine deutliche ssDNA-Konzentration nachgewiesen werden. Das Gleiche gilt für das (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-nitrophenyl)-2-imidazolin **30**, welches in der Konzentration von 10 µmol/l einen Wert von 2.6 ± 0.3 an den MDA-MB-231 Zellen im ssDNA-Assay erzielte (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu ist bei den *N,N'*-dimethylierten Verbindungen (**55**, **64**) eine Beteiligung der Caspase-3 am Apoptoseprozess erkennbar. In weiteren molekularbiologischen Untersuchungen muss nun geklärt werden, ob die Reaktionskaskade der Caspase-3 über den p53-gesteuerten Signalweg ausgelöst wurde.

2.4.4.3 Immunhistochemische Quantifizierung von p53 und Hdm2

Eine Stimulation von p53 durch die Einwirkung bestimmter Verbindungen auf entartete Zellen kann ein möglicher Weg zur kontrollierten Auslösung der Apoptose sein. Mit Hilfe einer immunhistochemischen Methode konnte die gebildete Menge an p53 in A549 Zellen quantifiziert werden. Des Weiteren wurde mit diesem Testverfahren gleichzeitig die Proteinmenge des Gegenspielers Hdm2 erfasst. Die A549 Zellen eigneten sich im besonderen Maße für diesen Zelltest, da zum einen vorausgesetzt wird, dass es sich um wt-p53-exprimierende Tumorzellen handelt und zum anderen ist es von Vorteil, dass das Protein Hdm2 vermehrt exprimiert wird.^[99]

In Abb. 89 ist das Prinzip der immunhistochemischen Proteinbestimmung von p53 und Hdm2 schematisch dargestellt. Es handelt sich dabei um eine indirekte Bestimmung der Immunfluoreszenz, bei der zunächst die A549 Zellen für 18 h mit unterschiedlichen Konzentrationen ausgewählter 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellkulturen fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen p53 bzw. Hdm2 versetzt. Nach dem gründlichen Auswaschen der überschüssigen Primärantikörper wurden fluoreszenzmarkierte Anti-Antikörper zugefügt, die die Detektion der primären Antikörper ermöglichen. Die Fluoreszenzintensität kann als Maß für die Proteinmenge von p53 bzw. Hdm2 herangezogen werden. Der grüne Fluoreszenzfarbstoff DyLight™ 488 macht dementsprechend Hdm2 in der Zelle sichtbar und die gelb-orangefarbene Fluoreszenz des DyLight™ 550 entspricht p53. Aufgrund der Messtechnik des Plattenreaders konnte zusätzlich das Kompartiment der Zelle bestimmt werden, in dem die Proteine lokalisiert sind. Eine detaillierte Beschreibung der Testdurchführung und die Berechnung der Proteinaktivitäten sind im experimentellen Teil im Kap. 5.2.3.6 dieser Arbeit zu finden.

Hoechst Dye wurde zum Anfärben der DNA im Zellkern benutzt. Die angefärbten Zellkerne ließen Rückschlüsse über die Zelldichte in einem Well zu. Die ermittelte Menge des jeweiligen Proteins wurde durch die mit Hoechst Dye bestimmte Zellzahl korrigiert. Der Wert der Proteinaktivität einer Testsubstanz sollte mindestens das 1.5-fache der Lösungsmittelkontrolle betragen, damit von einer p53- bzw. Hdm2-Aktivität ausgegangen werden kann.

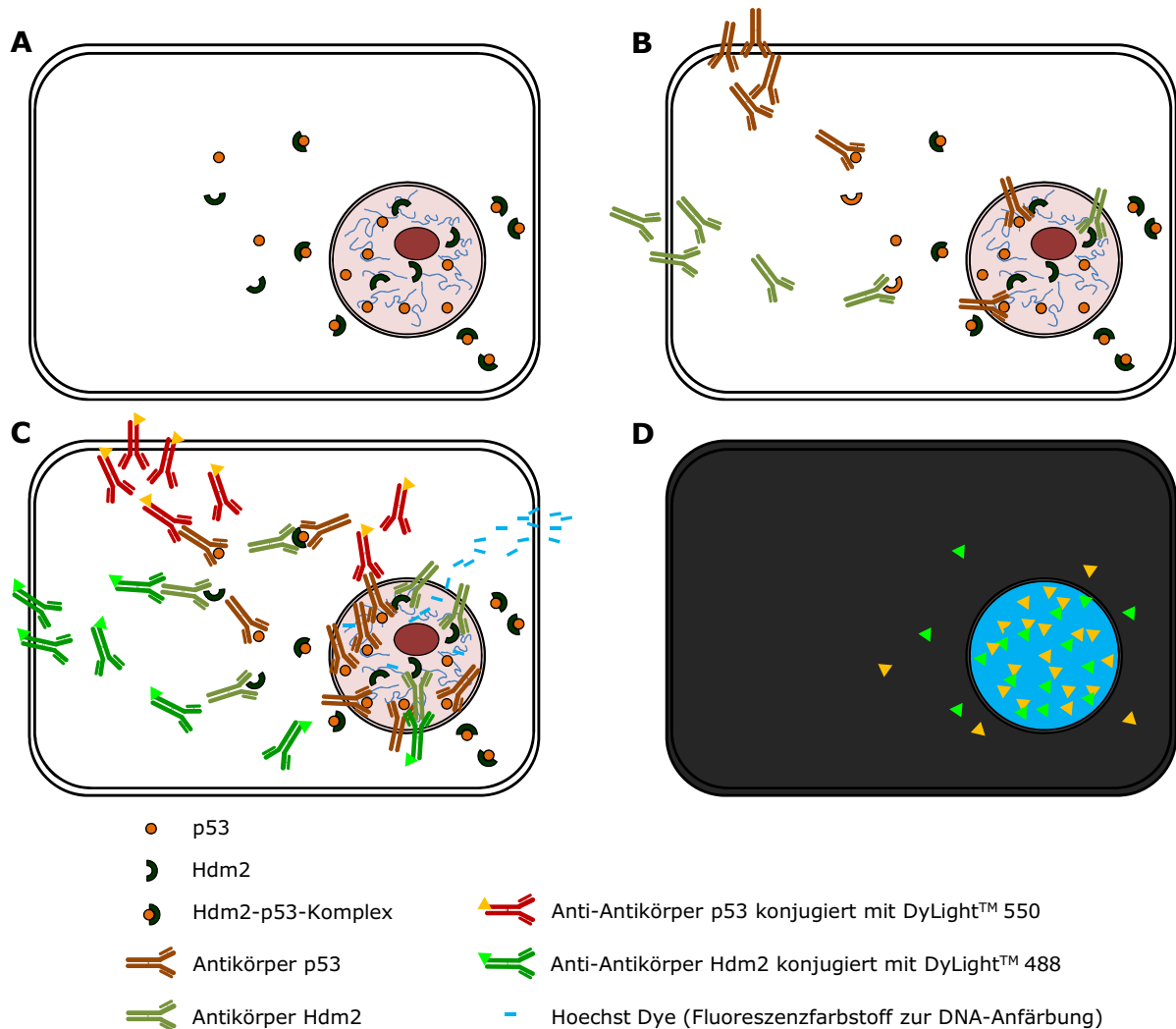


Abb. 89: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz

A: apoptotische Zelle nach 18 h Substanzinkubation; B: Zugabe der spezifischen Antikörper gegen p53 und Hdm2 (Primärantikörper); C: Zugabe der fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen die p53- bzw. Hdm2-Antikörper (Sekundärantikörper) und Hoechst Dye zur DNA-Anfärbung; D: fluorimetrische Quantifizierung der Proteine im Zytoplasma und Zellkern, sowie Bestimmung der Zellzahl über die angefärbten Zellkerne

Als Vergleichssubstanzen wurden für diese pharmakologischen Untersuchungen abermals Nutlin-3a und Camptothecin eingesetzt. Bei Camptothecin ist aufgrund seines Wirkungsmechanismus mit einem großen Anstieg an p53 in der Tumorzelle zu rechnen, da die Verbindung den Topoisomerase-I-DNA-Komplex stabilisiert und somit einen Wiederverschluss der DNA-Doppelhelix nach deren Ent-

spiralisierung verhindert. Die Folge sind Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA, die letztendlich zum programmierten Zelltod führen.^[13, 118] Nutlin-3a ist zum einen in der Lage p53 aus dem Hdm2-p53-Komplex wieder zu aktivieren und zum anderen schützt es das Protein durch Hemmung von Hdm2 vor einem erneuten Abbau.^[50] Es sind demzufolge ein erhöhter p53- und Hdm2-Spiegel in den A549 Zellen zu erwarten.

Camptothecin erzielte in den getesteten Konzentrationen (1.25 µmol/l bis 10 µmol/l) einem Maximaleffekt von Faktor $x = 6$ bei der Hdm2-Proteinaktivität, die entsprechenden p53-Werte betragen das 16-fache der Lösungsmittelwerte. In der Literatur ist für Hdm2 ein EC_{50} -Wert von 9.7 ± 0.7 nmol/l und für p53 ein EC_{50} -Wert von 0.6 ± 0.05 µmol/l an A549 Zellen zu finden.^[119]

Neben Camptothecin als DNA-schädigendes Agens wurde auch Cisplatin auf diese pharmakologischen Eigenschaften untersucht. Durch die Querverknüpfung der DNA-Stränge verursacht Cisplatin in der Tumorzelle Apoptose, die über den p53-vermittelten Signalweg verlaufen kann.^[120] Unter den Bedingungen des Testsystems wurden an den A549 Zellen nach einer Inkubationszeit von 18 h folgende Ergebnisse für Cisplatin ermittelt:

	p53	Hdm2
EC_{50}	18.3 ± 1.4 µmol/l	17.8 ± 1.5 µmol/l
Faktor x (EC_{50})	2.7 ± 0.2	3.1 ± 0.3
Maximaler Effekt (E_{max})	20 µmol/l	
Faktor x (E_{max})	8.9 ± 0.3	6.2 ± 0.3

Für Nutlin-3a konnten unter denselben Testbedingungen die nachstehenden Ergebnisse erhalten werden:

	p53	Hdm2
EC_{50}	6.8 ± 0.3 µmol/l	5.0 ± 0.1 µmol/l
Faktor x (EC_{50})	5.2 ± 0.2	9.4 ± 0.3
Maximaler Effekt (E_{max})	15 µmol/l	6 µmol/l
Faktor x (E_{max})	7.5 ± 0.4	15.5 ± 2.0

Die ermittelten EC_{50} -Werte von Nutlin-3a stimmen in etwa auch mit den Angaben in der Literatur überein (Hdm2: $EC_{50} = 3$ µmol/l; p53: $EC_{50} = 4$ µmol/l).^[119] Für Cisplatin gibt es keine Referenzen.

In der Abb. 90 sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Nutlin-3a und Cisplatin der jeweiligen Proteinbestimmung dargestellt.

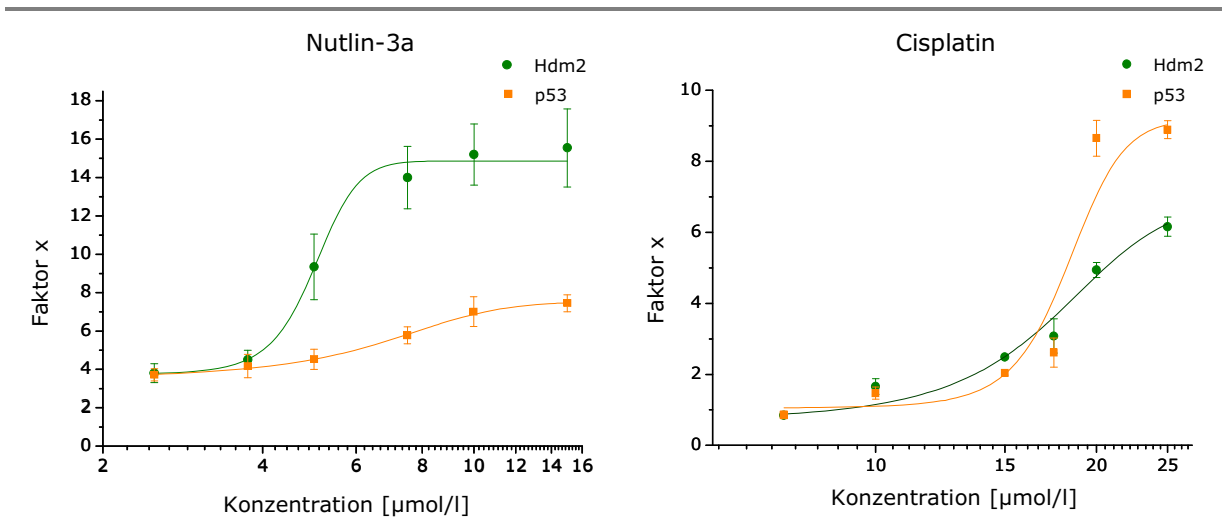
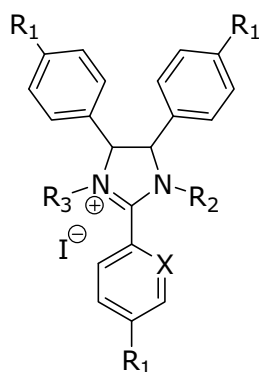


Abb. 90: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Nutlin-3a und Cisplatin der immunhistochemischen Bestimmung von Hdm2 und p53 nach einer Inkubation von 18 h an den A549 Zellen

Auffällig ist, dass durch Nutlin-3a deutlich mehr Hdm2 in der Zelle gebildet wurde als p53. Im Gegensatz dazu wurde bei den mit Cisplatin inkubierten Zellen eine deutlich höhere p53-Aktivität gefunden. Die Kurvenverläufe entsprechen den vom Wirkmechanismus der Verbindungen abgeleiteten Erwartungen. Cisplatin löst eine DNA-Schädigung in der Zelle aus. Daraufhin wird p53 freigesetzt, um den entstandenen Schaden zu reparieren oder gegebenenfalls den Zelltod einzuleiten. Gleichzeitig wird sein Gegenspieler Hdm2 vermehrt exprimiert um dem hohen p53-Level entgegenzuwirken und die drohende Apoptose zu verhindern.

Nutlin-3a hemmt die Interaktion von Hdm2 mit p53, das spiegelt sich in der hohen Konzentration von Hdm2 in der Tumorzelle wieder. Die Zelle versucht dem zu geringen p53-Abbau mit vermehrter Hdm2-Expression entgegenzusteuern. Der maximale p53-Effekt ist bei beiden Verbindungen vergleichbar (Faktor $x = 8$), jedoch erzielt Nutlin-3a einen deutlich kleineren EC_{50} -Wert ($6.8 \pm 0.3 \mu\text{mol/l}$) als Cisplatin ($18.3 \pm 1.4 \mu\text{mol/l}$).

In der Tab. 29 sind die Testergebnisse der immunhistochemischen Bestimmung von p53 und Hdm2 der für die Testung ausgewählten (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-konfigurierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline aufgelistet. Die Tab. 30 zeigt die dazugehörigen Ergebnisse der (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline.



Tab. 29: Ergebnisse der p53- und Hdm2-Bestimmung der (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**17**, **18**, **20**, **26**, **30**, **33**, **37-42**, **44**, **52-57**, **59**) nach einer Inkubation von 18 h an der A549 Zelllinie

Verb.	R ₁	R ₂	R ₃	X	Konz. [μmol/ l]	Enzym-Aktivität (Faktor x; keine Aktivität x = 1)	
						p53	Hdm2
<u>Tautomer</u>							
17	CH ₃	H	-	CH	15	1.0 ± 0.1	1.6 ± 0.3
					20	2.1 ± 0.1	2.2 ± 0.1
18	CH ₂ CH ₃	H	-	CH	7.5	2.2 ± 0.2	1.6 ± 0.1
20	Cl	H	-	CH	7.5	1.1 ± 0.04	1.6 ± 0.3
					10	1.4 ± 0.03	2.5 ± 0.6
26	OCH ₃ *	H	-	N	10	0.9 ± 0.2	1.4 ± 0.1
					20	2.0 ± 0.1	2.2 ± 0.3
30	NO ₂	H	-	CH	20	1.1 ± 0.2	1.5 ± 0.3
33	CN	H	-	CH	20	1.3 ± 0.1	1.9 ± 0.2
<u>N-Alkylierung</u>							
37	CH ₃	CH ₃	H	CH	20	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.4
38	CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	CH	10	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.3
39	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	H	CH	10	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.3
40	CH ₂ CH ₃	CH ₃	H	CH	7.5	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.2
41	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	CH	10	1.3 ± 0.1	1.5 ± 0.2
42	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	H	CH	5	1.5 ± 0.02	1.0 ± 0.1
44	Cl	CH ₂ CH ₃	H	CH	7.5	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.3
<u>N,N'-Dialkylierung</u>							
52	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH	20	0.9 ± 0.1	1.3 ± 0.3
53	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH	10	1.0 ± 0.02	1.0 ± 0.2
54	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH	10	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1
55	CH ₂ CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH	7.5	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1
56	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH	5	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.01
57	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH	5	1.5 ± 0.2	1.6 ± 0.2
59	Cl	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH	10	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.1

* Verbindung **26** trägt keinen R₁ am Aromaten in Position 2 (R₁ = H)

Tab. 30: Ergebnisse der p53- und Hdm2-Bestimmung der (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**35**, **36**, **46-51**, **61-66**) nach einer Inkubation von 18 h an der A549 Zelllinie; (X = CH)

Verb.	R ₁	R ₂	R ₃	Konz. [μmol/l]	Enzym-Aktivität (Faktor x; keine Aktivität x = 1)	
					p53	Hdm2
<u>Tautomer</u>						
35	CH ₃	H	-	10	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.2
36	CH ₂ CH ₃	H	-	10	0.7 ± 0.2	1.0 ± 0.3
<u>N-Alkylierung</u>						
46	CH ₃	CH ₃	H	10	1.2 ± 0.1	1.6 ± 0.4
47	CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	10	1.3 ± 0.1	1.5 ± 0.4
48	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	H	5	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.3
49	CH ₂ CH ₃	CH ₃	H	7.5	1.7 ± 0.02	1.6 ± 0.3
50	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	H	10	1.2 ± 0.2	1.4 ± 0.4
51	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	H	7.5	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.3
<u>N,N'-Dialkylierung</u>						
61	CH ₃	CH ₃	CH ₃	10	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.1
62	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	7.5	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.2
63	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	7.5	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.2
64	CH ₂ CH ₃	CH ₃	CH ₃	7.5	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.2
65	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	7.5	1.0 ± 0.02	1.2 ± 0.2
66	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	7.5	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.2

Die getesteten 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline lösten entgegen den Erwartungen der Voruntersuchungen in den A549 Zellen entweder keine oder lediglich sehr geringe p53- bzw. Hdm2-Konzentrationen aus. Die Verbindungen (**17**, **18**, **20**, **26**) mit einer positiven Proteinaktivität wurden in weiteren Zelltests genauer untersucht. Dazu erfolgte die Testung der einzelnen Verbindungen in mindestens fünf verschiedenen Konzentrationen. Dadurch konnten die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der jeweiligen Proteine erstellt und EC₅₀-Werte berechnet werden (Tab. 31).

Tab. 31: EC₅₀-Werte p53- und Hdm2-Bestimmung der (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**17**, **18**, **20**, **26**) und deren IC₅₀-Werte aus der Testung auf Hemmung der Zellproliferation an der A549 Zelllinie

Verb.	IC ₅₀ -Werte [μmol/l]	EC ₅₀ -Werte [μmol/l]	
		P53	Hdm2
17	2.4 ± 0.1	17.5 ± 0.1	16.1 ± 0.4
18	0.8 ± 0.1	6.2 ± 0.2	-
20	1.5 ± 0.1	10.7 ± 0.2	9.2 ± 0.3
26	7.6 ± 0.8	15.3 ± 1.0	19.5 ± 0.8

Die Verbindungen **17** und **20** unterscheiden sich strukturell lediglich in der *para*-Position der 2,4,5-Triaryle. Verbindung **20** besitzt gegenüber Verbindung **17** einen 4-Chlorsubstituenten anstatt einer 4-Methylgruppe. Interessanterweise zeigt die Verbindung **17** gegen über der Verbindung **20** eine deutliche Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Hdm2 und p53 (Abb. 91), obwohl sich die Verbindungen in ihren IC_{50} -Werten der Zytotoxizitätsuntersuchungen nicht wesentlich stark voneinander unterscheiden (**17**: $IC_{50} = 2.4 \pm 0.1 \mu\text{mol/l}$; **20**: $IC_{50} = 1.5 \pm 0.1 \mu\text{mol/l}$). Sowohl der EC_{50} -Wert der p53- als auch der Hdm2-Bestimmung des (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolins **17** betragen fast das doppelte der EC_{50} -Werte der Verbindung **20** (p53: **17**: $EC_{50} = 17.5 \pm 0.1 \mu\text{mol/l}$ **20**: $EC_{50} = 10.7 \pm 0.2 \mu\text{mol/l}$; Hdm2: **17**: $EC_{50} = 16.1 \pm 0.4 \mu\text{mol/l}$ **20**: $EC_{50} = 9.2 \pm 0.3 \mu\text{mol/l}$).

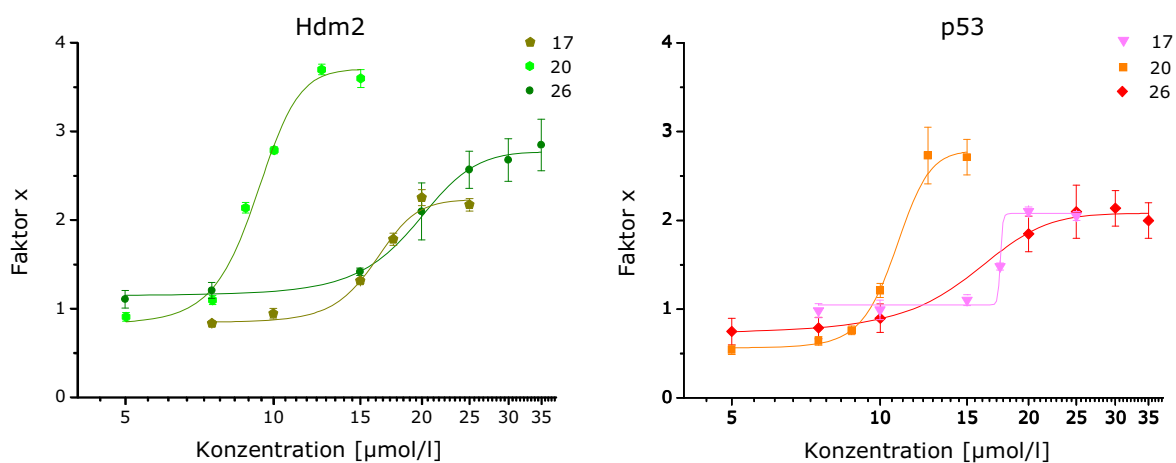


Abb. 91: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Hdm2 und p53 des (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolins **17**, (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-chlorphenyl)-2-imidazolins **20** und (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2-(Pyridin-2-yl)-4,5-bis(4-methoxyphenyl)-2-imidazolins **26** nach einer Inkubation von 18 h an den A549 Zellen

Die Abb. 91 bringt außerdem insbesondere bei der Verbindung **20** das deutlich höher liegende Plateau der Hdm2- Konzentrations-Wirkungs-Kurve im Vergleich zum p53-Wirkplateau zum Ausdruck (Faktor x von E_{max} : p53: 2.7; Hdm2: 3.7). Eine Hdm2-Inhibition könnte eine mögliche Ursache dieser Ergebnisse sein. Des Weiteren erwies sich das (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2-(Pyridin-2-yl)-4,5-bis(4-methoxyphenyl)-2-imidazolins **26** überraschenderweise auch als p53- und Hdm2-Aktivator. Es wurden ähnliche EC_{50} -Werte wie bei der Verbindung **17** erzielt (p53 $EC_{50} = 15.3 \pm 1.0 \mu\text{mol/l}$; Hdm2: $EC_{50} = 19.5 \pm 0.8 \mu\text{mol/l}$), wenn auch die zytotoxischen Eigenschaften der Verbindung **26** an den A549 Zellen um mehr als das Dreifache schwächer wirksam sind als bei dem (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolins **17** (**17**: $IC_{50} = 2.4 \pm 0.1 \mu\text{mol/l}$; **26**: $IC_{50} = 7.6 \pm 0.8 \mu\text{mol/l}$).

Das (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolins **18** lieferte von den getesteten 2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen bei der p53-Bestimmung den geringsten

EC₅₀-Wert ($6.2 \pm 0.2 \mu\text{mol/l}$). In der Abb. 92 ist die Konzentrations-Wirkungs-Kurve dieser Verbindung für das Protein 53 dargestellt. Auffällig ist, dass die Hdm2-Konzentration in den A549 Zellen sehr viel geringer war als der Anstieg des p53-Levels. Aufgrund der geringen Hdm2-Konzentration lässt sich vermuten, dass die Verbindung **18** das Protein nicht inhibiert, sondern eher eine rasche Zellschädigung verursacht. Die dadurch freigesetzte Menge an p53 löst dann Apoptose in der Zelle aus.

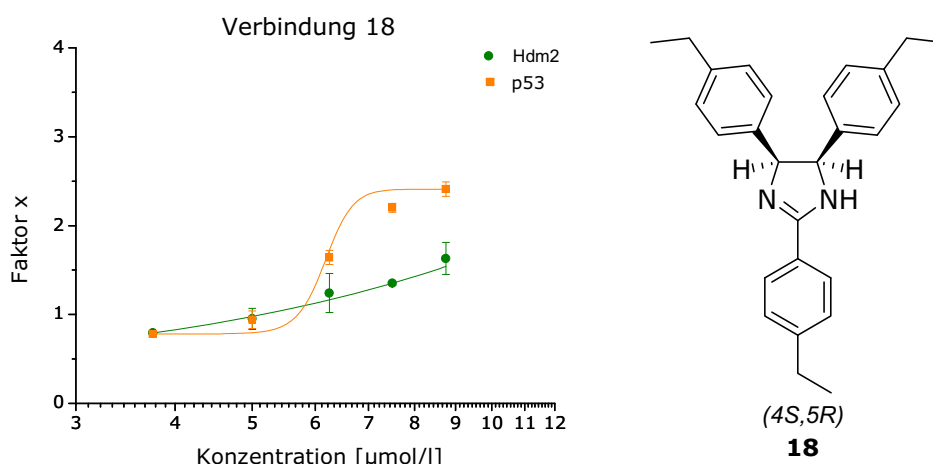


Abb. 92: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Hdm2 und p53 von $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin **18** (p53: EC₅₀ = $6.2 \pm 0.2 \mu\text{mol/l}$) nach einer Inkubation von 18 h an den A549 Zellen

Eine *N*-Alkylierung bzw. *N,N'*-Dialkylierung der $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline brachten gegenüber den nicht alkylierten Verbindungen keine Steigerung der Wirkung. Im Gegenteil, die getesteten mono- und dialkylierten Verbindungen zeigten weder eine Aktivierung von p53 noch einen Konzentrationsanstieg von seinem Gegenspieler Hdm2. Insbesondere die *N,N'*-dialkylierten Verbindungen erwiesen sich in der Testung auf Hemmung der Zellproliferation (Kap. 2.4.2) als äußerst potente Wirkstoffe (A549 IC₅₀: 0.1-0.7 $\mu\text{mol/l}$). Die Vermutung eines über p53-gesteuerten Wirkungsmechanismus wurde aufgrund des positiven Nachweises der Einzelstrang-DNA (z.B.: **55**: 8.1 ± 0.6 bei 25 $\mu\text{mol/l}$) sowie durch die Ergebnisse der Caspase-3-Bestimmung (z.B.: **55**: 2.3 ± 0.05 bei 20 $\mu\text{mol/l}$) angestellt. Die immunhistochemische Quantifizierung von p53 und Hdm2 ergab jedoch eindeutig keine durch p53 initiierte Apoptose. Der Wirkmechanismus dieser Verbindungen muss dementsprechend in weiterführenden Arbeiten untersucht werden.

Des Weiteren stellte sich für die untersuchten $(4R,5R)/(4S,5S)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline (**35**, **36**, **46-51**, **61-66**) heraus, dass die Verbindungen weder in nicht alkylierten noch in alkylierter Form in der Lage sind p53 zu aktivieren. Auch hier wären weitere Untersuchungen äußerst interessant, da das Wirkprofil der $(4R,5R)/(4S,5S)$ -konfigurierten Verbindungen ebenfalls noch nicht aufgeklärt ist.

3 Zusammenfassung

In vorhergehenden Arbeiten konnten Imidazolinderivate mit interessanten pharmakologischen Eigenschaften synthetisiert werden, insbesondere $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit lipophilen Substituenten wie Methyl, Methoxy oder Chlor an den Aromaten in Position 2, 4 und 5 des Imidazolinringes. Diese Verbindungen weisen in Abhängigkeit vom Substitutionsmuster ausgeprägt zytotoxische Wirkungen an Krebszellen auf. Ziel dieser Arbeit war es neue Derivate der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline zu entwickeln und diese hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungsbeziehung zu analysieren. Die strukturellen Veränderungen wurden zum einen durch *N*-Alkylierung und *N,N'*-Dialkylierung und zum anderen durch Änderung der Konfiguration von $(4R,5S)/(4S,5R)$ in $(4R,5R)/(4S,5S)$ vorgenommen. Mit Hilfe der Mikrowellentechnologie konnten Synthesemethoden entwickelt werden, die schnell und effizient zu den angestrebten Zielstrukturen führten. Darüber hinaus wurden $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit stickstoffhaltigen Substituenten an den 2,4,5-positionierten Aromaten erfolgreich synthetisiert.

Die erzielten Verbindungen wurden auf ihre zellulären Wirkungen getestet. Dazu wurde zuerst der Einfluss der Strukturvariationen der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline auf die Hemmung der Zellproliferation unter Verwendung der Tumorzelllinien: A549, MCF-7, MDA-MB-231 und U2OS untersucht. Dabei stellten sich die *N,N'*-dipropylierten 2-Imidazoline (**54**, **57**, **63**, **66**) als die Verbindungen mit den stärksten zytotoxischen Eigenschaften von den im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten und getesteten Verbindungen heraus. Beispielsweise wurde für das $(4R,5S)/(4S,5R)$ -*N,N'*-Dipropyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliumiodid **57** an den MCF-7 Zellen ein IC_{50} -Wert von 40 nmol/l ermittelt. Auch eine *N*-Alkylierung der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline führt zu einer Steigerung der Zytotoxizität. Die *N*-methyl- bzw. *N*-ethylierten 4-Chlor- und 4-Nitro-substituierten 2-Imidazoline erfuhren eine drastische Abschwächung der zytotoxischen Eigenschaften. Mit zunehmender Länge der *N*-Alkylkette und der damit verbundenen Erhöhung der Lipophilie nehmen die IC_{50} -Werte im Allgemeinen deutlich ab. Die $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit stickstoffhaltigem Substitutionsmuster an den Aromaten weisen deutlich höhere IC_{50} -Werte auf als die lipophileren Verbindungen. Ausgeprägte Unterschiede zwischen den $(4R,5S)/(4S,5R)$ - und $(4R,5R)/(4S,5S)$ -konfigurierten Verbindungen konnten nicht festgestellt werden.

In weiterführenden biochemischen Untersuchungen wurden die hoch zytotoxisch wirkenden Verbindungen auf ihre Apoptose induzierenden Eigenschaften getestet. So konnten beispielsweise für die *N,N'*-Dimethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliumiodide (**55**, **64**) sowohl eine Caspase-3-Aktivität von etwa 2.5 als auch ein positiver Nachweis von ssDNA ($F_x = 6.5-8.1$) beobachtet werden. Für

die dazugehörigen einfach alkylierten Verbindungen (**40**, **49**) wurde lediglich Einzelstrang-DNA nachgewiesen ($F_x = 7.5-7.9$).

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit Nutlin-3a wurde mit Hilfe eines zellulären Hdm2- und p53-Assays eine mögliche Inhibition des Hdm2-Proteins und dem damit verbundenen p53-vermittelten Zelltod untersucht. Die immunhistochemische Quantifizierung von p53 und Hdm2 ergab für die *N*-alkylierten und *N,N'*-dialkylierten (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline keine durch p53 initiierte Apoptose. Eine Hemmung von Hdm2 kann für das (*4R,5S*)/(*4S,5R*)-2,4,5-Tris(4-chlorphenyl)-2-imidazolin **20** diskutiert werden, da in den Tumorzellen eine höhere Konzentration an Hdm2 als an p53 gefunden wurde. Des Weiteren stellte sich für die untersuchten (*4R,5R*)/(*4S,5S*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline heraus, dass die Verbindungen weder in alkylierter noch in nicht alkylierter Form in der Lage sind p53 zu aktivieren.

Die Testergebnisse der bisherigen Apoptose-Untersuchungen haben gezeigt, dass die 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline durchaus in der Lage sind den programmierten Zelltod auszulösen. Dennoch scheint die Apoptose nicht über den p53-vermittelten Signalweg und in der ausführenden Phase nicht vornehmlich über die Effektorcaspase-3 zu verlaufen. Es sind daher zwingend weitere Untersuchungen nötig, um den Wirkungsmechanismus der äußerst potenten *N*-alkylierten und *N,N'*-dialkylierten 2,4,5-Triaryl-2-imidazoline aufzuklären.

4 Summary

In previous works several imidazoline derivatives with very interesting pharmacological properties were synthesized, i.e. $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-triaryl-2-imidazolines with lipophilic substituents such as chlorine, methyl or methoxy groups in position 2, 4 and 5 of the aromatic moieties. Depending on their substitution pattern these compounds showed cytotoxic effects on cancer cells.

The aim of this work was to develop new 2,4,5-triaryl-2-imidazolines and to analyze their structure activity relationship in terms of cytotoxicity. On the one hand structural changes were made by *N*-alkylation or *N,N'*-dialkylation and on the other hand compounds with either $(4R,5S)/(4S,5R)$ or $(4R,5R)/(4S,5S)$ configuration. Various $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-triaryl-2-imidazolines with nitrogenous substituents in position 2, 4 and 5 of aromatic moieties were successfully synthesized too. Using microwave technology, synthetic methods were developed allowing a fast and efficient synthesis of the above mentioned compounds.

The compounds were analyzed in terms of their cellular effects using different established *in-vitro* assays. Initially, the inhibiting effect on cell proliferation was investigated using the tumor cell lines A549, MCF-7, MDA-MB-231 and U2OS. In this context the highest cytotoxicity was observed for *N,N'*-dipropyl-2-imidazolines (**54**, **57**, **63**, **66**), i.e. $(4R,5S)/(4S,5R)$ -*N,N'*-dipropyl-2,4,5-tris-(4-ethylphenyl)-2-imidazoliumiodide **57** which exhibited an IC_{50} value of 40 nmol/l on MCF-7 cells. *N*-alkylation of 2,4,5-triaryl-2-imidazolines led to an increase in cytotoxicity whereas *N*-methylation or *N*-ethylation of 4-chlor- and 4-nitro-substituted 2-imidazolines led to a drastic attenuation of the cytotoxic properties. The elongation of alkyl chain and the associated increase in lipophilicity were generally accompanied by a significant decrease of IC_{50} values. $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-triaryl-2-imidazolines with nitrogen residues in position 2, 4 and 5 of the aromatic moieties appeared to be less cytotoxic. A change from $(4R,5S)/(4S,5R)$ to $(4R,5R)/(4S,5S)$ configuration did not effect cytotoxicity.

In further studies the most promising cytotoxic compounds were investigated in terms of their apoptosis-inducing properties. For *N,N'*-Dimethyl-2,4,5-tris-(4-ethylphenyl)-2-imidazoliumiodides (**55**, **64**) caspase-3 activity of about 2.5 and positive detection of ssDNA ($F_x = 6.5-8.1$) were observed whereas for the corresponding monoalkylated compounds (**40**, **49**) single-stranded DNA ($F_x = 7.5-7.9$) but no caspase-3 activity was found. Due to the structural similarity of the 2,4,5-triaryl-2-imidazolines to nutlin-3a a possible inhibition of hdm2 protein and associated p53 induced cell death were noticed. Immunohistochemical quantification of p53 and hdm2 did not exhibit p53 induced apoptosis for *N*-alkylated as well as for *N,N'*-dialkylated $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-triaryl-2-imidazolines. Interestingly, in A549 cells a higher concentration of hdm2 compared to p53 was found for $(4R,5S)/(4S,5R)$ -2,4,5-tris-(4-chlorophenyl)-2-imidazoline **20** which might indicate hdm2 inhibiting

properties. For all investigated compounds with *(4R,5R)/(4S,5S)* configuration no p53 activating effect was observed.

Although the results of the apoptosis tests have demonstrated that 2,4,5-triaryl-2-imidazolines are able to trigger programmed cell death it appeared that this process was neither p53 induced nor associated with caspase-3 in the executive phase. Therefore further studies are necessary to elucidate the mechanism of action of the *N*-alkylated and *N,N'*-dialkylated 2,4,5-triaryl-2-imidazolines.

5 Experimenteller Teil

5.1 Synthetischer und analytischer Teil

5.1.1 Verbrauchsmaterialien

Chemikalien

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

Dünnschichtchromatographie

DC Kieselgel 60 F254-Folien (Merck)

Die Auswertung erfolgte mittels UV-Detektion bei 254 nm und 366 nm (UV-Betrachter; CAMAG).

Einmalkanülen und -spritzen

verschiedene Größen und Volumina (B. Braun Melsungen AG)

Säulenchromatographie

Kieselgel 60, Korngröße 0.063-0.200 mm (Merck)

5.1.2 Verwendete Geräte

Autoklav

Autoklav 50 S (Roth)

Elementaranalyse

Elementaranalysator Vario EL (Elementar, Hanau)

Heizpilz

Pilz[®] (Heraeus), Voltron[®]Leistungssteller (Messner)

Infrarotspektroskopie

Spectrum 100 FTIR Spectrometer[®] mit Universal ATR Sampling Accessory (PerkinElmer)

Intensitätsangaben: w = schwach, m = mittel, s = stark, b = breit

Die Lage der Banden erfolgen als Wellenzahlangabe $\tilde{\nu}$ in cm^{-1} .

MagnetrührerIkamag[®]RCT (IKA)Massenspektrometrie

Hochaufgelöste Masse Agilent 6210 ESI-TOF-MS
 Agilent Technologie
 Flussrate: 4 µl/min, Sprayspannung: 4 kV
 Desolvatisierungsgas: 15 psi (1bar)

Alle anderen Parameter wurden für eine maximale Abundanz des jeweiligen $[M+H]^+$ optimiert. Die Abweichung der gefundenen Masse von der berechneten Masse sollte 7 ppm nicht überschreiten. Die Berechnung der absoluten Abweichung in ppm wird mit der folgenden Gleichung berechnet:

$$\left| \frac{Masse_{berechnet} - Masse_{gefunden}}{Masse_{gefunden}} \cdot 10^6 \right| = Abweichung [ppm]$$

pH-Messungen

VARIO SET WTW (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH);
 pH-Meter Set

Polarimetrie

Polarimeter 241 MC (PerkinElmer)
 Mikroküvette (1 ml)

Kernresonanzspektroskopie

Als ¹H-Kernresonanzspektrometer wurde das Avance/DPX-400 (Bruker Analytische Messtechnik GmbH) mit einer Betriebsfrequenz von 400.13 MHz verwendet.

Die chemische Verschiebung (δ) wird in ppm relativ zu Tetramethylsilan (TMS) als internen Standard angegeben. Das für die Aufnahmen verwendete Lösungsmittel ist jeweils aufgeführt. Der Austausch der Signale erfolgte mit D₂O.

Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, t = Triplet, pt = Pseudotriplett, q = Quartett, sext = Sextett, m = Multiplet, b = breite Bandenform, ⁿJ = Betrag der Kopplungskonstante über n Bindungen.

Die Aufspaltungen der Aromatenprotonen sind AA'BB'- bzw. AA'XX'-Systeme mit Aufspaltungsmustern höherer Ordnung. Der Einfachheit halber werden sie in diesem experimentellen Teil dennoch als Dubletts bezeichnet. Des Weiteren wird lediglich das Erscheinungsbild des Signals aufgeführt, dieses muss nicht den theoretischen Aufspaltungsmustern entsprechen.

RotationsverdampferRotavapor[®] (Büchi), Membran-Vakuumpumpe (Vacuubrand)Schmelzpunktbestimmung

Büchi Melting Point B-545 (Büchi)

Synthesemikrowelle

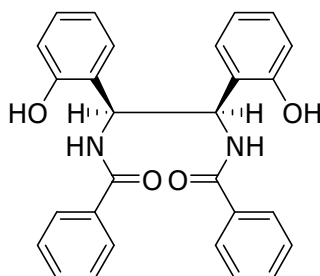
Start 1500 (MLS)

Trockenschrank

Trockenschrank (Heraeus)

UV/VIS-SpektroskopieLambda 35 UV/Vis Systems[®] (PerkinElmer)**5.1.3 Synthesevorschriften und analytische Daten**

Im Folgenden wird bei den nicht alkylierten Verbindungen nur die chemische Struktur der (1*S*,2*R*)-, (3*S*,4*R*)- bzw. (4*S*,5*R*)-Konfigurationsisomere dargestellt. Des Weiteren sind die mit * gekennzeichneten nomenklatorischen Verbindungsamen bereits von Dr. F. Schwegler synthetisiert und in ihrer Dissertationsschrift veröffentlicht worden.^[55] Diese Verbindungen wurden im Rahmen dieser Arbeit erneut hergestellt und zum Teil über einen alternativen Syntheseweg erhalten.

5.1.3.1 (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan**(1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-*N,N'*-dibenzoyl-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)-ethan***

1: In 1 l Ethanol werden unter leichtem Erwärmen 1 mol (210 g) Benzil gelöst. Nach der Zugabe von 2 mol (244 g) Salicylaldehyd wird 1 l konzentrierte Ammoniaklösung langsam zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 4 h bei 45-75 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der Feststoff filtriert und mit eiskaltem Ethanol

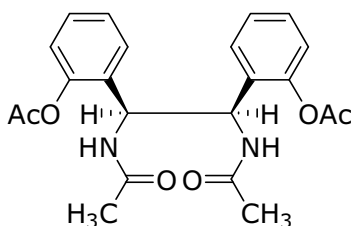
gewaschen. Anschließend wird das Produkt bei 80 °C im Trockenschrank getrocknet.

Ausbeute: 0.85 mol (384.3 g), 85 %

$C_{28}H_{24}N_2O_4$ (452.17 g/mol), gelbe Kristalle

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 5.88 (s, 2H, ArCH), 6.71-6.81 (m, 4H, ArH), 6.97-7.04 (m, 2H, ArH), 7.37-7.66 (m, 12H, ArH), 8.57 (s, 2H, CONH, austauschbar), 9.95 (s, 2H, ArOH, austauschbar)

(1R,2S)/(1S,2R)-O,O',N,N'-Tetraacetyl-1,2-diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan*



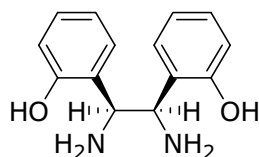
2: Eine Suspension aus 800 ml abs. Acetanhydrid und 0.85 mol (384.3 g) *(1R,2S)/(1S,2R)*-1,2-Diamino-*N,N'*-dibenzoyl-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan **1** wird unter Rückfluss erhitzt. Nach 24 h wird das Reaktionsgemisch langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und der dunkelbraune Feststoff filtriert. Der Niederschlag wird mit eiskaltem Acetanhydrid solange gewaschen bis dieser weiß ist. Abschließend wird das Produkt im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 0.48 mol (199.7 g), 56 %

$C_{22}H_{24}N_2O_6$ (412.16 g/mol), weißes Pulver

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 1.53 (s, 6H, CH_3CON), 2.27 (s, 6H, CH_3COOAr), 5.66 (s, 2H, ArCH), 6.99-7.57 (m, 8H, ArH), 7.48-7.57 (m, 1H, ArH), 8.04 (s, 2H, NH)

(1R,2S)/(1S,2R)-1,2-Diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan*



3: In 700 ml 47%iger Bromwasserstoffsäure werden 0.48 mol (199.7 g) des *(1R,2S)/(1S,2R)*-O,O',N,N'-Tetraacetyl-1,2-diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethans **2** suspendiert und 4 h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der Niederschlag filtriert und mit ca. 200 ml Eiswasser gewaschen. Anschließend wird das Dihydrobromid des Diaminoethans in heißem Wasser (70-80 °C) gelöst. Die Lösung wird heiß filtriert und mit 20%iger wässriger Natriumhydroxidlösung auf einen pH-Wert von 7-8 eingestellt. Die dabei entstehende freie Phenolbase wird

als Feststoff abgetrennt und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 0.34 mol (82.0 g), 71 %

$C_{14}H_{16}N_2O_2$ (244.12 g/mol), weißer Feststoff

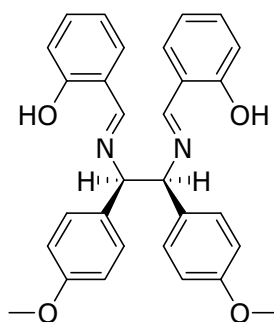
$^1H-NMR_{400\text{ MHz}}$ ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 3.33 (s, b, 4H, NH_2 , austauschbar), 4.20 (s, 2H, ArCH), 5.40 (s, b, 2H, ArOH, austauschbar), 6.61-7.08 (m, 8H, ArH)

5.1.3.2 (1R,2S)/(1S,2R)-1,2-Diamino-1,2-diarylethane

Allgemeine Vorschrift zur Synthese der (3R,4S)/(3S,4R)-3,4-Diaryl-1,6-bis-(2-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-diene:

25 mmol des (1R,2S)/(1S,2R)-1,2-Diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethans **3** werden in ca. 100 ml Acetonitril suspendiert. Anschließend werden 50 mmol des jeweiligen Benzaldehyds zugesetzt und je nach Reaktivität des Benzaldehyds zwischen 14-72 h unter Rückfluss erhitzt (DC-Kontrolle). Nach dem Abkühlen des Reaktionsgemisches wird dieses vorsichtig im Vakuum auf das halbe Volumen eingengt. Nach abgeschlossener Kristallisation im Kühlschrank wird der Feststoff filtriert und mit wenig eiskaltem Diethylether gewaschen. Das entstandene (3R,4S)/(3S,4R)-3,4-Diaryl-1,6-bis(2-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien (**4-6**) wird im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

(3R,4S)/(3S,4R)-1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-bis(4-methoxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien *



4: Aus 50 mmol (12.2 g) (1R,2S)/(1S,2R)-1,2-Diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan **3** und 0.1 mol (13.6 g) 4-Methoxybenzaldehyd:

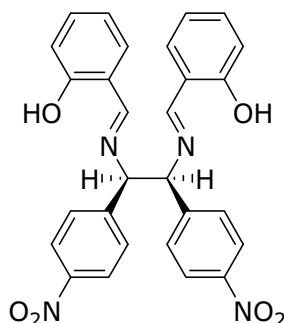
Der Reaktionsansatz wird 72 h erhitzt.

Ausbeute: 26 mmol (12.5 g), 52 %

$C_{30}H_{28}N_2O_4$ (480.20 g/mol), gelbe Kristalle

$^1H-NMR_{400\text{ MHz}}$ ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 3.69 (s, 6H, OCH_3), 4.98 (s, 2H, ArCHN), 6.84-7.61 (m, 16H, ArH), 8.42 (s, 2H, ArCH=N), 13.24 (s, 2H, ArOH, austauschbar)

(3*R*,4*S*)/(3*S*,4*R*)-1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-bis(4-nitrophenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien



5: Aus 25 mmol (6.1 g) (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan **3** und 50 mmol (7.6 g) 4-Nitrobenzaldehyd:

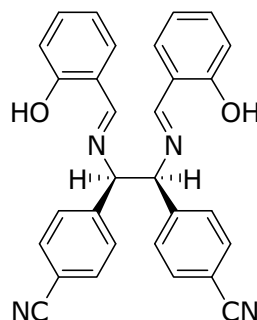
Der Reaktionsansatz wird 14 h erhitzt.

Ausbeute: 9.0 mmol (4.6 g), 36 %

C₂₈H₂₂N₄O₆ (510.15 g/mol), rote Kristalle

¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 5.38 (s, 2H, ArCHN), 6.84-8.26 (m, 16H, ArH), 8.54 (s, 2H, ArCH=N), 12.69 (s, 2H, ArOH, austauschbar)

(3*R*,4*S*)/(3*S*,4*R*)-1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-bis(4-cyanophenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien



6: Aus 25 mmol (6.1 g) (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan **3** und 50 mmol (6.6 g) 4-Cyanobenzaldehyd:

Der Reaktionsansatz wird 24 h erhitzt.

Ausbeute: 10.8 mmol (5.1 g), 43 %

C₃₀H₂₂N₄O₂ (470.17 g/mol), gelbe Kristalle

¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 5.27 (s, 2H, ArCHN), 6.82-7.86 (m, 16H, ArH), 8.50 (s, 2H, ArCH=N), 12.74 (s, 2H, ArOH, austauschbar)

Allgemeine Vorschrift zur Synthese der (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-diaryl-ethane:

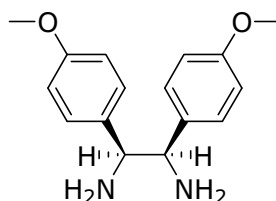
Methode A:

25 mmol (3*R*,4*S*)/(3*S*,4*R*)-3,4-Diaryl-1,6-bis(2-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien (**4-6**) werden in 150 ml 10%igem salzsaurem Tetrahydrofuran gelöst und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Dihydrochlorid des entsprechenden Diaminoethans wird filtriert und mit wenig Tetrahydrofuran gewaschen. Anschließend wird das Salz unter leichtem Erwärmen in 50 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird mit Hilfe einer 20%igen Natriumhydroxidlösung langsam alkalisiert. Die freie Base wird filtriert, mit Wasser gewaschen und im Exsikkator über Phosphor-pentoxid getrocknet.

Methode B:

In einem 70 ml-QRS-Gefäß werden 5 mmol (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan **3** und 10 mmol des jeweiligen Benzaldehyds in ca. 30 ml Acetonitril suspendiert. Das Reaktionsgefäß wird im monoPREP der Synthesemikrowelle befestigt. Nach einer Aufheizphase von 9-15 min auf eine Reaktionstemperatur von 140 °C beträgt die Reaktionszeit 15-30 min. Nach dem Abkühlen des Reaktionsgemisches werden 3 ml konzentrierte Salzsäure zugegeben und weitere 10 min bei 120 °C in der Synthesemikrowelle erhitzt. Anschließend wird der auf 70 °C abgekühlte Reaktionsansatz filtriert und mit wenig Acetonitril gewaschen. Das erhaltene Dihydrochlorid des Diaminoethans wird entsprechend der Methode A in die Base überführt.

(1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-bis(4-methoxyphenyl)ethan*



7: Methode A: Aus 26.4 mmol (12.7 g) (3*R*,4*S*)/(3*S*,4*R*)-1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-bis(4-methoxyphenyl)-2,5-diaza-hexa-1,5-dien **4**:

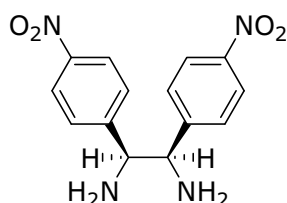
Ausbeute: 17.3 mmol (4.7 g), 66 %

Methode B: Aus 5 mmol (1.2 g) (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-bis-(2-hydroxyphenyl)ethan **3** und 10 mmol (1.4 g) 4-Methoxybenzaldehyd:

Ausbeute: 2.9 mmol (0.8 g), 57 %

C₁₆H₂₀N₂O₂ (272.15 g/mol), weißes Pulver

¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 1.47 (s, 4H, NH₂, austauschbar), 3.72 (s, 6H, OCH₃), 3.79 (s, 2H, ArCH), 6.82 (d, ³J = 8.35 Hz, 4H, ArH), 7.13 (d, ³J = 8.34 Hz, 4H, ArH)

(1R,2S)/(1S,2R)-1,2-Diamino-1,2-bis(4-nitrophenyl)ethan

8: Methode A: Aus 9.0 mmol (4.6 g) (3R,4S)/(3S,4R)-1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-bis(4-nitrophenyl)-2,5-diaza-hexa-1,5-dien **5**:

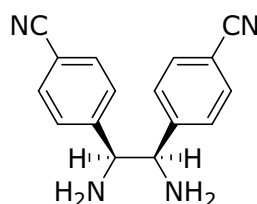
Ausbeute: 6.6 mmol (2.0 g), 73 %

Methode B: Aus 5 mmol (1.2 g) (1R,2S)/(1S,2R)-1,2-Diamino-1,2-bis(2-hydroxyphenyl)ethan **3** und 10 mmol (1.5 g) 4-Nitrobenzaldehyd:

Ausbeute: 3.3 mmol (1.0 g), 65 %

C₁₄H₁₄N₄O₄ (302.10 g/mol), hellgelbes Pulver

¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 2.10 (s, b, 4H, NH₂, austauschbar), 4.16 (s, 2H, ArCH), 7.43 (d, ³J = 8.72 Hz, 4H, ArH), 8.10 (d, ³J = 8.72 Hz, 4H, ArH)

(1R,2S)/(1S,2R)-1,2-Diamino-1,2-bis(4-methoxyphenyl)ethan

9: Methode A: Aus 10.8 mmol (5.1 g) (3R,4S)/(3S,4R)-1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-3,4-bis(4-cyanophenyl)-2,5-diaza-hexa-1,5-dien **6**:

Ausbeute: 7.6 mmol (2.0 g), 70 %

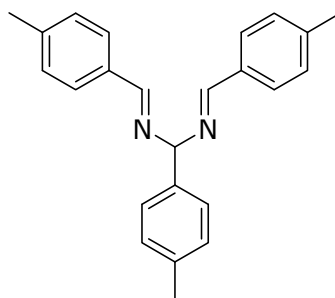
C₁₆H₁₄N₄ (262.12 g/mol), weißes Pulver

¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 1.97 (s, 4H, NH₂, austauschbar), 4.06 (s, 2H, ArCH), 7.33 (d, ³J = 8.22 Hz, 4H, ArH), 7.69 (d, ³J = 8.22 Hz, 4H, ArH)

5.1.3.3 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadiene

Allgemeine Vorschrift zur Synthese der 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadiene:

0.1 mol des jeweiligen Benzaldehyds werden mit 200 ml konzentrierter Ammoniaklösung für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das erhaltene 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadien (**10-16**) wird filtriert, dreimal mit ca. 50 ml Wasser gewaschen und über Phosphorpentoxid getrocknet. Die Reinigung ist bei den jeweiligen Verbindungen beschrieben.

1,3,5-Tris(4-methylphenyl)-2,4-diaza-1,4-pentadien*

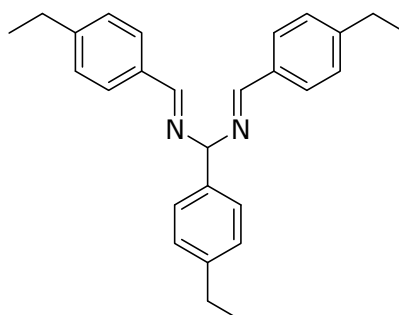
10: Aus 0.2 mol (25 g) 4-Methylbenzaldehyd:

Reinigung erfolgt durch Umkristallisation aus Diethylether/Petrolether (1+4).

Ausbeute: 55.3 mmol (18.8 g), 83 %

$C_{24}H_{24}N_2$ (340.19 g/mol), weiße Kristalle

1H -NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 2.28 (s, 3H, CH₃), 2.35 (s, 6H, CH₃), 5.92 (s, 1H, CH), 7.17 (d, 3J = 7.91 Hz, 2H, ArH), 7.28 (d, 3J = 7.93 Hz, 4H, ArH), 7.35 (d, 3J = 7.98 Hz, 2H, ArH), 7.72 (d, 3J = 8.01 Hz, 4H, ArH), 8.58 (s, 2H, ArCH=N)

1,3,5-Tris(4-ethylphenyl)-2,4-diaza-1,4-pentadien

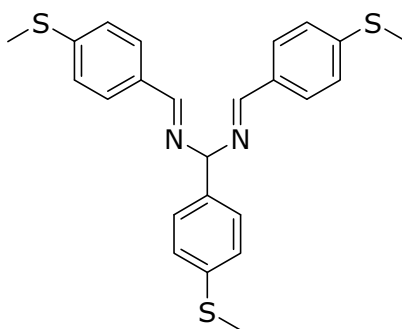
11: Aus 0.19 mol (25 g) 4-Ethylbenzaldehyd:

Reinigung erfolgt durch Umkristallisation aus Diethylether/Petrolether (1+6).

Ausbeute: 46.3 mmol (17.7 g), 73 %

$C_{27}H_{30}N_2$ (382.24 g/mol), hellgelbes Pulver

1H -NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 1.15 (t, 3H, CH₃), 1.19 (t, 6H, CH₃), 2.58 (q, 2H, CH₂), 2.64 (q, 4H, CH₂), 5.94 (s, 1H, CH), 7.20 (d, 3J = 7.93 Hz, 2H, ArH), 7.30 (d, 3J = 7.95 Hz, 4H, ArH), 7.38 (d, 3J = 7.98 Hz, 2H, ArH), 7.75 (d, 3J = 7.99 Hz, 4H, ArH), 8.59 (s, 2H, ArCH=N)

1,3,5-Tris(4-methylthiophenyl)-2,4-diaza-1,4-pentadien*

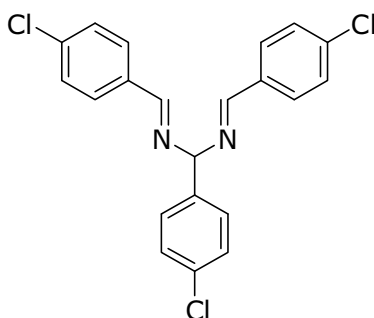
12: Aus 66 mmol (10 g) 4-Methylthiobenzaldehyd:

Das Produkt liegt analysenrein vor.

Ausbeute: 12.4 mmol (5.4 g), 56 %

$C_{24}H_{24}N_2S_3$ (436.11 g/mol), weißes Pulver

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 2.73 (s, 3H, SCH₃), 2.80 (s, 6H, SCH₃), 5.85 (s, 1H, CH), 6.92 (d, $^3J = 8.63$ Hz, 2H, ArH), 7.01 (d, $^3J = 8.75$ Hz, 4H, ArH), 7.39 (d, $^3J = 8.60$ Hz, 2H, ArH), 7.78 (d, $^3J = 8.39$ Hz, 4H, ArH), 8.52 (s, 2H, ArCH=N)

1,3,5-Tris(4-chlorphenyl)-2,4-diaza-1,4-pentadien*

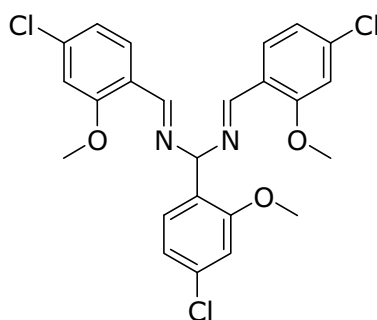
13: Aus 0.1 mol (14 g) 4-Chlorbenzaldehyd:

Das Produkt liegt analysenrein vor.

Ausbeute: 22.7 mmol (9.1 g), 68 %

$C_{21}H_{15}Cl_3N_2$ (400.03 g/mol), weißes Pulver

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 6.05 (s, 1H, CH), 7.42-7.56 (m, 8H, ArH), 7.85-7.89 (m, 4H, ArH), 8.65 (s, 2H, ArCH=N)

1,3,5-Tris(4-chlor-2-methoxyphenyl)-2,4-diaza-1,4-pentadien

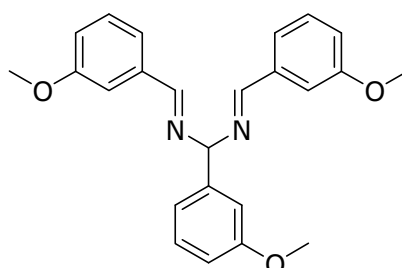
14: Aus 29.4 mmol (5 g) 4-Chlor-2-methoxybenzaldehyd:

Das Produkt liegt analysenrein vor.

Ausbeute: 6.5 mmol (3.2 g), 66 %

$C_{24}H_{21}Cl_3N_2O_3$ (490.06 g/mol), hellbraunes Pulver

1H -NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.88 (s, 6H, OCH₃), 6.23 (s, 1H, CH), 7.00-7.12 (m, 4H, ArH), 7.21 (d, 4J = 1.69 Hz, 2H, ArH), 7.42 (d, 3J = 8.22 Hz, 1H, ArH), 7.88 (d, 3J = 8.35 Hz, 2H, ArH), 8.83 (s, 2H, ArCH=N)

1,3,5-Tris(3-methoxyphenyl)-2,4-diaza-1,4-pentadien*

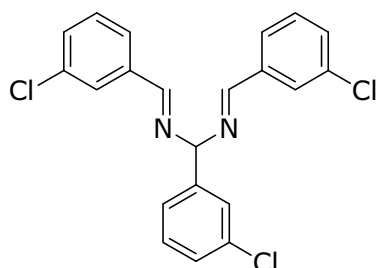
15: Aus 70 mmol (10 g) 3-Methoxybenzaldehyd:

Das Produkt liegt analysenrein vor.

Ausbeute: 14.7 mmol (5.7 g), 63 %

$C_{24}H_{24}N_2O_3$ (388.18 g/mol), weißes Pulver

1H -NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 3.68 (s, 6H, OCH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 5.73 (s, 1H, CH), 6.56 (s, 2H, ArH), 6.99-7.06 (m, 4H, ArH), 7.18-7.25 (m, 4H, ArH), 7.33 (s, 2H, ArH), 8.14 (s, 2H, ArCH=N)

1,3,5-Tris(3-chlorphenyl)-2,4-diaza-1,4-pentadien*

16: Aus 71 mmol (10 g) 3-Chlorbenzaldehyd:

Das Produkt liegt analysenrein vor.

Ausbeute: 16.3 mmol (6.5 g), 69 %

$C_{21}H_{15}Cl_3N_2$ (400.03 g/mol), weißes Pulver

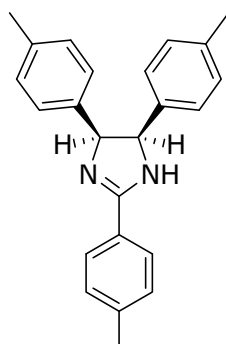
$^1H-NMR_{400\text{ MHz}}$ ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 5.96 (s, 1H, CH), 7.42-7.56 (m, 8H, ArH), 7.85-7.89 (m, 4H, ArH), 8.65 (s, 2H, ArCH=N)

5.1.3.4 Synthese der (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline aus 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadienen

Allgemeine Vorschrift zur Synthese der (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline aus 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadienen:

0.1 mol des entsprechenden 1,3,5-Triaryl-2,4-diaza-1,4-pentadiens (**10-16**) werden in 100 ml abs. THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Vorsichtig wird eine 2 M Kalium-*tert*-Butanolat-Lösung (in *tert*-Butanol) zugegeben bis das Reaktionsgemisch keine Blaufärbung mehr zeigt. Anschließend werden ca. 500 ml Wasser zugesetzt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Feststoff wird filtriert, mit Wasser gewaschen und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet. Die Reinigung ist bei den jeweiligen Verbindungen beschrieben.

(4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin*



17: Aus 57.6 mmol (19.6 g) 1,3,5-Tris(4-methylphenyl)-2,4-diaza-1,4-pentadien **10**:

Reinigung erfolgt durch Umkristallisation aus Diethylether/Petrolether (1+4).

Ausbeute: 51.1 mmol (17.4 g), 89 %

$C_{24}H_{24}N_2$ (340.19 g/mol), hellgelbes Pulver, Smp.: 122 °C

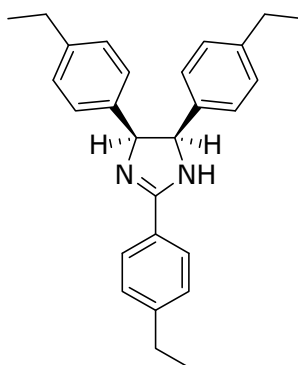
IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3268 (w), 3007 (w), 2921 (w), 2862 (w), 1607 (m), 1564 (m), 1512 (m), 1463 (m), 1380 (w), 836 (m)

MS (+ESI, 10.0 V) ber.: 341.2018 gef.: 341.2087 Abw.: 6 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 2.12 (s, 6H, CH_3), 2.38 (s, 3H, CH_3), 5.17 (d, 1H, ArCH), 5.44 (d, 1H, ArCH), 6.80-6.91 (m, 8H, ArH), 7.30 (d, $^3J = 8.32$ Hz, 2H, ArH), 7.58 (s, 1H, NH, austauschbar), 7.92 (d, $^3J = 8.14$ Hz, 2H, ArH)

CHN: ber.: C 84.67 H 7.11 N 8.23 gef.: C 84.52 H 7.19 N 8.29

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin



18: Aus 45.3 mmol (17.3 g) 1,3,5-Tris(4-ethylphenyl)-2,4-diaza-1,4-pentadien **11**:

Reinigung erfolgt durch Umkristallisation aus Diethylether/Petrolether (1+6).

Ausbeute: 32.7 mmol (12.5 g), 72 %

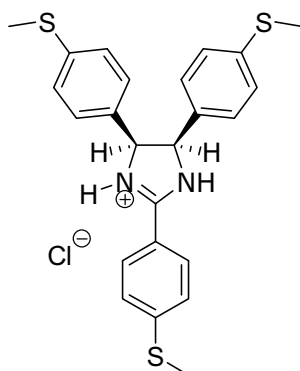
$C_{27}H_{30}N_2$ (382.24 g/mol), hellgelbes Pulver, Smp.: 97 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3262 (w, b) 3018 (w), 2962 (m), 2928 (m), 2870 (w), 1613 (m), 1560 (m), 1511 (m), 1455 (s), 1371 (w), 1191 (m), 1113 (m) 1281 (m), 830 (m)

MS (+ESI, 200.0 V) ber.: 383.2487 gef.: 338.2491 Abw.: 1 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 1.02 (q, 6H, CH_3), 1.23 (t, 3H, CH_3), 2.36-2.45 (m, 4H, CH_2), 2.68 (q, 2H, CH_2), 5.18 (d, 1H, ArCH), 5.45 (d, 1H, ArCH), 6.80-6.90 (m, 8H, ArH), 7.95 (d, $^3J = 8.18$ Hz, 2H, ArH), 7.59 (s, 1H, NH, austauschbar), 7.33 (d, $^3J = 8.21$ Hz, 2H, ArH)

CHN: ber.: C 84.77 H 7.90 N 7.32 gef.: C 84.63 H 8.01 N 7.16

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-methylthiophenyl)-2-imidazolin*

19: Aus 12.4 mmol (5.4 g) 1,3,5-Tris(4-methylthiophenyl)-2,4-diaza-1,4-pentadien **12**:

Reinigung erfolgt durch Fällung als Hydrochlorid aus etherischer Salzsäure.

Ausbeute: 4.9 mmol (2.3 g), 39 %, als Hydrochlorid

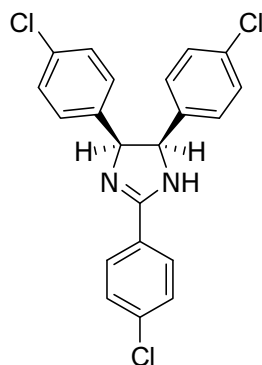
$C_{24}H_{25}ClN_2S_3$ (472.09 g/mol), beiges Pulver, Smp.: 233 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3320 (w, b), 3041 (w), 2915 (m), 2853 (m), 2726 (w), 2600 (w, b), 1592 (s), 1564 (m), 1539 (m), 1492 (s), 1406 (m), 1337 (m), 1299 (m), 1256 (m), 1091 (s), 964 (m), 815 (m), 759 (m), 731 (m)

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 2.34 (s, 6H, CH_3), 2.61 (s, 3H, CH_3), 5.88 (s, 2H, ArCH), 6.98-7.08 (m, 8H, ArH), 7.54-7.61 (m, 2H, ArH), 8.17-8.23 (m, 2H, ArH), 11.32 (s, 2H, NH, austauschbar)

CHNS:

ber.: C 60.93 H 5.33 N 5.92 S 20.33 gef.: C 60.92 H 5.34 N 5.87 S 20.46

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-chlorphenyl)-2-imidazolin*

20: Aus 22.7 mmol (9.1 g) 1,3,5-Tris(4-chlorphenyl)-2,4-diaza-1,4-pentadien **9**:
Reinigung erfolgt durch Umkristallisation aus Diethylether.

Ausbeute: 10.3 mmol (4.1 g), 45 %

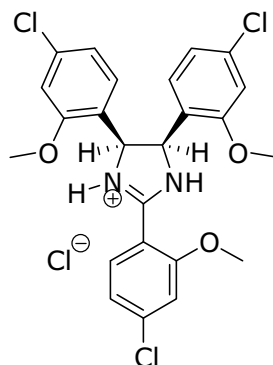
$C_{21}H_{15}Cl_3N_2$ (400.03 g/mol), weißes Pulver, Smp.: 199 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3142 (m), 3050 (w), 2926 (w), 1608 (m), 1593 (m), 1558 (m), 1488 (s), 1463 (s), 1408 (m), 1272 (m), 1090 (s), 1013 (s), 839 (m), 762 (s)

¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 5.33 (d, 1H, ArCH), 5.58 (d, 1H, ArCH), 6.93-7.03 (m, 4H, ArH), 7.08-7.16 (m, 4H, ArH), 7.59 (d, ³J = 8.43 Hz, 2H, ArH), 7.92 (s, 1H, NH, austauschbar), 8.05 (d, ³J = 8.42 Hz, 2H, ArH)

CHN: ber.: C 62.79 H 3.76 N 6.97 gef.: C 62.58 H 3.86 N 6.91

(4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Tris(4-chlor-2-methoxyphenyl)-2-imidazolin



21: Aus 6.5 mmol (3.2 g) 1,3,5-Tris(4-chlor-2-methoxyphenyl)-2,4-diaza-1,4-pentadien **14**:

Reinigung erfolgt durch Fällung als Hydrochlorid aus etherischer Salzsäure.

Ausbeute: 4.2 mmol (2.2 g), 65 %, als Hydrochlorid

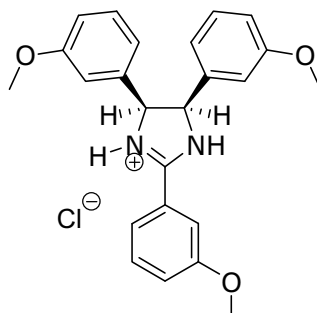
C₂₄H₂₂Cl₄N₂O₃ (526.04 g/mol), weißes Pulver, Smp.: 212 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3015 (m), 2853 (m), 2717 (m, b), 1619 (m), 1598 (s), 1577 (s), 1492 (s), 1466 (s), 1401 (s), 1249 (s), 1035 (m), 1018 (m), 832 (s)

MS (+ESI, 300.0 V) ber.: 491.0691 gef.: 491.0701 Abw.: 2 ppm

¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 3.63 (s, 6H, OCH₃), 4.01 (s, 3H, OCH₃), 5.88 (s, 2H, ArCH), 6.83 (d, ⁴J = 1.85 Hz, 2H, ArH), 6.88 (dd, ³J = 8.17 Hz, ³J = 1.90 Hz, 2H, ArH), 7.15 (d, ³J = 8.18 Hz, 2H, ArH), 7.35 (dd, ³J = 8.44 Hz, ⁴J = 1.88 Hz, 1H, ArH), 7.51 (d, ⁴J = 1.80 Hz, 1H, ArH), 7.97 (d, ³J = 8.45 Hz, 1H, ArH), 10.68 (s, 2H, NH, austauschbar)

(4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Tris(3-methoxyphenyl)-2-imidazolin*



22: Aus 14.7 mmol (5.7 g) 1,3,5-Tris(3-methoxyphenyl)-2,4-diaza-1,4-pentadien **15**:

Reinigung erfolgt durch Fällung als Hydrochlorid aus etherischer Salzsäure.

Ausbeute: 8.0 mmol (3.2 g), 52 %, als Hydrochlorid

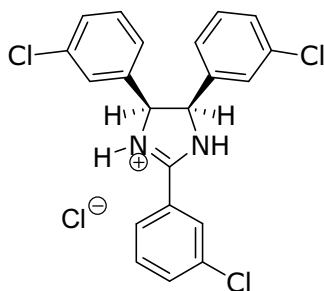
$C_{24}H_{24}ClN_2O_3$ (424.16 g/mol), weißes Pulver, Smp.: 209 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3100-2500 (m, b), 3054 (m), 2994 (m), 2876 (m), 2836 (m), 2732 (m), 1602 (s), 1588 (s), 1559 (s), 1491 (s), 1455 (m), 1432 (m), 1403 (m), 1329 (m), 1292 (m), 1252 (s), 1157 (m), 1035 (s), 874 (m), 771 (m), 690 (s)

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 3.60 (s, 6H, CH_3), 3.89 (s, 3H, CH_3), 5.91 (s, 2H, ArCH), 6.63-6.67 (m, 2H, ArH), 6.69 (d, $^4J = 2.10$ Hz, 2H, ArH), 6.71 (d, $^4J = 2.06$ Hz, 2H, ArH), 7.09 (t, 2H, ArH), 7.41-7.46 (m, 1H, ArH), 7.66 (t, 1H, ArH), 7.77-7.83 (m, 2H, ArH), 11.27 (s, 2H, NH, austauschbar)

CHN: ber.: C 67.84 H 5.93 N 6.59 gef.: C 67.62 H 6.12 N 6.51

(4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Tris(3-chlorphenyl)-2-imidazolin*



23: Aus 16.3 mmol (6.5 g) 1,3,5-Tris(3-chlorphenyl)-2,4-diaza-1,4-pentadien **16**:

Reinigung erfolgt durch Fällung als Hydrochlorid aus etherischer Salzsäure.

Ausbeute: 10.3 mmol (4.5 g), 64 %, als Hydrochlorid

$C_{21}H_{16}Cl_4N_2$ (436.01 g/mol), weißes Pulver, Smp.: 283 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3053 (m), 2855 (m, b), 2724 (m, b), 1615 (m), 1585 (s), 1555 (s), 1475 (s), 1434 (s), 1321 (m), 1249 (m), 1099 (m), 801 (s), 779 (s), 718 (s), 685 (s)

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 6.00 (s, 2H, ArCH), 7.12-7.21 (m, 6H, ArH), 7.26-7.31 (m, 2H, ArH), 7.78 (t, 1H, ArH), 7.92-7.96 (m, 1H, ArH), 8.22-8.28 (m, 1H, ArH), 11.66 (s, 2H, NH, austauschbar)

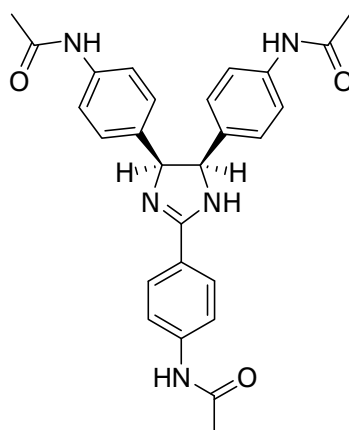
CHN: ber.: C 57.56 H 3.68 N 6.39 gef.: C 57.81 H 3.71 N 6.23

5.1.3.5 Synthese der (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit Hexamethyldisilazan

Allgemeine Vorschrift zur Synthese der (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit Hexamethyldisilazan

1 mol des jeweiligen Benzaldehyds werden mit 0.5 mmol basischem Aluminiumoxid versetzt und in 2 ml Hexamethyldisilazan suspendiert. Das Reaktionsgemisch wird 4 h unter Stickstoffbegasung auf maximal 120 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 10 ml Dichlormethan zugegeben, das Aluminiumoxid abfiltriert und die Lösung im Vakuum eingeeengt. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel oder durch Umkristallisation.

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-acetamidophenyl)-2-imidazolin



24: Aus 6.1 mmol (1.0 g) 4-Acetamidobenzaldehyd:
Reinigung erfolgt durch Umkristallisation aus Methanol.

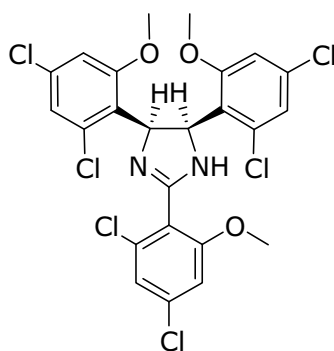
Ausbeute: 2.9 mmol (0.6 g), 65 %

$C_{27}H_{27}N_5O_3$ (469.21 g/mol), hellgelbes Pulver, Smp.: 240 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3290 (m, b), 3065 (m), 2930 (w), 1663 (s), 1601 (s), 1508 (s), 1463 (s), 1406 (s), 1367 (s), 1311 (s), 1261 (s), 1177 (s), 826 (m)

MS (+ESI, 100.0 V) ber.: 470.2192 gef.: 470.2222 Abw.: 6 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 1.94 (s, 6H, CH_3), 2.09 (s, 3H, CH_3), 5.15 (d, 1H, ArCH), 5.42 (d, 1H, ArCH), 6.79-6.93 (m, 4H, ArH), 7.24 (d, $^3J = 8.11$ Hz, 4H, ArH), 7.57 (s, 1H, NH, austauschbar), 7.68 (d, $^3J = 8.69$ Hz, 2H), 7.95 (d, $^3J = 8.70$ Hz, 2H), 9.69 (s, 2H, NHAc, austauschbar), 10.15 (s, 1H, NHAc, austauschbar)

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(2,4-dichlor-6-methoxyphenyl)-2-imidazolin

25: Aus 14.7 mmol (3.0 g) 2,4-Dichlor-6-methoxybenzaldehyd:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Dichlormethan/Methanol (9+1).

Ausbeute: 1.0 mmol (0.6 g), 20 %

$C_{24}H_{18}Cl_6N_2O_3$ (591.94 g/mol), , Smp.: 138 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3400-3100 (w), 3092 (w), 2936 (w), 2853 (w), 1580 (s), 1567 (s), 1455 (m), 1395 (s), 1257 (s), 1040 (s), 896 (s), 828 (s), 810 (s)

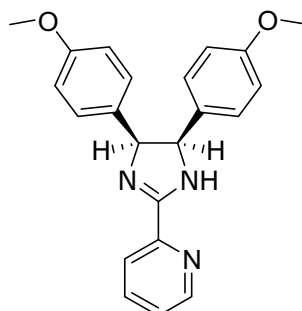
MS (+ESI, 300.0 V) ber.: 592.9527 gef.: 592.9551 Abw.: 4 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 3.60 (s, 6H, OCH_3), 3.87 (s, 3H, OCH_3), 5.90 (s, 2H, ArCH), 6.75 (s, 2H, ArH), 6.94 (s, 2H, ArH), 7.22 (d, $^4J = 1.45$ Hz, 1H, ArH), 7.26 (d, $^4J = 1.44$ Hz, 1H, ArH)

5.1.3.6 Synthese der (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-diarylethanen

Allgemeine Vorschrift zur Synthese der (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline mit (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-diarylethanen:

1 mmol (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-diarylethan (**7-9**) werden mit 1 mmol des jeweiligen Benzaldehyds in 15 ml abs. Dichlormethan suspendiert und unter Stickstoffbegasung 3 h bei -20 °C gerührt. Anschließend wird 1 mmol *N*-Bromsuccinimid zum Reaktionsgemisch zugefügt und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach abgeschlossener Reaktion werden 10 ml 10%ige wässrige Natriumhydroxidlösung zugesetzt und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Die Reinigung des Produkts erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel oder durch Umkristallisation.

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2-(Pyridin-2-yl)-4,5-bis(4-methoxyphenyl)-2-imidazolin

26: Aus 2.2 mmol (600 mg) (*1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-bis(4-methoxyphenyl)ethan **7** und 2.2 mmol (236 mg) Pyridin-2-aldehyd:*

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Cyclohexan/Diethylether (1+3).

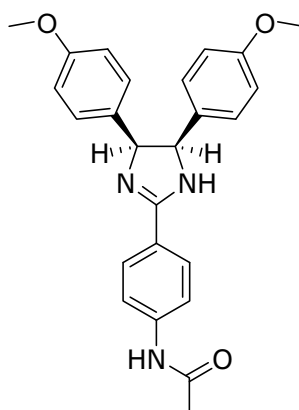
Ausbeute: 0.9 mmol (324 mg), 41 %

C₂₂H₂₁N₃O₂ (359.16 g/mol), gelbes Pulver, Smp.: 64 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3400-3090 (w, b), 3000 (w), 2934 (w), 2835 (w), 1669 (w), 1611 (m), 1593 (m), 1567 (m), 1511 (s), 1485 (s), 1455 (s), 1242 (s), 1173 (s), 1029 (s), 832 (s)

MS (+ESI, 50.0 V) ber.: 360.1712 gef.: 360.1738 Abw.: 7 ppm

¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 3.60 (s, 6H, OCH₃), 5.36 (s, 2H, ArCH), 6.60 (d, ³J = 8.61 Hz, 4H, ArH), 6.86 (d, ³J = 8.50 Hz, 4H, ArH), 8.19 (d, ³J = 7.83 Hz, 1H, ArH), 7.58 (dd, ³J = 6.54 Hz, ³J = 5.03 Hz, ⁴J = 1,80 Hz, 1H, ArH), 7.97 (dd, ³J = 7.78 Hz, ³J = 7.74 Hz, ⁴J = 1.53 Hz, 1H, ArH), 8.70 (d, ³J = 4.42 Hz, 1H, ArH)

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2-(4-Acetamidophenyl)-4,5-bis(4-methoxyphenyl)-2-imidazolin

27: Aus 2 mmol (544 mg) (*1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-bis(4-methoxyphenyl)ethan **7** und 2 mmol (328 mg) 4-Acetamidobenzaldehyd:*

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch:

Dichlormethan/Methanol (95+5).

Ausbeute: 0.46 mmol (191 mg), 23 %

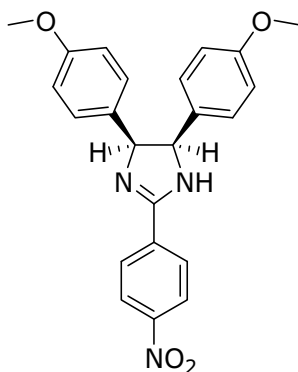
$C_{25}H_{25}N_3O_3$ (415.19 g/mol), , Smp.: °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3302 (m), 3005 (w), 2960 (w), 2837 (w), 1667 (m), 1607 (s), 1509 (s), 1466 (s), 1366 (m), 1301 (m), 1240 (s), 1169 (s), 1034 (s), 831 (m)

MS (+ESI, 250.0 V) ber.: 416.1974 gef.: 416.1995 Abw.: 5 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 2.08 (s, 3H, CH_3), 3.60 (2s, 6H, OCH_3), 5.14 (d, 1H, ArCH), 5.39 (d, 1H, ArCH), 6.56-6.64 (m, 4H, ArH), 6.83 (d, $^3J = 8.41$ Hz, 2H, ArH), 6.89 (d, $^3J = 8.47$ Hz, 2H, ArH), 7.52 (s, 1H, NH), 7.68 (d, $^3J = 8.42$ Hz, 2H, ArH), 7.95 (d, $^3J = 8.52$ Hz, 2H, ArH), 10.14 (s, 1H, NHAc, austauschbar)

(4R,5S)/(4S,5R)-2-(4-Nitrophenyl)-4,5-bis(4-methoxyphenyl)-2-imidazolin



28: Aus 2.2 mmol (600 mg) (1R,2S)/(1S,2R)-1,2-Diamino-1,2-bis(4-methoxyphenyl)ethan **7** und 2.2 mmol (332 mg) 4-Nitrobenzaldehyd:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Cyclohexan/Diethylether (1:3) und Dichlormethan/Methanol (95+5).

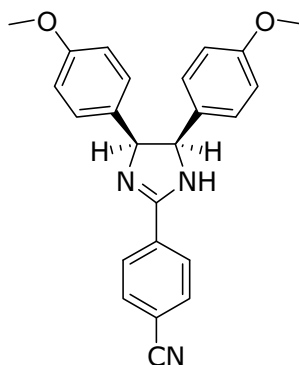
Ausbeute: 0.7 mmol (293 mg), 32 %

$C_{23}H_{21}N_3O_4$ (403.15 g/mol), rote Kristalle, Smp.: 164 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3280-3070 (w, b), 3018(w), 2953 (w), 2930 (w), 2835 (m), 1612 (m), 1588 (m), 1508 (s), 1461 (s), 1340 (s), 1243 (s), 1172 (s), 1106 (s), 1031 (s), 865 (s), 828 (m)

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 3.61 (s, 6H, OCH_3), 5.38 (dd, b, 2H, ArCH), 6.62 (d, $^3J = 8.49$ Hz, 4H, ArH), 6.88 (d, $^3J = 5.39$ Hz, 4H, ArH), 7.97 (s, 1H, NH, austauschbar), 8.28 (d, $^3J = 8.79$ Hz, 2H, ArH), 8.37 (d, $^3J = 8.76$ Hz, 2H, ArH)

CHN: ber.: C 68.47 H 5.25 N 10.42 gef.: C 68.44 H 5.26 N 10.32

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2-(4-Cyanophenyl)-4,5-bis(4-methoxyphenyl)-2-imidazolin

29: Aus 2.2 mmol (600 mg) (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-bis(4-methoxyphenyl)ethan **7** und 2.2 mmol (288 mg) 4-Cyanobenzaldehyd:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Cyclohexan/Diethylether (1:3) und Dichlormethan/Methanol (9+1).

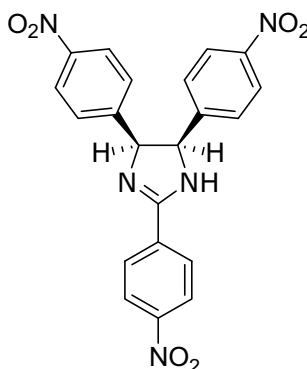
Ausbeute: 0.8 mmol (312 mg), 36 %

C₂₄H₂₁N₃O₂ (383.16 g/mol), gelbes Pulver, Smp.: 206 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3240-3100 (w, b), 3068 (w), 3001 (w), 2909 (w), 2837 (m), 2233 (m), 2225 (m), 1614 (m), 1600 (m), 1584 (m), 1511 (s), 1462 (s), 1239 (s), 1029 (s), 823 (m)

¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 3.60 (s, 6H, OCH₃), 5.24 (d, 1H, ArCH), 5.48 (d, 1H, ArCH), 6.61 (d, ³J = 8.07 Hz, 4H), 6.87 (d, ³J = 10.03 Hz, 4H), 7.99 (d, ³J = 8.33 Hz, 2H), 8.20 (d, ³J = 8.34 Hz, 2H)

CHN: ber.: C 75.18 H 5.52 N 10.96 gef.: C 75.14 H 5.45 N 10.71

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-nitrophenyl)-2-imidazolin

30: Aus 2.2 mmol (665 mg) (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-bis(4-nitrophenyl)ethan **8** und 2.2 mmol (332 mg) 4-Nitrobenzaldehyd:

Der Reaktionsansatz wird vor der Zugabe von NBS bei -70 °C 3 h gerührt.

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch:

Aceton/Petrolether (1+4) und Umkristallisation aus Dichlormethan.

Ausbeute: 1.4 mmol (610 mg), 64 %

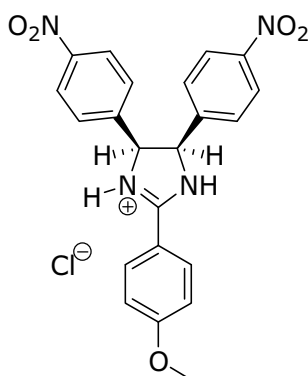
$C_{21}H_{15}N_5O_6$ (433.10 g/mol), gelbes Pulver, Smp.: ab 290 °C Zersetzung

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3418 (m), 3082 (w), 3062 (w), 2904 (w), 1587 (s), 1524 (s), 1448 (m), 1344 (s), 1275 (m), 1104 (s), 1009 (m), 860 (s), 840 (m)

MS (+ESI, 10.0 V) ber.: 434.1101 gef.: 434.1110 Abw.: 2 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 5.66 (d, 1H), 5.92 (d, 1H), 7.27-7.34 (m, 7.38 Hz, 4H, ArH), 7.92-8.00 (m, 4H, ArH), 8.33 (d, $^3J = 8.80$ Hz, 2H, ArH), 8.42 (d, $^3J = 8.72$ Hz, 3H, ArH, NH, austauschbar)

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2-(4-Methoxyphenyl)-4,5-bis(4-nitrophenyl)-2-imidazololol



31: Aus 2.2 mmol (665 mg) (*1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-bis(4-nitrophenyl)ethan **8** und 2.2 mmol (299 mg) 4-Methoxybenzaldehyd:*

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Ethylacetat/n-Hexan (95+5) und Fällung als Hydrochlorid aus etherischer Salzsäure.

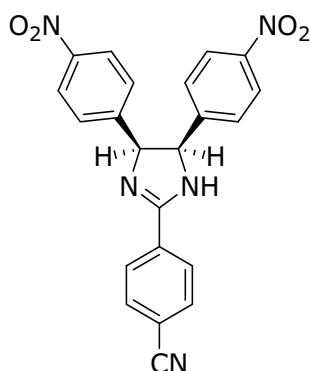
Ausbeute: 0.7 mmol (320 mg), 32 %, als Hydrochlorid

$C_{22}H_{19}ClN_4O_5$ (454.10 g/mol), rotes Pulver, Smp.: 231 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3140-2780 (w, b), 3032 (m), 2940 (m), 2844 (w), 2724 (m, b), 1608 (s), 1507 (s), 1463 (m), 1443 (m), 1344 (s), 1269 (s), 1185 (s), 844 (s)

MS (+ESI, 20.0 V) ber.: 419.1350 gef.: 419.1381 Abw.: 7 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 3.94 (s, 6H, OCH_3), 6.21 (s, 2H, ArCH), 7.33 (d, $^3J = 8.79$ Hz, 2H, ArH), 7.45 (d, $^3J = 8.61$ Hz, 4H, ArH), 8.02 (d, $^3J = 8.59$ Hz, 4H, ArH), 8.19 (d, $^3J = 8.79$ Hz, 2H, ArH), 11.20 (s, 1H, NH, austauschbar)

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2-(4-Cyanophenyl)-4,5-bis(4-nitrophenyl)-2-imidazolin

32: Aus 2.2 mmol (665 mg) (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-bis(4-nitrophenyl)ethan **8** und 2.2 mmol (288 mg) 4-Cyanobenzaldehyd:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Ethylacetat/n-Hexan (95+5).

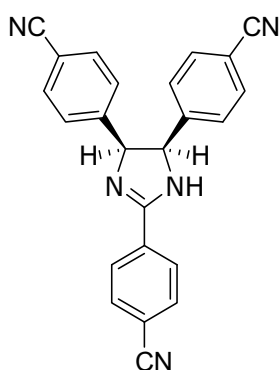
Ausbeute: 0.6 mmol (263 mg), 27 %

C₂₂H₁₅N₅O₄ (413.11 g/mol), rotbraune Kristalle, Smp.: ab 310 °C Zersetzung

IR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3417 (m), 3047 (w), 2924 (w), 2853 (w), 2230 (m), 1598 (m), 1509 (s), 1459 (s), 1342 (s), 1268 (m), 1107(s), 852 (s), 812 (m)

¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 5.65 (s, 1H, ArCH), 5.89 (d, 1H, ArCH), 7.29 (d, ³J = 8.38 Hz, 4H, ArH), 7.94 (d, ³J = 8.44 Hz, 4H, ArH), 8.05 (d, ³J = 8.22 Hz, 2H, ArH), 8.24 (d, ³J = 8.21 Hz, 2H, ArH), 8.33 (s, 1H, NH, austauschbar)

CHN: ber.: C 63.92 H 3.66 N 16.94 gef.: C 63.87 H 3.69 N 16.92

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-cyanophenyl)-2-imidazolin

33: Aus 2.2 mmol (577 mg) (1*R*,2*S*)/(1*S*,2*R*)-1,2-Diamino-1,2-bis(4-cyanophenyl)ethan **9** und 2.2 mmol (288 mg) 4-Cyanobenzaldehyd:

Reinigung erfolgt durch Umkristallisation aus wenig Methanol.

Ausbeute: 1.7 mmol (624 mg), 77 %

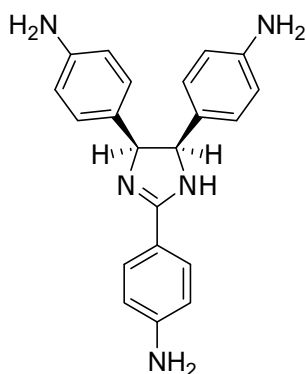
C₂₄H₁₅N₅ (373.13 g/mol), hellgelbe Kristalle, Smp.: 231 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3337 (m), 3052 (w), 2942 (w), 2227 (s), 1604 (s), 1558 (w), 1505 (m), 1444 (s), 1413 (m), 1279 (m), 1254 (m), 1101 (m), 851 (s), 832 (s)

¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 5.53 (d, 1H, ArCH), 5.79 (d, 1H, ArCH), 7.16 (pt, ³J = 8.63, ³J = 9.49, 4H, ArH), 7.53 (pt, ³J = 8.61 Hz, ³J = 8.61 Hz, 4H, ArH), 8.03 (d, ³J = 8.27 Hz, 2H, ArH), 8.21 (d, ³J = 8.32 Hz, 2H, ArH), 8.23 (s, 1H, NH, austauschbar)

CHN: ber.: C 77.20 H 4.05 N 18.76 gef.: C 77.24 H 3.93 N 18.83

5.1.3.7 (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-aminophenyl)-2-imidazolin



34: 1 mmol (469 mg) (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-acetamidophenyl)-2-imidazolin **24** werden in 20 ml abs. Dichlormethan gelöst. Bei -70 °C wird eine Lösung von 6.75 mmol Bortribromid in 5 ml Dichlormethan vorsichtig zugetropft und 30 min bei -70 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur weitere 3 h gerührt. Nach abgeschlossener Reaktion wird das überschüssige Bortribromid unter Eiskühlung mit Methanol hydrolysiert. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer eingengt und anschließend mit 20 ml Dichlormethan versetzt. Es wird dreimal mit je 10 ml 0.1 N Salzsäure extrahiert. Weiterhin werden die vereinigten Wasserphasen bei pH 14 dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Das Produkt wird durch Umkristallisation aus Diethylether gereinigt.

Ausbeute: 0.7 mmol (237 mg), 70 %

C₂₁H₂₁N₅ (343.18 g/mol), braune Kristalle, Smp.: 161 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3334 (m, b), 3202 (m, b), 3012 (w), 2922 (w), 1605 (s, b), 1513 (s), 1446 (m), 1416 (m), 1275 (s, b), 1176 (m), 833 (s)

MS (+ESI, 50.0 V) ber.: 344.1875 gef.: 344.1882 Abw.: 2 ppm

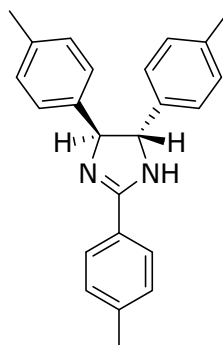
¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 4.68 (s, b, 4H, NH, austauschbar), 5.05 (s, 2H, ArCH), 5.62 (s, b, 2H, NH, austauschbar), 6.24 (d, ³J = 8.43 Hz, 4H, ArH), 6.56 – 6.62 (m, 6H, ArH), 7.69 (d, ³J = 8.60 Hz, 2H, ArH)

5.1.3.8 Synthese der (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline aus den (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen

Allgemeine Vorschrift zur Synthese der (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazoline aus den (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen:

In einem 12 ml-QRS-Gefäß werden 2 mmol (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazolin (**17**, **18**) in 5 ml 1 M Kalium-*tert*-butanolat-Lösung (in *tert*-Buthanol) gelöst. Das Reaktionsgefäß wird im monoPREP der Synthesemikrowelle befestigt. Nach einer Aufheizphase von 8 min auf eine Reaktionstemperatur von 110 °C beträgt die Reaktionszeit 30 min. Das Reaktionsgemisch wird nach abgeschlossener Reaktion mit wenig Methanol aus dem Reaktionsgefäß gelöst. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der entstandene Feststoff aus Diethylether umkristallisiert.

(4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin



35: Aus 2 mmol (680 mg) (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin **17**:

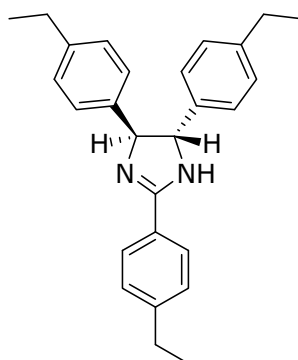
Ausbeute: 1.6 mmol (558 mg), 80 %

C₂₄H₂₄N₂ (340,19 g/mol), weißes Pulver, Smp.: 186 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3190-3070 (m, b), 3026 (w), 2919(w), 2859 (w), 1613 (m), 1595 (m), 1559 (m), 1513 (s), 1459 (s), 1325 (s), 1298 (m), 1217 (m), 810 (s)

¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 2.30 (s, 6H, CH₃), 2.37 (s, 3H, CH₃), 4.55 (d, 1H, ArCH), 4.77 (d, 1H, ArCH), 7.07-7.20 (m, 8H ArH), 7.28 (d, ³J = 7.96 Hz, 2H, ArH), 7.69 (s, 1H, NH), 7.87 (d, ³J = 8.06 Hz, 2H, ArH)

CHN: ber.: C 84.67 H 7.11 N 8.23 gef.: C 84.51 H 7.12 N 8.07

(4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin

36: Aus 2 mmol (764 mg) (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin **18**:

Ausbeute: 1.5 mmol (566 mg), 75 %

C₂₇H₃₀N₂ (382.24 g/mol), weißes Pulver, Smp.: 181 °C

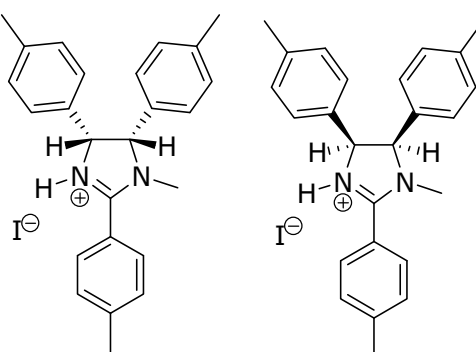
IR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3130 (w, b), 2024 (w), 2963 (m), 2929 (m), 2870 (w), 1615 (m), 1598 (m), 1561 (m), 1512 (m), 1463 (m), 1321 (m), 1281 (m), 1191 (m), 1112 (m), 1019 (m), 824 (s)

MS (+ESI, 50.0 V) ber.: 383.2487 gef.: 383.2483 Abw.: 1 ppm

¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 1.15-1.24 (m, 9H, CH₃), 2.59 (q, 4H, CH₂), 2.67 (q, 2H, CH₂), 4.59 (d, 1H, ArCH), 4.81 (d, 1H, ArCH), 7.12-7.22 (m, 8H, ArH), 7.31 (d, ³J = 8.17 Hz, 2H, ArH), 7.70 (s, 1H, NH, austauschbar), 7.90 (d, ³J = 8.17 Hz, 2H, ArH)

5.1.3.9 Synthese der *N*-Alkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazolineAllgemeine Vorschrift zur Synthese der *N*-Alkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoline

In einem 50 ml Schlenkkolben werden 0.5 mmol 2,4,5-Triaryl-2-imidazolin (**17**, **18**, **20**, **30**, **35**, **36**) in 10 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und unter Stickstoffbegasung auf 0 °C abgekühlt. Zur Lösung werden anschließend 1.5 mmol Natriumhydrid zugegeben und 15 min gerührt. Nach vollständiger Deprotonierung des 2,4,5-Triaryl-2-imidazolins wird 1 mmol Alkylhalogenid, gelöst in 2 ml absolutem Tetrahydrofuran, vorsichtig zugetropft. Der Reaktionsansatz wird auf Raumtemperatur erwärmt und 6 h gerührt. Nach abgeschlossener Reaktion wird das überschüssige Natriumhydrid mit 10 ml Wasser unter Eiskühlung vorsichtig hydrolysiert. Das Reaktionsgemisch wird dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Die Reinigung des Produkts erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel.

(4R,5S)/(4S,5R)-N-Alkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazolinen**(4R,5S)/(4S,5R)-N-Methyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin**

37: Aus 0.5 mmol (170 mg) (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin **17** und 1 mmol (142 mg) Methyljodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Chloroform/Methanol (95+5).

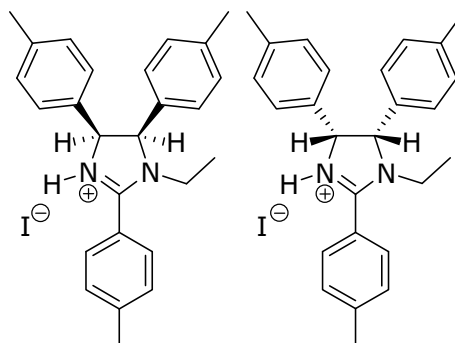
Ausbeute: 0.16 mmol (75 mg), 31 %, als Hydroiodid

C₂₅H₂₇IN₂ (482.12 g/mol), hellbraune Kristalle, Smp.: 135 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3025 (m), 2955 (w), 2919 (m), 2868 (w), 2800-2500 (w, b), 1613 (m), 1595 (m), 1552 (m), 1514 (m), 1446 (m), 1377 (m), 1280 (m), 1249 (m), 821 (s)

MS (+ESI, 150.0 V) ber.: 355.2169 gef.: 355.2153 Abw.: 5 ppm

¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 2.15 (s, 3H, CH₃), 2.17 (s, 3H, CH₃), 2.47 (s, 3H, CH₃), 2.91 (s, 3H, N-CH₃), 5.63 (d, 1H, ArCH), 5.80 (d, 1H, ArCH), 6.96 (s, 4H, ArH), 6.99 (s, 4H, ArH), 7.85 (d, ³J = 8.18 Hz, 2H, ArH), 7.54 (d, ³J = 7.92 Hz, 2H, ArH), 11.00 (s, b, 1H, NH, austauschbar)

(4R,5S)/(4S,5R)-N-Ethyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin

38: Aus 0.5 mmol (170 mg) (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin **17** und 1 mmol (156 mg) Ethyljodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Chloroform/Methanol (95+5).

Ausbeute: 0.15 mmol (72 mg), 29 %, als Hydroiodid

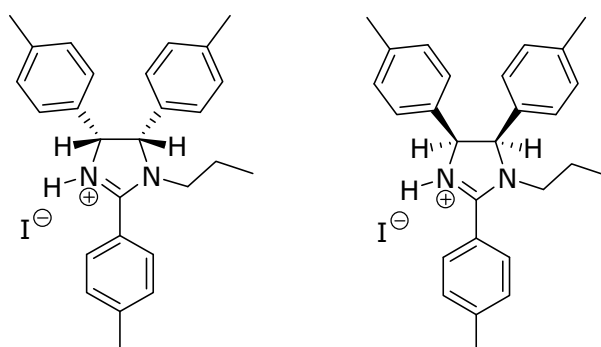
$C_{26}H_{29}IN_2$ (496.14 g/mol), hellgelbe Kristalle, Smp.: ab 200 °C Zersetzung

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3031 (m), 2950 (w), 2922 (w), 2863 (w), 1613 (m), 1586 (s), 1549 (s), 1516 (m), 1503 (m), 1451 (m), 1433 (m), 1384 (m), 1375 (m), 1267 (m), 1246 (m), 817 (m)

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 1.04 (t, 3H, N- CH_2CH_3), 2.16 (2s, 6H, CH_3), 2.47 (s, 3H, CH_3), 2.97 (sext, 1H, N- CH_2CH_3), 3.57 (sext, 1H, N- CH_2CH_3), 5.85 (dd, 2H, ArCH), 6.93-7.07 (m, 8H, ArH), 7.55 (d, $^3J = 7.94$ Hz, 2H, ArH), 7.83 (d, $^3J = 8.01$ Hz, 2H, ArH), 11.02 (s, b, 1H, NH, austauschbar)

CHN: ber.: C 62.91 H 5.89 N 5.64 gef.: C 62.82 H 5.60 N 5.85

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-*N*-Propyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin



39: Aus 0.5 mmol (170 mg) (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin **17** und 1 mmol (170 mg) Propyliodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Chloroform/Methanol (95+5).

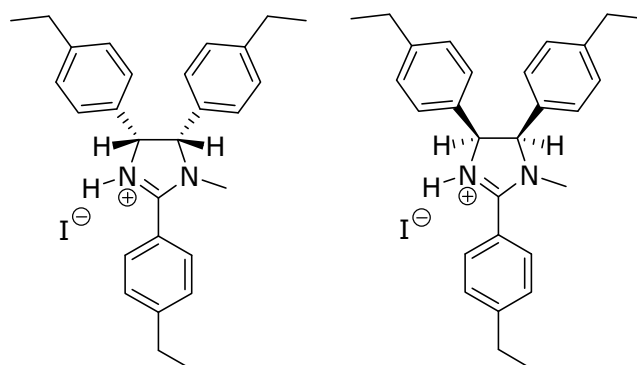
Ausbeute: 0.11 mmol (54 mg), 21 %, als Hydroiodid

$C_{27}H_{31}IN_2$ (510.15 g/mol), gelbe Kristalle, Smp.: 94 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3023 (m), 2960 (m), 2920 (m), 2872 (m), 2760-2500 (w, b), 1614 (m), 1589 (m), 1548 (m), 1514 (m), 1455 (m), 1416 (w), 1377 (w), 1246 (m), 1184 (m), 1098 (m), 1019 (m), 822 (s)

MS (+ESI, 200.0 V) ber.: 383.2482 gef.: 383.2496 Abw.: 4 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 0.71 (t, 3H, N- $CH_2CH_2CH_3$), 1.46 (sext, 2H, N- $CH_2CH_2CH_3$), 2.17 (2s, 6H, CH_3), 2.46 (s, 3H, CH_3), 2.86-2.97 (m, 1H, N- $CH_2CH_2CH_3$), 3.37-3.48 (m, 1H, N- $CH_2CH_2CH_3$), 5.80 (d, 1H, ArCH), 5.86 (d, 1H, ArCH), 6.94 – 7.03 (m, 8H, ArH), 7.54 (d, $^3J = 7.99$ Hz, 2H, ArH), 7.80 (d, $^3J = 8.12$ Hz, 2H, ArH), 11.09 (m, b, 1H, NH, austauschbar)

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-*N*-Methyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin

40: Aus 0.5 mmol (190 mg) (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin **18** und 1 mmol (142 mg) Methyliodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Chloroform/Methanol (95+5).

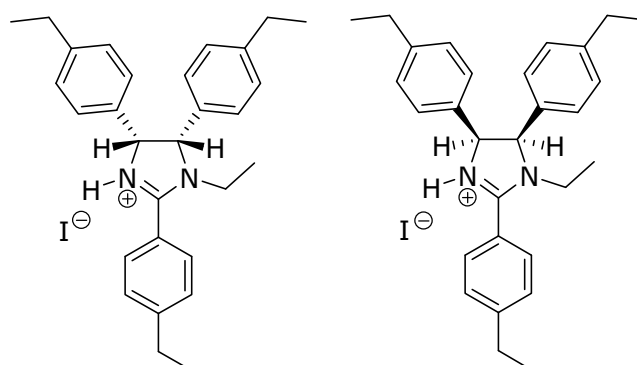
Ausbeute: 0.17 mmol (89 mg), 34 %, als Hydroiodid

C₂₈H₃₃IN₂ (524.17 g/mol), gelbe Kristalle, Smp.: 92 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3070-2350 (w, b), 3022 (w), 2963 (m), 2929 (m), 2871 (w), 1614 (m), 1590 (m), 1590 (m), 1552 (m), 1513 (m), 1453 (m), 1375 (w), 1281 (w), 1183 (m), 1062 (m), 1018 (m), 837 (s)

MS (+ESI, 150.0 V) ber.: 397.2638 gef.: 397.2650 Abw.: 3 ppm

¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 1.00-1.07 (m, 6H, CH₂CH₃), 1.26 (t, 3H, CH₂CH₃), 2.40-2.46 (m, 4H, CH₂CH₃), 2.76 (q, 2H, CH₂CH₃), 2.92 (s, 3H, N-CH₃), 5.77 (d, 1H, ArCH), 5.59 (d, 1H, ArCH), 6.91-7.00 (m, 8H, ArH), 7.56 (d, ³J = 8.19 Hz, 2H, ArH), 7.86 (d, ³J = 8.16 Hz, 2H, ArH), 11.10 (s, b, 1H, NH, austauschbar)

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-*N*-Ethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin

41: Aus 0.5 mmol (190 mg) (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin **18** und 1 mmol (156 mg) Ethyliodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Chloroform/Methanol (95+5).

Ausbeute: 0.17 mmol (89 mg), 27 %, als Hydroiodid

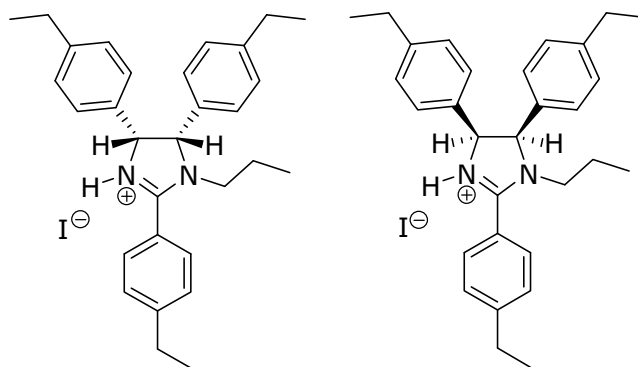
$C_{29}H_{35}IN_2$ (538.18 g/mol), braune Kristalle, Smp.: 93 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3100-2350 (w, b), 3028 (w), 2964 (m), 2930 (m), 2871 (w), 1614 (m), 1587 (m), 1548 (m), 1518 (m), 1495 (w), 1455 (m), 1376 (w), 1287 (w), 1265 (w), 1183 (m), 1018 (m), 835 (s)

MS (+ESI, 200.0 V) ber.: 411.2795 gef.: 411.2808 Abw.: 3 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 1.00-1.07 (m, 9H, CH_2CH_3 , N- CH_2CH_3), 1.26 (t, 3H, CH_2CH_3), 2.41-2.47 (m, 4H, CH_2CH_3), 2.76 (q, 2H, CH_2CH_3), 2.99 (sext, 1H, N- CH_2CH_3), 3.56 (sext, 1H, N- CH_2CH_3), 5.78 (s, 2H, ArCH), 6.94-7.01 (m, 8H, ArH), 7.56 (d, $^3J = 8.16$ Hz, 2H, ArH), 7.83 (d, $^3J = 8.08$ Hz, 2H, ArH), 11.02 (s, b, 1H, NH, austauschbar)

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-*N*-Propyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin



42: Aus 0.5 mmol (190 mg) (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin **18** und 1 mmol (170 mg) Propyliodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Chloroform/Methanol (95+5).

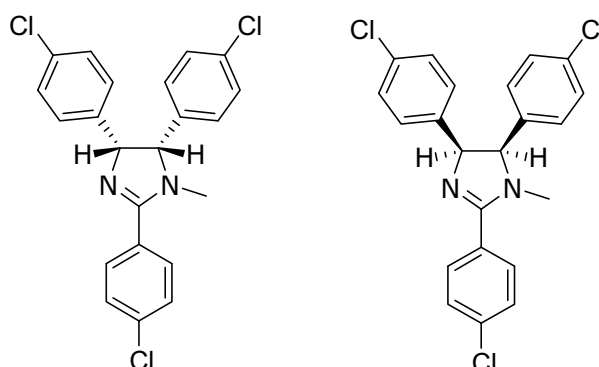
Ausbeute: 0.11 mmol (63 mg), 23 %, als Hydroiodid

$C_{30}H_{37}IN_2$ (552.20 g/mol), gelbes Pulver, Smp.: 82 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3028 (w), 2962 (m), 2967 (m), 2872 (m), 2800-2500 (w, b), 1613 (m), 1585 (m), 1545 (m), 1513 (m), 1456 (m), 1423 (m), 1371 (m), 1285 (m), 1249 (m), 1185 (m), 1018 (m), 838 (s)

MS (+ESI, 200.0 V) ber.: 425.2951 gef.: 425.2964 Abw.: 3 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 0.72 (t, 3H, N- $CH_2CH_2CH_3$), 0.99-1.07 (m, 6H, CH_2CH_3), 1.25 (t, 3H, CH_2CH_3), 1.43-1.52 (m, 2H, N- $CH_2CH_2CH_3$), 2.39-2.47 (m, 4H, CH_2CH_3), 2.76 (q, 2H, CH_2CH_3), 2.91-2.99 (m, 1H, N- $CH_2CH_2CH_3$), 3.40-3.48 (m, 1H, N- $CH_2CH_2CH_3$), 5.74 (d, 1H, ArCH), 5.82 (d, 1H, ArCH), 6.92-7.00 (m, 8H, ArH), 7.56 (d, $^3J = 8.16$ Hz, 1H, ArH), 7.81 (d, $^3J = 8.14$ Hz, 1H, ArH), 11.08 (s, b, 1H, NH, austauschbar)

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-*N*-Methyl-2,4,5-tris(4-chlorphenyl)-2-imidazolin

43: Aus 0.5 mmol (200 mg) (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-chlorphenyl)-2-imidazolin **20** und 1 mmol (142 mg) Methyljodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Dichlormethan/Methanol (95+5).

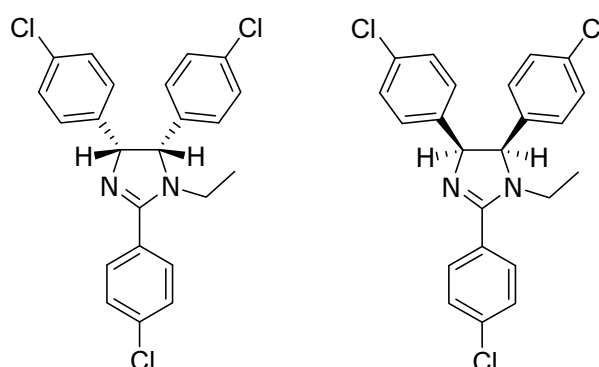
Ausbeute: 0.07 mmol (31 mg), 15 %

C₂₂H₁₇Cl₃N₂ (414.05 g/mol), weißes Pulver, Smp.: 159 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3006 (w), 2965 (w), 2926 (m), 2864 (w), 2829 (w), 2788 (w), 1613 (s), 1596 (m), 1494 (s), 1447 (m), 1400 (s), 1360 (m), 1349 (m), 1165 (m), 1091 (s), 1024 (m), 1014 (s), 834 (s), 799 (s), 764 (s)

¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 2.31 (s, 3H, N-CH₃), 4.66 (d, 1H, ArCH), 6.37 (s, b 1H, ArCH), 6.65 (d, ³J = 8.26 Hz, 2H, ArH), 7.29-7.40 (m, 4H, ArH), 7.42-7.51 (m, 4H, ArH), 7.62 (d, ³J = 8.20 Hz, 2H, ArH)

CHN: ber.: C 63.55 H 4.12 N 6.74 gef.: C 63.51 H 4.15 N 6.72

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-*N*-Ethyl-2,4,5-tris(4-chlorphenyl)-2-imidazolin

44: Aus 0.5 mmol (200 mg) (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-chlorphenyl)-2-imidazolin **20** und 1 mmol (156 mg) Ethyljodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Dichlormethan/Methanol (95+5).

Ausbeute: 0.08 mmol (36 mg), 17 %

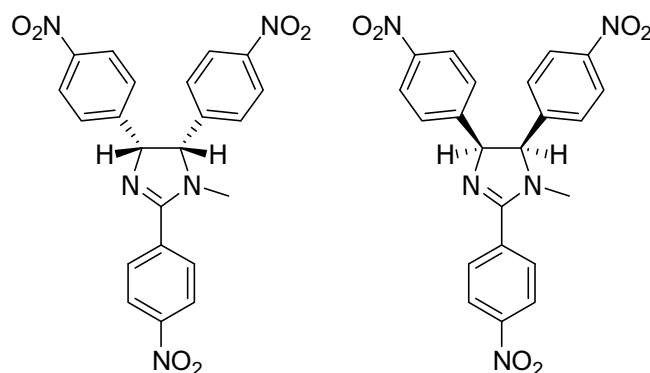
C₂₃H₁₉Cl₃N₂ (428.06 g/mol), hellgelbe Kristalle, Smp.: 155 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3062 (w), 2971 (w), 2930 (w), 1615 (m), 1591 (m), 1489 (s), 1403 (m), 1352 (m), 1290 (m), 1243 (m), 1210 (m), 1088 (s), 1065 (m), 1013 (s), 881 (m), 832 (s), 811 (s), 769 (m)

MS (+ESI, 350.0 V) ber.: 429.0692 gef.: 429.0691 Abw.: 0 ppm

¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 0.87 (t, 3H, N-CH₂CH₃), 2.82 (sext, 1H, N-CH₂CH₃), 3.27 (sext, 1H, N-CH₂CH₃), 5.27 (d, 1H, ArCH), 5.58 (d, 1H, ArCH), 6.92-6.96 (m, 2H, ArH), 7.03-7.11 (m, 4H, ArH), 7.14-7.18 (m, 2H, ArH), 7.58-7.64 (m, 2H, ArH), 7.73-7.78 (m, 2H, ArH)

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-*N*-Methyl-2,4,5-tris(4-nitrophenyl)-2-imidazolin



45: Aus 0.5 mmol (217 mg) (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-nitrophenyl)-2-imidazolin **30** und 1 mmol (142 mg) Methyljodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Dichlormethan/Methanol (9+1).

Ausbeute: 0.06 mmol (25 mg), 11 %

C₂₂H₁₇N₅O₆ (447.12 g/mol), gelbes Pulver

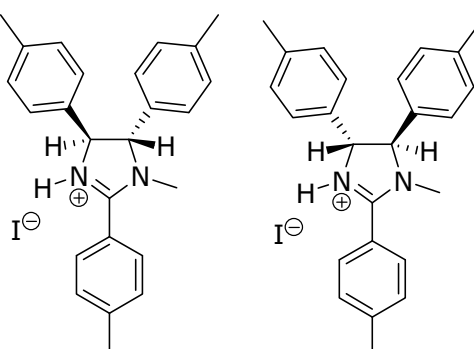
IR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3025 (w), 2924 (w), 2853 (w), 1597 (m), 1513 (s), 1408 (w), 1341 (s), 1282 (m), 1107 (m), 1061 (m), 1013 (m), 893 (m), 856 (s), 707 (m)

MS (+ESI, 350.0 V) ber.: 448.1257 gef.: 448.1243 Abw.: 3 ppm

¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 2.71 (s, 3H, N-CH₃), 5.38 (d, 1H, ArCH), 5.88 (d, 1H, ArCH), 7.22 (d, ³J = 8.64 Hz, 2H, ArH), 7.40 (d, ³J = 8.55 Hz, 2H, ArH), 7.91 (d, ³J = 8.77 Hz, 2H, ArH), 7.99 (d, ³J = 8.76 Hz, 2H, ArH), 8.11 (d, ³J = 8.83 Hz, 2H, ArH), 8.41 (d, ³J = 8.80 Hz, 2H, ArH)

(4R,5R)/(4S,5S)-N-Alkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoline

(4R,5R)/(4S,5S)-N-Methyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin



46: Aus 0.5 mmol (170 mg) (4R,5R)/(4S,5S)-2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin **35** und 1 mmol (142 mg) Methyljodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Chloroform/Methanol (95+5).

Ausbeute: 0.09 mmol (43 mg), 18 %, als Hydroiodid

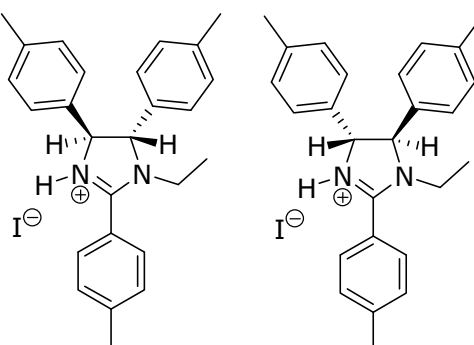
C₂₅H₂₇IN₂ (482.12 g/mol), gelbe Kristalle, Smp.: 73 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3022 (w), 2921 (w), 2855 (w), 2800-2400 (w, b), 1615 (m), 1591 (m), 1556 (m), 1512 (m), 1447 (m), 1379 (m), 1336 (m), 1276 (m), 1180 (m), 1065 (m), 1018 (m), 816 (s)

MS (+ESI, 250.0 V) ber.: 355.2169 gef.: 355.2161 Abw.: 2 ppm

¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.34 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.71 (s, 3H, N-CH₃), 4.47 (d, 1H, ArCH), 4.87 (d, 1H, ArCH), 7.16-7.21 (m, 4H, ArH), 7.22-7.29 (m, 4H, ArH), 7.38 (d, ³J = 7.98 Hz, 2H, ArH), 7.66 (d, ³J = 8.06 Hz, 2H, ArH), 11.01 (s, b, 1H, NH, austauschbar)

(4R,5R)/(4S,5S)-N-Ethyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin



47: Aus 0.5 mmol (170 mg) (4R,5R)/(4S,5S)-2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin **35** und 1 mmol (156 mg) Ethyljodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Chloroform/Methanol (95+5).

Ausbeute: 0.1 mmol (52 mg), 21 %, als Hydroiodid

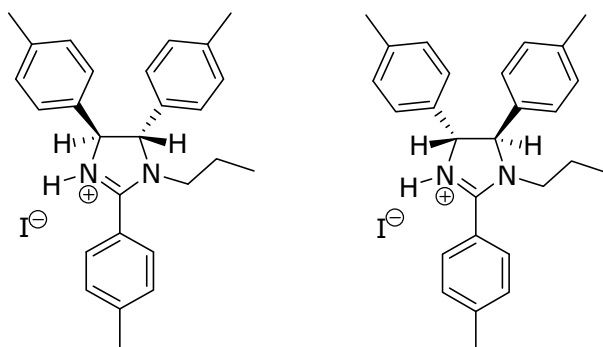
$C_{26}H_{29}IN_2$ (496.14 g/mol), gelbe Kristalle, Smp.: 86 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3023 (w), 2919 (m), 2850 (m), 2800-2500 (w, b) 1614 (m), 1587 (m), 1548 (m), 1513 (m), 1447 (m), 1379 (w), 1354 (w), 1277 (m), 1184 (m), 1018 (m), 816 (s)

MS (+ESI, .200 V) ber.: 369.2325 gef.: 369.2350 Abw.: 7 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 0.91 (t, 3H, N- CH_2CH_3), 2.33 (s, 3H, CH_3), 2.36 (s, 3H, CH_3), 2.44 (s, 3H, CH_3), 3.05 (sext, 1H, N- CH_2CH_3), 3.42 (sext, 1H, N- CH_2CH_3), 5.02 (d, 1H, ArCH), 5.15 (d, 1H, ArCH), 7.25-7.28 (m, 4H, ArH), 7.30 (d, $^3J = 7.81$ Hz, 2H, ArH), 7.44 (d, $^3J = 8.00$ Hz, 2H, ArH), 7.50 (d, $^3J = 7.96$ Hz, 2H, ArH), 7.75 (d, $^3J = 8.11$ Hz, 2H, ArH), 11.15 (s, b, 1H, NH, austauschbar)

(4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-*N*-Propyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin



48: Aus 0.5 mmol (170 mg) (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin **35** und 1 mmol (170 mg) Propyliodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Chloroform/Methanol (95+5).

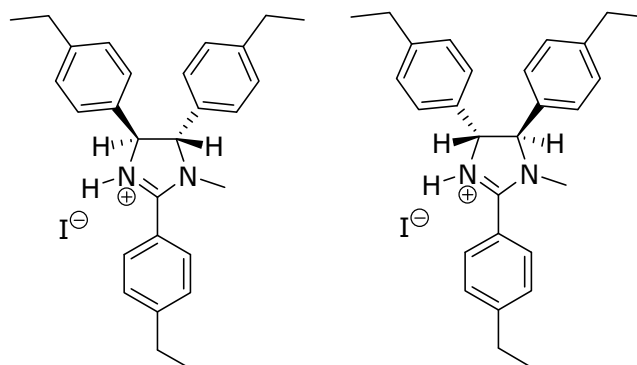
Ausbeute: 0.08 mmol (43 mg), 17 %, als Hydroiodid

$C_{27}H_{31}IN_2$ (510.15 g/mol), hellgelbes Pulver , Smp.: 69 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3023 (w), 2963 (w), 2921 (w), 2873 (w), 2800-2400 (w, b), 1614 (m), 1586 (m), 1549 (m), 1512 (s), 1455 (m), 1414 (m), 1342 (m), 1277 (m), 1220 (m), 1182 (m), 1090 (m), 1019 (m), 816 (s)

MS (+ESI, 350.0 V) ber.: 383.2482 gef.: 383.2482 Abw.: 0 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 0.59 (t, 3H, N- $CH_2CH_2CH_3$), 1.23 (sext, 1H, N- $CH_2CH_2CH_3$), 1.36 (sext, 1H, N- $CH_2CH_2CH_3$), 2.23 (s, 3H, CH_3), 2.35 (s, 3H, CH_3), 2.42 (s, 3H, CH_3), 2.89-3.00 (m, 1H, N- $CH_2CH_2CH_3$), 3.17-3.25 (m, 1H, N- $CH_2CH_2CH_3$), 4.75 (d, 1H, ArCH), 4.99 (d, 1H, ArCH), 7.19-7.25 (m, 4H, ArH), 7.27 (d, $^3J = 7.82$ Hz, 2H, ArH), 7.36 (d, $^3J = 8.08$ Hz, 2H, ArH), 7.44 (d, $^3J = 7.84$ Hz, 2H, ArH), 7.68 (d, $^3J = 8.14$ Hz, 2H, ArH), 11.09 (m, b, 1H, NH, austauschbar)

(4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-*N*-Methyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin

49: Aus 0.5 mmol (190 mg) (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin **36** und 1 mmol (142 mg) Methyliodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Chloroform/Methanol (95+5).

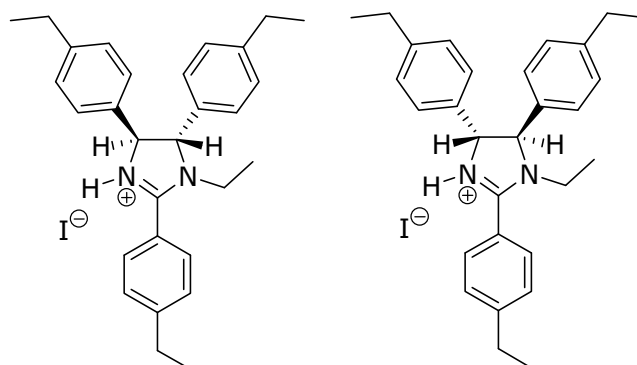
Ausbeute: 0.13 mmol (68 mg), 26 %, als Hydroiodid

C₂₈H₃₃IN₂ (524.17 g/mol), gelbes Pulver, Smp.: 59 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3023 (w), 2964 (m), 2930 (m), 2871 (w), 2800-2500 (w, b), 1615 (m), 1587 (m), 1552 (m), 1512 (m), 1454 (m), 1414 (w), 1337 (w), 1280 (m), 1182 (m), 1116 (m), 1065 (m), 1018 (m), 828 (s)

MS (+ESI, 350.0 V) ber.: 397.2638 gef.: 397.2633 Abw.: 1 ppm

¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 1.14-1.25 (m, 9H, CH₂CH₃), 2.57-2.70 (m, 6H, CH₂CH₃), 2.73 (s, 3H, N-CH₃), 4.53 (d, 1H, ArCH), 4.90 (d, 1H, ArCH), 7.21-7.24 (m, 4H, ArH), 7.27-7.32 (m, 4H, ArH), 7.42 (d, ³J = 8.40 Hz, 2H, ArH), 7.69 (d, ³J = 8.28 Hz, 2H, ArH), 10.18 (s, b, 1H, NH, austauschbar)

(4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-*N*-Ethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin

50: Aus 0.5 mmol (190 mg) (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin **36** und 1 mmol (156 mg) Ethyliodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Chloroform/Methanol (95+5).

Ausbeute: 0.12 mmol (62 mg), 23 %, als Hydroiodid

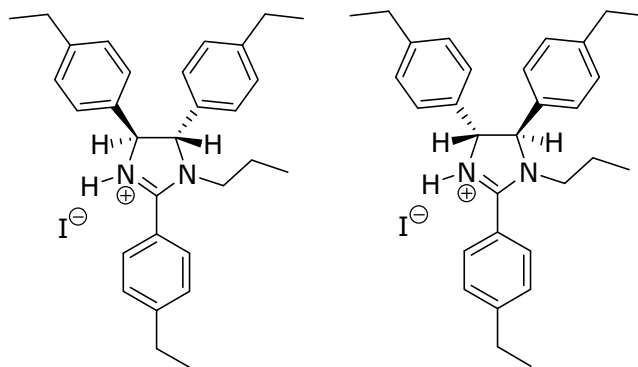
$C_{29}H_{35}IN_2$ (538.18 g/mol), gelbes Öl

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3028 (w), 2964 (m), 2927 (m), 2871 (w), 2800-2500 (w, b), 1613 (m), 1586 (m), 1546 (m), 1513 (m), 1455 (m), 1420 (m), 1353 (w), 1280 (m), 1187 (m), 1018 (m), 830 (s)

MS (+ESI, 300.0 V) ber.: 411.2795 gef.: 411.2818 Abw.: 6 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 0.94 (t, 3H, N- CH_2CH_3), 1.16–1.26 (m, 9H, CH_2CH_3), 2.60–2.70 (m, 4H, CH_2CH_3), 2.75 (q, 2H, CH_2CH_3), 3.07 (sext, 1H, N- CH_2CH_3), 3.45 (sext, 1H, N- CH_2CH_3), 5.12 (d, 1H, ArCH), 5.20 (d, 1H, ArCH), 7.28–7.38 (m, 6H, ArH), 7.47 (d, $^3J = 7.93$ Hz, 2H, ArH), 7.54 (d, $^3J = 8.06$ Hz, 2H, ArH), 7.79 (d, $^3J = 8.13$ Hz, 2H, ArH), 11.15 (s, b, 1H, NH, austauschbar)

(4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-*N*-Propyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin



51: Aus 0.5 mmol (190 mg) (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin **36** und 1 mmol (170 mg) Propyliodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Chloroform/Methanol (95+5).

Ausbeute: 0.07 mmol (41 mg), 15 %, als Hydroiodid

$C_{30}H_{37}IN_2$ (552.20 g/mol), gelbes Pulver, Smp.: 79 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3028 (w), 2964 (m), 2929 (m), 2872 (m), 2800-2500 (w), 1613 (m), 1587 (m), 1546 (m), 1505 (m), 1456 (m), 1420 (m), 1343 (w), 1281 (m), 1221 (m), 1185 (m), 1102 (m), 1018 (m), 830 (s)

MS (+ESI, 200.0 V) ber.: 425.2951 gef.: 425.2981 Abw.: 7 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 0.62 (t, 3H, N- $CH_2CH_2CH_3$), 1.17–1.27 (m, 9H, CH_2CH_3), 1.29 - 1.46 (m, 2H, N- $CH_2CH_2CH_3$), 2.61–2.70 (m, 4H, CH_2CH_3), 2.75 (q, 2H, CH_2CH_3), 2.96–3.05 (m, 1H, N- $CH_2CH_2CH_3$), 3.34–3.41 (m, 1H, N- $CH_2CH_2CH_3$), 5.74 (d, 1H, ArCH), 5.82 (d, 1H, ArCH), 7.30–7.33 (m, 4H, ArH), 7.35 (d, $^3J = 8.11$ Hz, 1H, ArH), 7.48 (d, $^3J = 8.08$ Hz, 1H, ArH), 7.55 (d, $^3J = 8.18$ Hz, 1H, ArH), 7.79 (d, $^3J = 8.19$ Hz, 1H, ArH), 11.12 (s, b, 1H, NH, austauschbar)

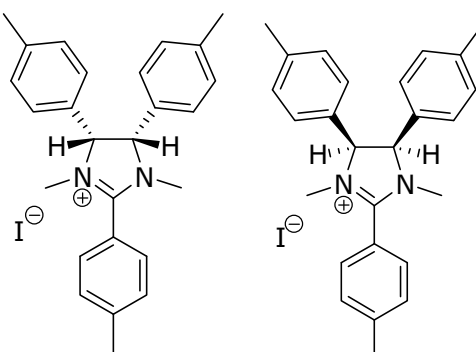
5.1.3.10 Synthese der *N,N'*-Dialkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoliniumiodide

Allgemeine Vorschrift zur Synthese der *N,N'*-Dialkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoliniumiodide

In einem 12 ml-QRS-Gefäß werden 0.5 mmol 2,4,5-Triaryl-2-imidazolin (**17**, **18**, **20**, **30**, **35**, **36**) in 5 ml Acetonitril gelöst und mit jeweils zwei Spatelspitzen Kaliumcarbonat und 18-Krone-6 versetzt, sowie 2 mmol Alkylhalogenid. Das Reaktionsgefäß wird im monoPREP der Synthesemikrowelle befestigt. Nach einer Aufheizphase von 12 min auf eine Reaktionstemperatur von 140 °C beträgt die Reaktionszeit 3 h. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Reaktionsgemisch in Dichlormethan gelöst. Das Kaliumcarbonat wird als Feststoff aus dem Reaktionsgemisch filtriert und mit wenig Dichlormethan gewaschen. Das Produkt wird im Vakuum eingeeengt und säulenchromatographisch an Kieselgel oder durch Umkristallisation gereinigt.

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-*N,N'*-Dialkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoliniumiodide

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-*N,N'*-Dimethyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoliniumiodid



52: Aus 0.5 mmol (170 mg) (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin **17** und 2 mmol (284 mg) Methyljodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Chloroform/Methanol (95+5).

Ausbeute: 0.41 mmol (204 mg), 82 %, als Iodid

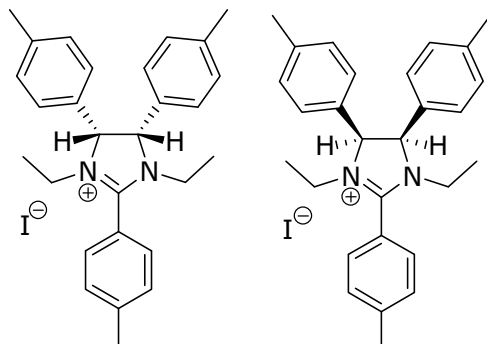
C₂₆H₂₉IN₂ (496.14 g/mol), gelbes Pulver, Smp.: 184 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3026 (w), 2979 (w), 2924 (m), 2868 (w), 1600 (s), 1574 (s), 1515 (m), 1446 (m), 1376 (w), 1260 (m), 1217 (m), 1191 (m), 833 (s)

MS (+ESI, 150.0 V) ber.: 369.2325 gef.: 369.2321 Abw.: 1 ppm

¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 2.17 (s, 6H, CH₃), 2.48 (s, 3H, CH₃), 2.80 (s, 6H, N-CH₃), 5.77 (s, 2H, ArCH), 6.99-7.05 (m, 8H, ArH), 7.60 (d, ³J = 7.84 Hz, 2H, ArH), 7.86 (d, ³J = 7.68 Hz, 2H, ArH)

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-*N,N'*-Diethyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoliumiodid



53: Aus 0.5 mmol (170 mg) (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin **17** und 2 mmol (312 mg) Ethyliodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Chloroform/Methanol (95+5).

Ausbeute: 0.35 mmol (186 mg), 71 %, als Iodid

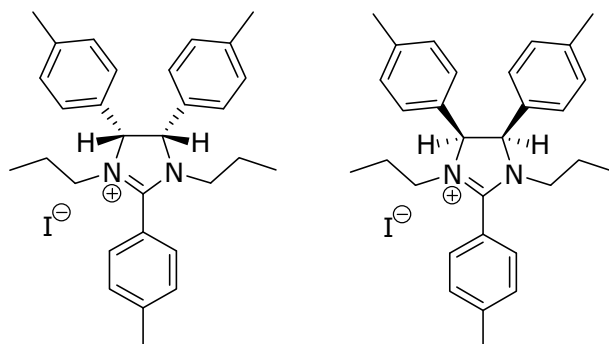
$C_{28}H_{33}IN_2$ (524.17 g/mol), hellgelbes Pulver, Smp.: 174 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3469 (m), 3433 (w), 3026 (w), 2982 (w), 2921 (w), 2876 (w), 1613 (m), 1591 (s), 1570 (s), 1516 (m), 1460 (w), 1444 (m), 1380 (m), 1290 (m), 1266 (m), 832 (s)

MS (+ESI, 150.0 V) ber.: 397.2638 gef.: 397.2637 Abw.: 0 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 0.98 (t, 6H, $N-CH_2CH_3$), 2.19 (s, 6H, CH_3), 2.48 (s, 3H, CH_3), 2.93 (sext, 2H, $N-CH_2CH_3$), 3.26 (sext, 2H, $N-CH_2CH_3$), 5.91 (s, 2H, ArCH), 6.98-7.12 (m, 8H, ArH), 7.61 (d, $^3J = 7.52$ Hz, 2H, ArH), 7.75 (s, b, 1H, ArH), 7.98 (s, b, 1H, ArH)

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-*N,N'*-Dipropyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoliumiodid



54: Aus 0.5 mmol (170 mg) (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin **17** und 2 mmol (340 mg) Propyliodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Chloroform/Methanol (95+5).

Ausbeute: 0.34 mmol (185 mg), 67 %, als Iodid

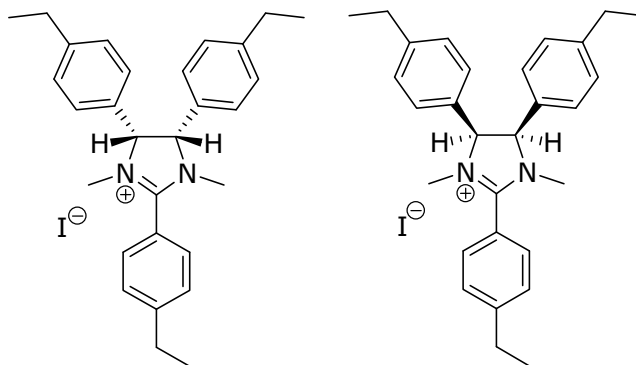
$C_{30}H_{37}IN_2$ (552.20 g/mol), gelbe Kristalle, Smp.: 149 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3026 (w), 2973 (w), 2924 (w), 2875 (w), 1614 (m), 1591 (s), 1574 (s), 1514 (m), 1465 (m), 1379 (m), 1308 (w), 1256 (m), 1213 (m), 1188 (m), 1118 (m), 1102 (m), 834 (s)

MS (+ESI, 100.0 V) ber.: 425.2951 gef.: 425.2975 Abw.: 6 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 0.67 (t, 6H, N-CH₂CH₂CH₃), 1.42 (sext, 4H, N-CH₂CH₂CH₃), 2.18 (s, 6H, CH₃), 2.48 (s, 3H, CH₃), 2.85-2.94 (m, 2H, N-CH₂CH₂CH₃), 3.08-3.17 (m, 2H, N-CH₂CH₂CH₃), 5.91 (s, 2H, ArCH), 6.98-7.10 (m, 8H, ArH), 7.57-7.70 (m, 3H, ArH), 7.94-8.06 (s, b, 1H, ArH)

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-*N,N'*-Dimethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliumiodid



55: Aus 0.5 mmol (190 mg) (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin **18** und 2 mmol (284 mg) Methyljodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Chloroform/Methanol (95+5).

Ausbeute: 0.41 mmol (219 mg), 81 %, als Iodid

$C_{29}H_{35}IN_2$ (538.18 g/mol), gelbe Kristalle, Smp.: 153 °C

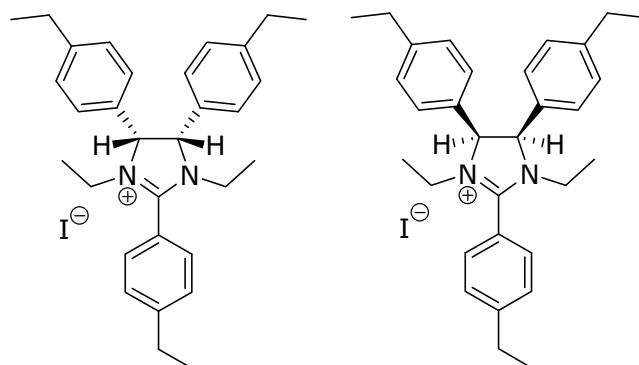
IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3024 (w), 2963 (m), 2930 (m), 2871 (w), 1601 (s), 1573 (m), 1559 (m), 1513 (m), 1454 (m), 1373 (w), 1262 (m), 1219 (m), 1185 (m), 1120 (m), 1076 (m), 839 (s)

MS (+ESI, 150.0 V) ber.: 411.2795 gef.: 411.2799 Abw.: 1 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 1.05 (t, 6H, CH₂CH₃), 1.28 (t, 3H, CH₂CH₃), 2.46 (q, 4H, CH₂CH₃), 2.78 (q, 2H, CH₂CH₃), 2.82 (s, 6H, N-CH₃), 5.78 (s, 2H, ArCH), 7.00 (s, 8H, ArH), 7.64 (d, $^3J = 8.45$ Hz, 2H, ArH), 7.89 (d, $^3J = 7.90$ Hz, 2H, ArH)

CHN: ber.: C 64.68 H 6.55 N 5.20 gef.: C 64.40 H 6.76 N 5.09

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-*N,N'*-Diethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliumiodid



56: Aus 0.5 mmol (190 mg) (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolium **18** und 2 mmol (312 mg) Ethyliodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Chloroform/Methanol (95+5).

Ausbeute: 0.35 mmol (196 mg), 69 %, als Iodid

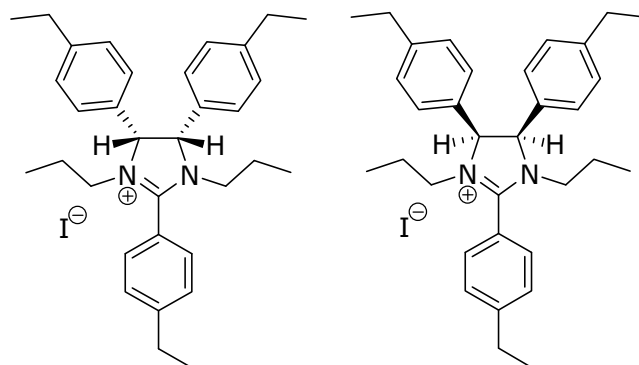
$C_{31}H_{39}IN_2$ (566.22 g/mol), braune Kristalle, Smp.: 100 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3028 (w), 2966 (m), 2932 (m), 2872 (w), 1614 (m), 1587 (s), 1514 (s), 1558 (m), 1501 (m), 1455 (m), 1386 (w), 1290 (m), 1261 (m), 841 (s)

MS (+ESI, 150.0 V) ber.: 439.3108 gef.: 439.3125 Abw.: 4 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 0.98-1.08 (m, 12H, CH_2CH_3 , $N-CH_2CH_3$), 1.28 (t, 3H, CH_2CH_3), 2.46 (q, 4H, CH_2CH_3), 2.79 (q, 2H, CH_2CH_3), 2.97 (sext, 2H, $N-CH_2CH_3$), 3.23-3.29 (m, 2H, $N-CH_2CH_3$), 5.92 (s, 2H, ArH), 6.97-7.08 (m, 8H, ArH), 7.65 (d, $^3J = 8.20$ Hz, 2H, ArH), 7.79 (s, b, 1H, ArH), 8.01 (s, b, 1H, ArH)

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-*N,N'*-Dipropyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliumiodid



57: Aus 0.5 mmol (190 mg) (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolium **18** und 2 mmol (340 mg) Propyliodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch:

Chloroform/Methanol (95+5).

Ausbeute: 0.27 mmol (163 mg), 55 %, als Iodid

$C_{33}H_{43}IN_2$ (594.25 g/mol), hellgelbes Pulver, Smp.: 211 °C

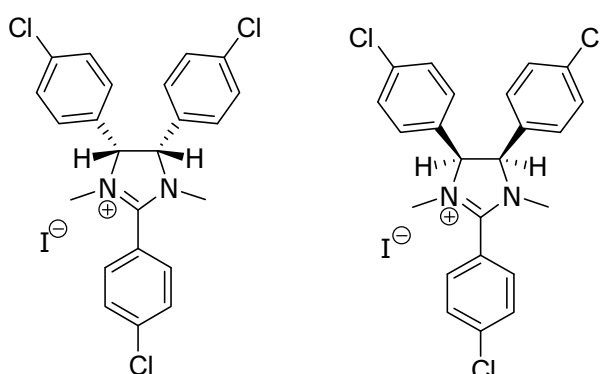
IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3028 (w), 2964 (m), 2932 (m), 2874 (w), 1614 (m), 1587 (s), 1559 (m), 1514 (m), 1501 (m), 1457 (m), 1424 (m), 1371 (m), 1255 (m), 1102 (m), 1022 (m), 845 (s)

MS (+ESI, 250.0 V) ber.: 467.3421 gef.: 467.3443 Abw.: 5 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 0.69 (t, 6H, N-CH₂CH₂CH₃), 1.05 (t, 6H, CH₂CH₃), 1.28 (t, 3H, CH₂CH₃), 1.44 (sext, 4H, N-CH₂CH₂CH₃), 2.45 (q, 4H, CH₂CH₃), 2.79 (q, 2H, CH₂CH₃), 2.91-2.99 (m, 2H, N-CH₂CH₂CH₃), 3.10-3.19 (m, 2H, N-CH₂CH₂CH₃), 5.93 (s, 2H, ArCH), 7.01 (s, 8H, ArH), 7.61-7.72 (m, 3H, ArH), 8.02 (s, 1H, ArH)

CHN: ber.: C 66.66 H 7.29 N 4.71 gef.: C 66.90 H 7.56 N 4.79

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-*N,N'*-Dimethyl-2,4,5-tris(4-chlorphenyl)-2-imidazoliumiodid



58: Aus 0.5 mmol (200 mg) (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-chlorphenyl)-2-imidazolin **20** und 2 mmol (284 mg) Methyljodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Dichlormethan/Methanol (95+5).

Ausbeute: 0.29 mmol (161 mg), 58 %, als Iodid

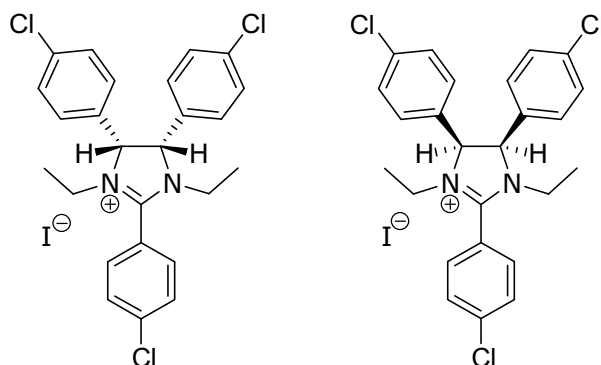
$C_{23}H_{20}Cl_3IN_2$ (555.97 g/mol), weißes Pulver, Smp.: 264 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3033 (w), 3014 (w), 2978 (w), 2929 (w), 1600 (s), 1572 (s), 1490 (s), 1440 (w), 1404 (s), 1337 (m), 1267 (m), 1217 (m), 1085 (s), 1013 (s), 876 (s), 844 (s), 779 (s)

MS (+ESI, 300.0 V) ber.: 429.0687 gef.: 429.0719 Abw.: 7 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 2.82 (s, 6H, N-CH₃), 5.87 (s, 2H, ArCH), 7.20-7.25 (m, 4H, ArH), 7.25-7.31 (m, 4H, ArH), 7.87-7.92 (m, 2H, ArH), 7.90 (d, b, 2H, ArH)

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-*N,N'*-Diethyl-2,4,5-tris(4-chlorphenyl)-2-imidazoliumiodid



59: Aus 0.5 mmol (200 mg) (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-chlorphenyl)-2-imidazolium **20** und 2 mmol (312 mg) Ethyliodid:

Reinigung erfolgt durch Umkristallisation aus Diethylether.

Ausbeute: 0.34 mmol (199 mg), 68 %, als Iodid

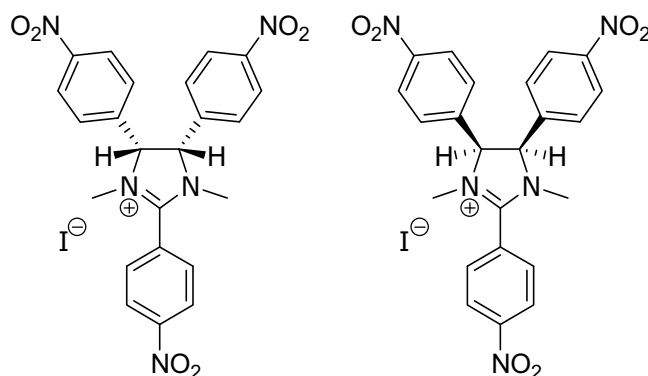
$C_{25}H_{24}Cl_3IN_2$ (584.01 g/mol), weißes Pulver, Smp.: 250 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3035 (w), 3015 (w), 2986 (w), 1589 (s), 1569 (s), 1490 (s), 1457 (m), 1411 (m), 1387 (m), 1352 (m), 1282 (m), 1261 (m), 1214 (m), 1087 (s), 1012 (s), 873 (s), 847 (s), 795 (s)

MS (+ESI, 300.0 V) ber.: 457.1000 gef.: 457.1006 Abw.: 1 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 0.97 (t, 6H, N-CH₂CH₃), 2.95 (sext, 2H, N-CH₂CH₃), 3.26 (sext, 2H, N-CH₂CH₃), 5.98 (s, 2H, ArCH), 7.20-7.30 (m, 8H, ArH), 7.89 (s, b, 2H, ArH), 8.20 (s, b, 1H, ArH)

(4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-*N,N'*-Dimethyl-2,4,5-tris(4-nitrophenyl)-2-imidazoliumiodid



60: Aus 0.5 mmol (217 mg) (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Tris(4-nitrophenyl)-2-imidazolium **30** und 2 mmol (284 mg) Methyliodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Dichlormethan/Methanol (9+1).

Ausbeute: 0.17 mmol (103 mg), 35 %, als Iodid

$C_{23}H_{20}IN_5O_6$ (589.05 g/mol), gelbes Pulver, Smp.: 225 °C

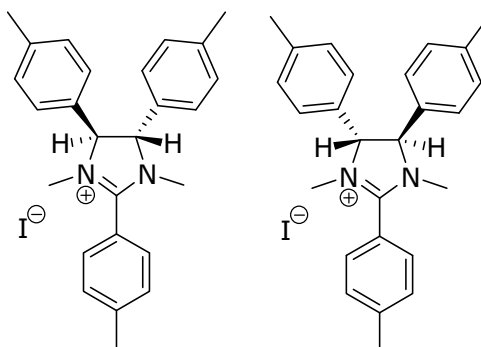
IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3039 (w), 2938 (w), 1582 (m), 1516 (s), 1426 (m), 1414 (m), 1346 (s), 1321 (s), 1290 (s), 1252 (m), 1182 (m), 1107 (m), 1075 (m), 856 (s)

MS (+ESI, 250.0 V) ber.: 462.1408 gef.: 462.1417 Abw.: 2 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 2.87 (s, 6H, N-CH₃), 6.15 (s, 2H, ArCH), 7.55-7.61 (m, 4H, ArH), 8.02-8.07 (m, 4H, ArH), 8.39 (d, b, 2H, ArH), 8.62-8.62 (m, 2H, ArH)

(4R,5R)/(4S,5S)-N,N'-Dialkyl-2,4,5-triaryl-2-imidazoliniumiodide

(4R,5R)/(4S,5S)-N,N'-Dimethyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoliniumiodid



61: Aus 0.5 mmol (170 mg) (4R,5R)/(4S,5S)-2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin **35** und 2 mmol (284 mg) Methyliodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Chloroform/Methanol (95+5).

Ausbeute: 0.38 mmol (186 mg), 75 %, als Iodid

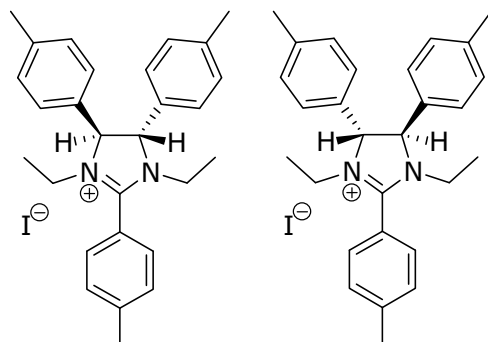
$C_{26}H_{29}IN_2$ (496.14 g/mol), gelbes Pulver, Smp.: 158 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3022 (w), 2921 (w), 1614 (m), 1591 (s), 1564 (m), 1516 (m), 1506 (m), 1444 (m), 1402 (m), 1331 (m), 1308 (m), 1282 (m), 1234 (m), 1185 (m), 1021 (m), 810 (s)

MS (+ESI, 350.0 V) ber.: 369.2325 gef.: 369.2351 Abw.: 7 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 2.36 (s, 6H, CH₃), 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.75 (s, 6H, N-CH₃), 5.11 (s, 2H, ArCH), 7.31 (d, $^3J = 7.86$ Hz, 4H, ArH), 7.44 (d, $^3J = 8.08$ Hz, 4H, ArH), 7.57 (d, $^3J = 7.92$ Hz, 2H, ArH), 7.76 (d, $^3J = 8.18$ Hz, 2H, ArH)

(4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-*N,N'*-Diethyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoliumiodid



62: Aus 0.5 mmol (170 mg) (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin **35** und 2 mmol (312 mg) Ethyliodid:
Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Chloroform/Methanol (95+5).

Ausbeute: 0.34 mmol (178 mg), 68 %, als Iodid

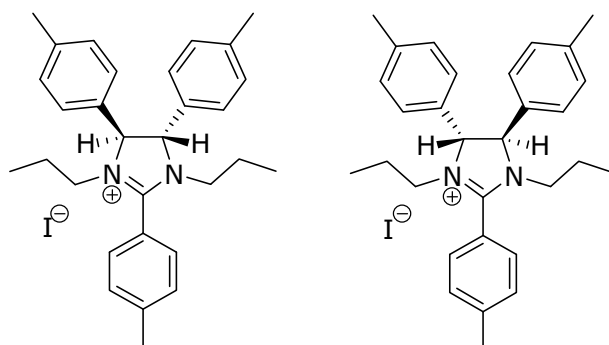
C₂₈H₃₃IN₂ (524.17 g/mol), rotbraune Kristalle, Smp.: 108 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3023 (w), 2921 (w), 1613 (m), 1556 (s), 1514 (m), 1440 (m), 1382 (m), 1350 (m), 1332 (m), 1279 (m), 1184 (m), 1020 (m), 810 (s)

MS (+ESI, 300.0 V) ber.: 397.2638 gef.: 397.2664 Abw.: 7 ppm

¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 0.90 (t, 6H, N-CH₂CH₃), 2.37 (s, 6H, CH₃), 2.48 (s, 3H, CH₃), 2.97 (sext, 2H, N-CH₂CH₃), 3.24 (sext, 2H, N-CH₂CH₃), 5.27 (s, 2H, ArCH), 7.33 (d, ³J = 7.98 Hz, 4H, ArH), 7.49 (d, ³J = 8.04 Hz, 4H, ArH), 7.59 (d, ³J = 8.06 Hz, 2H, ArH), 7.83 (d, ³J = 8.13 Hz, 2H, ArH)

(4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-*N,N'*-Dipropyl-2,4,5-tris(4-methylphenyl)-2-imidazoliumiodid



63: Aus 0.5 mmol (170 mg) (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Tris(4-methylphenyl)-2-imidazolin **35** und 2 mmol (340 mg) Propyliodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Chloroform/Methanol (95+5).

Ausbeute: 0.29 mmol (158 mg), 57 %, als Iodid

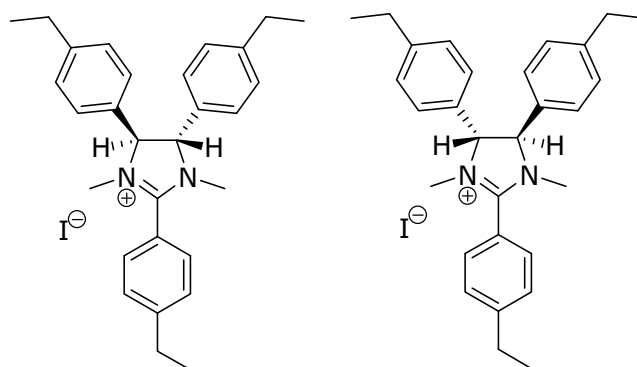
$C_{30}H_{37}IN_2$ (552.20 g/mol), gelbes Pulver, Smp.: 169 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3012 (w), 2970 (m), 2933 (w), 2873 (w), 1613 (m), 1517 (s), 1584 (s), 1517 (m), 1497 (m), 1466 (m), 1430 (m), 1378 (m), 1365 (m), 1339 (m), 1278 (m), 1234 (m), 1185 (m), 1103 (m), 1022 (m), 820 (s), 809 (s)

MS (+ESI, 200.0 V) ber.: 425.2951 gef.: 425.2974 Abw.: 5 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 0.59 (t, 6H, N-CH₂CH₂CH₃), 1.24-1.41 (m, 4H, N-CH₂CH₂CH₃), 2.36 (s, 6H, CH₃), 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.88 -2.96 (m, 2H, N-CH₂CH₂CH₃), 3.11-3.20 (m, 2H, N-CH₂CH₂CH₃), 5.24 (s, 2H, ArCH), 7.33 (d, 3J = 7.86 Hz, 4H, ArH), 7.46 (d, 3J = 8.09 Hz, 4H, ArH), 7.59 (d, 3J = 7.94 Hz, 2H, ArH), 7.81 (d, 3J = 8.16 Hz, 2H, ArH)

(4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-*N,N'*-Dimethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliumiodid



64: Aus 0.5 mmol (190 mg) (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolium **36** und 2 mmol (284 mg) Methyljodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Chloroform/Methanol (95+5).

Ausbeute: 0.34 mmol (186 mg), 69 %, als Iodid

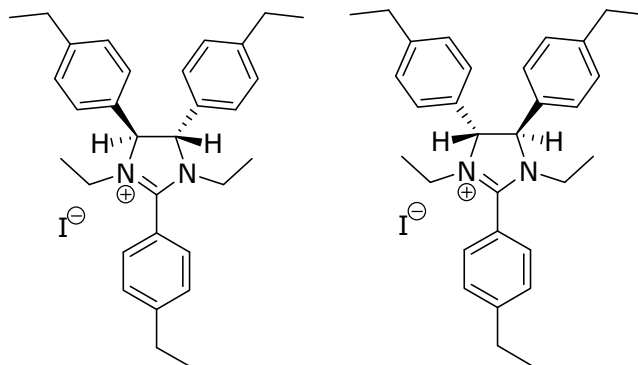
$C_{29}H_{35}IN_2$ (538.18 g/mol), hellgelbes Pulver, Smp.: 146 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3028 (w), 2964 (m), 2930 (m), 2872 (w), 1613 (m), 1590 (s), 1558 (m), 1515 (m), 1504 (m), 1456 (m), 1422 (m), 1332 (m), 1286 (m), 1234 (m), 1185 (m), 1018 (m), 825 (s)

MS (+ESI, 250.0 V) ber.: 411.2795 gef.: 411.2797 Abw.: 0 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 1.19-1.27 (m, 9H, CH₂CH₃), 2.66 (q, 4H, CH₂CH₃), 2.73-2.79 (m, 8H, CH₂CH₃, N-CH₃), 5.15 (s, 2H, ArCH), 7.35 (d, 3J = 8.14 Hz, 4H, ArH), 7.47 (d, 3J = 8.12 Hz, 4H, ArH), 7.60 (d, 3J = 8.28 Hz, 2H, ArH), 7.79 (d, 3J = 8.24 Hz, 2H, ArH)

CHN: ber.: C 64.68 H 6.55 N 5.20 gef.: C 64.42 H 6.84 N 5.09

(4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-*N,N'*-Diethyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliumiodid

65: Aus 0.5 mmol (190 mg) (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolium **36** und 2 mmol (312 mg) Ethyliodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Chloroform/Methanol (95+5).

Ausbeute: 0.31 mmol (178 mg), 63 %, als Iodid

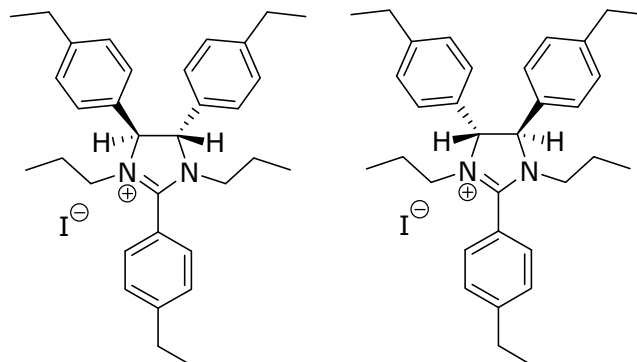
$C_{31}H_{39}IN_2$ (566.22 g/mol), gelbes Pulver, Smp.: 98 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3030 (w), 2966 (m), 2932 (m), 2872 (w), 1614 (m), 1558 (s), 1516 (m), 1500 (m), 1457 (m), 1437 (m), 1424 (m), 1383 (m), 1350 (m), 1284 (m), 1228 (m), 1187 (m), 1095 (m), 846 (s)

MS (+ESI, 250.0 V) ber.: 439.3108 gef.: 439.3112 Abw.: 1 ppm

1H -NMR_{400 MHz} ($[D_6]$ -DMSO): δ (ppm) 0.92 (t, 6H, CH_2CH_3) 1.18-1.29 (m, 9H, CH_2CH_3 , N- CH_2CH_3), 2.67 (q, 4H, CH_2CH_3), 2.77 (q, 2H, CH_2CH_3), 2.95 (sext, 2H, N- CH_2CH_3), 3.24 (sext, 2H, N- CH_2CH_3), 5.31 (s, 2H, ArCH), 7.36 (d, $^3J = 8.06$ Hz, 4H, ArH), 7.52 (d, $^3J = 8.07$ Hz, 4H, ArH), 7.62 (d, $^3J = 8.15$ Hz, 2H, ArH), 7.85 (d, $^3J = 8.16$ Hz, 2H, ArH)

CHN: ber.: C 65.72 H 6.94 N 4.94 gef.: C 65.67 H 7.01 N 5.02

(4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-*N,N'*-Dipropyl-2,4,5-tris(4-ethylphenyl)-2-imidazoliumiodid

66: Aus 0.5 mmol (190 mg) (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Tris(4-ethylphenyl)-2-imidazolin **36** und 2 mmol (340 mg) Propyliodid:

Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel, Fließmittelgemisch: Chloroform/Methanol (95+5).

Ausbeute: 0.25 mmol (150 mg), 19 %, als Iodid

$C_{33}H_{43}IN_2$ (594.25 g/mol), gelbes Pulver, Smp.: 187 °C

IR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2028 (w), 2963 (m), 2978 (m), 2871 (w), 1612 (m), 1572 (s), 1553 (m), 1516 (m), 1498 (m), 1455 (m), 1365 (m), 1346 (m), 1286 (m), 1232 (m), 1119 (m), 1102 (m), 1061 (m), 834 (s)

MS (+ESI, 250.0 V) ber.: 467.3421 gef.: 467.3418 Abw.: 1 ppm

¹H-NMR_{400 MHz} ([D₆]-DMSO): δ (ppm) 0.60 (t, 6H, N-CH₂CH₂CH₃), 1.19-1.29 (m, 9H, CH₂CH₃), 1.30-1.42 (m, 4H, N-CH₂CH₂CH₃), 2.67 (q, 4H, CH₂CH₃), 2.78 (q, 2H, CH₂CH₃), 2.89-2.97 (m, 2H, N-CH₂CH₂CH₃), 3.12-3.21 (m, 2H, N-CH₂CH₂CH₃), 5.28 (s, 2H, ArCH), 7.37 (d, ³J = 8.19 Hz, 4H, ArH), 7.49 (d, ³J = 8.16 Hz, 4H, ArH), 7.62 (d, ³J = 8.29 Hz, 2H, ArH), 7.84 (d, ³J = 8.27 Hz, 2H, ArH)

5.1.4 Polarimetrische Untersuchungen

Alle Messungen wurden dreimal durchgeführt, die angegebenen Werte stellen die Mittelwerte dar. Aufgrund der geringen Messanzahl wird auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Probenvorbereitung

Zur Herstellung einer Messlösung mit einer Konzentration von 1 g/100 ml werden 20 mg der Substanz eingewogen, in 2 ml Methanol gelöst und anschließend 1:10 mit Methanol verdünnt. Das Herstellen eines Volumens von 2 ml ist bei der Verwendung einer 1 ml-Mikro-Küvette (Schichtdicke 1 dm) ausreichend. Die Messlösungen werden vor der Vermessung mit Hilfe eines Wasserbades auf 20 °C temperiert.

Einstellung der Parameter am Polarimeter:

D-Linie des Natriumlichtes bei 589 nm

SLIT: 1 mm

Integration: 1 s

Durchführung

Vor der Messung der Probe wird der Nullabgleich des Polarimeters mit Methanol durchgeführt. Nachfolgend wird die auf 20 °C temperierte Messlösung luftblasenfrei in die Mikro-Küvette überführt und vermessen. Die Berechnung der spezifischen Drehung $[\alpha]_D^{20}$ erfolgt anhand folgender Gleichung^[89]:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{100 \cdot \alpha}{c \cdot l}$$

α - gemessener Drehungswinkel [°]

c - Konzentration [g/100 ml]

l - Schichtdicke [dm]

Zur Überprüfung des Polarimeters wurde der Drehungswinkel von (-)-Menthol (99 % ee) nach der Vorschrift des DAB 9 Kommentars gemessen.^[121] Die spezifische Drehung der Verbindung entsprach der Prüfung auf Reinheit nach dem DAB 9 Kommentar.

5.1.5 Nachweis der Iodid-Ionen

Probenvorbereitung

Zur Herstellung einer Iodid-Stärke-Lösung werden 1 g Weizenstärke und 0.5 g Kaliumiodid auf 100 g Aqua dem. gelöst. Die Iodid-Stärke-Lösung wird anschließend auf die Mitte eines Filterpapiers getüpfelt.

Durchführung

Eine Spatelspitze der zu untersuchenden Substanz wird auf eine Tüpfelplatte gebracht und mit einem Tropfen konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Anschließend wird das mit der Iodid-Stärke-Lösung versetzte Filterpapier über die Tüpfelplatte gehalten. Wenn die Substanz Iodid enthält, färben die aufsteigenden Iodgase das Filterpapier blauviolett.

Zum positiven Nachweis der Reaktion wurde Kaliumiodid zum Iod oxidiert und für einen eindeutig negativen Nachweis wurde ein nicht alkyliertes 2,4,5-Triaryl-2-imidazolin (z. B. Verbindung **17**) verwendet.

5.1.6 UV-spektroskopische Untersuchungen

Alle Messungen wurden dreimal durchgeführt, die angegebenen Werte stellen die Mittelwerte dar. Aufgrund der geringen Messanzahl wird auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Probenvorbereitung

Zur Herstellung einer 10^{-4} M Substanzlösung, wird die Substanz im entsprechenden Volumen einer 0.1 M Salzsäure unter leichtem Erwärmen gelöst. Anschließend wird diese Stammlösung 1:1 mit 0.1 M Salzsäure verdünnt, so dass die Konzentration der Messlösung $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l entspricht. Die Absorptionsmaxima für die gemessenen Verbindungen sollten im linearmessbaren Bereich des UV-Spektrometers liegen, in diesem Fall zwischen 0.2 und 2.0.

Durchführung

Von der Messlösung werden 20 ml in ein Becherglas überführt und der pH-Wert überprüft (pH = 1, RT). Anschließend wird der pH-Wert durch Zugabe kleiner Mengen (2.5-50 μ l) unterschiedlich konzentrierter Natriumhydroxidlösungen (0.01 M, 0.025 M, 0.05 M, 0.1 M, 1 M) schrittweise erhöht. Die Absorptionsspektren werden bei unterschiedlich eingestellten pH-Werten aufgenommen. Die jeweils für die Absorptionsmessung entnommene Probe wird der Gesamtlösung vor weiterer pH-Wertänderung wieder zugeführt.

Abschließend wird die Messlösung mit 1 M Salzsäure wieder auf einen pH-Wert von eins gebracht und davon das Absorptionsspektrum aufgenommen.

Der Volumenfehler, der sich durch das Zusätzen der Natriumhydroxidlösungen ergibt, kann aufgrund der geringen Mengen vernachlässigt werden.

5.2 Pharmakologischer und biochemischer Teil

5.2.1 Verbrauchsmaterialien

Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

Alle für die pharmakologischen und biochemischen Untersuchungen verwendeten Reagenzien und Lösungen wurden von den Firmen Akadia-Chemie, Biochrom AG, Fluka, ICN, Invitrogen, Merck, Mirus, National Diagnostics, PAA Laboratories GmbH, Promega, Roth, Sigma-Aldrich, PerkinElmer, SantaCruz (Biotec), Serva, ThermoFisher Scientific und VWR bezogen. Die Reinheit der verwendeten Chemikalien entspricht den höchsten Anforderungen.

- Ac-DEVD-AMC-Lösung (immer frisch herstellen):
30 mmol/l Ac-DEVD-AMC-Stammlösung auftauen und 1:500 mit PBS verdünnen
Die Ac-DEVD-AMC-Lösung muss vor Licht geschützt werden.
- Glutardialdehydlösung 1 % (Abstopplösung):
12.5 ml PBS und 0.5 ml Glutardialdehydlösung 25 %
Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.
- Kristallviolettlösung 0.02 %:
100 mg Kristallviolett in 500 ml Aqua dem. lösen
Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.
- PLB-Lösung (immer frisch herstellen):
PLB (passiver Lysepuffer) 1:5 mit PBS verdünnen
- Posphatgepufferte Salzlösung (PBS):
0.2 g KH_2PO_4 , 8 g NaCl, 1.44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ und 0.2 g KCl in 1 l Aqua bidest. lösen
Bei Bedarf autoklavieren. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.
- Trypsinlösung:
0.05 % Trypsin, 0.02 % EDTA in PBS (steril) lösen und sterilfiltrieren
Die Lagerung erfolgt bei -15 °C.
- Zellkulturmedium:
500 ml DMEM (4.5 g/l Glucose, 15 g/l Phenolrot) werden mit 25 ml FCS versetzt
Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

Antikörper

Mdm2 Monoclonal Antibody (IF2); Mouse/IgG2b (Thermo Scientific Pierce)

p53 Monoclonal Antibody (SP5); Rabbit/IgG (Thermo Scientific Pierce)

DyLight 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Absorptionsmaximum: 493 ± 4 nm, Emissionsmaximum: 518 ± 4 nm (Thermo Scientific Pierce)

DyLight 550 Co Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Absorptionsmaximum: 562 ± 4 nm, Emissionsmaximum: 576 ± 4 nm (Thermo Scientific Pierce)

Einmalkanülen und -spritzen

verschiedene Größen und Volumina (B. Braun Melsungen AG)

Mikrotiterplatten

96-Well-Mikrotiterplatten (klar), steril (Nunc)

96-Well-Mikrotiterplatten (schwarz), steril (Nunc)

96-Well-Mikrotiterplatten (schwarz mit klarem Boden), steril (PerkinElmer)

6-Loch-Makroplatten, klar, steril (TPP)

Membranfilter

Membranfilter (Sartorius AG)

Pasteurpipetten

Pasteurpipetten aus Glas (Roth)

Pipettenspitzen

Pipettenspitzen 10 μ l (Eppendorf AG)

Pipettenspitzen 200 μ l und 1000 μ l (Sarstedt AG)

Puffer-Kit (Thermo Scientific Pierce)

Zusammensetzung: 10X Waschpuffer (100 ml), 10X Permeabilisierungspuffer (100 ml), 10X Blockierungspuffer (85 ml), Hoechst Dye (30 μ l)

Reaktionsgefäße

Reaktionsgefäße 1.5 ml (Sarstedt AG)

Serologische Pipetten

Serologische Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml; steril (Sarstedt AG)

Sterilfilter für Einzelspritzen

Sterilfilter 0.2 μ m (Nalgene)

Zellkulturflaschen

Zellkulturflaschen 25 cm² (Sarstedt AG)

Zellkulturflaschen 75 cm² (Nunc)

Zelllinien

A549 Zellen (DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

MCF-7 Zellen (DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

MDA-MB-231 Zellen (ATCC: American Type Culture Collection)

U2OS Zellen (Schering AG)

Zentrifugenröhrchen

Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml (Sarstedt AG)

5.2.2 Verwendete Geräte

8/12-Kanalpipette

8/12-Kanalpipette 30-300 µl Eppendorf Research (Eppendorf AG)

Analysenwaage

Analysenwaage Sartorius BP2110 (Sartorius AG)

Autoklav

Autoklav Systec 2540 EL (Systec GmbH)

Brutschrank

Brutschrank HERAcell 240 CO₂ Incubator (Heraeus)

Labortiefkühltruhe

Labortiefkühltruhe Profiline Taurus PLTA (National Lab)

Mikroplattenreader

Luminometer Viktor², 1420 Multilabel Counter Wallac (Perkin Elmer)

Magnetrührer

IKAMAG RCT (IKA Labortechnik)

Mikroskop

Axiovert 40 CFL, mit Mikroskop-Beleuchtungseinrichtung HBO 50 (Carl Zeiss)

Axiovert 25 C (Carl Zeiss)

pH-Meter

Batterie-Konduktometer-Portamess (Knick)

Pipetten

Pipetten 1 µl, 20 µl, 200 µl und 1000 µl, verstellbar (Eppendorf AG)

Pipettierhilfe

PIPETBOY acu (Integra Biosciences)

Schüttelmaschine

Schüttelmaschine Gerhardt LS10 (Gerhardt)

Schüttelmaschine TiMix, Haube TH15 (Edmund Bühler)

Sterilwerkbank

Sterilwerkbank HERAsafe (Heraeus)

Stickstofftank

GT11 (Air Liquide)

Ultraschallbad

Ultraschallbad Bandelin Sonorex Super RK106 (Bandelin)

Vakuum-Absaugsystem

VACUBOY Handoperator (Integra Biosciences)

8-Kanal Edelstahladapter 40 mm (Integra Biosciences)

Vakuumpumpe Laboport KNF (KNF Neuberger)

Vortexer

Vortex Genie2 (Scientific Industries)

Wasserbad

Wasserbad Haake fisons W26 (Haake)

SW-21C (Julabo Labortechnik)

Zählkammer

Neubauer-Zählkammer (0.0025 mm²) (Carl Zeiss)

Zentrifuge

Eppendorf Zentrifuge 5417R (Eppendorf AG)

Multifuge 3SR Plus (Thermo Scientific)

5.2.3 Pharmakologische Methoden

5.2.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

Allgemeine Kultivierungsbedingungen

Das Kultivieren und Arbeiten mit den Zellen wird, soweit nichts anderes angegeben ist, ausschließlich in einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien werden im Zellkulturmedium bei einer Temperatur von 37 °C, einer gesättigten Wasserdampfatosphäre und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert.

Passagieren und Zellkulturmediumwechsel

Vor dem Passagieren oder Zellkulturmediumwechsel werden die dafür benötigten Lösungen mit Hilfe des Wasserbades auf 37 °C temperiert.

Beim Passagieren von Zellen wird im ersten Schritt aus einer 25 cm² Zellkulturflasche das alte Zellkulturmedium abgesaugt. Anschließend werden die an der Zellkulturflaschenwand anhaftenden Zellen mit 2.5 ml PBS gewaschen und mit 1 ml der Trypsinlösung benetzt. Nach dem Absaugen der Trypsinlösung erfolgt eine kurze Inkubation von zwei bis drei Minuten im Brutschrank. Die Zellen lösen sich daraufhin leicht von der Zellkulturflaschenwand ab und werden in 5 ml Medium suspendiert. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren werden die Zellen vereinzelt. In eine neue 25 cm² Zellkulturflasche werden 5 ml frisches Medium und 0.5 ml bzw. 0.3 ml der Zellsuspension (je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie) zugefügt. Die Zellen werden dann im Brutschrank inkubiert.

Die MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen werden einmal in der Woche, U2OS und A549 Zellen ein- bis zweimal pro Woche passagiert. Etwa drei Tage nach der Passage erfolgt ein Wechsel des Zellkulturmediums, dafür wird das alte Medium abgesaugt und durch 5 ml Neues ersetzt.

Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wird mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Diese Kammer besitzt acht Quadrate mit einem jeweiligen Füllvolumen von 0.1 µl. Nach Befuchtung der Ränder wird ein Deckgläschen vorsichtig auf die Zählkammer gedrückt, bis die sogenannte Newtonsche Interferenzfarbe sichtbar ist. Anschließend wird die homogene Zellsuspension in den Zählkammerraum eingebracht. Unter dem Lichtmikroskop werden die Zellen in den einzelnen Quadraten gezählt und gemittelt.

Die Zellzahl pro ml kann nach folgender Gleichung bestimmt werden:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl (gezählt)}}{\text{Anzahl der Quadrate}} \cdot 10^4$$

Auftauen der Zellen

Zum Auftauen der Zellen wird das Kryoröhrchen in 70%igen Isopropanol gelegt und auf dem Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Die Zellsuspension wird nach der Überführung in eine Kulturflasche und Zugabe von Zellmedium im Brutschrank inkubiert. Nach 6 h erfolgt ein Wechsel des Mediums.

Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren der Zellen werden die kurz vor der Konfluenz stehenden Zellen passagiert. Die Zellsuspension wird in einem konischen Zentrifugenröhrchen zentrifugiert (5 min, 2000 rpm, RT). Der Überstand wird verworfen und das entstandene Zellpellet wird in 3 ml Einfriermedium (80 % DMEM, 10 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert. Die Suspension wird gedrittelt und in sterile Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen kommen anschließend in eine Einfrierbox bei -80°C und werden nach ca. 24 h in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

5.2.3.2 Testung auf Hemmung der Zellproliferation

Aussaat der Zellen

Die Bestimmung des IC₅₀-Wertes erfolgt nach 96 h in 96-Well-Mikrotiterplatten. Dazu werden die Zellen passagiert und gezählt. Je nach verwendeter Zelllinie werden entweder 750 Zellen (MCF-7, MDA-MB-231), 400 Zellen (U2OS) oder 350 Zellen (A549) in 100 µl Medium pro Vertiefung ausgesät. Die Anzahl der auszusäenden Platten richtet sich nach der Anzahl der zu testenden Substanzen. Zusätzlich wird für jeden Test eine sogenannte t₀-Platte angefertigt. Anschließend werden die Platten für drei Tage im Brutschrank inkubiert.

Substanzzugabe

Von den Substanzen werden 10 mM bzw. 20 mM Stammlösungen in Dimethylsulfoxid hergestellt. Anschließend wird daraus eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 5 mM, 2.5 mM, 1.25 mM und 0.63 mM in Dimethylsulfoxid erstellt.

Die Testkonzentration ergibt sich aus einer 1:500 Verdünnung der hergestellten Substanzkonzentration und dem Zellmedium und einer weiteren 1:1 Verdünnung durch Zugabe von 100 µl dieser Lösung in die schon vorhandenen 100 µl der Vertiefung.

Als Referenzsubstanz wird Cisplatin in den Konzentrationen 10 µM, 5 µM, 2.5 µM, 1.25 µM und 0.63 µM in Dimethylformamid in jedem Test einmal mitgeführt. Als Negativkontrolle dienen 0.2%ige Lösungen der verwendeten Lösungsmittel in 100 µl Medium. In Abb. 93 ist die Plattenbelegung schematisch dargestellt. Nach der Substanzzugabe werden die Platten 96 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird die t_0 -Platte zur Bestimmung der initialen Zelldichte nach der unten beschriebenen Methode abgestoppt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		0.63	1.25	2.5	5	10		c_5	c_4	c_3	c_2	c_1
B	D						D					
C	M						M					
D	F		Cisplatin				S		Substanz 2			
E							O					
F		c_5	c_4	c_3	c_2	c_1		c_5	c_4	c_3	c_2	c_1
G	D						D					
H	M						M					
	S		Substanz 1				S		Substanz 3			
	O						O					

Abb. 93: Plattenbelegung: pro Substanz werden fünf Konzentrationen in jeweils vier Vertiefungen in aufsteigender Konzentration von c_5 bis c_1 getestet. Die Konzentration der jeweiligen Substanzlösungen wird in [mM] und die Testkonzentrationen in [µM] angegeben.

Wenn der IC_{50} -Wert unterhalb der Testkonzentrationen liegt, wird die erstellte Verdünnungsreihe erweitert. Sie sollte möglichst zwei Konzentrationen oberhalb und zwei Konzentrationen unterhalb des IC_{50} -Wertes enthalten.

Abstoppen des Zelltests

Das Zellwachstum wird 96 h nach der Substanzzugabe gestoppt. Dazu wird das Medium abgesaugt und in jede Vertiefung 100 µl der Abstopplösung (1%ige Glutardialdehydlösung) pipettiert. Nach einer halben Stunde bei Raumtemperatur

wird die Lösung entfernt und durch 180 µl PBS pro Loch ersetzt. Die Platten werden bis zum Anfärben der Zellen im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Ab dem Abstoppen des Zelltests ist das Arbeiten in einer Sterilwerkbank nicht mehr nötig.

Anfärben der Zellen

Zum Anfärben der Zellen des Zelltests wird das in den Vertiefungen enthaltene PBS entfernt und durch 100 µl einer 0.02%igen Kristallviolettlösung ersetzt. Nach einer halben Stunde bei Raumtemperatur wird der überschüssige Farbstoff durch 15 minütiges Waschen mit Leitungswasser entfernt. Anschließend werden die Platten trocken geklopft und mit jeweils 180 µl 70%igen Ethanol pro Loch versetzt. Innerhalb von 3 h wird das gebundene Kristallviolett bei 200 rpm auf der Schüttelmaschine herausgelöst. Die Platten werden dann photometrisch bei 590 nm vermessen.

Auswertung des Zelltests

Alle Zelltests wurden pro Verbindung mindestens dreimal durchgeführt, daher wurden die erhaltenen Messwerte gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

Die Messwerte werden auf die Lösungsmittelkontrolle und auf die Ausgangszellmasse bezogen:

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

T/C_{corr} - prozentuale Wachstumshemmung

T - Mittelwert der Absorptionen der jeweiligen Testkonzentration

C - Mittelwert der Absorptionen der Lösungsmittelblindwerte

C_0 - Mittelwert der Absorptionen zum Zeitpunkt der Substanzzugabe (t_0)

Wenn die Absorption T einen kleineren Zahlenwert als die Absorption zum Zeitpunkt der Substanzzugabe C_0 ergibt, wird statt des T/C_{corr} -Wertes der τ_{corr} -Wert nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$\tau_{corr} = \frac{T - C_0}{C_0} \cdot 100 \%$$

Die berechneten T/C_{corr} - bzw. τ_{corr} -Werte werden graphisch gegen den dekadischen Logarithmus der Testkonzentrationen aufgetragen. Die IC_{50} -Bestimmung erfolgt aus der erhaltenen Kurve bei derjenigen Testkonzentration, bei der das Zellwachstum zu 50 % gehemmt wird.

5.2.3.3 Änderung der Zellmorphologie unter Substanzeinwirkung

Aussaat der Zellen

Die Untersuchung der Zellmorphologie erfolgt in 6-Well-Mikrotiterplatten. Dazu werden die Zellen passagiert und gezählt. Je nach verwendeter Zelllinie werden entweder 700 000 Zellen (MCF-7, MDA-MB-231) oder 500 000 Zellen (A549, U2OS) in 2 ml Medium pro Vertiefung ausgesät. Pro Zelllinie werden drei Löcher der 6-Well-Mikrotiterplatte mit der Zellsuspension versetzt. Anschließend werden die Platten für 24 h im Brutschrank inkubiert.

Substanzzugabe

Die Substanzzugabe erfolgt nach der in Abb. 94 aufgeführten Plattenbelegung. Von den Substanzen werden entweder 5 mM, 10 mM oder 20 mM Substanzkonzentrationen verwendet. Die Testkonzentration ergibt sich aus einer 1:1000 Verdünnung der hergestellten Substanzkonzentration und dem im Well schon vorhandenen Zellmedium.

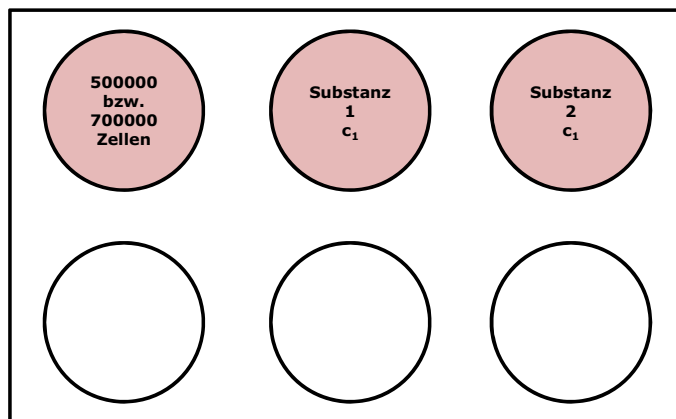


Abb. 94: Plattenbelegung: pro Substanz wird eine Konzentration (c_1) in jeweils einer Vertiefung getestet (3 Well pro Platte werden belegt). Die Konzentration der Substanzlösung wird in [mM] und die Testkonzentration in [μ M] angegeben.

fotographische Aufnahmen der Zellen

Die fotografischen Aufnahmen der Zellen erfolgten mit einem inversen Mikroskop und der EasyMeasure[®] Software.

Die Zellfotos werden unmittelbar nach der Substanzzugabe sowie nach 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 24 h und 48 h aufgenommen. Die Aufnahmen werden bei 40-facher Vergrößerung durchgeführt.

5.2.3.4 Bestimmung der Caspase-3-Aktivität

Aussaat der Zellen

Die Bestimmung der Caspase-3-Aktivität erfolgt an den Zelllinien MDA-MB-231 und U2OS in vollständig schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatten. Dazu werden die Zellen passagiert und gezählt. Je nach verwendeter Zelllinie werden entweder 50 000 Zellen (MDA-MB-231) oder 15 000 Zellen (U2OS) in 100 µl Medium pro Vertiefung ausgesät. Die Anzahl der auszusäenden Platten richtet sich nach der Anzahl der zu testenden Substanzen. Anschließend werden die Platten für 24 h im Brutschrank inkubiert.

Substanzzugabe

Die Substanzzugabe erfolgt nach der in Abb. 95 aufgeführten Plattenbelegung. Die jeweilige Testkonzentration wird wie im Kap. 5.2.3.2 beschrieben aus der entsprechenden Substanzkonzentration hergestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.65	1.25	2.5	5	10	20	c ₃	c ₂	c ₁	c ₃	c ₂	c ₁
B	Camptothecin						Substanz 5			Substanz 9		
C	DMSO						c ₃	c ₂	c ₁	c ₃	c ₂	c ₁
D	Medium und Zellen						Substanz 6			Substanz 10		
E	c ₃	c ₂	c ₁	c ₃	c ₂	c ₁	c ₃	c ₂	c ₁	c ₃	c ₂	c ₁
F	Substanz 1			Substanz 3			Substanz 7			Substanz 11		
G	c ₃	c ₂	c ₁	c ₃	c ₂	c ₁	c ₃	c ₂	c ₁	c ₃	c ₂	c ₁
H	Substanz 2			Substanz 4			Substanz 8			Substanz 12		

Abb. 95: Plattenbelegung: pro Substanz werden drei Konzentrationen in jeweils zwei Vertiefungen in aufsteigender Konzentration von c₃ bis c₁ getestet. Die Konzentration der jeweiligen Substanzlösungen wird in [mM] und die Testkonzentrationen in [µM] angegeben.

Als Referenzsubstanz wird Camptothecin in den Konzentrationen 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2.5 µM, 1.25 µM und 0.65 µM in Dimethylsulfoxid gelöst und in jedem Test einmal mitgeführt. Als Negativkontrolle dient zum einen die 0.2%ige Dimethylsulfoxid-Lösung in 100 µl Medium und zum anderen unbehandelte Zellen, die während der Substanzzugabe mit 100 µl Medium versetzt werden. Nach der Substanzzugabe werden die Platten 6-24 h bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Lyse der Zellen und fluoreszenzphotometrische Bestimmung

Zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität werden die Zellen 6-24 h nach der Substanzzugabe lysiert. Dazu wird das Medium abgesaugt und in jede Vertiefung 50 µl der frisch hergestellten PLB-Lösung pipettiert. Innerhalb von 5 min werden die Zellen bei 500 rpm auf der Schüttelmaschine lysiert. Anschließend werden 50 µl der Ac-DEVD-AMC-Lösung pro Loch dazu pipettiert und für 2 h unter Lichtausschluss bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Die fluorimetrische Bestimmung der Platten erfolgt dann bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm.

Ab dem Lysieren der Zellen ist das Arbeiten in einer Sterilwerkbank nicht mehr nötig.

Auswertung des Zelltests

Alle Zelltests wurden pro Verbindung mindestens dreimal durchgeführt, daher wurden die erhaltenen Messwerte gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

Für die Auswertung der Testergebnisse werden die gemittelten Fluoreszenzwerte der negativen Lösungsmittelkontrolle mit den gemittelten Fluoreszenzwerten der Testsubstanzen in Beziehung gesetzt.

$$\text{Caspase-3-Aktivität} = \frac{\text{Messwert}_{\text{Testsubstanz}}}{\text{Messwert}_{LM}}$$

Für die Caspase-3-Aktivität der Lösungsmittelkontrolle wird ein Wert von Eins angenommen. Der Wert der Caspase-3-Aktivität einer Testsubstanz sollte mindestens das 1.5-fache der Lösungsmittelkontrolle betragen. Testsubstanzen, die Werte unter 1.5 aufweisen, zeigen keine Caspase-3-Aktivität.

5.2.3.5 Nachweis von Einzelstrang-DNA

Die Testung über den Nachweis der Einzelstrang-DNA wurde von Frau Assistenzprof. Univ.-Doz. Mag. Dr. Brigitte Kircher im Labor für Tumor- und Immunobiologie in der Klinischen Abteilung für Hämatologie und Onkologie an der Universitätsklinik für Innere Medizin der Stadt Innsbruck (Österreich) unter Verwendung des ssDNA Apoptosis ELISA Kits der Firma Chemcon International durchgeführt. Die Untersuchung erfolgte an den MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen. Parallel zum ssDNA-Assay wurde die metabolische Aktivität der Zellen nach der Substanzinkubation mit Hilfe des EZ4U-Antiproliferations-Assays der Firma Biomedica überprüft. ^[117]

Prinzip des EZ4U-Antiproliferations-Assays:

Die Zellen werden nach der Substanzinkubation mit einer Lösung eines Tetrazoliumsalses versetzt, das von den Zellen aufgenommen wird. Anschließend erfolgt in den Mitochondrien die Reduktion des Tetrazoliumsalses zum ziegelroten Formazanderivat. Die Absorption der Farbstofflösung kann dann bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden.

5.2.3.6 Immunhistochemische Quantifizierung von p53 und Hdm2Aussaat der Zellen

Die Quantifizierung von p53 und Hdm2 erfolgt an den A549 Zellen in schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatten mit farblosem Boden. Dazu werden die Zellen passagiert und gezählt. Von der verwendeten Zelllinie werden 10 000 Zellen in 100 µl Medium pro Vertiefung ausgesät. Die Anzahl der auszusäenden Platten richtet sich nach der Anzahl der zu testenden Substanzen. Anschließend werden die Platten für 24 h im Brutschrank inkubiert.

Substanzzugabe

Die Substanzzugabe erfolgt nach der in Abb. 96 aufgeführten Plattenbelegung. Die jeweilige Testkonzentration wird wie im Kap. 5.2.3.2 beschrieben aus der entsprechenden Substanzkonzentration hergestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		1.25	2.5	3.75	5	7.5	c ₃	c ₂	c ₁	c ₃	c ₂	c ₁
B	D M S O	Camptothecin					Substanz 5			Substanz 9		
C		2.5	3.75	5	7.5	10	c ₃	c ₂	c ₁	c ₃	c ₂	c ₁
D		Nutlin-3a					Substanz 6			Substanz 10		
E	c ₃	c ₂	c ₁	c ₃	c ₂	c ₁	c ₃	c ₂	c ₁	c ₃	c ₂	c ₁
F	Substanz 1			Substanz 3			Substanz 7			Substanz 11		
G	c ₃	c ₂	c ₁	c ₃	c ₂	c ₁	c ₃	c ₂	c ₁	c ₃	c ₂	c ₁
H	Substanz 2			Substanz 4			Substanz 8			Substanz 12		

Abb. 96: Plattenbelegung: pro Substanz werden drei Konzentrationen in jeweils zwei Vertiefungen in aufsteigender Konzentration von c₃ bis c₁ getestet. Die Konzentration der jeweiligen Substanzlösungen wird in [mM] und die Testkonzentrationen in [µM] angegeben.

Als Referenzsubstanz wird zum einen Camptothecin in den Konzentrationen 7.5 µM, 5 µM, 3.75 µM, 2.5 µM, und 1.25 µM und zum anderen Nutlin-3a in den Konzentrationen 10 µM, 7.5 µM, 5 µM, 3.75 µM und 2.5 µM in Dimethylsulfoxid in

jedem Test einmal mitgeführt. Als Negativkontrolle dient eine 0.2%ige Dimethylsulfoxid-Lösung in 100 µl Medium. Nach der Substanzzugabe werden die Platten 18 h bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Herstellung der verwendeten Lösungen

Die im Folgenden aufgeführten Volumina zur Herstellung der einzelnen Lösungen beziehen sich auf die Verwendung einer 96-Well-Mikrotiterplatte und sind dementsprechend auf die Anzahl der verwendeten Platten anzupassen.

- 1X Waschpuffer
20 ml 10X Waschpuffer mit 180 ml Aqua bidest. verdünnen
Der 1X Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 4 °C 7 Tage verwendbar.
- Fixierlösung:
3 ml 16% Paraformaldehyd-Lösung und 9 ml 1X Waschpuffer
immer frisch herstellen
- 1X Permeabilisierungspuffer:
1.5 ml 10X Permeabilisierungspuffer und 13.5 ml 1X Waschpuffer
Der 1X Permeabilisierungspuffer ist bei einer Lagerung von 4 °C 7 Tage verwendbar.
- 1X Blockierungspuffer:
6.5 ml 10X Blockierungspuffer und 58.5 ml 1X Waschpuffer
Der 1X Blockierungspuffer ist bei einer Lagerung von 4 °C 7 Tage verwendbar.
- 1X Blockierungspuffer mit FCS:
2.5 ml 10X Blockierungspuffer, 0.5 ml FCS und 22 ml 1X Waschpuffer
Der 1X Blockierungspuffer mit FCS ist bei einer Lagerung von 4 °C 7 Tage verwendbar.
- Primäre Antikörper Lösung:
110 µl Mdm2 Antikörper, 110 µl p53 Antikörper und 5.5 ml 1X Blockierungspuffer mit FCS
immer frisch herstellen
- Sekundäre Antikörper Lösung:
0.55 µl Hoechst Dye, 11 µl Goat Anti-Mouse IgG (DyLight™ 488),
11 µl Goat Anti-Rabbit IgG (DyLight™ 550) und 5.5 ml 1X Blockierungspuffer mit FCS
immer frisch herstellen

In Voruntersuchungen wurden die optimalen Antikörperkonzentrationen für diese Testdurchführung ermittelt. Die primären Antikörper sollten am besten 1:50, mindestens aber 1:100 verdünnt werden. Für die sekundären Antikörper stellte sich eine Verdünnung von 1:500 als optimal heraus.

Durchführung

Die Substanzinkubation wird nach 18 h beendet. Dazu wird das Medium abgesaugt und in jede Vertiefung 100 µl der frisch hergestellten Fixierlösung pipettiert, die nach 15 min wieder entfernt wird. Anschließend werden 100 µl des 1X Permeabilisierungspuffers pro Loch zugesetzt und abermals für 15 min inkubiert. Nach dem Absaugen dieser Lösung werden die Zellen dreimal mit jeweils 100 µl/Loch des 1X Blockierungspuffers gewaschen. Dann erfolgt die Inkubation mit 100 µl 1X Blockierungspuffer mit FCS pro Vertiefung für weitere 15 min. Nach dem Entfernen der Pufferlösung werden 50 µl der primären Antikörper Lösung pro Loch pipettiert und bei RT und 200 rpm geschüttelt. Die überschüssigen primären Antikörper werden nach 1 h durch drei- bis viermaliges Waschen mit dem 1X Blockierungspuffer abgesaugt. Im Anschluss werden 50 µl/Loch der sekundären Antikörper Lösung zugegeben und für 1 h unter Lichtausschluss bei RT und 200 rpm geschüttelt. Durch das drei- bis viermalige Waschen mit dem 1X Waschpuffer werden die überschüssigen Antikörper wieder entfernt. Abschließend werden pro Vertiefung 150 µl des 1X Waschpuffers zugesetzt. Die Platten werden bis zum Vermessen am ArrayScan HCS Reader bei 4 °C gelagert.

Die Messung am ArrayScan HCS Reader erfolgte durch Frau Dr. S. Radetzki, eine Mitarbeiterin der Screening Unit im Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie in Berlin-Buch.

Fluorimetrische Bestimmung

Die Bestimmung der Hdm2- und p53-Konzentration in den Zellen wird fluorimetrisch anhand der fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper durchgeführt. Die Proteinbestimmung von Hdm2 erfolgt durch die Detektion des Farbstoffes DyLight™ 488 und p53 wird durch das DyLight™ 550 erfasst.

Protein	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper	$\lambda_{\text{Absorbtion}}$ (in PBS)	$\lambda_{\text{Emission}}$ (in PBS)
Hdm2	Mouse/IgG2b	Goat Anti-Mouse IgG (DyLight™ 488)	493 ± 4 nm	518 ± 4 nm
p53	Rabbit/IgG	Goat Anti-Rabbit IgG (DyLight™ 550)	562 ± 4 nm	576 ± 4 nm

Das Messgerät detektiert die jeweilige Proteinmenge im Zellkern und im Zytoplasma der Zelle. Des Weiteren wird mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Hoechst Dye die DNA im Zellkern angefärbt und darüber die Zellzahl bestimmt. Hoechst Dye wird bei einer Wellenlänge von 350 nm angeregt und emittiert Licht bei einer Wellenlänge von 461 nm.

Auswertung und Quantifizierung von Hdm2- und p53

Alle Zelltests wurden pro Verbindung mindestens zweimal durchgeführt, daher wurden die erhaltenen Messwerte gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

Für die Auswertung der Testergebnisse wird als erstes die Differenz aus den Fluoreszenzwerten des Kerns und des Zytoplasmas erstellt. Anschließend werden die erhaltenen Messwerte mit den entsprechenden Fluoreszenzwerten der negativen Lösungsmittelkontrolle in Beziehung gesetzt. Die ermittelte Menge des jeweiligen Proteins wird durch die mit Hoechst Dye bestimmte Zellzahl korrigiert.

Für die p53- bzw. Hdm2-Menge der Lösungsmittelkontrolle wird ein Wert von Eins angenommen. Der Wert der Enzymaktivität einer Testsubstanz sollte mindestens das 1.5-fache der Lösungsmittelkontrolle betragen. Testsubstanzen, die Werte unter 1.5 aufweisen, zeigen keine p53- bzw. Hdm2-Aktivität.

6 Literaturverzeichnis

Alle in dieser Arbeit verwendeten Abbildungen sind entweder selbst erstellt oder mit Quellenangaben versehen, die im Literaturverzeichnis aufgelistet sind.

Mit Hilfe folgender Programme konnten die Abbildungen erstellt werden:

ChemDraw Ultra 8.0 (CambridgeSoft), MestReC Version 4.8.6.0 (MESTRELAB), OriginPro® 8G (OriginLab®), Microsoft® Office Excel und PowerPoint 2007, EasyMeasure® Version 1.4 (INTEQ®)

1. Robert-Koch-Institut, *Krebs in Deutschland 2007/2008*, 8. Ausgabe, 2012
2. Bundesamt, S., *Todesfälle 2011 leicht rückläufig – häufigste Todesursache Herz-/Kreislaufkrankungen*, Pressemitteilung, 2012
3. Schmitz, S., *Der Experimentator: Zellkultur*, 3. Auflage, 2011
4. Offen, D.; Elkon, H.; Melamed, E., *Apoptosis as a general cell death pathway in neurodegenerative diseases*, Adv. Res. Neurodegener., 2000, 7, 153-166
5. Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R., *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*, Br J Cancer, 1972, 26, 239-57
6. Boehringer-Mannheim, *Apoptosis and cell proliferation*, 1998
7. Duvall, E.; Wyllie, A. H., *Death and the cell*, Immunol. Today, 1986, 7, 115-19
8. Leist, M.; Nicotera, P., *Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology*, Exp. Cell Res., 1998, 239, 183-201
9. Hanahan, D.; Weinberg, R. A., *Hallmarks of cancer: the next generation*, Cell (Cambridge, MA, U.S.), 2011, 144, 646-674
10. Hanahan, D.; Weinberg, R. A., *The hallmarks of cancer*, Cell (Cambridge, Mass.), 2000, 100, 57-70
11. Gupta, S., *Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis*, Life Sci., 2001, 69, 2957-2964
12. Kischkel, F. C.; Hellbardt, S.; Behrmann, I.; Germer, M.; Pawlita, M.; Krammer, P. H.; Peter, M. E., *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor*, EMBO J., 1995, 14, 5579-88
13. Marchenko, N. D.; Zaika, A.; Moll, U. M., *Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling*, J. Biol. Chem., 2000, 275, 16202-16212
14. Acehan, D.; Jiang, X.; Morgan, D. G.; Heuser, J. E.; Wang, X.; Akey, C. W., *Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation*, Mol. Cell, 2002, 9, 423-432
15. Cohen, G. M., *Caspases: the executioners of apoptosis*, Biochem. J., 1997, 326, 1-16
16. Denault, J.-B.; Salvesen, G. S., *Caspases: Keys in the ignition of cell death*, Chem. Rev. (Washington, DC, U.S.), 2002, 102, 4489-4499
17. Kaufmann, S. H.; Desnoyers, S.; Ottaviano, Y.; Davidson, N. E.; Poirier, G. G., *Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an*

- early marker of chemotherapy-induced apoptosis*, *Cancer Res.*, 1993, 53, 3976-63
18. Cao, G.; Pei, W.; Lan, J.; Stetler, R. A.; Luo, Y.; Nagayama, T.; Graham, S. H.; Yin, X.-M.; Simon, R. P.; Chen, J., *Caspase-activated DNase/DNA fragmentation factor 40 mediates apoptotic DNA fragmentation in transient cerebral ischemia and in neuronal cultures*, *J. Neurosci.*, 2001, 21, 4678-4690
 19. Pettmann, B.; Henderson, C. E., *Neuronal cell death*, *Neuron*, 1998, 20, 633-647
 20. Haupt, Y.; Maya, R.; Kazaz, A.; Oren, M., *Mdm2 promotes the rapid degradation of p53*, *Nature (London)*, 1997, 387, 296-299
 21. Grever, M. R.; Lucas, D. M.; Johnson, A. J.; Byrd, J. C., *Novel agents and strategies for treatment of p53-defective chronic lymphocytic leukemia*, *Best Pract. Res., Clin. Haematol.*, 2007, 20, 545-556
 22. Hickman, E. S.; Moroni, M. C.; Helin, K., *The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer*, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2002, 12, 60-66
 23. El-Deiry, W. S., *Regulation of p53 downstream genes*, *Semin. Cancer Biol.*, 1998, 8, 345-357
 24. Reich, N. C.; Oren, M.; Levine, A. J., *Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53*, *Mol. Cell. Biol.*, 1983, 3, 2143-50
 25. Balint, E. E.; Vousden, K. H., *Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein*, *Br J Cancer*, 2001, 85, 1813-23
 26. Alarcon-Vargas, D.; Ronai, Z., *p53-mdm2-the affair that never ends*, *Carcinogenesis*, 2002, 23, 541-547
 27. Fang, S.; Jensen, J. P.; Ludwig, R. L.; Vousden, K. H.; Weissman, A. M., *Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53*, *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 8945-8951
 28. Bar-Or, R. L.; Maya, R.; Segel, L. A.; Alon, U.; Levine, A. J.; Oren, M., *Generation of oscillations by the p53-mdm2 feedback loop: a theoretical and experimental study*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2000, 97, 11250-11255
 29. Bean, L. J. H.; Stark, G. R., *Regulation of the accumulation and function of p53 by phosphorylation of two residues within the domain that binds to mdm2*, *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 1864-1871
 30. Mejia-Guerrero, S.; Quejada, M.; Gokgoz, N.; Gill, M.; Parkes, R. K.; Wunder, J. S.; Andrulis, I. L., *Characterization of the 12q15 mdm2 and 12q13-14 CDK4 amplicons and clinical correlations in osteosarcoma*, *Genes, Chromosomes Cancer*, 2010, 49, 518-525
 31. Maki, C. G., *Oligomerization is required for p53 to be efficiently ubiquitinated by mdm2*, *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 16531-16535
 32. Freedman, D. A.; Wu, L.; Levine, A. J., *Functions of the mdm2 onco-protein*, *Cell. Mol. Life Sci.*, 1999, 55, 96-107
 33. Vousden, K. H.; Vande, W. G. F., *The ins and outs of p53*, *Nat. Cell Biol.*, 2000, 2, E178-E180
 34. Feige, A.; Rempfen, A.; Würfel, W.; Jawny, J.; Rohde, A.; Geithövel, F., *Frauenheilkunde - Fortpflanzungsmedizin, Geburtsmedizin, Onkologie, Psychosomatik*, 3. Auflage, 2006
 35. Marine, J.-C.; Jochemsen, A. G., *Mdmx and mdm2. Brothers in arms?*, *Cell Cycle*, 2004, 3, 900-904
 36. Alhopuro, P.; Ylisaukko-Oja, S. K.; Koskinen, W. J.; Bono, P.; Arola, J.; Jarvinen, H. J.; Mecklin, J. P.; Atula, T.; Kontio, R.; Makitie, A. A.; Suominen, S.; Leivo, I.; Vahteristo, P.; Aaltonen, L. M.; Aaltonen, L. A., *The mdm2 promoter polymorphism SNP309T-->G and the risk of uterine*

- leiomyosarcoma, colorectal cancer, and squamous cell carcinoma of the head and neck*, J Med Genet, 2005, 42, 694-8
37. Chene, P., *Inhibiting the p53-mdm2 interaction: An important target for cancer therapy*, Nat. Rev. Cancer, 2003, 3, 102-109
38. Posselt, D., *Eisen(diarylsalen)-Komplexe als neuartige Zytostatika: Synthese, pharmakologische und biochemische Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus*, Dissertation, 2006
39. Yuan, Y.; Liao, Y.-M.; Hsueh, C.-T.; Mirshahidi, H. R., *Novel targeted therapeutics: inhibitors of mdm2, ALK and PARP*, J. Hematol. Oncol., 2011, 4, 16
40. Smith, M. A.; Gorlick, R.; Kolb, E. A.; Lock, R.; Carol, H.; Maris, J. M.; Keir, S. T.; Morton, C. L.; Reynolds, C. P.; Kang, M. H.; Arts, J.; Bashir, T.; Janicot, M.; Kurmasheva, R. T.; Houghton, P. J., *Initial testing of JNJ-26854165 (Serdemetan) by the pediatric preclinical testing program*, Pediatr Blood Cancer, 2012, 59, 329-32
41. Kitagaki, J.; Agama, K. K.; Pommier, Y.; Yang, Y.; Weissman, A. M., *Targeting tumor cells expressing p53 with a water-soluble inhibitor of hdm2*, Mol. Cancer Ther., 2008, 7, 2445-2454
42. Yang, Y.; Ludwig, R. L.; Jensen, J. P.; Pierre, S. A.; Medaglia, M. V.; Davydov, I. V.; Safiran, Y. J.; Oberoi, P.; Kenten, J. H.; Phillips, A. C.; Weissman, A. M.; Vousden, K. H., *Small molecule inhibitors of hdm2 ubiquitin ligase activity stabilize and activate p53 in cells*, Cancer Cell, 2005, 7, 547-559
43. Brown, C. J.; Cheek, C. F.; Verma, C. S.; Lane, D. P., *Reactivation of p53: from peptides to small molecules*, Trends Pharmacol. Sci., 2011, 32, 53-62
44. Issaeva, N.; Bozko, P.; Enge, M.; Protopopova, M.; Verhoef, L. G. G. C.; Masucci, M.; Pramanik, A.; Selivanova, G., *Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-hdm-2 interaction and activates p53 function in tumors*, Nat. Med. (N. Y., NY, U.S.), 2004, 10, 1321-1328
45. Roh, J.-L.; Ko, J. H.; Moon, S. J.; Ryu, C. H.; Choi, J. Y.; Koch, W. M., *The p53-reactivating small-molecule RITA enhances cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis in head and neck cancer*, Cancer Lett. (N. Y., NY, U. S.), 2012, 325, 35-41
46. Kussie, P. H.; Gorina, S.; Marechal, V.; Elenbaas, B.; Moreau, J.; Levine, A. J.; Pavletich, N. P., *Structure of the mdm2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain*, Science (Washington, D.C.), 1996, 274, 948-953
47. Joseph, T. L.; Madhumalar, A.; Brown, C. J.; Lane, D. P.; Verma, C., *Differential binding of p53 and nutlin to mdm2 and mdmx: computational studies*, Cell Cycle, 2010, 9, 1167-1181
48. Mohammad, R. M.; Wu, J.; Azmi, A. S.; Aboukameel, A.; Sosin, A.; Wu, S.; Yang, D.; Wang, S.; Al-katib, A. M., *An mdm2 antagonist (MI-319) restores p53 functions and increases the life span of orally treated follicular lymphoma bearing animals*, Mol. Cancer, 2009, 8
49. Koblisch, H. K.; Zhao, S.; Franks, C. F.; Donatelli, R. R.; Tominovich, R. M.; LaFrance, L. V.; Leonard, K. A.; Gushue, J. M.; Parks, D. J.; Calvo, R. R.; Milkiewicz, K. L.; Marugan, J. J.; Raboisson, P.; Cummings, M. D.; Grasberger, B. L.; Johnson, D. L.; Lu, T.; Molloy, C. J.; Maroney, A. C., *Benzodiazepinedione inhibitors of the hdm2:p53 complex suppress human tumor cell proliferation in vitro and sensitize tumors to doxorubicin in vivo*, Mol. Cancer Ther., 2006, 5, 160-169
50. Vassilev, L. T.; Vu, B. T.; Graves, B.; Carvajal, D.; Podlaski, F.; Filipovic, Z.; Kong, N.; Kammlott, U.; Lukacs, C.; Klein, C.; Fotouhi, N.; Liu, E. A.,

- In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of mdm2*, Science (Washington, DC, U. S.), 2004, 303, 844-848
51. Roche, F. H.-L., *Roche trials database*, RO5045337 2012
 52. von Rauch, M., *4,5-Diaryl-2-imidazoline als Liganden des Estrogenrezeptors: Untersuchungen zur Synthese, Stabilität, Struktur und Pharmakologie*, Dissertation, 2003
 53. Laios, I.; Cleeren, A.; Leclercq, G.; Nonclercq, D.; Laurent, G.; Schlenk, M.; Wellner, A.; Gust, R., *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, 1029-1038
 54. von Rauch, M.; Schlenk, M.; Gust, R., *Effects of C2-alkylation, N-alkylation, and N,N'-dialkylation on the stability and estrogen receptor interaction of (4R,5S)/(4S,5R)-4,5-bis(4-hydroxyphenyl)-2-imidazolines*, J. Med. Chem., 2004, 47, 915-927
 55. Schwegler, F., *Synthese und Testung von (4R,5S)/(4S,5R)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1H-Imidazolen*, Dissertation, 2009
 56. Voegtle, F.; Goldschmitt, E., *The diaza-Cope rearrangement*, Chem. Ber., 1976, 109, 1-40
 57. Hippel, A. R. v., *Dielectric materials and applications*, 1995 Artech House 456 pp.
 58. Hunter, D. H.; Sim, S. K., *2,4-Diazapentadienes. I. Prototropy, cyclization, and addition-elimination*, Can. J. Chem., 1972, 50, 669-77
 59. Dobler, F., *Studies on the reaction kinetics of the influence of ammonia on aromatic aldehydes*, Z. physik. Chem., 1922, 101, 1-33
 60. Ogata, Y.; Kawasaki, A.; Okumura, N., *Kinetics of the reaction of aromatic aldehydes with ammonia*, J. Org. Chem., 1964, 29, 1985-8
 61. Francis, F., *Action of ammonia on benzaldehyde and the preparation of "benzaldehyde-ammonia"*, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1909, 42, 2216-8
 62. Schlenk, M., *(4R,5S)/(4S,5R)-4,5-Diaryl-2-imidazoline als Liganden des Estrogenrezeptors: Untersuchungen zur Synthese, Stabilität, Pharmakologie und Biochemie*, Dissertation, 2006
 63. Hunter, D. H.; Sim, S. K., *2,4-Diazapentadienes. II. Carbanion cyclization*, Can. J. Chem., 1972, 50, 678-89
 64. Hunter, D. H.; Sim, S. K., *Orbital symmetry in a carbanion cyclization*, J. Amer. Chem. Soc., 1969, 91, 6202-3
 65. Lozinskaya, N. A.; Tsybezova, V. V.; Proskurnina, M. V.; Zefirov, N. S., *Regioselective synthesis of cis- and trans-2,4,5-triarylimidazolines and 2,4,5-triarylimidazoles from available reagents*, Russ. Chem. Bull., 2003, 52, 674-678
 66. Grigor'ev, S. V.; Voronkov, M. G.; Mirskov, R. G.; Rakhlin, V. I., *Reaction of hexamethyldisilazane with aldehydes*, Russ. J. Gen. Chem., 2001, 71, 149
 67. Mistryukov, E. A., *Hexamethyldisilazane as an amination agent: one-pot synthesis of isoamarine and its pyridine analogue*, Mendeleev Commun., 2001, 29
 68. Nishiyama, K.; Saito, M.; Oba, M., *Formation of N,N'-disubstituted methanediamine derivatives from hexamethyldisilazane and aldehydes via stepwise reactions*, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1988, 61, 609-11
 69. Reddy, P. Y.; Shimizu, M.; Higashi, K.; Shimizu, T.; Toru, T., *Solvent-free efficient synthesis of N,N'-bis(arylmethylidene)arylmethanediamines from*

- aromatic aldehydes and hexamethyldisilazane*, ARKIVOC (Gainesville, FL, U. S.), 2001, 111-115
70. Uchida, H.; Shimizu, T.; Reddy, P. Y.; Nakamura, S.; Toru, T., *Solvent-free efficient synthesis of 2,4,5-triarylimidazolines from aromatic aldehydes and hexamethyldisilazane*, *Synthesis*, 2003, 1236-1240
71. Fujioka, H.; Murai, K.; Ohba, Y.; Hiramatsu, A.; Kita, Y., *A mild and efficient one-pot synthesis of 2-dihydroimidazoles from aldehydes*, *Tetrahedron Lett.*, 2005, 46, 2197-2199
72. Halland, N.; Hazell, R. G.; Jorgensen, K. A., *Organocatalytic asymmetric conjugate addition of nitroalkanes to α,β -unsaturated enones using novel imidazolidine catalysts*, *J. Org. Chem.*, 2002, 67, 8331-8338
73. Ishihara, M.; Togo, H., *An efficient preparation of 2-imidazolines and imidazoles from aldehydes with molecular iodine and (diacetoxyiodo)-benzene*, *Synlett*, 2006, 227-230
74. Kim, S.-m.; Choi, K., *A practical solvating agent for the chiral NMR discrimination of carboxylic acids*, *Eur. J. Org. Chem.*, 2011, 2011, 4747-4750, S4747/1-S4747/9
75. Murai, K.; Fukushima, S.; Hayashi, S.; Takahara, Y.; Fujioka, H., *C3-symmetric chiral trisimidazoline: design and application to organocatalyst*, *Org. Lett.*, 2010, 12, 964-966
76. Murai, K.; Morishita, M.; Nakatani, R.; Fujioka, H.; Kita, Y., *Oxidative decarboxylative synthesis of 2-H-imidazolines from glyoxylic acid and 1,2-diamines*, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)*, 2008, 4498-4500
77. Takahashi, S.; Togo, H., *Efficient preparation of 2-imidazolines from aldehydes and ethylenediamines with 1,3-diiodo-5,5-dimethylhydantoin*, *Heterocycles*, 2008, 76, 507-514
78. Ishihara, M.; Togo, H., *Facile preparation of 2-imidazolines from aldehydes with tert-butyl hypochlorite*, *Synthesis*, 2007, 1939-1942
79. Horner, L.; Winkelmann, E. H., *N-Bromsuccinimid, Eigenschaften und Reaktionsweisen; Studien zum Ablauf der Substitution XV*, *Angewandte Chemie*, 1959, 71(11), 349-392
80. Cai, T. B.; Zou, Z.; Thomas, J. B.; Brieady, L.; Navarro, H. A.; Carroll, F. I., *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-isoquinoline-carboxamide (JDTic)*, *J. Med. Chem.*, 2008, 51, 1849-1860
81. Bellamy, F. D.; Ou, K., *Selective reduction of aromatic nitro compounds with stannous chloride in nonacidic and nonaqueous medium*, *Tetrahedron Lett.*, 1984, 25, 839-42
82. Greene, T. W.; Wuts, P. G. M., *Protective groups in organic synthesis*, 3. Edition, 1998
83. Benton, F. L.; Dillon, T. E., *Cleavage of ethers with boron bromide. I. Some common ethers*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1942, 64, 1128-9
84. Mistryukov, E. A., *One-pot synthesis of rac-1,2-diphenylethylene-1,2-diamine*, *Russ. Chem. Bull.*, 2002, 51, 2308-2309
85. Uchida, H.; Tanikoshi, H.; Nakamura, S.; Reddy, P. Y.; Toru, T., *Microwave-assisted rapid and selective synthesis of cis- and trans-2,4,5-triarylimidazolines from aromatic aldehydes*, *Synlett*, 2003, 1117-1120
86. King, J. A.; McMillan, F. H., *Preparation of some monoalkyl- and symmetrical dialkylethylenediamines*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1946, 68, 1774-7

87. Beyer; Walter, *Lehrbuch der Organischen Chemie*, 24. Auflage, 2004
88. Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B., *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 7. Auflage, 2005
89. Rücker; Neugebauer; Willems, *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*, 4. Auflage, 2008
90. Huang, X.-F.; Song, Y.-M.; Wang, X.-S.; Pang, J.; Zuo, J.-L.; Xiong, R.-G., *Crystal structures of amarine and isoamarine and copper(I) coordination chemistry with their allylation products*, J. Organomet. Chem., 2006, 691, 1065-1074
91. Günzler, H.; Gremlich, H.-U., *IR-Spektroskopie - Eine Einführung*, 4. Auflage, 2003
92. Hellwich, K.-H., *Stereochemie Grundbegriffe*, 1. Auflage, 2002
93. Sangster, J., *Octanol-water partition coefficients: fundamentals and physical chemistry*, Vol. 2, 1997
94. Tetko, I. V., *Virtual computational chemistry laboratory - VCCLAB*, 2005, <http://www.vcclab.org>
95. Tetko, I. V.; Gasteiger, J.; Todeschini, R.; Mauri, A.; Livingstone, D.; Ertl, P.; Palyulin, V. A.; Radchenko, E. V.; Zefirov, N. S.; Makarenko, A. S.; Tanchuk, V. Y.; Prokopenko, V. V., *Virtual computational chemistry laboratory - design and description*, J. Comput.-Aided Mol. Des., 2005, 19, 453-463
96. Watson, J. W.; Limatibul, S., *Mechanism of acid hydrolysis of imidazolines*, J. Org. Chem., 1971, 36, 3803-5
97. Braddock, D. C.; Redmond, J. M.; Hermitage, S. A.; White, A. J. P., *A convenient preparation of enantiomerically pure (+)-(1R,2R)- and (-)-(1S,2S)-1,2-diamino-1,2-diphenylethanes*, Adv. Synth. Catal., 2006, 348, 911-916
98. Giard, D. J.; Aaronson, S. A.; Todaro, G. J.; Arnstein, P.; Kersey, J. H.; Dosik, H.; Parks, W. P., *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*, J Natl Cancer Inst, 1973, 51, 1417-23
99. Jia, L.-Q.; Osada, M.; Ishioka, C.; Gamo, M.; Ikawa, S.; Suzuki, T.; Shimodaira, H.; Niitani, T.; Kudo, T.; Akiyama, M.; Kimura, N.; Matsuo, M.; Mizusawa, H.; Tanaka, N.; Koyama, H.; Namba, M.; Kanamaru, R.; Kuroki, T., *Screening the p53 status of human cell lines using a yeast functional assay*, Mol. Carcinog., 1997, 19, 243-253
100. Soule, H. D.; Vazquez, J.; Long, A.; Albert, S.; Brennan, M., *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*, J Natl Cancer Inst, 1973, 51, 1409-16
101. Horwitz, K. B.; Costlow, M. E.; McGuire, W. L., *MCF-7: a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors*, Steroids, 1975, 26, 785-95
102. Janicke, R. U.; Sprengart, M. L.; Wati, M. R.; Porter, A. G., *Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis*, J. Biol. Chem., 1998, 273, 9357-9360
103. Di, X.; Gennings, C.; Bear, H. D.; Graham, L. J.; Sheth, C. M.; White, K. L., Jr.; Gewirtz, D. A., *Influence of the phosphodiesterase-5 inhibitor, sildenafil, on sensitivity to chemotherapy in breast tumor cells*, Breast Cancer Res. Treat., 2010, 124, 349-360
104. Wasielewski, M.; Elstrodt, F.; Klijn, J. G. M.; Berns, E. M. J. J.; Schutte, M., *Thirteen new p53 gene mutants identified among 41 human breast cancer cell lines*, Breast Cancer Res. Treat., 2006, 99, 97-101

105. Cailleau, R.; Young, R.; Olive, M.; Reeves, W. J., Jr., *Breast tumor cell lines from pleural effusions*, J Natl Cancer Inst, 1974, 53, 661-74
106. Cailleau, R.; Olive, M.; Cruciger, Q. V., *Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization*, In Vitro, 1978, 14, 911-5
107. Engel, L. W.; Young, N. A., *Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review*, Cancer Res, 1978, 38, 4327-39
108. Mukhopadhyay, R.; Theriault, R. L.; Price, J. E., *Increased levels of $\alpha 6$ integrins are associated with the metastatic phenotype of human breast cancer cells*, Clin. Exp. Metastasis, 1999, 17, 325-332
109. Chien, S.-Y.; Wu, Y.-C.; Chung, J.-G.; Yang, J.-S.; Lu, H.-F.; Tsou, M.-F.; Wood, W. G.; Kuo, S.-J.; Chen, D.-R., *Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial- and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells*, Hum. Exp. Toxicol., 2009, 28, 493-503
110. Bartek, J.; Iggo, R.; Gannon, J.; Lane, D. P., *Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines*, Oncogene, 1990, 5, 893-9
111. Hui, L.; Zheng, Y.; Yan, Y.; Bargonetti, J.; Foster, D. A., *Mutant p53 in MDA-MB-231 breast cancer cells is stabilized by elevated phospholipase D activity and contributes to survival signals generated by phospholipase D*, Oncogene, 2006, 25, 7305-7310
112. Ponten, J.; Saksela, E., *Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours*, Int J Cancer, 1967, 2, 434-47
113. Kranz, D.; Dobbelstein, M., *Nongenotoxic p53 activation protects cells against S-phase-specific chemotherapy*, Cancer Res., 2006, 66, 10274-10280
114. Inoue, M.; Saeki, M.; Egusa, H.; Niwa, H.; Kamisaki, Y., *PIH1D1, a subunit of R2TP complex, inhibits doxorubicin-induced apoptosis*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2010, 403, 340-344
115. Collins, J. A.; Schandl, C. A.; Young, K. K.; Vesely, J.; Willingham, M. C., *Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis*, J. Histochem. Cytochem., 1997, 45, 923-934
116. Frankfurt, O. S.; Krishan, A., *Identification of apoptotic cells by formamide-induced DNA denaturation in condensed chromatin*, J. Histochem. Cytochem., 2001, 49, 369-378
117. Rubner, G.; Bendsdorf, K.; Wellner, A.; Kircher, B.; Bergemann, S.; Ott, I.; Gust, R., *Synthesis and biological activities of transition metal complexes based on acetylsalicylic acid as neo-anticancer agents*, J. Med. Chem., 2010, 53, 6889-6898
118. Adams, D. J.; Webba, d. S. M.; Flowers, J. L.; Kohlhagen, G.; Pommier, Y.; Colvin, O. M.; Manikumar, G.; Wani, M. C., *Camptothecin analogs with enhanced activity against human breast cancer cells. I. Correlation of potency with lipophilicity and persistence in the cleavage complex*, Cancer Chemother. Pharmacol., 2006, 57, 135-144
119. Biotechnology, P., *Introduction: cellomics® HCS reagent kits; mdm2 and p53 detection kits*, 2007
120. Ott, I.; Gust, R., *Special qualities of inorganic cytostatics. Medicinal chemistry of platinum complexes*, Pharm Unserer Zeit, 2006, 35, 124-33
121. Hartke; Mutschler, *DAB 9 Kommentar - Deutsches Arzneibuch 9. Ausgabe 1986 mit wissenschaftlichen Erläuterungen*, 1987

7 Publikationsverzeichnis

Posterpräsentationen

S. Elsner, A. Wellner, R. Gust: „Struktur- Wirkungsbeziehung von (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)- und (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazolinen“, Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft 2009, 1.-3. Oktober 2009, Jena

S. Elsner, K. Bendsdorf, A. Wellner, R. Gust: „Structure-Activity-Relationship of (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)- and (4*R*,5*R*)/(4*S*,5*S*)-2,4,5-Triaryl-2-imidazolines“, FRONTIERS IN MEDICINAL CHEMISTRY, EFMC (European Federation for Medicinal Chemistry), 4.-6. Oktober 2009, Barcelona (Spanien)

S. Elsner, R. Gust: „Synthese und Testung von (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1*H*-imidazol-Derivaten“, Deutsche Pharmazeutischen Gesellschaft - Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor, 2.Juli 2010, Berlin

S. Elsner, R. Gust: „Synthesis and investigation on the mode of action of (4*R*,5*S*)/(4*S*,5*R*)-2,4,5-Triaryl-4,5-dihydro-1*H*-imidazoles“, Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft 2010, 4.-6. Oktober 2010, Braunschweig

