

Entwicklung neuartiger Konzepte zur Unterscheidung bakterieller und steriler Entzündungen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Fabian Brunswig, M. Sc.

2023

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Oliver Plettenburg

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Kirschning

Tag der Promotion: 19.09.2023

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.”

- Marie Curie

Kurzzusammenfassung

Schlagnote: Radioimaging, Radiolabeling, eDNA-Binder, Biofilm, nicht-invasive Diagnose, Fluoreszenz, Nanopartikel, antibakterielle photodynamische Therapie, FRET

Die Entwicklung eines Diagnosekonzepts zur nicht-invasiven Diagnose einer bakteriellen Infektion war das erste Ziel dieser Arbeit. Für eine erfolgreiche Umsetzung wurde sich das Kolonieverhalten von Bakterien zu Nutze gemacht. Um sich vor ungünstigen Lebensbedingungen zu schützen, neigen Bakterien dazu eine Kolonie in einer schützenden Schicht auszubilden. Diese schützende Schicht wird Biofilm genannt und besteht aus extrazellulären Zellbestandteilen in Form eines Hydrogels. Ein ubiquitärer Bestandteil eines Biofilms ist extrazelluläre DNA (eDNA). Durch die Synthese eines geeigneten Moleküls, welches die Eigenschaft aufweist selektiv an eDNA zu binden, sollte ein Biofilm und damit der Herd einer bakteriellen Infektion gezielt diagnostiziert werden. Die Detektion des erfolgte mittels eines radioaktiven Markers im Molekül. Im Zentrum des Kapitels steht die Synthese einer geeigneten Sonde und die Validierung der Hypothese in *in vitro* Experimenten, basierend auf den fluoreszenten und radioaktiven Moleküleigenschaften.

Neben der Diagnose bakterieller Infektionen befasst sich die Arbeit auch mit der Entwicklung eines Therapiekonzepts zur Behandlung bakterieller Infektion. In einem materialbasierten Ansatz wurden poröse Organosilika Nanopartikel mit zwei Molekülen verschiedener Funktionalität konjugiert. Auf die Oberfläche der Partikel wurde ein Derivat des Moleküls konjugiert, dessen eDNA-bindende Eigenschaft im ersten Kapitel erarbeitet wurde. Die Funktionalisierung der Partikeloberfläche garantierte eine räumliche Nähe des Partikels zum Biofilm. Die Poren der Partikel wurden mit einem Photosensibilisator funktionalisiert, der bei Bestrahlung reaktive Sauerstoffintermediate freisetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die räumliche Nähe der Partikel zu einem Biofilm in Kombination mit der Freisetzung reaktiver Sauerstoffintermediaten die Zahl lebender Bakterien in einem Biofilm signifikant reduziert. Neben der Evaluierung der therapeutischen Funktion des Materials, sind die Untersuchung elektronischer Wechselwirkungen der beiden konjugierten Moleküle untereinander, sowie die Charakterisierung der Materialeigenschaften Kern des Kapitels.

Abstract

Keywords: radioimaging, radiolabeling, eDNA-binder, biofilm, non-invasive diagnosis, fluorescence, nanopartikel, antibacterial photodynamic therapy, FRET

The development of a diagnostic concept for the non-invasive diagnosis of a bacterial infection was the first target of this work. For a successful implementation, the colony behaviour of bacteria was utilised. To protect themselves from unfavourable living conditions, bacteria tend to form a colony in a protective layer. This protective layer is called biofilm and consists of extracellular cell components in the form of a hydrogel. A ubiquitous component of a biofilm is extracellular DNA (eDNA). By synthesising a suitable molecule, that has the property to selectively bind to eDNA, located in a biofilm and thus the source of a bacterial infection. The detection was performed by implementation of a radioactive marker in the molecule. The focus of the chapter is the synthesis of the probe and the validation of the hypothesis in *in vitro* experiments based on fluorescent and radioactive molecular properties.

In addition to the diagnosis of bacterial infections, the work also covers the development of a therapy concept for the treatment of one. In a material-based approach, porous organosilica nanoparticles were conjugated with two molecules of different functionality. A derivative of the molecule, which eDNA-binding properties were elaborated in the first chapter, was conjugated to the surface of the particles. The functionalisation of the particles' surface guaranteed a spatial proximity of the particle to the biofilm. The pores of the particles were functionalised with a photosensitizer that releases reactive oxygen intermediates upon irradiation. It could be shown that the spatial proximity of the particles to a biofilm in combination with the production of reactive oxygen intermediates significantly reduces the number of living bacteria in a biofilm. In addition to the evaluation of the therapeutic function of the material, the investigation of electronic interactions of the two conjugated molecules with each other, as well as the characterisation of the material properties are the core of the chapter.

Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt zunächst dir, lieber Oliver. Ich danke dir, dass du mir dein Vertrauen entgegengebracht hast und ich die Möglichkeit bekommen habe diese Arbeit in deiner Gruppe anfertigen zu können. Ich danke dir dafür, dass du mir ein in gleicher Weise faszinierendes und relevantes Thema anvertraut hast, dass ich stets mit großer Freude ausgearbeitet habe. Und ich danke dir für jede Freiheit, die du mir während meiner Forschung gewährt hast. Ich konnte dadurch viele Menschen kennenlernen, mit denen ich heute in Freundschaft verbunden bin. Ich werde die Zeit in deiner Arbeitsgruppe als sehr bereichernd in Erinnerung behalten.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Andreas Kirschning für die Übernahme des Koreferendariats. Ich danke Ihnen auch für viele sehr fordernde aber auch sehr lehrreiche Vorlesungen, die meine Begeisterung für das Fach der organischen Chemie geweckt haben. Auch für Ihre Motivation und Hilfe meinen Auslandsaufenthalt im Rahmen des Masterstudiums durchführen zu können, möchte ich mich herzlich bedanken.

Ich danke meinen beiden Kooperationspartnerinnen Silav und Hannah. Die gute Zusammenarbeit mit euch, die vielen Gespräche die wir im und außerhalb des Labors führen konnten, aber auch der Zuspruch in Zeiten in denen nichts funktionieren wollte, haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Diese Arbeit wäre ohne euch nicht das, was sie ist.

Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Plettenburg für eine schöne Zusammenarbeit in den letzten Jahren. Hervorheben möchte ich Lukas, für eine großartige Betreuung meiner Masterarbeit und eine schöne gemeinsame Zeit im Labor 340 und Berit und Ardalán, für die kritische und konstruktive Durchsicht dieser Arbeit.

Ich danke allen Kommilitoninnen und Kommilitonen die mich in meinem Studium und meiner Promotion begleitet haben. Ein ganz besonderer Dank an dieser Stelle gilt euch- Marius, Malte und Catha.

Und ich danke meinen Eltern. Ich danke euch für jede Unterstützung, die ihr mir gegeben habt und mir so meinen bisherigen Lebensweg möglich gemacht habt. Ich bin euch unendlich dankbar.

Inhaltsverzeichnis

Motivational Quote	III
Kurzzusammenfassung	IV
Abstract	V
Danksagung	VI
Inhaltsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	X
1. Einleitung	14
1.1. Biofilme- Aufbau und Struktur	14
1.1.1. Charakterisierung von Biofilmen	16
1.1.2. Bedeutung von Biofilmen in der Medizin	18
1.2. Die Pathophysiologie einer Entzündung	20
1.2.1. Biosynthese relevanter Zytokine	22
1.2.2. Entstehung der sichtbaren Symptome einer Entzündung	24
1.2.3. Zelluläre und vaskuläre Mechanismen zur Rekrutierung von Leukozyten	25
1.2.4. Sterile und pathogene Entzündungen	27
1.3. Diagnose bakterieller Infektionen	29
2. Zielsetzung	33
2.1. Synthese und Evaluierung molekularer PET-Sonden zur Diagnose bakterieller Infektionen	33
2.2. Entwicklung eines Nanopartikel-basierenden Ansatzes zur Behandlung bakterieller Infektionen	36
3. Synthese und Evaluierung molekularer PET-Sonden zur Diagnose bakterieller Infektionen	38
3.1. Synthese der eDNA-bindenden Sonden	38
3.1.1. Design der Sonden	38
3.1.2. Chemische Synthese der DNA-bindenden Sonden	44
3.1.2.1. Synthese des C ₄ -funktionalisierten Acridinbaustein 44	44
3.1.2.2. Synthese des C ₉ -funktionalisierten Acridinbausteins 47	46
3.1.2.3. Synthese des Naphthalimid-basierten Bausteins 49	46
3.1.2.4. Synthese des Hoechst-basierten Bausteins 50	47
3.1.2.5. Synthese des TRIS-basierten Linker Systems 76	55
3.1.2.6. Synthese des DOTA-Bausteins 80	56

3.1.2.7.	Konjugation der Bausteine zu DNA-bindenden Sonden	57
3.1.2.7.1.	Synthese der Sonden über Syntheseweg A.....	58
3.1.2.7.2.	Synthese C ₄ -funktionalisierten Acridin basierten Sonde über Syntheseweg B	60
3.2.	Evaluierung der Anwendbarkeit der Sonden	62
3.2.1.	Evaluierung der Anwendbarkeit der Sonden basierend auf fluoreszenten Eigenschaften	62
3.2.1.1.	DNA-bindende Eigenschaften	62
3.2.1.2.	Bindungseigenschaft der Sonde 26 an einen bakteriellen Biofilm	67
3.2.1.3.	Zellpermeabilität der Sonde 26 in CHO-Zellen.....	69
3.2.2.	Evaluierung der Anwendbarkeit der Sonden basierend auf radioaktiven Eigenschaften.....	70
3.2.2.1.	Radiosynthese der markierten Sonde 26*	70
3.2.2.2.	Inkubationsexperimente der radioaktiven Sonde 26*	72
3.2.2.3.	Etablierung eines Versuchsaufbaus	72
3.2.2.4.	Anwendbarkeit der Sonde 26* an einem <i>Pseudomonas fluorescens</i> Biofilm.....	75
3.2.2.5.	Anwendbarkeit der Sonde 26* an einem <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Biofilm	80
3.2.2.6.	Anwendbarkeit der Sonde 26* an einem <i>Staphylococcus aureus</i> Biofilm	83
3.2.2.7.	Anwendbarkeit der Sonde 26* an einem <i>Escherichia coli</i> Biofilm	85
4.	Entwicklung eines Nanopartikel-basierenden Ansatzes zur Behandlung bakterieller Infektionen	89
4.1.	Allgemeine Vorbemerkung	89
4.2.	Synthese der Nanopartikel.....	89
4.3.	Charakterisierung der Nanopartikel	96
4.4.	Photophysikalische Eigenschaften der Nanopartikel.....	99
4.4.1.	Fluoreszenzlebensdauer und FRET	103
4.5.	Antibakterielle Eigenschaften der Nanopartikel NP5	105
5.	Zusammenfassung und Ausblick.....	111
5.1.	Synthese und Evaluierung molekularer PET-Sonden zur Diagnose bakterieller Infektionen.....	111
5.2.	Entwicklung eines Nanopartikel-basierten Ansatzes zur Behandlung bakterieller Infektionen	113
6.	Experimentalteil.....	115
6.1.	Allgemeine Vorbemerkungen	115
6.2.	Chemische Synthesen	119
6.2.1.	Chemische Synthesen der DNA-bindenden Bausteine	119
6.2.2.	Synthese der TRIS basierten Linkereinheit 76	135
6.2.3.	Synthese des DOTA Bausteins 80	139
6.2.4.	Synthese der DNA-bindenden Sonden über Syntheseweg A	141

6.2.5.	Synthese der DNA-bindenden Sonde 27 über Syntheseweg B.....	151
6.2.6.	Synthese der konjugierbaren Acridin Orange Einheit 91	155
6.3.	Biologische Experimente.....	158
6.3.1.	Bakterien- und Zellkultur	158
6.3.1.1.	Kultivierung von Biofilmen	158
6.3.1.2.	Zellkultur.....	160
6.3.2.	Bindungsassay zur Bestimmung der DNA Bindefähigkeit	160
6.3.2.1.	DNA-Bindungsassay mit den molekularen Sonden 23 – 27	160
6.3.2.2.	DNA Bindungsassay mit Nanoartikeln.....	161
6.3.3.	Zellpermeabilitätsassays mittels Fluoreszenzmessungen.....	161
6.3.4.	Biofilminkubationsassays.....	162
6.3.4.1.	Biofilminkubation mit Verbindung 26	162
6.3.4.2.	Biofilminkubation mit Nanopartikeln	162
6.3.5.	Absortions- und Emissionsspektren	163
6.3.6.	Bakterieninkubation	163
6.3.7.	Radiomarkierung von Sonde 26*	164
6.3.8.	Radioinkubation.....	164
6.3.9.	Assay zur DNA Quantifizierung.....	165
6.3.10.	Inkubation und Bestrahlung eines Biofilms mit Nanopartikeln	165
7.	Literaturverzeichnis.....	167
8.	Anhang.....	171
8.1.	NMR-Spektren.....	172
8.2.	Absorptions- und Emissionsspektren der Verbindungen 23, 24, 25, 26 und 27	204
8.3.	Ergänzende Spektren zu den Radioinkubationsexperimenten.....	207
	Persönliche Daten und Akademischer Werdegang	209
	Wissenschaftliche Beiträge und Publikationen	210

Abkürzungsverzeichnis

5-LO	Arachidonat-5-Lipoxygenase
Ac	Acetyl
AFM	Atomkraftmikroskopie (<i>engl. atomic force microscopy</i>)
AO	Acridin Orange
aq.	Wässrig (<i>lat. aequius</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
Bn	Benzyl
Boc	<i>Tert</i> -Butyloxycarbonyl
BODIPY	boron-dipyrrromethene
Bq	Becquerel
Cbz	Benzoyloxycarbonyl
CFU	Koloniebildende Einheit (<i>engl. colony formig units</i>)
CHO	Ovarien des chinesischen Zwerghamsters (<i>engl. chinese hamster ovary</i>)
CLSM	Konfokale Laserscanning Mikroskopie (<i>engl. confocal laser scanning microscopy</i>)
cpm	Zählungen pro Minute (<i>engl. counts per minute</i>)
COSY	Zweidimensionale Kernspinresonanzspektroskopie (<i>engl. correlation spectroscopy</i>)
COX-X	Cyclooxygenase X (X = I oder II)
d	Tag(e) (<i>engl. day(s)</i>)
δ	Chemische Verschiebung [ppm]
DAMPs	<i>damage associated molecular patterns</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dba	Dibenzylidenacetone
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMA	Dimethylacetamid
DMF	Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
DOTA	2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrayl)tetraessigsäure
dppf	1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen
ds	doppelsträngig
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
ESI	Elektronenspray Ionisierung
(e)DNA	(extrazelluläre) Desoxyribonukleinsäure (<i>engl. desoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>engl. Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
Em	Emmission
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
E-Selektin	Endothel-Selektin
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter</i>
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	und andere (<i>lat. et alii</i>)
Ex	Anregung (<i>engl. excitation</i>)
FRET	Förster Resonanzenergietransfer
h	Stunde(n) (<i>engl. hour(s)</i>)
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HDC	Histidin Decarboxylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HO	Hoechst
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie (<i>engl. high pressure liquid chromatography</i>)
HRSM	hochauflösende Massenspektrometrie (<i>engl. high resolution mass spectrometry</i>)
HSP	Hitzeschock(<i>engl. heat shock</i>)proteine
Hz	Hertz [s^{-1}]
IL-1	Interleukin-1
IR	Infrarot
<i>J</i>	Kopplungskonstante [Hz]

k	kilo (10 ³)
konz.	konzentriert
λ	Wellenlänge
LB	lysogenic broth
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (<i>engl. liquid chromatography-mass spectrometry</i>)
LAT4H	Leucotrin A4- Hydrolase
LTC4S	Glutathion S-Transferase II
m	milli (10 ⁻³)
<i>m</i>	Masse
M	mega (10 ⁶)
<i>M</i>	Molare Masse
μ	mikro (10 ⁻⁶)
Me	Methyl
MBZ	Mikrobielle Brennstoffzelle
min	Minute
Ms	Mesyl (Methansulfonat)
mtDNA	mitochondriale DNA
n	nano (10 ⁻⁹)
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl [cm ⁻¹]
NFP	<i>N</i> -formylierte Peptide
NLRs	<i>NOD-like</i> Rezeptoren
NMR	Kernspinresonanz (<i>engl. nuclear magnetic resonance</i>)
oXs	Über X Stufen (<i>engl. over x steps</i>)
Oxyma	Hydroxyiminocyanessigsäureethylester
PAMPS	<i>pahogen associated molecular patterns</i>
PBP	Penicilin bindenden Proteine
PBS	Natriumphosphate Puffer (<i>engl. phosphate buffer saline</i>)
PECAMs	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (<i>engl. platelet endothelial cell adhesion molecule</i>)

PEG	Polyethylenglycol
Ph	Phenyl
PLA ₂	Phospholipase 2
ppm	Teile pro eine Millionen (<i>engl. parts per minute</i>)
P-Selektin	Thrombozyten-Selektin (<i>engl. platelet Selektiv</i>)
quat.	quantitativ
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i>
RLRs	<i>RIG-like-Rezeptoren</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl. ribo nucleic acid</i>)
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>engl. sodium dodecyl sulfate</i>)
ss	einsträngig (<i>engl. single-stranded</i>)
RT	Raumtemperatur
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure (<i>engl. trifluoroacetic acid</i>)
THF	Tetrahydrofuran
THTPA	Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin
TLRs	<i>toll-like Rezeptoren</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TMP	Trimethoprim
Ts	Tosyl (<i>para</i> -Toluolsulfonat)
TSB	Trypti soy broth
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WPK	Weibel-Palade-Körperchen
UV	Ultraviolett
Vis	sichtbar (<i>engl. visible</i>)
z	Ladung

1. Einleitung

1.1. Biofilme- Aufbau und Struktur

Unter Biofilmen werden Kulturen von Mikroorganismen verstanden, die in einer schleimähnlichen Struktur eingebettet sind. In diesen Strukturen können sowohl Bakterien als auch Pilze oder Algen vorkommen, sodass es sich dabei um eine heterogene Lebensform handeln kann. Biofilme können ubiquitär vorkommen und bilden sich bevorzugt an den Grenzflächen zwischen Feststoff und Flüssigkeit, oder aber auch an den Grenzflächen von Flüssigkeit und Luft aus. Die Voraussetzung zur Bildung dieses Films ist lediglich das Vorhandensein von Flüssigkeit und mikrobiell verwertbaren Nährstoffen.^[1]

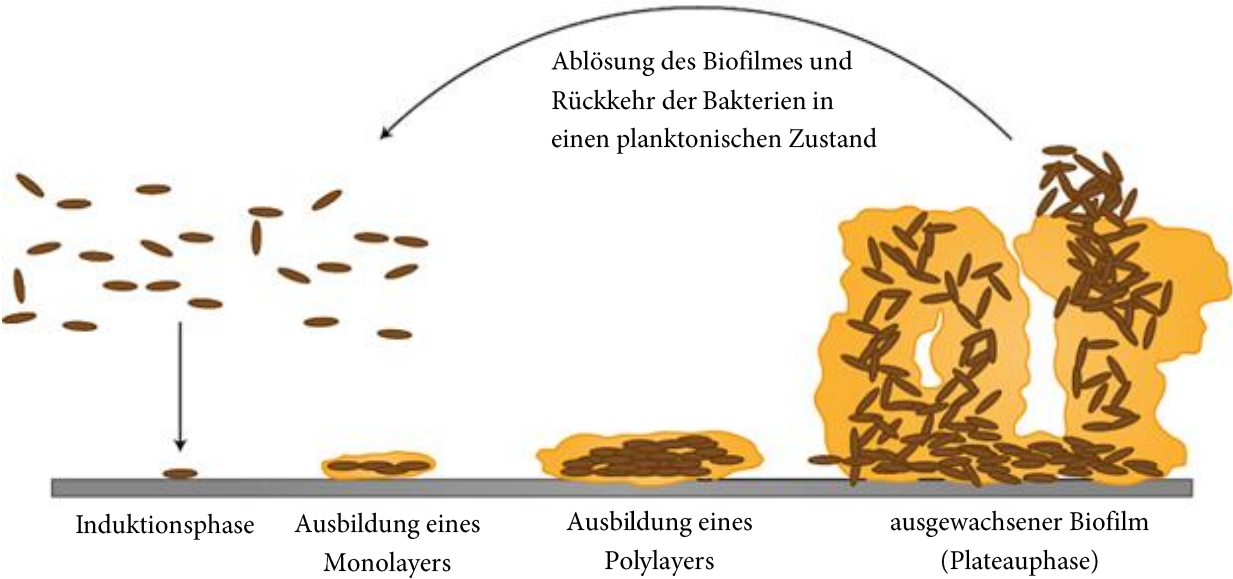
Für den Aufbau ist die Exkretion extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS) von essentieller Bedeutung. Bei den EPS handelt es sich im Wesentlichen um Polysaccharide, Proteine, DNA und Lipide, aber auch anorganische Verbindungen können Bestandteil von Biofilmen sein. Die EPS bilden ein dreidimensionales Netzwerk, das als Matrix bezeichnet wird. Durch die Ausbildung eines Biofilmes werden Bedingungen geschaffen, in der die Mikroorganismen geschützt sind. Damit sind die Organismen auch unter ungünstigen Lebensbedingungen, wie zum Beispiel Temperaturveränderungen oder Nährstoffmangel, lebensfähig.^[2,3] Die Schutzwirkung des Biofilms beruht zum einen darauf, dass die Matrix eine Diffusionsbarriere darstellt. Dadurch werden Wasser und Nährstoffe im Biofilm zurückgehalten und lassen die Bakterien Perioden von Nährstoffknappheit und Trockenheit überstehen. Darüber hinaus kann die Matrix organische und anorganische Stoffe adsorbieren und sorgt so für eine Akkumulation von Nährstoffen und Mineralien im Biofilm. Weiterhin bietet die Matrix eine Schutzbarriere gegen äußere Einflüsse wie Strahlung, Angriffe des Immunsystems und Antibiotika.

Eine weitere Schutzwirkung des Biofilms beruht auf der hohen Zelldichte in der Matrix. Bakterien produzieren kontinuierlich Signalmoleküle, sogenannte Autoinducer, die dem interzellulären Austausch von Informationen dienen. Durch die hohe Zelldichte wird ein Schwellenwert erreicht, der einerseits die Produktion von weiteren Autoinducern bewirkt und zum anderen die Genexpression in den Bakterien verändert. In *S. aureus* Bakterien werden über 250 Gene differenziell exprimiert^[4], bei *P. aeruginosa* sogar über 800 Gene, was mehr als der Hälfte des gesamten Genoms entspricht^[5]. Solche, auf Zelldichte

beruhende Regulationsprozesse werden als Quorum sensing (QS) bezeichnet.^[6] Die veränderte Genexpression hat zur Folge, dass Bakterien in einem Biofilm häufiger Resistenzen gegen Antibiotika aufweisen, als in planktonischer Form. Ein weiterer Effekt der hohen Zelldichte ist, dass der interzelluläre Austausch von DNA (horizontaler Gentransfer) erleichtert ist und sich die Resistenzgene im Biofilm verbreiten.^[7]

Eine letzte Schutzwirkung eines Biofilms ist die hohe Zahl von Persisterzellen in einem Biofilm. Persisterzellen können entstehen, wenn reguläre Zellen auf äußere Stressfaktoren, wie beispielsweise Antibiotika, treffen. Anstatt abzusterben, gehen Persister in einen metabolisch inaktiven Zustand über und können über lange Zeiträume hinweg in dieser Form verbleiben.^[8] Nachdem die externen Faktoren nicht mehr wirken, können Persister wieder in den normalen aktiven Zustand übergehen und sich vermehren. In planktonischer Form sind etwa 0,001 % einer Population Persister, die vom Immunsystem erkannt und bekämpft werden können. In tiefen Schichten eines Biofilms sind etwa 1 % der Bakterien Persister und sind in der Matrix vor Angriffen des Immunsystems geschützt.^[9]

Die Entstehung eines Biofilmes teilt sich in fünf Phasen, die in Schema 1 dargestellt sind und im Folgenden erörtert werden sollen.



Schema 1: Schematische Darstellung der Ausbildung eines Biofilmes.^[10]

In der ersten Phase, der Induktionsphase, wird zunächst die Anwuchsfläche konditioniert. Dabei lagern sich von den Mikroorganismen exkretierte EPS an der Anwuchsfläche an, worauf eine reversible Adhäsion erster planktonischer Zellen an die Anwuchsfläche erfolgt. Die zunächst reversible Adhäsion wird bei fortschreitender Biofilmbildung irreversibel, worauf eine Zellakkumulation der Primärbesiedler folgt, die dann eine erste Biofilmschicht, einen sogenannten Monolayer, ausbilden.

In der Wachstumsphase kommt es sowohl zur Akkumulation der Zellen als auch zum Beginn der Zellteilung im Biofilm, dabei bilden sich weitere Schichten aus EPS und Zellen aus. Der Film nimmt an Dicke zu, es wird von einer Poly-layer-Struktur gesprochen. Auch die Stabilität des Biofilms nimmt in dieser Phase zu. Im Kontrast zur Induktionsphase ist das Wachstum hier nicht von der Beschaffenheit der Anwuchsfläche abhängig, sondern lediglich von den vorhandenen mikrobiellen Strukturen. In der Plateauphase beginnt die Ablösung einzelner Zellen, es stellt sich ein Gleichgewicht aus ablösenden und neu anhaftenden Zellen ein, dass maßgeblich durch die Nährstoffkonzentration und den wirkenden Scherkräften beeinflusst wird. Die sich ablösenden Zellen können als sogenannte Schwärmerzellen an einer neuen Stelle anhaften und die Bildung eines neuen Biofilms initiieren.

Durch die Dynamik innerhalb der Wachstumsphasen, sind Biofilme weder in der Struktur noch in der Zusammensetzung konstant. Durch die sich ausbildende Poly-layerstruktur können sich Sauerstoff- und Nährstoffgradienten ausbilden.^[10]

1.1.1. Charakterisierung von Biofilmen

Die spezifischen Bestandteile und die Zusammensetzung eines Biofilms hängen von verschiedenen Faktoren ab, einschließlich der beteiligten Mikroorganismen, der Umweltbedingungen wie Temperatur, pH-Wert, Nährstoffverfügbarkeit und der Art der Oberfläche, an der der Biofilm wächst. Jeder Biofilm ist einzigartig und passt sich an seine spezifische Umgebung an.^[1] Da es sich bei Biofilmen um komplexe Strukturen handelt, ist die Bandbreite der Analysemethoden groß und reicht von der Analyse der Matrixzusammensetzung bis hin zur Analyse der Mikroorganismen selbst. Eine Auswahl verschiedener Methoden ist in Abbildung 1 gezeigt.

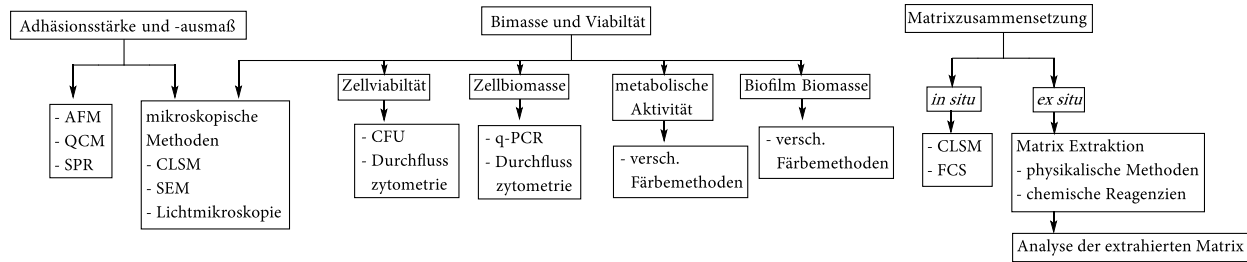


Abb. 1: Analysemethoden von Biofilmen.^[11]

Informationen über die Dicke eines Biofilms, deren Adhäsionsstärke sowie die Topographie lassen sich beispielsweise über Atomkraftmikroskopie (AFM, *atomic force microscopy*) erhalten. Da der Biofilm bei dieser Messmethode intakt bleibt, kann er in Anschluss mit weiteren Methoden analysiert werden. Limitierungen mit dieser Methode gibt es hinsichtlich der Probengröße, da lediglich maximal $150 \mu\text{m}^2$ in einer Messung analysiert werden können.^[12] Neben der Analyse der Adhäsion und der Topographie eines Biofilms, ist ein weiterer wichtiger Analysebereich die Bestimmung der Biomasse sowie die Viabilität der Mikroorganismen. Zur Bestimmung der Viabilität werden klassische Methoden der Zellzahlbestimmung, wie CFU-Analyse (colony forming units) herangezogen. Ein Nachteil dieser Methoden ist die vergleichbar hohe Fehleranfälligkeit, auf Grund der Stabilität der Biofilmmatrix. Eine verlässlichere Methode zu Bestimmung der Zellviabilität bietet die Durchflusszytometrie. Allerdings ist bei dieser Analysemethode die Entnahmen einer Probe sowie der Zusatz von Fluorophoren nötig, sodass es sich bei dieser Methode um eine invasive Analysemethode handelt. Zur Bestimmung der Biomasse werden Biotrockenmassen- und Biofeuchtmassenbestimmungen durchgeführt.^[12,13]

Sowohl Adhäsionsverhalten als auch die Biomasse lassen sich mittels eines konfokalen Laserscanning Mikroskops (CLSM, *confocal laser scanning microscopy*) bestimmen. Diese Methode der Mikroskopie erlaubt eine genaue Bildgebung unebener Strukturen. Durch die sequenzielle Analyse einzelner Bereiche des Präparates kann ein Gesamtbild der Probe zusammengesetzt werden. Durch Kombination mit geeigneten Färbereagenzien lassen sich einzelne Komponenten, beispielsweise DNA, im Biofilm analysieren.^[13]

Ein weiterer Bereich der Biofilmanalyse ist die Charakterisierung der EPS-Matrix. Die genaue Analyse ist jedoch komplex, da für die Bestimmung die Matrix von den sich darin befindlichen Mikroorganismen separiert werden muss. Dies kann über Behandlung mit chemischen Reagenzien passieren. Häufig genutzte Detergenzien für diese Zwecke sind Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Natriumdodecylsulfat (SDS),

NaOH-Lösungen sowie organische Lösungsmittel wie beispielsweise Ethanol. Diese werden in Kombination mit physikalischen Methoden wie Ultraschallbehandlung oder Zentrifugation eingesetzt. Nachteil dieser Methoden ist eine hohe Fehleranfälligkeit, da selbst bei kontrollierter Anwendung eine signifikante Menge an Mikroorganismen lysiert werden und deren Zellbestandteile die Messung der extrazellulären Komponenten verfälscht. Für eine genaue Analyse bieten sich enzymatische Behandlungsmethoden an. Bei der Wahl geeigneter Enzyme ist ein kontrollierter Abbau der Matrix möglich, ohne dabei die Integrität der Mikroorganismen zu beeinträchtigen.^[14] In den Arbeiten von WU *et al.* wurden diese Methoden genutzt um die eDNA-Konzentration in verschiedenen Biofilmen zu analysieren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1: Isolierte Mengen eDNA aus Biofilmen der Stämme *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Actinobacter sp.* und *E. coli*.^[14]

Stamm	<i>m</i> (eDNA) [$\mu\text{g/ml OD}_{600}$]
<i>S. aureus</i>	5,85 \pm 1,44
<i>P. aeruginosa</i>	15,76 \pm 3,34
<i>Actinobacter sp.</i>	14,44 \pm 2,20
<i>E. coli</i>	5,85 \pm 1,44

Neben den Mengen der eDNA, wurden für *Actinobacter sp.* auch die Menge an Polysacchariden zu $26.42 \pm 3.68 \mu\text{g/ml OD}_{600}$ bzw. die Mengen an Proteinen zu $66.12 \pm 3.27 \mu\text{g/ml OD}_{600}$ in der Matrix bestimmt. Da die Zusammensetzung der Matrix aber von den Kultivierungsbedingungen abhängt, geben diese Daten lediglich einen Hinweis auf die Zusammensetzung der EPS-Matrix unterschiedlicher Bakterienstämme. Jedoch konnte in den Arbeiten eine generelle Methode zur Bestimmung der Matrixzusammensetzung gezeigt werden.

1.1.2. Bedeutung von Biofilmen in der Medizin

Neben einigen ausgewählten Anwendungsgebieten, beispielsweise in der Abwasseraufbereitung^[15], bringt die ungewollte Bildung von Biofilmen jedoch häufig Probleme mit sich. Besonders in Krankenhäusern stellt dies eine akute Gefahr dar. Durchschnittlich sind 7 % aller Krankenhauspatienten von einer Krankenhaus-akquirierten Infektion betroffen.^[16] Durch eine nicht sterile Arbeitsweise kann es zu einer bakteriellen

Besiedlung der Oberflächen medizinischer Gerätschaften kommen. Auf diesem Wege können bei Operationen Bakterien in den Körper eingetragen werden, die im Falle von pathogenen Erregern schwerwiegende Folgen haben können. (Tabelle 2)

Tabelle 2: Übersicht möglicher Krankheitsbilder in Assoziation mit Biofilmbildung auf den Oberflächenmedizinischer Produkte.^[17]

Medizinprodukt	Mögliche Folgen einer mikrobiellen Besiedlung (Auswahl)	Beteiligte Mikroorganismen (Beispiele)
Knochen- und Gelenksprothesen	Osteomyelitis, Implantatlockerung	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Bacillus spec</i>
Künstliche Herzklappen	Endokarditis, Sepsis	Streptokokken, <i>S. aureus</i> , <i>E. hirae</i>
Intrauterine Kontrazeptiva (Spirale)	Vaginose	<i>Candida spec.</i>
Kontaktlinsen	Hornhautinfektionen	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>
Zahnimplantate	Periimplantitis	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i>

In Abschnitt 1.1 wurden die Mechanismen zur Ausbildung von Resistenzen gegen Antibiotika von sessilen Bakterien erläutert. Darum sind zur Behandlung von Biofilminfektionen andere Strategien nötig. Prinzipiell kann zwischen Therapien unterschieden werden, die auf Abtötung der Mikroorganismen abzielen, und solchen, die deren Organisation in Biofilmen stören.

In Arbeiten von KOSTAKIOTI *et al.* wurde die bakterizide Wirkung von Silber-Nanopartikeln gezeigt. Die Oberfläche von Implantaten wurden mit Silber-Nanopartikeln beschichtet und konnte eine Reduzierung der lebenden Bakterien in einem *S. epiderimidis* Biofilm um 95 % gezeigt werden.^[18] In Arbeiten von BRONNER und BRUNSWIG *et al.* konnten funktionalisierte Organosilika-Nanopartikel genutzt werden, um in einer antimikrobiellen photodynamischen Therapie 90 % der lebenden Bakterien in einem *P. fluorescens* Biofilm zu töten.^[19]

In Arbeiten von SCHEMBERI *et al.* wurde eine Methode entwickelt, um die Adhäsion von *E. coli* Bakterien auf einer Oberfläche zu inhibieren und so die Bildung eines Biofilms zu unterdrücken. Dafür wurden die Oberflächen von Implantaten mit Mannosiden funktionalisiert. Mannoside blocken in *E. coli* Bakterien das

Membranprotein FimH-Adhäsion, was maßgeblich zur Ausbildung von adhäsiven Wechselwirkung an Oberflächen beiträgt.^[20]

Ein weiterer Therapieansatz besteht darin die interzellulären Regulationsprozesse zu stören. QS-Inhibitoren können die Produktion der Autoinducer inaktivieren, oder deren Rezeptorstellen blockieren. Die dadurch veränderte Genexpression kann unterdrückt werden und in Kombination mit einem Antibiotikum, können Biofilm assoziierte Infektionen effektiv behandelt werden.^[21]

Im Falle einer Implantation besteht die weitere Schwierigkeit, dass nur durch das Auftreten der Immunreaktion keine Rückschlüsse auf dessen Ursache möglich ist. Sowohl im Falle einer bakteriellen Infektion, aber auch im Falle einer sterilen Abstoßungsreaktion aktiviert das Immunsystem sehr ähnliche Mechanismen.

1.2. Die Pathophysiologie einer Entzündung

Im Allgemeinen beschreibt eine Entzündung ein breites Spektrum an vaskulären, zellulären und molekularen Reaktionen des Immunsystems auf jegliche Art von Gewebsschädigungen und Infektionen. Diese Reaktionen haben das Ziel den Organismus gegen pathogene Einflüsse zu schützen und den Wiederaufbau des betroffenen Gewebes zu initiieren.^[22]

Ein Entzündungsprozess beginnt typischerweise mit der Freisetzung von bestimmten Signalmolekülen. Diese Signalmoleküle, auch Zytokine genannt, werden von den Zellen des angeborenen Immunsystems detektiert und setzen eine Kaskade in Gang, die dann die Entzündungsreaktion hervorruft.^[23]

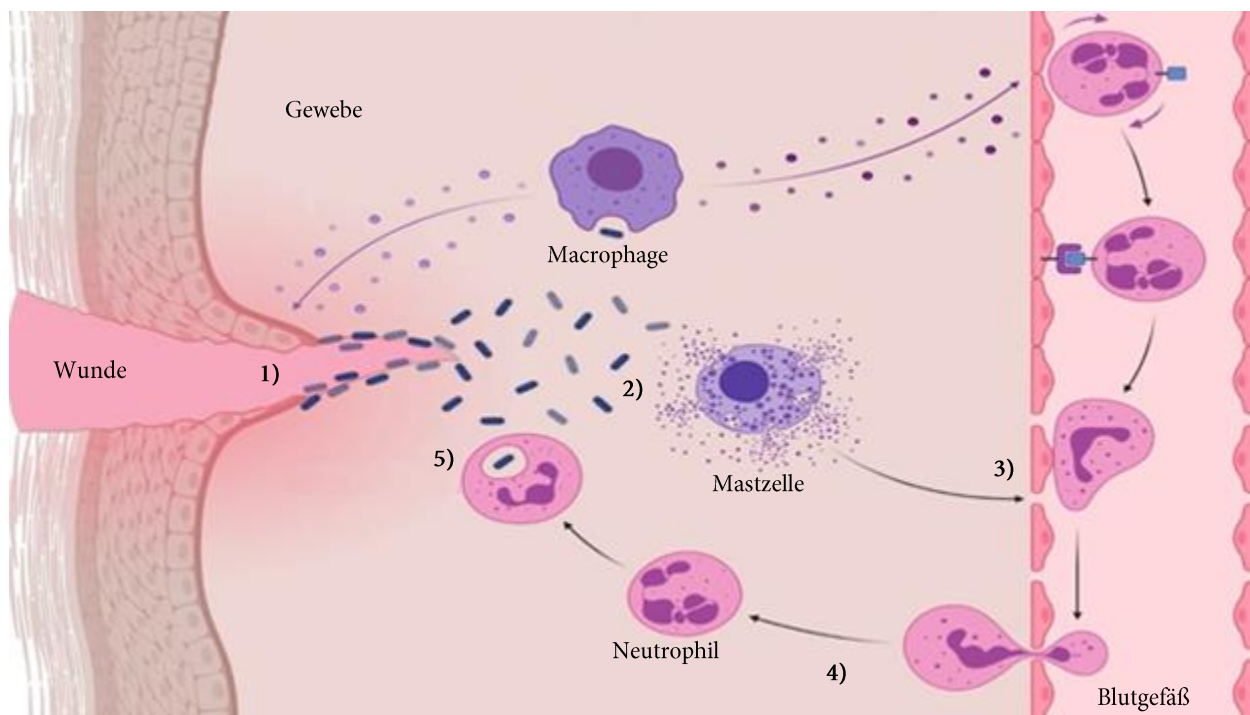
Für die Entstehung einer Entzündung sind Mastzellen von großer Bedeutung. Diese Zellen kommen in verschiedenen Geweben des Körpers vor, insbesondere in der Haut, im Darm und in den Atemwegen. Mastzellen tragen auf ihren Oberflächen Rezeptoren, an die Signalmoleküle, die eine Immunreaktion auslösen, binden.^[24, 25] Weiterhin tragen sie die Botenstoffe Histamin 16, Leukotrine 11 - 18 und Prostaglandine 5 - 8 in Form von Granulae in sich. Nach Rezeptoraktivierung werden die Granulae durch Exozytose freigesetzt und dienen im Folgenden als Signalmoleküle zur Weiterführung der Immunkaskade.

Durch die Freisetzung der Zytokine werden Prozesse eingeleitet, die der Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blutkreislauf in die betroffene Region dienen. Diese Zellen werden auch als weiße Blutkörperchen

bezeichnet. Sie sind die Zellen des Immunsystems, die den Körper gegen Krankheitserreger und Fremdkörper verteidigen. Es gibt verschiedene Arten von Leukozyten. In der Bekämpfung von Fremdkörpern, aber auch in der Aktivierung des adaptiven Immunsystems sind Neutrophile und Monocyten von besonderer Relevanz.

Neutrophile sind die häufigste Form von Leukozyten im Blut und können Erreger durch Freisetzung von Enzymen und reaktiver Sauerstoff-Intermediate oder durch Phagozytose töten.^[26]

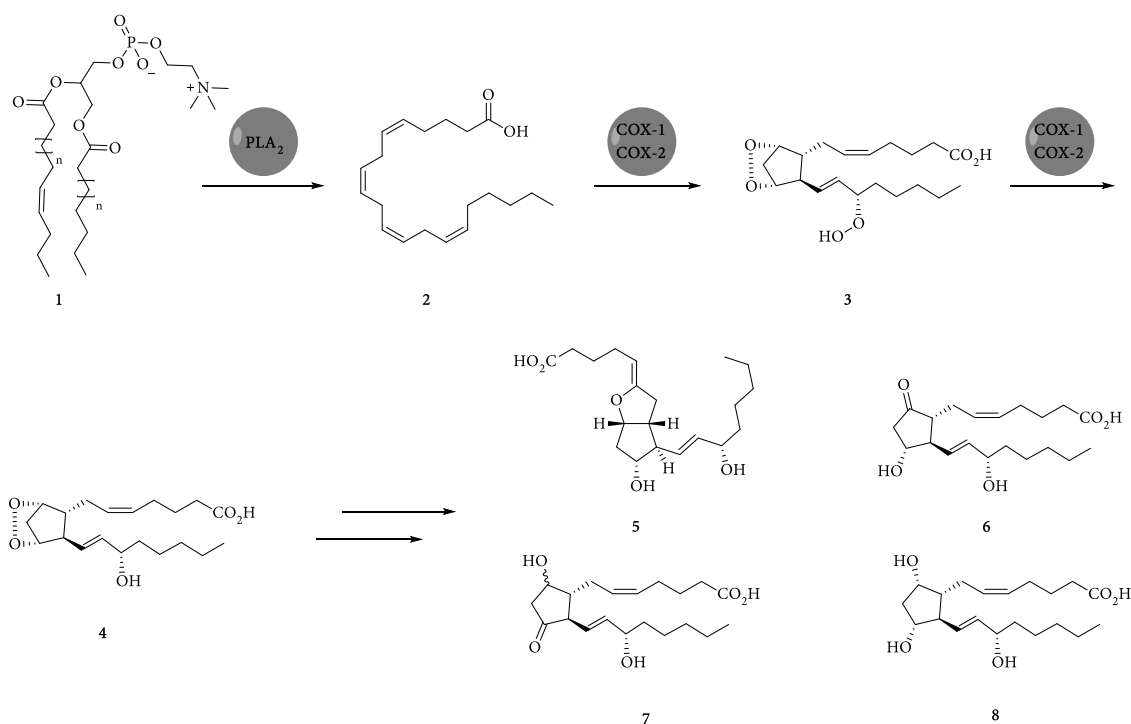
Monocyten zirkulieren im Blut als Vorläuferzellen und wachsen im Gewebe zu Makrophagen heran. Ähnlich wie Neutrophile können die Makrophagen Fremdkörper über Phagozytose töten. Neben der Funktion Krankheitserreger zu eliminieren, können sowohl Monozyten als auch Neutrophile Botenstoffe freisetzen, um weitere Zellen des Immunsystems zu aktivieren.^[26] Der Prozess zur Rekrutierung von Immunzellen ist in Schema 2 abgebildet.^[27]



Schema 2: Grundsätzlichen Ablauf einer Entzündungsreaktion. Durch eine Wunde werden Pathogene in den Körper getragen (1). Diese Pathogene werden von den Mastzellen im Gewebe detektiert, was zur Ausschüttung von Zytokinen führt (2). Die Zytokine wirken auf die Endothelzellen und die Zellen der glatten Muskulatur und verändern deren Struktur (3). Weiterhin werden durch das Wirken der Zytokine auf die Gefäßwände Prozesse eingeleitet, die dazu führen, dass Leukozyten aus dem Blutfluss in das betroffene Gewebe gelangen können (4). Dort angekommen erkennen die Leukozyten die pathogenen Erreger und können sie mittels Phagozytose bekämpfen (5).

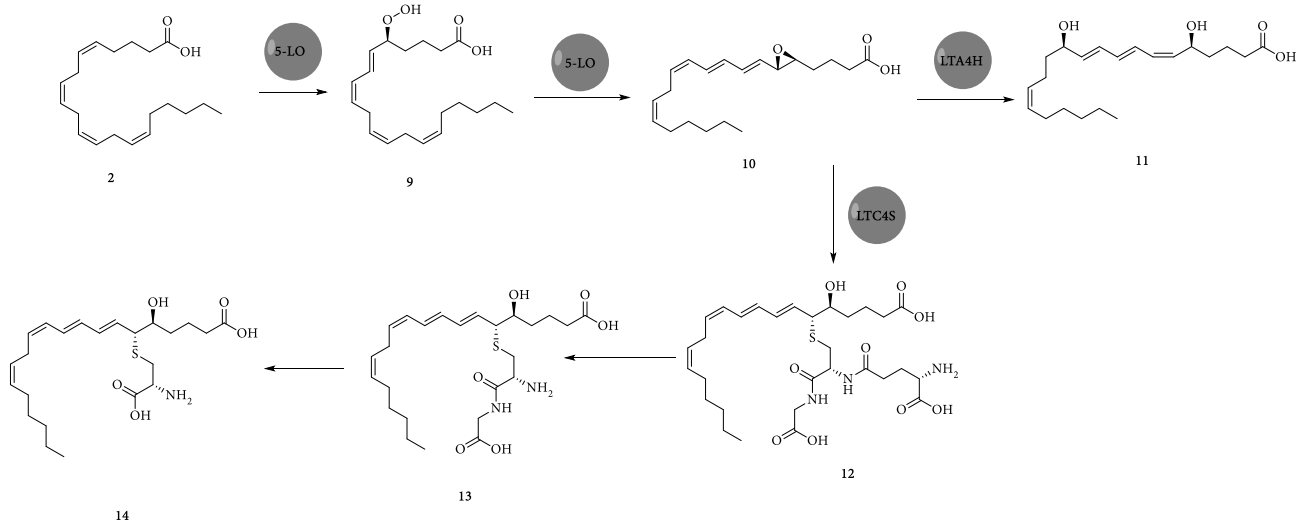
1.2.1. Biosynthese relevanter Zytokine

Im Falle einer Infektion können Schäden in den Zellwänden der umliegenden Gewebszellen auftreten. Die dadurch freigesetzten Phospholipide **1** können, katalysiert durch das Enzym Phospholipase A₂ (PLA₂), zunächst in Arachidonsäure **2** transformiert werden. **2** kann nun durch zwei Enzymkaskaden, entweder Cyclooxygenase (COX I und COX II) katalysiert in Prostaglandine, oder Arachidonat-5-Lipoxygenase (5-LO) katalysiert in Leukotrine überführt werden. Die dazugehörigen Transformationen sind in Schema 3 und Schema 4 gezeigt.



Schema 3: Biosyntheseweg von Prostaglandinen **5 – 8** ausgehend von Phospholipiden **1**.

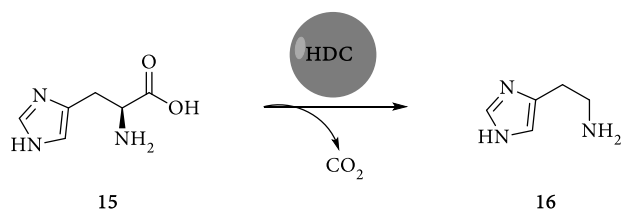
Die Esterase PLA₂ katalysiert die Hydrolyse von Phospholipiden **1** und setzt auf diese Weise Arachidonsäure **2** frei. **2** wird durch COX I und COX II zunächst in das Diperoxid Prostaglandin G₂ **3** und anschließend in den Alkohol Prostaglandin H₂ **4** überführt. **4** dient als Ausgangsstoff für die Synthese weiterer Prostaglandin-Derivate, welche über entsprechende enzymatische Synthesewege in die gezeigten Derivate Prostaglandin I₂ **5**, Prostaglandin E₂ **6**, Prostaglandin D₂ **7** und Prostaglandin F_{2α} **8** transformiert werden.^[28]



Schema 4: Biosyntheseweg von Leukotrienen 11 – 13 ausgehend von Arachidonsäure 2.

Der Biosyntheseweg von Leukotrienen beginnt mit der 5-LO katalysierten Transformation von Arachidonsäure 2 in Leukotrin C₄ 10 über zwei Schritte. Durch das Enzym Leukotrien A₄-Hydrolase (LAT4H) kann 10 entweder in Leukotrin B₄ 11 hydrolysiert werden oder durch Addition von Glutathion, katalysiert durch die Glutathiontransferase Leukotrin C₄ Synthase (LTC₄S), in Leukotrin C₄ 12. Durch eine Protease-katalysierte Abspaltung von Glutaminsäure, wird zunächst Leukotrin D₄ 13 und durch weitere Abspaltung von Glycin Leukotrin E₄ 14 erhalten.^[29]

Die Biosynthese von Histamin ist in Schema 5 dargestellt.

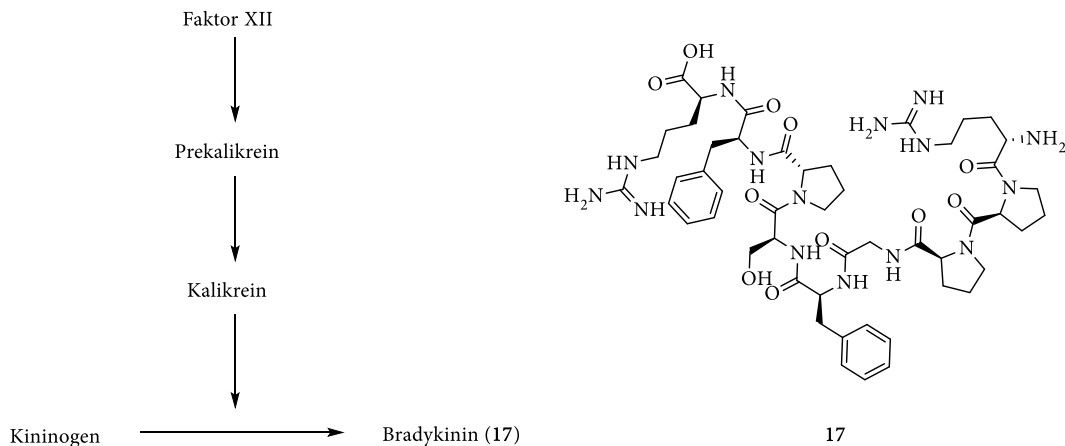


Schema 5: Biosyntheseweg von Histamin 16.

Durch die Histidin Decarboxylase (HDC) katalysierte Decarboxylierung von Histidin 15 wird Histamin 16 in einem Schritt erhalten.^[19]

Neben Prostaglandinen 5 – 8, Leukotrienen 11 – 14 und Histamin 16 ist als weiterer Mediator das Oligopeptid Bradykinin 17 zu nennen.

Bradykinin 17 ist ein aus 9 Aminosäuren bestehendes Oligopeptid, das biosynthetisch aus dem inaktiven Vorläuferprotein Kininogen gewonnen wird. Die Biosynthese ist in Schema 6 dargestellt.



Schema 6: Biosyntheseweg von Bradykinin 17.

Das notwendige Enzym, welches die Transformation des inaktiven Kininogen in Bradykinin 17 katalysiert, entsteht durch den enzymatischen Abbau des für die Blutgerinnung notwendigen Faktor XII. In diesem zweistufigen Abbau über das Intermediat Prekalikrein wird das aktive Enzym Kalikrein gewonnen. Dieses Enzym katalysiert den Abbau des aus 625 Aminosäuren bestehenden Kininogen in Bradykinin 17.^[30]

1.2.2. Entstehung der sichtbaren Symptome einer Entzündung

Die im Gewebe gebildeten oder freigesetzten Zytokine leiten nun die Prozesse zur Bekämpfung von Krankheitserregern und Fremdkörpern ein. Diese Prozesse führen zu den äußerlich sichtbaren sogenannten Leitsymptomen einer Entzündung. Die Leitsymptome einer Entzündung sind seit dem zweiten Jahrhundert bekannt und werden mit den lateinischen Begriffen *tumor* (Schwellung), *dolor* (Schmerz), *rubor* (Rötung), *calor* (Überwärmung und Fieber) und *functio laesa* (Funktionseinschränkung) beschrieben.^[31]

Die Zytokine binden an Rezeptoren von Endothelzellen, wodurch diese kontrahieren und sich Lücken zwischen den einzelnen Zellen bilden. Durch die gebildeten Lücken ist die Integrität der äußeren Zellschicht reduziert und die vaskuläre Permeabilität ist erhöht, wodurch vermehrt Plasma aus den Gefäßen in den

Gewebsbereich gelangt. Die Einlagerung von Flüssigkeit im Gewebe hat die Ausbildung eines Ödems zur Folge, wodurch das erste Symptom, *tumor*, erklärt werden kann. ^[32, 33]

Das zweite Symptom, *dolor*, ist ebenfalls eine Folge der erhöhten Flüssigkeitsmenge im Gewebe. Im Gewebe befinden sich Neuronen, deren Aktivierung für das Auslösen von Schmerzempfinden verantwortlich ist. Diese Noizzeptoren genannten Schmerzrezeptoren reagieren auf die erhöhte Flüssigkeitsmenge und den daraus resultierenden gestiegenen hydrostatischen Druck. Neben dem physikalischen Trauma, werden die Noizzeptoren ebenfalls durch das gebildete Bradykinin **17** aktiviert. ^[32, 34]

Die Symptome *rubor* und *calor* sind Resultate eines Effekts, der Vasodilatation genannt wird.

Auf der Oberfläche der Zellen des glatten Muskelgewebes befinden sich ebenfalls Zytokin-Rezeptoren, die nach Aktivierung eine Entspannung der Muskulatur bewirken. Durch die Entspannung der Muskulatur kommt es zu Erweiterung der umliegenden Gefäße. Die betroffenen Gefäße müssen vermehrt mit Blut versorgt werden, um die Homöostase des Blutdrucks in der Region aufrecht zu erhalten. In Folge dessen kommt es zu einer lokalen Hyperämie. Die erhöhte Blutmenge in der entzündeten Region führt zu einer Rötung der betroffenen Stelle sowie eine lokale Erhöhung der Temperatur. ^[32,35]

Das fünfte Symptom, *functio laesa*, tritt nicht bei jeder Entzündung auf, sondern nur bei einer sehr starken Reaktion beispielsweise in Folge eines schwerwiegenden Traumas. In einem solchen Fall kann die austretende Flüssigkeit in das Gewebe so groß sein, dass dies die Funktionalität der Gelenke beeinträchtigen kann. ^[36]

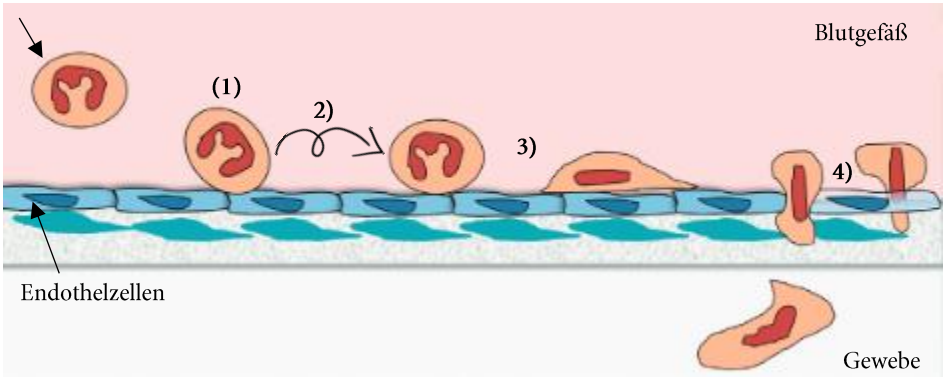
1.2.3. Zelluläre und vaskuläre Mechanismen zur Rekrutierung von Leukozyten

Die Gründe für die herbeigeführte Hyperämie, liegt in dem Bestreben vermehrt Zellen des Immunsystems in die betroffene Region zu rekrutieren.

Neben dem Effekt der Kontraktion der Epithelzellen, hat die Rezeptorbindung der Hormone an diese Zellen noch einen weiteren Effekt. Ähnlich zu den Mastzellen, tragen auch Epithelzellen Granulae in sich, die nach Rezeptoraktivierung ihren Inhalt freigeben. In so genannten Weibel-Palade-Körperchen (WPK) ist unter anderem das Transmembran-Protein P-Selektin gespeichert. Durch die Rezeptorbindung wird eine Migration der WPK an die, der Gefäßlumen zugewandten, Zellmembran initiiert. Dort angekommen

fusionieren sie mit ihr und setzen ihren Inhalt frei, dadurch erfolgt eine Markierung der Zelloberflächen der betroffenen Region mit P-Selektin.^[37]

P-Selektin zeigt eine hohe Affinität zu Zuckermolekülen, die auf den Zelloberflächen von Neutrophilen und Monozyten lokalisiert sind. Durch die Affinität entstehen anziehende Kräfte zwischen den Leukozyten im Blutstrom und P-Selektin auf den Gefäßwänden. Diese Kräfte sind stark genug, um die Zellen aus dem Blutstrom zu ziehen und durch adhäsive Kräfte an die Zellwände der Gefäße zu binden. An den Zellwänden sind die Leukozyten nicht lokal gebunden, sondern durch das Lösen und Neuausbilden neuer Bindungen mit P-Selektinen erfolgt eine rollende Bewegung an der Zellwand. Dieser Bewegungsprozess wird Margination genannt. Mit fortschreitender Margination bildet sich eine stärkere Bindung an die Zellwand aus, wodurch sich weitere Wechselwirkungen mit anderen Membranproteinen ausbilden können. Durch die gebildeten Lücken in den Gefäßwänden, werden bestimmte Zelladhäsionsmoleküle (CAMs, *cell adhesion molecules*) zugänglich. Diese Proteine, auch PECAMs (*platelet endothelial cell adhesion molecule*) genannt, gewährleisten unter physiologischem Normalzustand die Zell-Zell-Bindung und somit die Integrität der Gefäße. Nach der Kontraktion liegen diese Proteine frei und können nun auch adhäsive Kräfte zu den Leukozyten ausbilden. Diese Kräfte bewirken, dass die Leukozyten von den Gefäßwänden in das kapillare System der kontrahierten Zellen gezogen und hindurch befördert werden. Auf dieser Weise ist eine transendotheliale Migration aus dem Gefäß- in den Gewebsraum möglich. Die Gesamtheit dieses Prozesses wird Diapedese genannt und ist in Schema 7 gezeigt.^[38]



Schema 7: Schematische Darstellung des Prozesses der Diapedese. Einleitend werden die Leukozyten Selektin-vermittelt aus dem Blutstrom gebunden (1) und bewegen sich in einer rollenden Bewegung entlang der luminalen Zellwand (2), wobei die Bindung mit fortschreitender Bewegung stärker wird (3). Ab einem gewissen Punkt ist die Bindung stark genug, dass eine transendotheliale Migration entweder parazellulär oder transzellulär möglich ist (4).^[38]

Nachdem die Leukozyten in den Gewebsraum gelangen, wirken die Zytokine auch auf Rezeptoren der weißen Blutzellen. In einem Chemotaxis genannten Prozess, bewegen sich die weißen Blutkörperchen entlang des Konzentrationsgradienten der Zytokine zum Ort der Infektion. Sobald die Zellen dort angelangt sind, sekretieren sie weitere Entzündungsmediatoren, die Prozesse einleiten, um bei der Rekrutierung von weiteren Leukozyten zu helfen. Die beiden Zytokine Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), wirken gleichermaßen auf die Endothelzellen und können die Exkretion von E-Selektin initiieren. E-Selektin, analog zu P-Selektin, bietet weitere Bindungsstellen für Leukozyten und leitet die Mechanismen zur Diapedese ein.^[39]

Neben dem unmittelbaren Einfluss von IL-1 auf die entzündete Region, hat das Protein auch Auswirkungen auf den Körper über die Entzündungsstelle hinaus. Über die systemische Verteilung über das Blut gelangt IL-1 ins Gehirn und kann dort auf den Hypothalamus wirken. Dies bewirkt die Sekretierung von Prostaglandin E₂. Eine erhöhte Konzentration des Hormons im Hypothalamus führt zu einer Erhöhung der Körperkerntemperatur, was sowohl ein ungünstigeres Lebensumfeld für Pathogene schafft als auch die gesamte metabolische Aktivität des Körpers erhöht.^[40] Des Weiteren kann IL-1 auch auf das Knochenmark wirken. Dies bewirkt die Produktion von Leukozyten in den Stammzellen, was zu einer erhöhten Verfügbarkeit von Immunzellen im Organismus führt.^[41]

1.2.4. Sterile und pathogene Entzündungen

Eine Immunreaktion, kann auf zwei Wegen ausgelöst werden. Es wird unterscheiden in einen sterilen und einen pathogenen Verlauf einer Entzündung.

Bei einem sterilen Verlauf reagiert das Immunsystem auf Schädigungen oder das nekrotische Ableben von Gewebe und lässt sich somit nicht mit der Anwesenheit von Mikroorganismen, wie Bakterien oder Viren, assoziieren. Mögliche Ursachen einer sterilen Entzündung können chemische oder physikalische Traumata, wie Verbrennungen, Verätzungen oder Strahlenbelastung darstellen. Der nekrotische Zelltod als Ursache für eine sterile Entzündung erklärt sich durch den Verlust der Zellintegrität und der damit verbundenen unkontrollierten Freisetzung von Zellbestandteilen. Diese Bestandteile werden auch als *damage associated molecular patterns* (DAMPs) bezeichnet und dienen als Signalmoleküle, um die Entzündungskaskade einleiten. Unter physiologischen Bedingungen sind sie im Cytoplasma lokalisiert und

werden in diesem Zustand nicht vom Immunsystem registriert.^[42] Ebenfalls hervorgerufen werden kann eine sterile Entzündung durch eine Abstoßungsreaktion des Körpers auf ein Implantat.^[43] Ausgelöst werden kann die Immunreaktion in einem solchen Fall durch das Ablösen von Mikropartikeln des Implantats, welches als Fremdkörper vom Immunsystem erkannt wird.^[43]

Bei einem pathogenen Verlauf einer Entzündung wird die Immunreaktion ebenfalls durch die Registrierung bestimmter Signalmoleküle eingeleitet. Die hierfür verantwortlichen Moleküle sind Zellbestandteile von körperfremden Mikroorganismen und werden als *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet.^[44]

Die Rezeptoren zur Erkennung der Signalmoleküle befinden sich vornehmlich auf Immunzellen und werden PRRs (*pattern recognition receptors*) genannt. Im Besonderen sind mit PRRs drei Rezeptorgruppen gemeint: die Transmembran-ständigen *toll-like* Rezeptoren (TLRs), sowie die intrazellulären *NOD-like* (NLRs) und *RIG-like*-Rezeptoren (RLRs). Eine Auflistung einiger PAMPs und DAMPs, sowie die jeweils assoziierten Rezeptoren zur Erkennung sind in Tabelle 3 aufgeführt.^[45-47]

Tabelle 3: Beispiele einiger PAMPs und DMAPS sowie der jeweils assoziierten Rezeptoren. ssRNA: single-stranded RNA; dsRNA: double-stranded RNA; Poly I:C: Polyinosinsäure:Polycytidylsäure; ATP: Adenosintriphosphat; mtDNA: mitochondriale DNA; NFP: N-formylierte Peptide; HSP: *heat shock* Proteine.

PAMP	Ursprung des PAMPs	PRR
Lipoteichonsäure	Bakterien	TLR2, TLR6
Flagellin	Bakterien	TLR5
Muramyl-Dipeptid	Bakterien	NOD2
ssRNA/dsRNA	Viren	NOD2, TLR7, TLR8 / TLR10
Poly I:C	Viren	RIG-I
Zymosan	Pilze	TLR2
DAMP	Mechanismus der Freisetzung	PRR
ATP	Apoptose	NOD3
mtDNA	Pyroptose	TLR8
NFPs	Nekrose	NOD2
HSPs	Nekroptose	NOD3
Harnsäure	Nekrose	NOD3

Die beiden Entzündungsformen unterscheiden sich lediglich in der Art der Moleküle, die eine Entzündung hervorrufen und den Rezeptoren, die diese erkennen. Die Mechanismen zur Rekrutierung von Immunzellen in die betroffene Region und die Ausbildung der Symptome einer Entzündung sind in beiden Fällen identisch. Dies erschwert die Diagnose der Ursache einer Entzündung und somit auch die gezielte Therapie.^[48]

1.3. Diagnose bakterieller Infektionen

Die Diagnose eines bakteriellen Infekts geschieht in der Regel über die Analyse entnommener Proben vom Patienten. Geeignete Proben können auf verschiedene Weise erhalten werden, beispielsweise aus dem Blut, dem Urin, dem Stuhl, durch Abstriche von Wunden oder dem Nasen- und Rachenbereich^[49], durch Lumbalpunktion oder durch Gewebentnahmen.^[50] Im Labor werden die Proben durch Kultivierung oder durch Mikroskopie analysiert und so kann Aufschluss über die Erreger und über den Ort der Infektion erhalten werden. Anhand dieser Ergebnisse kann dann eine geeignete Therapie eingeleitet werden. Die Diagnose über entnommene Proben ist verlässlich, jedoch ist sie zeitaufwendig und durch den invasiven Charakter zum Teil mit Belastungen für den Patienten verbunden.^[51] Aus diesem Grund wurden in der Vergangenheit einige Konzepte zur nicht-invasiven Diagnose von bakteriellen Infektionen entwickelt. Einige von diesen sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Ein grundlegendes Konzept der entwickelten Methoden beruht auf der Synthese von chemischen Sonden. Für diese Zwecke wird ein Molekül, mit bekannter Affinität für Bakterien mit einer Markierung versehen, die es erlaubt die Verbindung im Körper zu detektieren. Bei Anwesenheit von Bakterien wird das Molekül sich an dieser Stelle akkumulieren und über das Signal der Markierung kann die Position im Körper detektiert werden.

Ein fluoreszenzbasierter Ansatz wurde von CHANG *et al.* entwickelt. Durch die Synthese der BODIPY-Derivate **20** – **22** ^[57] gelang es verschiedene Bestandteile der EPS-Matrix zu adressieren und diese fluoreszent zu markieren. Über *knock-out* Experimente mit modifizierten *P. aeruginosa* Stämmen konnte gezeigt werden, dass Derivat **22** die Amyloid-Strukturen eines Biofilms markiert, Derivat **20** hingegen die eDNA und Derivat **21** Exopolysaccharide (Abbildung 2).

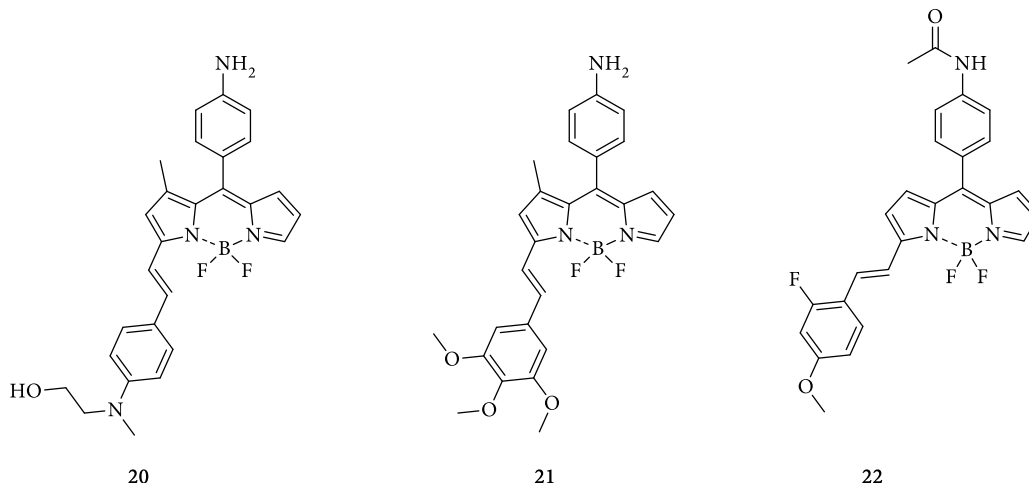


Abb. 2: Strukturen von Biofilm-bindenden BODIPY-Derivaten 20 – 22.

Die Anwendbarkeit der Sonden konnte *in vivo* durch Visualisierung einer Infektion der Cornea bei Mäusen gezeigt werden. Da die Detektion der Sonde über die fluoreszenten Eigenschaften des BODIPY-Grundkörpers erfolgt, ist diese Sonde jedoch auf oberflächliche Anwendungen limitiert. Obwohl die Emissionsmaxima der Sonden im Nahinfrarotbereich liegen, sind sie für die Detektion von Infektionen in tieferen Gewebsschichten nicht geeignet.

Für die Detektion von Infektionen in tiefen Gewebsschichten ist die Positronen-Emissionstomographie (PET) eine etablierte Diagnosemethode. Bei der PET handelt es sich um ein bildgebendes Verfahren, das die Position schwach radioaktiver Substanzen im Körper darstellen kann. Die für die Messungen eingesetzten Substanzen (Tracer) enthalten Radionuklide, die unter β^+ -Zerfall Positronen emittieren.

Der β^+ -Zerfall ist in Gleichung (1) dargestellt.

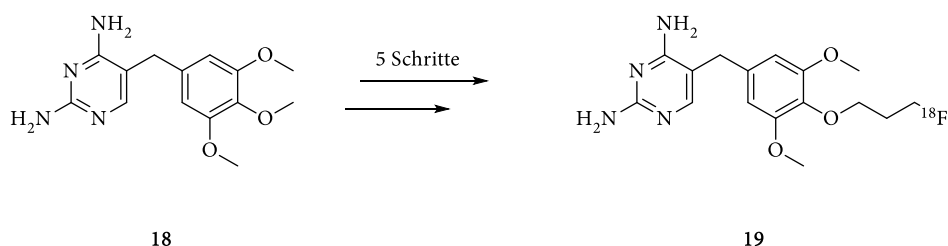


Im Kern des Mutternuklids M wandelt sich ein Proton in ein Neutron um. M zerfällt in ein Tochternuklid T und gibt dabei ein Positron (e^+) und ein Elektron-Neutrino (ν_e) frei.

Die freigesetzten Positronen haben keine lange Stabilität und geraten unverzüglich in Wechselwirkung mit Elektronen. Bei diesem Prozess entsteht Energie in Form von zwei Photonen, die sich in einem Winkel von 180° zueinander ausbreiten.

Ein Positronen-Emissions-Tomograph enthält ringförmig angeordnete Detektoren, die die ausgesandten Photonen detektieren können. In Kombination mit einem morphologisch bildgebenden Verfahren wie Computertomographie (PET/CT) oder Magnetresonanztomographie (PET/MRT) kann aus der zeitlichen und räumlichen Verteilung der detektierten Photonen die Verteilung des *tracers* im Körper visualisiert werden.^[52]

Ein gängiger Tracer, der zur Diagnose von entzündetem Gewebe genutzt wird, ist ¹⁸F-Desoxyglucose (¹⁸FDG). ¹⁸FDG ist ein Glukoseanalogon und fand zunächst Anwendung in der Tumordiagnostik.^[53] Die meisten Tumorarten mit gesteigertem Stoffwechsel nehmen durch Überexpression von Glukosetransportern (GLUT1 und GLUT3) und Überproduktion von Hexokinase II vermehrt Glukose auf^[54, 55]. Über den gleichen Mechanismus gelangt FDG in die Tumorzellen und wird dort akkumuliert, wobei der FDG-Uptake mit der Stoffwechselaktivität und Malignität des Tumors korreliert.^[55] Da auch Bakterien Glukose als Energiequelle verwenden, ist das Prinzip auch zur Detektion von entzündetem Gewebe geeignet.^[56] Der Vorteil dieser Methode ist die deutlich höhere Ortsauflösung im Vergleich zu konventionellen Methoden und eine kurze Untersuchungsdauer, sodass die Diagnose schneller gestellt werden kann.^[56] Da mit dieser Methode aber nicht zwischen Tumoren und Entzündungen unterschieden werden kann, haben SELLMYER *et al.* die Synthese eines ¹⁸F-markierten Trimethoprim-derivats **19** (Schema 8) entwickelt.^[48]



Schema 8: Darstellung eines ¹⁸F-markierten Trimethoprimderivats **19** ausgehend von Trimethoprim **18** über 5 Schritte.

Trimethoprim (TMP) **18** ist ein synthetisches Antibiotikum, das die bakterielle Dihydrofolatreduktase (DHFR) hemmt.^[48] DHFR ist ein Enzym der DNA-Synthese und des Folsäuremetabolismus, das bei den meisten Bakterienstämmen vorkommt. Die Aktivität von TMP **18** wurde trotz Funktionalisierung aufrechterhalten und hat eine nanomolare Affinität für bakterielle DHFR, wohingegen es eine mikromolare

Affinität für die humane DHFR aufweist. Zur Bestätigung der Anwendbarkeit wurden in Tiermodellen drei Krankheitsbilder etabliert, eine bakterielle Entzündung, eine sterile Entzündung und eine Tumorerkrankung. Diese drei Krankheitsbilder können mit ^{18}F FDG-Messungen nicht eindeutig unterschieden werden und ohne invasive Probeentnahme nicht ohne weiteres diagnostiziert werden. Durch Administration des ^{18}F -markierten TMP gelang es mittels Positronen-Emissionstomographie (PET) die bakterielle Infektion selektiv zu detektieren.

2. Zielsetzung

2.1. Synthese und Evaluierung molekularer PET-Sonden zur Diagnose bakterieller Infektionen

Trotz der Verfügbarkeit von Antibiotika sind bakterielle Infektionen jedes Jahr eine der Haupttodesursachen von Millionen von Menschen auf der ganzen Welt. NAGHAVI *et al.* konnten zeigen, dass im Jahre 2019 7.7 Millionen Todesfälle mit bakteriellen Infektionen assoziiert wurden. Dies entspricht 13.6 % aller Todesfälle dieses Jahres.^[58] Die frühzeitige Erkennung einer bakteriellen Infektion ist daher eine wichtige Herausforderung.

Die Unterscheidung zwischen einer bakteriellen und einer sterilen Infektion stellt nur auf der Grundlage von Symptomen und Laborbefunden eine Herausforderung dar. Eine genaue Unterscheidung ist aber von entscheidender Bedeutung, da sie für eine gezielte Behandlung notwendig ist.

Klassische Methoden zur Erkennung von bakteriellen Infektionen existieren, allerdings beruhen diese häufig auf der Untersuchung und Kultivierung von Gewebeproben, die aus der verdächtigen Stelle entnommen werden.^[59] Diese Methoden sind wirkungsvoll, sind aber auf Grund ihres invasiven Charakters komplex und zeitraubend. Im Falle einer akuten Entzündung kann das Ergebnis für eine klinische Entscheidung zu spät kommen.

Die Entwicklung einer nicht-invasiven Methode zur Diagnose von bakteriellen Infektionsherden stellte das initiale Projekt dieser Doktorarbeit dar.

Das zugrundeliegende Konzept zur Lösung dieses Problems ist das Design, die Synthese und die Evaluierung zur Anwendbarkeit kleiner Molekülsonden. Die Sonden sollen die Eigenschaften haben, selektiv an bakterielle DNA, genauer gesagt an extrazelluläre DNA (eDNA) eines Biofilms zu binden. Der Charakter eines bakteriellen Biofilms ist in Abschnitt 1.1 erläutert. Im Falle einer bakteriellen Infektion wird die eDNA in der Nähe der Infektionsstelle angereichert und wirkt so Biomarker für bakterielle Existenz.

Dafür wurden generelle Ansprüche an das Molekül formuliert:

- Die Sonde muss eDNA bindend sein
- Die Sonde muss im Körper detektierbar sein
- Die Sonde muss einen zell-impermeablen Charakter aufweisen

Um an das molekulare Ziel der Sonde zu binden, muss die Sonde eDNA bindende Eigenschaften besitzen.

Um den Ort der Entzündung lokalisieren zu können, muss die Sonde im Körper detektierbar sein. Eine geeignete Methode zur Detektion stellen nukleare Bildgebungsverfahren wie die Positronenemissionstomographie dar, die in Kombination mit morphologischen Bildgebungsverfahren wie CT oder MRT ein dreidimensionales Bild der Vorgänge im gesamten Körper liefern kann.

Der zell-impermeable Charakter ist aus zwei Gründen notwendig. Zum einen würde eine zellgängige Sonde auch mit menschlicher DNA interagieren, sodass sie mutagen wirken würde. Zum anderen würden diese Eigenschaften bei lokaler Injektion zu falsch-positiven Ergebnissen führen.

Auf Grundlage dieser Überlegungen werden fünf Moleküle dargestellt, deren Strukturen in Abbildung 3 dargestellt ist.

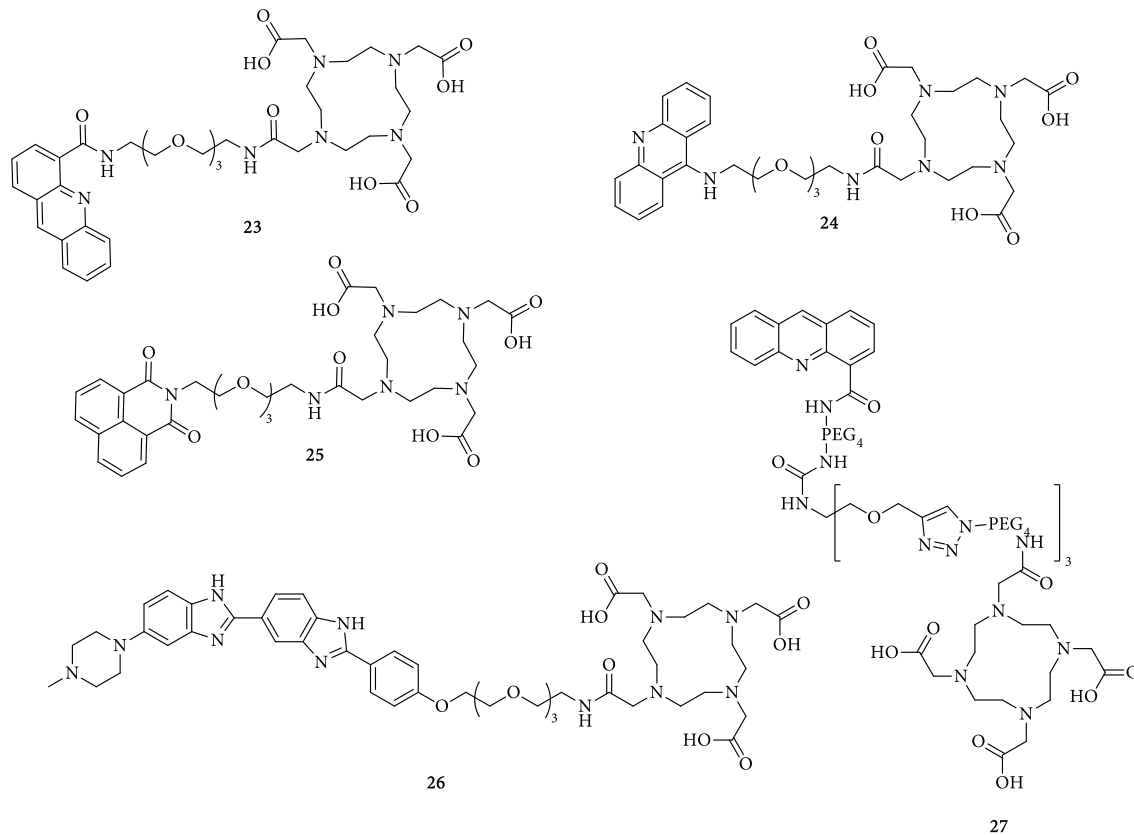


Abb. 3: Strukturen der Zielverbindungen 23 – 27.

Die Moleküle bestehen aus zwei funktionellen Einheiten, die über einen linker miteinander verbunden werden. Die erste funktionelle Einheit stellt ein DNA-bindendes Molekül dar, über das die Sonde an eDNA bindet. Die zweite funktionelle Einheit bietet die Möglichkeit die Sonde radioaktiv zu markieren. Für diesen Zweck werden die Sonden mit dem cyclischen Chelator DOTA funktionalisiert. Dieser wird genutzt um ^{68}Ga zu chelatisieren und so das Molekül radioaktiv zu markieren. Verbunden werden beide Einheiten über PEG-basierte Linker. Neben einem einfachen PEG-linker-System wird ebenfalls ein TRIS-basiertes linkersystem entwickelt.

Nach erfolgreicher Synthese geeigneter Verbindungen sollen die formulierten Anforderungen an die Sonde durch geeignete *in vitro* Experimente validiert werden. Dies geschieht zunächst auf Grundlage der optischen Eigenschaften der Verbindungen. Zunächst wird die generelle Bindefähigkeit der Sonde an DNA getestet, im Anschluss die Bindefähigkeit an eDNA in einem Biofilm und abschließend die Zellpermeabilität in Bakterien und eukaryotische Zellen. Der vielversprechendste Kandidat wird in diesen Experimenten vorselektiert und für diesen Kandidaten werden dann zunächst Methoden zur radioaktiven

Markierung gefunden. Abschließend werden die Ergebnisse, die auf Grundlage der fluoreszenten Eigenschaften gewonnen wurden, mit den radioaktiven Moleküleigenschaften validiert und die Anwendbarkeitsbreite der Sonde wird an Biofilmen verschiedener Stämme getestet.

2.2. Entwicklung eines Nanopartikel-basierenden Ansatzes zur Behandlung bakterieller Infektionen

Neben der Herausforderung eine bakterielle Infektion zu erkennen, bringt auch die Therapie einer solchen Infektion Probleme mit sich. Nebenwirkungen in der konventionellen Behandlung mit Antibiotika sind bekannt und reichen von allergischen Reaktionen bis hin zu Herzkomplikationen.^[60, 61] Eine besondere Belastung kann bei Antibiotikatherapien für den Gastrointestinaltrakt ausgehen, da Antibiotika zum Teil nicht zwischen pathogenen Bakterien und gesunder Darmflora unterscheiden können.^[62] Diese fehlende Selektivität hat zur Folge, dass bei der Therapie die Gabe von höheren Dosen nötig ist, was eine rasant entwickelnde bakterielle Resistenz gegen die Antibiotika zur Folge hat. Die Entwicklung antibiotikafreier Therapiemethoden gegen bakterielle Infektionen ist von großer Bedeutung, da die WHO die Entwicklung von bakteriellen Resistenzen gegen Antibiotika als einer der größten Gefahren für das globale Gesundheitssystem sieht.^[63]

Eine ideale Therapieform tötet Bakterien effektiv, ist nicht anfällig für die Ausbildung von Resistenzen, und hat keinen Einfluss auf gesundes Gewebe.

Die Entwicklung eines möglichen neuartigen Therapieansatzes, der diese Anforderung beachtet, ist das zweite Projekt dieser Doktorarbeit und wurde in gleichberechtigter Kooperation mit Professor SEBASTIAN POLARZ und M.Sc. HANNAH BRONNER am Institut für anorganische Chemie der Leibniz Universität Hannover erarbeitet.

Das Ziel dieses Projekts ist die Entwicklung eines geeigneten Materials, das gezielt in die räumliche Nähe eines Infektionsherdes gebracht werden kann und dort, nach Aktivierung eines externen Reizes, einen antibakteriellen Effekt zeigt.

Eine reizaktivierbare Therapieform stellt die photodynamische Therapie (PDT) dar. Diese findet vornehmlich Anwendung in der Onkologie, jedoch konnten auch erste Konzepte zur Behandlung von

bakteriellen Erkrankungen mit Hilfe von phototherapeutischer Verfahren (aPDT, antibakterielle photodynamische Therapie) entwickelt werden.^[64, 65]

Die Idee der antibakteriellen photodynamischen Therapie beruht auf einem Photosensibilisator, der nach Lichtanregung mit geeigneter Wellenlänge reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produziert. Unter ROS sind folgende Verbindungen zusammengefasst: Hydroxyl-Radikal (HO \cdot), Hyperoxid-Anion (O $^{2-}$) Wasserstoffperoxid (H $_2$ O $_2$) und Singulett Sauerstoff (1 O $_2$).

Das bisher größte Problem der aPDT ist der gezielte Transport des Photosensibilisators zum Wirkort. Die meist hydrophoben Moleküle werden schlecht vom Körper aufgenommen, aggregieren und gelangen so nur unzureichend zum Wirkort. In dieser Form wird nicht genug ROS produziert um eine antibakterielle Wirkung entfalten zu können. Dieses Problem kann umgangen werden, indem die Moleküle auf Nanopartikeln immobilisiert werden. Durch die homogene Verteilung einer solchen Partikelsuspension, wird ein lösungsähnlicher Zustand erreicht, in dem die Moleküle wirkungsvoll sind.

In der Arbeitsgruppe von POLARZ konnten Methoden zur Synthese poröser Organosilka Nanopartikel entwickelt werden, die eine unterschiedliche Funktionalisierung der Oberfläche und des porösen Systems erlauben.^[66, 67]

Diese Partikel werden auf der Oberfläche mit einem Molekül funktionalisiert, dass durch Bindung an den Biofilm die räumliche Nähe sicherstellt. Da die eDNA bindende Eigenschaft des Hoechst-PEG-Azid **50** in Kapitel 3.2. gezeigt werden konnte, soll die generelle Anwendungsbreite von **50** in Transportprozessen in diesem Kapitel untersucht werden. **50** wird mit Kupfer click Chemie an die Oberfläche des Partikels funktionalisiert. Als Photosensibilisator diente ein Acridin Orange (AO) Derivat, dass in einer Thio-MICHAEL-Reaktion in das poröse System gebunden wird. Die so erhaltenen Partikel werden auf ihre Anwendbarkeit in einer aPDT untersucht.

3. Synthese und Evaluierung molekularer PET-Sonden zur Diagnose bakterieller Infektionen

3.1. Synthese der eDNA-bindenden Sonden

3.1.1. Design der Sonden

Bei dem Design einer möglichen Sonde wurde sich an den Eigenschaften orientiert, die in Kapitel 2.1. genannt wurden. Da es das Ziel ist an extrazelluläre DNA zu binden, muss ein Strukturmotiv eine DNA-bindende Einheit darstellen. Da die Verbindung mittels radioaktiver Strahlung detektiert werden soll, muss sie eine Position für eine entsprechende Markierung bieten. Beide Funktionalitäten werden über eine Verbindungseinheit miteinander verbunden und somit ergibt sich eine allgemeine Struktur für eine Sonde, die in Abbildung 4 gezeigt ist.

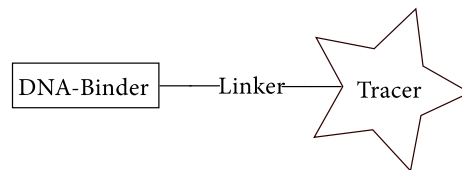


Abb. 4: allgemeine Struktur einer DNA-bindenden Sonde.

Da das tracing über Radioaktivitätsmessung erfolgt, muss der Tracer eine Möglichkeit bieten ein radioaktives Atom zu binden. Für die gewünschten Zwecke stellt ^{68}Ga einen guten Kompromiss aus Handhabbarkeit und Halbwertszeit dar. Aus diesem Grund wurde die *tracing* Einheit so gewählt, dass sie ^{68}Ga -Atome komplexieren kann. Ein gängiges Strukturmotiv zur Komplexierung radioaktiver Metallionen sind verschiedene cyclische Chelatoren, und im Besonderen geeignet für ^{68}Ga ist 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrayl)tetraessigsäure (DOTA). Die Strukturen von DOTA als freie Tetracarbonsäure und als at-Komplex sind in Abbildung 5 gezeigt.^[68]

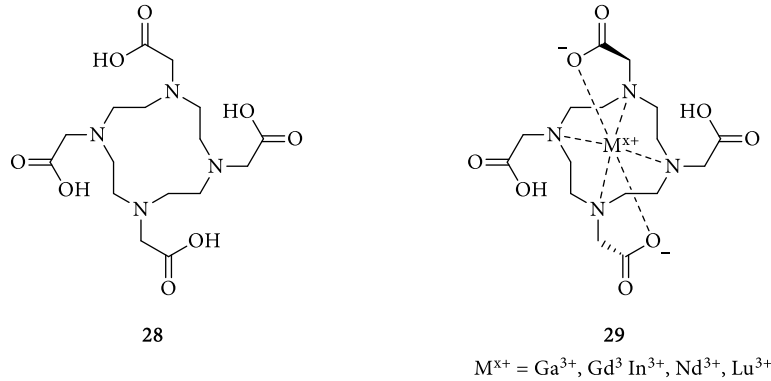


Abb. 5: DOTA als freie Tetracarbonsäure **28** und DOTA als at-Komplex **29** mit geeigneten Metallen, die einen Komplex mit einer Bindungskonstante von $\log K > 20$ ausbilden.^[69, 70]

Die vier Stickstoffatome, sowie zwei Carboxylate komplexieren das Metallkation in einem sehr stabilen oktaedrischen Komplex. Die Bindungskonstanten für die in der Abbildung aufgeführten Metalle liegen bei $\log K > 20$ ^[53,54] und für Gallium im Besonderen bei $\log K = 21.3$.^[70]

Bei den Überlegungen, welche DNA-bindende Einheiten für die Verwendung in einer möglichen Sonde geeignet sind, wurden Moleküle gesucht, die zwei Anforderungen erfüllen:

- Das Molekül muss sich an einer distinkten Stelle funktionalisieren lassen
- Das Molekül muss trotz Funktionalisierung die DNA-bindenden Eigenschaft behalten

In der Literatur wurde dafür nach geeigneten Strukturmotiven gesucht, deren DNA Affinität bereits gezeigt werden konnte und die eine Funktionalisierung erlauben, ohne dabei die bindenden Eigenschaften zu verlieren. Es wurde sich auf vier Struktur motive konzentriert, die in Abbildung 6 gezeigt sind.

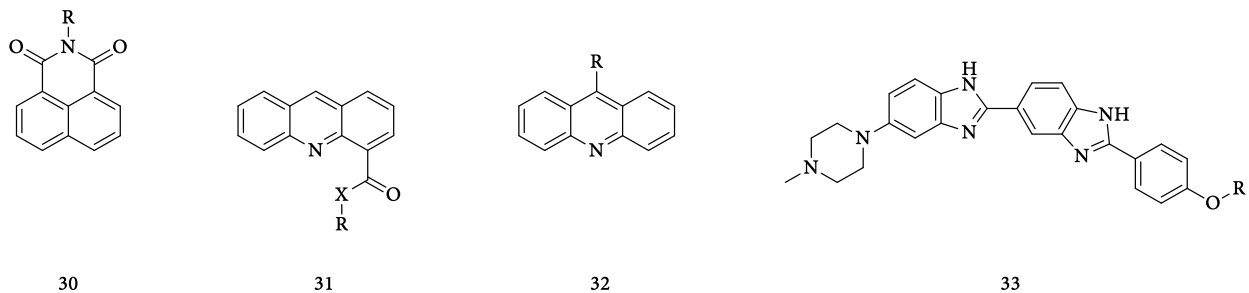


Abb. 6: Bekannte DNA-bindende Struktur motive.

Bei Verbindung **30** handelt es sich um ein 1,8-Naphthalimid-Derivat. In Arbeiten von RYAN *et al.* konnte über UV/Vis-Messungen die DNA bindende Eigenschaft dieses Struktur motiv in Konjugation mit einem

Rutheniumkomplex gezeigt werden. Eine Abbildung des DNA-bindenden Moleküls **34**, sowie die entsprechenden Emissionsspektren der Verbindung ist in Abbildung 7 dargestellt.^[71]

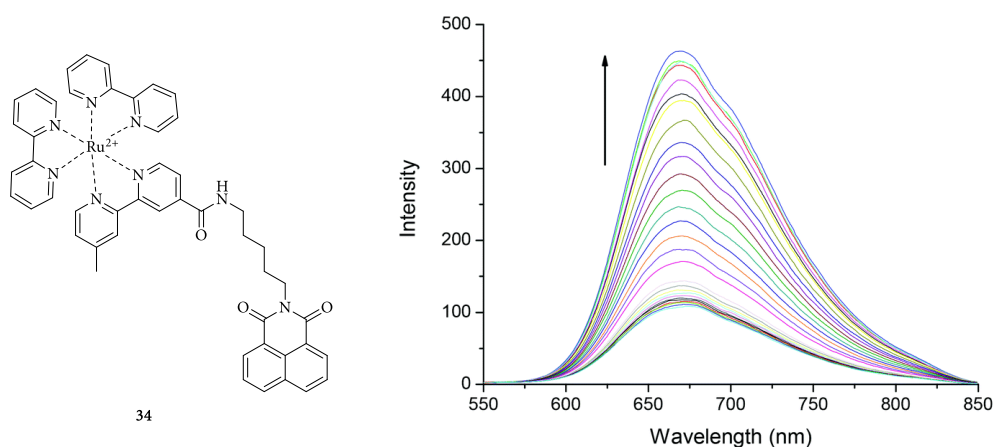


Abb. 7: a) Struktur eines 1,8-Naphthalimid-funktionalisiertem Metallkomplex mit DNA-bindenden Eigenschaften; b) Emissionsspektrum der Verbindung **34** bei zunehmender Menge DNA (0 – 15 µg) nach Bestrahlung bei $\lambda = 355$ nm.^[71]

Die DNA-bindenden Eigenschaften der Verbindung wurde mit der Emissionssteigerung der Verbindung nach Zugabe von DNA gezeigt. DNA bindende Moleküle zeigen in Konjugation mit DNA eine Veränderung in ihrem Fluoreszenzverhalten. Diese Veränderungen treten sowohl in Form von Veränderungen in der Fluoreszenzintensität, als auch in hypo- und bathochromen Effekten auf.^[72 - 75] Begründet liegt die Veränderung des Emissionsverhaltens in den Wechselwirkungen der π -Elektronen des Farbstoffes und der DNA. Diese Wechselwirkungen können eine Verschiebung der Emissions- und Absorptionsmaxima, sowie eine Stabilisierung oder auch eine Destabilisierung des angeregten Zustands nach Bestrahlung bewirken.^[76]

Der Metallkomplex, der über eine Linker-Einheit, mit dem 1,8-Naphthalimid-Gerüst verbunden ist, zeigt strukturelle Ähnlichkeiten zu einer potentiellen Sonde, wie sie in dieser Arbeit Verwendung finden soll und somit wurde Strukturmotiv **30** für geeignet befunden.

Bei den Motiven **31** und **32** handelt es sich um Acridinderivate. Die DNA-bindende Eigenschaft dieses Grundgerüsts ist bekannt unter anderem durch den in der Molekularbiologie verwendeten DNA-Farbstoff Acridin Orange **34**. Dass auch eine Funktionalisierung des Grundgerüsts an C₄ mit einem Amid DNA-bindende Eigenschaften aufweist, konnte durch TODD *et al.* gezeigt werden. Mittels Kristallstrukturanalyse konnte die interkalierende Wechselwirkung des Topoisomeraseinhibitor *N*-[2-(dimethylamino)ethyl]-

Acridine-4-Carboxamid (DACA) **35** zwischen zwei Guanosin/Cytosin Paare gezeigt werden.^[77] Eine entsprechende Darstellung ist in Abbildung 8 gezeigt.^[78]

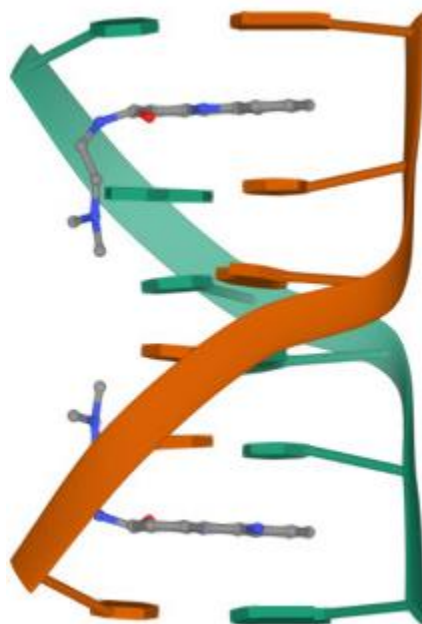


Abb. 8: Kristallstruktur von interkaliertem DACA **35** zwischen zwei Guanosin/Cytosin Paare.

Dass auch die C₉-Position eine Funktionalisierung erlaubt, ohne dass die DNA-bindende Eigenschaft des Acridin-Grundgerüsts verloren geht, wurde in Arbeiten von FERNANDEZ *et al.* gezeigt. In dieser Arbeit wurden Polyacridin PEG-Peptide **36**, hinsichtlich ihrer DNA-Bindfähigkeit untersucht. Dafür wurden, 9-Aminoacridin-Einheiten über einen Linker an Lysineinheiten des Peptids gebunden und über einen Verdrängungsassay konnte die interkalierende Wirkung der Acridineinheiten gezeigt werden.^[79]

Die Strukturen der diskutierten DNA-bindenden Acridin-Derivate (**34** – **36**) sind in Abbildung 9 gezeigt.

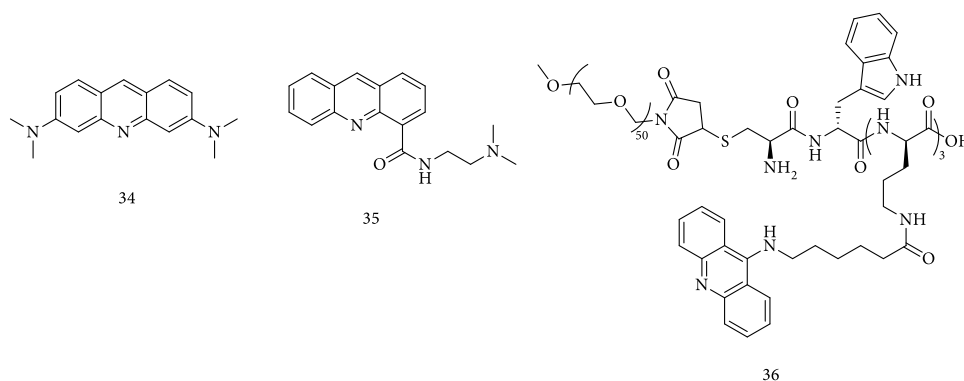


Abb. 9: Strukturen bekannter DNA-bindender Acridin-Derivate mit Funktionalisierung von verschiedenen Positionen im Grundgerüst.

Bei Motiv 33 handelt es sich um die Grundstruktur der Hoechst-Farbstoffe. Dieser DNA-Farbstoff bindet an die kleine Furche von Adenosin/Thymin-reichen DNA-Sequenzen.^[80] Die Bindung von Hoechst an DNA ist in Abbildung 10 gezeigt.

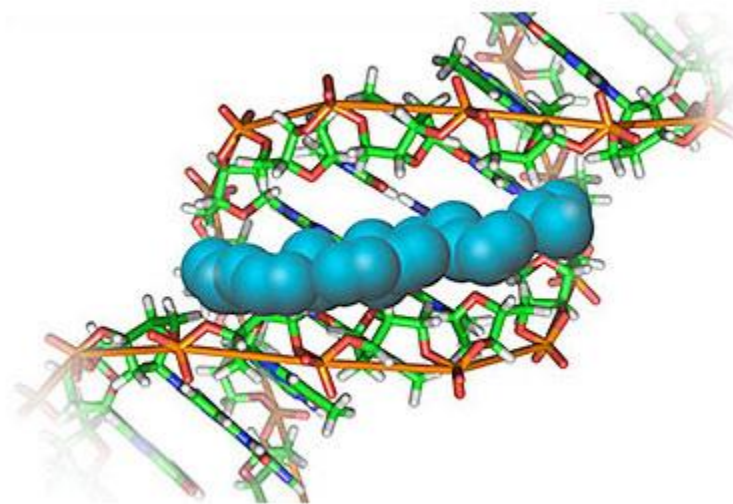
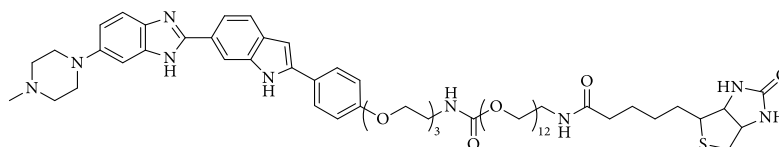


Abb. 10: Bindung von Hoechst 33342 in die kleine Furche von Adenosin/Thymin-reichen DNA-Sequenzen.^[81]

In Arbeiten von KHAN *et al.* wurde ein Biotin-funktionalisiertes Hoechst-Derivat 37 (Abbildung 11) dargestellt, welches in Konjugation mit Streptavidin in *targeted delivery* Prozessen eingesetzt werden konnte.^[89] Treibende Kraft für diesen Prozess war die DNA-bindende Eigenschaft des Hoechst-Derivats, welche selbst nach Konjugation an ein Protein nicht verloren ging.



37

Abb. 10: Struktur eines Biotin-funktionalisierten Hoechst-Derivats mit DNA-bindenden Eigenschaften.

Bei der Wahl der Verbindungseinheit, wurde neben der Bifunktionalität des Moleküls, ein Augenmerk darauf gelegt, dass die Eigenschaften des Linkers, die Eigenschaften des gesamten Moleküls gut komplementiert. Für die Implementierung, ist es notwendig, dass es wasserlöslich ist und keine Zellgängigkeit aufweist. Für beides ist eine hohe Gesamtpolarität des Moleküls nötig. Die DOTA-Einheit als Tricarbonsäure, Amid und mit einem Cyclen-Grundgerüst bringt gute physikochemische Eigenschaften

hinsichtlich einer hohen Polarität mit. Alle selektierten DNA bindenden Moleküle sind jedoch unpolar und weisen keine guten Löslichkeitseigenschaften in Wasser auf.

Es wurden darum Linkersysteme auf Polyethylenglycol (PEG)-Basis gewählt. Im einfachsten Fall wären beide Funktionalitäten über eine PEG₄ Einheit verbunden worden. Um ein generelles System zu etablieren, was eine Funktionalisierung mit mehr als einer Funktionalität bietet, wurde auf Basis von Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) ein Linkersystem gewählt, dass eine Funktionalisierung mit bis zu drei Substituenten erlaubt. Die Verwendung von drei polaren Seitenketten erhöht die Gesamtpolarität des Moleküls und somit den hydrophilen Charakter der Sonde.

Aus der allgemeinen Struktur in Abbildung 4 ergeben sich nach diesen Überlegungen mögliche Kandidaten, die sich aus den Bausteinen **30** – **33** und **34** zu den Sonden mit den allgemeinen Strukturen **35** und **36** zusammensetzen lassen. Gezeigt sind diese in Abbildung 11.

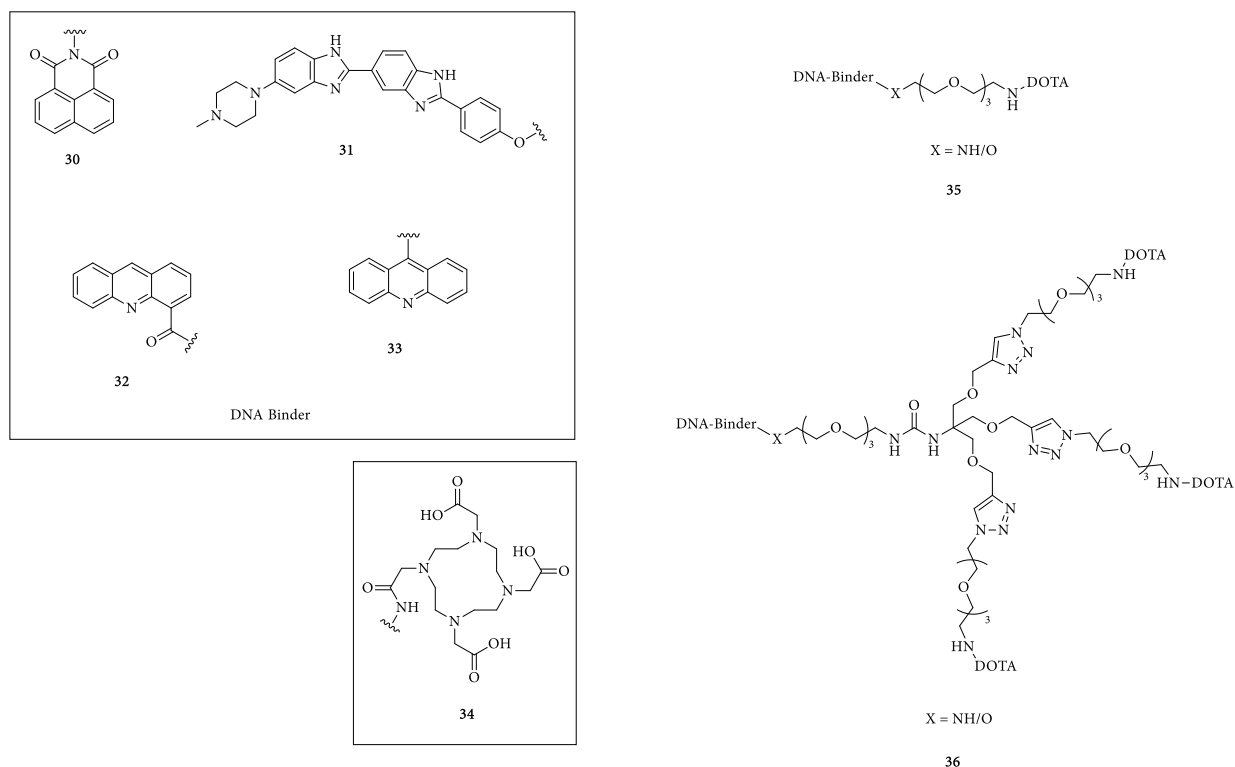
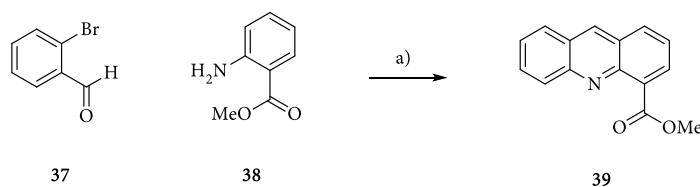


Abb. 11: Bausteine und allgemeine Struktur möglicher DNA-bindender Sonden.

3.1.2. Chemische Synthese der DNA-bindenden Sonden

 3.1.2.1. Synthese des C₄-funktionalisierten Acridinbaustein **44**

4-Acridincarbonsäuremethylester **37** wurde in einer zweistufigen Sequenz, bestehend aus einer HARTWIG-BUCHWALD-Kupplung mit anschließender Kondensation synthetisiert (Schema 8). Die getesteten Bedingungen dafür sind in Tabelle 4 dargestellt.



Schema 8: Syntheseroute zu Acridinmethylester **39**, a) siehe Tabelle 4.

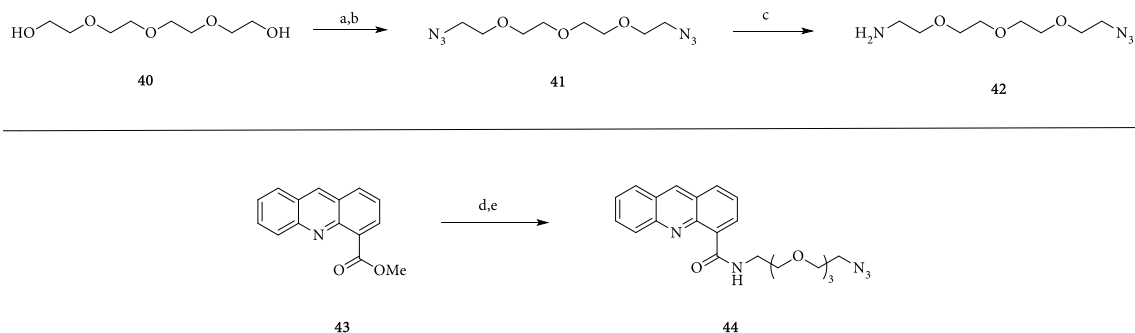
Tabelle 4: Bedingungen für die zweistufige Synthese von Acridinmethylester **39**.

Eintrag	Bedingungen	Ergebnis
I	1. Pd ₂ (dba) ₃ , dppf, K ₂ CO ₃ , PhMe, 80 °C, 24 h 2. AlCl ₃ , PhMe, 80 °C, 2 h	19 %
II	1. Pd ₂ (dba) ₃ , Xantphos, Cs ₂ CO ₃ , 1,4-Dioxan, 115 °C, 24 h 2. H ₂ SO ₄ , 80 °C, 1 h	65 %

Die optimierten Bedingungen unter Eintrag II^[82] ermöglichten die Synthese von 4-Acridincarbonsäuremethylester **39** in 65 % Ausbeute.

Ausgehend von Verbindung **40** konnte dann der DNA bindende Baustein **44** synthetisiert werden (Schema 9).

Synthese und Evaluierung molekularer PET-Sonden zur Diagnose bakterieller Infektionen



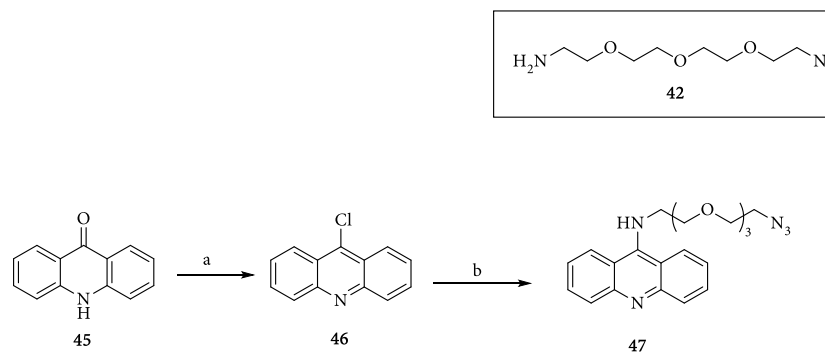
Schema 9: Synthese von Acridinamid **44**. a) MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C – RT, 16 h; b) NaN₃, DMF, 60 °C, 16 h, 59 % o2s; c) PPh₃, Et₂O/1 M HCl (aq.), 84 % d) LiOH (1 M in H₂O), THF, RT, 2h; e) EDC-HCl, Oxyma, NaHCO₃, **42**, DMF/CH₂Cl₂, 0 °C – RT, 48 % o2s.

Die Sequenz begann mit der Synthese der Linker-Einheit. Die terminalen Alkohole von Tetraethylglykol **40** wurden zunächst, nach Tosylierung, in das Diazid **41** überführt. In einer Zwei-Phasen Reaktion in Diethylether und 1 M wässriger HCl wurde selektiv ein Azid in Gegenwart von Triphenylphosphin zu Amin **42** reduziert. Es wurde sich bei dieser Reaktion zu Nutze gemacht, dass Triphenylphosphin leicht in Diethylether löslich ist, nicht jedoch in wässrigen Lösungen. Das Diazid **41** ist ebenfalls in Ether löslich, sobald jedoch eine Reduktion abgelaufen ist, wird das gebildete Amin durch die Salzsäure protoniert und ist somit unlöslich in Ether. Auf diese Weise wird verhindert, dass das Molekül ein weiteres Mal reduziert werden kann.^[83]

Nach Verseifung von Methylester **43** wurde der Linker als Amid an die Acridineinheit gebunden. Azid **44** erlaubt eine flexible Konjugation der DNA bindenden Einheit, entweder direkt über click Chemie, oder über nucleophile Addition, reduktive Aminierung oder Amidkupplung nach vorheriger Reduktion des Azids in das korrespondierende Amin.

3.1.2.2. Synthese des C₉-funktionalisierten Acridinbausteins **47**

Ausgehend von Acridon **45** wurde ein C₉ funktionalisierter DNA-bindender Baustein synthetisiert. Die zweistufige Synthese ist in Schema 10 dargestellt.

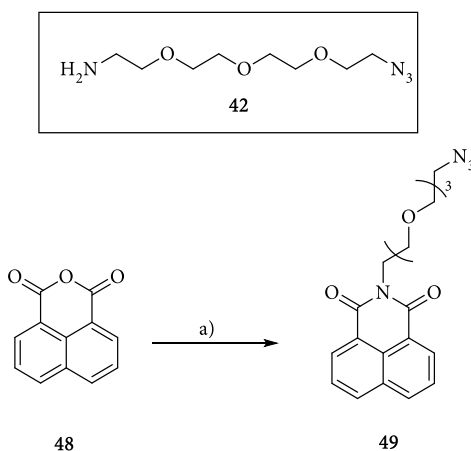


Schema 10: Synthese des Acridin-Derivats **47**. a) SOCl₂, DMF, 80 °C, 2 h, 94 %; b) Phenol, **42**, 50 – 120 °C, 30 min, 90 %.

Die Synthese begann mit der Sulfurylchlorid vermittelten Reduktion von Acridon **45** zum 9-Chloroacridin **46**. Das so eingeführte Chloratom fungiert als Fluchtgruppe in der anschließenden nucleophilen aromatischen Substitution mit Azidoamino-Linker **42**. In einer zweistufigen Synthese wurde der Acridinbaustein **47** in einer Gesamtausbeute von 85 % isoliert.

3.1.2.3. Synthese des Naphthalimid-basierten Bausteins **49**

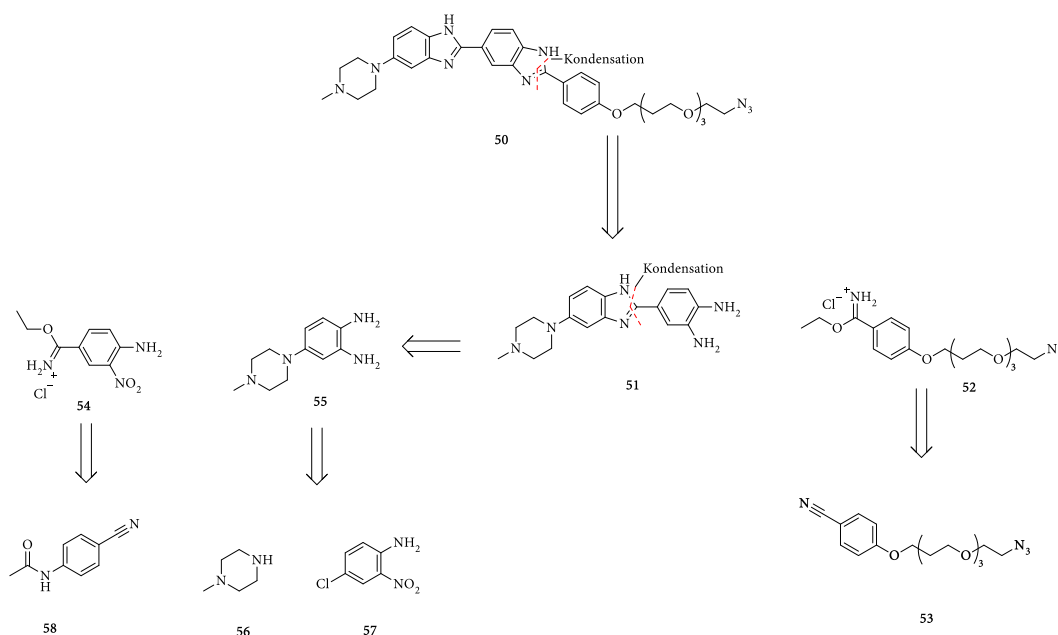
Die Synthese des DNA-bindenden Bausteins mit einem 1,8-Naphthalimid-Grundgerüst **49** erfolgte ausgehend von 1,8-Naphthalinsäureanhydrid **48**. Nach zweifachem nucleophilen Angriff des Azidoamino-Linkers **42** wurde Derivat **49** in einem Schritt und einer Gesamtausbeute von 84 % isoliert. Die Synthese ist in Schema 11 dargestellt.



Schema 11: Synthese des Naphthalinimids 49. a) 42, EtOH, reflux, 2 h, 84 %

3.1.2.4. Synthese des Hoechst-basierten Bausteins 50

Während die Synthese der drei Bausteine 44, 47 und 49 in wenigen Schritten erfolgte, war die Synthese eines konjugierbaren DNA-bindenden Bausteins auf Basis eines Bisbenzimidazols komplexer. Eine erste retrosynthetische Analyse des Moleküls 50 ist in Schema 12 gezeigt.

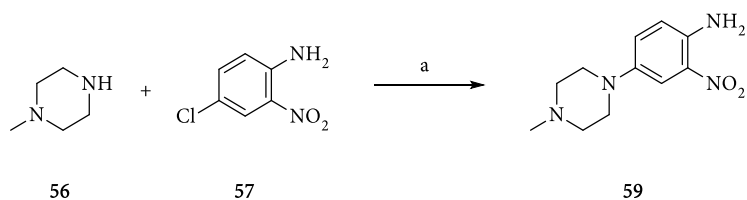


Schema 12: erste retrosynthetische Analyse des Hoechst-Derivats 50.

Der Baustein 50 kann aus einer Kondensation der beiden Bausteine 51 und 52 erhalten werden. Das elektrophile Carboximidat 52 wurde in einer PINNEN-Reaktion, aus dem PEG-funktionalisiertem Hydroxybenzonnitril 53 gewonnen. Die Kondensation des Benzimidazols in Baustein 51 entstand in

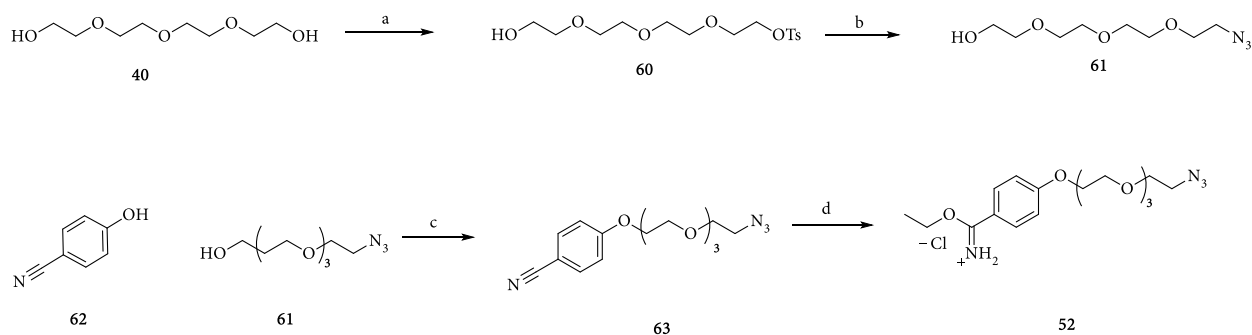
analoger Weise aus den beiden Bausteinen **54** und **55**. **55** wurde in einer nucleophilen aromatischen Substitution aus Nitroanilin **56** mit Methylpiperazin **57** gewonnen. Baustein **54** entstand aus dem Acetylgeschützten *p*-Aminobenzonitril **58** über drei Stufen.

Die Synthese des Bausteins **55** erfolgte in einem Schritt aus dem Nitroanilin **59** und *N*-Methylpiperazin **56** in einer nucleophilen aromatischen Substitution und lieferte den Baustein **55** in 84 % Ausbeute. Diese Reaktion ist in Schema 13 gezeigt.



Schema 13: Synthese des Bausteins **59**. a) K_2CO_3 , DMF, 120 °C, 15 h, 84 %.

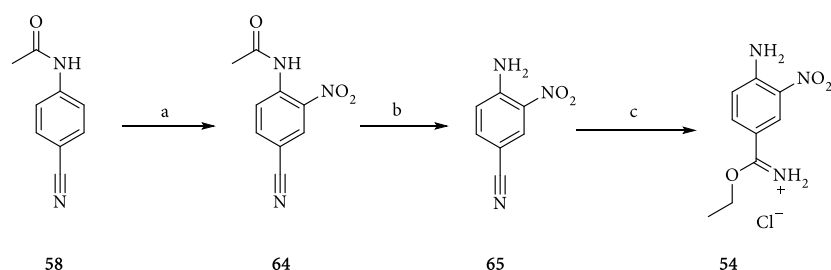
Die Synthese des Bausteins **52** ist in Schema 14 gezeigt.



Schema 14: Synthese des Carboximidats **52**. a) TsCl , Ag_2O , KI , 0 °C, 20 min, 63 %; b) NaN_3 , DMF, 80 °C, 18 h, 96 %; c) PPh_3 , DEAD, THF, 18 h, 0 – RT, 71 %; d) EtOH, HCl (*in situ* Generierung aus NaCl + konz. H_2SO_4), RT, 2 d, 92 %.

Die Sequenz begann mit der Monoazidierung des Tetraethylglykols **40**. Dies erfolgte durch Substitution eines Alkohols nach vorheriger selektiver Monotosylierung. Die Tosylierung erfolgte nach einer von BOUZIDE *et al.* entwickelten Methode zur Monotosylierung symmetrischer Dirole.^[84] Das Tosylat **60** wurde durch Umsatz mit NaN_3 in das Monoazid **61** überführt. Der Alkohol des Azidoalkohol wurde anschließend in einer MITSUNOBU-Reaktion mit Phenol **62** substituiert und in einer abschließenden PINNER-Reaktion in salzsaurer ethanolischer Lösung wurde Carboximidat **52** in einer Gesamtausbeute von 40 % über vier Stufen isoliert.

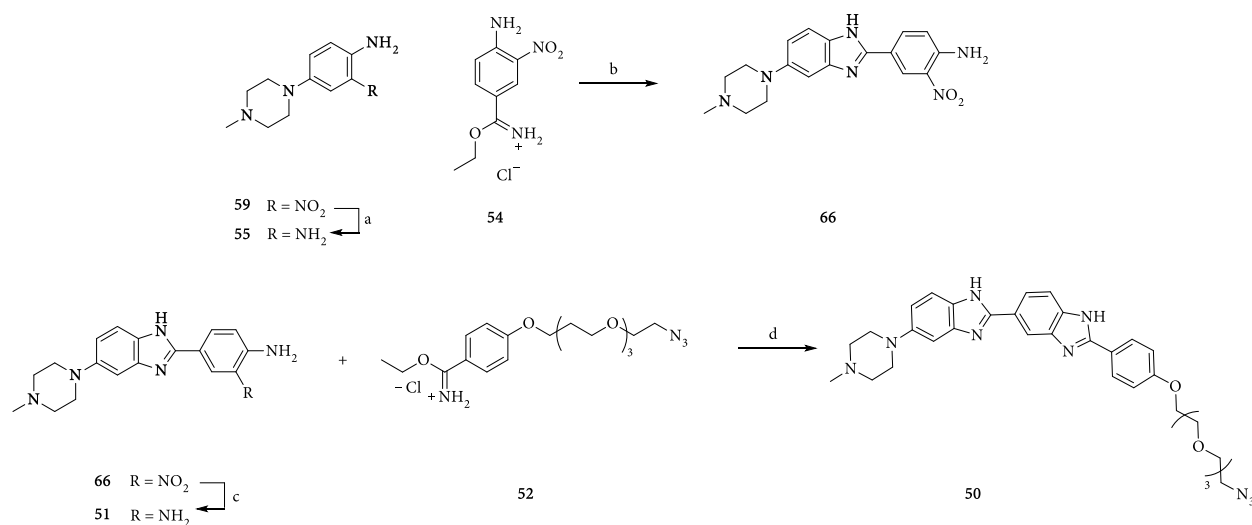
Für die Synthese des Bausteins **54** wurde 4-Cyanoacetanilid **58** zunächst selektiv in der 2-Position durch Umsetzung mit KNO_3 und konzentrierter Schwefelsäure nitriert **64**. Anschließend wurde das Amid durch Umsatz mit einer ein molaren Schwefelsäure unter Rückfluss hydrolysiert **65**. In einer abschließenden PINNER-Reaktion in salzsaurer ethanolischer Lösung wurde Carboximidat **54** in einer Gesamtausbeute von 17 % über 3 Stufen erhalten (Schema 15).



Schema 15: Synthese des Carboximidats **54**. a) KNO_3 , konz. H_2SO_4 , $-15\text{ }^\circ\text{C} - 0\text{ }^\circ\text{C}$, 1h, 48 %, b) H_2SO_4 (aq. 10 %), $100\text{ }^\circ\text{C}$, 45 min, 99 %; c) EtOH, HCl (*in situ* Generierung aus NaCl + konz. H_2SO_4), RT, 7 d, 37 %.

Besonders der letzte Schritt, die PINNER-Reaktion, ist in der Sequenz ein limitierender Faktor. Da nach 7 Tagen Reaktionszeit wurde kein Reaktionsfortschritt mehr beobachtet werden konnte, wurde die Reaktion nach dieser Zeit trotz unvollständigem Umsatzes beendet. Das isolierte Produkt konnte nach Fällung nicht vollständig von unreaktiertem Startmaterial getrennt werden. Ein Grund für die schlechte Ausbeute und die lange Reaktionszeit könnte das Substituierungsmuster des Benzonitrils **65** sein. Durch die beiden elektronenziehenden Substituenten ist das Nitril elektronenarm, was die Protonierung des Stickstoffs erschwert, was dann wiederum den Angriff des Ethanols verhindert. Auf Grund der Hydrolyseempfindlichkeit des Carboximidats **54** wurde auf weitere Reinigungsversuche verzichtet und das Stoffgemisch wurde in der nächsten Stufe verwendet.

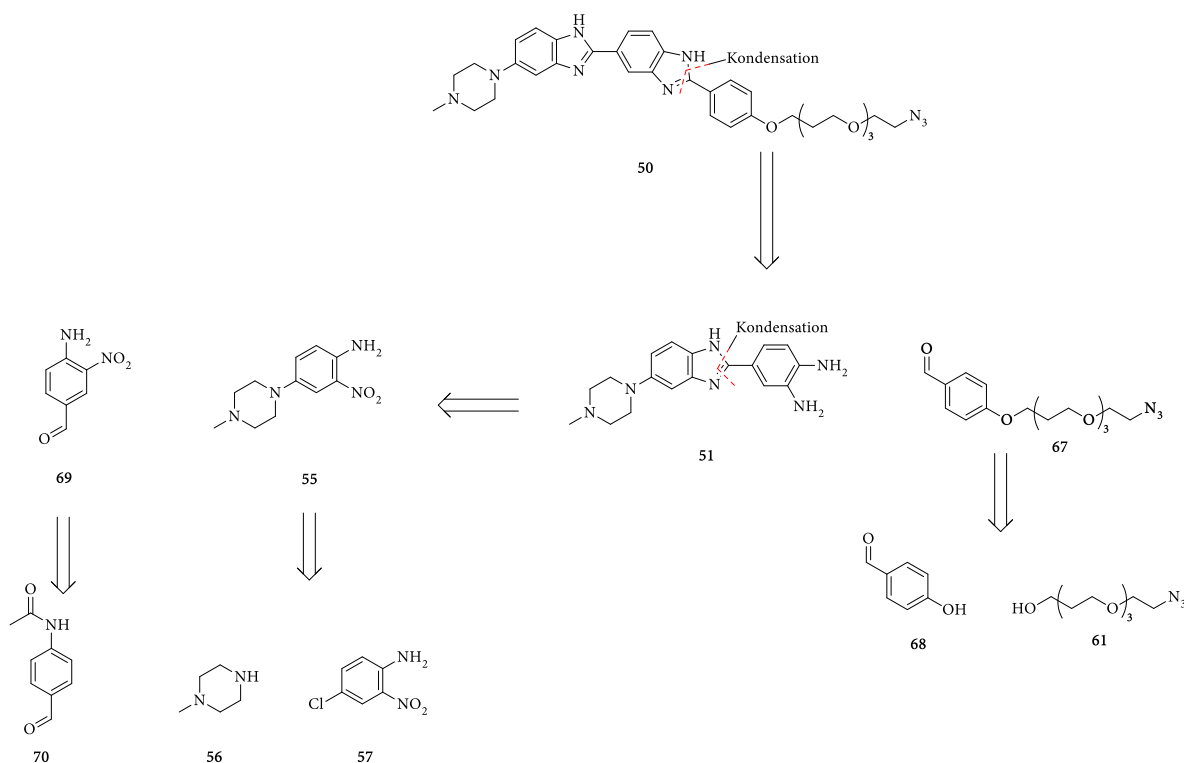
Nachdem die drei Bausteine **52**, **54** und **59** erfolgreich synthetisiert wurden, wurden sie nun in den abschließenden Transformationen zu den Benzimidazolen kondensiert. Die abschließenden Schritte zum Hoehchst-Derivat **50** sind schematisch in Schema 16 dargestellt.



Schema 16: Kondensation der drei Bausteine 55, 54 und 51 zum Hoechst-Derivat 50. a) H₂, Pd/C (10 %), EtOAc/CH₃OH (4/1), 2 h, RT, 97 %; b) AcOH/EtOH (1/2), 18 h, 85 °C, 18 h, 19 %; c) H₂, Pd/C (10 %), CH₃OH, 2 h, RT, quant.; d) AcOH/EtOH (1/2), 18 h, 85 °C, 18 h, 19 %.

Für die Kondensation des 1,2-Anilins 55 mit Carboximidat 54 wurde zunächst die Nitrogruppe in 59 in einer palladiumkatalysierten Hydrierung reduziert. Die folgende Kondensation erfolgte in essigsaurer ethanolischer Lösung und lieferte das Benzimidazol 66. Die Kondensation zum Bisbenzimidazol 50 erfolgte in einer analogen Synthesesequenz. Das finale Produkt wurde über 11 Stufen in einer Gesamtausbeute von 0,2 % erhalten.

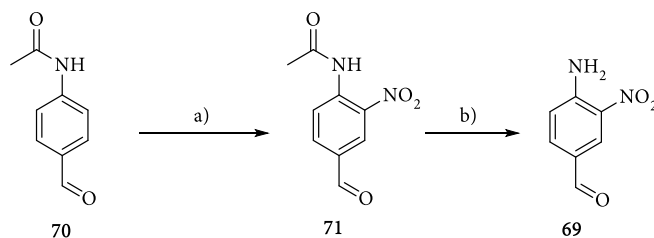
Mit der hier gezeigten Synthese war es zwar möglich den gewünschten Vorläufer 50 zu synthetisieren, jedoch zeigte sie Schwächen. Zum einen ist da die zeitaufwendige und wenig ergiebige PINNER-Reaktion von Nitril 65 zu nennen und zum anderen die geringen Ausbeuten der beiden Kondensationen zu den Benzimidazolen 66 und 50. Da auf diesem Reaktionswege nur geringe Mengen (< 50 mg) des gewünschten Produkts isoliert werden konnten, wurde versucht eine effizientere Synthesestrategie zu entwickeln. Eine alternative Retrosynthese von 50 ist in Schema 17 gezeigt.



Schema 17: zweite retrosynthetische Analyse des Hoechst-Derivats 50.

Die Benzimidazole 50 und 51 entstehen in Kondensationsreaktionen. Im Unterschied zum Carboximidat des ersten Ansatzes, wird in diesem Ansatz ein Aldehyd in der Kondensation angegriffen. Der PEG-funktionalisierte Aldehyd 67 wurde aus 4-Hydroxybenzaldehyd 68 und dem Azidoalkohol 61 erhalten. Benzimidazol 51 wurde in analoger Weise aus den beiden Bausteinen 69 und 55 erhalten. 55 wurde in gleicher Weise wie im ersten Ansatz bereits beschrieben erhalten und Baustein 69 wurde aus dem Acetylgeschützten 4-Acetamidobenzaldehyd 70 erhalten.

Die Synthese des Aldehydbausteins 69 ist schematisch in Schema 18 gezeigt.



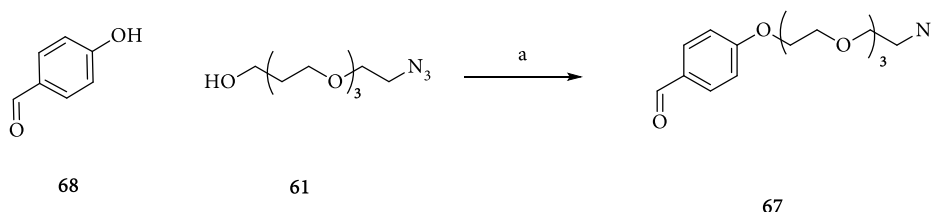
Schema 18: Synthese des Bausteins 69. a) siehe Tabelle 5; b) H_2SO_4 (aq. 10 %), 100 °C, 90 min, 96 %

Die Sequenz verlief ähnlich zu der beschriebenen Synthese des Nitritls **65** des ersten Ansatzes. Begonnen wurde mit der Nitrierung von 4-Acetamidobenzaldehyd **70**. Dafür wurden die Bedingungen in Tabelle 5 getestet. Es zeigte sich, dass lediglich die Verwendung von rauchender Salpetersäure zusammen mit konzentrierter Schwefelsäure bei 0 °C (Eintrag III) Umsatz lieferte. Nach Hydrolyse des Amids wurde der Baustein **69** in zwei Schritten in 56 % Ausbeute erhalten.

Tabelle 5: Bedingungen für die Nitrierung des Aldehyds **70**.

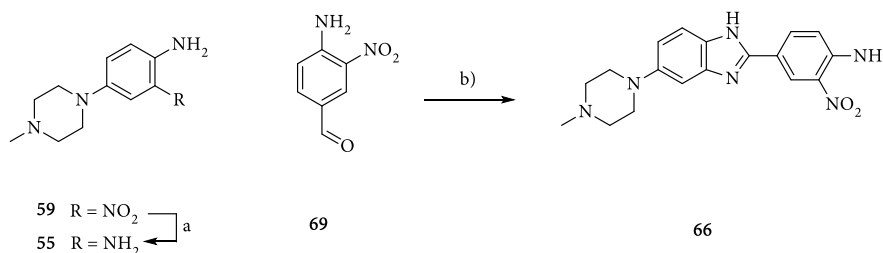
Eintrag	Bedingungen	Ergebnis
I	KNO ₃ , konz. H ₂ SO ₄ , -15 °C – 0 °C	Kein Umsatz
II	H ₂ SO ₄ (konz.), HNO ₃ (rauchend), RT, 1 h	Zersetzung
III	H ₂ SO ₄ (konz.), HNO ₃ (rauchend), 0 °C, 30 min	58 % Ausbeute

Der zweite Aldehyd wurde in einer MITSUNOBU-Reaktion aus 4-Hydroxybenzaldehyd **68** und dem Azidotetraethylglykol **61** dargestellt (Schema 19).



Schema 19: Synthese des Bausteins **67**. a) PPh₃, DEAD, THF, 18 h, 0 °C – RT, 83 %.

Nach bereits beschriebener Hydrierung des Nitroanilins **59** wurden Bedingungen zur Kondensation der beiden Bausteine **55** und **69** zum Benzimidazol **66** getestet (Schema 20). Diese getesteten Bedingungen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

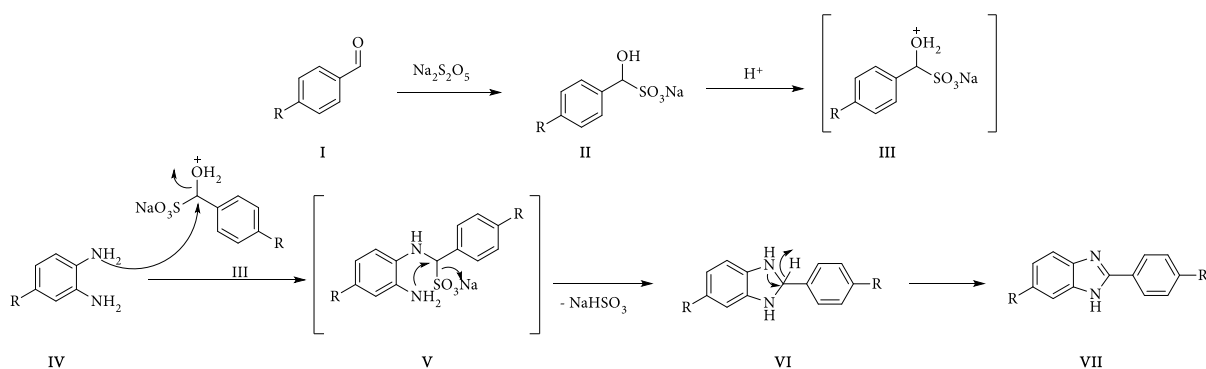


Schema 20: Kondensation der Bausteine **55** und **69** zu Benzimidazol **66**. a) H₂, Pd/C (10 %), EtOAc/CH₃OH (4/1), quant.; b) siehe Tabelle 6

Tabelle 6: getestete Bedingungen für die Kondensation zum Benzimidazol **66**.

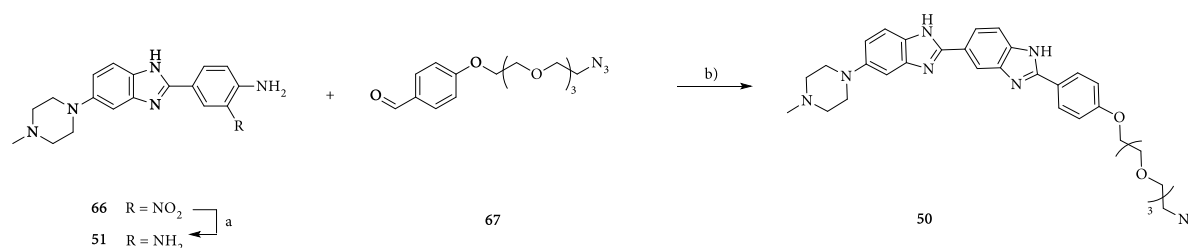
Eintrag	Bedingungen	Ergebnisse
I	1. DMF, 80 °C, 12 h 2. FeCl ₃ , O ₂ , 120 °C, 1h	72 % Ausbeute
II	Na ₂ S ₂ O ₅ , DMF, AcOH, 70 °C, 90 min	63 % Ausbeute
III	PhNO ₂ , 180 °C, 5 h	29 % Ausbeute

Es zeigte sich, dass die Voraktivierung des Aldehyds mit Natriumdisulfit und die thermisch getriebene Kondensation mit anschließender eisenkatalysierter Oxidation vergleichbare Resultate lieferten. Lediglich die gänzlich thermisch getriebene Kondensation fällt in den Ergebnissen zurück. Der Mechanismus der Natriumdisulfit katalysierten Oxidation ist in Schema 21 gezeigt.


Schema 21: Allgemeiner Mechanismus der Natriumdisulfit getriebenen Kondensation von 1,2-Dianilinen und Aldehyden zu Benzimidazolen.^[85]

Aldehyd **I** formt in Anwesenheit von Natriumdisulfit das Hydroxysulfonat **II**. Die protonierte Hydroxygruppe **III** wird von Amin **IV** substituiert. Das primäre Amin **V** greift den benzyliischen Kohlenstoff an und formt Dihydrobenzimidazol **VI**, welches nach Hydrideliminierung das Benzimidazol **VII** formt.^[85]

Um das Bisbenzimidazol **50** zu erhalten (Schema 22), wurde zunächst die Nitrogruppe in Benzimidazol **66** in gleicher Weise wie zuvor beschrieben reduziert. Auch für die zweite Kondensation wurden die Bedingungen getestet. Diese sind in Tabelle 7 aufgeführt.



Schema 22: Kondensation der Bausteine **51** und **67** zu Bisbenzimidazol **50**. a) H₂, Pd/C (10 %), CH₃OH, quant., b) siehe Tabelle 7.

Tabelle 7: getestete Bedingungen für die Kondensation zum Bisbenzimidazol **50**.

Eintrag	Bedingungen	Ergebnisse
I	1. DMF, 80 °C, 12 h 2. FeCl ₃ , O ₂ , 120 °C, 1h	18 % Ausbeute
II	Na ₂ S ₂ O ₅ , DMF, AcOH, 70 °C, 90 min	64 % Ausbeute
III	PhNO ₂ , 180 °C, 5 h	9 % Ausbeute

Bei der Kondensation zum Bisbenzimidazol **50** lieferten die Bedingungen unter Eintrag II die besten Ergebnisse. Anders als bei der Kondensation zu **66** wurde bei der thermischen Kondensation mit anschließender eisenkatalysierter Oxidation lediglich eine Ausbeute von 18 % erhalten. Da sich aber mit Eintrag II eine gute Alternative anbietet, sollte diese Methode gewählt werden um **50** im letzten Schritt zu synthetisieren.

50 wurde über acht Stufen in 16 % Ausbeute isoliert. Der zweite Syntheseansatz bietet einen deutlich effizienteren Zugang zu **50**. Die Synthese ist zwei Schritte kürzer und bedarf keiner langen Reaktionszeiten. Mit den Aldehyden **67** und **68** als Bausteine wurden gute Elektrophile gefunden, um die Kondensationen zu den entsprechenden Benzimidazolen **66** und **50** in besseren Ausbeuten als im ersten Ansatz zu realisieren.

In diesem Abschnitt wurden die Synthesen der DNA-bindenden Bausteine diskutiert. Die vier dargestellten Bausteine sind in Abbildung 11 gezeigt. Es gelang die Synthesen aller Bausteine so zu optimieren, dass auch über eine mehrstufige Synthese gute Gesamtausbeuten erzielt werden konnten und jeder Baustein im Grammaßstab darstellbar war.

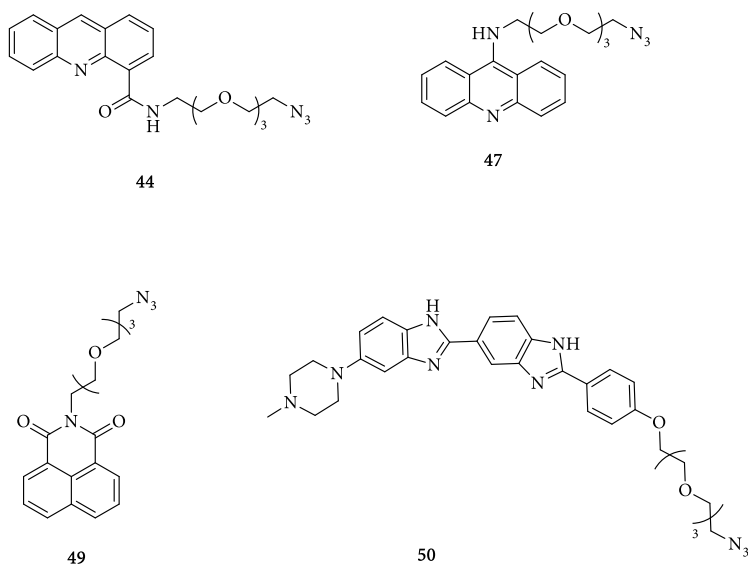
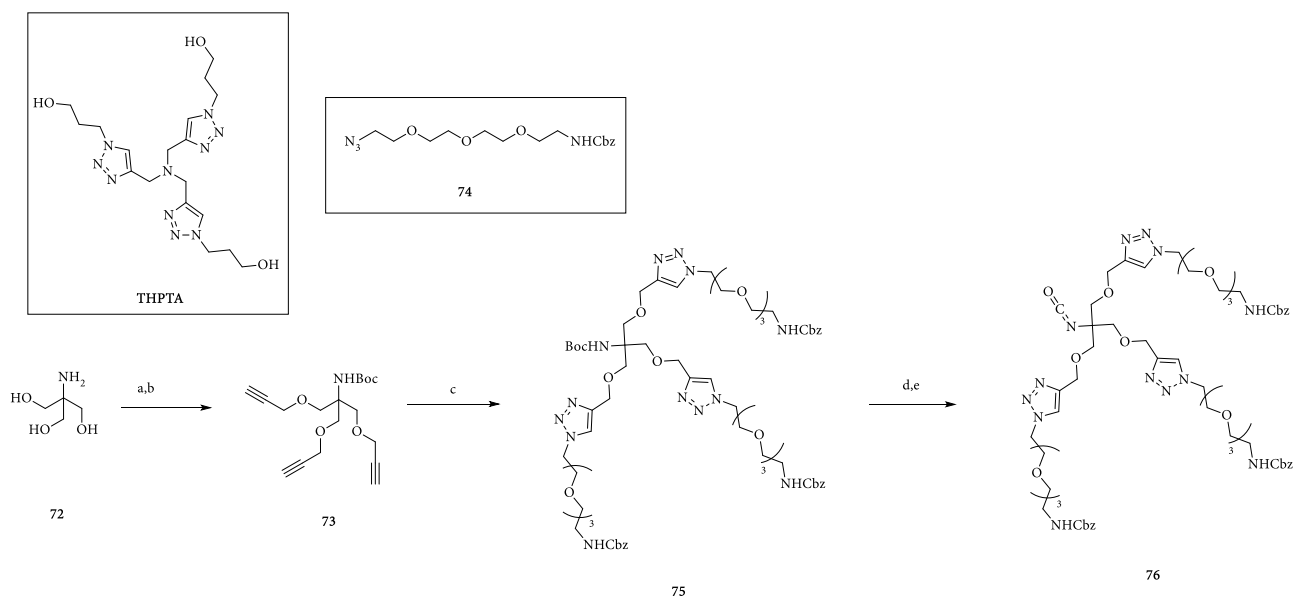


Abb. 11: Strukturen der DNA-bindenden Bausteine 44, 47, 49 und 50.

3.1.2.5. Synthese des TRIS-basierten Linker Systems 76

Wie in Abschnitt 3.1.1 diskutiert, wurden zwei grundsätzliche Designs der Sonden angestrebt. Bei der Synthese aller DNA-bindenden Bausteine wurde die PEG-Kette, die für die einfache Verbindung zwischen DNA-bindender Einheit und *tracer* vorgesehen ist, bereits in den Synthesen mitberücksichtigt. In diesem Abschnitt soll die Synthese des TRIS-basierten Linkersystems 76 diskutiert werden. Isocyanat 76 bietet ein elektrophiles Zentrum, über das die DNA-bindende Einheit an das Linkersystem gebunden werden kann. Die Synthese von 76 ist in Schema 23 gezeigt.

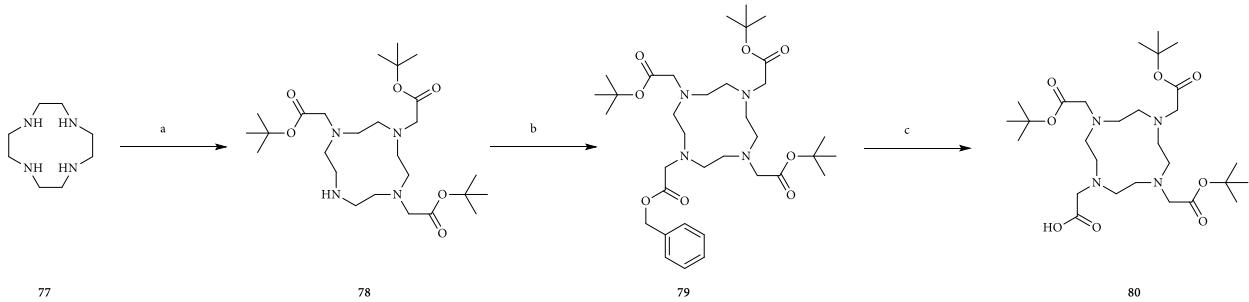


Schema 23: Synthese des Isocyanats **76**. a) Boc₂O, CH₃OH, 96 %; b) Propargylbromid (80 % w/w in PhMe), KOH, DMF, 0 – 37 °C, 4 h, 74 %; c) **74**, CuSO₄ · 5 H₂O, Na-Ascorbat, THPTA, THF/H₂O, 84 %; d) TFA, CH₂Cl₂, RT, 6 h, 89 %; e) Triphosgen, Et₃N, CH₂Cl₂, 95 %.

Das Startmaterial TRIS **72** wurde zunächst Boc geschützt und anschließend mit Propargylbromid und Kaliumhydroxid zum Trialkin **73** umgesetzt. Die Synthese des Azidoamino-Linkers **74** wurde in Abschnitt 3.1.2.1. bereits diskutiert. Für die Synthese des Linkersystems **76**, wurde die Sequenz noch um eine Cbz-Schützung der Aminogruppe erweitert. Über eine anschließende Kuper vermittelte 1,3-dipolare Cycloaddition wurden die PEG-Ketten eingeführt **75**. Nach anschließender Boc Entschützung und Oxidation des Amins unter Verwendung von Triphosgen wurde das Isocyanat **76** in 40 % Ausbeute über 8 Schritte erhalten.

3.1.2.6. Synthese des DOTA-Bausteins **80**

Der letzte Baustein für die Synthese der Sonden ist die chelatisierende DOTA-Einheit. Die Sequenz zur Synthese des Bausteins ist in Schema 24 gezeigt.

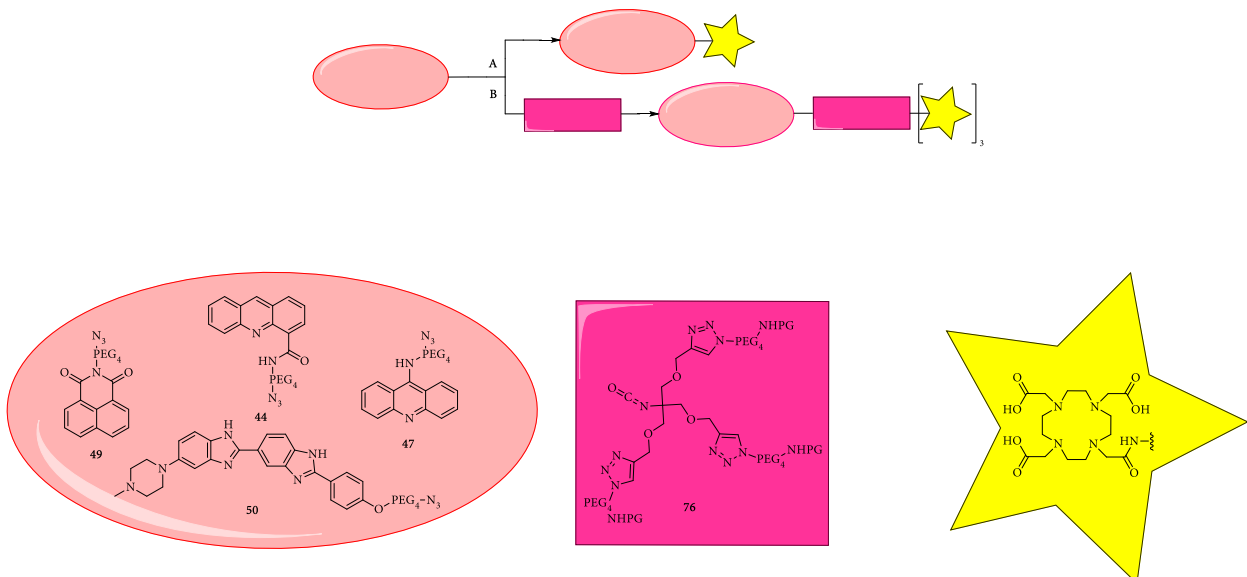


Schema 24: Synthese des DOTA-Vorläufers **81**. a) *t*Bu-Bromacetat, NaOAc, DMA, 0 °C - RT, 48 h, 73 %; b) Bn-Bromacetat, K₂CO₃, DMA, 70 °C, 15 h, quant.; c) H₂, Pd/C (10 %), CH₃OH, RT, 2 h, quant.^[86]

Zunächst wurde Cyclen **77** unter Verwendung von Natriumacetat als Base dreifach mit *tert*-Butylbromoacetat alkyliert. Die vierte Alkylierung erfolgte K₂CO₃ mediiert mit Benzylbromoacetat und nach Hydrierung des Benzylesters unter Verwendung von 10 % Pd auf Aktivkohle wurde der DOTA-Vorläufer **80** in drei Schritten in einer Ausbeute von 73 % erhalten.

3.1.2.7. Konjugation der Bausteine zu DNA-bindenden Sonden

Nach erfolgreicher Synthese der einzelnen Bausteine, sollten diese nun zu den finalen Sonden, wie in Schema 25 gezeigt, synthetisiert werden.

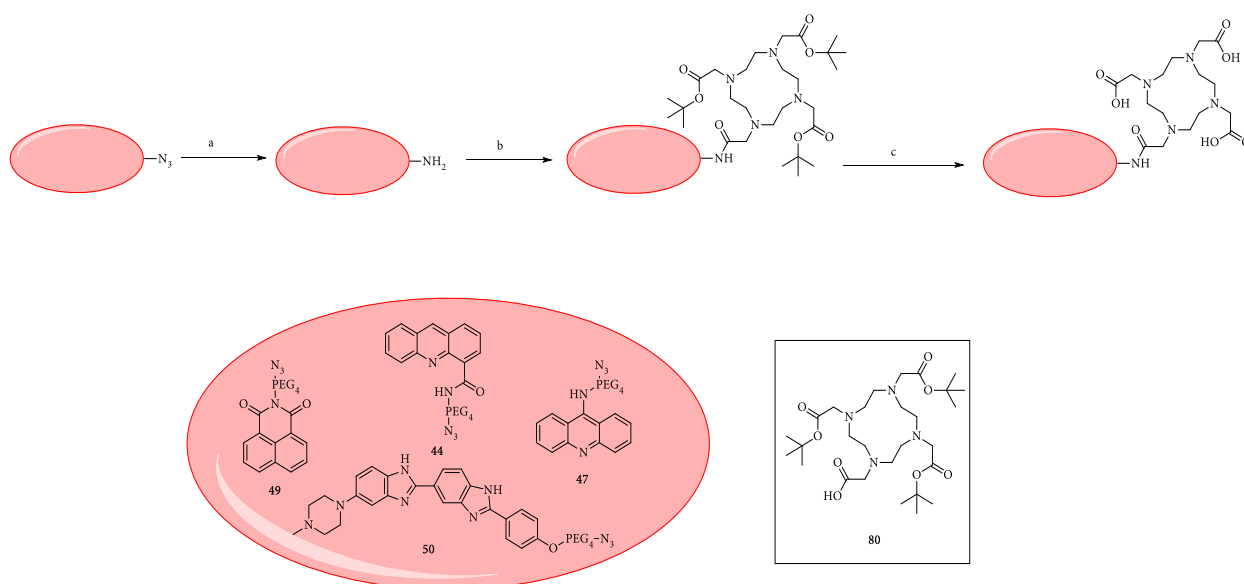


Schema 25: Syntheschema zur Kupplung der einzelnen Bausteine zur fertigen Sonde. Weg A: direkte Konjugation der DNA-bindenden Einheiten mit DOTA; Weg B: Konjugation der DOTA-Einheiten an das TRIS-basierte Linkersystem.

Die DNA-bindenden Einheiten **44**, **47**, **49** und **50** sollten nun in finalen Transformationen zusammengesetzt werden. Dies erfolgte entweder durch direkte Konjugation mit dem *tracer* (Weg A) oder durch vorherige Konjugation der DNA-bindenden Einheit an das polarere Linkersystem **76** und darauf folgender Konjugation des *tracers* (Weg B)

3.1.2.7.1. Synthese der Sonden über Syntheseweg A

Die Kupplung der beiden Fragmente gelang für jede Sonde in einer dreistufigen Sequenz, die in Schema 26 gezeigt ist.



Schema 26: Synthese der Sonden **23** – **26** durch direkte Konjugation der DNA-bindenden Einheiten mit DOTA **80**.
a) PMe_3 (1 M in THF), THF/ H_2O , RT; b) **80**, HATU, DIPEA, DMF, RT, 18 h; c) TFA, CH_2Cl_2 , RT, 18 h.

Zunächst wurden die Azidgruppen der DNA-bindenden Einheiten in einer Trimethylphosphin medierten STAUDINGER-Reaktion zu den Aminen reduziert. Die Verwendung von Trimethylphosphin bietet gegenüber der Verwendung von Triphenylphosphin in der klassischen STAUDINGER-Reaktion den Vorteil, dass sowohl das Reduktionsmittel, als auch das zweite Reaktionsprodukt, Trimethylphosphinoxid, flüchtiger sind, als die höhermolekularen Äquivalente bei der Verwendung von Triphenylphosphin.^[87]

Die so erhaltenen Amine konnten in einer Amidkupplung mit DOTA-Fragment **80** gekuppelt werden und nach abschließender Entschützung der *tert*-Butylester wurden die finalen Sonden **23**, **24**, **25** und **26** erhalten.

Synthese und Evaluierung molekularer PET-Sonden zur Diagnose bakterieller Infektionen

Die final dargestellten Sonden sind zusammenfassend in Abbildung 12 dargestellt. Die Synthese der Sonden lief über 10 – 14 Schritte und gelang in Gesamtausbeuten von 6 – 15 % über die gesamten Synthesen.

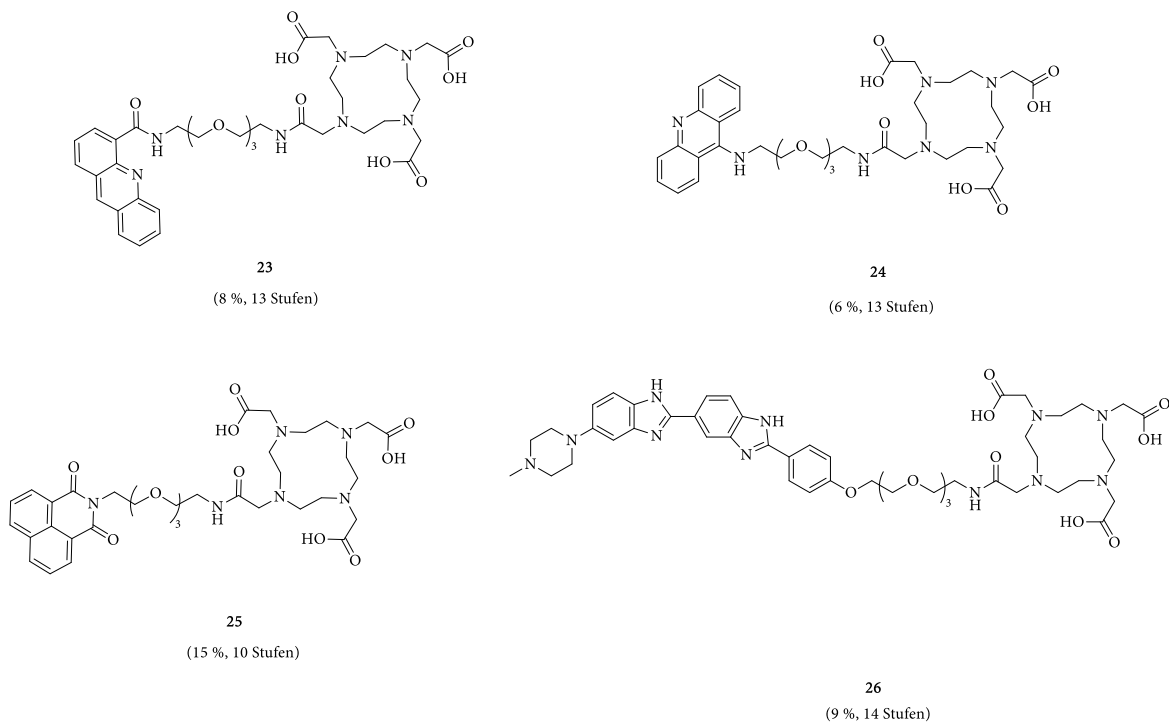
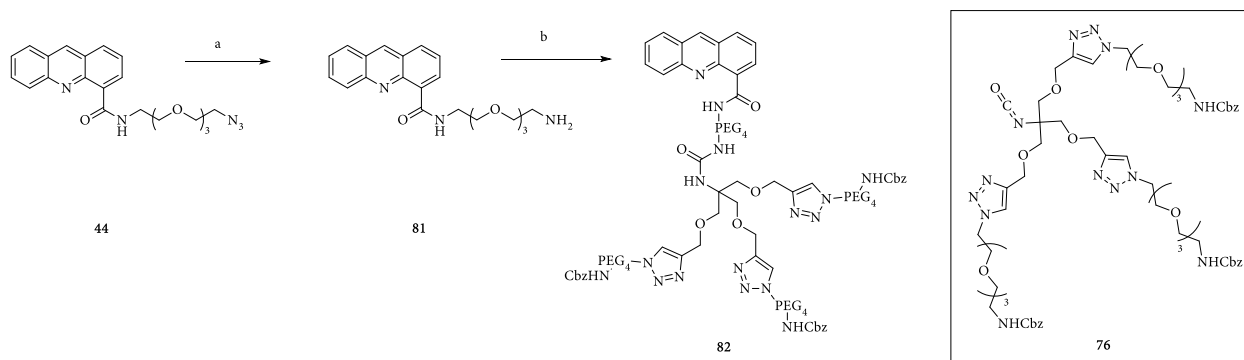


Abb. 12: Strukturen der finalen Sonden 23 – 26, die über Weg A dargestellt wurden.

3.1.2.7.2. Synthese C₄-funktionalisierten Acridin basierten Sonde über Syntheseweg B

Über Syntheseweg B wurde lediglich eine Sonde auf Basis der 9-Acridincarbonsäure Einheit **44** dargestellt. In dieser Synthese sollte die Darstellbarkeit der sterisch anspruchsvolleren Sonde validiert werden.

Schema 27 zeigt die Kupplung der DNA-bindenden Acridineinheit **44** mit dem TRIS-basierten Linkersystem **76**.

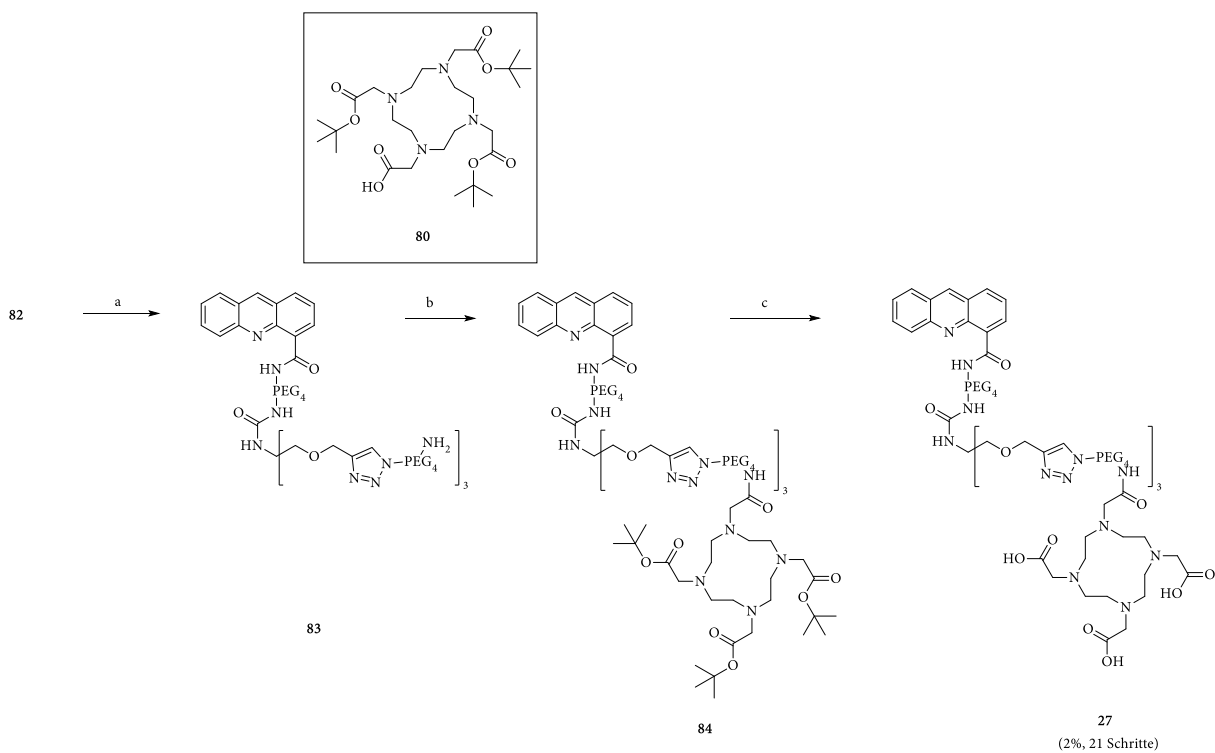


Schema 27: Synthese des gekuppelten Fragments **82** durch Konjugation des Acridin Bausteins **81** mit dem TRIS-basierten Linker-System **76**. a) PMe₃ (1 M in THF), THF/H₂O, RT, 92 %; b) **76**, Et₃N, CH₂Cl₂, RT, 2 h, 76 %.

Zunächst wurde in einer STAUDINGER-Reaktion das Azid **44** zu Amin **81** reduziert. In einer anschließenden nucleophilen Addition an den TRIS-Baustein **76** wurde Harnstoff **82** erhalten.

Die Entschützung der Cbz-Schutzgruppe gelang durch Umsetzung mit 33 % Bromwasserstoff in Essigsäure. DOTA-Fragment **80** wurde an Triamin **83** gekuppelt und nach abschließender Entschützung der *tert*-Butyl Ester wurde Sonde **85** in zwei Schritten in einer Gesamtausbeute von 2 % erhalten. (Schema 28)

Synthese und Evaluierung molekularer PET-Sonden zur Diagnose bakterieller Infektionen



Schema 28: Abschließende Synthesesequenz zur Sonde 27. a) HBr (33 % w/w in AcOH), AcOH, RT, 90 min, quant.; b) **80**, HATU, DIPEA, DMF, RT, 18 h, 31 %; c) TFA, CH₂Cl₂, RT, 18 h, quant.

3.2. Evaluierung der Anwendbarkeit der Sonden

3.2.1. Evaluierung der Anwendbarkeit der Sonden basierend auf fluoreszenten Eigenschaften

Bei der Evaluierung zur Anwendbarkeit der Sonden, wurde ein Vorgehen gewählt, bei dem notwendige Eigenschaften der Sonden zunächst basierend auf ihren fluoreszierenden Eigenschaften validiert oder widerlegt wurden. Die Sonde, die aus diesen Vorexperimenten die besten Resultate versprach, wurde dann für radioaktive Experimente verwendet.

Bei der Evaluierung der Anwendbarkeit wurde folgendes Vorgehen gewählt:

1. Untersuchung der Bindungseigenschaften der Sonden an DNA.

In einem Bindungsassay wurde durch Emissionsmessungen untersucht, ob die DNA-bindenden Eigenschaften der Sonden aufrechterhalten blieben.

2. Untersuchung der Bindungseigenschaften an einen bakteriellen Biofilm.

Nachdem die DNA-bindende Eigenschaft bestätigt waren, wurde untersucht, ob die Bindefähigkeit auch für eDNA in einem Biofilm gilt.

3. Untersuchung der Zellpermeabilität der Sonden in prokaryotische und eukaryotische Zellen.

In Permeabilitätsassays wurde in Vergleichsexperimenten mit Hoechst 33342 (HO 33342) untersucht, ob die Zellpermeabilität durch die gewählten Funktionalisierungen inhibiert werden konnte.

3.2.1.1. DNA-bindende Eigenschaften

Für die Evaluierung der DNA-Bindefähigkeit wurde folgender Versuchsaufbau gewählt: Eine 5 μM Lösung der Verbindung wurde mit einer steigenden Menge DNA (0 – 5 μg) versetzt. Die Lösungen wurden im Absorptionsmaximum der jeweiligen Sonde (Spektren siehe Anhang) angeregt und die Emissionen wurden aufgenommen.

Abbildungen 13 – 15 zeigen die Emissionsspektren der Acridin-basierten Sonden 23, 24 und 27.

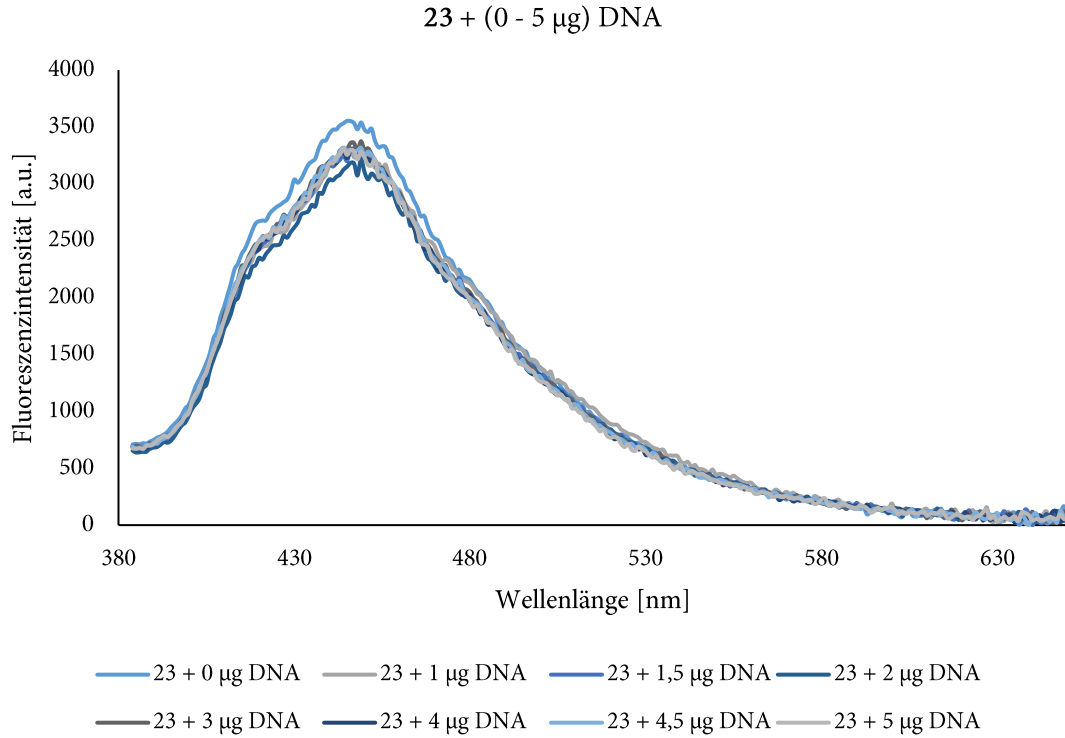


Abb. 13: Emissionsspektren einer 5 µM-Lösung von **23** mit einer steigenden Menge DNA (0 – 5 µg). Ex: 360 nm; Em: 381 – 650 nm. Die Werte repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten.

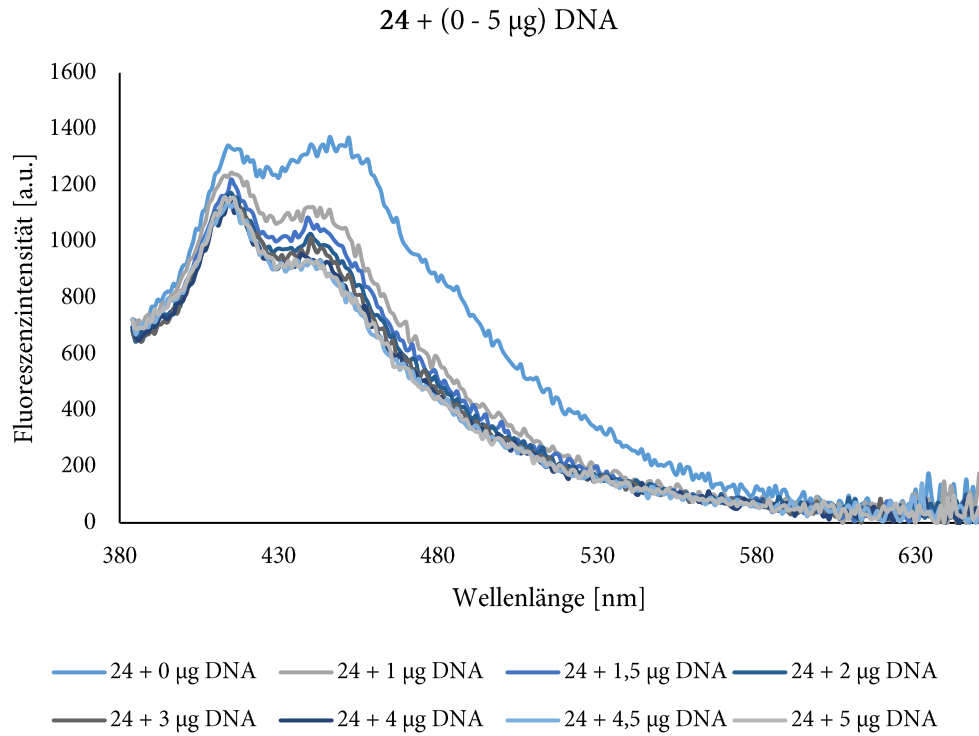


Abb. 14: Emissionsspektren einer 5 µM-Lösung von **24** mit einer steigenden Menge DNA (0 – 5 µg). Ex: 360 nm; Em: 381 – 650 nm. Die Werte repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten.

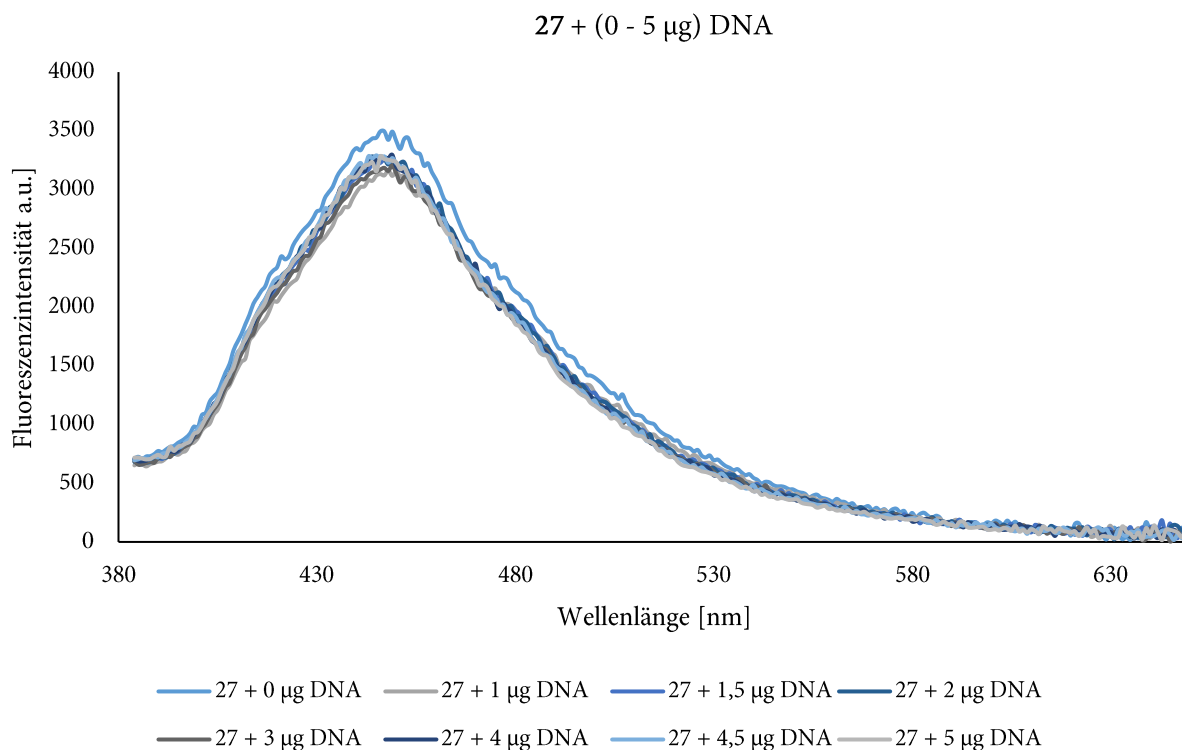


Abb. 15: Emissionsspektren einer 5 µM-Lösung von 27 mit einer steigenden Menge DNA (0 – 5 µg). Ex: 360 nm; Em: 381 – 650 nm. Die Werte repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten.

Obwohl es in den Emissionsmaxima der auf 4-Acridincarbonsäure basierenden Sonden 23 und 27 (Abb. 13 und Abb. 15) leichte Veränderungen gab, so sind diese als nicht signifikant anzusehen. Auf Grundlage dieser Experimente wurde davon ausgegangen, dass die Funktionalisierung des Acridingerüsts das Molekül sterisch überfrachtet, so dass die Acridineinheit nicht mehr eine Konfiguration einnehmen kann, aus der DNA gebunden werden kann. Es ist denkbar, dass eine Veränderung des Linkers, der Linkerlänge oder des Chelators zu einer Verbesserung der Bindungseigenschaften führt, jedoch wurde dies nicht weiter untersucht.

Die Spektren der an C₉-funktionalisierten Sonde 24 (Abb. 14) zeigen neben einer konzentrationsabhängigen Signalminimierung auch einen bathochromen Effekt. Da diese Effekte jedoch nicht sehr stark ausgeprägt sind, wurde von einer schwachen Bindung der Sonde an DNA ausgegangen.

Abbildung 16 zeigt die Emissionsspektren der Naphtahlimid-basierten Sonde 25.

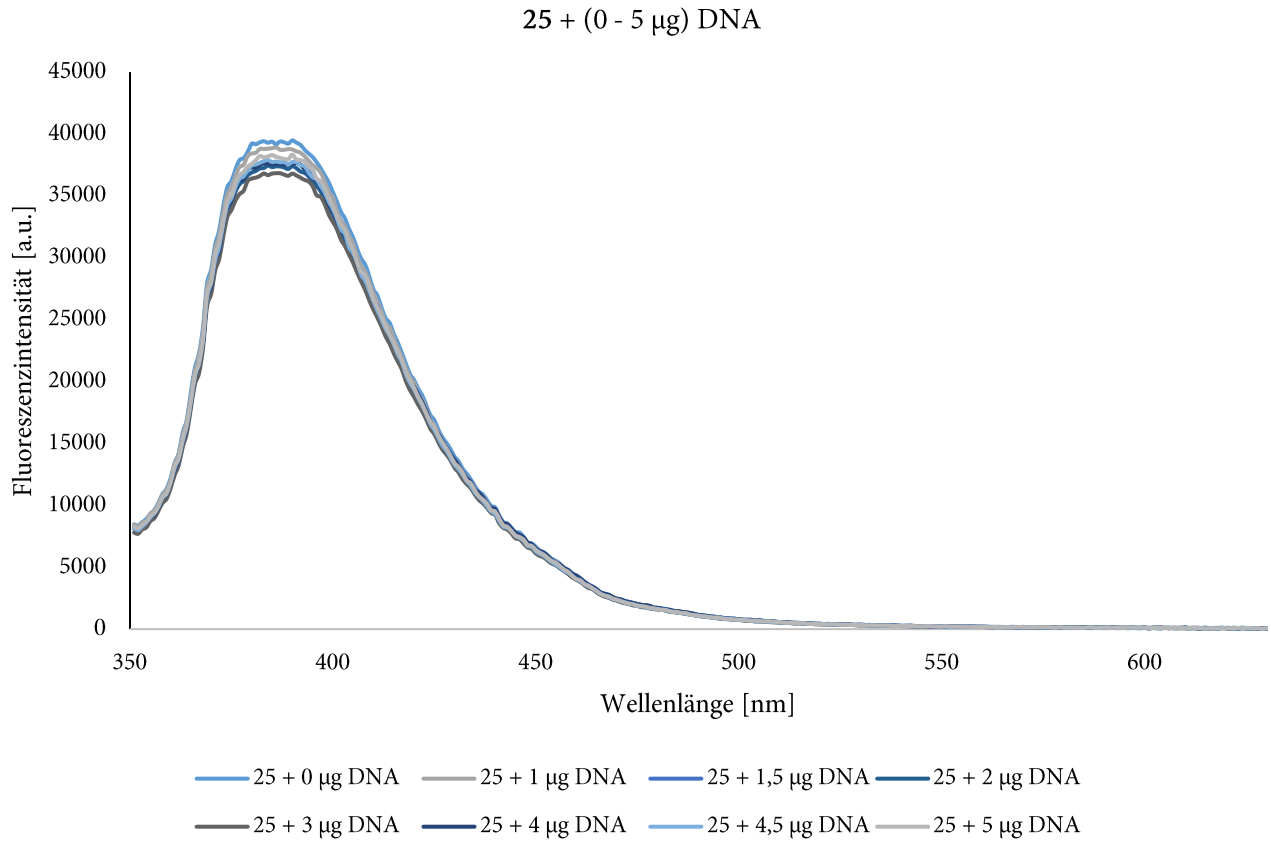


Abb. 16: Emissionsspektren einer 5 µM-Lösung von 25 mit einer steigenden Menge DNA (0 – 5 µg). Ex: 330 nm; Em: 351 – 650 nm. Die Werte repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten.

Das Ergebnis der Bindungsexperimente der Naphthalimid-basierten Sonde 25 zeigt, ähnlich zu den 4-Acridincarbonsäure basierten Sonden, keine signifikanten Veränderungen im Emissionsverhalten, so dass auch für diese Sonde keine DNA-bindende Eigenschaft angenommen wurde. Auch in diesem Fall wurden keine weiteren Experimente mit weiteren Naphthalimid-basierten Soden unternommen.

Abbildung 16 zeigt die Emissionsspektren der Hoechst-basierten Sonde 26.

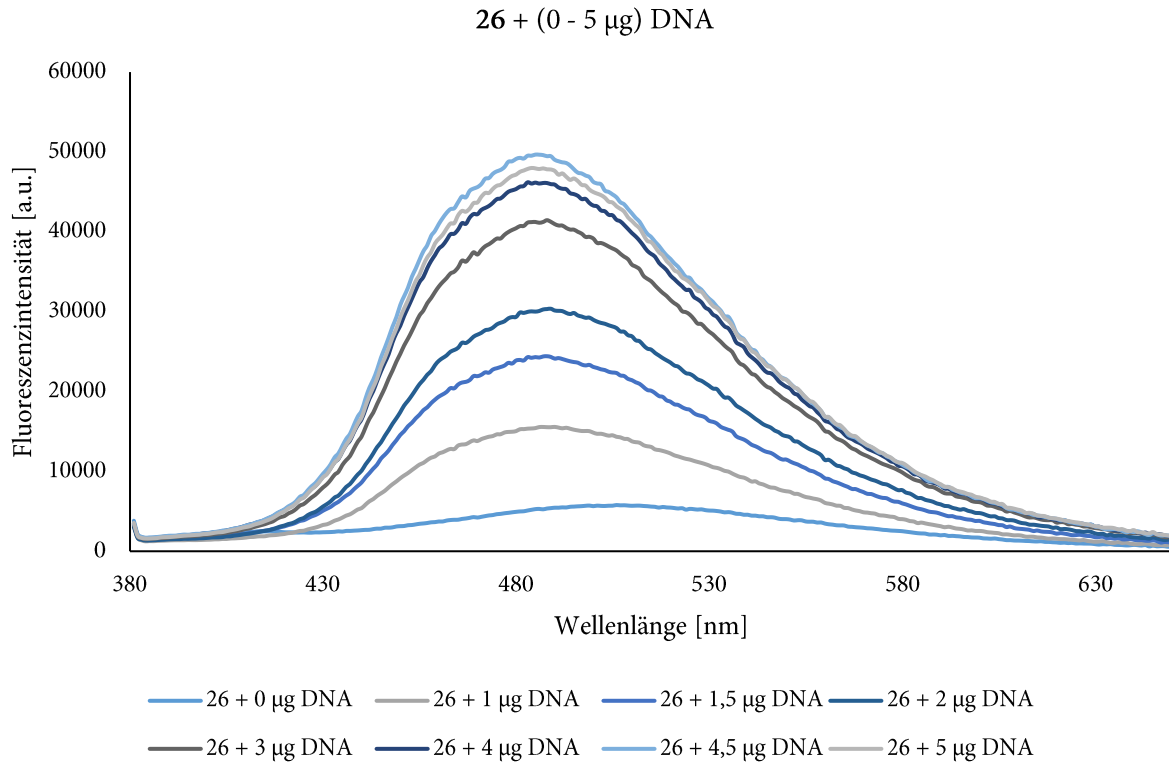


Abb. 16: Emissionsspektren einer 5 µM-Lösung von **26** mit einer steigenden Menge DNA (0 – 5 µg). Ex: 360 nm; Em: 381 – 650 nm. Die Werte repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten.

Die Spektren der Hoechst-basierten Sonde **26** zeigen eine sehr deutliche hypochrome Signalintensivierung. Das Emissionsmaximum verschiebt sich von 506 nm im unkonjugierten Zustand auf 488 nm nach Zugabe von DNA. Die Emissionsintensität nimmt bei der Zugabe von 5 µg DNA um den Faktor 10 zu. Auf Grund der deutlicheren Veränderung im Emissionsverhalten wurde für Sonde **26** ein stärkere DNA-Bindefähigkeit angenommen, als für Sonde **24**. Darum wurde entschieden die folgenden Experimente mit der Hoechst-basierten Sonde **26** durchzuführen.

3.2.1.2. Bindungseigenschaft der Sonde 26 an einen bakteriellen Biofilm

Sonde 26 zeigte in den DNA-Bindungsexperimenten die besten Resultate und darum wurden Experimente zur Bestimmung der Bindefähigkeit an einen bakteriellen Biofilm mit diesem Derivat durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurde ein *P. fluorescens* Biofilm in einer 96-Well Platte gezüchtet. Der Biofilm, sowie ein leeres Well als Negativkontrolle wurden mit 26 (50 μM) inkubiert, gewaschen und der Rückstand wurde in Ethanol gelöst. Der Rückstand wurde auf seine optischen Eigenschaften untersucht. Die beiden dazugehörigen Spektren sind in Abbildung 17 gezeigt.

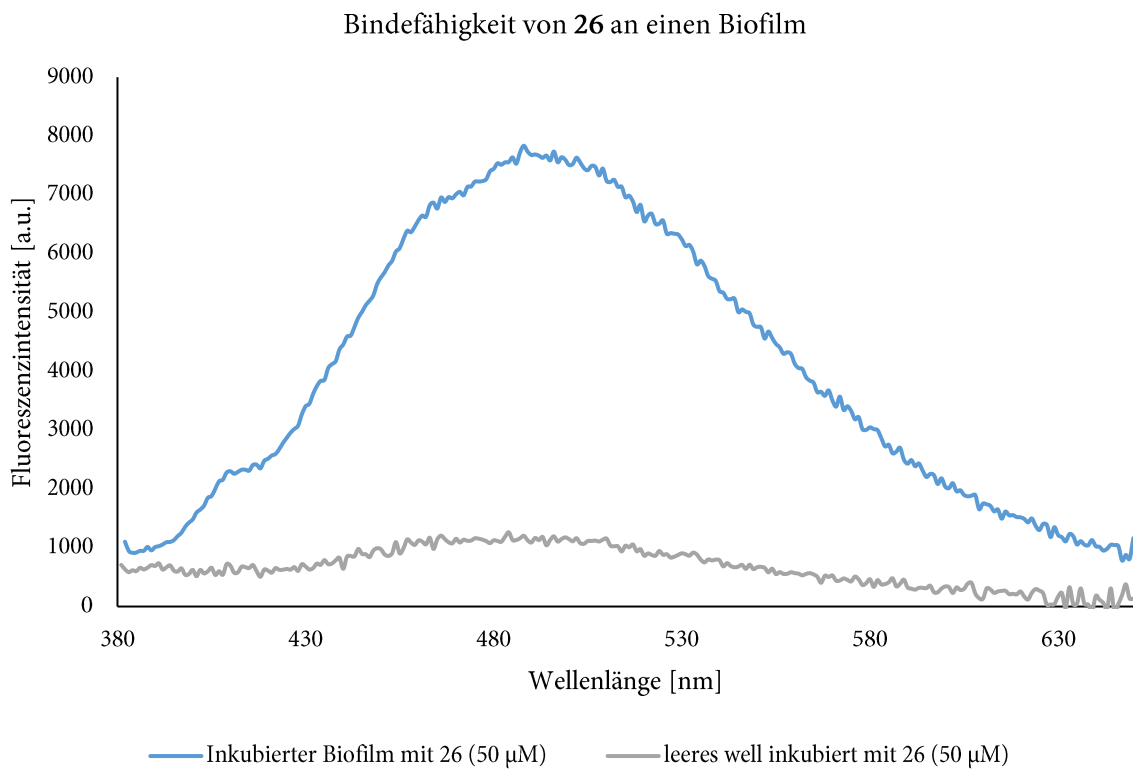


Abb. 17: Emissionsspektren der gelösten Rückstände von mit 26 (50 μM) inkubierten Wells; dunkel: mit einem Biofilm bewachsen, hell: leer. Ex: 360 nm; Em: 381 – 650 nm. Die Werte repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten.

In den Spektren ist zu sehen, dass die Emission des Rückstands aus dem bewachsenen Wells deutlich erhöht ist, gegenüber dem, des leeren Wells. Da in beide Wells die gleiche Stoffmenge gegeben wurde, ist den Spektren zu entnehmen, dass im Falle des bewachsenen Wells nach dem Waschen mehr Verbindung verblieben ist, als in dem leeren. Erklären lässt sich dies durch die Bindung der Sonde 26 an die vorhandene DNA.

Um sicherzustellen, dass dieser Effekt ausschließlich auf Wechselwirkung mit der eDNA des Biofilms beruht und nicht darauf, dass die Sonde den Biofilm penetriert und von den Bakterien internalisiert wird, wurde ein weiteres Inkubationsexperiment durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden $5 \cdot 10^6$ *P. fluorescens* Bakterien je mit **26** ($5 \mu\text{M}$), sowie mit HO 33342 inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterien gewaschen und lysiert. Das Lysat wurde im Anschluss auf optische Eigenschaften untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 gezeigt.

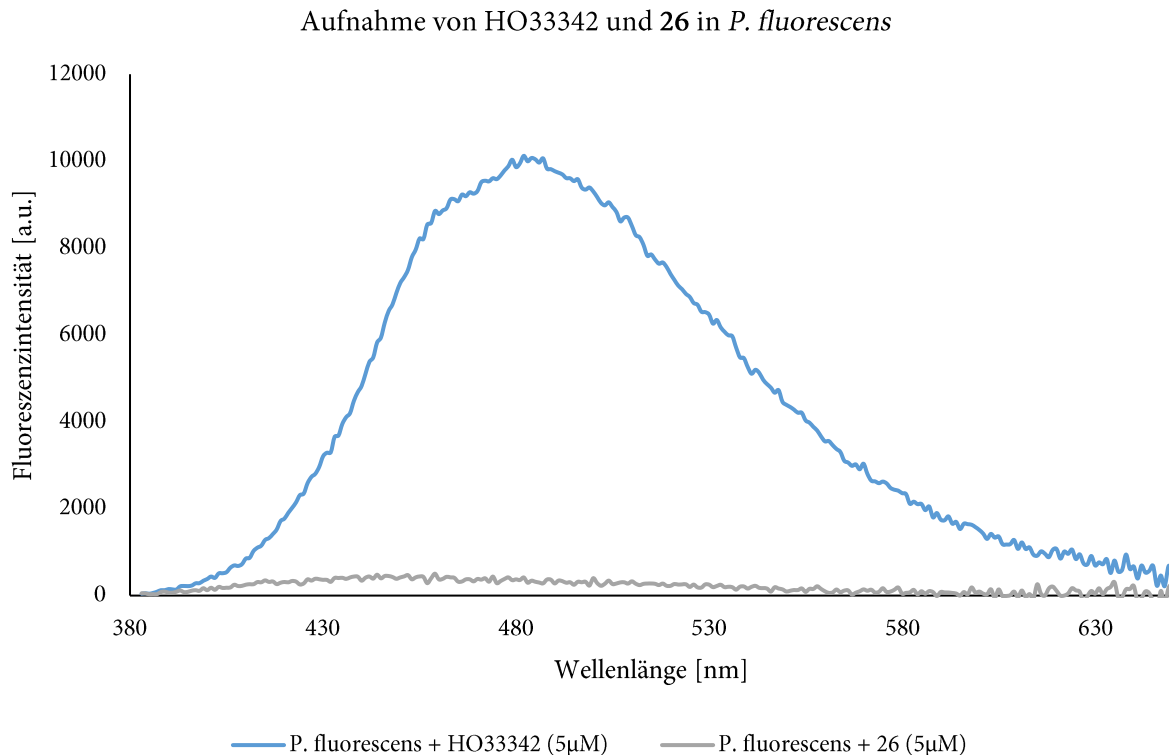


Abb. 18: Emissionsspektren der Zellysate von $5 \cdot 10^6$ *P. fluorescens*-Bakterien inkubiert mit dunkel: HO33342 ($5 \mu\text{M}$) und hell: **26** ($5 \mu\text{M}$). Ex: 360 nm; Em: 381 – 650 nm. Die Werte repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten.

HO 33342 hat bekannte zellpermeable Eigenschaften und schafft es somit die DNA der Bakterien zu markieren.^[63] Dies ist an der deutlichen Emission des mit HO 33342 inkubierten Zellysats zu sehen. Die Emission des Lysats der mit **26** inkubierten Bakterien ist nicht signifikant und somit kann davon ausgegangen werden, dass das Molekül durch seine Funktionalisierung mit dem PEG-Linker und dem Chelator keine zellpermeablen Eigenschaften mehr aufweist.

Die Ergebnisse dieser beiden Experimente zeigen, dass die Sonde **26** geeignet ist um einen bakteriellen Biofilm zu markieren und zu detektieren. Dass die Bindung der Sonde an extrazelluläre DNA erfolgt,

konnte durch die Inkubation von planktonischen Zellen gezeigt werden, in dem keine charakteristische Fluoreszenz des Lysats beobachtet werden konnte.

3.2.1.3. Zellpermeabilität der Sonde 26 in CHO-Zellen

Die Zellimpermeabilität der Sonde 26 wurde an prokaryotischen Zellen gezeigt. Um zu zeigen, dass diese auch für eukaryotische Zellen gilt, wurde in einem ähnlichen Inkubationsexperiment die Zellpermeabilität in CHO-Zellen evaluiert.

Adhärente CHO-Zellen wurden dazu mit HO33342 (5 μ M) und 26 (5 μ M) inkubiert. Nach Entfernen der Inkubationslösung und Waschen der Zellen wurden die verschiedenen inkubierten Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.

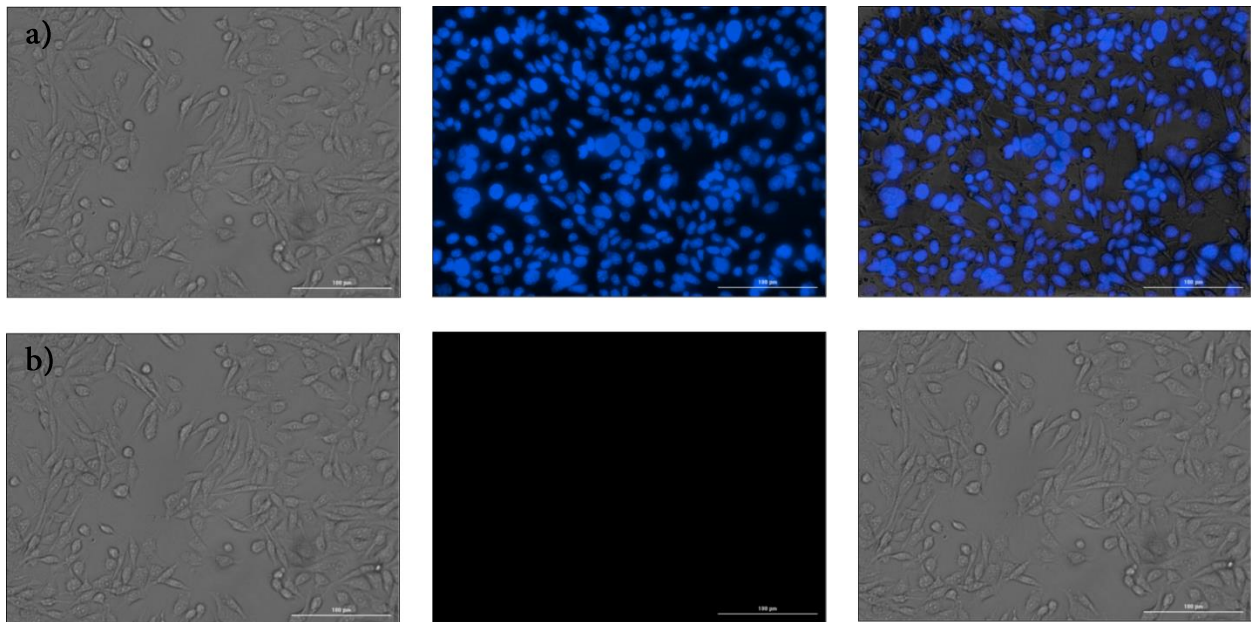


Abb. 19: Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von CHO-Zellen inkubiert mit HO 33342 (a) und 26 (b). Erste Spalte: Hellfeldaufnahmen der Zellen, zweite Spalte: Aufnahmen der Zellen mit einem DAPI-Filter. Dritte Spalte: Fusion beider Aufnahmen.

In der linken Spalte von Abbildung 19 a) sind in der Hellfeldaufnahme einzelne CHO-Zellen zu sehen und unter Verwendung eines DAPI-Filters (mittlere Spalte) die charakteristische Fluoreszenz des Hoechst-Farbstoffs. Werden beide Aufnahmen übereinandergelegt (rechte Spalte), ist zu sehen, dass das

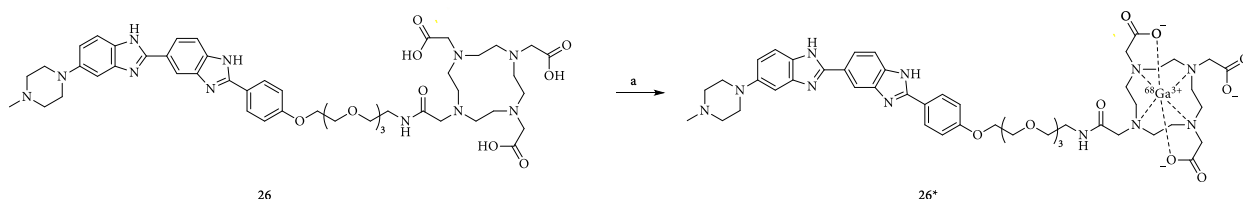
Fluoreszenzsignal innerhalb der Zellen liegt. In der Hellfeldaufnahme von Abbildung 19 b) sind ebenfalls einzelne CHO-Zellen zu erkennen, jedoch ist mit dem DAPI-Filter keine Fluoreszenz zu erkennen, die auf die Anwesenheit des Farbstoffs hindeutet. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Sonde **26** keine Zellpermeabilität in eukaryotische Zellen aufweist.

In diesem Kapitel wurden die synthetisierten Verbindungen schrittweise hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit als eDNA-detektierende Sonde evaluiert. Auf Grundlage der fluoreszierenden Eigenschaften wurde die DNA-bindende Eigenschaft lediglich Sonde **24** und Sonde **26** gezeigt. Für Sonde **26** konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Verbindung an eDNA binden kann und darüber hinaus zellimpermeabel sowohl für eukaryotische als auch für prokaryotische Zellen ist. Es konnte somit gezeigt werden, dass Verbindung **26** alle hinreichenden Kriterien aufweist um als Sonde zur Detektion von bakteriellen Biofilmen genutzt zu werden. Die bis hierhin erhaltenen Ergebnisse basieren auf Fluoreszenzmessungen der Verbindungen. Im nun folgenden Kapitel soll die Validierung der Anwendbarkeit auf Grundlage von Radioaktivität erfolgen.

3.2.2. Evaluierung der Anwendbarkeit der Sonden basierend auf radioaktiven Eigenschaften

3.2.2.1. Radiosynthese der markierten Sonde **26***

Zunächst wurde nach einem etablierten Protokoll die Reaktion in Schema 29 durchgeführt.^[90]



Schema 29: Radioaktive Markierung der Sonde **26***; a) $^{68}\text{GaCl}_3$, HEPES, 100 °C, 10 min, 56 %.

Der Reaktionsfortschritt, sowie die Reinheit des Produkts wurde über mittels HPLC in Kombination mit einem UV-Detektor und einem Radio-Detektor ermittelt. Die entsprechenden Chromatogramme sind in Abbildung 20 dargestellt.

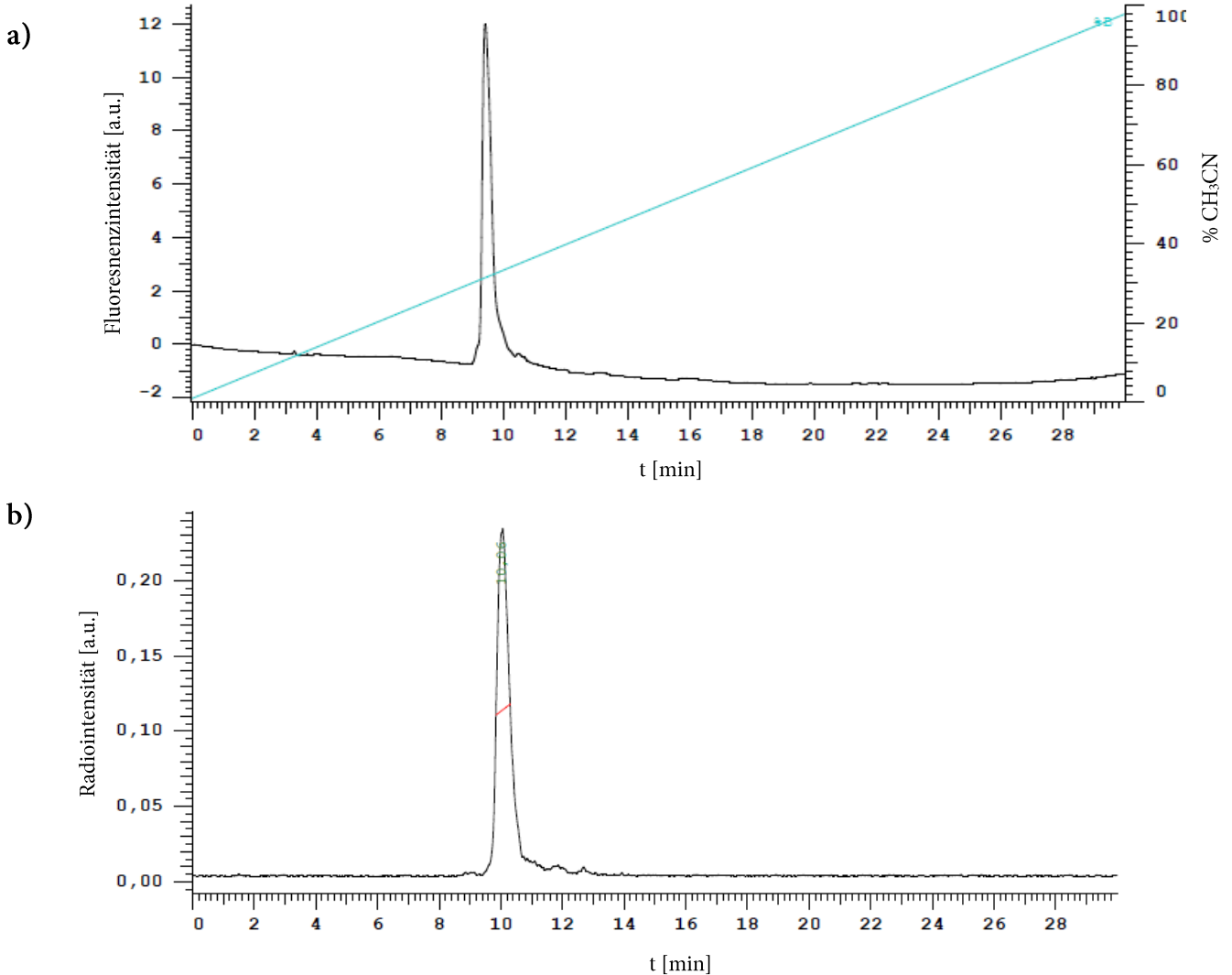


Abb. 20: aufgenommene HPLC-Chromatogramme der Sonde **26** und **26***. a) UV-Spur der unmarkierten Sonde **26**; b) Radio-Spur der markierten Sonde **26***.

Die Charakterisierung des Produkts **26*** erfolgte über zwei separate Messungen. Zunächst wurde die unmarkierte Sonde **26** vermessen. Mittels UV-Detektor konnte sowohl die Reinheit des precursors als auch die Retentionszeit auf der Säule bestimmt werden (Abbildung 20 a)). Die gereinigte Sonde **26*** wurde mit den gleichen Parametern vermessen und die Radioaktivität wurde detektiert (Abbildung 20 b)).

Es ist zu sehen, dass in der Radio-Spur ein *Peak* detektiert wurde, der mit Retentionszeit der unmarkierten Sonde **26** übereinstimmt. Leichte Veränderungen in der Retentionszeit sind zum einen mit dem Aufbau der Anlage zu erklären (der Radiodetektor ist hinter dem UV-Detektor geschaltet) und zum anderen dadurch, dass die markierte Verbindung **26*** ein verändertes Retentionsverhalten aufweist. Eine weitere

Messung mit einem nicht-radioaktiven Galliumkomplex wurde nicht durchgeführt. Die erhaltenen Spektren wurden als hinreichend aussagekräftig interpretiert. Da lediglich ein Radiosignal detektiert wurde, dass basierend auf der Retentionszeit dem gewünschten Produkt zuzuordnen ist, konnte von einer erfolgreichen Synthese der markierten Verbindung **26*** ausgegangen werden. Die Radioausbeute dieser Reaktion betrug über sechs Durchführungen durchschnittlich 56 %.

3.2.2.2. Inkubationsexperimente der radioaktiven Sonde **26***

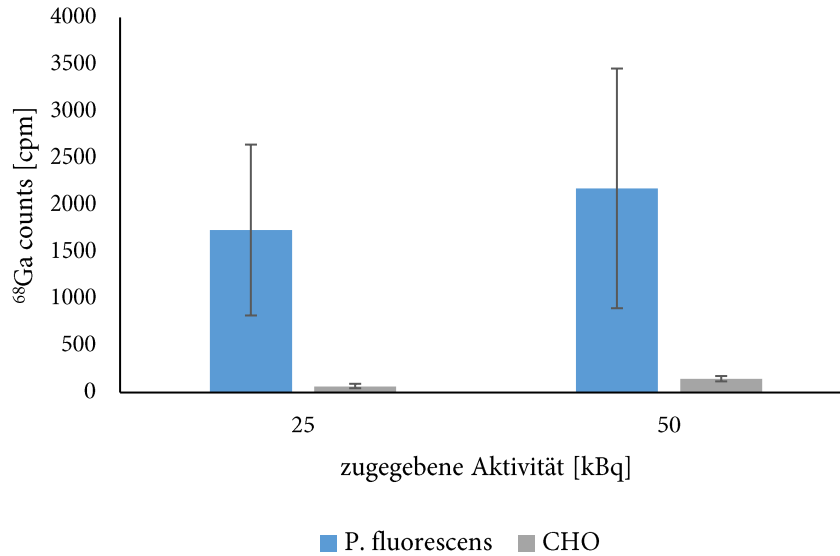
In diesem Abschnitt sollten Experimente durchgeführt werden, mit denen die Ergebnisse, die auf Grundlage der Fluoreszenz erhalten wurden, validiert werden konnten. Dazu wurden Biofilme und eukaryotische Zellen mit gleichen Mengen der Sonde **26*** inkubiert. Das Biomaterial wurde gewaschen und lysiert und die Lysate wurden auf verbliebene Radioaktivität untersucht. Dabei wurde zunächst ein geeigneter Versuchsaufbau gesucht und sobald dieser etabliert war, wurde die Anwendungsbreite der Sonde an verschiedenen Biofilmen und eukaryotischen Zellen evaluiert.

3.2.2.3. Etablierung eines Versuchsaufbaus

1. Ansatz: Kultivierung in einer 96-Well Platte

Für die Experimente wurde zunächst ein Versuchsaufbau gewählt, bei dem ein *P. fluorescens* Biofilm und CHO-Zellen in einer 96-Well Platte gezüchtet wurden. Die Wells wurden je mit einer Aktivitätsmenge von 25 und 50 kBq der markierten Sonde **26*** inkubiert. Zusätzlich wurden leere Wells mit gleichen Aktivitätsmengen befüllt, um die Hintergrundaktivität zu bestimmen. Die detektierten Aktivitäten der Lysate sind in Abbildung 21 dargestellt.

a) aufgenommene Aktivität von Sonde 26* in *P. fluorescens* und CHO-Zellen



b) aufgenommene Aktivität von Sonde 26* in *P. fluorescens* und CHO-Zellen mit Hintergrundaktivität

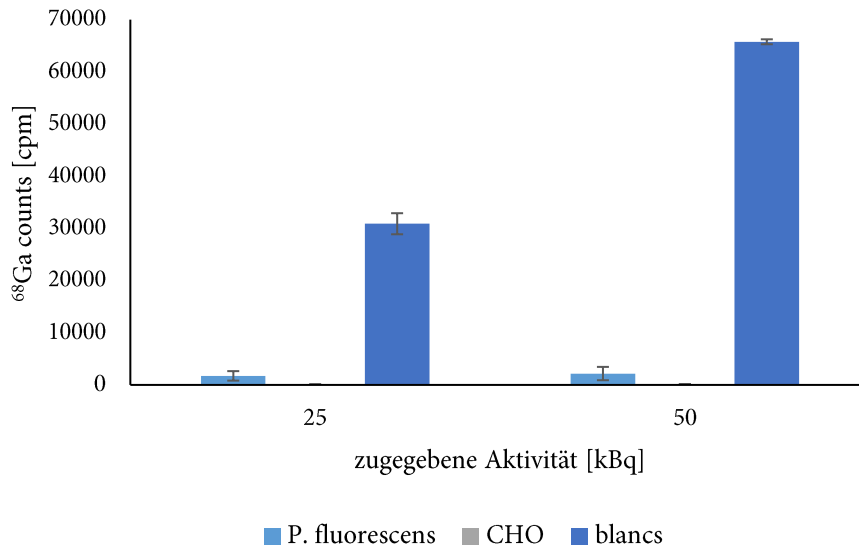


Abb. 21: Detektierte Aktivitäten der Lysate. a) direkter Vergleich der Restaktivität von *P. fluorescens* Biofilmen und CHO-Zellen. Die Standardabweichung ist angegeben; b) Vergleich der Restaktivitäten von *P. fluorescens* Biofilmen und CHO-Zellen sowie der Hintergrundaktivitäten. Die Höhe der Säulen repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten.

Abbildung 26 a) zeigt die detektierten Aktivitäten der Lysate der CHO Zellen und der Biofilme im direkten Vergleich. Im Mittelwert sind die Restaktivitäten der Biofilme um die Faktoren 26 bzw. 14 gegenüber den CHO Zellen erhöht. Dass der gewählte Versuchsaufbau jedoch nicht ideal ist, zeigt sich in Abbildung 21 b). In diesem Graph sind neben den gemessenen Aktivitäten auch die detektierte Hintergrundaktivität aus den leeren Wells abgebildet. Diese übersteigt in beiden Fällen die Aktivität des lysierten Biomaterials deutlich, was eine genaue Interpretation der Messungen nicht möglich macht.

Eine mögliche Erklärung für die hohe Hintergrundaktivität sind Wechselwirkungen der Sonde mit dem Gefäßmaterial der Polystyrolplatte. Es ist anzunehmen, dass Polystyrol durch π -stacking mit dem ausgedehnten π -System der Sonde interagiert und sich so adhäsive Kräfte zwischen Sonde und Gefäßmaterial ausbilden.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde nach einem Testgefäß für die Inkubationsexperimente gesucht, in dem die Wechselwirkungen nicht auftreten. Mikroreaktionsgefäße aus Polypropylen schienen als Gefäßmaterial geeignet. Um dies zu validieren, wurden leere Mikroreaktionsgefäße mit ^{26}Al inkubiert und die Restaktivitäten wurden bestimmt. Die erhaltenen Daten sind in Abbildung 22 gezeigt.

Hintergrundaktivitäten in Mikroreaktionsgefäßen und einer 96 Well Platte

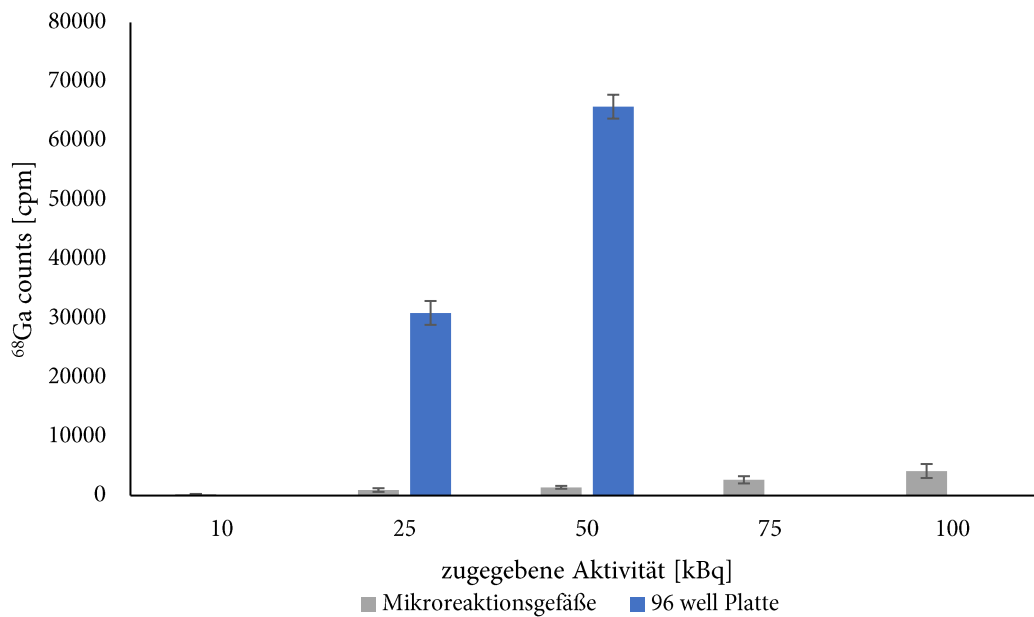


Abb. 22: Vergleich der Hintergrundaktivitäten bei Zugabe verschiedener Aktivitätsmengen in 96-Well Platten aus Polystyrol und Mikroreaktionsgefäßen aus Polypropylen. Die Höhe der Säulen repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten. Die Standardabweichung ist angegeben.

Die Hintergrundaktivität der Polypropylengefäße ist deutlich geringer, verglichen mit der in Polystyrolgefäßen im Experiment zuvor. Die detektierte Aktivität in Polypropylengefäßen ist selbst bei Zugabe der größten Aktivitätsmenge signifikant geringer als im Aufbau in Polystyrolgefäßen. Bei der Zugabe von 25 kBq bzw. 50 kBq, den Aktivitätszugaben, die einen direkten Vergleich erlauben, sind die verbliebenen Aktivitäten um den Faktor 30 – 50 reduziert. Es zeigte sich, dass nur geringe Mengen der Sonde **26*** als Rückstand in den Mikroreaktionsgefäßen blieb und diese somit ein geeignetes Gefäß sind, um weitere Experimente in ihnen durchzuführen. Das Protokoll für die Züchtung eines Biofilms ließ sich adaptieren, um einen Biofilm in einem Mikroreaktionsgefäß wachsen zu lassen. Da die Gefäße allerdings ungeeignet sind um eukaryotische Zellen adhäsiv wachsen zu lassen, wurden die Zellen aus einer Kultur aliquotiert und für die Zeit des Experiments in Suspension gehalten.

3.2.2.4. Anwendbarkeit der Sonde **26*** an einem *Pseudomonas fluorescens* Biofilm

Das Protokoll für die Züchtung eines Biofilms ließ sich adaptieren, um einen Biofilm in einem Mikroreaktionsgefäß wachsen zu lassen. Da die Gefäße allerdings ungeeignet sind um eukaryotische Zellen adhäsiv wachsen zu lassen, wurden die Zellen aus einer Kultur aliquotiert und für die Zeit des Experiments in Suspension gehalten.

Neben dem optimierten Aufbau, wurde ebenfalls der Umfang des Experiments erweitert.

In diesem Durchgang wurde mit THP-1 Makrophagen eine weitere eukaryotische Zelllinie neben den CHO-Zellen als Vergleichsgröße herangezogen. Wie in Kapitel 1.2. erklärt, werden Makrophagen in der Signalkette der Immunantwort zu dem Ort der Entzündung geleitet und akkumulieren sich dort, sowohl im Falle einer sterilen als auch einer pathogenen Entzündung. Weiterhin haben Makrophagen die Eigenschaft körperfremde Stoffe über Phagozytose aufzunehmen. Um nun sicher zwischen einer sterilen und einer infektiösen Entzündung unterscheiden zu können, ist es wichtig, dass die Sonde auch von Makrophagen nicht in signifikanten Mengen aufgenommen wird. Wäre dies der Fall, könnte nicht mehr zwischen einer sterilen und einer pathogenen Entzündung unterschieden werden. Da in beiden Fällen Makrophagen in der betroffenen Region präsent sind, könnte nicht bestimmt gesagt werden, ob das Signal von einem Biofilm oder von Makrophagen stammt.

Die zweite Erweiterung in diesem Experiment war, dass eine Normierung der absolut gemessenen Aktivitäten auf die vorhandene Biomasse in der Probe vorgenommen wurde. Um eine genaue Aussage über die Selektivität der Aufnahme zu treffen, ist nur die Detektion der absoluten Aktivitäten nicht hinreichend aussagekräftig, da diese allein keine Aussage über die vorhandene Biomasse zulässt. Als Indikator für die Biomasse wurde daher die Gesamtmenge an DNA in jeder Probe photomeTRISch bestimmt (Abbildung 121 und 122, Anhang).

Die dritte Erweiterung in dieser Versuchsreihe war die Untersuchung der prozentual aufgenommenen Aktivitäten. Dies wurde ermittelt, indem die Aktivitäten der Lysate in Relation mit der zugegebenen Aktivität (Abbildung 120, Anhang) gesetzt wurde. Die erhaltenen Ergebnisse des Experiments sind in den Abbildungen 23 – 25 gezeigt.

aufgenommene Aktivität von Sonde 26* in einen *P. fluorescens* Biofilm, THP-1- und CHO-Zellen

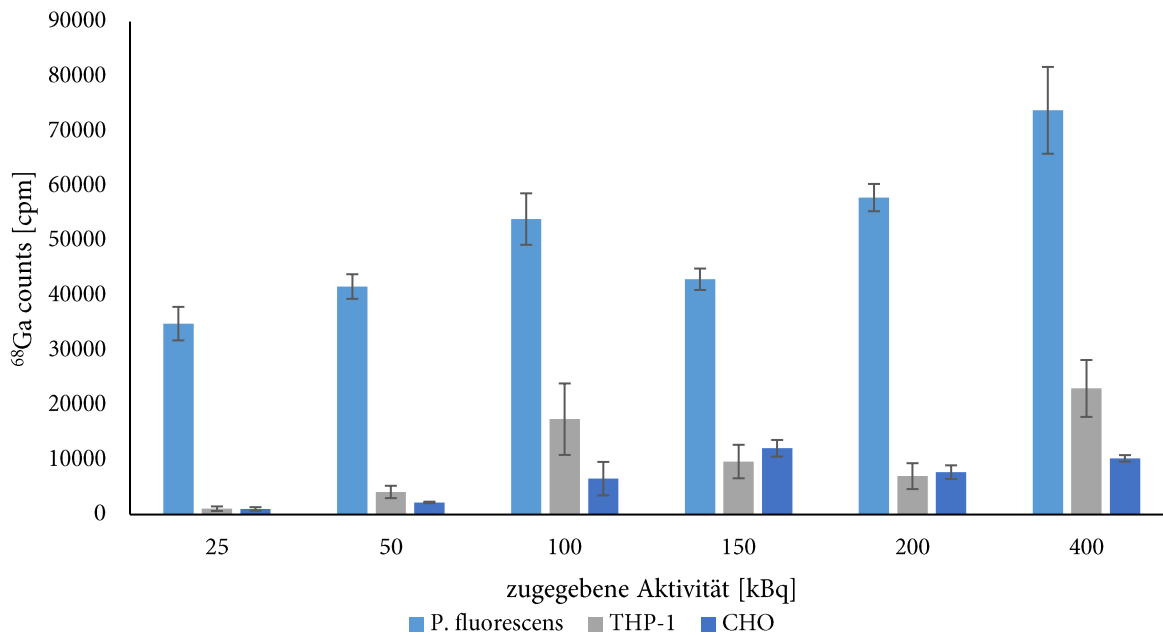


Abb. 23: Vergleich der detektierten Restaktivitäten der Lysate von CHO-Zellen, THP-1-Zellen und *P. fluorescens* Biofilmen bei Zugabe verschiedener Aktivitätsmengen. Die Höhe der Säulen repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten. Die Standardabweichung ist angegeben.

Tabelle 8: Vergleich der detektierten Aktivitäten [^{68}Ga cpm] der Lysate der *P. fluorescens* Biofilme, CHO- und THP-1 Zellen nach Zugabe steigender Aktivitätsmengen.

	25 kBq	50 kBq	75 kBq	100 Bq	200 kBq	400 kBq
<i>P. fluorescens</i> Biofilme	34855 (± 3061)	41630 (± 2244)	53943 (± 4701)	42956 (± 1955)	57864 (± 2493)	73794 (± 7925)
THP-1 Zellen	1064 (± 418)	4124 (± 1127)	17410 (± 6527)	9678 (± 3060)	7012 (± 2365)	23020 (± 5195)
CHO-Zellen	1018 (± 329)	2214 (± 136)	6559 (± 3052)	12098 (± 1519)	7744 (± 1243)	10260 (± 589)

Abbildung 23 und Tabelle 9 zeigen die gemessenen absoluten Aktivitäten der Lysate. Es ist zu sehen, dass die verbliebene Aktivität in den CHO-Zellen in jeder getesteten Aktivität gegenüber den Bakterien reduziert ist. Während die Aktivität bei Zugabe von 25 kBq um die Faktoren 32, bzw. 34 gegenüber den Eukaryoten erhöht ist, ist es bei Zugabe von Aktivitäten von > 50 kBq nur noch eine Erhöhung um die Faktoren 3 – 8. Anhand dieser Daten und den bestimmten DNA-Mengen (Abbildung 122, Anhang) lässt sich nun eine Normierung der aufgenommenen Aktivität auf die Menge an DNA vornehmen. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 24 und in Tabelle 9 dargestellt ist.

Tabelle 9: Vergleich der detektierten Aktivitäten normiert auf die bestimmte Menge DNA [^{68}Ga cpm/ng] in den Lysaten der *P. fluorescens* Biofilme, CHO- und THP-1 Zellen nach Zugabe steigender Aktivitätsmengen.

	25 kBq	50 kBq	75 kBq	100 Bq	200 kBq	400 kBq
<i>P. fluorescens</i> Biofilme	47,8 ($\pm 4,2$)	49,6 ($\pm 2,7$)	89,2 ($\pm 7,8$)	64,3 ($\pm 2,9$)	78,4 ($\pm 3,3$)	93,2 ($\pm 10,0$)
THP-1 Zellen	1,3 ($\pm 0,5$)	4,6 ($\pm 1,3$)	21,2 ($\pm 7,9$)	10,7 ($\pm 3,4$)	7,3 ($\pm 2,5$)	26,5 ($\pm 6,0$)
CHO-Zellen	1,0 ($\pm 0,3$)	2,0 ($\pm 0,1$)	6,2 ($\pm 2,9$)	11,5 ($\pm 1,5$)	7,4 ($\pm 1,2$)	9,6 ($\pm 0,6$)

Die normierten Aktivitäten bestätigt die bevorzugte Bindung der Sonde an den Biofilm. Die ist in allen getesteten Aktivitäten signifikant höher als die Aufnahme in die Zellen. Auffallend ist, dass sich beim Vergleich der beiden eukaryotischen Zellen zeigt, dass die Aufnahme in die Makrophagen erhöht ist, gegenüber der Aufnahme in die CHO Zellen. Dies lässt sich mit den phagozytotischen Eigenschaften der THP-1 Zellen begründen.

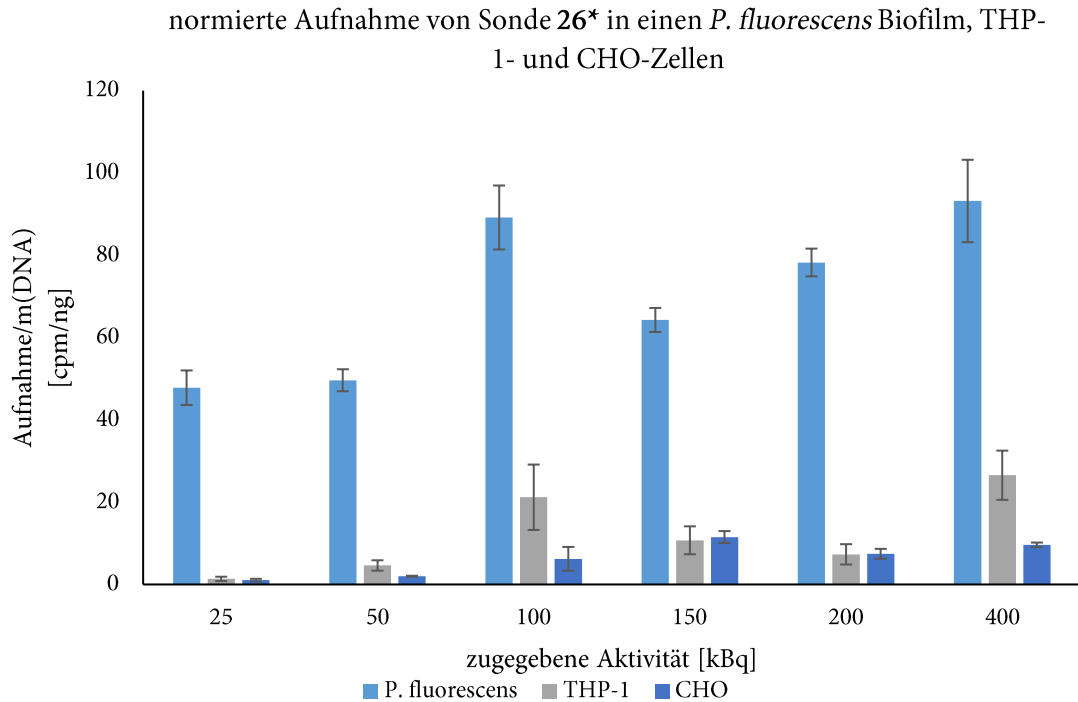


Abb. 24: Vergleich der auf die DNA Menge normierten Aktivitätsaufnahmen in CHO-Zellen, THP-1-Zellen und *P. fluorescens* Biofilme bei Zugabe verschiedener Aktivitätsmengen. Die Höhe der Säulen repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten. Die Standardabweichung ist angegeben.

Abbildung 120 (Anhang) zeigt die Aktivitäten der zugegebenen Inkubationslösungen. Zusammen mit den absoluten Aktivitäten (Abbildung 23) ergeben sich draus die prozentual aufgenommenen Mengen. Diese sind in Abbildung 25 und in Tabelle 10 dargestellt.

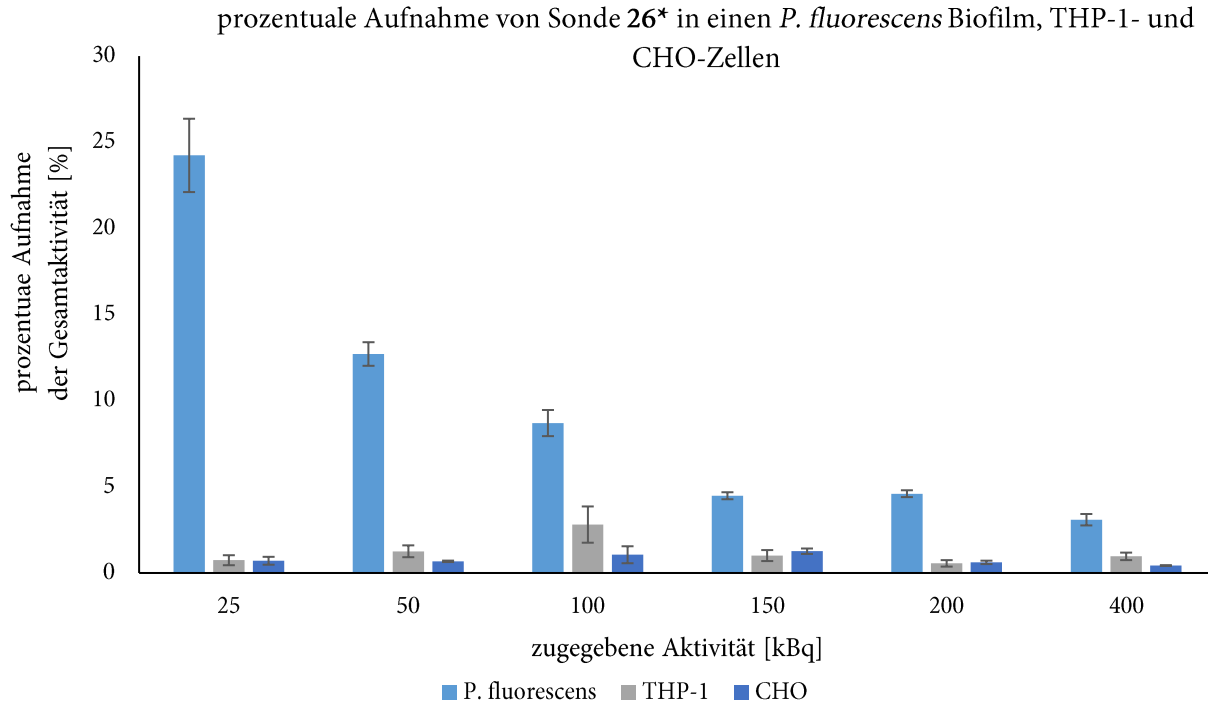


Abb. 25: Vergleich der prozentual aufgenommenen Aktivitäten in CHO-Zellen, THP-1-Zellen und *P. fluorescens* Biofilme bei Zugabe verschiedener Aktivitätsmengen. Die Höhe der Säulen repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten. Die Standardabweichung ist angegeben.

Tabelle 10: Vergleich der prozentualen Aufnahme der zugegebenen Inkubationslösungen [%] in *P. fluorescens* Biofilme, CHO- und THP-1 Zellen.

	25 kBq	50 kBq	100 kBq	150 kBq	200 kBq	400 kBq
<i>P. fluorescens</i> Biofilme	24,2 (± 2,1)	12,7 (± 0,7)	8,7 (± 0,8)	4,5 (± 0,2)	4,6 (± 0,2)	3,1 (± 0,3)
THP-1 Zellen	0,7 (± 0,3)	1,3 (± 0,3)	2,8 (± 1,0)	1,0 (± 0,3)	0,6 (± 0,2)	1,0 (± 0,2)
CHO-Zellen	0,7 (± 0,2)	0,7 (± 0,04)	1,1 (± 0,5)	1,3 (± 0,2)	0,6 (± 0,1)	0,4 (± 0,02)

Es wurden in diesem Versuch Aktivitäten bis 400 kBq gewählt, um herauszufinden, ob ab einer gewissen Aktivitätsmenge eine Sättigung des Signals einsetzt. Die prozentual gebundene Menge an den Biofilm nimmt exponentiell ab und bleibt ab einer Aktivitätszugabe von 150 kBq konstant. Dies deutet auf eine beginnende Sättigung ab 150 kBq. Die prozentual aufgenommene Menge in die eukaryotischen Zellen hingegen ist über den getesteten Bereich konstant und auch in jedem Messpunkt signifikant unter der Aufnahme in den Biofilm.

Durch diese Experimente wurden zum einen, das ein Versuchsaufbau gefunden, mit dem die Eigenschaften der Sonde verlässlich getestet werden konnten. Zum anderen, konnte an einem Modelbiofilm gezeigt werden, dass die Sonde bei Aktivitätszugaben unter 100 kBq die effizienteste Nutzung verspricht.

An dem Modellbiofilm, *P. fluorescens*, konnte im Vergleich mit CHO- und THP-1-Zellen sowohl mit fluoreszenten als auch mit radioaktiven Eigenschaften gezeigt werden, dass die Sonde 26* geeignet ist um Biofilme selektiv zu detektieren.

Abschließend zu der Versuchsreihe sollte die Anwendungsbreite der Sonde an weiteren bakteriellen Stämmen getestet werden. In der beschriebenen Weise, wurden die Experimente an Biofilmen der Stämme *P. aeruginosa* und *S. aureus*, sowie *E. coli* durchgeführt. Es wurden somit sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Stämme getestet.

3.2.2.5. Anwendbarkeit der Sonde 26* an einem *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm

Wie im vorherigen Abschnitt erarbeitet, wurde ein Aktivitätsbereich von 10 - 100 kBq gewählt. Die Ergebnisse der Messungen der absoluten Aktivitäten sind in Abbildung 26 und in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Vergleich der detektierten Aktivitäten [⁶⁸Ga cpm] der Lysate der *P. aeruginosa* Biofilme, CHO- und THP-1 Zellen nach Zugabe steigender Aktivitätsmengen.

	10 kBq	25 kBq	50 kBq	75 kBq	100 kBq
<i>P. aeruginosa</i> Biofilme	5523 (± 121)	18018 (± 1620)	28238 (± 1817)	45569 (± 3922)	58186 (± 9821)
CHO-Zellen	559 (± 115)	2144 (± 144)	5953 (± 2144)	8872 (± 4944)	14267 (± 1964)
THP-1-Zellen	2019 (± 629)	3753 (± 1678)	6202 (± 1712)	11248 (± 2682)	21444 (± 7565)

Die Daten der Messungen sind denen von *P. fluorescens* ähnlich, die Werte sind geringer, zeigen aber die gleiche Tendenz. Dass die absoluten Werte der eukaryotischen Zellen in diesem Experiment größer sind als im Versuch zuvor, liegt daran, dass in dieser Versuchsreihe 500.000 Zellen je Probe verwendet wurden und nicht 250.000. Der Grund für die Verdopplung der Zellzahl war ein rein praktischer.

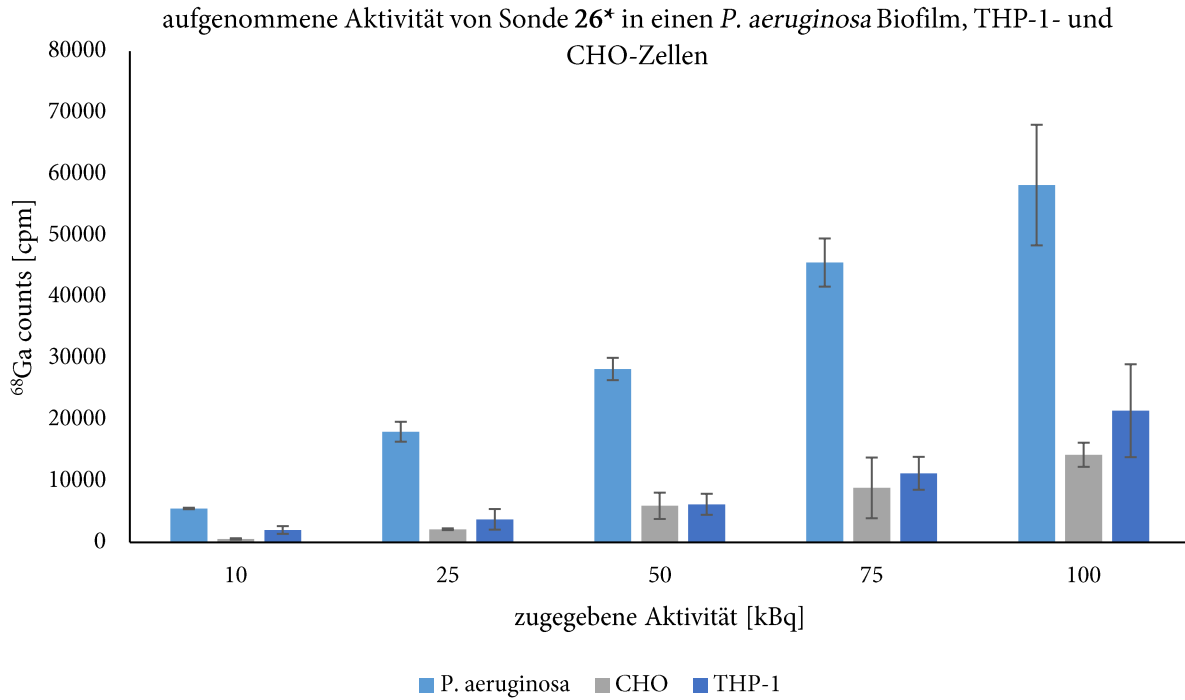


Abb. 26: Vergleich der detektierten Restaktivitäten der Lysate von CHO-Zellen, THP-1-Zellen und *P. aeruginosa* Biofilmen bei Zugabe verschiedener Aktivitätsmengen. Die Höhe der Säulen repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten. Die Standardabweichung ist angegeben.

Obwohl im Versuch zuvor gute Ergebnisse erzielt wurden, war es problematisch die Inkubations- und Waschlösungen abzunehmen und dabei das Zellpellet intakt zu lassen. Das Problem konnte mit einem größeren Pellet umgangen werden. Die Daten zur normierten Aufnahme sind in Abbildung 27, sowie in Tabelle 12 dargestellt.

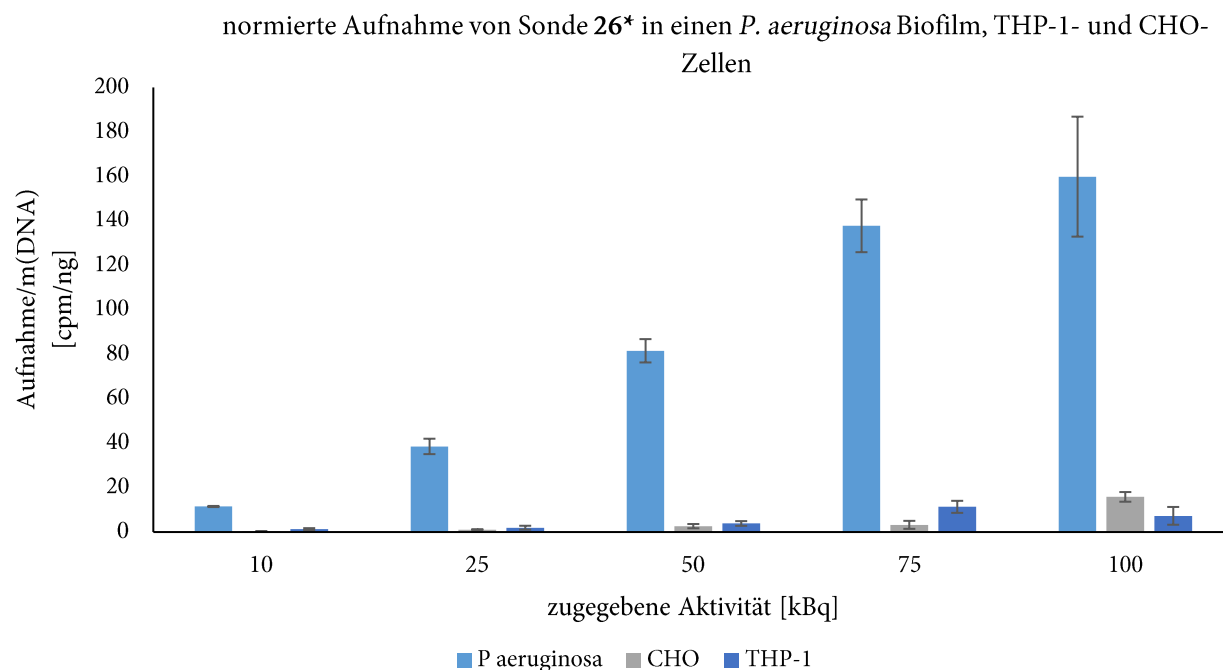


Abb. 27: Vergleich der auf die DNA Menge normierten Aktivitätsaufnahmen in CHO-Zellen, THP-1-Zellen und *P. aeruginosa* Biofilme bei Zugabe verschiedener Aktivitätsmengen. Die Höhe der Säulen repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten. Die Standardabweichung ist angegeben.

Tabelle 12: Vergleich der detektierten Aktivitäten normiert auf die bestimmte Menge DNA [^{68}Ga cpm/ng] in den Lysaten der *P. aeruginosa* Biofilme, CHO- und THP-1 Zellen nach Zugabe steigender Aktivitätsmengen.

	10 kBq	25 kBq	50 kBq	75 kBq	100 kBq
<i>P. aeruginosa</i> Biofilme	11,5 ($\pm 0,3$)	38,5 ($\pm 3,5$)	81,5 ($\pm 5,2$)	137,7 ($\pm 11,9$)	159,9 ($\pm 27,0$)
CHO-Zellen	0,2 ($\pm 0,05$)	1,1 ($\pm 0,07$)	2,7 ($\pm 1,0$)	3,2 ($\pm 1,8$)	15,8 ($\pm 2,1$)
THP-1-Zellen	1,3 ($\pm 0,4$)	2,0 ($\pm 0,9$)	3,9 ($\pm 1,1$)	11,3 ($\pm 2,7$)	7,3 ($\pm 4,0$)

Bei der Normierung zeigt sich eine sehr gute Selektivität der Sonde für den *P. aeruginosa* Biofilm gegenüber den Vergleichsgruppen. Auch für diesen Bakterienstamm konnte in diesem Experiment die Anwendbarkeit der Sonde bestätigt werden.

3.2.2.6. Anwendbarkeit der Sonde 26* an einem *Staphylococcus aureus* Biofilm

Abbildung 28 und Tabelle 13 zeigen die absoluten Aktivitäten der Lysate.

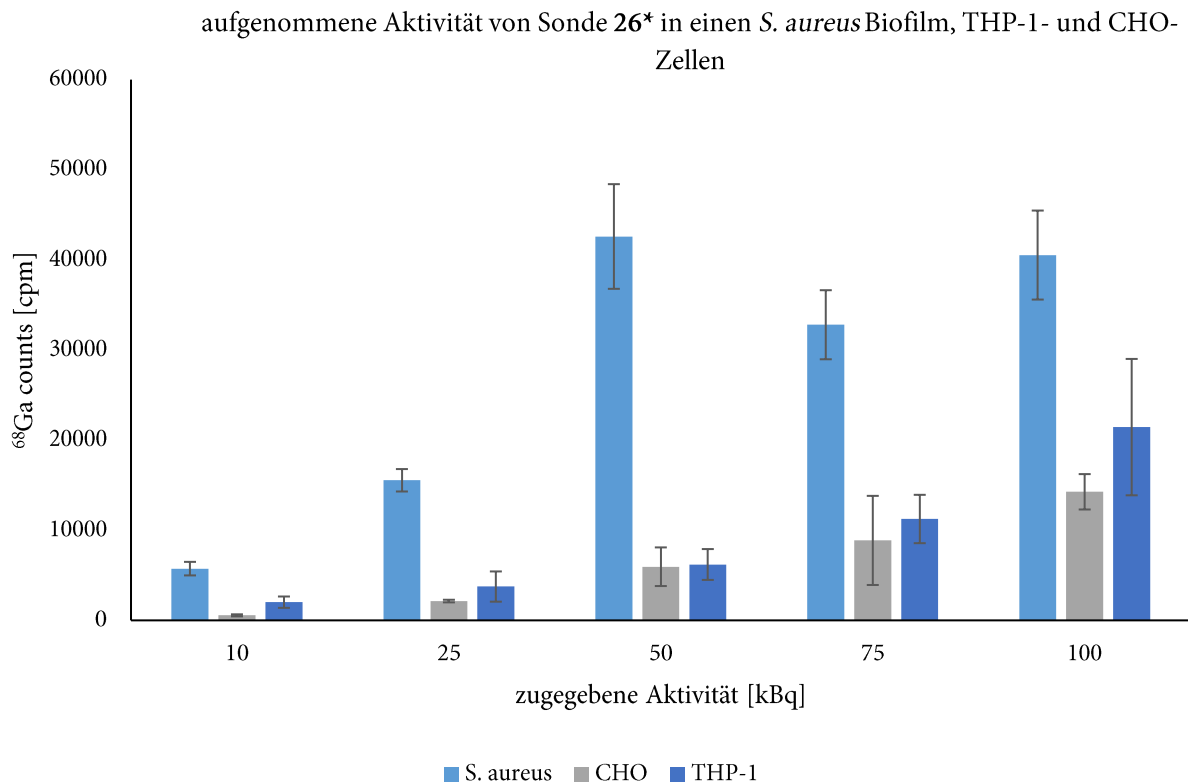


Abb. 28: Vergleich der detektierten Restaktivitäten der Lysate von CHO-Zellen, THP-1-Zellen und *S. aureus* Biofilmen bei Zugabe verschiedener Aktivitätsmengen. Die Höhe der Säulen repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten. Die Standardabweichung ist angegeben.

Tabelle 13: Vergleich der detektierten Aktivitäten [^{68}Ga cpm] der Lysate der *S. aureus* Biofilme, CHO- und THP-1 Zellen nach Zugabe steigender Aktivitätsmengen.

	10 kBq	25 kBq	50 kBq	75 kBq	100 kBq
<i>S. aureus</i> Biofilme	5741 (± 751)	15545 (± 1244)	42594 (± 5808)	32803 (± 3832)	40534 (± 4937)
CHO-Zellen	559 (± 115)	2144 (± 144)	5953 (± 2144)	8872 (± 4944)	14267 (± 1964)
THP-1-Zellen	2019 (± 629)	3753 (± 1678)	6202 (± 1712)	11248 (± 2682)	21444 (± 7565)

Wie in den vorherigen Experimenten zeigt sich auch hier eine größere absolute Aktivität im Biofilm, als in den eukaryotischen Zellen. Die absoluten Werte sind bei den Biofilmen geringer als in den zuvor getesteten

Stämmen, aber noch immer signifikant erhöht gegenüber den Lysaten der Eukaryoten. Der Vergleich der relativ aufgenommenen Aktivitäten bestätigt diesen Trend (Abbildung 29 und Tabelle 14).

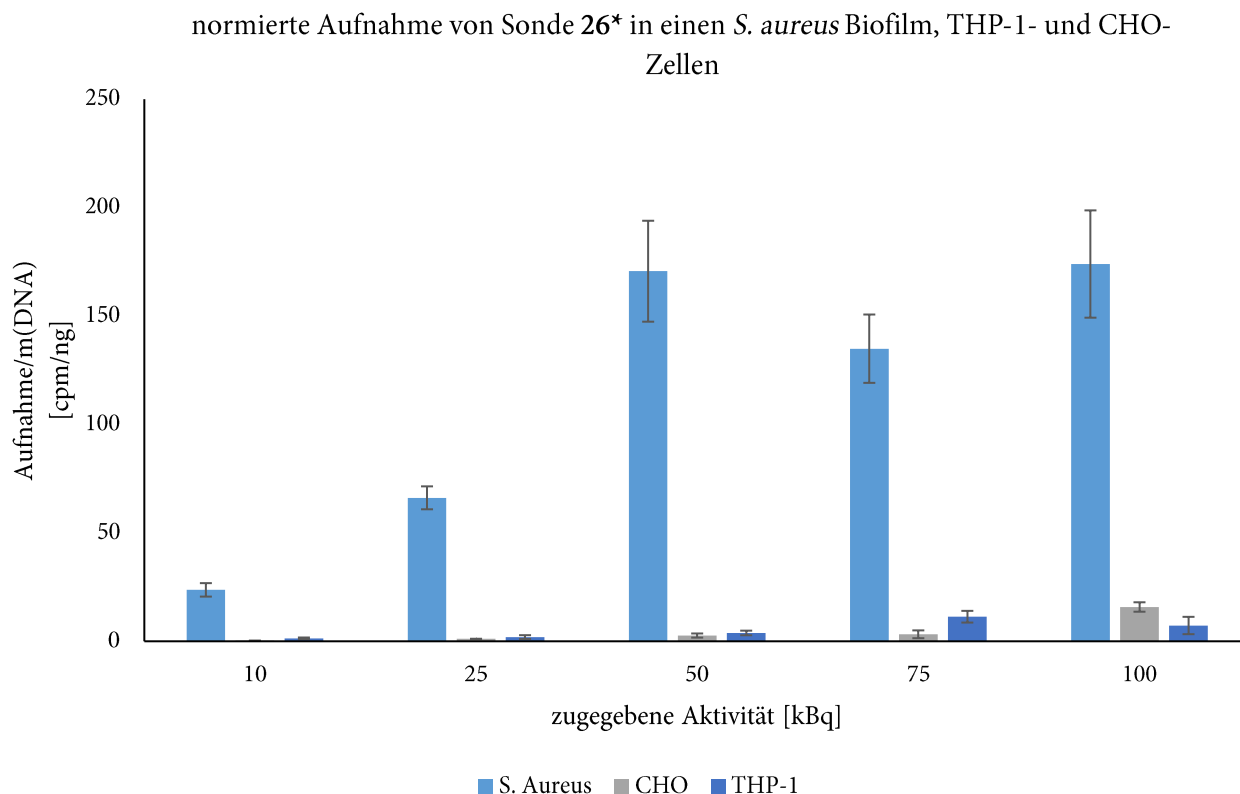


Abb. 29: Vergleich der auf die DNA Menge normierten Aktivitätsaufnahmen in CHO-Zellen, THP-1-Zellen und *S. aureus* Biofilme bei Zugabe verschiedener Aktivitätsmengen. Die Höhe der Säulen repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten. Die Standardabweichung ist angegeben.

Tabelle 14: Vergleich der detektierten Aktivitäten normiert auf die bestimmte Menge DNA [⁶⁸Ga cpm/ng] in den Lysaten der *S. aureus* Biofilme, CHO- und THP-1 Zellen nach Zugabe steigender Aktivitätsmengen.

	10 kBq	25 kBq	50 kBq	75 kBq	100 kBq
<i>S. aureus</i> Biofilme	23,7 (± 3,1)	66,2 (± 5,3)	170,7 (± 23,3)	135,0 (± 15,8)	174,0 (± 24,7)
CHO-Zellen	0,2 (± 0,05)	1,1 (± 0,07)	2,7 (± 1,0)	3,2 (± 1,8)	15,8 (± 2,1)
THP-1-Zellen	1,3 (± 0,4)	2,0 (± 0,9)	3,9 (± 1,1)	11,3 (± 2,7)	7,3 (± 4,0)

Es zeigte sich, dass in den *S. aureus* Proben weniger DNA nachgewiesen wurde, als in denen von *P. fluorescens* und *P. aeruginosa* (Abbildung 122, Anhang). In den normierten Aufnahmen spiegelt sich das in

einer größeren Signifikanz in der Selektivität für den Biofilm wieder. Auch für den Gram-positiven Stamm *S. aureus*, zeigt sich die Anwendbarkeit der Sonde.

3.2.2.7. Anwendbarkeit der Sonde 26* an einem *Escherichia coli* Biofilm

Die graphischen Ergebnisse der absoluten Aktivitäten sind in Abbildung 30 und tabellarisch in Tabelle 15 dargestellt.

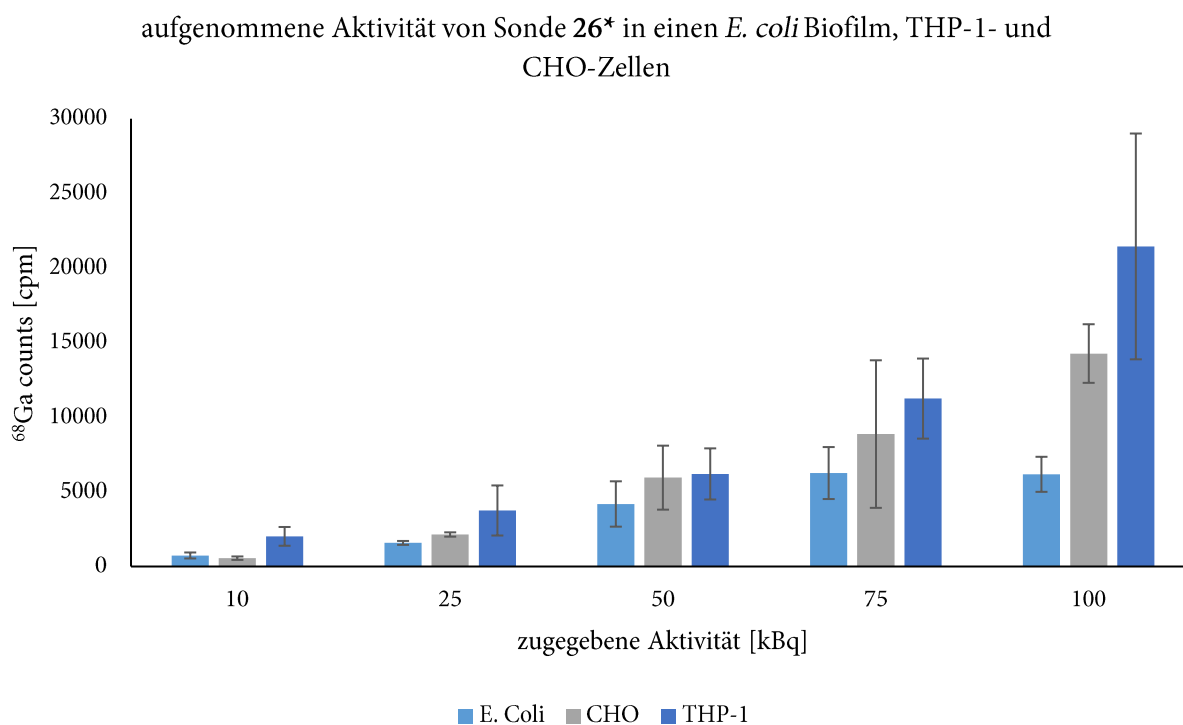


Abb. 30: Vergleich der detektierten Restaktivitäten der Lysate von CHO-Zellen, THP-1-Zellen und *E. coli* Biofilmen bei Zugabe verschiedener Aktivitätsmengen. Die Höhe der Säulen repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten. Die Standardabweichung ist angegeben.

Tabelle 15: Vergleich der detektierten Aktivitäten [^{68}Ga cpm] der Lysate der *E. coli* Biofilme, CHO- und THP-1 Zellen nach Zugabe steigender Aktivitätsmengen.

	10 kBq	25 kBq	50 kBq	75 kBq	100 kBq
<i>E. coli</i> Biofilme	739 (± 201)	1580 (± 131)	4188 (± 1520)	6261 (± 1173)	6175 (± 751)
CHO-Zellen	559 (± 115)	2144 (± 144)	5953 (± 2144)	8872 (± 4944)	14267 (± 1964)
THP-1-Zellen	2019 (± 629)	3753 (± 1678)	6202 (± 1712)	11248 (± 2682)	21444 (± 7565)

Der Vergleich der absoluten Aktivitäten zeigt ein anderes Bild, als in den zuvor getesteten Stämmen. Die aufgenommenen Aktivitäten sind im besten Fall vergleichbar groß, in den meisten Fällen jedoch kleiner als in CHO- und THP-1 Zellen. Die Relevanz der Normierung der detektierten Aktivitäten auf die vorhandene Biomasse zeigt sich in diesem Beispiel.

Die normierten Aktivitäten sind in Abbildung 31 und in Tabelle 16 aufgetragen.

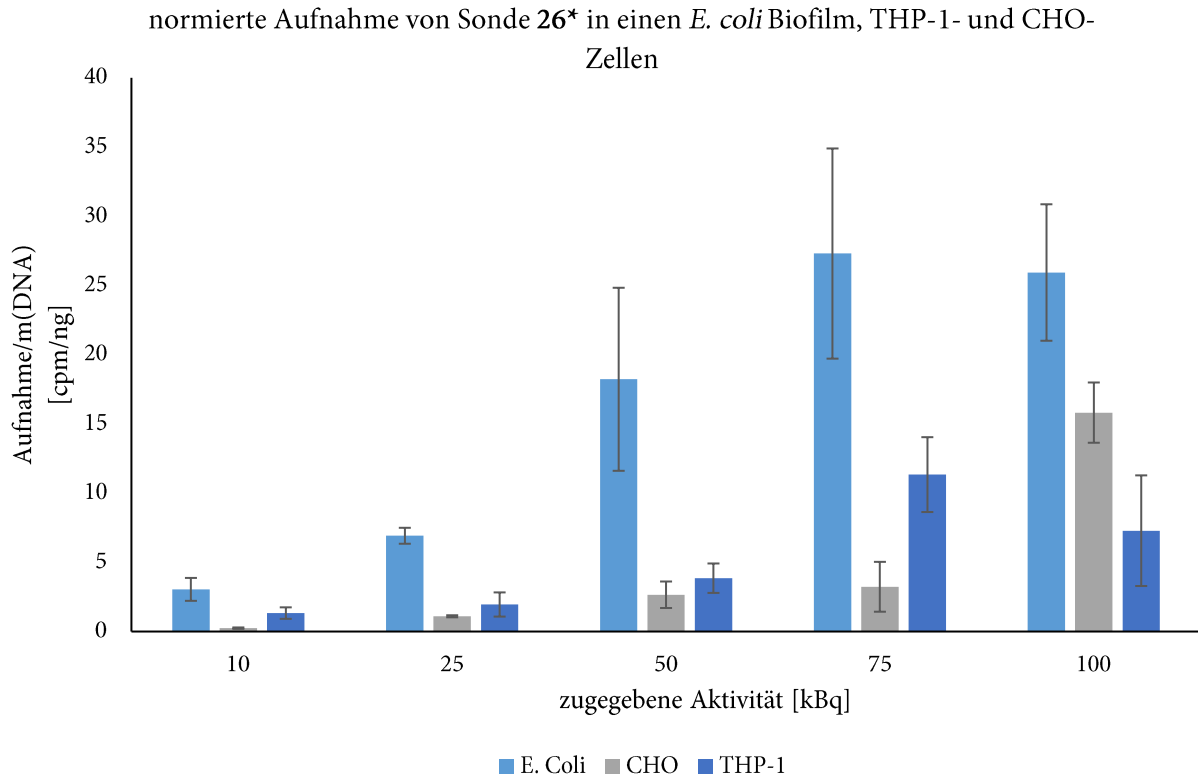


Abb. 31: Vergleich der auf die DNA Menge normierten Aktivitätsaufnahmen in CHO-Zellen, THP-1-Zellen und *E. coli* Biofilme bei Zugabe verschiedener Aktivitätsmengen. Die Höhe der Säulen repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten. Die Standardabweichung ist angegeben.

Tabelle 16: Vergleich der detektierten Aktivitäten normiert auf die bestimmte Menge DNA [⁶⁸Ga cpm/ng] in den Lysaten der *E. coli* Biofilme, CHO- und THP-1 Zellen nach Zugabe steigender Aktivitätsmengen.

	10 kBq	25 kBq	50 kBq	75 kBq	100 kBq
<i>E. coli</i> Biofilme	3,0 (± 0,8)	6,9 (± 0,6)	18,2 (± 6,6)	27,3 (± 7,6)	25,9 (± 4,9)
CHO-Zellen	0,2 (± 0,05)	1,1 (± 0,07)	2,7 (± 1,0)	3,2 (± 1,8)	15,8 (± 2,1)
THP-1-Zellen	1,3 (± 0,4)	2,0 (± 0,9)	3,9 (± 1,1)	11,3 (± 2,7)	7,3 (± 4,0)

Da in den *E. coli* Proben wenig DNA isoliert wurde, ergibt sich aus den relativen Aufnahmen ein neuer Eindruck der Ergebnisse. Die Aufnahme der Sonde in den Biofilm ist auch in diesem Experiment selektiv gegenüber eukaryotischen Zellen um den Faktor 2 – 12. Das ist weniger signifikant als in den drei zuvor diskutierten Fällen, aber noch immer ausreichend, um eine Unterscheidung zu ermöglichen.

Die Notwendigkeit zur Normierung der Aktivität auf die vorhandene Biomasse zeigte sich in den Experimenten mit *S. aureus* und *E. coli* deutlich. Obwohl die absoluten Aktivitäten in *E. coli* Biofilmen geringer waren als CHO- und THP-1-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Sonde auch für *E. coli* Biofilme anwendbar ist. Und obwohl die absoluten Aktivitäten in den pseudomonalen Stämmen höher ist als bei *S. aureus*, zeigt die normierte Bindung die besten Resultate bei den Versuchen mit *S. aureus* Biofilmen.

Da die Normierungsgröße die gesamte DNA war, können aus den normierten Aktivitäten keine Aussagen über die Selektivität der Sonde zu den einzelnen Biofilmen getroffen werden. Um ein Verständnis für die Selektivität der Sonde zu einzelnen Biofilmen zu erlangen, ist es nötig nicht nur die Menge an Gesamt-DNA zu vergleichen, sondern die Menge an eDNA in den einzelnen Biofilmen. In der Literatur finden sich Angaben zu den Mengen an eDNA der verwendeten Stämme.^[14,88] Diese sind in Tabelle 17 gezeigt.

Tabelle 17: Isolierte Mengen eDNA aus Biofilmen der Stämme *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *P. fluorescens*.

Stamm	<i>m</i> (eDNA) [$\mu\text{g/ml OD}_{600}$]
<i>E. coli</i> ^[14]	5,85 \pm 1,44
<i>S. aureus</i> ^[14]	11,98 \pm 1,52
<i>P. aeruginosa</i> ^[14]	15,76 \pm 3,34
<i>P. fluorescens</i> ^[88]	13,14 \pm 2,15

Bei den Stämmen *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *P. fluorescens* sind die absoluten Aktivitäten um die Faktoren 4 – 10 größer als bei *E. coli*. Die Werte unter den ersten drei Stämmen hingegen nur um die Faktoren 1 – 1,5. Eine ähnliche Tendenz zeigt sich bei den Literaturdaten zur eDNA Menge. WU *et al.* konnten zeigen, dass die in *E. coli* Stämmen um die Faktoren 2 – 3 kleiner ist, als in den anderen getesteten Stämmen. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen in den hier durchgeführten Experimenten. Da die Gesamtmenge der isolierten DNA in den *E. coli* Proben ähnlich groß ist, wie in den der *S. aureus* Proben (*E. coli*: 230 ng, *S. aureus*: 236 ng, siehe Abbildung 122), die absoluten Aktivitäten sich aber um den Faktor

sechs unterscheiden, ist es denkbar, dass auch in den *E. Coli* Biofilmen in Polypropylengefäßen, weniger eDNA gebunden ist, als in den anderen getesteten Stämmen. Für ein genaues Verständnis zur Selektivität der Sonde kann eine Versuchsreihe nach dem etablierten Verfahren mit einer Normierung auf die eDNA-Mengen durchgeführt werden.

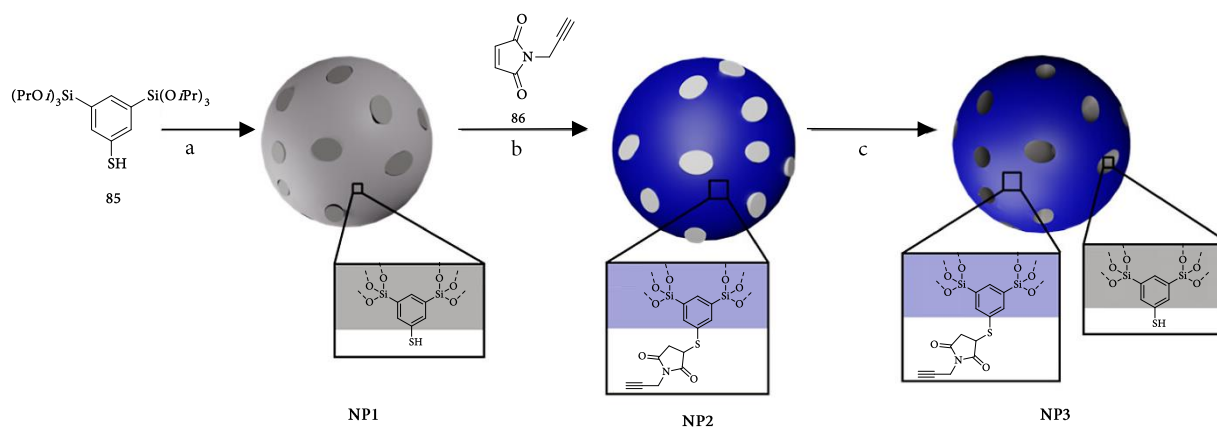
4. Entwicklung eines Nanopartikel-basierenden Ansatzes zur Behandlung bakterieller Infektionen

4.1. Allgemeine Vorbemerkung

Die Ergebnisse dieses Kapitels stammen aus einer Kooperation mit M. Sc. HANNAH BRONNER (HB) vom Institut für anorganische Chemie der Gottfried-Wilhelm-Leibniz Universität Hannover und M. Sc. DENIS PLUTA (DP) vom Institut für physikalische Chemie der Gottfried-Wilhelm-Leibniz Universität Hannover. Die Synthese sowie die Charakterisierung der Nanopartikel wurde von HB durchgeführt, die Messungen zur Fluoreszenzlebensdauer wurden von DP durchgeführt, die Synthese der genutzten Moleküle, sowie die biologischen Experimente wurden von mir durchgeführt.

4.2. Synthese der Nanopartikel

Das Grundgerüst für die Studien stellten Nanopartikel dar, die eine zweifache Funktionalisierung erlaubte. In der Gruppe um Professor SEBASTIAN POLARZ wurden für diese Zwecke Thiolgruppen tragende Phenylsilyl ether in einem templatgestützten Sol-Gel-Prozess zu porösen Organosilica-Nanopartikeln kondensiert.^[19,66] Die Synthese ist in Schema 30 gezeigt.



Schema 30: Schematische Darstellung zur Synthese von bifunktionalen Nanopartikeln. a) HCl (aq., 0.1 M), *i*PrOH, 3h, Pluronic P123, CTAB, Bicarbonat-Puffer (pH = 9, 0.1 M), 2 d; b) **86**, Bicarbonat-Puffer (pH = 8, 0.1 M), 6 h; c) EtOH/HCl (aq., 0.1 M) (4/1), 2d.

In der Synthese wurden bei 1,5-Bistri(isopropoxysilyl)-3-Benzenothiol **85** durch Umsatz mit HCl zunächst die Silantriolgruppen entschützt. Die Reaktionslösung wurde im Anschluss in eine basische Lösung gegeben, in der Pluronic P123 gelöst war. Im basischen Milieu kondensieren die Silanolgruppen zu den Nanopartikel. Pluronic P123 ist ein aus Poly(ethylenoxid) und Poly(propylenoxid) bestehendes Polymer, das unter basischen Bedingungen Mizellen in Wasser ausbildet. Die Kondensation der Nanopartikel entsteht um diese Mizellen herum und ergeben die verschlossenen porösen Strukturen **NP1**, die eine selektive Funktionalisierung der Oberfläche erlaubt. Durch Umsatz mit *N*-Propargylmaleimid **86** unter basischen Bedingungen wurde der Alkin-funktionalisierte Nanopartikel **NP2** erhalten. Durch Umsatz mit HCl wurden die Template aus den Poren entfernt und der zweifach funktionalisierbare Partikel **NP3** wurde erhalten.

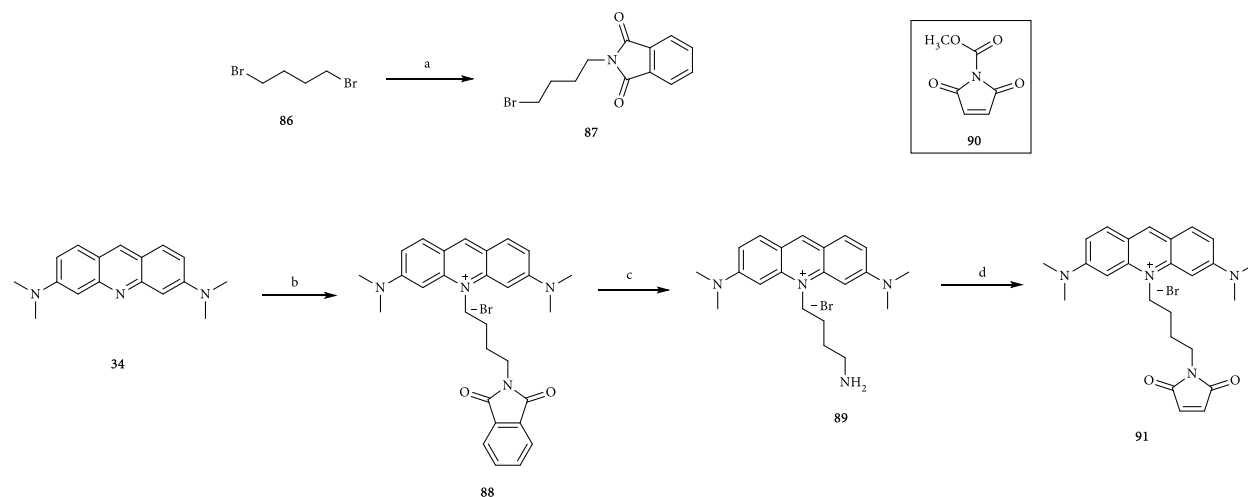
Nachdem Partikel **NP3** erfolgreich dargestellt werden konnte, wurden die funktionellen Gruppen der Partikeloberfläche und -poren mit geeigneten Molekülen konjugiert. Bei der Wahl der Moleküle wurde sich an den Funktionen orientiert, die die Moleküle aufweisen müssen, um das erdachte System im gewünschten Sinne anwenden zu können.

Wie in der Zielsetzung zu diesem Kapitel diskutiert, sollten die Partikel über einen molekularen Anker an einen Biofilm physikalisch gebunden werden, um so eine räumliche Nähe zum Herd einer bakteriellen Infektion zu gewährleisten.

Im vorherigen Kapitel konnte erarbeitet werden, dass das Hoechst-Grundgerüst geeignet ist, an die eDNA eines bakteriellen Biofilms zu binden. In den Arbeiten von KHAN *et al.*^[89] wurde gezeigt, dass Hoechst auch weiterhin DNA-bindend ist, wenn das Hoechst-Grundgerüst mit makromolekularen Strukturen konjugiert ist. Da Molekül **26** im vorherigen Kapitel die besten DNA-bindenden Eigenschaften zeigte, wurde das Hoechst-Azid **50** als Anker gewählt. Die Synthese dieses Moleküls wurde bereits in Abschnitt 3.1.2.4. beschrieben.

Die Funktion des zweiten Moleküls war es als Photosensibilisator nach Bestrahlung ROS produzieren zu können, um so die antimikrobiellen Eigenschaften zu ermöglichen. Für diesen Zweck sollte ein bekannter Photosensibilisator so funktionalisiert werden, dass er in einer Thio-Michael-Addition an die Thiole der Partikelporen konjugiert werden konnte. Ein geeignetes Molekül dafür schien Acridinorange (AO) **34**. Dessen photosensitiven Eigenschaften sind beschrieben^[90] und in Arbeiten von ESTEVES *et al.* wurde die

Synthese des Acridinamins **89** beschrieben.^[91] Ausgehend von diesem Amin erfolgte in einem Schritt die Transformation in das funktionalisierbare Maleimid **91**. Die Synthese des Acridin Orange Derivats **91** ist in Schema 31 dargestellt.



Schema 31: Synthese des Maleimid-funktionalisierten Acridinorange **91**. a) Phthalimid, K_2CO_3 , $PhNEt_3Cl$, Aceton, RT, 18 h, 87 %; b) **87**, 1,4-Xylol, reflux, 48 h, 90 %; c) $N_2H_4 \cdot H_2O$, $CH_3OH/EtOH$ (3/1), 80 °C, 6 h, quant.; d) **90**, $NaHCO_3$ (aq., ges.), 0 °C, 10 min, 78 %.

Als Startmaterial für die Synthese diente Acridin Orange **34**, welches zunächst mit dem Phthalimid geschützten Aminobromid **87** alkyliert wurde. **87** wurde aus 1,4-Dibromobutan **86** nach einfacher Substitution dargestellt. Nach Hydrazin-vermittelter Entfernung der Schutzgruppe wurde das Amin **89** erhalten.

Für die abschließende Einführung des Maleimids wurden verschiedene Bedingungen getestet. Eine Übersicht ist in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Bedingungen zur Einführung des Maleimids zur Bildung von Acridinorange Derivat **91**.

Eintrag	Bedingungen	Ergebnis
I	89 (10 mg), 90 (1.5 Äq.), DMF, DIPEA, RT, 30 min	60 % Ausbeute
II	89 (500 mg), 90 (1.5 Äq.), DMF, DIPEA, RT, 30 min	Produkt in Spuren detektiert
III	89 (100 mg), 90 (1.5 Äq.), DMF, DIPEA, RT, 30 min	Produkt in Spuren detektiert
IV	89 (100 mg), 90 (1.5 Äq.), DMF, DIPEA, 0 °C, 30 min	Produkt in Spuren detektiert
V	89 (100 mg), 90 (2.5 Äq.), DMF, DIPEA, 0 °C, 30 min	Produkt in Spuren detektiert
VI	89 (400 mg), 90 (1.5 Äq.), $NaHCO_3$ (aq., ges.), 0 °C, 30 min	78 % Ausbeute

Die Reaktion verlief in einem kleinen Maßstab (10 mg, Eintrag I) vornehmlich unter Bildung des gewünschten Produkts ab. Bei Ansätzen >100 mg bildeten sich Nebenprodukte, die mittels LC-MS nachgewiesen wurden. Diese haben ein Masse/Ladung-Verhältnis von $m/z = 337.1$, 524.2 , 395.7 und 418.1 und eine Retentionszeit von $t_R = 1.101$ bzw. 1.287 min. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abbildung 32 gezeigt.

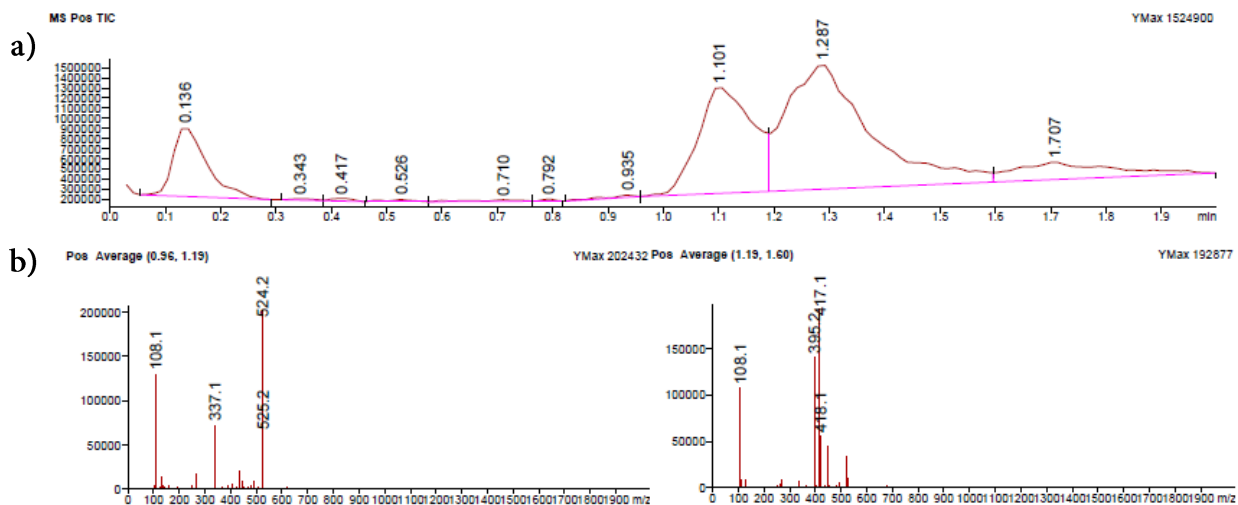


Abb. 32: Repräsentative Reaktionskontrolle der Reaktion zu Verbindung **91** nach den Einträgen II - IV; a) Chromatogramm der Reaktionskontrolle; b) Massenspektren des Chromatogramms in der Retentionszeit 0,96 min – 1,60 min, $m/z(\text{Produkt}) = 417.1$.

Da eine selektive Umsetzung zum gewünschten Produkt auf diesem Wege nicht erfolgreich war, wurden geänderte Reaktionsbedingungen gewählt. Unter Verwendung einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung als Lösungsmittel (Eintrag VI) konnten bei 0°C in Reaktionskontrollen mittels LC-MS gute Umsätze zum Produkt beobachtet werden (Abbildung 33).

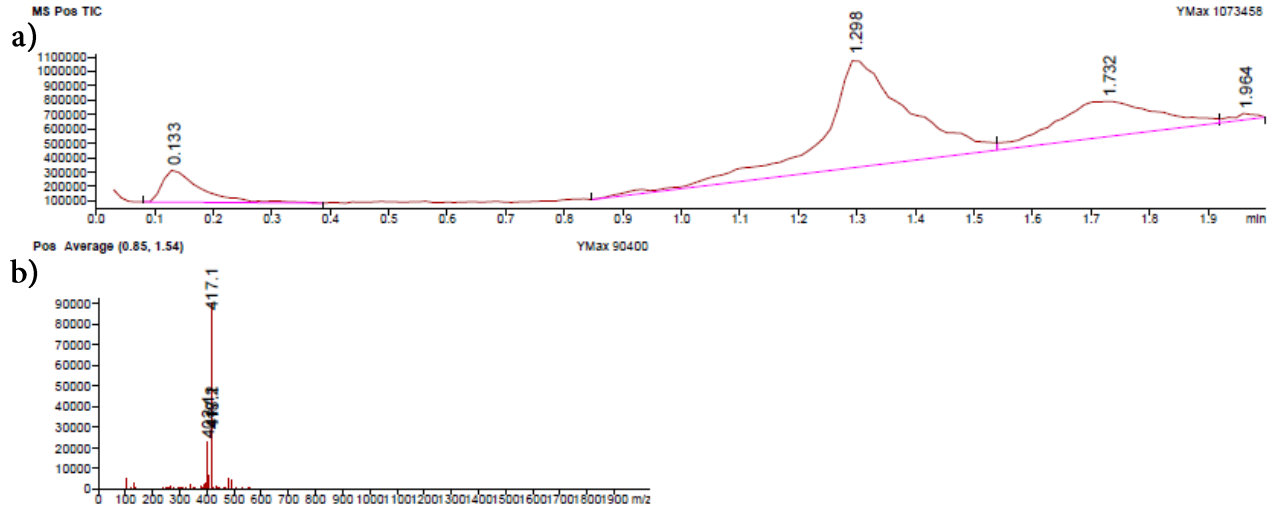


Abb. 33: Reaktionskontrolle der Reaktion zu Verbindung **91** nach Einträgen V; a) Chromatogramm der Reaktionskontrolle; b) Massenspektrum des Chromatogramms in der Retentionszeit 0.85 min – 1.54 min, $m/z_{\text{Produkt}} = 417.1$.

Da die Reaktionskontrolle auf die saubere Bildung von Produkt **91** hindeutet, wurde vom isoliertem Rohprodukt ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen, welches in Abbildung 34 gezeigt ist.

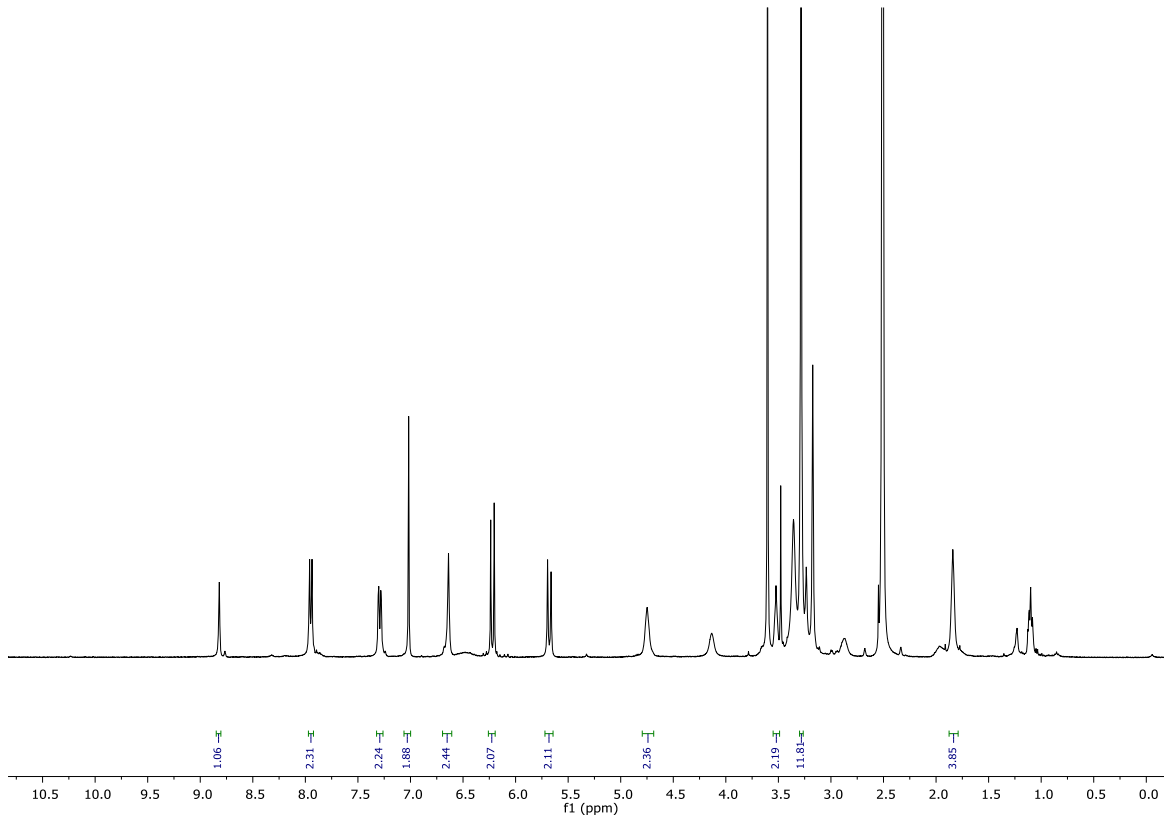


Abb. 34: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **91** in DMSO.

Das Spektrum zeigt im Bereich der aromatischen Protonen alle erwarteten Signale der Acridin Orange Einheit ($\delta = 8.84, 7.98, 7.35, 6.65$ ppm), sowie das Singulett bei $\delta = 7.05$ ppm, was den Protonen der Doppelbindung der Maleimideinheit zugeordnet werden kann. Das Spektrum zeigt weiterhin zwei Dubletts bei $\delta = 6.25$ ppm und $\delta = 5.63$ ppm, welche in ihren Integralen im Verhältnis 1:1 zueinander sind und untereinander koppeln (interpretierbar aus dem COSY-Spektrum Abb. 35).

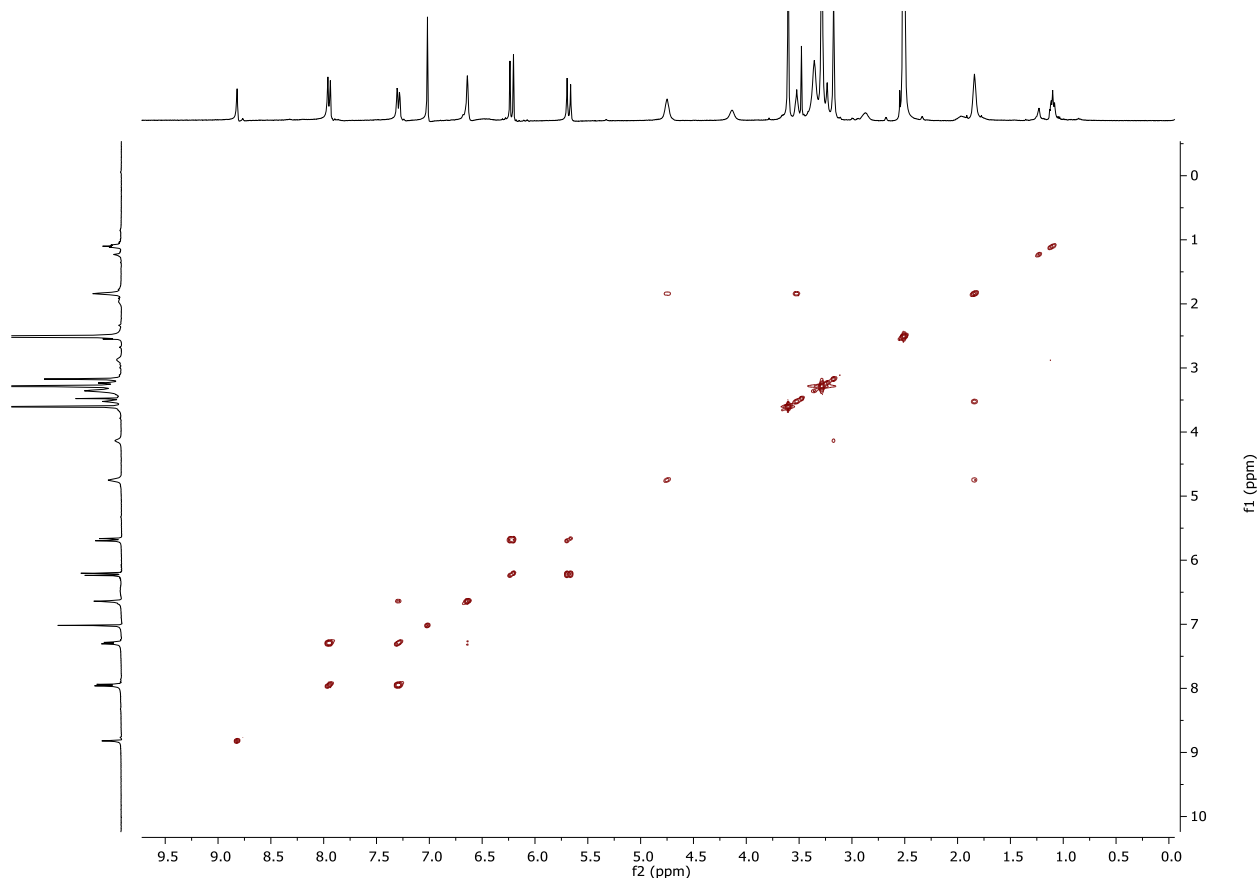


Abb. 35: COSY-Spektrum der isolierten Verbindungen **91** und **92** in DMSO.

Auf Grund der chemischen Verschiebung, der gleichen Integrale und der Kopplung beider Signale untereinander, können diese Signale zwei Protonen einer nicht symmetrischen Doppelbindung zugeordnet werden. Es kann angenommen werden, dass das Maleimid nach der Reaktion zu einem Teil hydrolysiert ist und das isolierte Produkt als Gemisch der Verbindungen **91** und **92** vorlag (Abbildung 36). Zu Gunsten der Ausbeute wurde auf eine Trennung des Gemisches verzichtet.

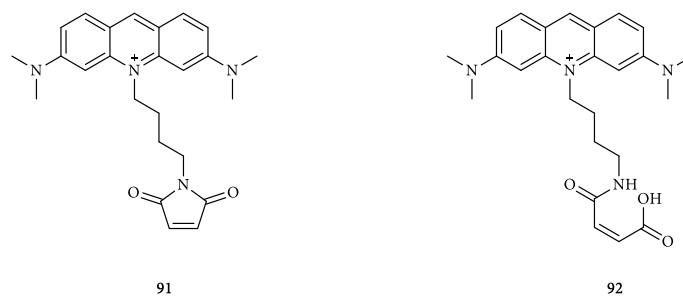
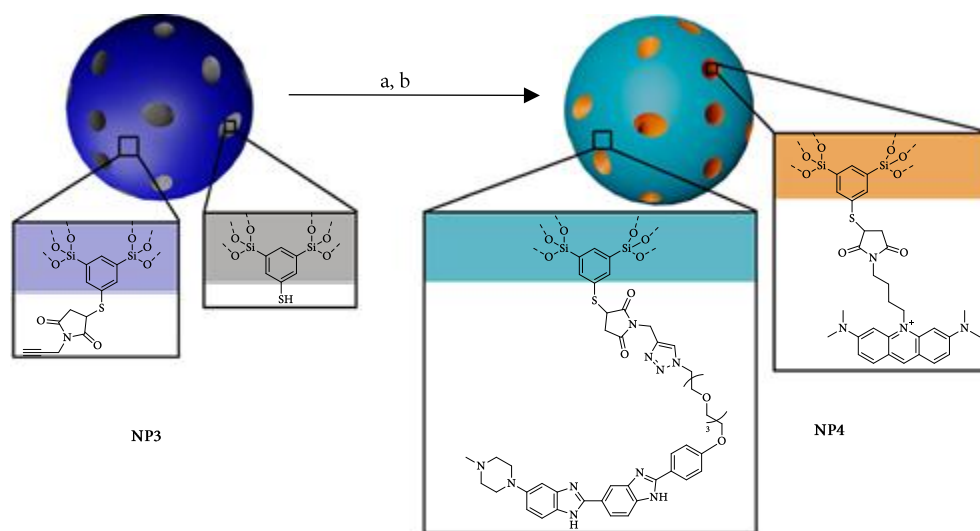


Abb. 36: Strukturen des isolierten Produktgemischs nach der Reaktion zur Einführung des Maleimids in das Acridin Orange Gerüst.

Die Synthese der finalen Partikel ist in Schema 32 dargestellt.



Schema 32: Schematische Darstellung der Synthese der bifunktionalisierten Nanopartikel. a) **50**, $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$, $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ (1/1), 18 h; b) **91**, NaHCO_3 (aq., 0.1 M).

Ausgehend von Partikel **NP3** wurde in einer Kuper(I) katalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition zunächst **50** an die Oberfläche konjugiert **NP5**. In einer Thio-Michael-Addition wurde Acridin Orange-Maleimid **91** in das Porensystem der Partikel gebunden. Der Funktionalisierungsgrad wurde mittels UV-Vis-Spektroskopie ermittelt. Die Oberfläche von **NP4** war mit 2 % **50** und die Poren mit 10 % **91** funktionalisiert.^[19]

4.3. Charakterisierung der Nanopartikel

Um die Bindung an die Partikel zu bestätigen, wurden die Partikel mittels IR-Spektroskopie untersucht. Die entsprechenden Spektren sind in Abbildung 37 und 38 gezeigt

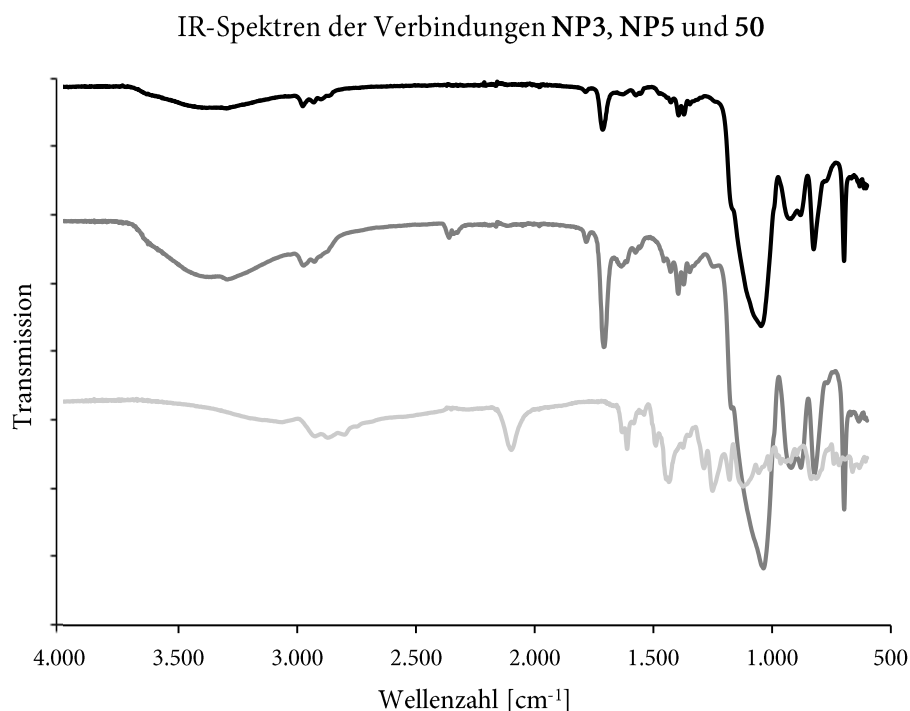


Abb. 37: IR-Spektren zur Charakterisierung der mit Hoechst-Derivat 50 funktionalisierten Nanopartikel. Schwarz: Alkin-funktionalisierte Partikel mit entferntem Templat NP3; Grau: Partikel mit Hoechst-Derivat 50 funktionalisierter Oberfläche NP5; Hellgrau: Hoechst-Derivat 50.

Abbildung 37 zeigt die IR-Spektren des Alkin-funktionalisierten Partikels mit entferntem Templat NP3 (Schwarz), der mit 50 funktionalisierten Partikel NP5 (Grau) und von 50 (Hellgrau). Der Vergleich des schwarzen mit dem grauen Spektrum zeigt zwei neue Banden bei den Wellenzahlen $\tilde{\nu} = 1455 \text{ cm}^{-1}$ bzw. 1612 cm^{-1} . Diese Banden könnten dem in der Konjugationsreaktion gebildeten Triazol zugeordnet werden. Der Vergleich des grauen mit dem hellgrauen Spektrum zeigt das Fehlen der charakteristischen Azidbande bei $\tilde{\nu} = 2045 \text{ cm}^{-1}$. Die Bindung des Moleküls an die Partikel, sowie die Reinheit der Partikel von ungebundenem Farbstoff konnte anhand dieser Spektren bestätigt werden. Eine Auflistung von charakteristischen Banden ist in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19: Charakteristische Schwingungen in Partikel NP5.

Kurve	Wellenzahl [cm^{-1}]	Schwingung
Schwarz	1030	Si-O (Nanopartikel)
	1715	C=O (Maleimid)
Grau (nur zusätzliche Banden)	1455	Triazol ^[92]
	1612	Triazol ^[92]

Die Bindung des zweiten Farbstoffs wurde in ähnlicher Weise validiert. Die entsprechenden IR-Spektren sind in Abbildung 38 gezeigt.

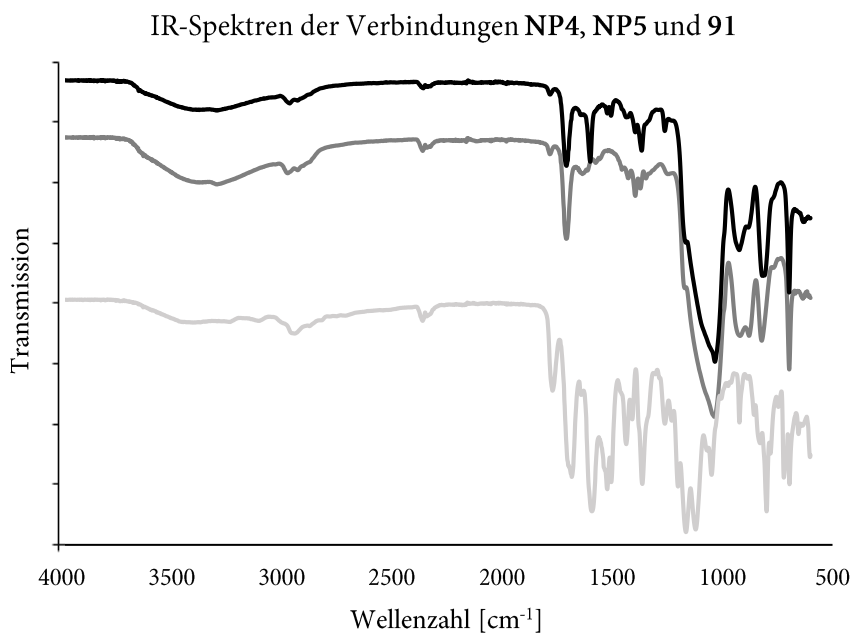


Abb. 38: IR-Spektren zur Charakterisierung der mit Hoechst-Derivat **50** und Acridin-Orange-Derivat **91** funktionalisierten Nanopartikel. Schwarz: Partikel **NP4**; Grau: Partikel mit Hoechst-Derivat **50** funktionalisierter Oberfläche **NP5**; Hellgrau: Acridin-Orange-Derivat **91**.

Abbildung 38 zeigt die IR-Spektren der Partikel **NP4** (Schwarz), **NP5** (Grau) und des **91** (Hellgrau). Der Vergleich des schwarzen mit dem grauen Spektrum zeigt neue Bande bei den Wellenzahlen $\tilde{\nu} = 1600 \text{ cm}^{-1}$ und $\tilde{\nu} = 2945 \text{ cm}^{-1}$ welche auch im hellgrauen Spektrum von **91** zu sehen sind. Diese Banden können den Aminschnwingungen im Acridinorange zugeordnet werden. Auch für diesen Konjugationsschritt konnte die Bindung an die Partikel bestätigt werden. Eine Auflistung von charakteristischen Banden ist in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Charakteristische Schwingungen in Partikel NP4.

Kurve	Wellenzahl [cm^{-1}]	Schwingung
Schwarz	1040	Si-O (Nanopartikel)
	1710	C=O (Maleimid)
	1455	Triazol (HO)
	1615	Triazol (HO)
Grau (nur zusätzliche Banden)	1600	Amine (Acridine Orange)

Um neben der Bindung beider Moleküle auch die Integrität der beiden Farbstoffe zu bestätigen, wurden die Partikel in einer basischen DMSO-Lösung aufgelöst. Von den Lösungen wurden Absorptionsspektren aufgenommen und mit Absorptionsspektren der molekularen Farbstoffe, sowie den Partikeln NP3 verglichen. Die Spektren der beiden Partikelsorten sind in Abbildung 39 und 40 gezeigt.

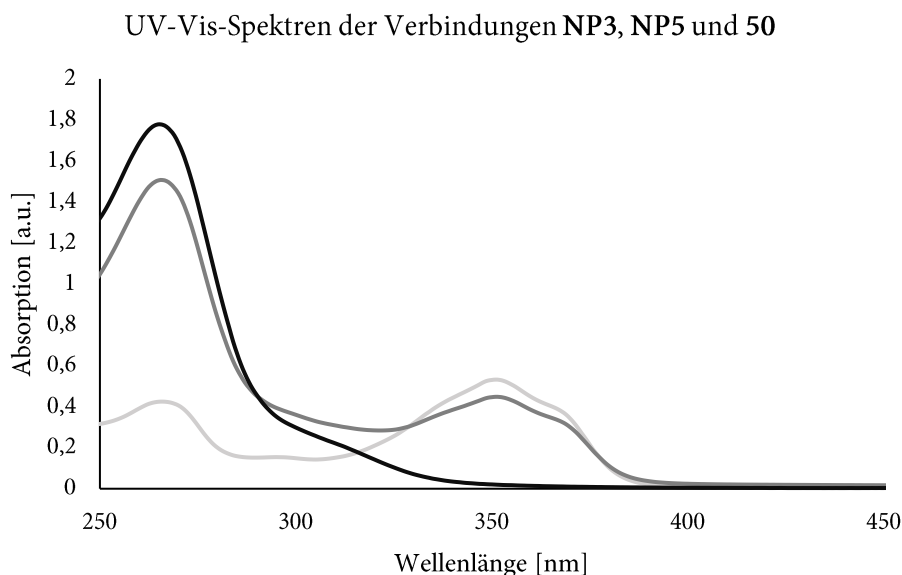


Abb. 39: UV-Vis-Spektren zur Bestätigung der Integrität der beiden Farbstoffe in Konjugation mit den Partikeln. Schwarz: NP3; Grau: 50; Hellgrau: NP5.

Zu sehen sind die Absorptionskurven der Partikel NP3 (schwarz), des Farbstoffes 50 (grau) und der Partikel NP5 (hellgrau). Es ist deutlich zu sehen, dass die Absorption, die bei 350 nm ihr Maximum erreicht, nicht von den Partikeln selber kommt und zudem Deckungsgleich zu der Absorption von 50 ist. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Konjugation des Moleküls keinen Einfluss auf dessen optischen Eigenschaften hat.

Abbildung 40 zeigt die Absorptionskurven der Partikel NP4 (blau), NP3 (schwarz), NP5 (hellgrau) und 91 (grau).

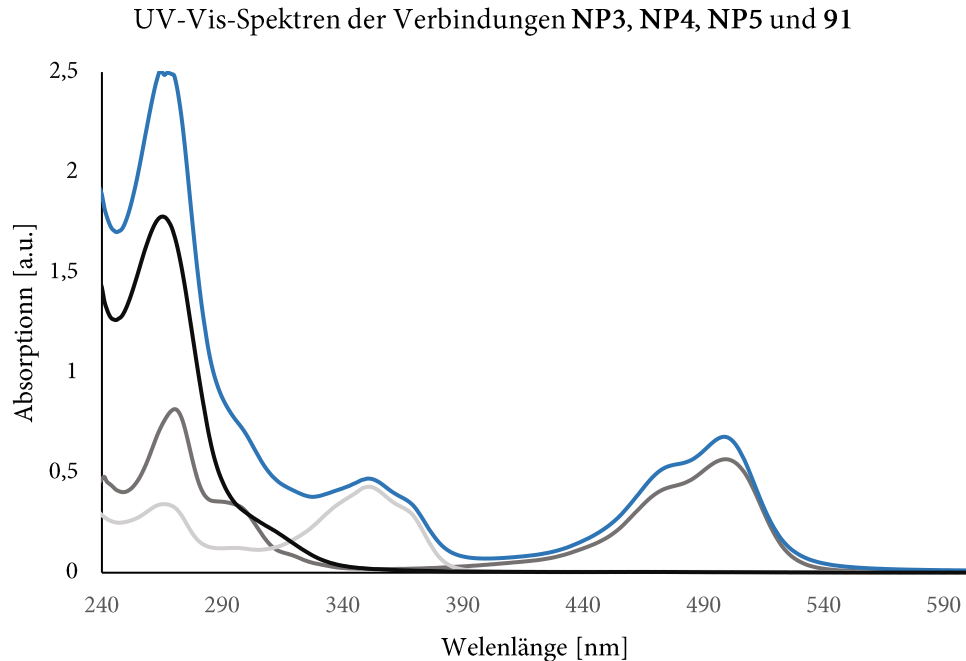


Abb. 40: UV-Vis-Spektren zur Bestätigung der Integrität der beiden Farbstoffe in Konjugation mit den Partikeln. Blau: Partikel NP4; Schwarz: Partikel NP3; Grau: 91; Hellgrau: Partikel NP5.

Auch nach der Konjugation des zweiten Farbstoffs ist zu sehen, dass die Absorptionskurven der Farbstoffe nicht durch die Konjugation beeinträchtigt sind. In diesen Experimenten konnte die erfolgreiche Synthese der Partikel bestätigt werden.

4.4. Photophysikalische Eigenschaften der Nanopartikel

Im nun Folgenden werden die Experimente beschrieben, die die Partikel hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit eines theranostischen Materials prüfen.

Es wurde zunächst getestet, ob die Bindungsfähigkeit der Hoechst-Einheit an DNA durch die Konjugation beeinträchtigt ist.

Dies geschah in einem ähnlichen Versuchsaufbau, mit dem zuvor bereits die Bindungsfähigkeit der potentiellen Sonden in Kapitel 3.2. getestet wurden. Zu 10 μg NP5 wurde eine steigende Menge DNA gegeben (0 – 10 μg) und die Emissionskurven nach Bestrahlung bei $\lambda = 360$ nm wurden aufgenommen. Dies ist in Abbildung 41 gezeigt.

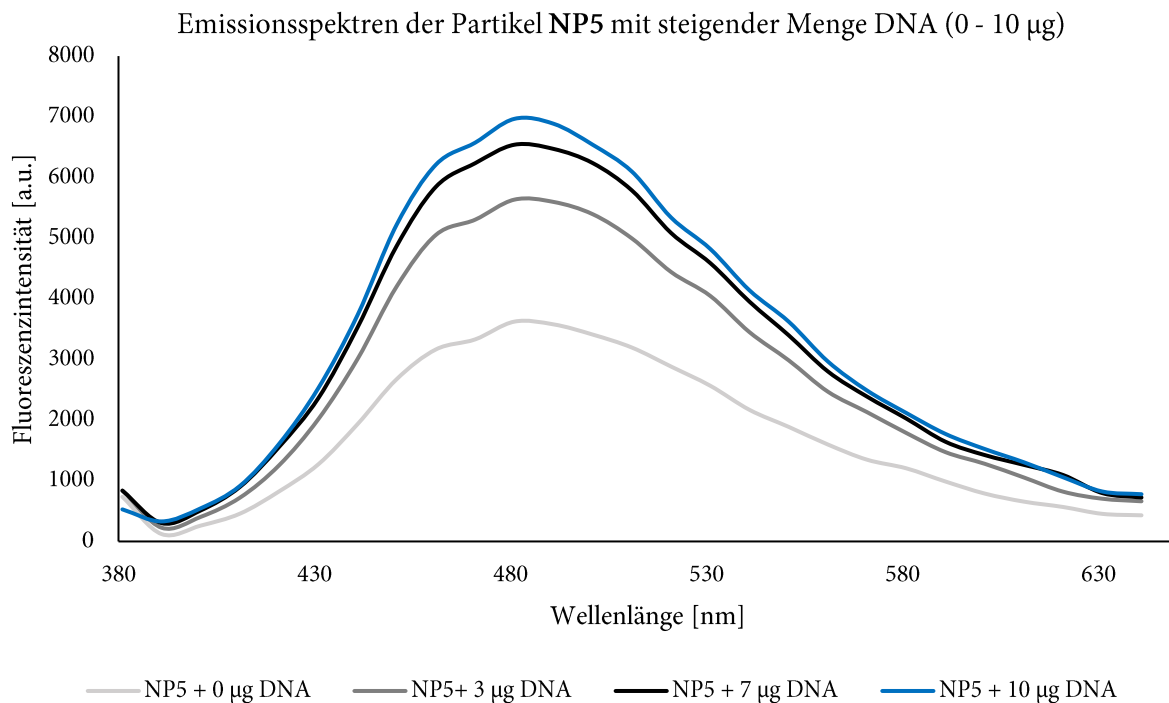


Abb. 41: Emissionsspektren einer 10 µg-Suspension der Partikel NP5 mit einer steigenden Menge DNA (0 – 10 µg). Ex: 360 nm; Em: 381 – 650 nm. Die Kurven repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten

Die Emissionsspektren zeigen eine Signalintensivierung der Emission bei steigender Zugabe von DNA. Dass die Intensivierung nicht in einem Ausmaß beobachtet wurde, wie das bei einem gelösten Molekül der Fall war, könnte an drei Gründen liegen. Die Immobilisierung führt lokal zu einer sehr hohen Konzentration des Farbstoffs, was zu Fluoreszenzlöschung führen kann.^[93] Zusätzlich könnten sterische und elektrostatische Effekte zu einer verminderten Bindefähigkeit an DNA führt. Da die Partikeloberfläche negativ geladen ist, sind repulsive Kräfte zwischen DNA und Partikel denkbar. Weiterhin ist die Partikeloberfläche lediglich zu 2 % mit 50 funktionalisiert. Die geringe Emissionsintensität könnte auch von einer geringen Substanzmenge herrühren.

Das gleiche Experiment mit Partikel NP4 wiederholt, die entsprechenden Emissionsspektren sind in Abbildung 41 gezeigt.

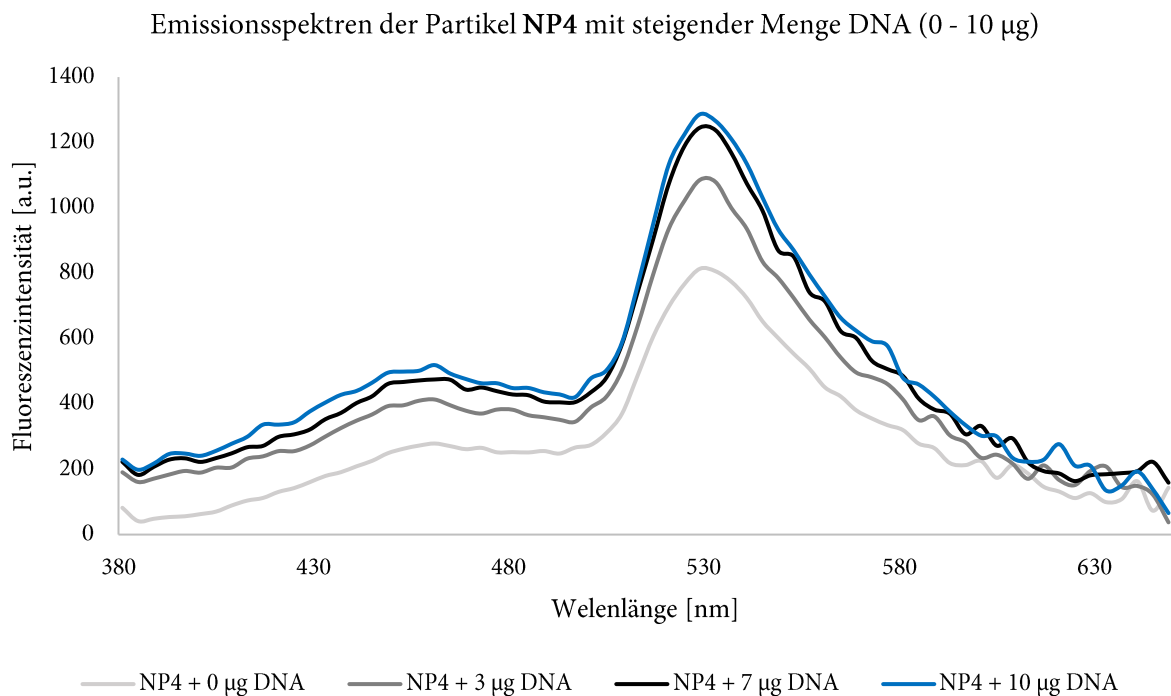


Abb. 41: Emissionsspektren einer 10 μg -Suspension der Partikel NP5 mit einer steigenden Menge DNA (0 – 10 μg). Ex: 360 nm; Em: 381 – 650 nm. Die Kurven repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten

Die Spektren dieses Experimentes unterschieden sich von denen des vorherigen. Obwohl die Einstrahlungswellenlänge unverändert blieb, ist die Emission ($\lambda = 480 \text{ nm}$) des Hoechst-Moleküls nur noch in geringem Maße sichtbar. Stattdessen wurde eine deutliche Emission bei $\lambda = 530 \text{ nm}$ detektiert, welche der Emission von Acridinorange entspricht.^[94] Dies erscheint zunächst verwunderlich, wenn das Absorptionsspektrum von Acridinorange betrachtet wird (Abbildung 42). Zwar absorbiert Acridin Orange in kleinen Mengen auch bei $\lambda = 360 \text{ nm}$, jedoch nicht in einem Maße, dass dies eine intensive Fluoreszenz erklären würde. Die fehlende Emission des eigentlich angeregten HO-Moleküls deutet einen strahlungsfreien Energieübertrag des einen Fluorophors auf den anderen an. Bei einem Vergleich der Emissionsspektren von 50 mit dem Absorptionsspektrum von 91 wird die Ursache für den Energietransfer deutlich.

Werden Emissionsspektrum von HO-Derivat 91 und Absorptionsspektrum von AO-Derivat 92 übereinandergelegt, zeigt sich eine große Überlappung der Kurven.

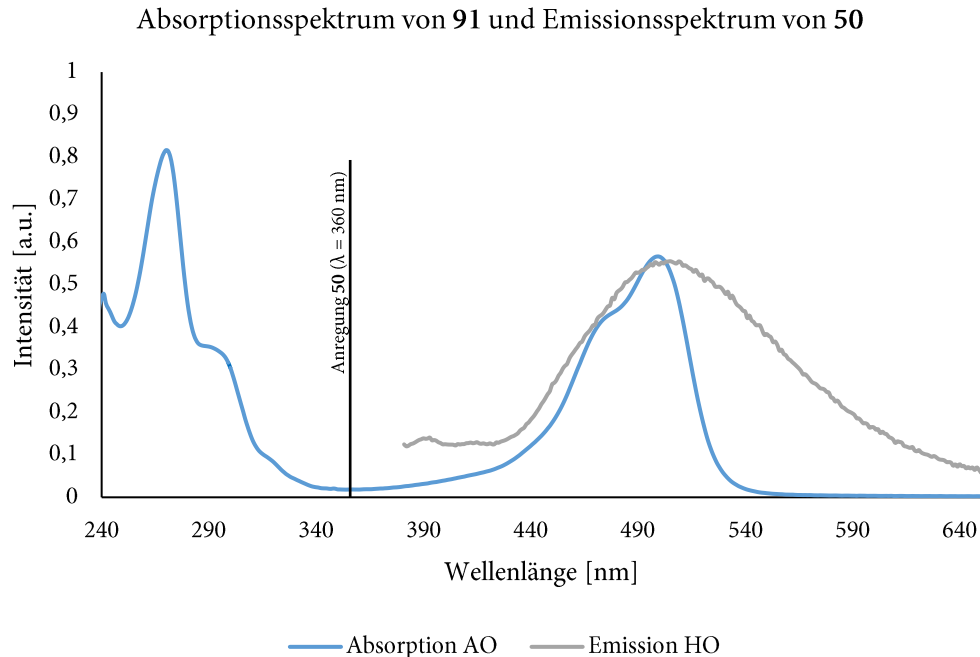


Abb. 42: Grau: Emissionsspektrum von 50 nach Anregung bei $\lambda = 360$ nm; Blau: Absorptionsspektrum von 91.

Genau diese Überlappung, in der Emission eines Donormoleküls und der Absorption eines Akzeptormoleküls ist eine der beiden Voraussetzungen für das Auftreten eines Effekts der Energieübertragung zwischen lichtsensitiven Molekülen. Dieser FÖRSTER-Resonanzenergietransfer (FRET) beschreibt einen strahlungsfreien Energietransfer über den Raum.^[95]

Neben der ersten notwendigen Voraussetzung, der passenden optischen Eigenschaften beider Moleküle, ist die zweite Voraussetzung eine räumliche Nähe beider Moleküle zueinander. Typische Abstände in denen FRET-Effekte detektiert werden können, sind 1 – 10 nm.^[95]

Es wurde aus zwei Gründen entschieden, die FRET-Eigenschaften genauer zu untersuchen. Zum einen wurden weitere Erkenntnisse zu den Materialeigenschaften erwartet. Ein auftretender FRET könnte bedeuten, dass Anregung des HO auf der Oberfläche gleichzeitig eine Anregung des AO in den Poren ermöglicht. Dadurch wäre es dem System möglich durch Anregung des einen Moleküls die Funktion des zweiten Moleküls zu aktivieren. Zum anderen wäre eine Beobachtung des FRETs eine weitere Validierung, dass das System in der Lage dazu ist, DNA zu binden.

Die notwendige räumliche Nähe der beiden Moleküle wurde in zwei Konfigurationen untersucht. Es wurde erwartet, dass eine Wechselwirkung zwischen HO und DNA einen Einfluss auf die räumliche Orientierung des gesamten Partikels hat. Es wurde angenommen, dass bei DNA-Bindung der Abstand zwischen

Partikeloberfläche und Hoechst-Molekül auf Grund der sterischen und elektrostatischen Wechselwirkungen maximal ist. Ohne Zugabe von DNA kann sich der Linker frei um die Oberfläche bewegen und eine geringere Distanz von Hoechst zur Oberfläche wurde erwartet. Der veränderte Abstand zwischen Hoechst und Oberfläche und damit auch zwischen Hoechst und Acridin Orange wäre in einer veränderten FRET-Effizienz nachweisbar. Die DNA-bindenden Eigenschaften des Systems wäre somit über dieses Experiment bestätigt.

4.4.1. Fluoreszenzlebensdauer und FRET

Zur Berechnung der FRET-Effizienz wurden Messungen der Lumineszenz-Lebensdauer der beiden Partikel NP4 und NP5 durchgeführt. Aus den Fluoreszenzabfallkurven (Abbildung 43) lassen sich durchschnittliche Fluoreszenzlebensdauern ($\bar{\tau}$) von 1.387 ns für Partikel NP5 und eine verkürzte Lebensdauer von 1.178 ns für Partikel NP4 bestimmen.

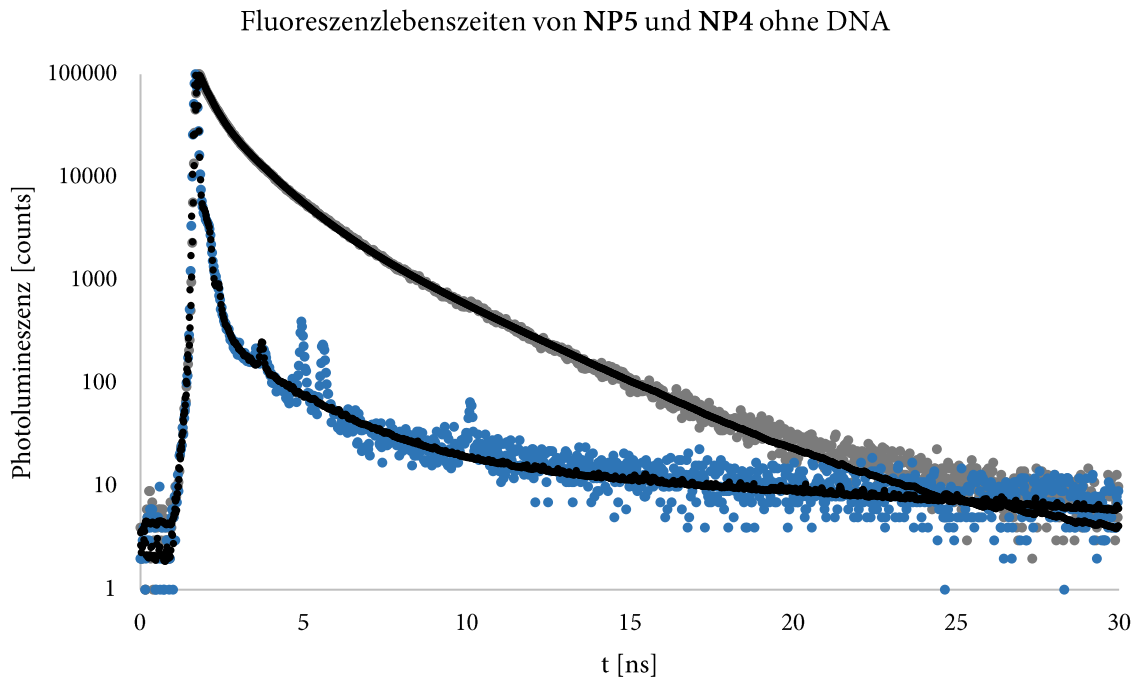


Abb. 43: Fluoreszenzlebenszeiten der Partikel NP5 (grau) und NP4 (blau) in PBS aufgenommen über einen Zeitraum von $t = 30$ ns. In schwarz sind die an die Messpunkte angepassten Funktionen gezeigt.

Die FRET-Effizienz (E) berechnet sich über Gleichung (2),

$$E = 1 - \frac{\langle \tau_{DA} \rangle}{\langle \tau_D \rangle} \quad (2)$$

wobei $\langle \tau \rangle$ die intensitätsgewichteten Fluoreszenzlebensdauern für Partikel **NP4** ($\langle \tau_{DA} \rangle$) und Partikel **NP5** ($\langle \tau_D \rangle$) beschreiben. Diese ermitteln sich aus den gemessenen Fluoreszenzlebensdauern und den Amplituden der angepassten Funktionen und berechnen sich zu $\langle \tau_{DA} \rangle = 0.021$ ns und $\langle \tau_D \rangle = 0.178$ ns. Die FRET-Effizienz für dieses System beträgt demnach $E = 88$ %.

Um den Einfluss von DNA auf das System zu untersuchen, wurden die Messungen unter Zugabe von $10 \mu\text{g}$ DNA ($c = 5 \mu\text{g/ml}$) wiederholt. Die erhaltenen Fluoreszenzabfallkurven sind in Abbildung 44 dargestellt.

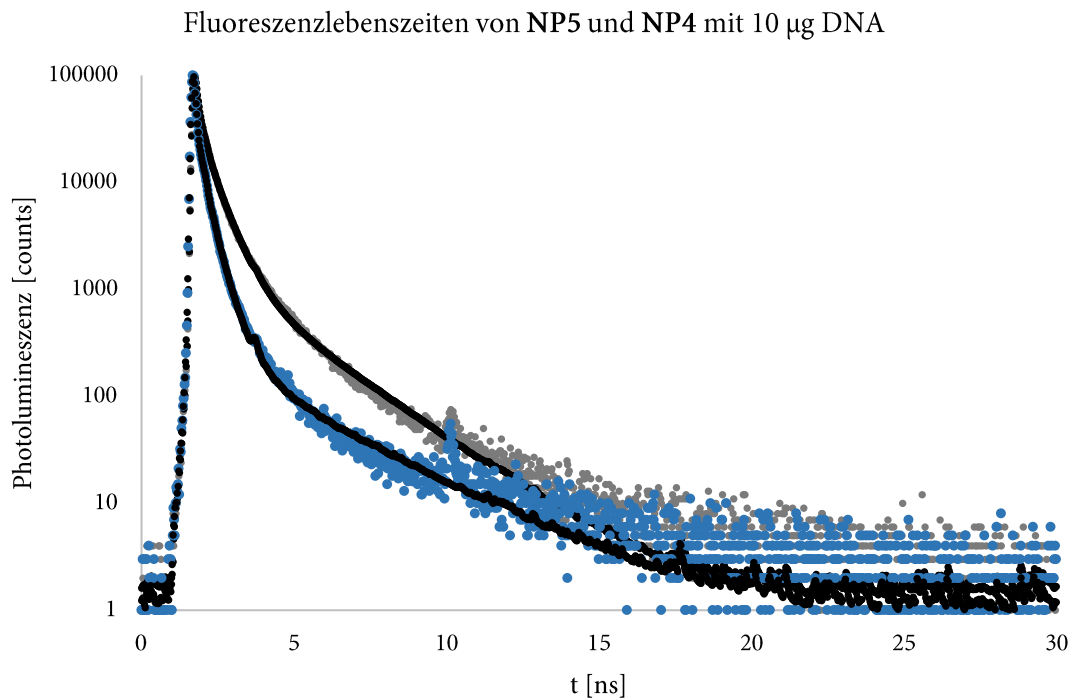


Abb. 44: Fluoreszenzlebenszeiten der Partikel **NP5** (grau) und **NP4** (blau) in PBS und der Zugabe von $10 \mu\text{g}$ DNA aufgenommen über einen Zeitraum von $t = 30$ ns. In schwarz sind die an die Messpunkte angepassten Funktionen gezeigt.

Die Fluoreszenzlebenszeiten ($\bar{\tau}$) in diesem Experiment berechnen sich zu 1.241 ns für Partikel **NP4** und 1.720 ns für Partikel **NP5**. Aus den intensitätsgewichteten Fluoreszenzlebensdauern $\langle \tau_{DA} \rangle = 0.021$ ns und $\langle \tau_A \rangle = 0.131$ ns. Die FRET-Effizienz konnte aus diesem Experiment mit 60 % berechnet werden. Wie angenommen, verringert sich die FRET-Effizienz bei Zugabe von DNA. Somit konnte in diesen Experimenten die postulierte Annahme bestätigt werden, dass die Partikel durch Funktionalisierung mit 50 DNA-bindende Eigenschaften besitzen.

4.5. Antibakterielle Eigenschaften der Nanopartikel **NP5**

Nachdem die Bindefähigkeit der Partikel an DNA validiert wurde, wurden weitere Experimente hinsichtlich der Anwendbarkeit durchgeführt. Es galt zu zeigen, dass die Partikel nicht nur an gelöst vorliegende DNA binden kann, sondern auch an eDNA in einem Biofilm. Darüber hinaus musste ebenfalls sichergestellt werden, dass die Zellgängigkeit der Partikel inhibiert ist. In Arbeiten von Liu *et al.* wurden magnetische Nanopartikel auf der Oberfläche mit Hoechst 33342 funktionalisiert.^[96] Diese Partikel konnten dann genutzt werden um sie gezielt zum Kern von eukaryotischen Zellen zu führen. Dieser Effekt sollte explizit nicht auftreten und um beide Ansprüche zu evaluieren, wurden Experimente analog zu denen in Abschnitt 3.2., durchgeführt.

Zur Evaluierung der Bindefähigkeit wurde ein Biofilm auf einem Deckglas wachsen gelassen. Die bewachsenen Deckgläser wurden im Anschluss mit Partikeln inkubiert und die Deckgläser wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Als Negativkontrolle wurde ein unbewachsenes Deckglas inkubiert und ebenfalls auf Fluoreszenz untersucht. Die aufgenommenen Bilder sind in Abbildung 45 gezeigt.

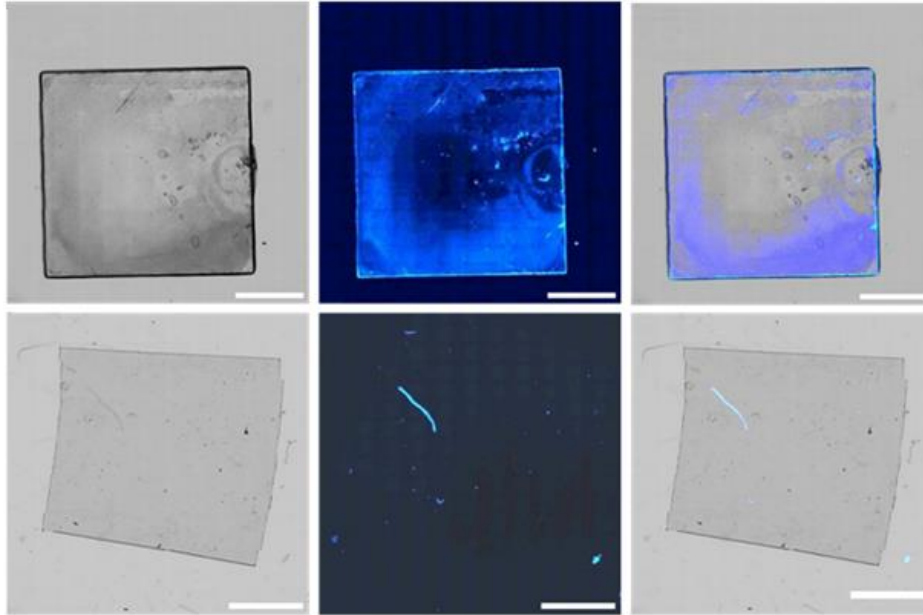


Abb. 45: Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen. a) eines mit einem *P. fluorescens* Biofilm bewachsenen Deckglases inkubiert mit Partikeln NP5 und b) eines sterilen Deckglases inkubiert mit Partikeln NP5. Erste Spalte: Hellfeldaufnahmen der Deckgläser, zweite Spalte: Aufnahmen der Deckgläser unter einem DAPI-Filter. Dritte Spalte: Übereinanderlegung beider Aufnahmen.

Die aufgenommenen Bilder zeigen eindeutig eine Interaktion der Partikel mit dem Biofilm. Die Bereiche in denen der Biofilm gewachsen ist, sind im Hellfeld als graue Schraffierungen zu sehen. Unter einem DAPI-Filter sind diese Bereiche blau fluoreszent. Werden beide Bilder übereinandergelegt, ist deutlich zu sehen, dass die Bereiche in denen der Biofilm gewachsen ist, auch die Bereiche sind, in denen die Partikel sich akkumulieren.

In der Negativkontrolle sind weder die grauen Schraffierungen des Biofilms, noch die Fluoreszenz der Partikel sichtbar. Es konnte also gezeigt werden, dass die Bindung im ersten Experiment durch die Bindung der Partikel an den Biofilm zu Stande kommt und nicht durch Interaktion mit dem Material. Es ist also nicht nur möglich die Partikel an gelöste DNA zu binden, sondern auch an einen bakteriellen Biofilm, was es ermöglicht die Partikel in räumliche Nähe eines Infektionsherdes zu bringen.

Zur Evaluierung der Zellgängigkeit wurde ein Inkubationsexperiment mit CHO-Zellen gewählt. Adhärente CHO-Zellen wurden mit Partikeln inkubiert. Als Positivkontrolle wurde die gleiche Zellzahl mit HO 33342 inkubiert. Die Zellen wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 46 dargestellt.

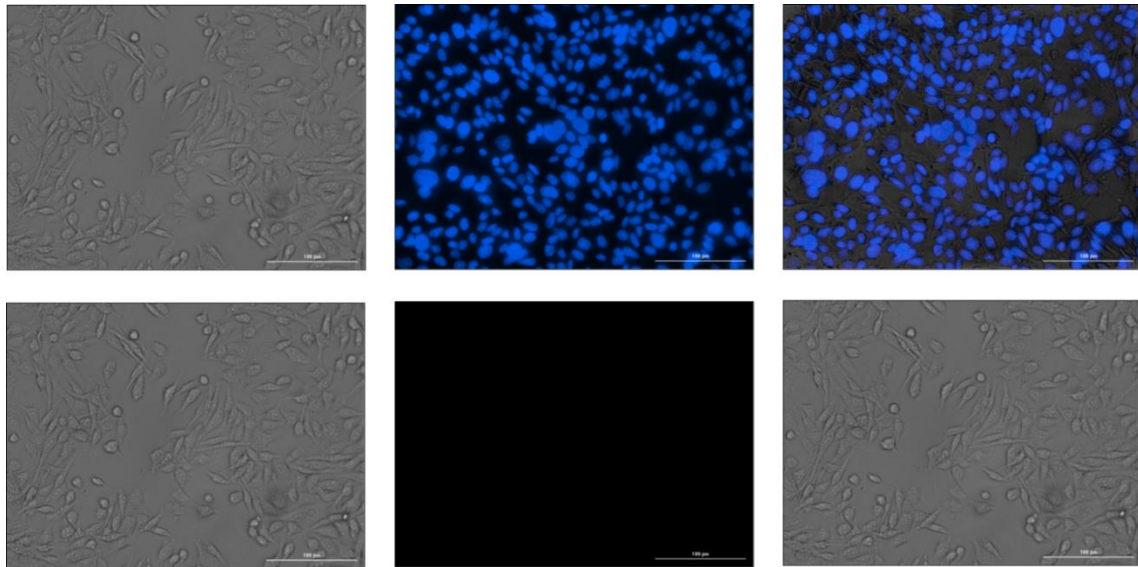


Abb. 46: Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von adhärennten CHO-Zellen. a) CHO-Zellen inkubiert mit Partikeln NP5 und b) CHO-Zellen inkubiert mit Hoechst 33342 (5 µM). Erste Spalte: Hellfeldaufnahmen der Zellen, zweite Spalte: Aufnahmen der Zellen unter einem DAPI-Filter. Dritte Spalte: Übereinanderlegung beider Aufnahmen.

Die Zellen sind in beiden Experimenten im Hellfeld deutlich zu erkennen, während bei der Inkubation mit HO 33342 unter einem DAPI-Filter die charakteristische blaue Fluoreszenz sichtbar ist, ist diese bei der Inkubation mit den Partikeln nicht detektierbar.

Mit diesen beiden Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Partikel in Interaktion mit einem Biofilm treten und an diesen binden, gleichzeitig aber nicht fähig sind eine Zellmembran zu durchdringen und somit nicht mit genomischer DNA interagieren können.

Nachdem die Bindefähigkeit der Partikel an einen Biofilm bestätigt war und somit die räumliche Nähe der Partikel zu den Bakterien sichergestellt ist, sollten nun die antimikrobiellen Eigenschaften des Materials evaluiert werden. Wie in der Zielsetzung dieses Kapitels erwähnt, sollte dies über eine Anwendung der aPDT geschehen. In einem ersten Experiment wurde untersucht, ob die Partikel nach Bestrahlung in der Lage sind ROS zu produzieren. Für die Evaluierung wurde ein Harnsäure-Abbau-Assay gewählt. Der Abbau kann durch das abnehmende UV-Vis-Signal bei $\lambda = 292$ nm gezeigt werden.^[97] Abbildung 47 zeigt die Ergebnisse des Harnsäureabbau-Assays.

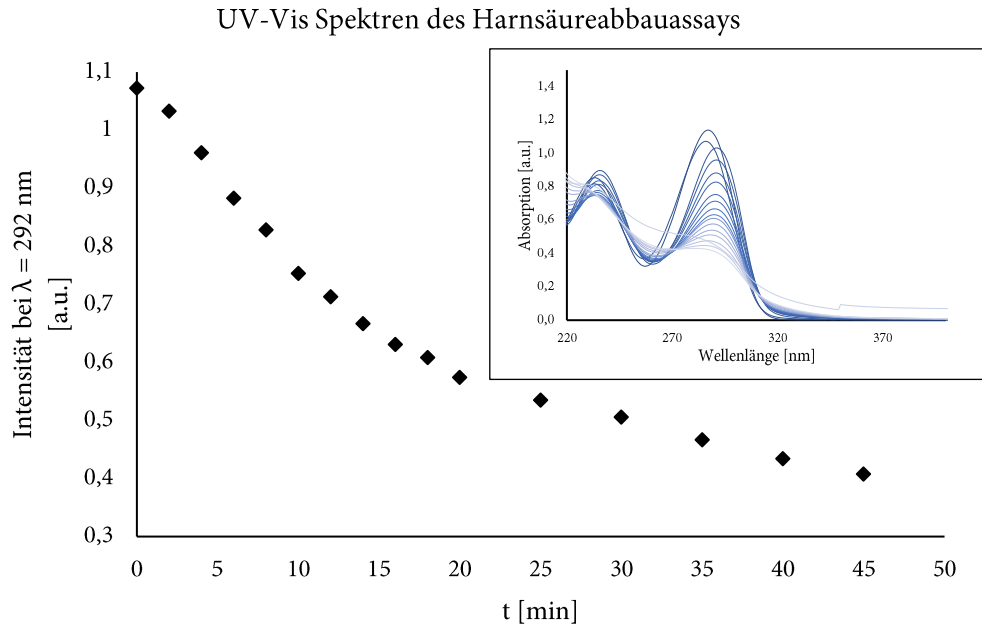


Abb. 47: Ergebnisse des Harnsäure-Zersetzungsassays. Graphische Darstellung der Abnahme der UV-Vis-Intensität bei $\lambda = 292 \text{ nm}$ über einen Zeitraum von 45 min; Einlass: Dazugehörige UV-Vis-Spektren im Bereich $\lambda = 220 - 400 \text{ nm}$.

Bei der Bestrahlung einer Harnsäurelösung führt die Anwesenheit von **NP5** zu einem effizienten Abbau des Signals im UV-Vis-Spektrum (siehe Abbildung 47, Einlass). Dieses Ergebnis zeigt, dass $^1\text{O}_2$, was in den Poren von **NP5** entsteht, effizient aus ihnen herausdiffundiert und die Partikel somit für einen Einsatz in der antibakteriellen photodynamischen Therapie geeignet sind.

Als abschließendes Experiment wurde ein Inkubations-/Bestrahlungsexperiment an einem gewachsenen Biofilm durchgeführt. Ein Biofilm wurde mit einer ansteigenden Menge an **NP5** ($0 - 250 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) inkubiert und 180 Minuten lang mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 480 \text{ nm}$ bestrahlt. Die Anzahl der lebenden Bakterien nach dieser Behandlung wurde durch CFU-Zählung des verbleibenden Biomaterials bestimmt. Als Kontrollexperimente wurden Biofilme zum einen ohne Zugabe von Partikeln für 180 min bestrahlt und zum anderen mit $250 \mu\text{g/ml}$ **NP5** im Dunkeln inkubiert. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 48 und Abbildung 49 dargestellt.

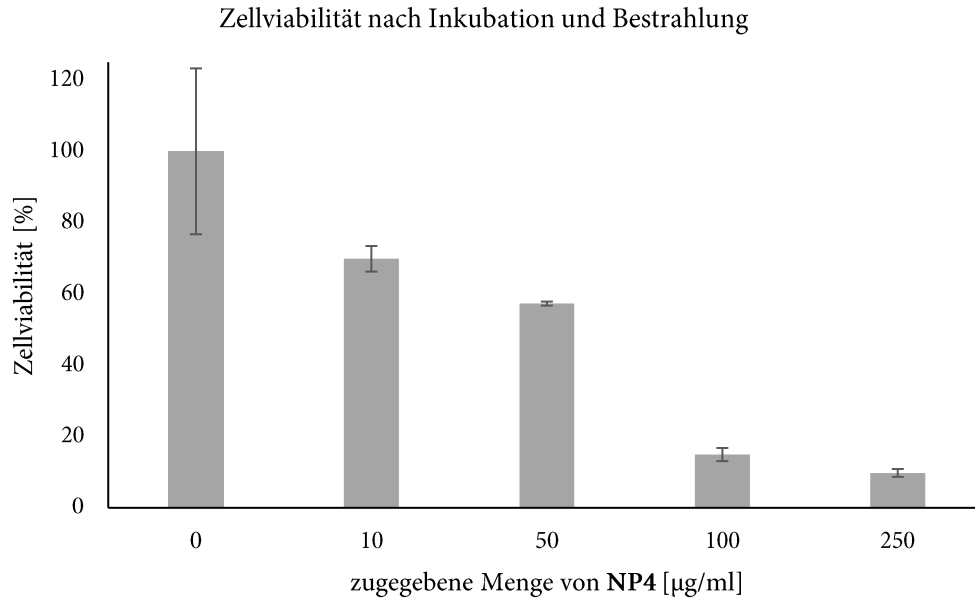


Abb. 48: Zellviabilität basierend auf CFU-Zählungen nach der Inkubation und Bestrahlung von *P. fluorescens*-Biofilmen über einen Zeitraum von 3 h mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 480$ nm. Die Höhe der Säulen repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten. Die Standardabweichung ist angegeben.

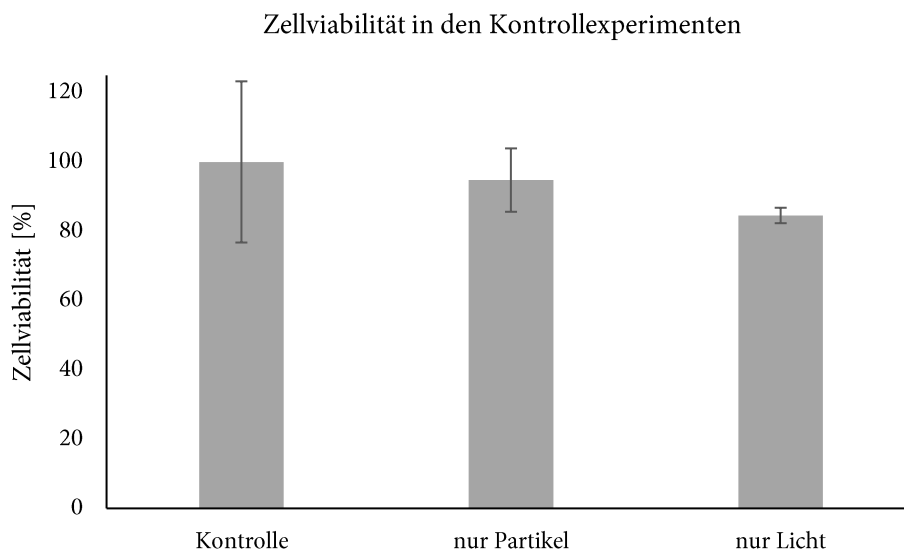


Abb. 49: Zellviabilität der Kontrollexperimente basierend auf CFU-Zählungen. Die Höhe der Säulen repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten. Die Standardabweichung ist angegeben.

Entwicklung eines Nanopartikel-basierenden Ansatzes zur Behandlung bakterieller Infektionen

Die Zugabe der Partikel führte bereits bei der kleinsten gewählten Menge (10 µg/ml) zu einer Minderung der Zellviabilität um 30 %. Dieser Effekt stieg auf bis zu 90 % (Zellviabilität < 10 %) mit der höchsten zugesetzten Menge an Partikeln (250 µg/ml). Die Kontrollexperimente zeigen, dass die Einflüsse des Lichts beziehungsweise der Partikel allein einen vernachlässigbaren Effekt haben. Die Zellviabilität in den Kontrollexperimenten betrug 94 % für die inkubierten Biofilm, bzw. 85 % für den bestrahlten Biofilm. Dieser Effekt ist geringer, als bei der Zugabe der kleinsten Menge an Partikeln. Diese Ergebnisse sind bemerkenswert, da die Bakterien in einem Biofilm stark vor Umwelteinflüssen geschützt sind und daher schwerer zu bekämpfen, als in planktonischer Form.

5. Zusammenfassung und Ausblick

5.1. Synthese und Evaluierung molekularer PET-Sonden zur Diagnose bakterieller Infektionen

Bakterielle Infektionen stellen in allen Bereichen der Medizin eine große Herausforderung dar, deren frühzeitige Diagnose eine wichtige Aufgabe ist. Eine gezielte Diagnose erfolgt bis heute standardmäßig über mikrobiologische Verfahren, die zeitintensiv sind und überwiegend invasiv erfolgen.

Die Entwicklung einer neuartigen, nicht-invasiven Diagnosemethode für bakterielle Infektionen war das Ziel dieser Arbeit. Dazu wurden zunächst fünf Verbindungen synthetisiert, deren Anwendbarkeit im Folgenden getestet wurde. Das Design der Sonde basierte auf bekannten DNA-bindenden Molekülen, welche eine Funktionalisierung erlaubten ohne dabei ihre bindenden Eigenschaften zu verlieren.^[57-60] Als mögliche DNA-bindende Bausteine wurden zwei Acridin-Derivate, ein 1,8-Naphtalinimid-Derivat, sowie ein Derivat des Bisbenzimidazols HO 33342 gewählt. Die Detektion der Sonde erfolgte mittels Radioaktivität. Dafür wurden die DNA-bindenden Einheiten mit dem cyclischen Chelator DOTA funktionalisiert, der im Späteren mit ^{68}Ga radioaktiv markiert wurde. Über PEG-basierte Linker wurden die beiden Einheiten verbunden. In Abbildung 50 sind die dargestellten Moleküle gezeigt. Neben einem einfachen PEG-linker-System wurde ebenfalls ein TRIS-basiertes linkersystem entwickelt, dass eine Funktionalisierung mit bis zu drei verschiedenen Einheiten ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde lediglich ein Linkersystem mit drei gleichen Resten dargestellt, jedoch wurde die generelle Syntheseroute zu einer solchen Sonde gezeigt.

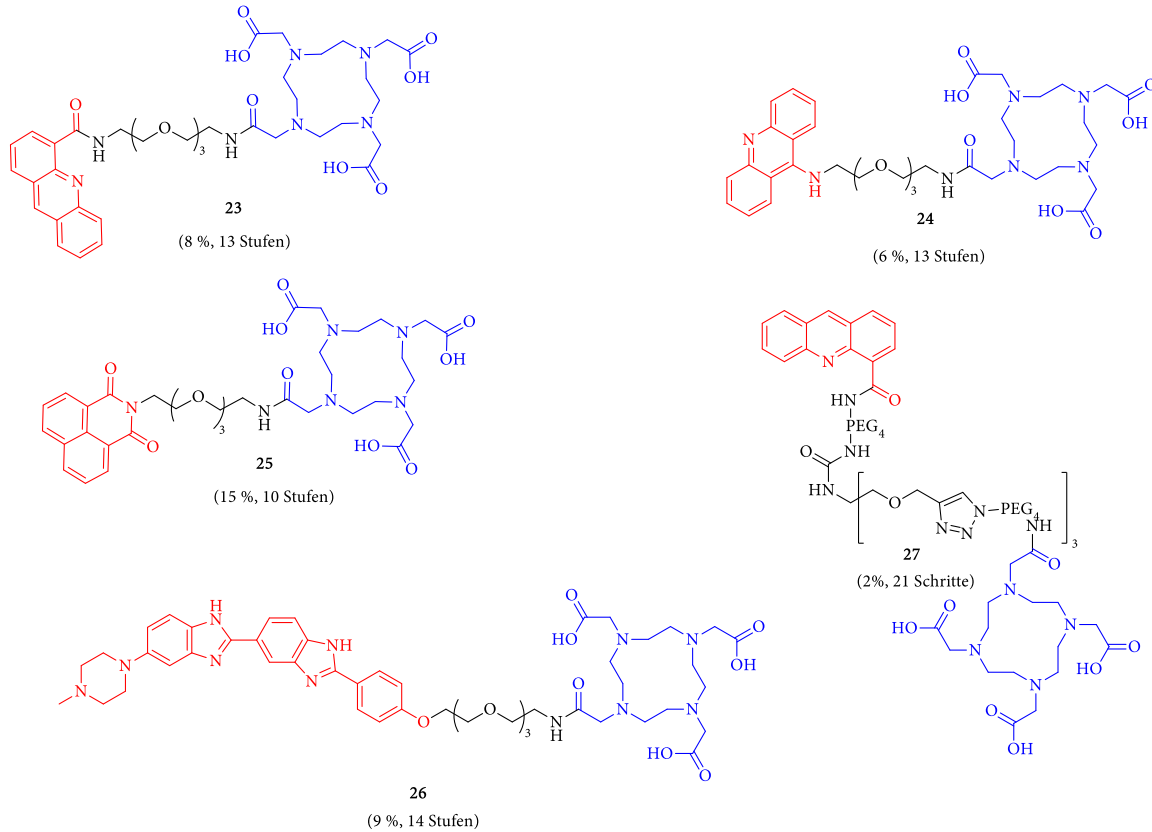
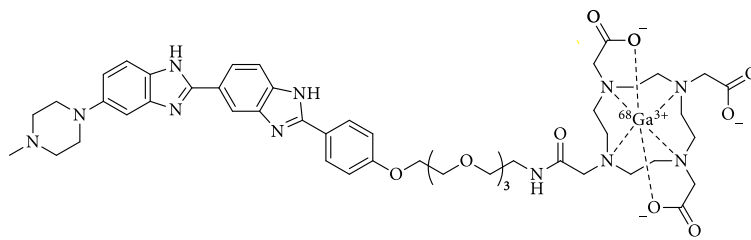


Abb. 50: Strukturen der dargestellten Sonden. Rot: DNA-bindende Einheit, schwarz: linker; blau: chelatisierende Einheit für die Radiomarkierung.

Die Anwendbarkeit der Sonden wurde zunächst mit Fluoreszenzmessungen evaluiert. Verbindung **26** konnte in diesen Experimenten als geeignetster Kandidat selektiert werden. Diese Ergebnisse wurden im Anschluss mit radioaktiven Eigenschaften bestätigt. Dazu wurde **26** zunächst mit ^{68}Ga markiert, um **26*** zu erhalten. Die Markierung erfolgte innerhalb von 10 Minuten und lieferte **26*** in hoher Reinheit und in einer Radioausbeute von 60 %. Die Struktur der markierten Sonde **26*** ist in Abbildung 51 gezeigt.



26*

Abb. 51: Struktur der radioaktiv markierten Sonde **26***.

In Inkubationsexperimenten wurde die Aufnahme der Sonde in Biofilme der Stämme *P. fluorescens*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *E. coli* sowie in CHO-Zellen und THP-1 Makrophagen untersucht, indem die Rückstände nach dem Entfernen der Inkubationslösung auf ihre Radioaktivität bestimmt wurden. Die Aktivitäten wurden dabei auf die vorhandene Biomasse normiert, als Indikator dafür diente die Gesamtmenge an DNA in jeder Probe.

Das Resultat der Experimente war, dass Sonde 26* zu jedem Biofilm der getesteten Stämme eine höhere Affinität aufwies, als zu den eukaryotischen Zellen. Die Anwendbarkeit der Sonde konnte somit auch auf Grundlage von radioaktiven Eigenschaften bestätigt werden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: Faktor der erhöhten normierten Aufnahme in die Biofilme gegenüber den getesteten eukaryotischen Zellen. In Klammern genannt ist die zugegebene Menge Aktivität, bei der die größte Selektivität der Biofilme gegenüber den eukaryotischen Zellen detektiert wurde.

	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
THP-1 Zellen	37 (25 kBq)	19 (25 kBq)	4 (50 kBq)	44 (50 kBq)
CHO-Zellen	48 (25 kBq)	58 (10 kBq)	15 (10 kBq)	119 (10 kBq)

Es gelang die bisher erste Synthese einer Hoechst basierten PET-Sonde. Die Synthese des Grundkörpers erfolgte zunächst nach einer bekannten Synthese^[89], konnte jedoch optimiert werden, sodass die Synthese in einer Gesamtausbeute von 9 % über 14 Schritte realisiert wurde. In *in vitro* Experimenten konnte das Gesamtkonzept validiert werden und eröffnet neue Möglichkeiten der nicht-invasiven Diagnose von bakteriellen Infektionen.

5.2. Entwicklung eines Nanopartikel-basierten Ansatzes zur Behandlung bakterieller Infektionen

Neben der Entwicklung eines Konzepts zur Detektion einer bakteriellen Infektion, war auch die Entwicklung eines Konzepts zur Behandlung einer solchen das Ziel dieser Arbeit. Da es die beschriebenen Schwierigkeiten in der Unterscheidung der Ursache einer Infektion gibt, werden häufig präventiv Antibiotika verschrieben, was die Ausbildung von bakteriellen Resistenzen beschleunigt. Aus diesem Grund war die Entwicklung eines nicht-Antibiotika basierten Therapiekonzepts ein weiteres Ziel. Ein

materialbasierter Ansatz, basierend auf funktionalisierbaren porösen Organosilika Nanopartikeln stellte dafür die Grundlage.

Durch Konjugation des Hoechst-Derivats **50** auf die Partikeloberflächen wurde die eDNA-bindende Eigenschaft von **50** genutzt, um die Partikel in geringe Distanz zu einem Biofilm zu bringen.^[65]

Die Poren wurden mit dem AO-Derivat **91** funktionalisiert. Die AO-Einheit wurde als Photosensibilisator genutzt um durch ROS-Freisetzung eine antibakterielle Wirkung zu zeigen. Auf Grund der optischen Eigenschaften und der räumlichen Nähe beider Farbstoffe konnte mittels Fluoreszenz-Lebensdauermessungen die Ausbildung eines FRET gezeigt werden. Dieser wurde genutzt um die Bindefähigkeit der Partikel an DNA nachzuweisen.

Die antibakterielle Wirkung wurde in einem Inkubations-/Bestrahlungsexperiment gezeigt. Biofilme wurden mit steigender Menge der Partikel **NP4** inkubiert und für 3 h mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 480$ nm bestrahlt. Eine nachfolgende CFU-Bestimmung zeigte, dass durch die Behandlung bis zu 90 % der lebenden Bakterien im Biofilm getötet wurden.

Die generelle Anwendbarkeit der Nanopartikel in einer aPDT konnte gezeigt werden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass bei der Wahl passender Moleküle in dem System FRET nachgewiesen werden kann. Auch wenn FRET in diesem System lediglich zur Validierung der DNA-Bindefähigkeit genutzt wurde, könnte der beobachtete FRET von der Oberfläche der Partikel innerhalb ihrer Poren eine Schlüsselrolle spielen, um das System im Hinblick auf ein breiteres Spektrum medizinischer Anwendungen zu verbessern. Bei der Wahl geeigneter Moleküle könnte der FRET genutzt werden, um eine zweite Reaktion auszulösen, beispielsweise die Freisetzung eines antimikrobiellen Moleküls.

6. Experimentalteil

6.1. Allgemeine Vorbemerkungen

Alle nichtwässrigen Reaktionen wurden unter trockener Ar-Atmosphäre durchgeführt, wobei standardmäßig Schlenk-Linien-Techniken verwendet wurden. Handelsübliche Chemikalien und Lösungsmittel wurden, sofern nicht anders beschrieben, ohne weitere Aufreinigung verwendet und von Sigma-Aldrich, Acros Organics, Alfa Aesar und Fluorochem bezogen. Deuterierte Lösungsmittel wurden von der Deutero GmbH bezogen. Alle verwendeten Farbstoffe wurden von der Lumiprobe GmbH bezogen. Für feuchtigkeitsempfindliche NMR-Proben wurden die Lösungsmittel über AlO_x getrocknet.

CHROMAFIL® Xtra PTFE-45/25 Spritzenvorsatzfilter von Macherey-Nagel mit einer Porengröße von 0,45 µm wurden zur Filtration von Lösungen vor der automatisierten chromatographischen Aufreinigung verwendet.

THF wurde über Na/Benzophenon getrocknet und unter Ar-Atmosphäre destilliert. NEt₃ wurde über KOH und DIPEA über CaH₂ unter N₂-Atmosphäre destilliert.

Das Molekularsieb wurde durch Erhitzen auf 160 °C im Hochvakuum über Nacht aktiviert, bevor es verwendet wurde.

Zur Kühlung der Reaktionen wurden Eis-Salz-Gemische für -20 °C und Trockeneis-Aceton-Gemische für -78 °C verwendet.

Die organischen Lösungsmittel wurden, sofern nicht anders angegeben, bei einer reduzierten Temperatur von 45 °C mit einem Rotationsverdampfer entfernt. Wässrige Lösungen wurden durch Gefriertrocknung mit einem Alpha 2-4 Gefriertrocknungsanalogon von Christ konzentriert.

Alle NMR-Experimente wurden mit einem Bruker-Spektrometer des Typs DPX-400 (¹H: 400,13 MHz, ¹³C{¹H}: 100,61 MHz), DPX-500 (¹H: 500,13 MHz, ¹³C{¹H}: 125,76 MHz) und DPX-600 (¹H: 600,33 MHz, ¹³C{¹H}: 150,95 MHz) bei Raumtemperatur in den angegebenen deuterierten Lösungsmitteln durchgeführt. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm relativ zu Si(CH₃)₄ angegeben. Alle Proben für die ¹H-Spektroskopie enthalten als Referenz das Restprotonensignal des jeweiligen Lösungsmittels

(Chloroform: δ ($^1\text{H-NMR}$) = 7.26 ppm, Methanol: δ ($^1\text{H-NMR}$) = 3.31 ppm, Dimethylsulfoxid: δ ($^1\text{H-NMR}$) = 2.50 ppm, Aceton: δ ($^1\text{H-NMR}$) = 2.05 ppm, Wasser: δ ($^1\text{H-NMR}$) = 4,79 ppm). Alle Proben für die ^{13}C -Spektroskopie wurden auf das Lösemittelsignal bezogen und breitbandig entkoppelt aufgezeichnet (Chloroform: δ ($^{13}\text{C-NMR}$) = 77.2 ppm, Methanol: δ ($^{13}\text{C-NMR}$) = 49.0 ppm, Dimethylsulfoxid: δ ($^{13}\text{C-NMR}$) = 39.5 ppm). Die Kopplungskonstanten J sind in Hz angegeben und die entsprechenden Signalmultiplikationen werden wie folgt abgekürzt:

Singulett (s), Duplett (d), Triplett (t), Quartett (q) und Multiplett (m). Für die Verarbeitung und Auswertung der Spektren wurde TOPSPIN verwendet.

Die hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS) wurde mit einem Waters Micromass LCT-Premier-Spektrometer durchgeführt. Es wurden eine Lockspray Dual Ion Source und ein Waters Alliance 2695 System verwendet. Die Ionisierung erfolgte durch Elektrospray-Ionisierung (ESI). Alle Werte sind in Masse/Ladung (m/z) angegeben.

Die LC-MS-Daten für die Reaktionskontrollen wurden wie angegeben für die jeweiligen Verbindungen entweder mit einem Agilent-HPLC-System der Serie 1100, das mit einem Esquire 3000plus MS-Detektor gekoppelt ist, unter Verwendung von C8-HPLC-Säulen gemessen.

Methoden:

DEFAULT.M (ESI-MS+): 0 min, 97 % H_2O / 3 % MeCN (0,05 % TFA); 1,5 min, 97 % MeCN / 3 % H_2O (0,05 % TFA); 2 min, Laufzeitende; 1 ml/min; 30 °C.

DEFAULTUNPOL.M (ESI-MS+): 0 min, 97 % H_2O / 3 % MeCN (0,05 % TFA); 1 min, 97 % MeCN / 3 % H_2O (0,05 % TFA); 2 min, Laufzeitende; 1 ml/min; 30 °C.

Die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) für die Analyse der Radiomarkierung von Sonde **26*** wurde an einer LaChrome 7000-Serie von Merck mit einer Luna C18 LC-Säule (250 mm x 4,6 mm, Phenomenex) mit dem folgenden Gradienten durchgeführt: 0 min, 99 % H_2O / 1 % MeCN (0,05 % TFA); 30 min, 99 % MeCN / 1 % H_2O (0,05 % TFA); 30 min, 1 ml/min; 30 °C.

Die Säulenchromatographie wurde unter Überdruck mit den angegebenen Lösungsmittelgemischen manuell oder automatisch mit einem Reveleris Prep. System von Buchi durchgeführt und erfolgte entweder

mit Kieselgel von Macherey-Nagel (Teilchengröße: 40-63 µm, Normalphase) oder mit C18-modifiziertem Kieselgel von Macherey-Nagel (Teilchengröße: 40-63 µm, reversed phase) als stationäre Phasen. Bei der Normalphasensäulenchromatographie wurde das Rohprodukt entweder als Lösung in das Ausgangseluentengemisch gegeben oder auf Celite immobilisiert. Bei der Reversed-Phase-Säulenchromatographie wurde das Rohprodukt als Lösung im Ausgangseluentengemisch aufgetragen, und es wurden Laufmedien mit 0,05 % TFA verwendet.

In den Tabellen 22 – 24 sind die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Medien aufgelistet. Die für die Zellkultur verwendeten Medien und Zusätze wurden kommerziell erworben: *Ham's F-12 nutrition mix* (Gibco), *FBS* (Gibo), *RPMI-1640 medium* (Gibco), *Accutase* (400 – 600 Einheiten/ml, Sigma-Aldrich), *Gentamicin* (c = 5 µg/ml, Sigma-Aldrich)

Tabelle 22: Zusammensetzung des PBS-Puffers.

Komponente	Konzentration [g·l ⁻¹]
NaCl	8,00
KCl	0,20
Na ₂ HPO ₄	1,42
KH ₂ HPO ₄	0,27

Tabelle 23: Zusammensetzung des TSB-Mediums.

Komponente	Konzentration [g·l ⁻¹]
Pepton S	3,00
Casein	17,0
D(+)-Glukose	1,42
KH ₂ HPO ₄	0,27
pH	7,3

Tabelle 24: Zusammensetzung des LB-Mediums.

Komponente	Konzentration [g·l ⁻¹]
Pepton 140	10,0
Hefeextrakt	5,00
NaCl	0,27
pH	7,3

Die verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 25 aufgelistet.

Tabelle 25: Verwendete Bakterienstämme.

Name	Erläuterung
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> WST-1
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> SA113
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> K12

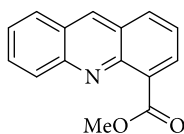
Die verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 26 aufgelistet

Tabelle 26: Verwendete Zelllinien.

Name	Erläuterung
CHO	CHO-d3/ADB44081
THP-1	THP-1 TIB-202

6.2. Chemische Synthesen

6.2.1. Chemische Synthesen der DNA-bindenden Bausteine



39

Methylacrididin-4-Carboxylat

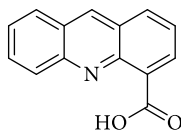
Das in dieser Reaktion verwendete Lösungsmittel wurde zunächst mittels des *freeze-pump-thaw*-Verfahrens entgast. Dazu wurde Lösungsmittel in einem Kolben vorgelegt, welcher mit einem Kükenhahn versehen wurde. Bei geschlossenem Hahn wurde das Lösungsmittel in flüssigem Stickstoff eingefroren. Sobald das Lösungsmittel gefroren war, wurde der Hahn geöffnet und Gasphase des Kolbens wurde für 10 Minuten evakuiert. Im Anschluss wurde der Hahn verschlossen und der Kolben wurde erwärmt, bis sich das Lösungsmittel wieder verflüssigt hat. Dieses Prozedere wurde drei weitere Male durchgeführt.

2-Bromobenzaldehyd **37** (1652 mg, 8.9 mmol), Bis(dibenzylideneacetone)palladium (227 mg, 0.3 mmol), Xantphos (287 mg, 0.5 mmol) und Cs_2CO_3 (2742 mg, 19.9 mmol) wurden bei Raumtemperatur in 1,4-Dioxan (20 ml) vorgelegt. Die entstandene Suspension wurde für 5 Minuten gerührt und Anthranilsäuremethylester **38** (1500mg, 9.9 mmol) zum Gemisch gegeben wurde. Im Anschluss wurde die Reaktion für 18 h bei 115 °C gerührt. Nach dieser Zeit wurde die Reaktionslösung im Vakuum eingengt und der Rückstand wurde mit gesättigter NH_4Cl -Lösung und EtOAc aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc extrahiert und die vereinten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Das erhaltene Rohprodukt wurde in 5 ml konzentrierter Schwefelsäure aufgenommen und für 1 h bei 80 °C gerührt. Die entstandene Lösung wurde nach dieser Zeit in kaltes Wasser gegossen und der gebildete Niederschlag wurde gefiltert. Das Filtrat wurde durch Zugabe von NaOH auf pH = 11 eingestellt und die wässrige Phase wurde mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde

säulenchromatographisch (PE/EE = 15/1 – 6/1) gereinigt. **39** (1368 mg, 5.8 mmol, 65 %) wurde als gelbes Öl erhalten.

¹H-NMR (MHz, CDCl₃): δ 8.75 (s, 1 H), 8.29 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H), 8.06 – 8.14 (m, 2 H), 7.95 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H), 7.73 – 7.82 (m, 1 H), 7.47 – 7.57 (m, 2 H), 4.11 (s, 3 H) ppm.^[98]

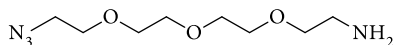


92

Acridine-4-Carbonsäure

39 (1328 mg, 5.6 mmol) wurde bei Raumtemperatur in THF (56 mL) gelöst. Der Lösung wurde eine LiOH-Lösung (1 M, 9.0 mmol, 9.0 mL) zugegeben und für 12 h gerührt. Nach dieser Zeit wurde die Reaktionslösung im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde mit einer KHSO₄-Lösung auf pH = 2 eingestellt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. **92** (735 mg, 3.3 mmol) wurde als gelbes Öl erhalten und ohne weitere Reinigungsschritte im nächsten Schritt verwendet.

¹H-NMR (MHz, CDCl₃): δ = 9.04 (s, 1H), 8.93 (dd, *J* = 7.1, 1.5 Hz, 1H), 8.29 (dd, *J* = 8.4, 1.5 Hz, 1H), 8.25 (dd, *J* = 8.8, 1.0 Hz, 1H), 8.13 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.99 – 7.91 (m, 1H), 7.81 – 7.63 (m, 2H) ppm.^[98]



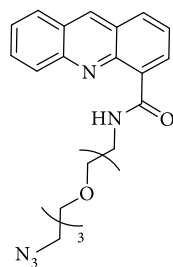
42

2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-Amin

40 (8.3 ml, 47.9 mmol) wurde in CH₂Cl₂ (48 ml) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Der Lösung wurden Methansulfonylchlorid (8.2 ml, 105.3 mmol) und Triethylamin (14.0 ml, 105.3 mmol) zugetropft. Die entstehende Suspension wurde für 16 h gerührt und erwärmte sich dabei auf Raumtemperatur. Das Lösungsmittel wurde im Anschluss unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde in wässriger HCl-Lösung (1 M) aufgenommen. Die wässrige Lösung wurde mit CH₂Cl₂ extrahiert und die

vereinten organischen Phasen wurde mit wässriger NaHCO₃-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde in DMF (100 ml) gelöst und Natriumazid (6.9 g, 105.3 mmol) wurde der Lösung hinzugefügt. Die Reaktion wurde für 18 h bei 60 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde in Wasser gegeben und mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wurde Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. **42** (11.1 g, 45.5 mmol, 95 %) wurde als gelbes Öl erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.40 (s, 2H), 4.04 – 3.56 (m, 12H), 3.47 – 3.36 (m, 2H), 3.00 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H) ppm.^[99]



44

N-(2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)acridine-4-Carboxamide

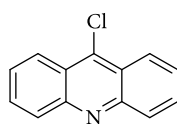
92 (735 mg, 3.3 mmol) wurden bei – 15 °C in CH₂Cl₂/DMF (1/1, 33 ml) gelöst. Der Lösung wurden EDC · HCl (1388 mg, 7.2 mmol), Oxyma (1029 mg, 7.2 mmol) und NaHCO₃ (1383 mg, 16.5 mmol) zugegeben. Die Lösung wurde für 5 Minuten gerührt und **42** (790 mg, 3.6 mmol) wurde zur Reaktion gegeben. Das Gemisch wurde für 18 h gerührt und erwärmte sich während dieser Zeit auf Raumtemperatur. Die Reaktion wurde nach dieser Zeit durch die Zugabe von Wasser gestoppt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc extrahiert und die vereinten organischen Phasen wurden mit gesättigter NH₄Cl-Lösung, gesättigter NaHCO₃-Lösung, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (PE/EE = 1/2 - 1/8) gereinigt. **44** (873 mg, 2.1 mmol, 38 % o2s) wurde als gelbes Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (MHz, CDCl_3): $\delta = 12.11$ (s, 1 H), 8.99 (d, $J = 7.0$ Hz, 1 H), 8.89 (s, 1 H), 8.25 (d, $J = 8.8$ Hz, 1 H), 8.14 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H), 7.82 – 7.89 (m, 1 H), 7.57 – 7.71 (m, 2 H), 3.83 – 3.94 (m, 4 H), 3.73 – 3.82 (m, 4 H), 3.64 – 3.69 (m, 2 H), 3.53 – 3.60 (m, 3 H), 3.28 – 3.35 (m, 2H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (MHz, CDCl_3): $\delta = 166.0, 135.4, 132.4, 131.4, 129.1, 128.1, 126.8, 126.4, 126.0, 125.5, 121.3, 119.6, 117.7, 70.8, 70.7, 70.7, 70.5, 70.3, 70.0, 50.6, 39.7, 29.7$ ppm.

R_f (PE/EE = 1/5): 0.35

HRMS (ESI): m/z berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_4\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+$: 432.1774, gefunden: 432.1776



46

9-Chloroacridin

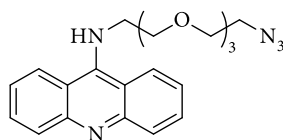
Acridon **45** (600 mg, 3.07 mmol) wurde in frisch destilliertem SOCl_2 (3 ml) vorgelegt. Der Suspension wurde DMF (30 μl , 0.37 mmol) zugegeben und die Reaktion wurde für 2 h bei 80 °C gerührt. Nach dieser Zeit wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der verbliebene Rückstand wurde in CHCl_3 aufgenommen und in eine kalte Ammoniak-Lösung gegeben. Die Suspension wurde mit CHCl_3 extrahiert und die vereinten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. **46** (620 mg, 2.90 mmol, 94 %) wurde als gelber Feststoff erhalten und ohne weitere Reinigungsschritte verwendet.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.44$ (dd, $J = 8.8, 1.4$ Hz, 2H), 8.23 (dt, $J = 8.8, 1.3$ Hz, 2H), 7.82 (ddd, $J = 8.8, 6.6, 1.4$ Hz, 2H), 7.64 (ddd, $J = 8.8, 6.6, 1.2$ Hz, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 206.9, 148.9, 130.5, 129.7, 126.8, 124.6, 124.2$ ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NCl}[\text{M}+\text{H}]^+$: 214.0424, gefunden: 214.0429

R_f (PE/EE = 5/1) = 0.4



47

N-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)acridin-9-Amin

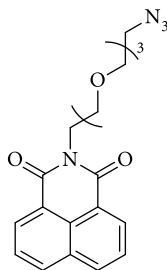
46 (112 mg, 0.52 mmol) wurde bei 50 °C in Phenol (460 µl, 5.24 mmol) gelöst. Der Lösung wurde eine weitere Lösung aus **42** (114 mg, 0.52 mmol) in Phenol (460 µl, 5.24 mmol) bei derselben Temperatur zugegeben. Die Reaktion wurde für 30 min bei 120 °C gerührt. Nach dieser Zeit wurde die Reaktion auf Raumtemperatur abgekühlt und die Reaktionsmischung wurde in CH₂Cl₂ aufgenommen und auf eine Silicasäule gegeben. Das Produkt wurde mit CH₃OH in CH₂Cl₂ (6 % - 10 %) eluiert. **47** (186 mg, 0.47 mmol, 90 %) wurde als gelber Feststoff erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 9.17 (s, 1H), 8.48 (dd, *J* = 8.8, 1.4 Hz, 2H), 8.14 (dt, *J* = 8.8, 1.3 Hz, 2H), 7.51 (ddd, *J* = 8.8, 6.6, 1.4 Hz, 2H), 7.24 (ddd, *J* = 8.8, 6.6, 1.2 Hz, 2H), 4.36 (t, *J* = 5.3, 2H), 3.84 – 3.79 (m, 2H), 3.76 – 3.70 (m, 2H), 3.68 – 3.65 (m, *J* = 5.0, 1.9, 2H), 3.63 – 3.55 (m, 4H), 3.32 (t, *J* = 5.0, 2H) ppm.

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 157.1, 140.0, 133.8, 124.9, 123.2, 119.9, 112.4, 70.6, 70.6, 70.6, 70.5, 70.0, 69.1, 60.4, 53.5, 50.6, 48.5, 21.1, 14.2 ppm.

HRMS (ESI): *m/z* berechnet für C₂₁H₂₆N₅O₃[M+H]⁺: 396.2036, gefunden: 396.2041

R_f (8 % CH₃OH in CH₂Cl₂) = 0.25



49

2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-1
H-benzo[*de*]isochinolin-1,3(2 *H*)-dion

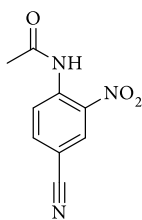
48 (100 mg; 0,51 mmol) und **42** (111 mg; 0,51 mmol) wurden in Ethanol (5 ml) gegeben und die resultierende Suspension wurde für 2 h refluxiert. Nach dieser Zeit wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (PE/EE = 2/1 – 1/4) gereinigt. **49** (171 mg; 0,43 mmol, 84 %) wurde als farbloses Öl isoliert.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.56 (dd, *J* = 7.3, 1.1 Hz, 1H), 8.19 (dd, *J* = 8.2, 1.2 Hz, 1H), 7.73 (dd, *J* = 8.2, 7.3 Hz, 1H), 4.43 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 3.83 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 3.71 (dd, *J* = 5.8, 3.5 Hz, 1H), 3.66 – 3.52 (m, 4H), 3.34 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 164.1, 134.0, 131.5, 131.2, 128.1, 126.9, 122.6, 70.7, 70.6, 70.6, 70.2, 69.9, 67.9, 50.6, 39.1.

HRMS (ESI): *m/z* berechnet für C₂₀H₂₃N₄O₅ [M+H]⁺: 399.1668, gefunden: 399.1674

R_f (PE/EE = 2/1) = 0.2



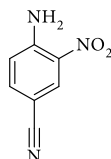
64

N-(4-Cyano-2-Nitrophenyl)Acetamidie

KNO₃ (3.1 g, 30.6 mmol) wurden in konz. H₂SO₄ (14 ml) gelöst und die resultierende Lösung wurde auf -15 °C gekühlt. Der Lösung wurde **58** (2.3 g, 14.4 mmol) portionsweise zugegeben, wobei darauf geachtet wurde, dass die Temperatur im Kolben 0 °C nicht überschreitet. Nach vollständiger Zugabe wurde die

Reaktion für 1 h gerührt und im Anschluss in Eiswasser gegossen. Der sich bildende gelbe Niederschlag wurde gefiltert und mit kaltem Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wurde aus CH₃OH umkristallisiert. **64** (1412 mg, 6.9 mmol, 48 %) wurde als gelber Feststoff isoliert.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 10.58 (s, 1H), 9.05 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 8.58 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.90 (dd, J = 9.1, 2.0 Hz, 1H), 2.37 (s, 3H) ppm.^[100]

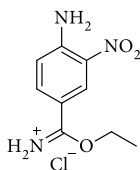


65

4-Amino-3-Nitrobenzonitril

64 (365 mg, 1.8 mmol) wurde in H₂SO₄ (10 % aq.) suspendiert und die Suspension wurde für 45 min bei 100 °C gerührt. Nachdem sich die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt hat wurde die Säure durch Zugabe einer ges. Na₂CO₃ Lsg auf pH = 10 eingestellt und die wässrige Phase wurde mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. **65** (286 mg, 1.8 mmol, 99 %) wurde als gelber Feststoff erhalten und ohne weitere Reinigungsschritte verwendet.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.44 (d, J=2.0, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.69 (dd, J = 8.8, 2.1 Hz, 1H), 7.09 (d, J = 8.9 Hz, 1H) ppm.^[101]



54

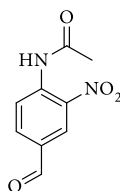
Ethyl 4-Amino-3-Nitrobenzimidat Hydrochlorid

In einem Zweihalskolben, versehen mit Tropftrichter und Olive wurde NaCl (75 g) vorgelegt. Der Tropftrichter wurde mit konz. H₂SO₄ (100 mL) befüllt und wurde tropfenweise zum NaCl gegeben. Über die Olive wurde das frei werdende HCl durch konzentrierte H₂SO₄ und einen weiteren Zweihalskolben

geleitet, in dem 65 (282 mg, 1.7 mmol) in EtOH (28 ml) suspendiert war. Schließlich wurde das überschüssige Gas durch eine KOH-Lsg zur Neutralisation geleitet.

Der Gasstrom wurde für 90 min aufrechterhalten, im Anschluss wurde der Reaktionskolben mit einem Stopfen verschlossen und für 7 Tage gerührt.

Nach dieser Zeit wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde mit Et₂O gewaschen. Der gebildete Feststoff (158mg, 0.6 mmol, 37 %) wurde direkt weiter umgesetzt.

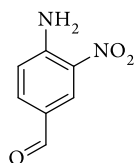


71

N-(4-Formyl-2-Nitrophenyl)Acetamid

Bei 0 °C wurde konz. H₂SO₄ (280 µl) vorgelegt und HNO₃ (rauchend, 70 µl) wurde dazugetroppt. Zu dieser Lösung wurde portionsweise 70 (100 mg, 0.61 mmol) gegeben und die Reaktion wurde für 30 Minuten bei dieser Temperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Na₂CO₃ (ges. Lsg.) gestoppt und die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Die Rohware wurde säulenchromatographisch (PE/EE = 3/1 – 1/1) gereinigt. 71 (74 mg, 0.36 mmol, 58 %) wurde als gelber Feststoff isoliert

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 10.66 (s, 1H), 10.01 (s, 1H), 9.06 (d, *J*=8.8, 1H), 8.77 (d, *J*=2.0, 1H), 8.18 (dd, *J*=8.8, 2.0, 1H), 2.38 (s, 3H) ppm.^[102]

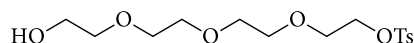


69

4-Amino-3-Nitrobenzaldehyde

71 (1.99 g, 9.6 mmol) wurde bei Raumtemperatur in verdünnte H_2SO_4 (10 vol.%, 9.5 ml) gegeben. Die resultierende Suspension wurde bei 100 °C für 1.5 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Na_2CO_3 (ges. Lsg.) gestoppt und die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. **69** (1.52 g, 9.1 mmol, 96 %) wurde als gelber Feststoff isoliert und ohne weitere Reinigungsschritte verwendet.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 9.76$ (s, 1H), 8.57 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.36 – 8.18 (m, 2H), 7.80 (dd, $J = 8.9, 2.0$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H) ppm.^[102]



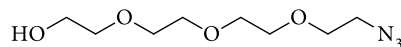
60

2-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-4-Methylbenzenesulfonat

40 (1.99 g, 10.3 mmol) wurde bei 0 °C in CH_2Cl_2 (100 ml) gelöst. Der Lösung wurden Tosylchlorid (2.15 g, 11.3 mmol), Ag_2O (3.6 g, 15.4 mmol) und KI (340 mg, 2.05 mmol) zugegeben. Die Reaktionssuspension wurde für 20 min bei dieser Temperatur gerührt.

Im Anschluss wurde die Suspension über Celite gefiltert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (PE/EE = 1/1 - 1/3 - 0/100) gereinigt. **60** (2.2 g, 6.5 mmol, 63 %) wurde als farbloses Öl isoliert.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.78$ (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 4.16 – 4.13 (m, 2H), 3.69 – 3.57 (m, 14H), 2.43 (s, 3H) ppm.^[84]

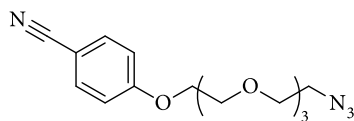


61

2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-ol

60 (1.2 g, 3.5 mmol) wurde bei Raumtemperatur in DMF (7 ml) gelöst. Der Lösung wurde NaN₃ (560 mg, 8.6 mmol) zugegeben und die Suspension wurde bei 80 °C für 18 h gerührt. Nach dieser Zeit wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde in Wasser und CH₂Cl₂ aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen und die vereinten wässrigen Phasen wurden einmal mit CH₂Cl₂ rückextrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. **61** (734 mg, 3.3 mmol, 97 %) wurde als farbloses Öl isoliert.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.80 – 3.73 (m, 1H), 3.72 – 3.68 (m, 5H), 3.66 – 3.61 (m, 1H), 3.42 (t, J = 5.1 Hz, 1H) ppm.^[84]



63

4-(2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)benzonnitril

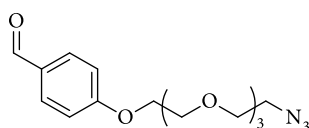
61 (793 mg, 3.6 mmol), **62** (560 mg, 4.7 mmol) und Triphenylphosphan (1233 mg, 4.7 mmol) wurden bei 0 °C in THF (18 ml) gelöst. Der Lösung wurde Diethylazodicarboxylat (740 µl, 4.7 mmol) zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktion für 18 h gerührt und erwärmte sich dabei auf Raumtemperatur. Nach dieser Zeit wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde in Wasser und CH₂Cl₂ aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen und im Anschluss über Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (PE/EE = 2/1 – 1/2 – 1/3) gereinigt. **63** (825 mg, 2.6 mmol, 71 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.59$ (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 4.19 (t, $J = 5.6$ Hz, 3.8, 1H), 3.89 (t, 1H), 3.77 – 3.65 (m, 6H), 3.40 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 162.1, 134.0, 119.2, 115.3, 104.1, 70.9, 70.7, 70.7, 70.1, 69.4, 67.8, 50.7$ ppm.

R_f (PE/EE = 1/3): 0.3

HRMS (ESI): m/z berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 321.1563, gefunden: 321.1568



67

4-(2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)benzaldehyde

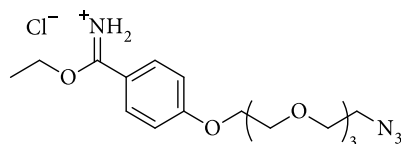
61 (1257 g, 5.7 mmol), **63** (910 mg, 7.5 mmol) und Triphenylphosphan (1298 mg, 7.5 mmol) wurden bei 0 °C in THF (30ml) gelöst. Der Lösung wurde Diethylazodicarboxylat (1.2 ml, 7.5 mmol) zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktion für 18 h gerührt und erwärmte sich dabei auf Raumtemperatur. Nach dieser Zeit wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde in Wasser und CH_2Cl_2 aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen und im Anschluss über Na_2SO_4 getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (PE/EE = 3/1 – 1/1) gereinigt. **67** (1588 mg, 4.9 mmol, 83 %) wurde als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 9.85$ (s, 1H), 7.79 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.99 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.26 – 4.08 (m, 2H), 3.93 – 3.83 (m, 2H), 3.78 – 3.58 (m, 10H), 3.34 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): $\delta = 190.8, 163.8, 131.9, 130.0, 114.8, 70.8, 70.7, 70.6, 70.6, 70.0, 69.4, 67.7, 50.6$ ppm.

R_f (PE/EE = 1/1): 0.2

HRMS (ESI): m/z berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 346.1379, gefunden: 346.1385



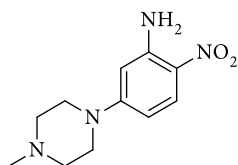
52

Ethyl 4-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)benzimidat

In einem Zweihalskolben, versehen mit Tropftrichter und Olive wurde NaCl (75 g) vorgelegt. Der Tropftrichter wurde mit konz. H₂SO₄ (100 mL) befüllt und wurde tropfenweise zum NaCl gegeben. Über die Olive wurde das frei werdende HCl durch konzentrierte H₂SO₄ und einen weiteren Zweihalskolben geleitet, in dem **63** (484 mg, 1.5 mmol) in EtOH (24 ml) suspendiert war. Schließlich wurde das überschüssige Gas durch eine KOH-Lsg zur Neutralisation geleitet.

Der Gasstrom wurde für 90 min aufrechterhalten, im Anschluss wurde der Reaktionskolben mit einem Stopfen verschlossen und für 2 Tage gerührt.

Nach dieser Zeit wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde mit Et₂O gewaschen. Der gebildete Feststoff (559 mg, 1.4 mmol, 92 %) wurde direkt weiter umgesetzt.

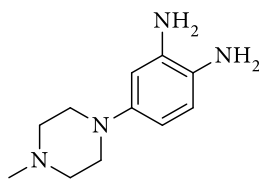


59

5-(4-Methylpiperazin-1-yl)-2-Nitroanilin

5-Chloro-2-Nitroanilin (250 mg, 1.5 mmol), K₂CO₃ (300 mg, 2.2 mmol) und Methylpiperazin (193 µl, 1.7 mmol) wurden in DMF (870 µl) suspendiert und für 15 h bei 120 °C gerührt. Nach dieser Zeit wurde die Suspension im Vakuum eingengt und der Rückstand wurde in Wasser und CH₂Cl₂ aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (CH₃OH in CH₂Cl₂: 1 % – 6 % – 10%) gereinigt. **59** (287 mg, 1.2 mmol, 84 %) wurde als gelber Feststoff isoliert.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.03 (d, *J* = 9.8, 1H), 6.30 (dd, *J* = 9.7, 2.6 Hz, 1H), 6.17 (s, 2H), 5.97 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 3.39 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H), 2.54 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H), 2.36 (s, 3H) ppm.^[103]

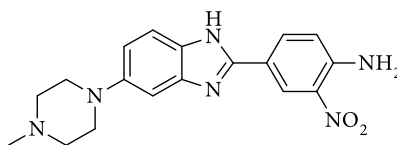


55

4-(4-Methylpiperazin-1-yl)benzol-1,2-Diamine

59 (192 mg, 0.8 mmol) wurde bei Raumtemperatur in EtOAc/CH₃OH (4/1, 7.5 ml) gelöst. Der Lösung wurde Palladium/Aktivkohle (10 %, 10 mg) zugegeben und durch die Suspension wurde für 2 h ein Wasserstoffstrom geleitet. Im Anschluss wurde die Suspension über Celite gefiltert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. 55 (163 mg, 0.8 mmol, 97 %) wurde als braunes Öl isoliert und ohne weitere Reinigungsschritte weiter umgesetzt.

R_f (20 % CH₃OH in CH₂Cl₂) = 0.05



66

4-(5-(4-Methylpiperazin-1-yl)-1-Benzimidazol-2-yl)-2-Nitroanilin

Methode I:

54 (158 mg, 0.74 mmol) und 55 (158 mg, 0.64 mmol) wurden in AcOH/EtOH (1/2, 9.0 ml) gelöst und für 18 h bei 85 °C gerührt. Nach dieser Zeit wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde in CH₃OH/H₂O (1/10, 5 ml) aufgenommen. Die Lösung wurde mit konz. NH₃ (aq., 5 ml) versetzt. Das Gemisch wurde über Nacht im Kühlschrank gelagert und während dieser Zeit fiel ein Feststoff aus der Lösung aus. Dieser Feststoff wurde gefiltert, in CH₃OH/AcOH (92,5/7,5) aufgenommen und durch Zugabe von konz. NH₃ basisch eingestellt. Es fiel ein Feststoff aus, dieser wurde gefiltert, mit kaltem Wasser gewaschen und getrocknet. 66 (44 mg, 0.1 mmol, 19 %) wurde als orangener Feststoff isoliert.

Methode II:

69 (77 mg, 0.37 mmol) und **55** (80 mg, 0.39 mmol) wurden bei Raumtemperatur in DMF (3.6 ml) gelöst. Die Reaktionslösung wurde im Anschluss für 18 h bei 70 °C gerührt. Nach dieser Zeit wurde der Reaktion $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (3 mg, 3 mol%) zugegeben und die Reaktionstemperatur wurde auf 120 °C erhöht. Zusätzlich wurde durch die resultierende Suspension ein Sauerstoffstrom geleitet. Die Reaktion wurde für eine weitere Stunde gerührt.

Nach dieser Zeit wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (10 % CH_3OH in CH_2Cl_2) gereinigt. **66** (105 mg, 0.27 mmol, 72 %) wurde als orangener Feststoff isoliert.

Methode III:

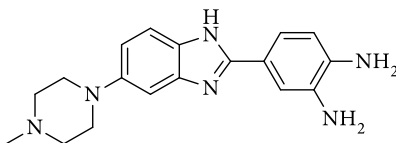
69 (390 mg, 2.35 mmol), **55** (508 mg, 2.47 mmol) und $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (446 mg, 2.35 mmol) wurden bei Raumtemperatur in DMF (4.6 ml) gelöst. Die resultierende Suspension wurde bei 70 °C für 1.5 h gerührt. Nach dieser Zeit wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (20 % CH_3OH in CH_2Cl_2) gereinigt. **66** (437 mg, 1.24 mmol, 53 %) wurde als orangener Feststoff isoliert.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 12.65 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.15 (dd, J = 8.9 Hz, 2.1, 1H), 7.78 (s, 2H), 7.43 (s, 1H), 7.15 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 3.17 (s, 4H), 2.64 (s, 4H), 2.34 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400Hz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 148.0, 147.2, 141.4, 136.6, 133.8, 130.5, 123.3, 120.3, 118.5, 54.9, 49.8, 49.0, 46.0, 45.5 ppm.

R_f (10 % CH_3OH in CH_2Cl_2) = 0.25

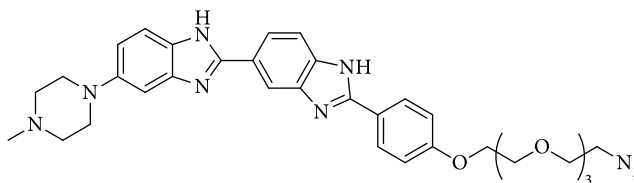
HRMS (ESI): m/z berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_2\text{Na} [\text{M}+\text{Na}]^+$: 375.1545, gefunden: 375.1552



51

4-(5-(4-Methylpiperazin-1-yl)-1-Benzimidazol-2-yl)benzol-1,2-diamin

66 (44 mg, 0.1 mmol) wurde bei Raumtemperatur in CH₃OH (5 ml) gelöst. Der Lösung wurde Palladium/Aktivkohle (10 %, 10 mg) zugegeben und durch die Suspension wurde für 2 h ein Wasserstoffstrom geleitet. Im Anschluss wurde die Suspension über Celite gefiltert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. **51** (44 mg, quantitativer Umsatz) wurde als gelber Feststoff isoliert und ohne weitere Reinigungsschritte weiter umgesetzt.



50

2'-(4-(2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)phenyl)-5-(4-Methylpiperazin-1-yl)-1 H,1' H-2,5'-Bisbenzimidazole

Methode I:

52 (40 mg, 0.11 mmol) und **51** (86 mg, 0.17 mmol) wurden bei Raumtemperatur in Essigsäure (1.9 ml) gelöst. Die Lösung wurde auf 90 °C erhitzt und die Reaktion wurde für 15 h gerührt. Die Lösung wurde auf 90 °C erhitzt und die Reaktion wurde für 15 h gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (C18 Kartusche, CH₃CN + 0.05 % TFA/H₂O + 0.05 % TFA, 5-95 %) gereinigt. **50** (15 mg, 0.02 mmol, 19 %) wurde als gelber Feststoff isoliert.

Methode II:

67 (26 mg, 0.08 mmol) und **51** (27 mg, 0.08 mmol) wurden bei Raumtemperatur in Nitrophenol (800 μ l) gegeben. Die resultierende Suspension wurde bei 150 °C für 5 h gerührt. Im Anschluss kühlte die Reaktion auf Raumtemperatur ab und durch Zugabe von Hexan wurde das Rohprodukt ausgefällt. Die Suspension wurde gefiltert und der Niederschlag wurde säulenchromatographisch (10 % - 20 % CH₃OH in CH₂Cl₂) gereinigt. **50** (21 mg, 0.03 mmol, 42 %) wurde als gelber Feststoff isoliert.

Methode III:

67 (350 mg, 1.08 mmol) und **51** (349 mg, 1.08 mmol) wurde bei Raumtemperatur in DMF (2.1 ml) gelöst. Der Lösung wurde Na₂S₂O₅ (205 mg, 1.08 mmol) zugefügt und die resultierende Suspension wurde für 18 h bei 70 °C gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (20 % CH₃OH in CH₂Cl₂) gereinigt. **50** (498 mg, 0.76 mmol, 74 %) wurde als gelber Feststoff isoliert.

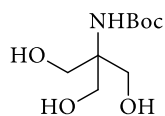
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 8.27 (s, 1H), 8.06 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.96 (dd, J = 8.5, 1.7 Hz, 1H), 7.70 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.16 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.11 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.07 (dd, J = 8.8, 2.2 Hz, 1H), 4.25 – 4.16 (m, 2H), 3.92 – 3.86 (m, 2H), 3.76 – 3.62 (m, 10H), 3.41 – 3.34 (m, 2H), 3.28 (t, J = 5.1 Hz, 5H), 2.82 (t, J = 5.0 Hz, 4H), 2.49 (s, 3H) ppm.

¹³C NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 161.1, 153.9, 152.4, 148.0, 128.2, 124.3, 121.7, 121.1, 115.1, 114.8, 70.4, 70.3, 70.3, 70.1, 69.7, 69.3, 67.4, 54.6, 50.4, 50.1, 44.3 ppm.

R_f (20 % CH₃OH in CH₂Cl₂) = 0.15

HRMS (ESI): m/z berechnet für C₃₃H₄₀N₉O₄ [M+H]⁺: 626.3203, gefunden: 626.3205

6.2.2. Synthese der TRIS basierten Linkereinheit 76

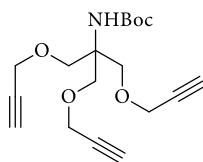


93

tert-Butyl (1,3-Dihydroxy-2-(Hydroxymethyl)propan-2-yl)Carbamate

Tris 72 (200 mg, 1.65 mmol) wurde in CH₃OH (6.7 ml) gelöst. Der Lösung wurde eine Lösung aus *tert*-butyldicarbonat (0.4 ml, 1.72 mmol) in CH₃OH (1.5 ml) zugetropft. Die Reaktion wurde über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und Boc-Tris 93 (350 mg, 1.58 mmol, 96 %) wurde als weißer Feststoff erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 3.71 (s, 6H), 1.46 (s, 9H).^[104]

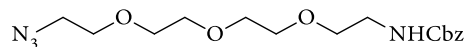


73

tert-Butyl (1,3-bis(prop-2-yn-1-yloxy)-2-((prop-2-yn-1-yloxy)methyl)propan-2-yl)carbamate

Boc-Tris 93 (930 mg, 4.2 mmol) wurde in DMF (11.3 ml) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Der Lösung wurde Propargylbromid (80 % w / w in Toluol 2.8 ml, 25.2 mmol) in einer Portion zugegeben und über einen Zeitraum von 20 Minuten wurde der Reaktion portionsweise gemörsertes KOH (1.4 g, 25.2 mmol) zugegeben und die Reaktion wurde für 4 h bei 37 °C gerührt. Im Anschluss wurde der Reaktion EtOAc hinzugefügt und die Lösung wurde mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (PE/EE = 9/1) gereinigt. Das Trialkin 73 (1.04 g, 3.11 mmol, 74 %) wurde als gelbes Öl isoliert.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.17 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 3.80 (s, 1H), 2.44 (t, *J* = 2.4 Hz, 0H), 1.44 (s, 1H) ppm.^[105]



74

Benzyl (2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate

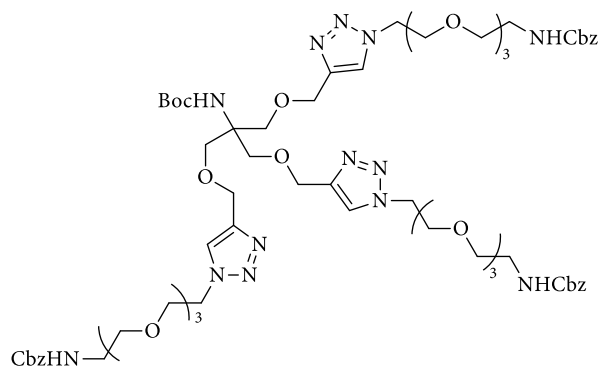
42 (1.70 g, 7.79 mmol) wurde bei Raumtemperatur in 1,4-Dioxan/H₂O (1/1, 18 ml) vorgelegt und NaHCO₃ (1.96 g, 23.38 mmol) wurde zu der Lösung gegeben. Dieser Suspension wurde Chlorameisensäurebenzylester (2.0 ml, 9.35 mmol) in 1,4-Dioxan/H₂O (1/1, 18 ml) zugetropft und die entstandene Suspension wurde für 18 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser gestoppt und die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (PE/EE = 1/1) gereinigt und 74 (2.37g, 6.72 mmol, 86 %) wurde als farbloses Öl erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.31 – 7.48 (m, 5 H), 5.35 (s, 1 H), 5.12 (s, 2 H), 3.66 (d, *J* = 7.6 Hz, 10 H), 3.59 (t, *J* = 5.1 Hz, 2 H), 3.48 – 3.33 (m, 4 H) ppm.

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 156.5, 136.6, 128.5, 128.1, 128.19, 70.7, 70.7, 70.6, 70.3, 70.0, 70.2, 66.7, 50.7, 40.9 ppm.

R_f (PE/EE = 1/2): 0.45

HRMS (ESI): *m/z* berechnet für C₁₆H₂₅N₄O₅[M+H]⁺: 353.1825, gefunden: 353.1831



75

tert-Butyl (1,3-bis((1-(3-oxo-1-phenyl-2,7,10,13-tetraoxa-4-azapentadecan-15-yl)-1 *H*-1,2,3-Triazol-4-yl)methoxy)-2-(((1-(3-oxo-1-phenyl-2,7,10,13-tetraoxa-4-azapentadecan-15-yl)-1 *H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)methyl)propan-2-yl)carbamae

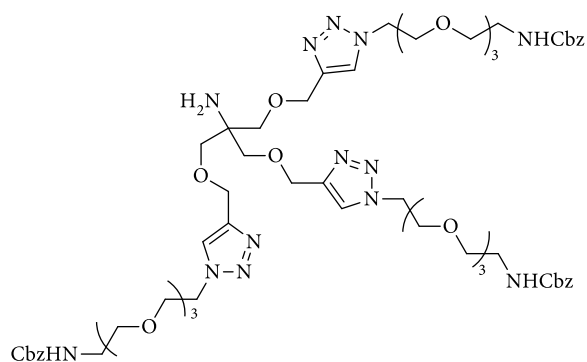
74 (1004 mg, 3.0 mmol) und 73 (1055 mg, 3.0 mmol) wurden bei Raumtemperatur in THF (30 ml) vorgelegt. Dieser Lösung wurden Lösungen aus $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (97 mg, 0.4 mmol) und THPTA (520 mg, 1.2 mmol) in H_2O (3 mL) sowie Natriumascorbat (237 mg, 1.2 mmol) in H_2O (3 mL) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 18 h gerührt und im Anschluss mit Wasser und EtOAc verdünnt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (PE/EE = 1/9) gereinigt. 75 (3635 mg, 2.61 mmol, 87 %) wurde als gelbes Öl isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (MHz, CDCl_3): δ = 7.66 (s, 3 H), 7.36 – 7.27 (m, 15 H), 5.46 (d, J = 6.2 Hz, 3 H), 5.07 (s, 2 H), 5.02 (s, 1 H), 4.56 (s, 2 H), 4.45 (t, J = 5.2 Hz, 6 H), 3.80 (t, J = 5.2 Hz, 6 H), 3.72 (s, 6 H), 3.60 – 3.51 (m, 30 H), 3.36 (q, J = 5.4 Hz, 6 H), 1.37 (s, 9 H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (MHz, CDCl_3): δ = 156.5, 154.8, 144.6, 136.6, 128.5, 128.2, 128.1, 123.8, 70.5, 70.5, 70.5, 70.20, 70.0, 69.4, 69.3, 66.6, 64.8, 58.5, 53.5, 50.1, 40.8, 28.5 ppm.

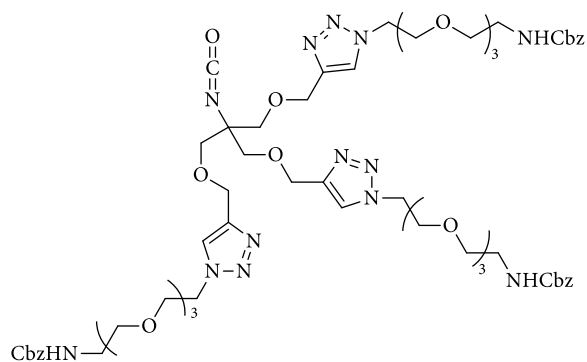
R_f (8 % CH_3OH in CH_2Cl_2): 0.25

HRMS (ESI): m/z berechnet für $\text{C}_{66}\text{H}_{97}\text{N}_{13}\text{O}_{20}[\text{M}+\text{H}]^+$: 1392.7051, gefunden: 1392.7049



76

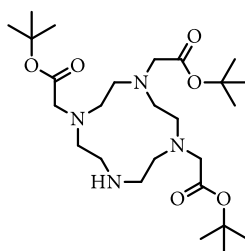
75 (200 mg, 0.14 mmol) wurden bei Raumtemperatur in CH_2Cl_2 (1.5 ml) gelöst und der Lösung wurde TFA (220 μl , 2.87 mmol) zugefügt. Die Reaktion wurde für 6 h gerührt und durch Zugabe einer gesättigten Na_2CO_3 -Lösung gestoppt. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert und die vereinten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das so erhaltene Amin 76 (166 mg, 0.13 mmol, 89 %) wurde als gelbes Öl erhalten und ohne weitere Reinigungsschritte verwendet.



76

Triphosgen (38 mg, 0.13 mmol) wurde in CH_2Cl_2 (0.4 ml) gelöst. Dieser Lösung wurden Lösungen aus Triethylamin (40 μl , 0.30 mmol) in CH_2Cl_2 (0.4 ml) und 76 (166 mg, 0.13 mmol) in CH_2Cl_2 (0.4 ml) zugegeben und für 1 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung versetzt und die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert und die vereinten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Isocyanat 76 (160 mg, 0.12 mmol, 95 %) wurde als gelbes Öl erhalten und ohne weitere Reinigungsschritte weiterverwendet.

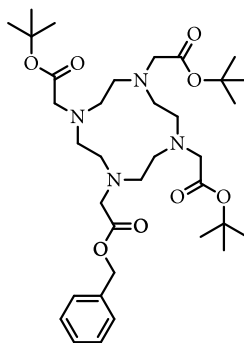
6.2.3. Synthese des DOTA Bausteins 80

tri-*tert*-butyl 2,2',2''-(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate

78

77 (1000 mg, 5.80 mmol) wurde in DMA (11.6 ml) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Der Reaktion wurde NaOAc (1.43 g, 17.41 mmol) zugegeben und *tert*-Butylbromoacetat (2.6 ml, 17.41 mmol) wurde zugetropft. Die Lösung wurde für 72 h gerührt und erwärmte sich dabei auf Raumtemperatur. Durch Zugabe von NaHCO₃ wurde das Produkt aus der Lösung gefällt. Nach Filtration und Trocknen wurde das trialkylierte Cyclen **78** (2.2 g, 4.32 mmol 73 %) als weißer Feststoff erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 10.02 (s, 1H), 3.36 (s, 4H), 3.28 (s, 2H), 3.09 (s, 4H), 2.89 (dd, *J* = 20.5, 5.8 Hz, 12H), 1.44 (s, 27H).^[106]

tri-*tert*-butyl 2,2',2''-(10-(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate

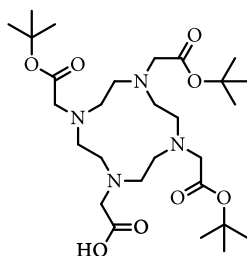
79

K₂CO₃ (1.1 g, 8.23 mmol) wurde in DMA (100 ml) vorgelegt und der Suspension wurde **78** (2.1 g, 4.27 mmol) zugegeben. Benzylbromoacetat (684 µl, 4.32 mmol) in CH₃CN (10 ml) wurde der Reaktion hinzugefügt und bei 70 °C für 18 h gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionsmischung gefiltert und das

Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (10 % CH₃OH/CH₂Cl₂) gereinigt. **79** (2.7 g, quantitativ) wurde als weißer Feststoff erhalten.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.36 (dt, *J* = 9.7, 5.1 Hz, 1H), 5.16 (d, *J* = 19.7 Hz, 0H), 3.93 – 2.00 (m, 2H), 1.47 (s, 1H) ppm.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[106]



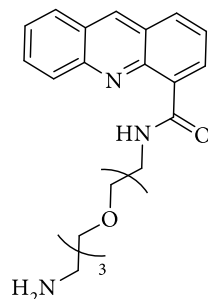
2-(4,7,10-tris(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)acetic acid

80

79 (315 mg, 0.48 mmol) wurde bei Raumtemperatur in CH₃OH (12 mL) gelöst. Der Lösung wurde Palladium/Aktivkohle (10 %, 10 mg) zugegeben und durch die Suspension wurde für 2 h ein Wasserstoffstrom geleitet. Im Anschluss wurde die Suspension über Celite gefiltert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. **80** (273 mg, 0.48 mmol, quant.) wurde als weißer Feststoff erhalten und wurde ohne weitere Reinigungsschritte im nächsten Schritt verwendet.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.89–1.87 (br, 24H), 1.46 (s, 27H) ppm.^[106]

6.2.4. Synthese der DNA-bindenden Sonden über Syntheseweg A



94

N-(2-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)acridin-4-carboxamid

Zum Entgasen des Lösungsmittels wurde zunächst ein Argonstrom für 30 Minuten durch das Lösungsmittelgemisch geleitet.

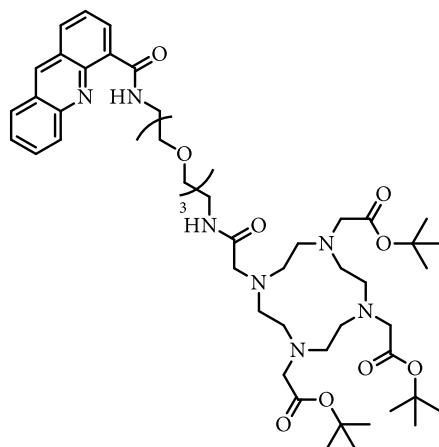
44 (168 mg, 0.4 mmol) wurde bei Raumtemperatur in THF/H₂O (5/1, 4 ml) gelöst. Der Lösung wurde Trimethylphosphin (1 M in THF, 0.5 mmol, 0.5 ml) zugegeben und die Lösung wurde für 3 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde in CH₂Cl₂ aufgenommen und mit HCl (1 M) extrahiert. Die vereinten wässrigen Phasen wurden mit gesättigter Na₂CO₃-Lösung auf pH = 11 eingestellt und wurde im Anschluss mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. 94 (145 mg, 0.4 mmol, 92 %) wurde als gelbes Öl erhalten und ohne weitere Reinigungsschritte weiterverwendet.

¹H-NMR (MHz, CDCl₃): δ 12.14 (s, 1 H), 8.96 (dd, *J* = 7.1, 1.6 Hz, 1 H), 8.87 (s, 1H), 8.24 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H), 8.13 (dd, *J* = 8.4, 1.6 Hz, 1 H), 8.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.73 – 7.48 (m, 2 H), 3.82 – 3.96 (m, 4H), 3.82 – 3.71 (m, 4H), 3.70 – 3.61 (m, 4 H), 3.55 (m, 2 H), 3.51 – 3.42 (m, 2 H), 2.81 (s, 2 H) ppm.

¹³C-NMR (MHz, CDCl₃): δ 166.1, 147.5, 146.3, 137.7, 135.4, 132.4, 131.3, 130.1 6, 129.2, 128.1, 126.8, 126.4, 126.0, 125.5, 70.63, 70.6, 70.4, 70.36, 70.2, 69.9, 39.7, 29.7 ppm.

R_f (10 % CH₃OH in CH₂Cl₂): 0.12

HRMS (ESI):): *m/z* berechnet für C₂₂H₂₇N₄O₄Na[M+Na]⁺: 406.1869, gefunden: 406.1866



95

Tri- *tert*-Butyl 2,2',2''-(10-(1-(acridin-4-yl)-1,15-dioxo-5,8,11-trioxa-2,14-diazahexadecan-16-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetat

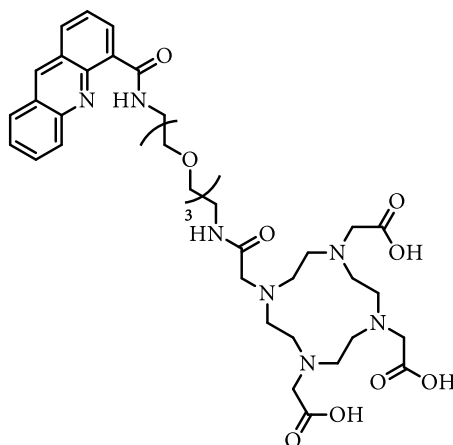
94 (129 mg, 0.22 mmol), HATU (85 mg, 0.22 mmol) und DIPEA (90 μ l) wurden bei Raumtemperatur in CH_2Cl_2 (1.8 ml) gelöst. Die Lösung wurde für 10 min gerührt und **800** (69 mg, 0.17 mmol) wurde zur Reaktion gegeben. Die Reaktion wurde für 15 h gerührt. Durch Zugabe von H_2O wurde die Reaktion gestoppt und die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit einer gesättigten NH_4Cl -, einer gesättigten NaHCO_3 - und einer gesättigten NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (PE/EA: 5/1 – 1/3) gereinigt. **95** (73 mg, 0.07 mmol, 44 %) wurde als gelbes Öl isoliert.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 12.26 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.93 (dd, J = 7.1, 1.5 Hz, 1H), 8.24 (dd, J = 17.9, 8.5 Hz, 2H), 8.10 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.90 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.67 (dt, J = 15.1, 7.6 Hz, 2H), 6.55 (s, 1H), 4.05 – 3.86 (m, 4H), 3.81 (dd, J = 5.9, 3.2 Hz, 2H), 3.74 (dd, J = 5.8, 3.3 Hz, 2H), 3.66 (dd, J = 5.8, 3.4, 2H), 3.57 (dd, J = 5.8, 3.4 Hz, 2H), 3.53 (bs, 2H), 3.40 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 3.24 (dd, J = 7.5, 2.9 Hz, 10H), 2.62 – 1.78 (bs, 14 H), 1.46 (d, J = 7.2 Hz, 27H) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 207.1, 172.5, 171.6, 166.3, 147.6, 146.2, 138.0, 135.2, 132.8, 131.6, 129.0, 128.3, 126.9, 126.5, 126.1, 125.3, 81.9, 70.6, 70.5, 70.4, 70.3, 70.2, 69.5, 47.5, 38.6, 31.0, 28.0, 27.9, 8.8 ppm.

R_f (PE/EA = 1/3): 0.2

HRMS (ESI): m/z berechnet für $C_{50}H_{78}N_7O_{11}$ $[M+H]^+$: 952.5759, gefunden: 952.5758



23

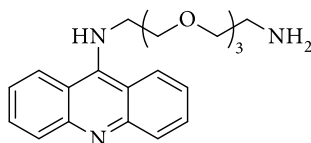
2,2',2''-(10-(1-(acridin-4-yl)-1,15-dioxo-5,8,11-trioxa-2,14-diazahexadecan-16-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triyl)Triessigsäure

95 (57 mg, 0.06 mmol) wurde bei Raumtemperatur in CH_2Cl_2 /TFA (3/1, 600 μ l) gelöst. Die Lösung wurde für 36 h gerührt und im Anschluss wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. 23 (41 mg, 0.05 mmol, 87 %) wurde als gelbes Öl isoliert und wurde ohne weitere Reinigungsschritte verwendet.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 9.25 (s, 1H), 8.87 (dd, J = 7.1, 1.6, 1H), 8.43 – 8.37 (m, 1H), 8.33 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.24 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.99 (dd, J = 8.6, 6.8 Hz, 1H), 7.83 – 7.69 (m, 2H), 4.16 – 3.40 (m, 30H), 1.60 – 1.06 (m, 6H) ppm.

^{13}C NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 166.7, 135.0, 133.3, 132.3, 128.4, 127.8, 126.9, 126.6, 126.2, 125.0, 117.9, 115.0, 70.3, 70.2, 70.1, 69.6, 69.4, 68.8, 39.5, 38.9, 7.8 ppm.

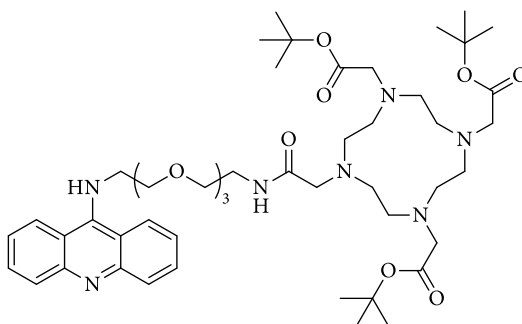
HRMS (ESI): m/z berechnet für $C_{38}H_{53}N_7O_{11}Na$ $[M+Na]^+$: 806.3701, gefunden: 806.3709



96

N-(2-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)acridin-9-Amin

47 (57 mg; 0,14 mmol) wurde bei Raumtemperatur in einem Gemisch aus THF/H₂O (4/1; 1,5 ml) gelöst, welches zuvor entgast wurde, indem ein Argonstrom für 30 min durch die Lösung geleitet wurde. Der resultierenden Lösung wurde Trimethylphosphin (1 M in THF; 0,17 mmol; 170 µl) zugegeben und für 3 h gerührt. Nach dieser Zeit wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. **96** (62 mg, quant.) wurde als farbloses Öl isoliert und wurde ohne weitere Reinigungsschritte in der nächsten Reaktion eingesetzt.



97

Tri- *tert*-Butyl 2,2',2''-(10-(14-(acridin-9-ylamino)-2-oxo-6,9,12-trioxa-3-azatetradecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetat

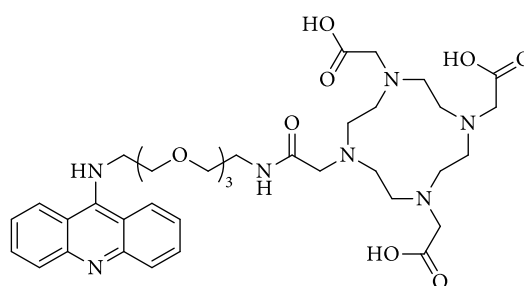
80 (106 mg, 0.19 mmol), HATU (71 mg, 0.19 mmol) und DIPEA (74 µl, 0.43 mmol) wurden bei Raumtemperatur in CH₂Cl₂ (2 ml) gelöst. Die Lösung wurde für 15 min gerührt und im Anschluss wurde eine weitere Lösung aus **96** (53 mg, 0.14 mmol) in CH₂Cl₂ (2 ml) dazugegeben. Die Reaktion wurde für 18 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (CH₃OH in CH₂Cl₂; 2 %) gereinigt. **97** (10 mg, 0.01 mmol, 7 %) wurde als gelbes Öl isoliert.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 8.46 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 8.28 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.76 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 4.61 – 2.56 (m, 44H), 1.51 (d, *J* = 32.7 Hz, 27H) ppm.

¹³C NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 164.1, 163.4, 160.7, 160.4, 160.0, 159.7, 157.3, 134.2, 131.6, 130.7, 127.7, 126.8, 126.8, 122.0, 120.5, 117.68, 116.0, 114.7, 113.2, 111.8, 70.1, 70.1, 70.1, 69.9, 69.8, 69.0, 67.4, 39.0, 38.8, 37.5, 35.6, 27.1, 27.1 ppm.

HRMS (ESI): *m/z* berechnet für C₄₉H₇₇N₇O₁₀Na[M+Na]⁺: 946.5630, gefunden: 946.5625

R_f (5 % CH₃OH in CH₂Cl₂) = 0.45



24

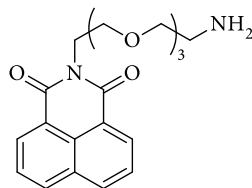
2,2',2''-(10-(14-(acridin-9-ylamino)-2-oxo-6,9,12-trioxa-3-azatetradecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triessigsäure

97 (120 mg, 0.13 mmol) wurde bei Raumtemperatur in einem Gemisch aus TFA/CH₂Cl₂ (50/50, 1.3 ml) gelöst und für 24 h gerührt. Nach dieser Zeit wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (C18-Kartusche, ACN + 0.05 %, TFA/H₂O + 0.05 % TFA, 5 – 95 %) gereinigt. 24 (84 mg, 0.11 mmol, 98 %) wurde als farbloses Öl isoliert.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 8.61 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 8.01 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.87 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.60 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 4.61 – 2.74 (m, 46H) ppm.

¹³C NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 160.75, 160.39, 158.98, 150.67, 135.17, 123.58, 118.27, 114.83, 70.08, 69.64, 68.93, 68.45, 48.97, 38.84, 13.01 ppm.

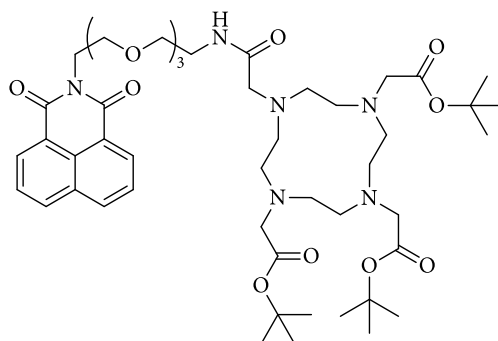
HRMS (ESI): *m/z* berechnet für C₄₉H₇₇N₇O₁₀Na[M+Na]⁺: 756.3932, gefunden: 756.3935



98

2-(2-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethyl)-1 *H*-benzoisochinolin-1,3-Dione

49 (57 mg; 0,14 mmol) wurde bei Raumtemperatur in einem Gemisch aus THF/H₂O (4/1; 1,5 ml) gelöst, welches zuvor entgast wurde, indem ein Argonstrom für 30 min durch die Lösung geleitet wurde. Der resultierenden Lösung wurde Trimethylphosphin (1 M in THF; 0,17 mmol; 170 µl) zugegeben und für 3 h gerührt. Nach dieser Zeit wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. **98** (62 mg, quant.) wurde als farbloses Öl isoliert und wurde ohne weitere Reinigungsschritte in der nächsten Reaktion eingesetzt.



99

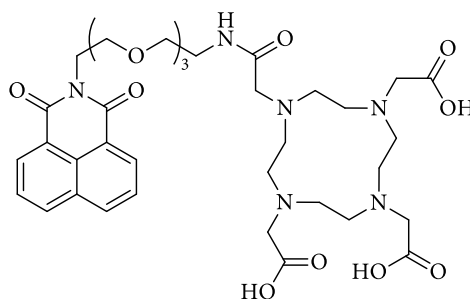
Tri- *tert*-Butyl 2,2',2''-(10-(14-(1,3-dioxo-1 *H*-benzoisochinolin-2(3 *H*)-yl)-2-oxo-6,9,12-trioxa-3-azatetradecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triyl)triacetat

80 (90 mg, 0.16 mmol), HATU (60 mg, 0.16 mmol) und DIPEA (60 µl, 0.16 mmol) wurden bei Raumtemperatur in CH₂Cl₂ (1 ml) gelöst. Die Lösung wurde für 15 min gerührt und im Anschluss wurde eine weitere Lösung aus **98** (45 mg, 0.12 mmol) in CH₂Cl₂ (1 ml) dazugegeben. Die Reaktion wurde für 18 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (C18-Kartusche Gradient [% CH₃CN in H₂O]: 5 – 50 % über 20 Minuten) gereinigt. **99** (120 mg, 0.02 mmol, 18 %) wurde als farbloses Öl isoliert.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 8.46$ (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 8.28 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.76 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), $4.45 - 2.77$ (bs, 42H), 1.51 (d, $J = 32.8$ Hz, 27H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD): $\delta = 160.5, 160.1, 159.8, 159.4, 159.0, 135.1, 123.6, 120.3, 118.2, 117.4, 114.5, 70.1, 70.1, 69.8, 68.5, 49.0, 27.1$ ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für $\text{C}_{48}\text{H}_{75}\text{N}_6\text{O}_{12}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 927.5443, gefunden: 927.5444



25

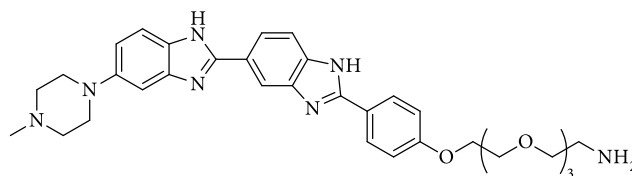
2,2',2''-(10-(14-(1,3-dioxo-1*H*-benzoisochinolin-2(3*H*)-yl)-2-oxo-6,9,12-trioxa-3-azatetradecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triyl)Triessigsäure

99 (120 mg, 0.13 mmol) wurde bei Raumtemperatur in einem Gemisch aus TFA/ CH_2Cl_2 (50/50, 1.3 ml) gelöst und für 24 h gerührt. Nach dieser Zeit wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (C18-Kartusche, ACN + 0.05 %, TFA/ H_2O + 0.05 % TFA, 5 – 95 %) gereinigt. **25** (84 mg, 0.11 mmol, 98 %) wurde als farbloses Öl isoliert.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 8.49$ (d, $J = 7.3$, 2H), 8.31 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.78 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), $4.52 - 3.01$ (m, 42H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 164.2, 161.0, 160.6, 160.3, 159.9, 134.2, 131.7, 130.8, 127.7, 126.8, 122.0, 120.6, 119.1, 117.7, 114.8, 111.9, 70.1, 70.0, 69.9, 69.6, 68.8, 67.4, 38.9, 38.8$ ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für $C_{36}H_{51}N_6O_{12}[M+H]^+$: 759.3635, gefunden: 759.3633



100

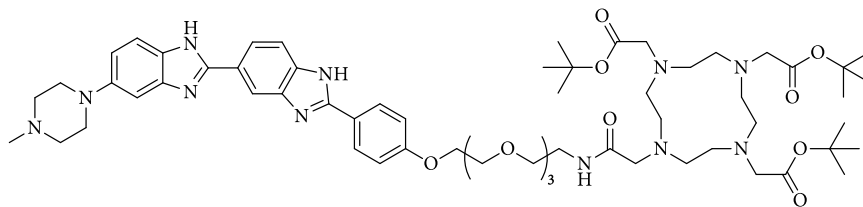
2-(2-(2-(2-(4-(5-(4-methylpiperazin-1-yl)-1-*H*,1'-*H*-[2,5'-bisbenzimidazol]-2'-yl)phenoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-Amin

50 (40 mg, 0.06 mmol) wurde bei Raumtemperatur in zuvor entgastem THF/H₂O (5/1, 570 μ l) gelöst. Der Lösung wurde PMe₃ (1M in THF, 0.06 mmol, 65 μ l) zugegeben und die Reaktion wurde für 1 h gerührt. Im Anschluss wurden die Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. 100 (38 mg, quant. Umsatz) wurde als gelber Feststoff isoliert und wurde ohne weitere Reinigungsschritte verwendet.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 8.33 - 8.25 (m, 1H), 8.01 - 7.92 (m, 3H), 7.86 - 7.83 (m, 1H), 7.58 - 7.53 (m, 1H), 7.25 - 7.23 (m, 1H), 7.17 - 7.14 (m, 1H), 7.09 - 7.02 (m, 2H), 4.13 - 4.08 (m, 2H), 3.84 - 3.76 (m, 5H), 3.60 - 3.55 (m, 9H), 3.21 - 3.17 (m, 5H), 3.10 - 3.07 (m, 2H), 2.99 (t, J = 4 Hz, 2H), 2.87 (s, 3H), 1.43 (d, J = 6 Hz, 2H) ppm.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 164.7, 150.8, 149.4, 134.5, 131.2, 127.9, 125.5, 120.8, 119.6, 116.9, 116.5, 115.7, 114.9, 100.8, 71.7, 71.5, 71.5, 71.2, 70.5, 69.2, 67.8, 62.2, 54.5, 43.6, 40.6 ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für $C_{33}H_{42}N_7O_4[M+H]^+$: 600.3298, gefunden: 600.3298



101

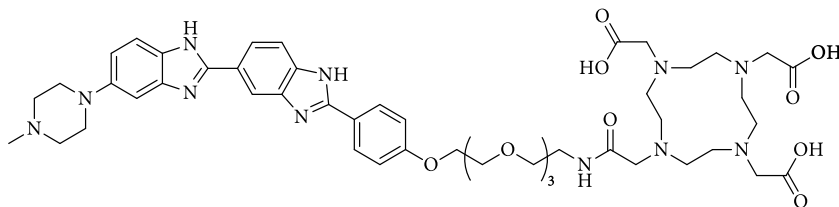
tri-*tert*-butyl 2,2',2''-(10-(14-(4-(5-(4-methylpiperazin-1-yl)-1-*H*,1'*H*-[2,5'-bibenzo[*d*]imidazol]-2'-yl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12-trioxa-3-azatetradecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate

80 (44 mg, 0.08 mmol), DIPEA (32 μ l, 0.2 mmol) und HATU (0.08 mmol) wurden bei Raumtemperatur in DMF (300 μ l) gelöst und für 15 min gerührt. Der Lösung wurde eine weitere Lösung aus **100** (38 mg, 0.06 mmol) in DMF (300 μ l) zugegeben und die resultierende Lösung wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Anschluss unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt. **101** (52 mg, 0.05 mmol, 62 %) wurde als gelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ = 8.56 (s, 1H), 8.20 (d, J = 4 Hz, 3H), 8.04 (d, J = 4 Hz, 1H), 7.98 (s, 2H), 7.76 (d, J = 4 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 4 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.28 (d, J = 4 Hz, 2H), 4.30 (t, J = 4 Hz, 2H), 3.98 (d, J = 8 Hz, 3H), 3.91 (t, J = 4 Hz, 3H), 3.75 - 3.64 (m, 14H), 3.57 (brs, 4H), 3.22 (t, J = 12 Hz, 4H), 3.01 (s, 3H), 3.00 (s, 7H), 2.86 (s, 7H), 2.03 (s, 1H), 1.94 (s, 1H), 1.54 - 1.47 (m, 27H), 1.31 - 1.29 (m, 3H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ = 164.9, 164.6, 161.5, 161.2, 155.0, 151.0, 150.1, 134.7, 131.1, 128.2, 125.3, 120.0, 118.8, 117.0, 115.7, 101.1, 71.8, 71.7, 71.6, 71.3, 70.6, 69.2, 54.6, 43.6, 37.0, 31.6, 28.5 ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für $\text{C}_{61}\text{H}_{91}\text{N}_{11}\text{O}_{11}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 1176.6797, gefunden: 1176.6799



26

2,2',2''-(10-(14-(4-(5-(4-methylpiperazin-1-yl)-1-*H*,1'-*H*-[2,5'-bibenzo[*d*]imidazol]-2'-yl)phenoxy)-2-oxo-6,9,12-trioxa-3-azatetradecyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triessigsäure

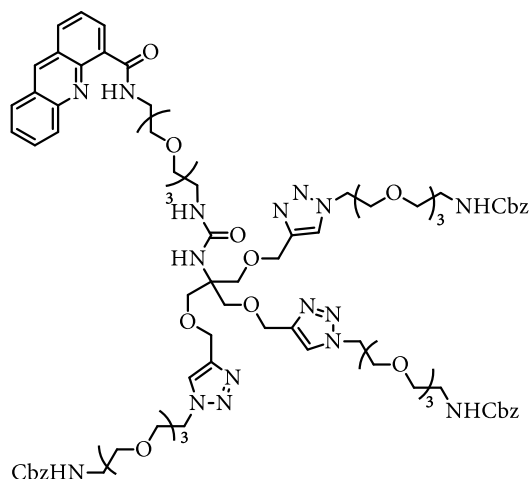
101 (16 mg, 0.01 mmol) wurde bei Raumtemperatur in CH₂Cl₂/TFA(7/3, μl) gelöst. Die Reaktion wurde für 18 h gerührt und im Anschluss wurden die Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (C18 Kartusche, ACN + 0.05 % TFA/H₂O + 0.05 % TFA, 5-95 %) gereinigt. **26** (10 mg, 0.01 mmol, 73 %) wurde als gelber Feststoff isoliert.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.34 (s, 1H), 8.17 (d, *J*=8.3, 1H), 8.02 (d, *J*=8.5, 1H), 7.70 (d, *J*=8.3, 1H), 7.52 (d, *J*=8.7, 1H), 7.22 – 7.09 (m, 2H), 7.02 (d, *J*=8.7, 1H), 4.29 – 4.14 (m, 2H), 3.87 – 3.76 (m, 2H), 3.69 – 2.99 (bs, 58H), 2.87 (s, 3H), 2.54 (s, 1H) ppm.

¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 176.7, 174.9, 160.6, 158.6, 158.4, 158.2, 157.9, 132.7, 129.6, 128.8, 126.9, 122.7, 121.4, 119.0, 116.6, 115.4, 114.2, 72.9, 70.4, 70.3, 70.2, 70.0, 69.3, 67.9, 66.2, 63.5, 53.1, 49.1, 47.9, 42.6, 31.5, 28.7, 22.6, 20.9, 19.7, 14.4 ppm.

HRMS (ESI): *m/z* berechnet für C₄₉H₆₈N₁₁O₁₁ [M+H]⁺: 985.5022, gefunden: 985.5020

6.2.5. Synthese der DNA-bindenden Sonde 27 über Syntheseweg B



82

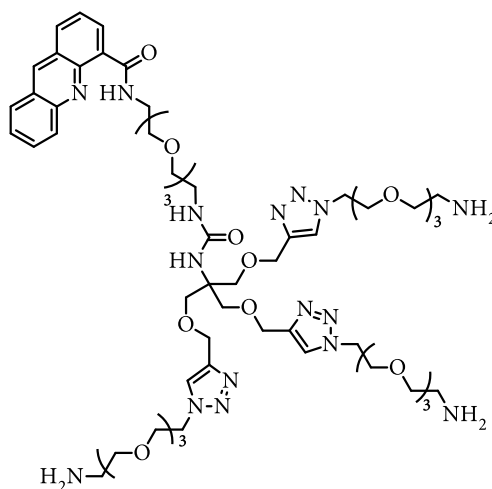
76 (160 mg, 0.12 mmol) und **81** (53 mg, 0.13 mmol) wurden bei Raumtemperatur in CH_2Cl_2 (1.2 ml) gelöst. Der Lösung wurde Triethylamin (25 μl , 0.18 mmol) zugegeben und die Lösung wurde für 2 h gerührt. Der Reaktion wurde Wasser zugegeben und die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, gefiltert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (5 % CH_3OH in CH_2Cl_2) gereinigt. **82** (158 mg, 0.09 mmol, 76 %) wurde als gelbes Öl isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (MHz, CDCl_3): δ = 8.99 (d, J = 7.1 Hz, 1 H), 8.93 (s, 1 H), 8.26 (d, J = 8.7 Hz, 1 H), 8.17 (d, J = 8.3 Hz, 1 H), 8.07 (d, J = 8.6 Hz, 1 H), 7.88 (t, J = 7.8 Hz, 1 H), 7.74 – 7.56 (m, 5 H), 7.42 – 7.29 (m, 15 H), 5.56 (s, 3 H), 5.39 (s, 1 H), 5.05– 5.18 (bs, 6 H), 4.53 – 4.66 (bs, 6 H), 4.37 – 4.52 (bs, 6 H), 3.88 – 4.02 (m, 4H), 3.75 – 3.83 (bs, 12 H), 3.66 – 3.72 (bs, 2H), 3.49 – 3.64 (bs, 32H), 3.46 (s, 2H), 3.37 (s, 8 H), 3.23 (t, J = 5.2 Hz, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ = 166.1, 157.9, 156.5, 144.7, 144.5, 141.2, 136.6, 132.5, 128.5, 128.1, 128.1, 126.8, 126.5, 126.0, 125.5, 123.8, 70.6, 70.4, 70.2, 70.1, 70.0, 69.9, 69.4, 66.6, 64.8, 58.9, 53.5, 50.1, 40.8, 39.7, 31.9, 29.7, 29.7, 29.4, 22.7, 14.1 ppm.

R_f (10 % CH₃OH in CH₂Cl₂): 0.7

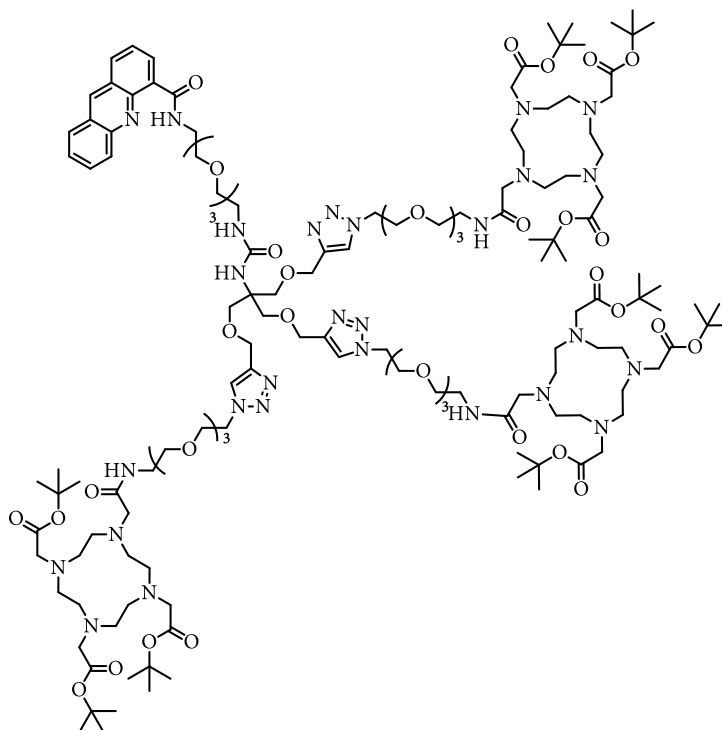
HRMS (ESI): m/z berechnet für C₈₄H₁₁₆N₁₆O₂₃[M+2 H]²⁺: 858.4200, gefunden: 858.3991



83

82 (26 mg, 0.02 mmol) wurde bei Raumtemperatur in einer Lösung aus 33 % (w/w) HBr in AcOH / AcOH (1/1, 150 μ l) vorgelgt und für 1.5 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Diethylether versetzt. Der sich bildene Niederschlag wurde gefiltert, mit Diethylether gewaschen und anschließend getrocknet. **83** (27 mg, quant.) wurde als Trihydrodromid isoliert und ohne weitere Reinigungsschritt verwendet.

HRMS (ESI): m/z berechnet für C₆₀H₉₆N₁₆O₁₇Na[M+Na]⁺: 1335.7037, gefunden: 1335.7028.



84

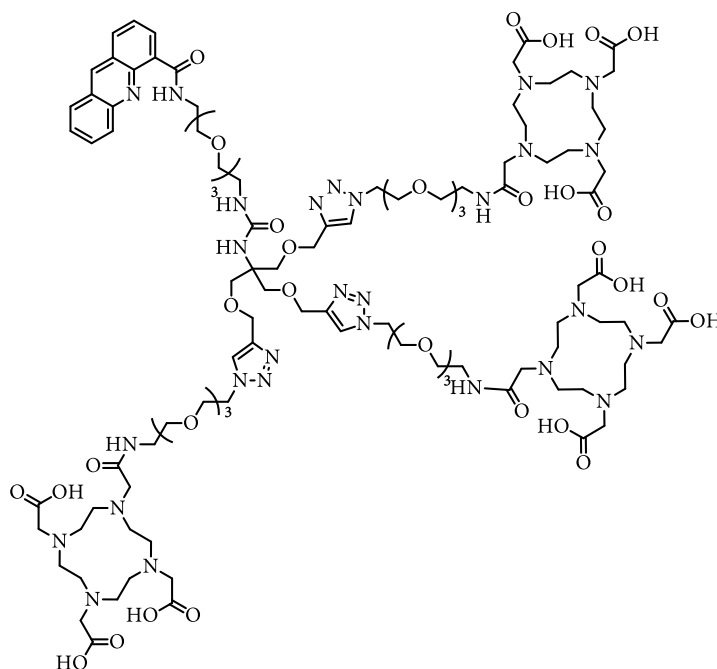
80 (44 mg, 0.15 mmol), DIPEA (45 μ l, 0.3 mmol) und HATU (27 mg, 0.15 mmol) wurden bei Raumtemperatur in DMF (300 μ l) gelöst und für 15 min gerührt. Der Lösung wurde eine weitere Lösung aus **83** (77 mg, 0.05 mmol) in DMF (300 μ l) zugegeben und die resultierende Lösung wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Anschluss unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt. **84** (46 mg, 0.02 mmol, 31 %) wurde als gelber Feststoff isoliert.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ = 9.19 (s, 1 H), 8.84 (dd, J = 7.1, 1.6 Hz, 1 H), 8.37 – 8.33 (m, 1 H), 8.30 (d, J = 8.8, 1.0, 1 H), 8.19 (d, J = 8.4, 1 H), 8.04 – 7.96 (m, 4 H), 7.80 – 7.63 (m, 2 H), 4.51 – 4.60 (m, 14 H), 3.85 – 3.93 (m, 10 H), 3.64 – 3.82 (bs, 15 H), 3.48 – 3.62 (bs, 40 H), 1.81 – 3.16 (bs, 72 H), 1.48 (bs, 81H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 173.0, 172.7, 172.0, 147.6, 144.4, 133.3, 131.8, 128.6, 128.3, 127.4, 127.0, 126.5, 126.2, 124.3, 81.4, 81.3, 70.3, 70.2, 70.1, 70.1, 70.0, 69.9, 69.6, 69.3, 69.0, 64.0, 58.7, 55.9, 55.4, 55.3, 39.5, 38.8, 27.1, 27.0 ppm.

R_f (20 % CH₃OH in CH₂Cl₂): 0.35

HRMS (ESI): m/z berechnet für C₁₁₄H₂₄₉N₂₈O₃₈[M+3 H]³⁺: 872.9471, gefunden: 872.9466



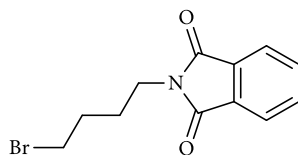
27

84 (41 mg, 0.01 mmol) wurde bei Raumtemperatur in CH₂Cl₂/TFA (5/1, 400 µl) suspendiert und für 48 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde im Anschluss mit Et₂O versetzt und der entstandene Niederschlag wurde gefiltert und mehrfach mit Et₂O gewaschen. Im Anschluss wurde das Rohprodukt mehrmals mit CH₂Cl₂ coevaporiert. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. **27** (40 mg, quant.) wurde als orangener Feststoff erhalten.

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 9.66 (s, 1 H), 8.52 (d, J = 7.3 Hz, 1 H), 8.44 (d, J = 8.4 Hz, 1 H), 8.28 (d, J = 8.5 Hz, 1 H), 8.19 (d, J = 3.2 Hz, 2 H), 7.89 (s, 3 H), 7.78 – 7.85 (m, 3 H), 4.35 – 4.545 (m, 20 H), 2.87 – 4.14 (m, 220 H) ppm.

Für die Aufnahme eines aussagekräftigen ¹³C-NMR-Spektrums wurde zu wenig Substanz isoliert.

HRMS (ESI): m/z berechnet für C₁₀₈H₁₇₄N₂₈O₃₈[M+3 H]³⁺: 824.7593, gefunden: 824.7601

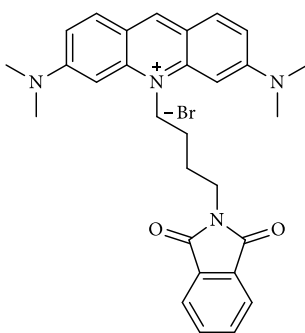
6.2.6. Synthese der konjugierbaren Acridin Orange Einheit **91**


87

2-(4-Bromobutyl)isoindolin-1,3-dion

Phthalimid (3000 mg, 20.4 mmol), K_2CO_3 (8450 mg, 61.2 mmol) und Phenyltriethylammoniumchlorid (464 mg, 2.04 mmol) wurden in Acetone (100 ml) suspendiert. Der Suspension wurde 1,4-Dibromobutane (7.2 ml, 61.2 mmol) zugetropft und die Reaktion wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde in CH_2Cl_2 und H_2O aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert und die vereinten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet gefiltert und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (PE/EA = 2/1) über Silica gereinigt. **87** (5008 mg, 17.8 mmol, 87 %) wurde als weißer Feststoff isoliert.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.86 (dd, $J = 5.4$ Hz, 3.1 Hz, 2H), 7.74 (dd, $J = 5.5$ Hz, 3.0 Hz, 2H), 3.74 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.46 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 1.99 – 1.77 (m, 4H).^[107]



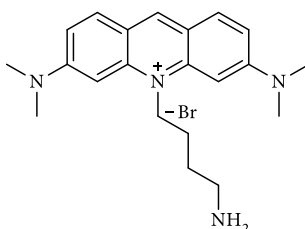
88

3,6-Bis(dimethylamino)-10-(4-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)butyl)acridin Hydrobromid

34 (555 mg, 2.1 mmol) und **87** (1520 mg, 7.0 mmol) wurde in 1,4-Xylol (17 ml) gelöst und die Lösung wurde für 48 h unter Reflux erhitzt. Nach dieser Zeit wurde die Reaktionsmischung über Celite gefiltert.

Der gebildete Nierschalg wurde so lange mit Toluol gewaschen, bis das Filtrat farblos war. Das Produkt wurde mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (1/1) vom Celite gewaschen. Nach Entfernung der Lösungsmittel unter vermindertem Druck wurde **88** (1028 mg, 1.9 mmol, 90 %) als roter Feststoff erhalten und wurde ohne weitere Reinigungsschritte verwendet.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 8.76$ (s, 1H), 7.90 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 7.84 (t, $J = 1.2$ Hz, 4H), 7.23 (dd, $J = 9.3$ Hz, 2.0 Hz, 2H), 6.60 (s, 2H), 4.74 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.68 (t, $J = 7.2$ Hz, 12H), 1.90 (m, 4H).^[91]



89

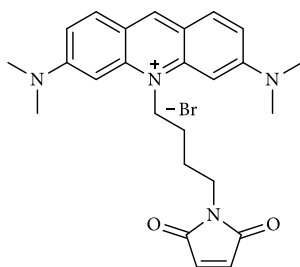
10-(4-aminobutyl)-3,6-bis(dimethylamino)acridin

88 (600 mg, 1.1 mmol) wurde in $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (3/1, 12 ml) gelöst. Der Lösung wurde Hydrazin Monohydrat (664 μl , 8.8 mmol) zugegeben und die Reaktion wurde für 6 h bei 80 °C gerührt. Nach dieser Zeit wurden die Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (C18-Kartusche, $\text{ACN} + 0.05\%$, $\text{TFA}/\text{H}_2\text{O} + 0.05\%$ TFA, 5 – 95 %) gereinigt. **89** (458 mg, quant.) wurde als roter Feststoff isoliert.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 8.81$ (s, 1H), 7.95 (s, 2H), 7.29 (dd, $J = 9.3$ Hz, 2.0 Hz, 2H), 6.67 (s, 2H), 5.72 (s, 6H), 4.79 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.30 (s, 12H), 2.92 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.95 (q, $J = 7.9$ Hz, 2H), 1.83 (q, $J = 8.0$ Hz, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 155.9, 143.4, 142.7, 133.5, 117.0, 114.8, 93.2, 46.4, 25.1, 23.5$ ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_4^+ = 337.2387$; gefunden: 337.2388



91

3,6-bis(dimethylamino)-10-(4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1 *H*-pyrrol-1-yl)butyl)acridin

89 (360 mg, 0.9 mmol) wurde 0 °C in einer gesättigten NaHCO₃-Lösung gelöst. Der Lösung wurde *N*-Methoxycarbonylmalimid (260 mg, 1.1 mmol) zugegeben und die Reaktion wurde 10 Minuten gerührt. Aus der Reaktionslösung wurde mittels Gefreitrocknung das Wasser entfernt. Das Rohprodukt wurde auf Celite gegeben und das Produkt wurde durch Waschen mit CH₂Cl₂/*i*PrOH (5/1 + 1 % TEA) aus dem Rückstand gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und **91** (396 mg, 0.7 mmol, 78 %) wurde als roter Feststoff isoliert.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 8.82 (s, 1H), 7.95 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.29 (dd, *J* = 9.4, 2.0 Hz, 2H), 7.02 (s, 1H), 6.64 (s, 2H), 4.75 (s, 2H), 3.53 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.28 (s, 12H), 1.97 – 1.68 (m, 4H) ppm.

¹³C NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ = 171.7, 168. 1, 165.7, 155.9, 142.6, 135.0, 117.0, 114.9, 93.0, 52.0, 49.1, 46.0, 26.1, 23.4 ppm.

HRMS (ESI): *m/z* berechnet for C₂₅H₂₉N₄O₂⁺ = 417.2285; gefunden: 417.2293

6.3. Biologische Experimente

6.3.1. Bakterien- und Zellkultur

6.3.1.1. Kultivierung von Biofilmen

Für die Kultivierung der Biofilme wurden drei verschiedene Methoden gewählt. Welche Methode bei welchem Experiment angewandt wurde, ist in der Vorschrift zum jeweiligen Experiment entnehmen.

Methode I: Kultivierung eines Biofilms in einer 96-well Platte

10 ml Kulturmedium wurde mit einer Kryokultur des entsprechenden Bakterienstamms inokuliert und für 24 h bei der entsprechenden Temperatur bei 180 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Die gewählten Temperaturen für die verwendeten Stämme, sowie die verwendeten Kulturmedien sind Tabelle 27 zu entnehmen.

Tabelle 27: Kulturmedien und Inkubationstemperaturen für die verwendeten Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Kulturmedium	Inkubationstemperatur [°C]
<i>P. fluorescens</i>	LB-Medium	30
<i>P. aeruginosa</i>	LB-Medium	37
<i>S. aureus</i>	TSB-Medium	37
<i>E. coli</i>	LB-Medium	37

Die erhaltenen Vorkulturen wurden mit frischem Medium auf $OD_{600} = 0.075$ verdünnt und 200 μ l der verdünnten Vorkulturen wurden in 96-well Platten gegeben. Die befüllten Platten wurden für weitere 24 h bei der entsprechenden Temperatur ohne Rühren inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Überstand entfernt und der Rückstand wurde einmal mit PBS gewaschen um nicht gebundene Bakterien zu entfernen. Die Biofilme wurden an der Luft getrocknet und die Existenz der Biofilme wurde durch Färbung mit einer 0.1 % Kristallviolett-Lösung bestätigt. Zu diesem Zweck wurden die Biofilme mit 200 μ l der Kristallviolett-Lösung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Rückstand wurde mit Wasser gewaschen. Die Stellen, an denen sich ein Biofilm bildete, blieben violett gefärbt zurück.

Methode II: Kultivierung eines Biofilms in einem Mikroreaktionsgefäß

Die Kultivierung der Vorkultur erfolgte analog zu dem in Methode I beschriebenen Vorgehen. Die erhaltenen Vorkulturen wurden mit frischem Medium auf $OD_{600} = 0.075$ verdünnt und 200 μl der verdünnten Vorkulturen wurden in Mikroreaktionsgefäße (1.5 ml, nicht behandelte Oberfläche) gegeben. Die Gefäße wurden verschlossen und um Luftaustausch zu gewährleisten, wurde in den Deckel mit einer Kanüle ein Loch gebohrt. Die befüllten Gefäße wurden für 24 h bei der entsprechenden Temperatur ohne Rühren inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Überstand entfernt und der Rückstand wurde einmal mit PBS gewaschen um nicht gebundene Bakterien zu entfernen. Die Biofilme wurden an der Luft getrocknet und die Existenz der Biofilme wurde durch Färbung mit einer 0.1 % Kristallviolett-Lösung bestätigt. Zu diesem Zweck wurden die Biofilme mit 200 μl der Kristallviolett-Lösung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Rückstand wurde mit Wasser gewaschen. Die Stellen, an denen sich ein Biofilm bildete, blieben violett gefärbt zurück.

Methode III: Kultivierung eines Biofilms auf einem Deckglas

Die Kultivierung der Vorkultur erfolgte analog zu dem in Methode I beschriebenen Vorgehen. Die erhaltenen Vorkulturen wurden mit frischem Medium auf $OD_{600} = 0.075$ verdünnt. Auf den Boden einer 6-well Platte wurde ein Deckglas (1 cm x 1 cm) gelegt und das Glas wurde mit 2 ml der verdünnten Vorkultur überschichtet. Die befüllten Platten wurden für 24 h bei der entsprechenden Temperatur ohne Rühren inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Deckglas aus der Kultur gehoben und in Wasser getaucht um nicht gebundene Bakterien zu entfernen. Die Biofilme wurden an der Luft getrocknet und die Existenz der Biofilme wurde durch Färbung mit einer 0.1 % Kristallviolett-Lösung bestätigt. Zu diesem Zweck wurden die Biofilme mit 200 μl der Kristallviolett-Lösung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Rückstand wurde mit Wasser gewaschen. Die Stellen, an denen sich ein Biofilm bildete, blieben violett gefärbt zurück.

6.3.1.2. Zellkultur

20 ml Kulturmedium wurden in einer T75 Flasche mit 10^6 Zellen einer Kryokultur inokuliert und für 5 d bei 37 °C in einer 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die gewählten Kulturmedien sind Tabelle 28 zu entnehmen.

Tabelle 28: Kulturmedien und Inkubationstemperaturen für die verwendeten Bakterienstämme.

Zellstamm	Kulturmedium
CHO	89 vol. % <i>Ham's F-12 nutrition mix</i> , 10 vol. % FBS, 1 vol. % Gentamicin (c = 5 µg/ml)
THP-1	99 vol. % <i>RPMI-1640 medium</i> , 1 vol. % Gentamicin (c = 5 µg/ml)

Während der Kultivierungszeit wurden die CHO-Zellen adhärent, die THP-1 Zellen verblieben in planktonischer Form. Für weitere Verwendungszwecke wurden die adhärennten Zellen vom Flaschenboden gelöst. Dafür wurde zunächst der Überstand abgesaugt und der Rückstand einmal mit PBS (10 ml) gespült. Um die Zellen abzulösen wurde der Flaschenboden mit einer Accutase-Lösung (5 ml) bedeckt und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Um das Enzym zu deaktivieren wurden der Suspension 5 ml frisches Medium zugegeben. Die Suspension wurde zentrifugiert (5 min, 300 rcf) und der Überstand wurde entfernt. Die Zellen wurden mit frischem Medium resuspendiert und wurden in dieser Form weiterverwendet. Die nicht gebundenen Zellen wurden ohne weitere Schritte zentrifugiert und analog weiterverwendet.

6.3.2. Bindungsassay zur Bestimmung der DNA Bindefähigkeit

6.3.2.1. DNA-Bindungsassay mit den molekularen Sonden 23 – 27

In einer 96-well Platte wurden zu 200 µl einer 10 µM Lösung der entsprechenden Verbindung eine steigende Menge an DNA (0, 1, 3, 7, 10 µg) aus einer Stammlösung gegeben. Die Stammlösung wurde erstellt, indem Lachssperma DNA (Sigma Aldrich) in einer DNA-Puffer-Lösung (1mM EDTA, 1mM NaCl, 1 mM Tris, pH = 7.4) zu einer Konzentration von c = 1 mg/ml gelöst wurde. Die resultierenden Lösungen wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss in einem Cytation 5 plate reader auf Fluoreszenz untersucht. Die entsprechenden Einstrahlungswellenlängen ergeben sich aus den Absorptionsmaxima

(Abb. 114 – 118) der jeweiligen Verbindung und sind in Tabelle 29 aufgeführt. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt und die dargestellten Ergebnisse entsprechen dem Mittelwert jedes Messpunkts der entsprechenden Wellenlängen.

6.3.2.2. DNA Bindungsassay mit Nanoartikeln

In einer 384-well Platte wurden zu 10 µl einer Stammlösung der Nanoartikel **NP4** und **NP5** (in PBS, $c = 1$ mg/ml) eine steigende Menge DNA (0, 1, 3, 7, 10 µg) aus einer Stammlösung gegeben. Die Stammlösungen wurden analog zu dem jeweils oben beschriebenen Vorgehen hergestellt. Das Gesamtvolumen im well wurde zu 25 µl eingestellt und die resultierenden Suspensionen wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss in einem Cytation 5 plate reader auf Fluoreszenz untersucht. Die Einstahlungswellenlänge ($\lambda = 360/10$ nm) ergab sich aus dem Absorptionsmaximum der Verbindung **26** (Abb. 117). Die Emissionen wurden im Bereich von 381/10 – 650 nm in Schritten von 1 nm aufgenommen. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt und die dargestellten Ergebnisse entsprechen dem Mittelwert jedes Messpunkts der entsprechenden Wellenlängen.

6.3.3. Zellpermeabilitätsassays mittels Fluoreszenzmessungen

Für die Zellpermeabilitätsassays wurden in eine 96 well Platte zunächst 10^4 CHO Zellen (kultiviert, wie zuvor beschrieben) in 200 µl Medium ausgesät und für 3 d bei 37 °C in einer 5 % CO₂ Atmosphäre inkubiert, während welcher Zeit die Zellen erneut adhärent wurden. Nach der Zeit wurde der Überstand entfernt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen.

Die präparierten Zellen wurden inkubiert mit a) 200 µl einer Hoechst 33342-Lösung (10 µM), b) 200 µl einer Lösung von **50** (10 µM) und c) 200 µl einer Suspension der Partikel **NPL5** ($c = 1$ mg/ml). Die Zellen wurden für 10 min bei 37 °C in einer 5 % CO₂ Atmosphäre inkubiert. Im Anschluss wurden die Überstände abgenommen, die Rückstände mit PBS gewaschen und die Zellen wurden in einem Cytation 5 plate reader im Hellfeld und unter einem DAPI-Filter (ex / em: 377/50 nm / 447/60 nm) untersucht.

6.3.4. Biofilminkubationsassays

6.3.4.1. Biofilminkubation mit Verbindung 26

Ein *P. fluorescens* Biofilm wurde nach Methode I gezüchtet. Der Biofilm wurde mit 200 µl einer Lösung aus **26** (50 µM) für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Inkubationslösung entfernt und der Rückstand wurde mit Wasser gewaschen. Im Anschluss wurde der Rückstand durch Zugabe von 200 µl Ethanol in Lösung gebracht. Als Negativkontrolle wurde ein unkultiviertes well analog behandelt und beide ethanolischen Lösungen wurden in einem Cytation 5 plate reader auf Fluoreszenz untersucht. Die Einstrahlungswellenlänge ($\lambda = 360/10$ nm) ergab sich aus dem Absorptionsmaximum der Verbindung **26**. (Abb. 117). Die Emissionen wurden im Bereich von 381/10 – 650 nm in Schritten von 1 nm aufgenommen. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt und die dargestellten Ergebnisse entsprechen dem Mittelwert jedes Messpunkts der entsprechenden Wellenlängen.

6.3.4.2. Biofilminkubation mit Nanopartikeln

Ein *P. fluorescens* Biofilm wurde nach Methode III gezüchtet. Nach der Inkubationszeit von 24 h wurden dem Inkubationswell 100 µg der Nanopartikel aus einer Stammlösung ($c = 1$ mg / ml) zugegeben und die Suspension wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein unbewachsenes Deckglas mit 2 ml LB-Medium überschichtet und analog mit den Partikeln behandelt. Beide Deckgläser wurden aus dem well geborgen und um nicht gebundene Partikel, sowie ungebundene Bakterien zu entfernen, wurden die Deckgläser in Wasser gewaschen. Die Deckgläser wurden in einem Cytation 5 plate reader im Hellfeld und unter einem DAPI-Filter (ex / em: 377/50 nm / 447/60 nm) untersucht.

6.3.5. Absortions- und Emissionsspektren

Absortions- und Emissionsspektren wurden aus einer 10 μM Lösung der jeweiligen Verbindung aufgenommen. 200 μl der jeweiligen Lösung wurden in eine 96-well Platte gegeben und mit einem Cytation 5 plate reader wurden die Absorptionen von 220 – 650 nm in Schritten von 1 nm aufgenommen.

Die Emissionsspektren wurden aus den gleichen Lösungen aufgenommen und Einstrahlungswellenlängen ergaben sich aus den jeweiligen Absorptionsmaxima (Abb. 114 – 118) der jeweiligen Verbindung. Die resultierenden Absorptions- und Emissionsmaxima sind in Tabelle 29 aufgeführt.

Tabelle 29: Absorptions- und Emissionsmaxima der Verbindungen **23**, **24**, **25**, **26** und **27**.

Verbindung	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmimum [nm]
23	358	456
24	439	458
25	346	395
26	361	506
27	358	456

6.3.6. Bakterieninkubation

$5 \cdot 10^6$ Zellen einer *E. coli*-Kultur wurden je in 1 ml einer Lösung aus **26** (10 μM in LB-Medium) und Hoechst 33342 (10 μM in LB-Medium) suspendiert und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zentrifugiert und drei Mal mit PBS gewaschen, indem die Bakterien in 1 ml PBS resuspendiert und zentrifugiert wurden. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen durch Zugabe von 1 % SDS lysiert und die Lysate wurden in einem Cytation 5 plate reader auf Fluoreszenz untersucht. Die Einstrahlungswellenlänge ($\lambda = 360/10$ nm) ergab sich aus dem Absorptionsmaximum der Verbindung **26**. (Abb. 117). Die Emissionen wurden im Bereich von 381/10 – 650 nm in Schritten von 1 nm aufgenommen.

6.3.7. Radiomarkierung von Sonde 26*

30 µl einer Stammlösung von 26 (1 mg/ml in 70 Vol% EtOH) wurden in 300 µl HEPES gelöst. Diese Lösung wurde mit einer Spritze zu einer ^{68}Ga -Lösung (325 MBq) gegeben. Die Mischung wurde für 10 min bei 100 °C inkubiert und im Anschluss wurde die Lösung mit 10 ml Wasser verdünnt, mit einer Spritze aufgezogen und über eine HLB-Kartusche filtriert. Die Kartusche wurde ein weiteres Mal mit 5 ml Wasser gewaschen. 26* wurde mit 1 ml EtOH von der Kartusche eluiert. Die Reinheit Das erhaltene Produkts wurde mittels HPLC bestimmt. 26* (194 MBq, 60 %) wurde ohne weitere Reinigungsschritte verwendet.

HPLC: $t_R = 10.08$ min

6.3.8. Radioinkubation

Für die Experimente wurden Biofilme der Stämme *E. coli*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* und *S. aureus* nach Methode II kultiviert. Die Biofilme wurden mit 200 µl des entsprechenden Mediums (Tabelle 27) bedeckt. Zusätzlich wurden in Mikroreaktionsgefäßen $5 \cdot 10^5$ CHO-Zellen, sowie $5 \cdot 10^5$ THP-1 Zellen in 200 µl des entsprechenden Mediums (Tabelle 28) suspendiert. Zu jeder Probe wurde eine steigende Menge der aktiven Inkubationslösung gegeben (10 – 400 kBq). Die Inkubationslösung wurde durch Zugabe der aktiven Sonde in inaktive PBS ($c = 1$ MBq/ml bzw. 10 MBq/ml) erhalten. Die inkubierten Kulturen wurden 20 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Lösung entfernt und die Kulturen wurden dreimal mit PBS gespült. Zur Bestimmung der Restaktivität wurde das Biomaterial mit SDS (2 %) bei 37 °C 25 Minuten lang lysiert. Das Lysat wurde in ein Reagenzglas überführt und die verbliebenen Aktivitäten wurden in einem γ -Zähler bestimmt. Zur Bestimmung der Hintergrundaktivität wurden zusätzlich unkultivierte Mikroreaktionsgefäße mit den gleichen Aktivitäten inkubiert. Das Verfahren mit diesen Gefäßen erfolgte analog zu dem Vorgehen mit den kultivierten Gefäßen. Um die prozentuale Aufnahmen der Kulturen zu bestimmen wurde die Gesamtaktivität der zugegebenen Aktivitäten ebenfalls im γ -Zähler bestimmt. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt und die dargestellten Ergebnisse entsprechen dem Mittelwert jedes Messpunkts der entsprechenden Aktivität.

6.3.9. Assay zur DNA Quantifizierung

Für die Quantifizierung wurde ein Quant-iT™ (Thermo Fischer) DNA kit benutzt. In einer 96 well Platte wurden zur Kalibrierung DNA-Lösungen mit $c = 5 - 500 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ in Puffer eingestellt (200 μl). Zur Bestimmung der DNA-Menge in den Lysaten wurden Aliquote von 20 μl mit 180 μl Puffer aufgefüllt. Kalibrierlösung und Proben wurden 20 μl des Farbstoffes zugegeben. Die Platte wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und in einem Cytation 5 plate reader (BioTech) auf Fluoreszenz untersucht. Die Emission bei $\lambda = 527 \text{ nm}$ wurde bei einer Einstrahlungswellenlänge von $\lambda = 510 \text{ nm}$ detektiert. Die Konzentration in den Proben ergab sich aus linearen Regression mit der Kalibriergrade.

6.3.10. Inkubation und Bestrahlung eines Biofilms mit Nanopartikeln

Für diese Experimente wurde ein *P. fluorescens* Biofilm nach Methode I gezüchtet. Den Inkubationslösungen wurden Partikel NLP4 ($c = 0, 10, 50, 100$ und $250 \mu\text{g}/\text{ml}$) aus einer Stammlösung (in PBS, $c = 1 \text{ mg}/\text{ml}$) zugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Ein unbehandelter und unbestrahlter Biofilm sowie ein unbestrahlter, aber inkubierter ($c = 250 \mu\text{g}/\text{ml}$) Biofilm wurden als Referenz verwendet. Die Platte wurde dann unter eine LED-Konstruktion (bestehend aus 6 LEDs) gestellt und 180 Minuten mit einer blauen LED (470 mW, Spektrum siehe Abbildung 50 a)) bestrahlt (siehe Abbildung 50 b)).

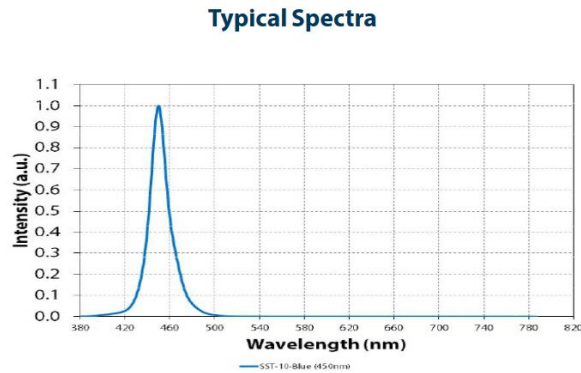


Abb 50: a) Emissionsspektrum der verwendeten LEDs; b) und c) Aufbau der Bestrahlungsapparatur.

Um die Anzahl der lebenden Bakterien nach der Behandlung zu bestimmen, wurde eine CFU-Bestimmung durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Überstände aus dem well genommen und der Rückstand wurde drei Mal mit PBS gewaschen um ungebundenes Material zu entfernen. Im Anschluss wurden 200 μ l frisches LB-Medium in jedes well gegeben und 30 Sekunden lang kräftig auf und ab pipettiert, um den verbliebenen Biofilm zu resuspendieren.

Die Biofilme wurden im Verhältnis 1:8000 für die Referenzen und die bestrahlten Biofilme für die Konzentrationen 0 - 50 μ g/ml verdünnt. Die mit den Konzentrationen 100 und 250 μ g/ml inkubierten Biofilme wurden im Verhältnis 1:1000 verdünnt. Aus jedem well wurden aliquote von 50 μ l auf LB-Agarplatten ausgestrichen und die Platten wurden für 24 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die gebildeten CFUs wurden gezählt. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt und die dargestellten Ergebnisse entsprechen dem Mittelwert der jeweils zugegebenen Menge an Partikel.

7. Literaturverzeichnis

- [1] FLEMMING *et al.*; *Nature Reviews Microbiology*, 14, 2016, 563 – 575
- [2] DONLAN *et al.*, *Emerging infectious diseases*, 8, 2002, 881 – 890
- [3] FAASSEN *et al.*, *Sensors*, 15, 2015, 10271–10291
- [4] RESCH *et al.*, *Proteomics*, 6, 2006, 1867 – 1877
- [5] SAUER *et al.*, *J. Bacteriol.*, 184, 2002, 1140 –1154.
- [6] MUKHERJEE *et al.*, *Nat. Rev. Microbiol.*, 17, 2019, 371 – 382
- [7] SOUCY *et al.*, *Nat. Rev. Genet.*, 16, 2015, 472 – 482
- [8] FISHER *et al.*, *Nat. Rev. Microbiol.*, 15, 2017, 453 – 464
- [9] CONLON *et al.*, ‘Persister Cells in Biofilm Associated Infections’, in: *Biofilm-based Healthcare-associated Infections*, 2015, Berlin, Germany: Springer International Publishing, 1–9
- [10] HOLLMANN *et al.*, ‘Biofilms and their role in pathogenesis’, verfügbar unter: <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/pathogens-disease/biofilms-and-their-role-pathogenesis>, aufgerufen am: 17.05.2023
- [11] SIMÕES *et al.*, *Food Science and Technology*, 43, 2010, 573 – 583
- [12] CHATTERJEE *et al.*, *Microscopy*, 63, 2014, 269 – 278
- [13] KANG *et al.*, *Angew. Chem. Int. Edit.*, 52, 33, 2013, 8557 – 8560
- [14] WU *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 16, 2009, 5390 – 5395
- [15] SCHRÖDER *et al.*, *ChemTexts*, 4, 9, 2018
- [16] BEHNKE *et al.*, *Dtsch. Arztebl. Int.*, 114, 2017, 851 – 857
- [17] SCHOOLTINK, ‘Mikrobielle Biofilme Gemeinsam zur Attacke’ verfügbar unter: <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/ausgabe-032015/gemeinsam-zur-attacke/>, aufgerufen am: 17.05.2023
- [18] KOSTAKIOTI *et al.*, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 3, a010306, 2013
- [19] BRONNER und BRUNSWIG *et al.*, *Appl. Mater. Interfaces*, 15, 11, 2023, 14067 – 14076
- [20] SCHEMBERI *et al.*, *Infect Immun.*, 69, 3, 2001, 1322 – 1328
- [21] BHARDWAJ *et al.*, *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.*, 8, 1, 2013, 68 – 83.
- [22] BADRI *et al.*, *Int. J. Pharm.*, 515, 1 – 2, 2016, 757 – 773
- [23] SHERWOOD *et al.*, *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.*, 18, 3, 2004, 385 – 405

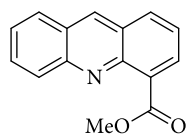
- [24] DENZLINGER *et al.*, *Science*, 230, **1985**, 330 – 332.
- [25] KRYPEL-WHITTEMORE *et al.*, *Front. Immunol.*, 6, **2016**, 62 – 73
- [26] TIMMERMANN *et al.*, *International Review of Cell and Molecular Biology*, 322, **2016**, 281 – 329
- [27] PHILLIPSON *et al.* *Nature Medicine*, 17, 11, **2011**, 1381 – 1390
- [28] MOSS, *Ann. Rev. Physiol.*, 41, **1979**, 633 – 652
- [29] SAMUELSSON *et al.*, *Science*, 237, 419, **1987**, 1171 – 1176
- [30] JAYARAJAH *et al.*, *Anal. Chem.*, 79, **2007**, 8162 – 8169
- [31] MARCOS-CONTRERAS *et al.*, *Blood*, 128, 20, **2016**, 2423 – 2434
- [32] DIEPGEN *et al.*, *Kurze Übersichtstabelle zur Geschichte der Medizin*, Springer, **1960**, Berlin, 32 – 33
- [33] GRUNDANN, *Einführung in die Allgemeine Pathologie und in Teile der Pathologischen Physiologie*, Fischer, München, **1989**, 141 – 144
- [34] TAKEUCHI *et al.*, *Cell*, 140, 8, **2010**, 805 – 820
- [35] AXELROD *et al.*, *Semin Neurol.*, 23, 4, **2003**, 381 – 390
- [36] KNAAPEN, *Circ. Cardiovasc Imaging*, 10, 2, **2017**
- [37] GALON *et al.*, *Science*, 313, **2006**, 1960 – 1964
- [38] FILIPPI *et al.*, *Adv. in Immun.*, 129, **2016**, 25 – 53
- [39] WYBLE *et al.*, *J. Surg. Res.*, 73, 2, **1997**, 107 – 112
- [40] SEHIC *et al.*, *Brain Res Bull.*, 39, 6, **1996**, 391 – 399
- [41] KANEKO *et al.*, *Inflamm and Regener*, 39, 12, **2019**
- [42] ZINDEL *et al.*, *Annual Review of Pathology*, 15, 1, **2020**, 493 – 518
- [43] CAINELLI *et al.*, *The Lancet, Infectious Diseases*, 2, 9, **2002**, 539 – 549
- [44] KUMAR *et al.*, *Int Rev Immunol.*, 30, 1, **2011**, 16 – 34
- [45] LI *et al.*, *Sig. Transduct. Target Ther.*, 21, 6, **2021**
- [46] SCHAEFER, *J. Biol. Chem.*, 289, 51, **2014**, 35237 – 35245
- [47] AKIRA *et al.*, *Cell*, 124, 4, **2006**, 783 – 801
- [48] SELLMYER *et al.*, *PNAS*, 114, 31, **2017**, 8372 – 8377
- [49] LATHAM *et al.*, *Forensic Sci. Res.*, 4, 1, **2019**, 51 – 59
- [50] HASAP *et al.*, *Int. J. Leg. Med.*, 134, **2020**, 461 – 471
- [51] AMER *et al.*, *J. Hard Tissue Biol.*, 26, 2, **2017**, 111 – 118

- [52] MUEHLEHNER *et al.*, *Phys. Med. Biol.*, 51, **2006**, R117
- [53] BECKER, *Radiologie*, 6, **2000**, 561 – 567
- [54] BIRSACK *et al.*, *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung*, 6, **2009**, 594–600
- [55] KRAUSE *et al.*, *Nuklearmedizin*, 6, 2007, 291 – 301
- [56] HABERKORN, *Entzündungen/Infektionen*, Thieme, Stuttgart/New York, **2001**, 342–355
- [57] KWON *et al.*, *Biomater. Sci.*, 7, **2019**, 3594 – 3598;
- [58] GBD 2019 ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS, *The Lancet*, 400, 1036, **2023**, 2221 – 2248
- [59] AHMED *et al.*, *Cureus*, 13, 5, **2021**, e14925
- [60] PONVERT *et al.*, *Pediatr. Allergy Immunol.*, 22, **2011**, 411– 418,
- [61] SARRO *et al.*, *Curr. Med. Chem.*, 8, **2001**, 371– 384
- [62] RAMIREZ *et al.*, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 10, **2020**, 572912.
- [63] “Antibiotic resistance,” verfügbar unter: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>, aufgerufen am: 17.05.2023
- [64] HUANG, *Technology in Cancer Research & Treatment*, 4, 3, **2005**, 283 – 293
- [65] LIU *et al.*, *J Clin Transl Res.*, 1, 3, **2015**, 140 – 167
- [66] GEHRING *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 138, 9, **2016**, 3076 – 3084
- [67] BARANYAI, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 1, 2020, 36–56
- [68] DERI *et al.*, *Nucl. Med. Biol.*, 40, 1, **2013**, 3 – 14
- [69] BYEGÅRD *et al.*, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 241, **1999**, 281 – 290
- [70] BARRET *et al.*, *Appl. Radiation and Isotopes*, 146, **2019**, 99 – 103
- [71] RYAN *et al.* *Dalton Trans.*, 44, **2015**, 16332 - 16344
- [72] SAYED *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18, **2016**, 24642 – 24653
- [73] RYAN *et al.*, *Dalton Trans.*, 44, **2015**, 16332 – 16344
- [74] REHMAN *et al.*, *PLoS ONE*, 9, 4, **2014**, e93913
- [75] DE ALMEIDA *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 6, **2015**, 13023 – 13042
- [76] GLEMBOCKYTE *et al.*, *Acc. Chem. Res.*, 54, 17, **2021**, 3338 – 3348
- [77] TODD *et al.*, *J. Med. Chem.*, 42, 4, **1999**, 536 – 540
- [78] “Acridine binding to DNA”, verfügbar unter: <https://www.rcsb.org/structure/452D>, aufgerufen am: 17.05.2023
- [79] FERNANDEZ *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 21, 4, **2010**, 723 – 730

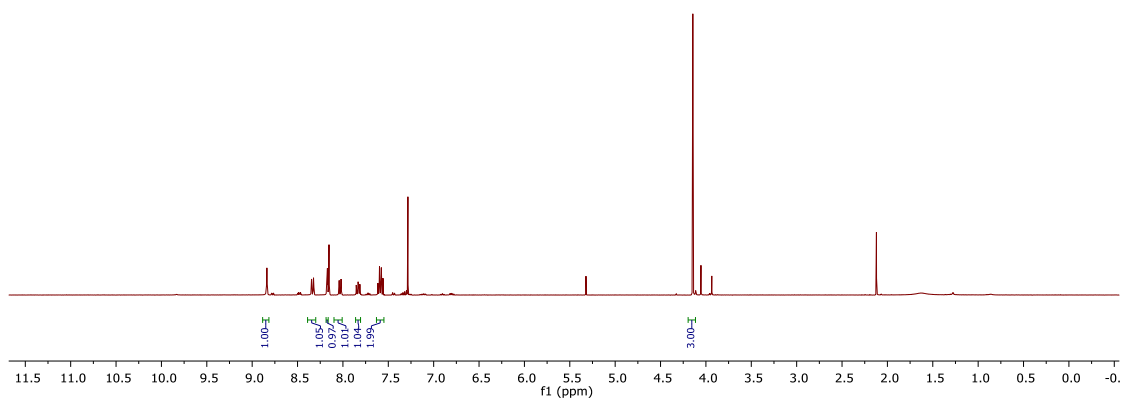
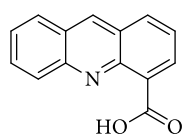
- [80] BAZHULINA *et al.*, *J Biomol Struct Dyn.*, 26, 6, **2009**, 701 – 718
- [81] “Hoehst 33342“, verfügbar unter: <https://www.bio-rad-antibodies.com/cell-health-nuclear-staining-cell-pureblu-hoechst-33342.html>, aufgerufen am: 17.05.2023
- [82] WANG *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, 13, **2015**, 6580 – 6586
- [83] BURES *et al.*, *J. Org. Chem.*, 74, 5, **2009**, 2203 – 2206
- [84] BOUZIDE *et al.*, *Org. Lett.*, 14, 4, **2002**, 2329 – 2332
- [85] KUMAR *et al.*, *Results in Chemistry*, 4, **2022**, 100403
- [86] WINNET, *Inorganic Chemistry*, 59, 1, **2020**, 118 – 127
- [87] MARTÍN *et al.*, *J. Org. Chem.*, 74, 5, **2009**, 2203 – 2206
- [88] KUSCHEL *et al.*, *Chem. Mater.*, 22, 4, **2010**, 1472 – 1482
- [89] KHAN *et al.*, *Sci Rep.*, 4, **2014**, 4257
- [90] OSMAN *et al.*, *World Neurosurg.*, 114, **2018**, 1310 – 1315.
- [91] ESTEVEZ *et al.*, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 18, 8, **2010**, 4104 – 4116
- [92] LI *et al.*, *Analyst*, 135, **2010**, 1360 – 1364
- [93] KUBBIES *et al.*, *Cytometry*, 3, 4, **1993**, 276 – 281
- [94] BI *et al.*, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 119, 1, **2006**, 199 – 208
- [95] PISTON *et al.*, *Trends in Biochemical Science*, 32, 9, **2007**, 407 – 414
- [96] LIU *et al.*, *J. Clin. Transl. Res.*, 1, **2015**, 140 – 167.
- [97] FISCHER *et al.*, *Clin. Chim. Acta*, 274, **1998**, 89 – 104.
- [98] WANG *et al.*, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 13, 23, **2015**, 6580 – 6586
- [99] OKOTH *et al.*, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 9, **2013**, 608 – 612
- [100] MAJI *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 57, 16, **2014**, 6973 – 6988
- [101] MONGE *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 10, **1995**, 1786 – 1792
- [102] TUCCITTO *et al.*, *Chemistry - A European Journal*, 27, 55, **2021**, 13715 – 13718
- [103] SERAFI *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 65, 4, **2022**, 3173 – 3192
- [104] SETO *et al.*, *Journal of the American Chemical Society*, 115, 4, **1993**, 1321 - 1329
- [105] DAS *et al.*, *Tetrahedron Letters*, 57, 16, **2016**, 1775 – 1781
- [106] PEUKERT *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 64, 16, **2021**, 12359 – 12378
- [107] PATEL *et al.*, *ACS Chemical Neuroscience*, 10, 8, **2019**, 3635 – 3661

8. Anhang

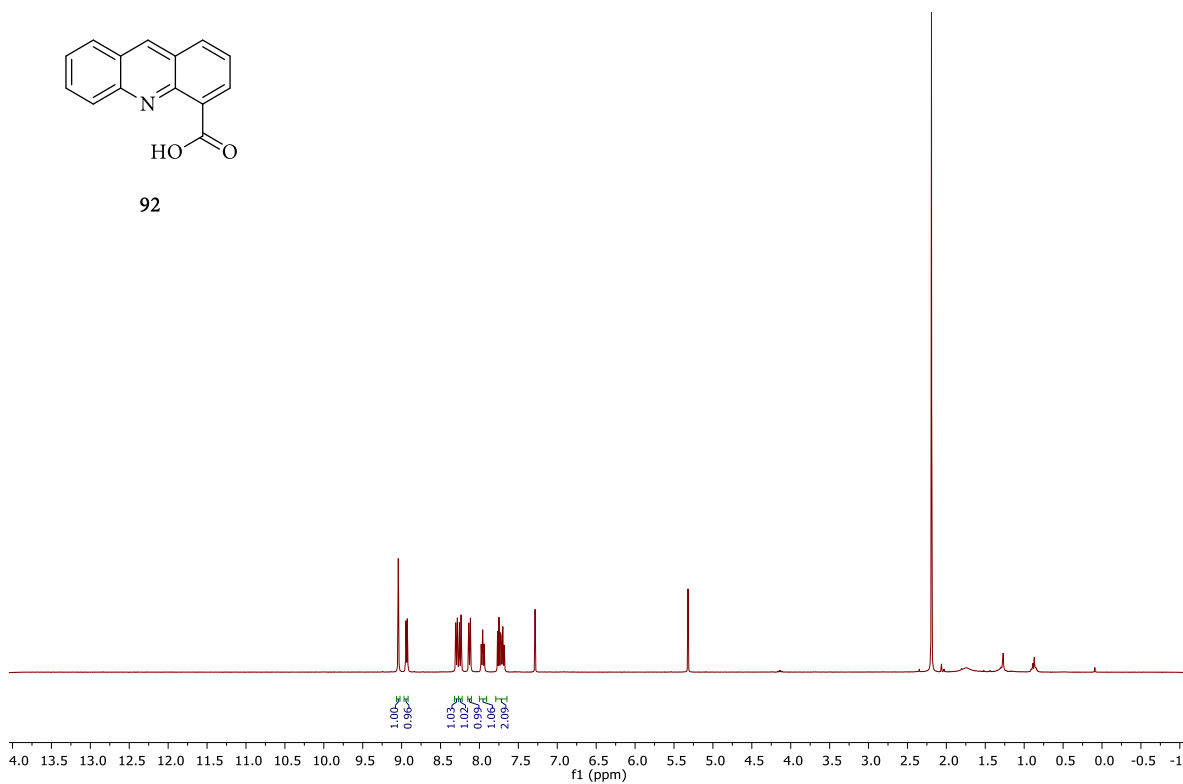
8.1. NMR-Spektren

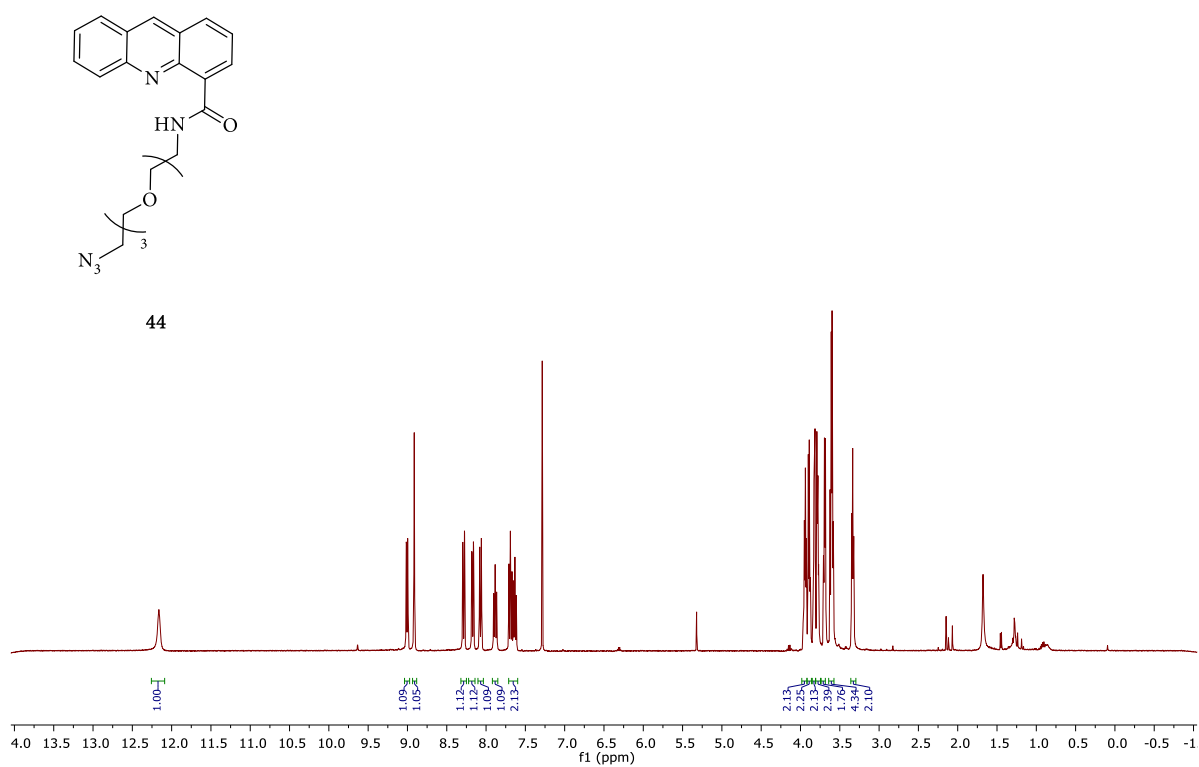
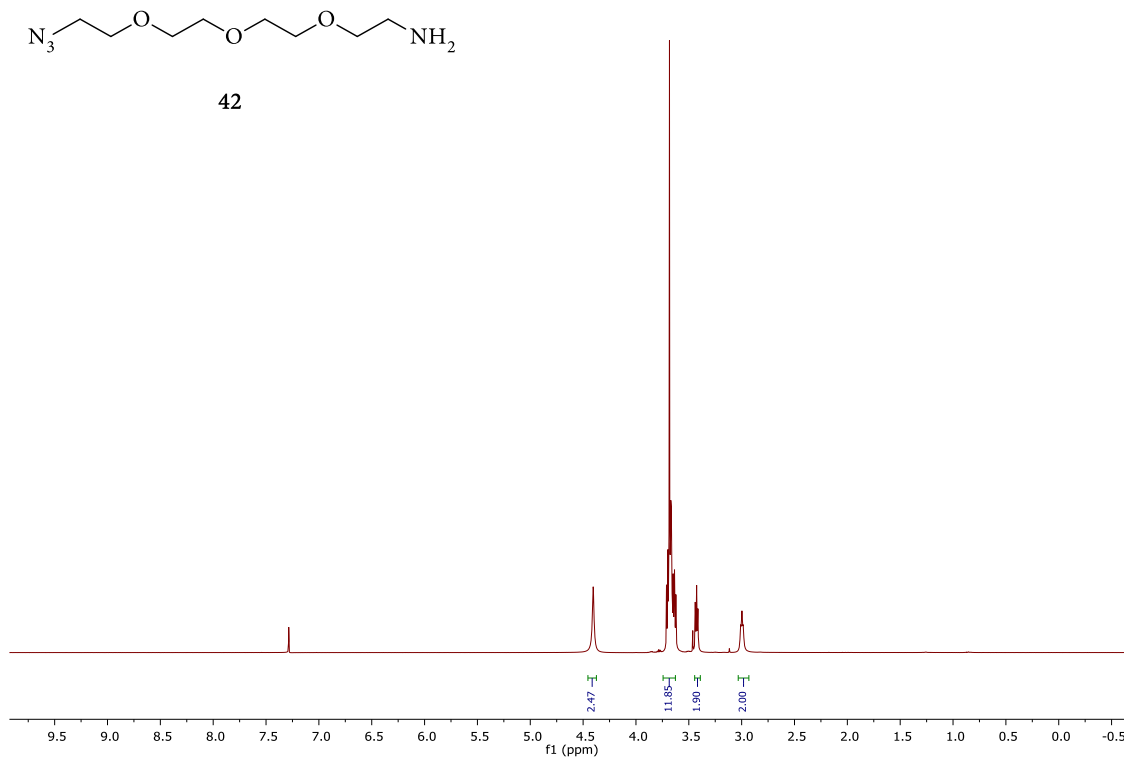


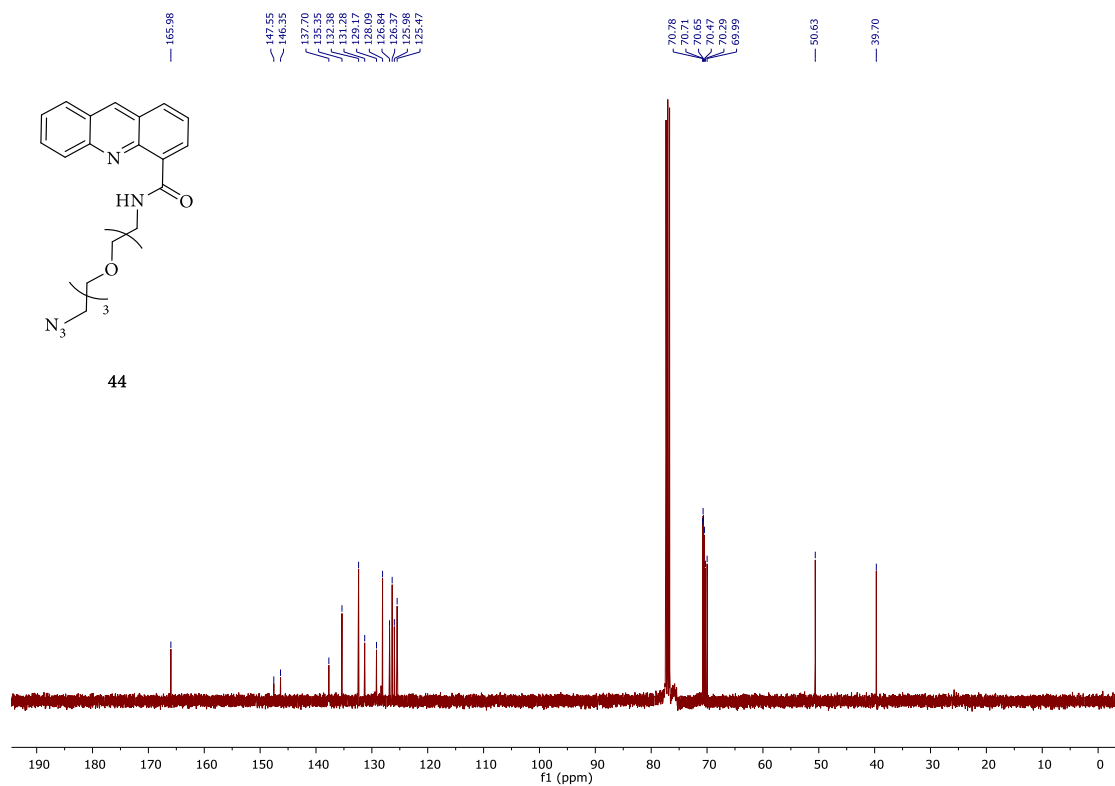
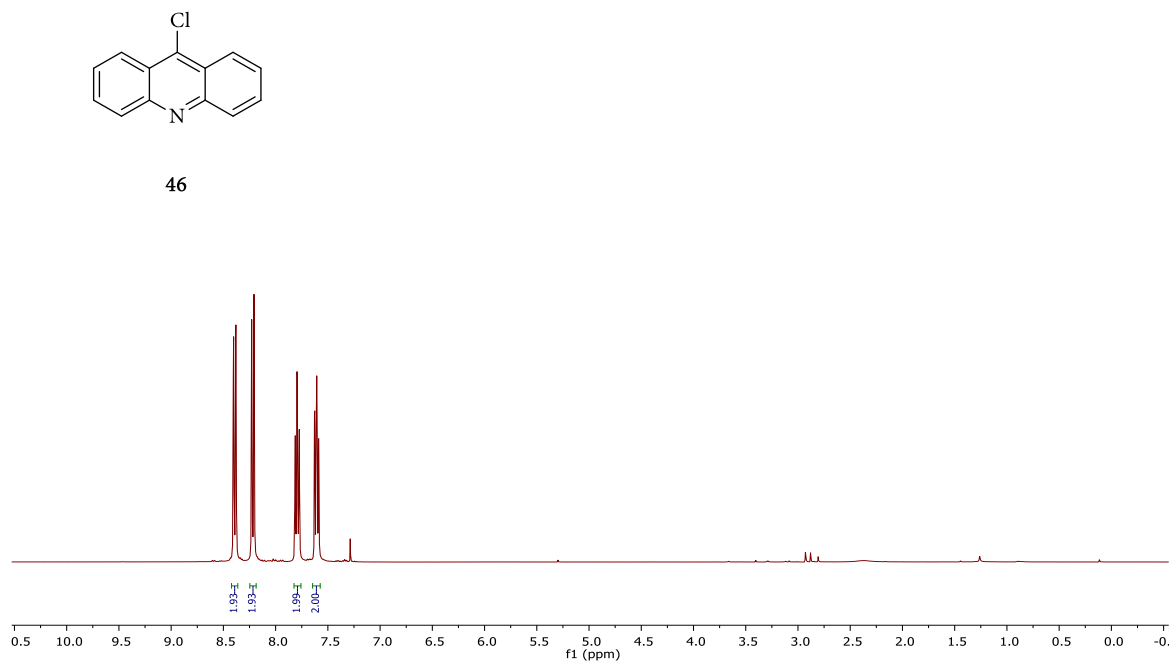
39

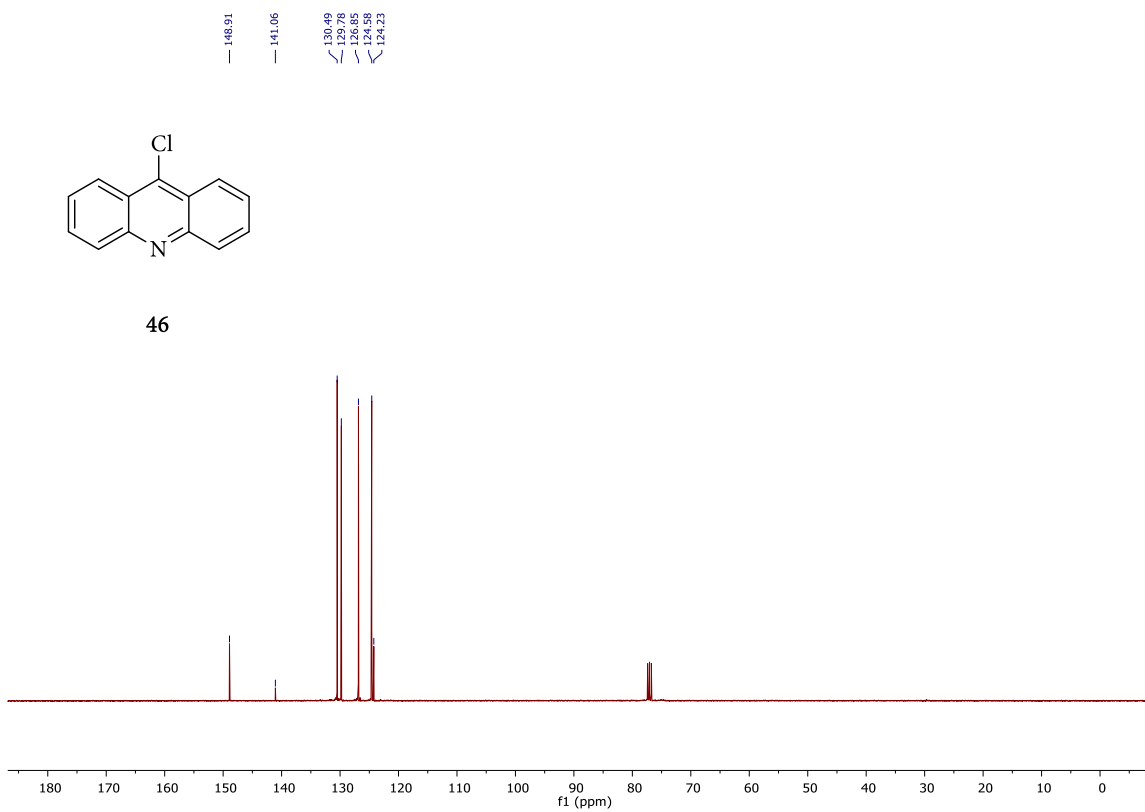
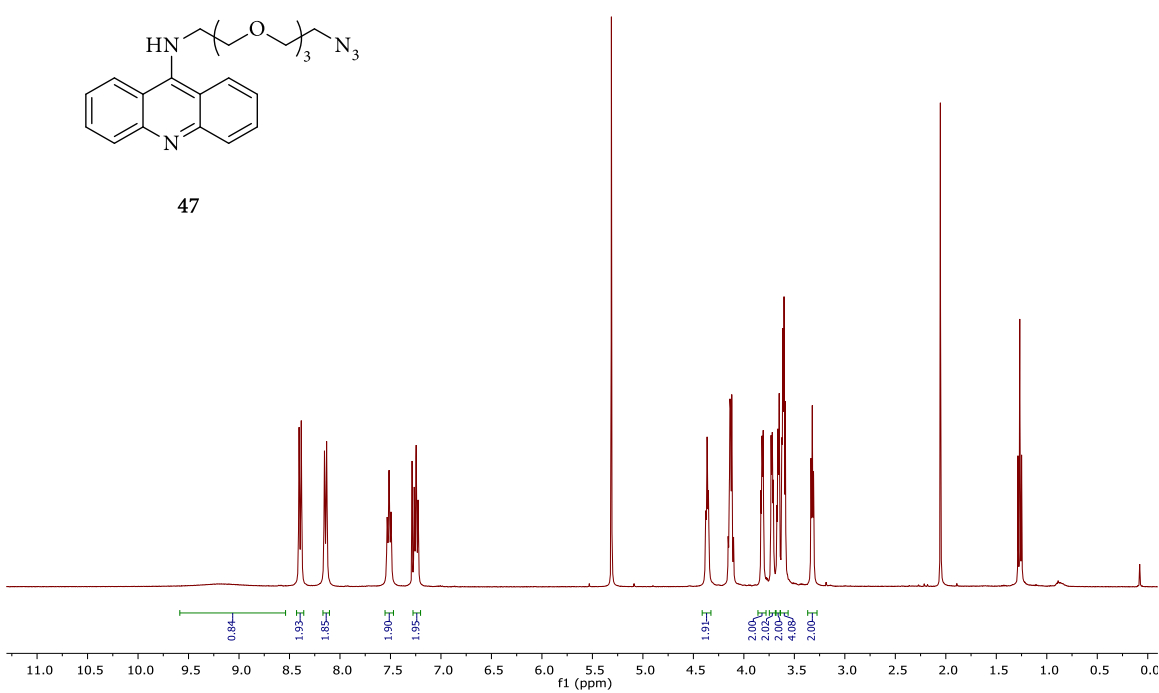
Abb. 51: ¹H-NMR- Spektrum von Verbindung 39.

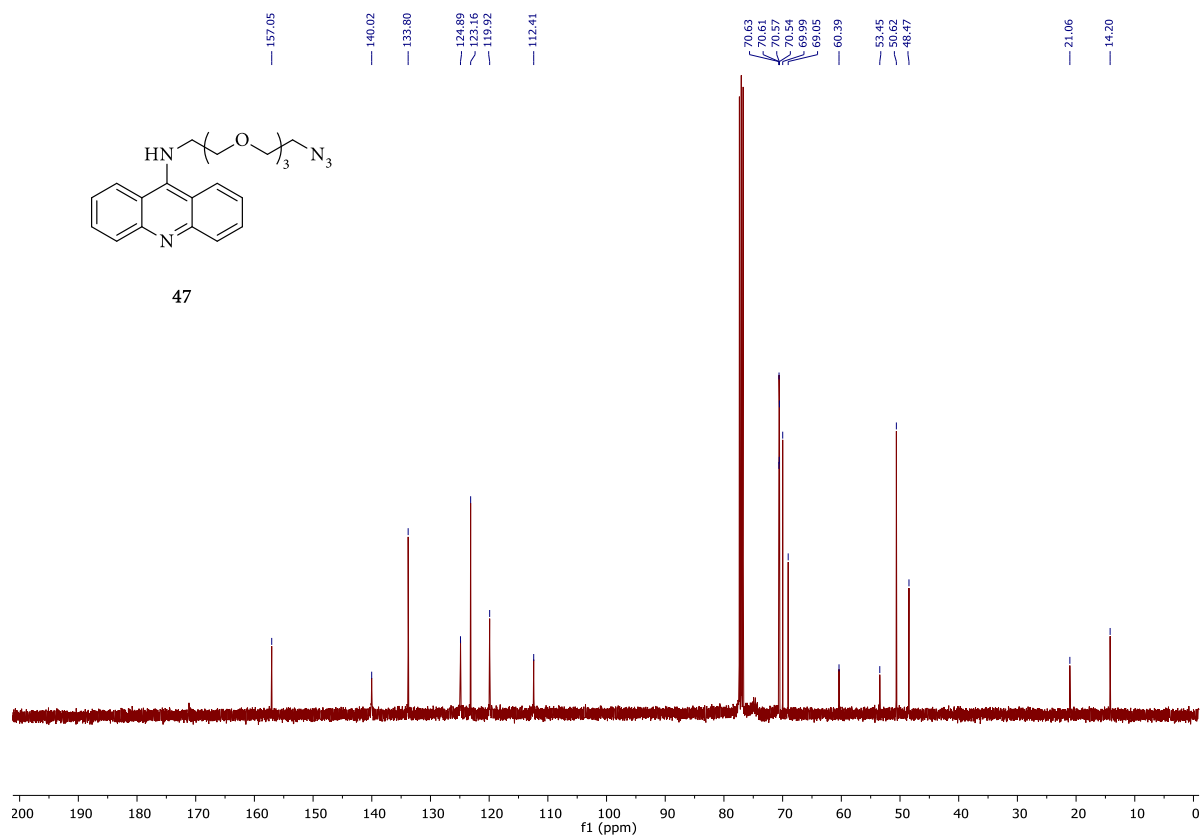
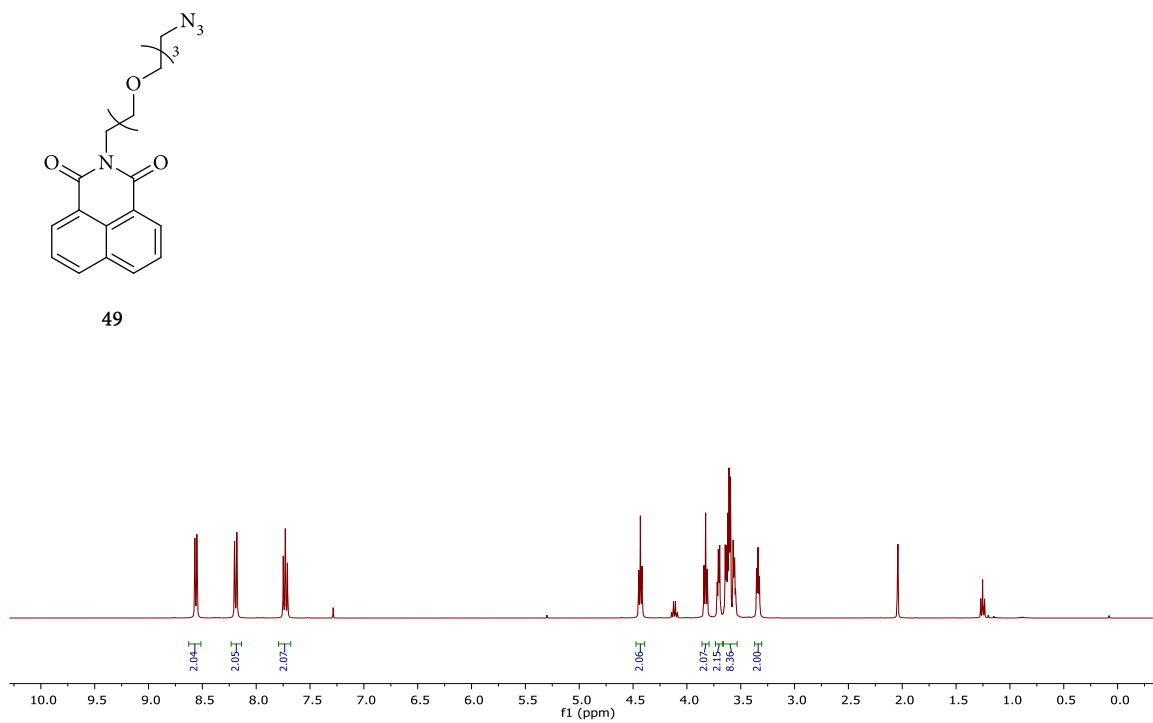
92

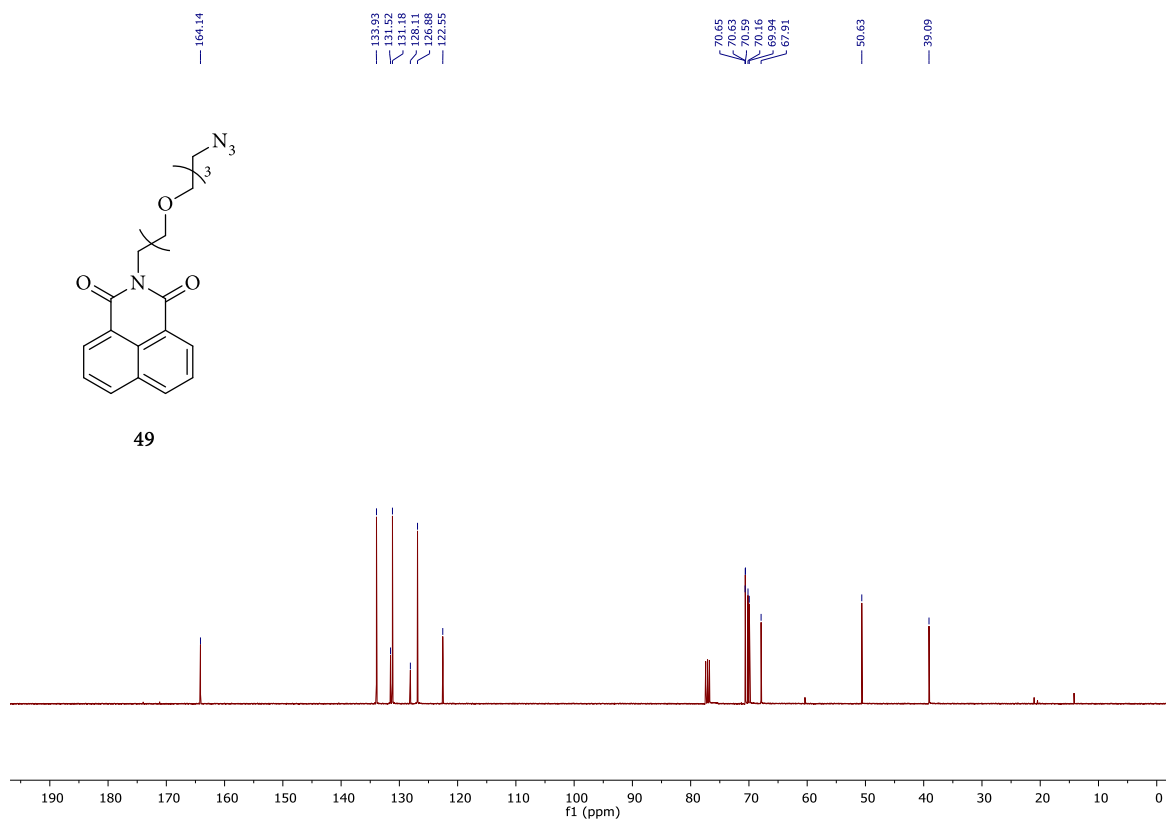
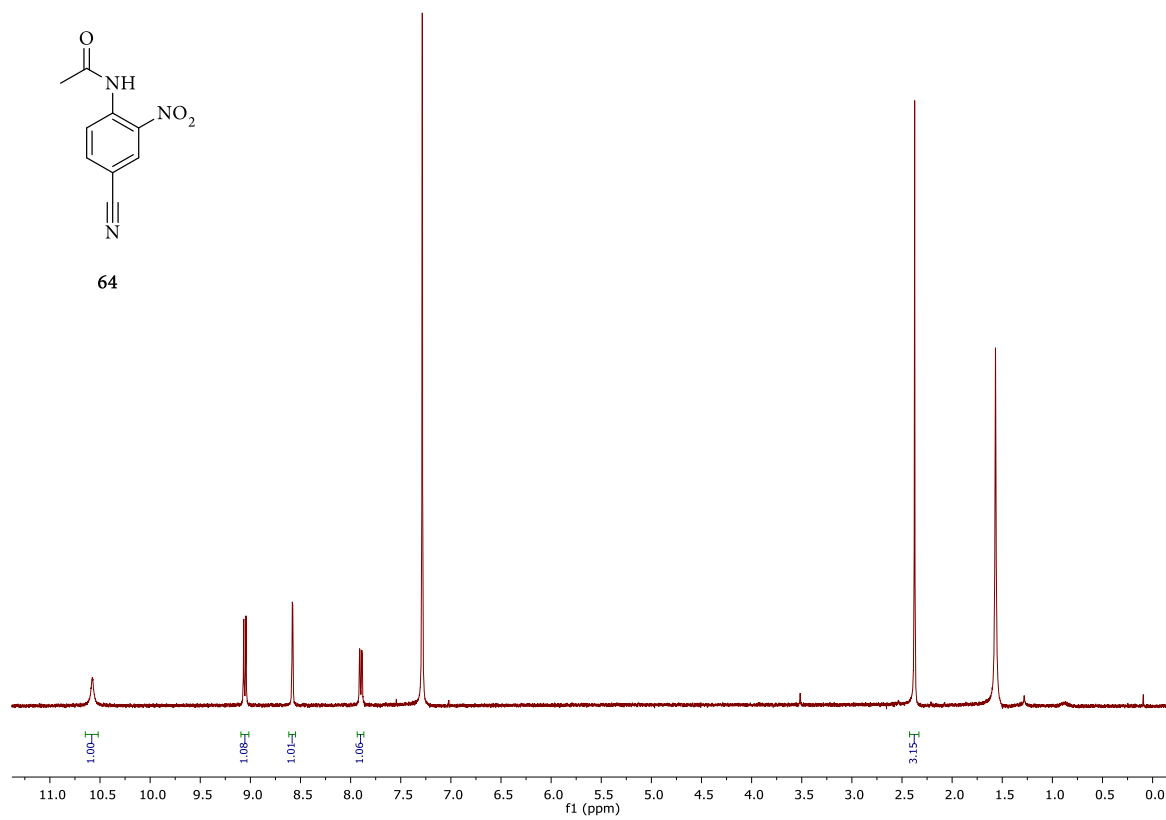
Abb. 52: ¹H-NMR- Spektrum von Verbindung 92.

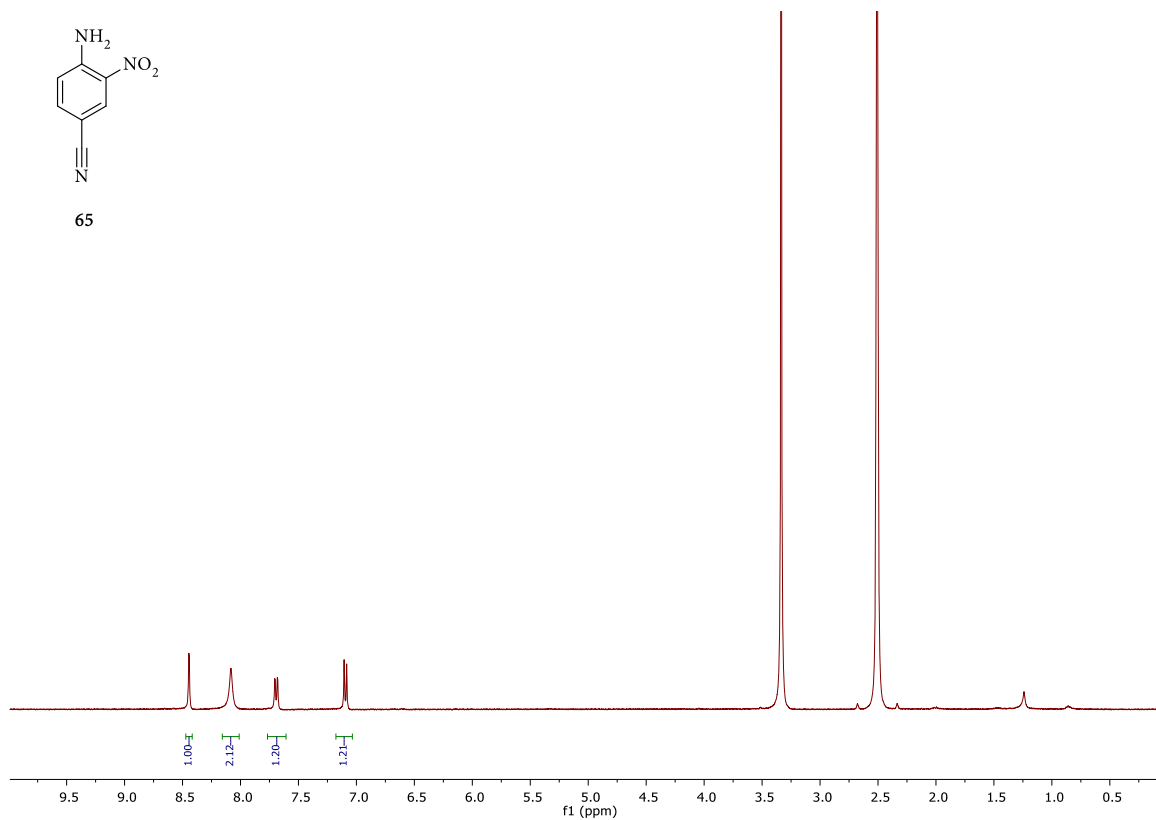
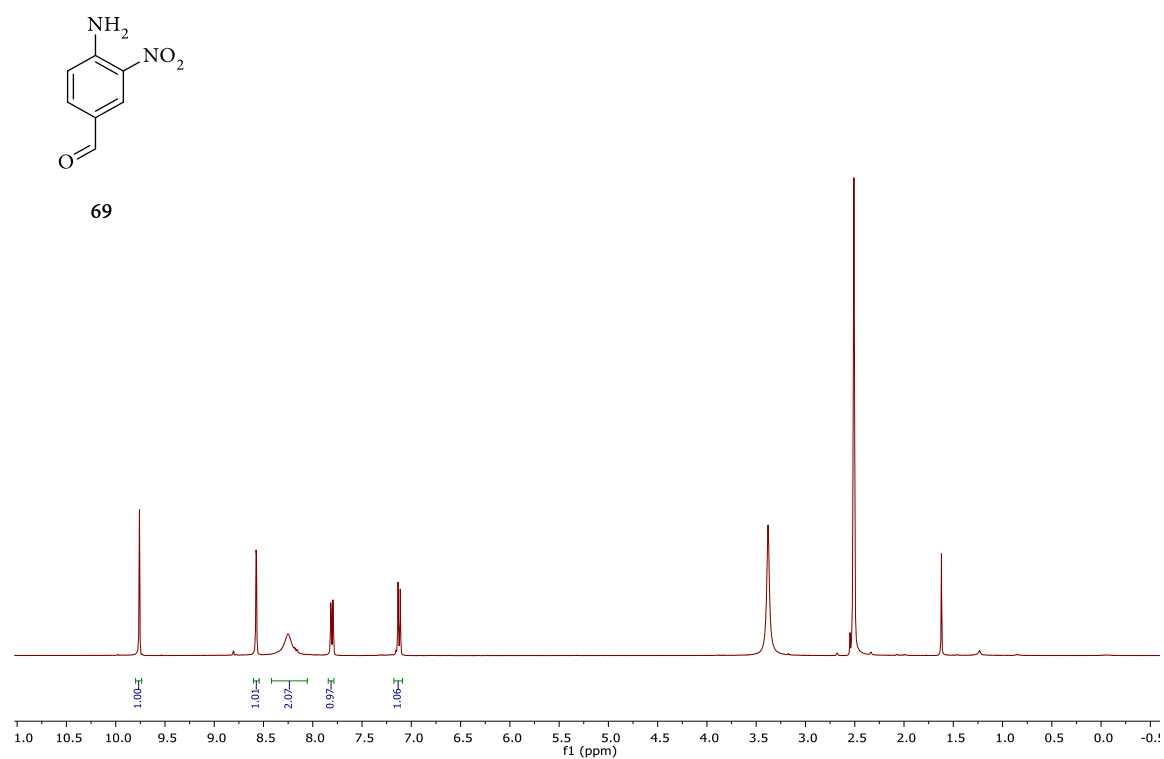


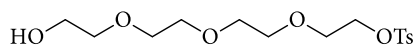
Abb. 55: ^{13}C -NMR- Spektrum von Verbindung 44.Abb. 56: ^1H -NMR- Spektrum von Verbindung 46.

Abb. 57: ^{13}C -NMR- Spektrum von Verbindung 46.Abb. 58: ^1H -NMR- Spektrum von Verbindung 47.

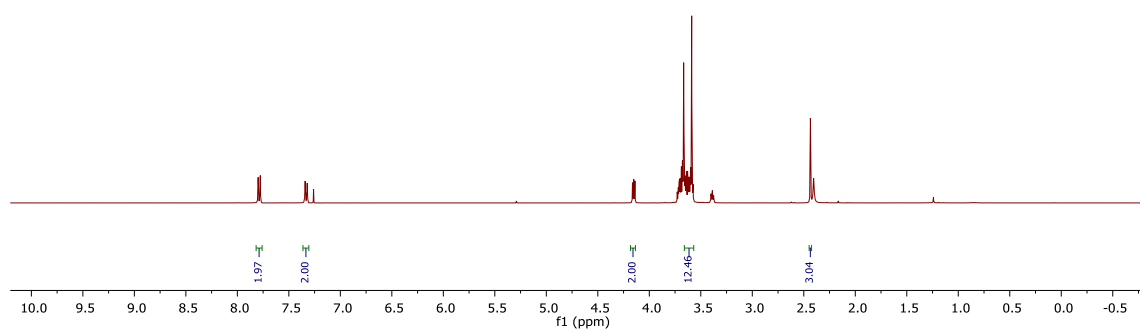
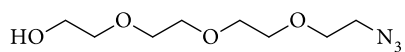
Abb. 59: ¹³C-NMR- Spektrum von Verbindung 47.Abb. 60: ¹H-NMR- Spektrum von Verbindung 49.

Abb. 61: ^{13}C -NMR- Spektrum von Verbindung 49.Abb. 62: ^1H -NMR- Spektrum von Verbindung 64.

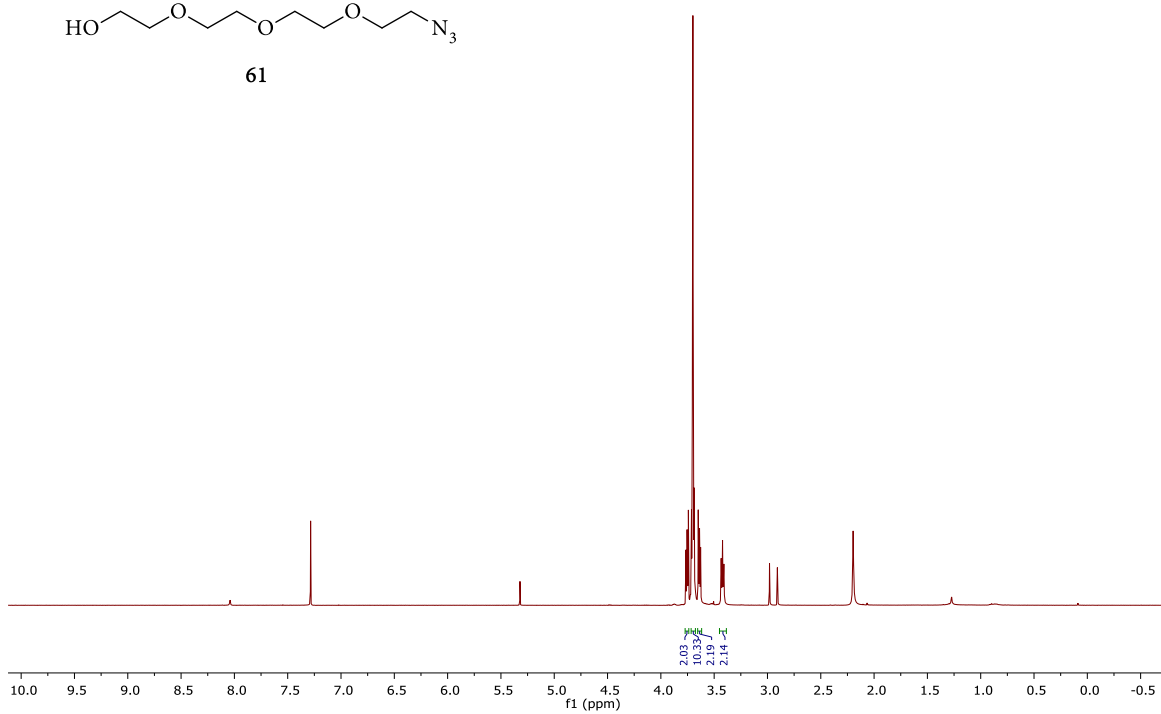
Abb. 63: ^1H -NMR- Spektrum von Verbindung 65.Abb. 64: ^1H -NMR- Spektrum von Verbindung 69.

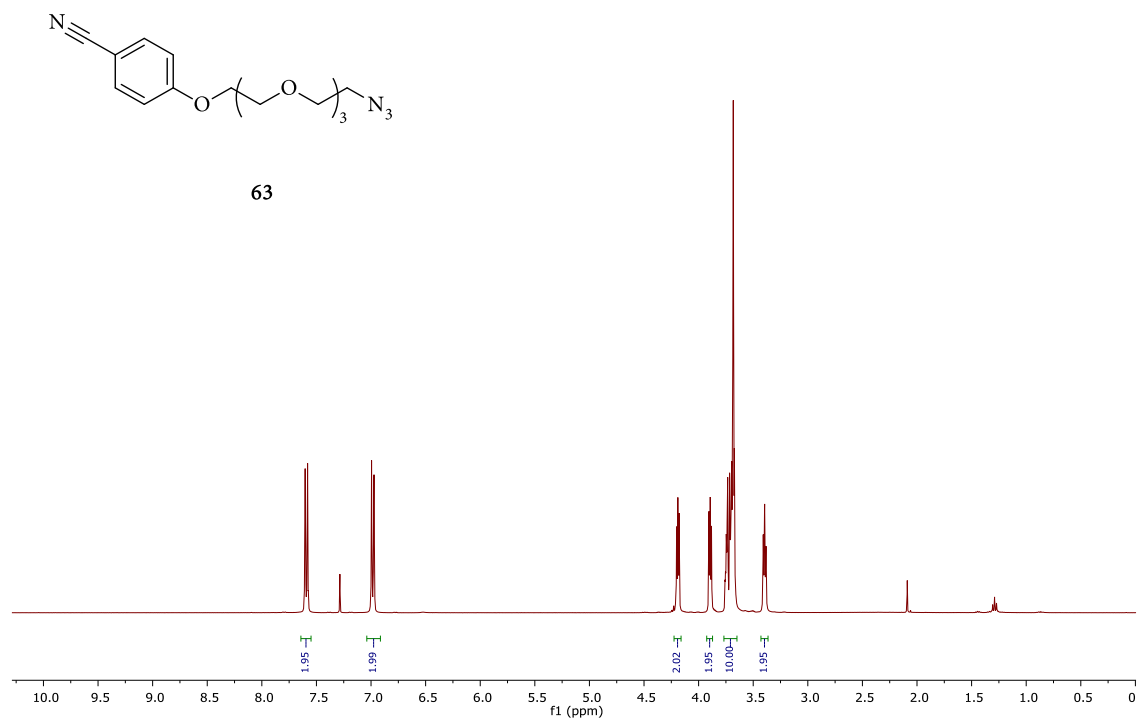
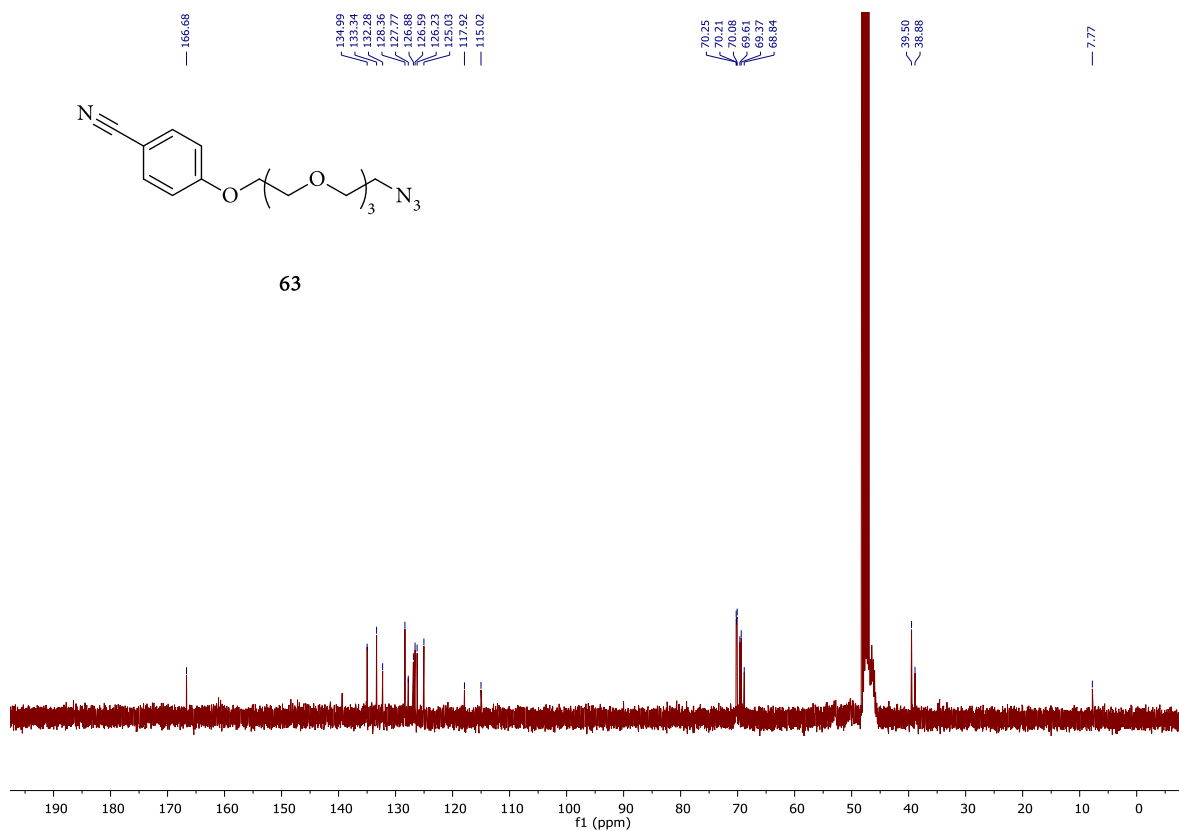


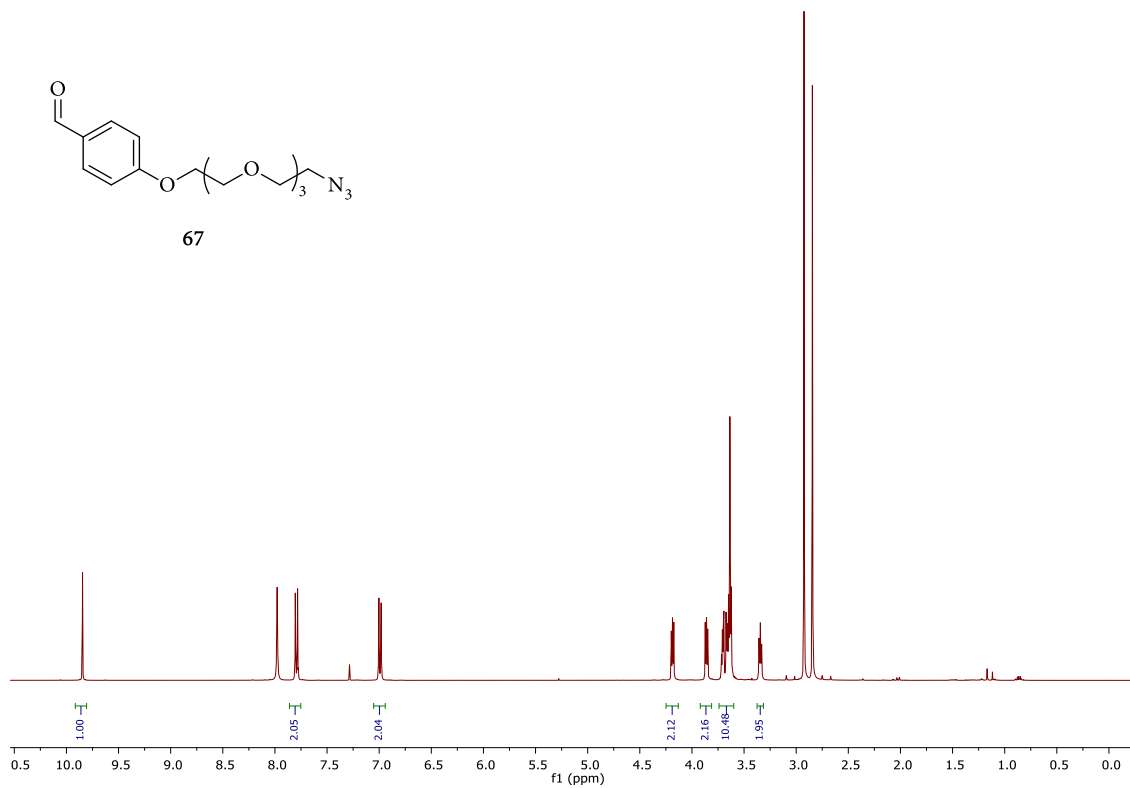
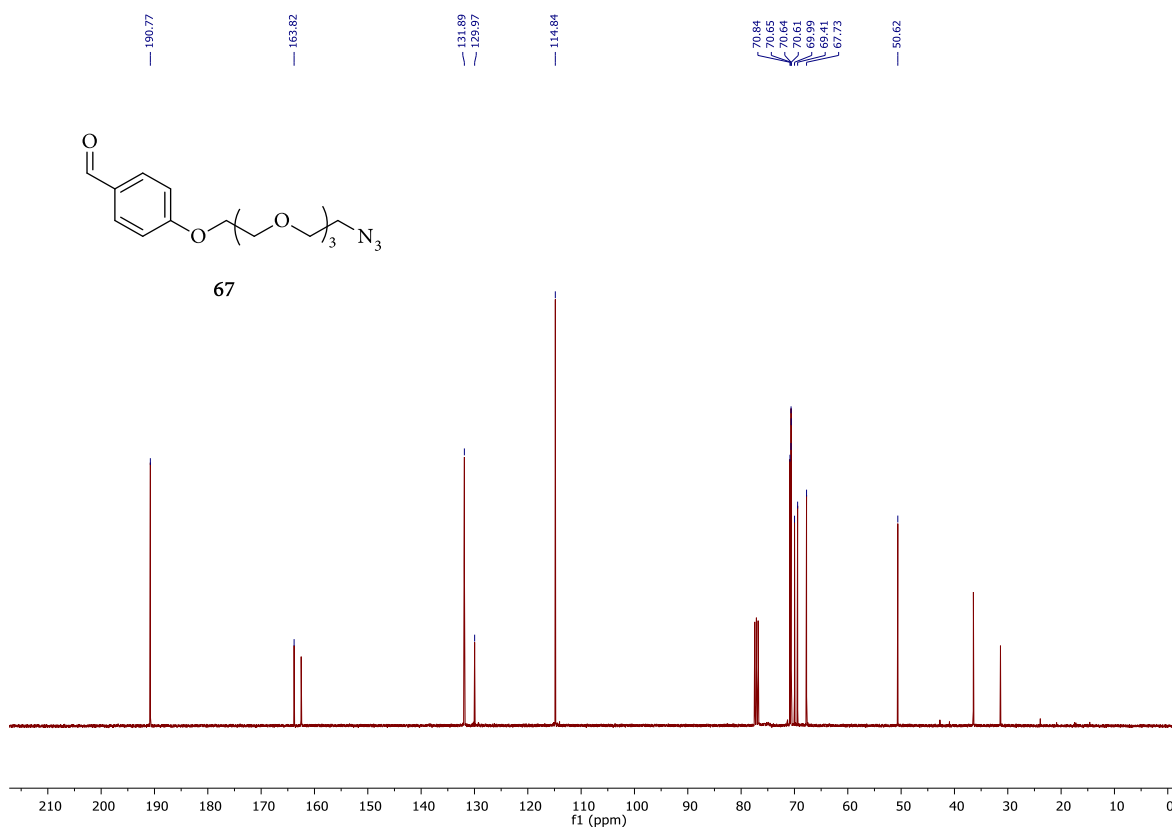
60

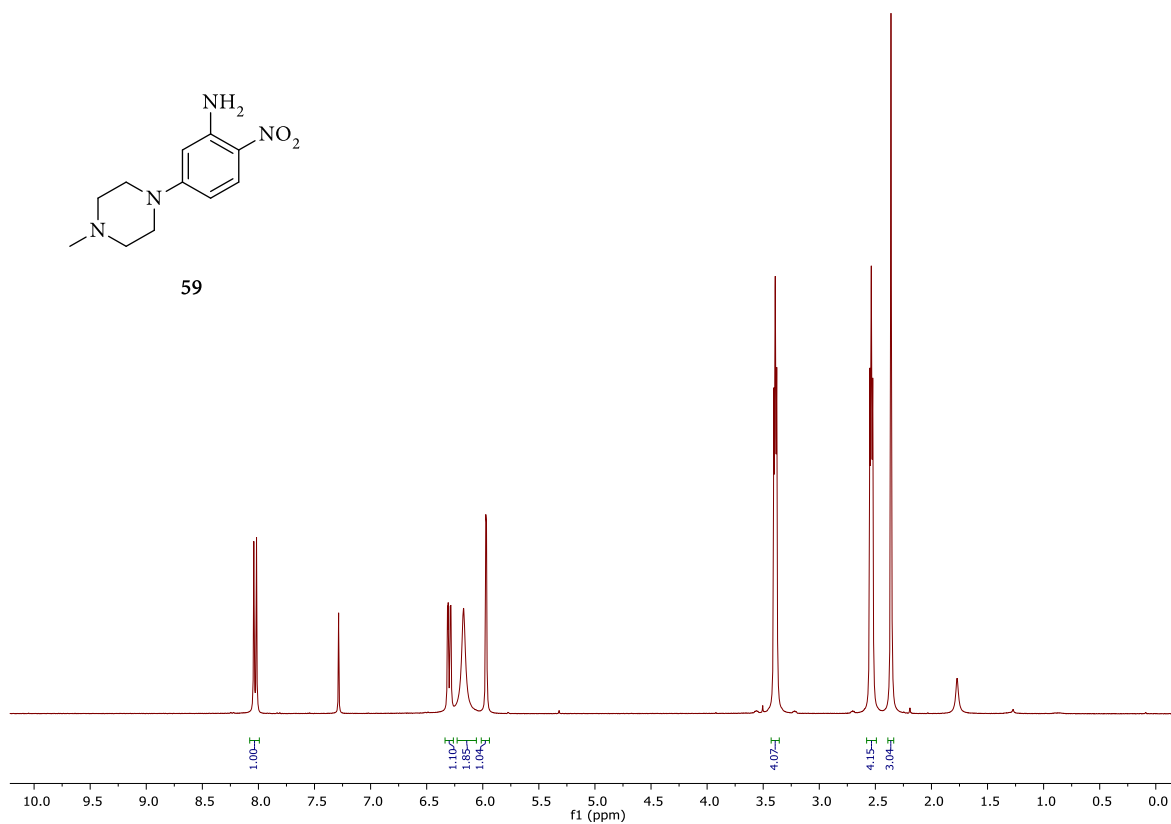
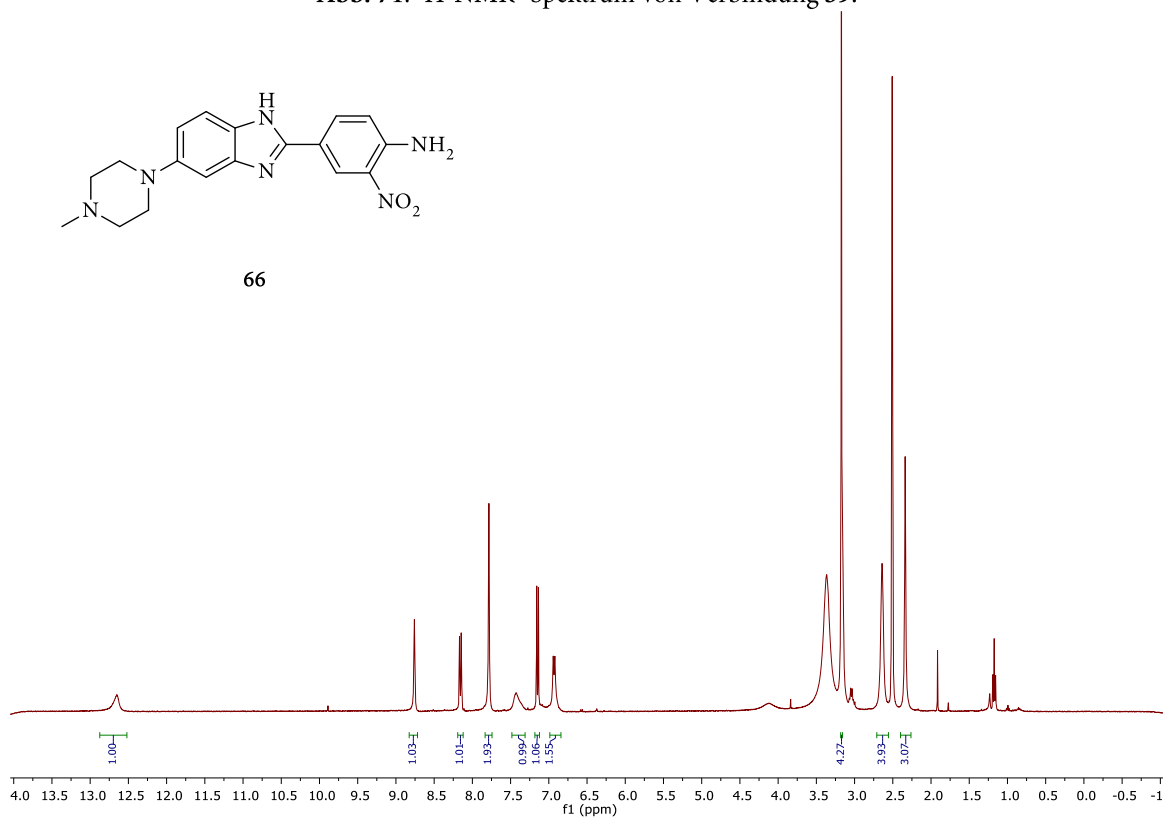
Abb. 65: ¹H-NMR- Spektrum von Verbindung 60.

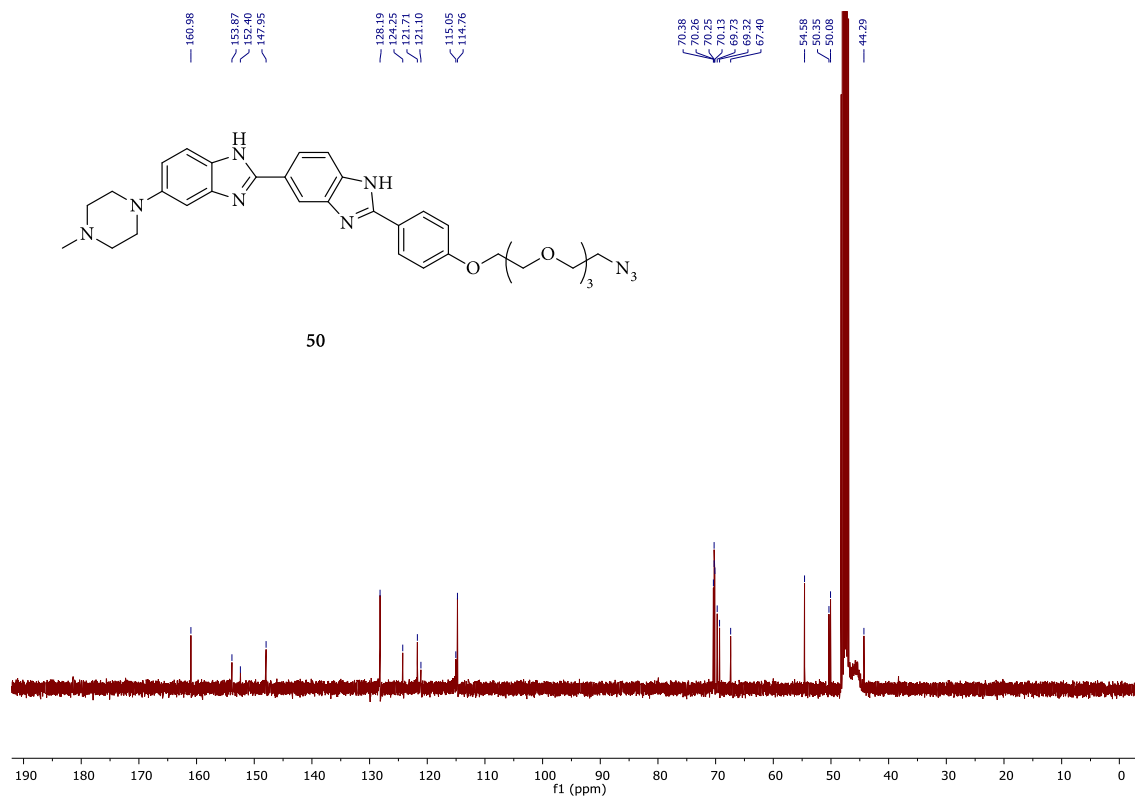
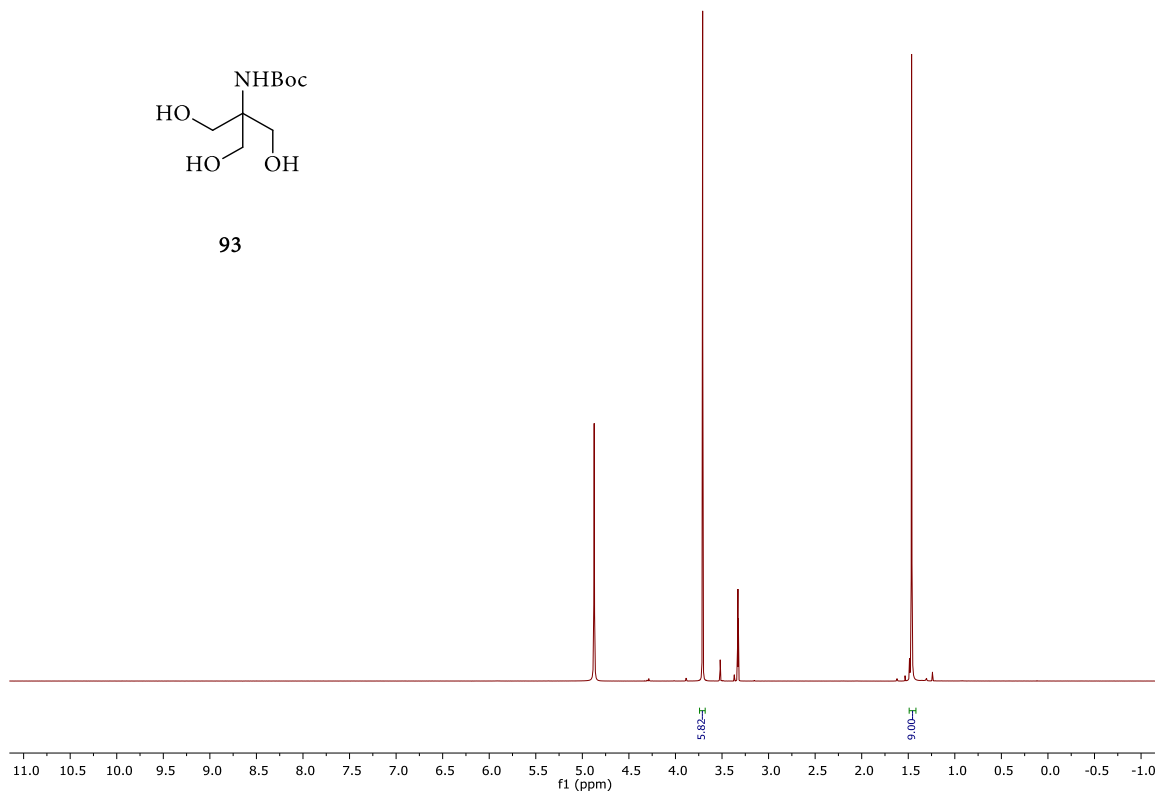
61

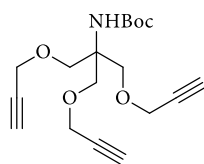
Abb. 66: ¹H-NMR- Spektrum von Verbindung 61.

Abb. 67: ^1H -NMR- Spektrum von Verbindung 63.Abb. 68: ^{13}C -NMR- Spektrum von Verbindung 63.

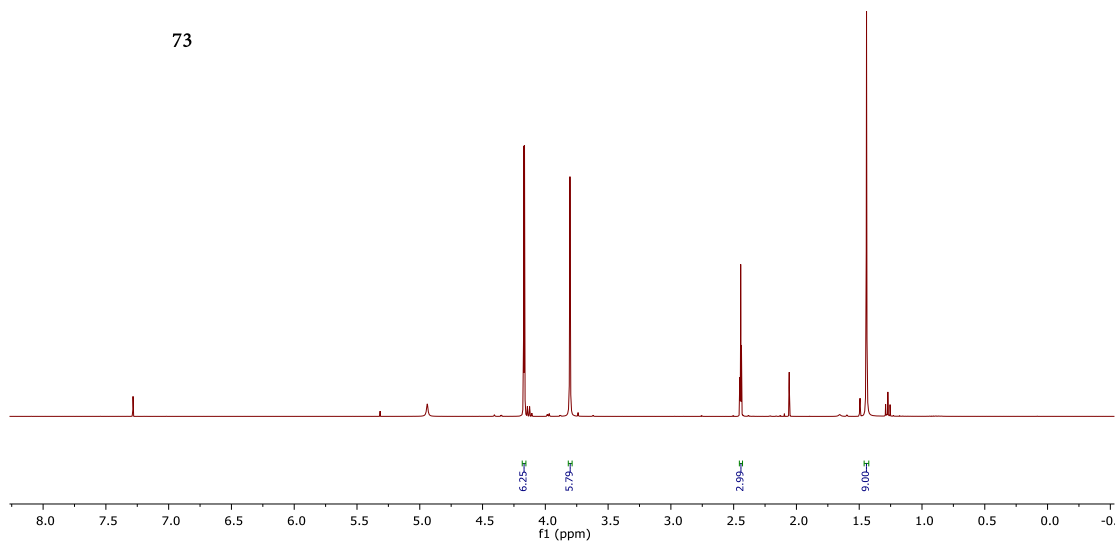
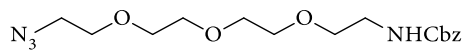
Abb. 69: ^1H -NMR- Spektrum von Verbindung 67.Abb. 70: ^{13}C -NMR- Spektrum von Verbindung 67.

Abb. 71: ^1H -NMR- Spektrum von Verbindung 59.Abb. 72: ^1H -NMR- Spektrum von Verbindung 66.

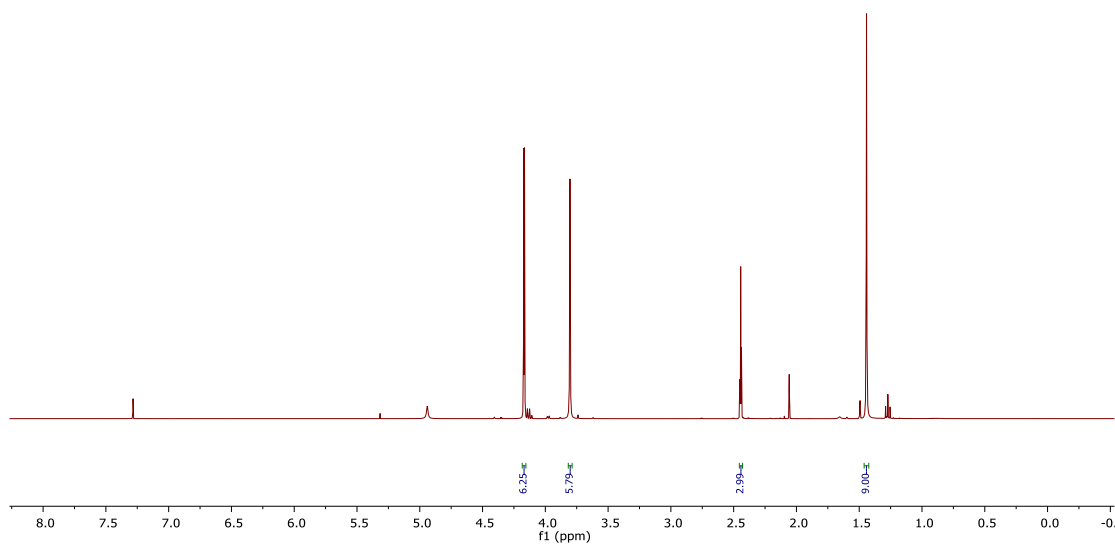
Abb. 75: ^{13}C -NMR-Spektrum von Verbindung 50.Abb. 76: ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung 93.

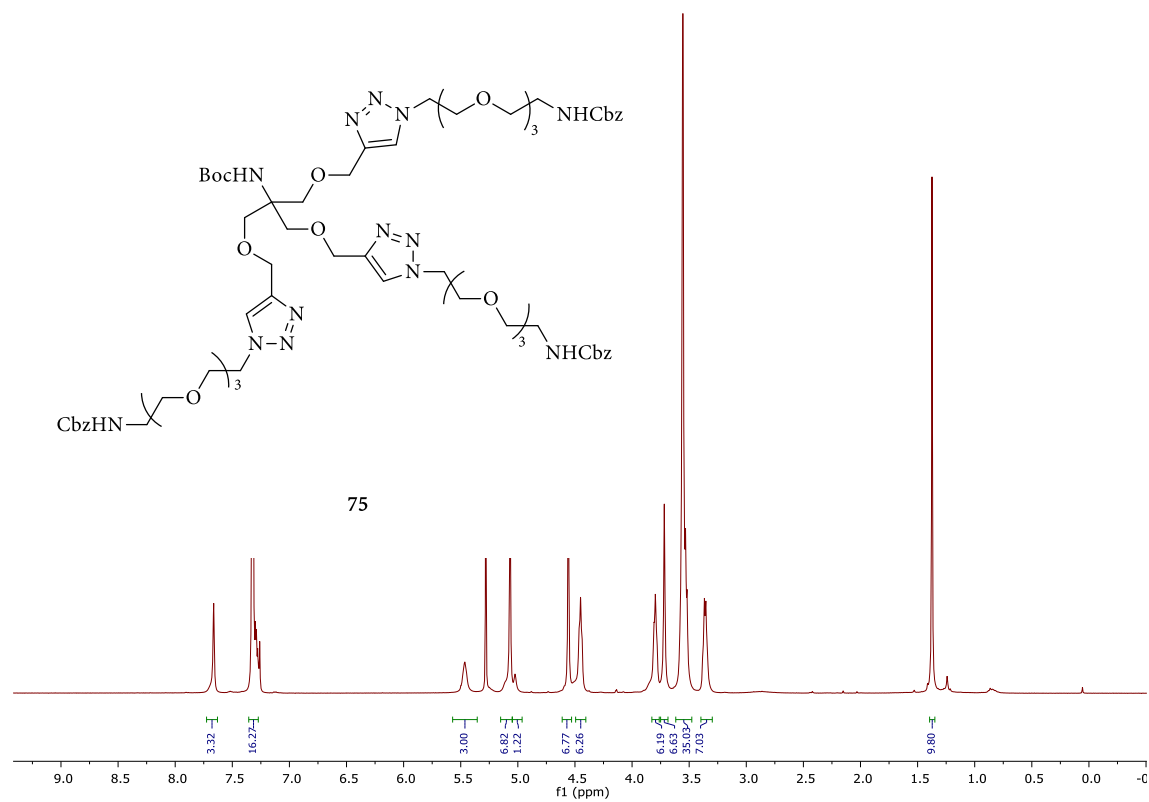
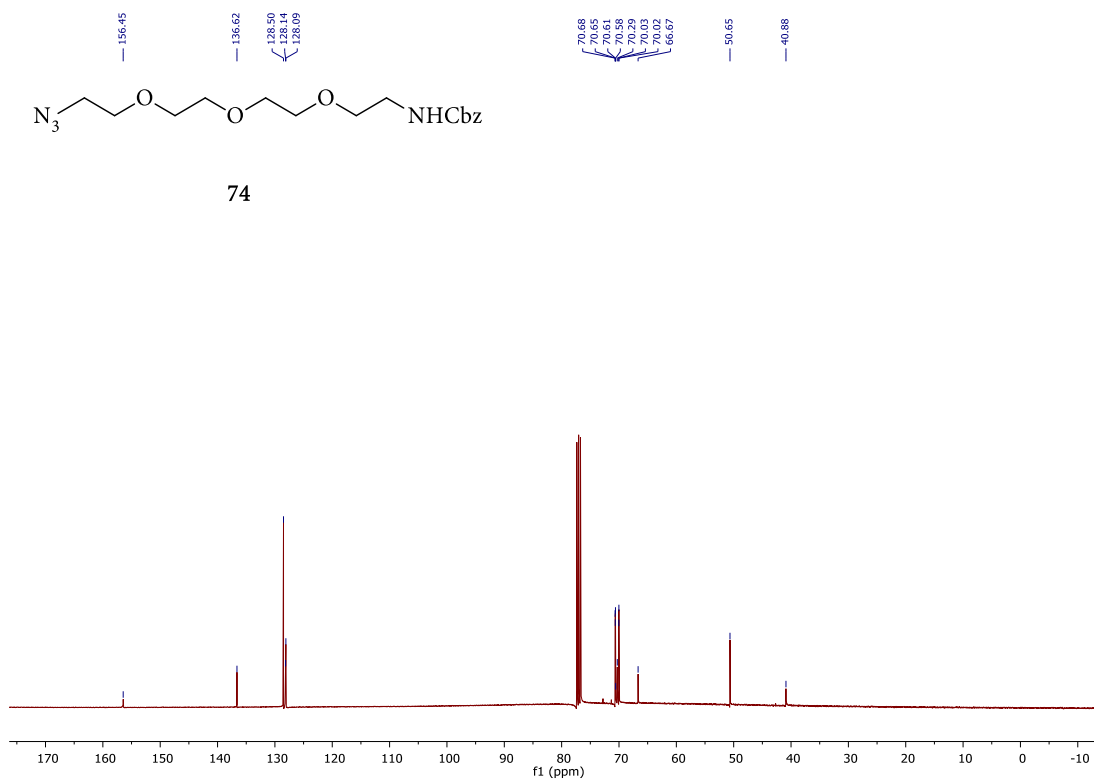


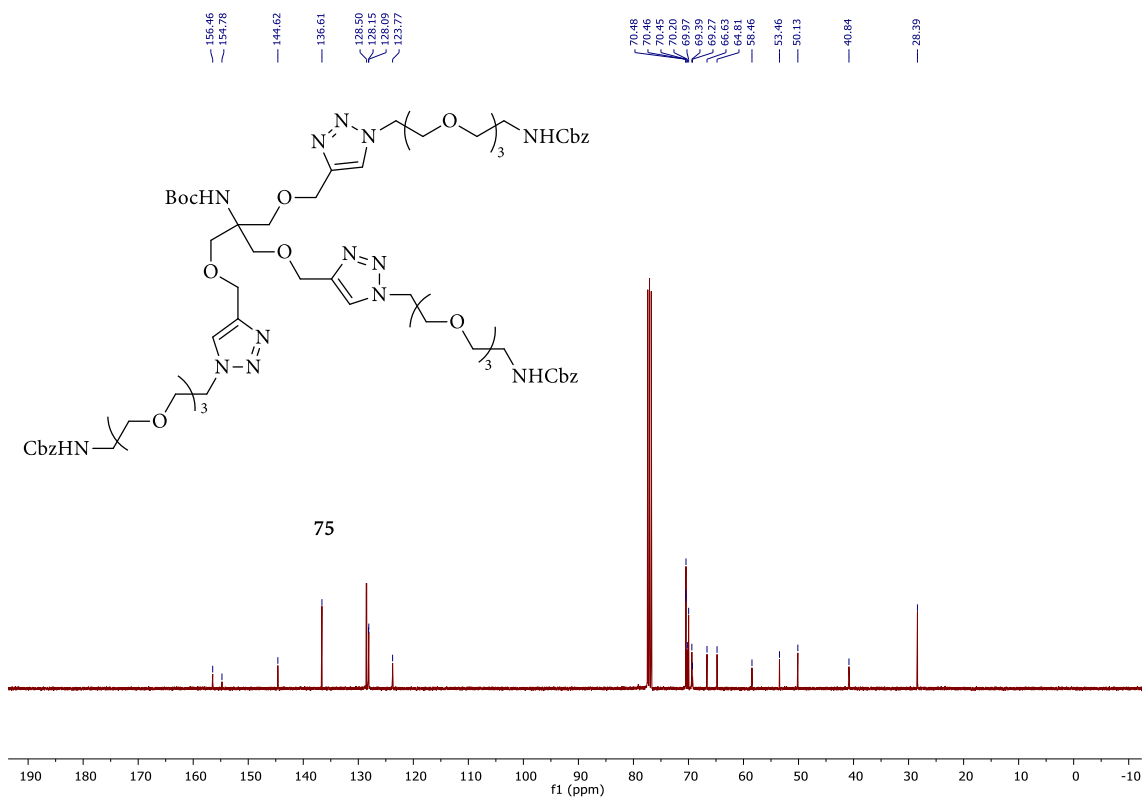
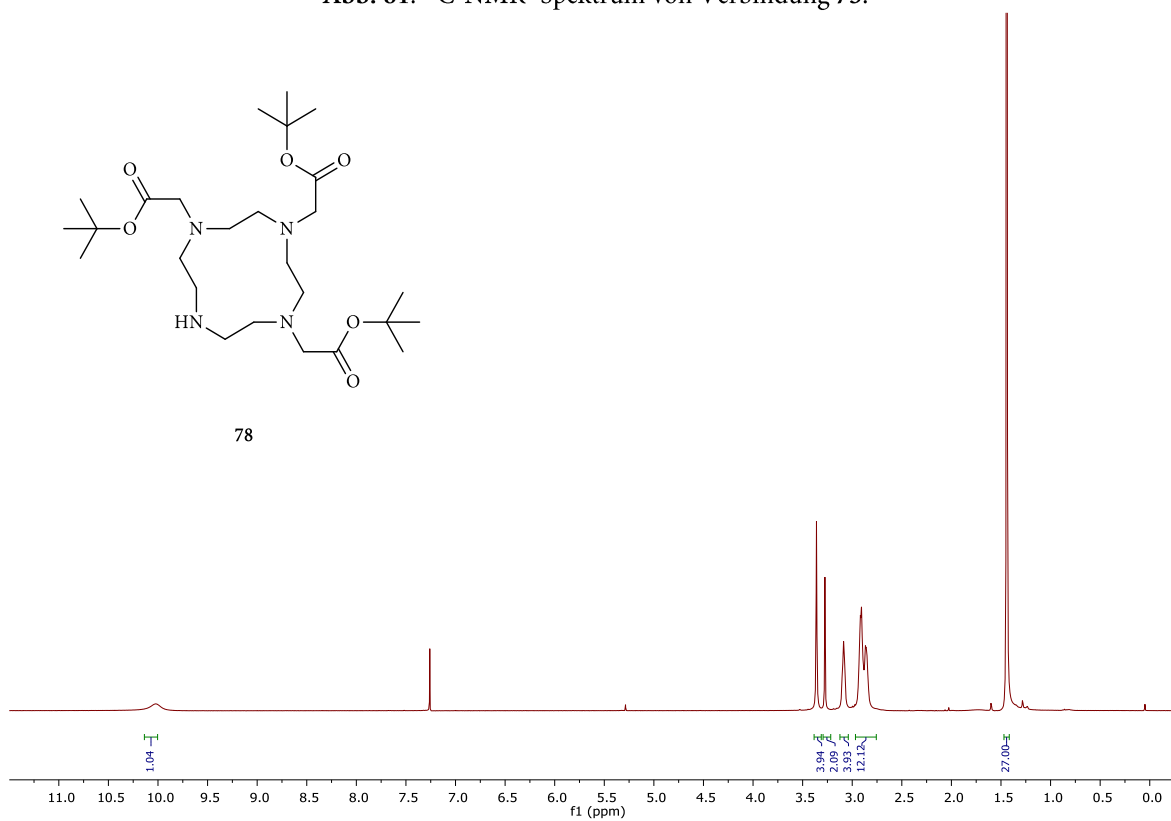
73

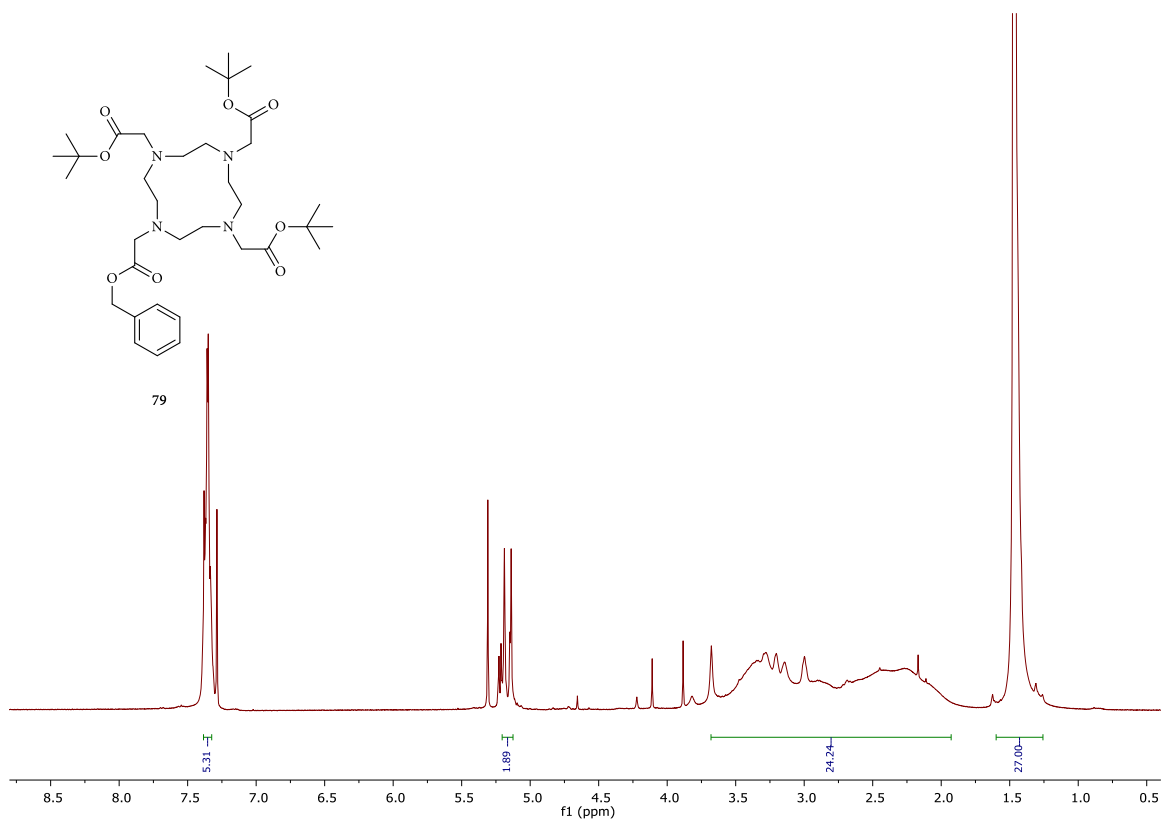
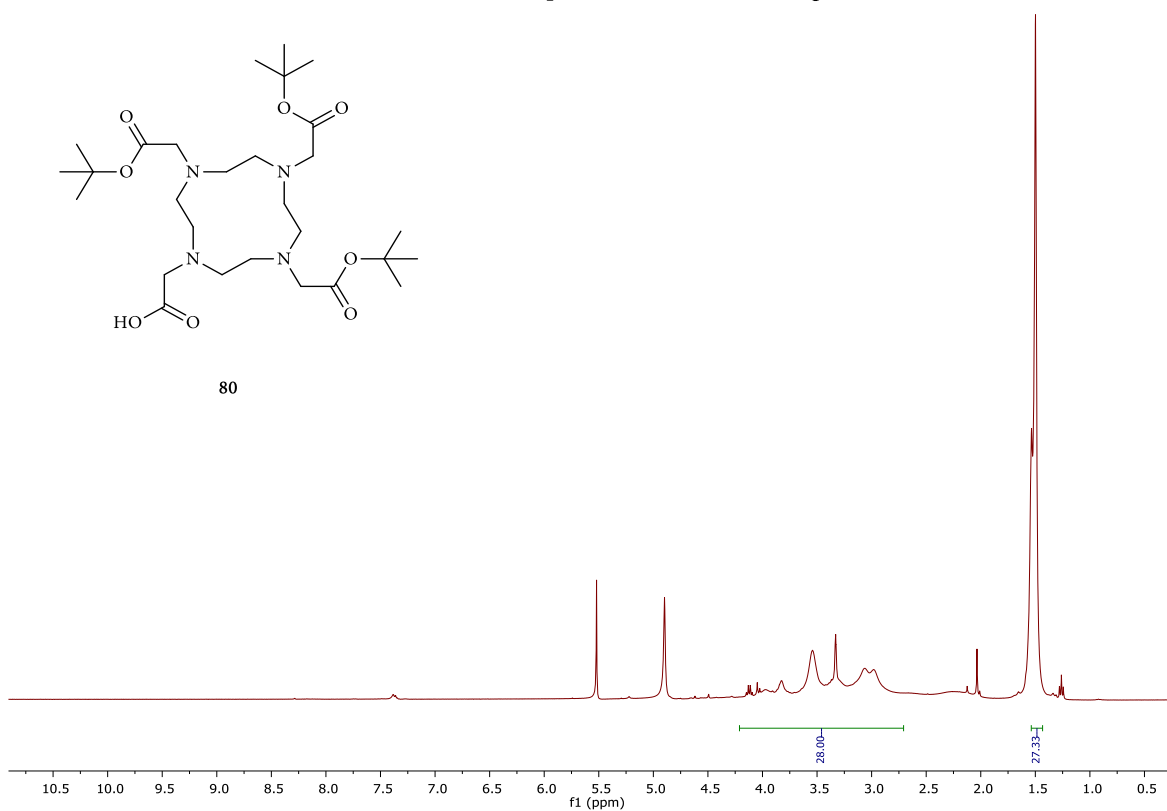
Abb. 77: ^1H -NMR- Spektrum von Verbindung 73.

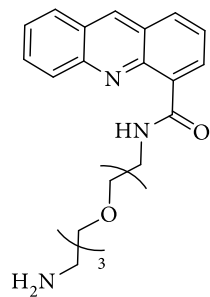
74

Abb. 78: ^1H -NMR- Spektrum von Verbindung 74.

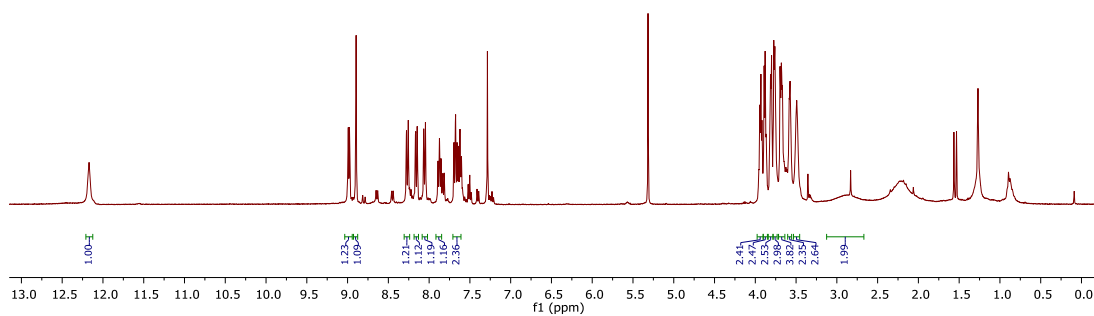
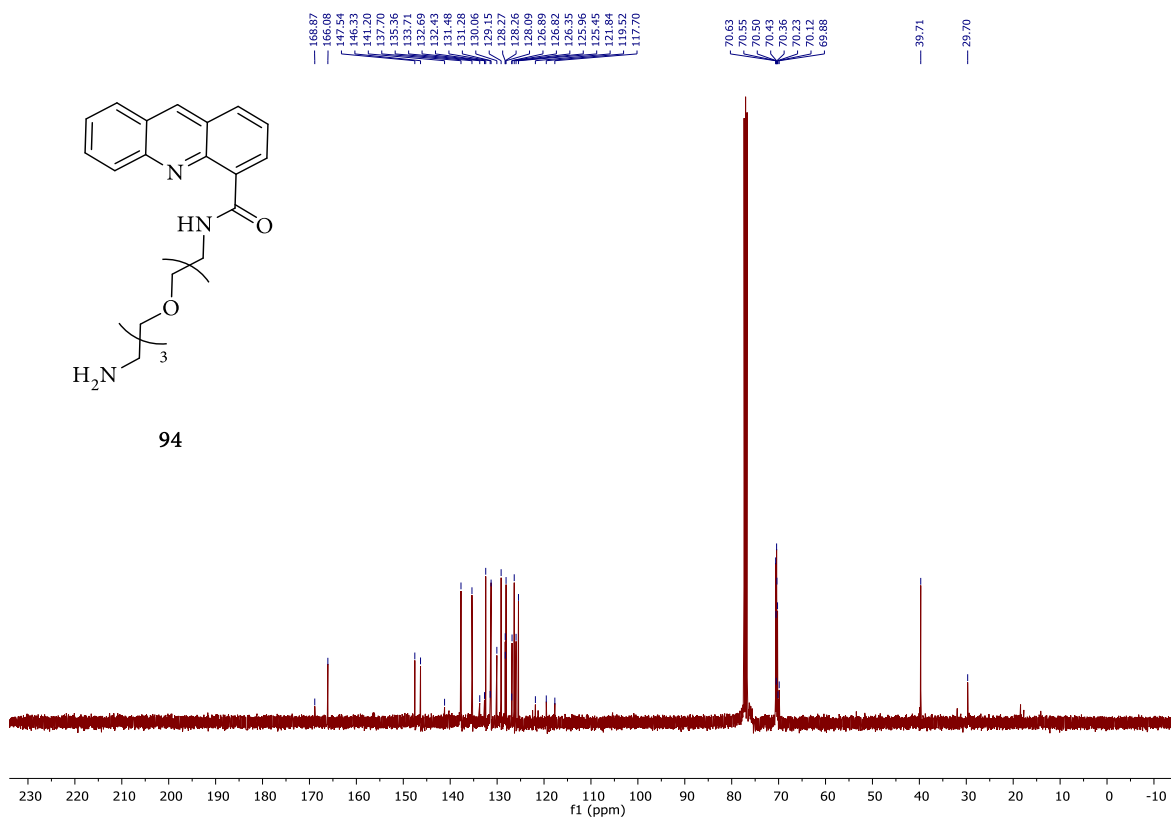


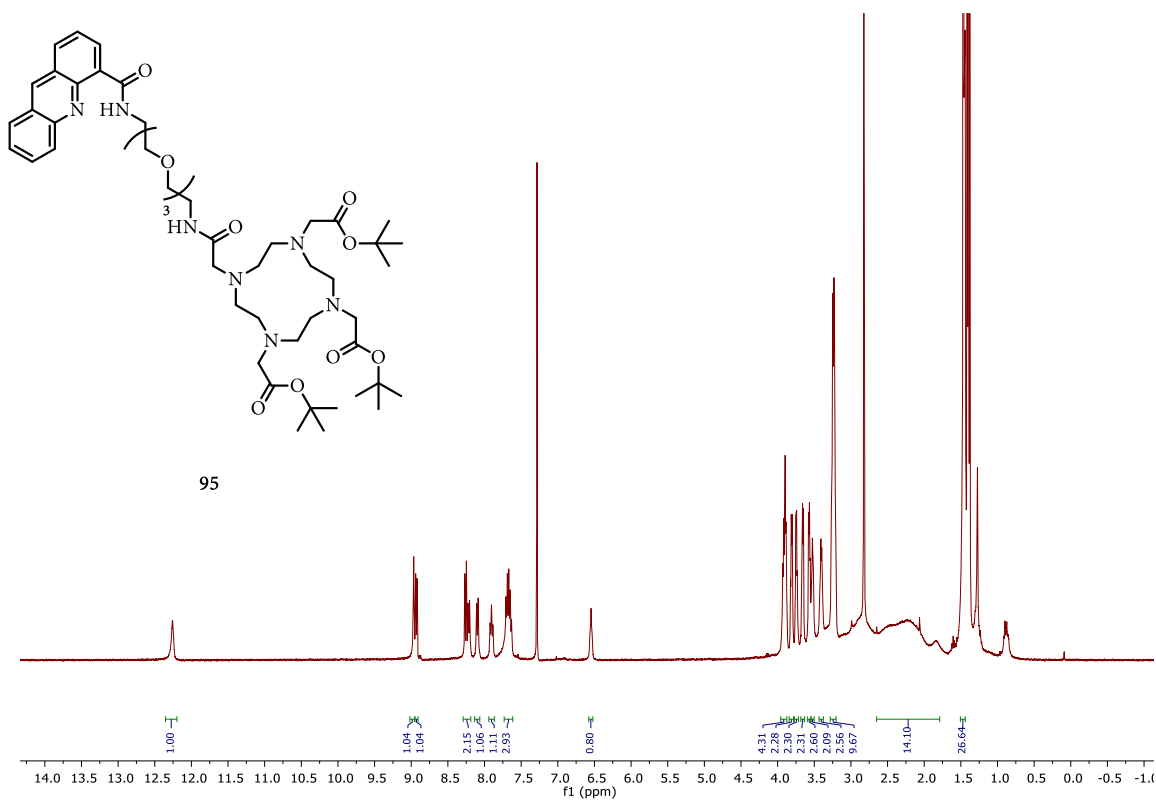
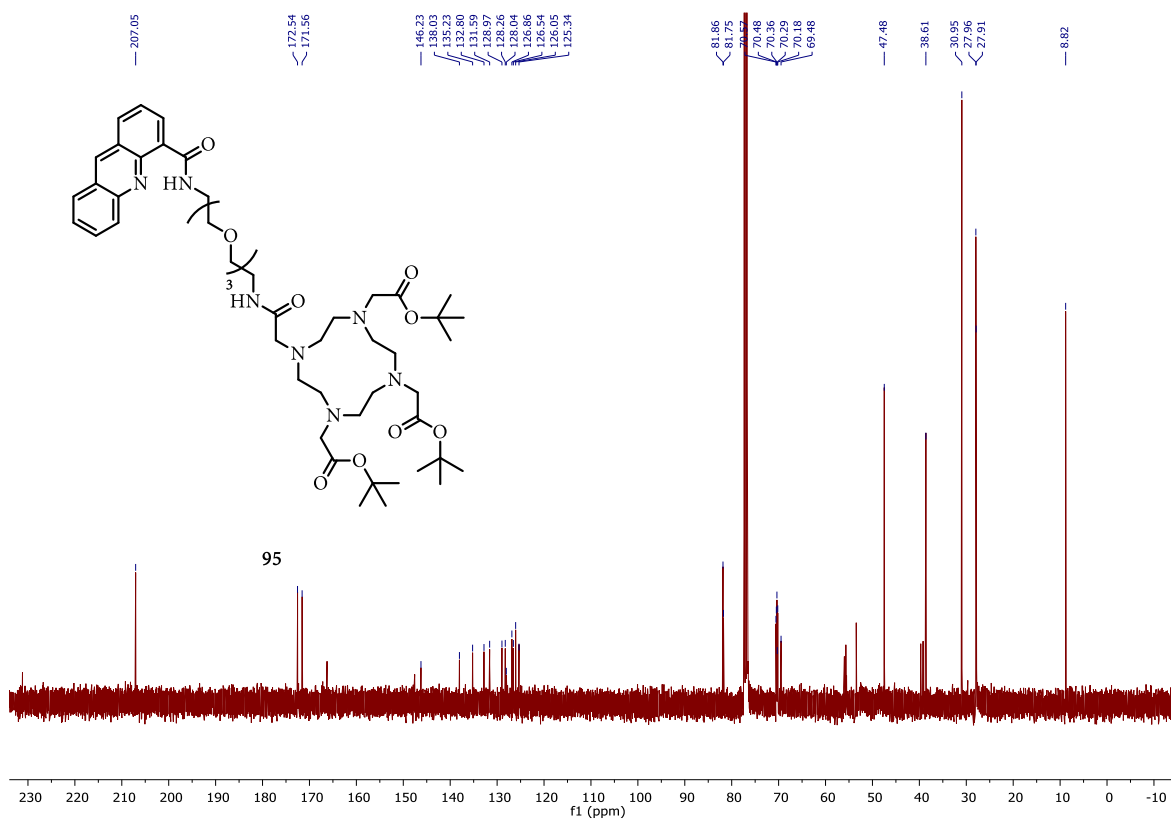
Abb. 81: ^{13}C -NMR-Spektrum von Verbindung 75.Abb. 82: ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung 78.

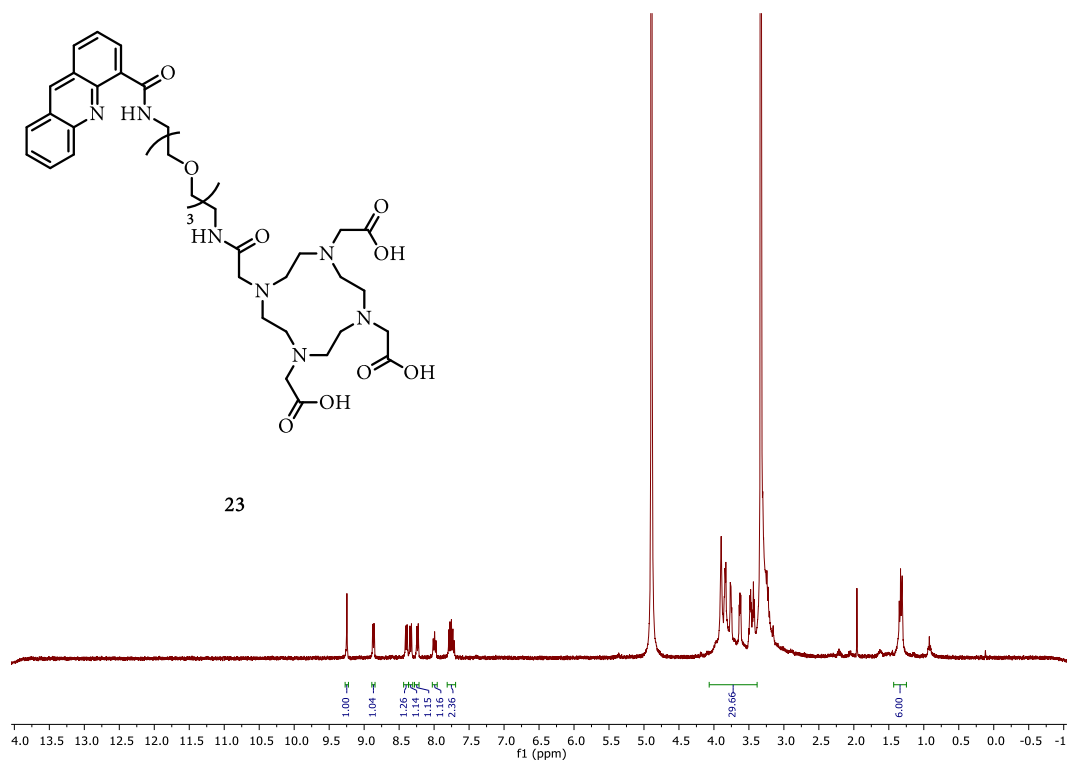
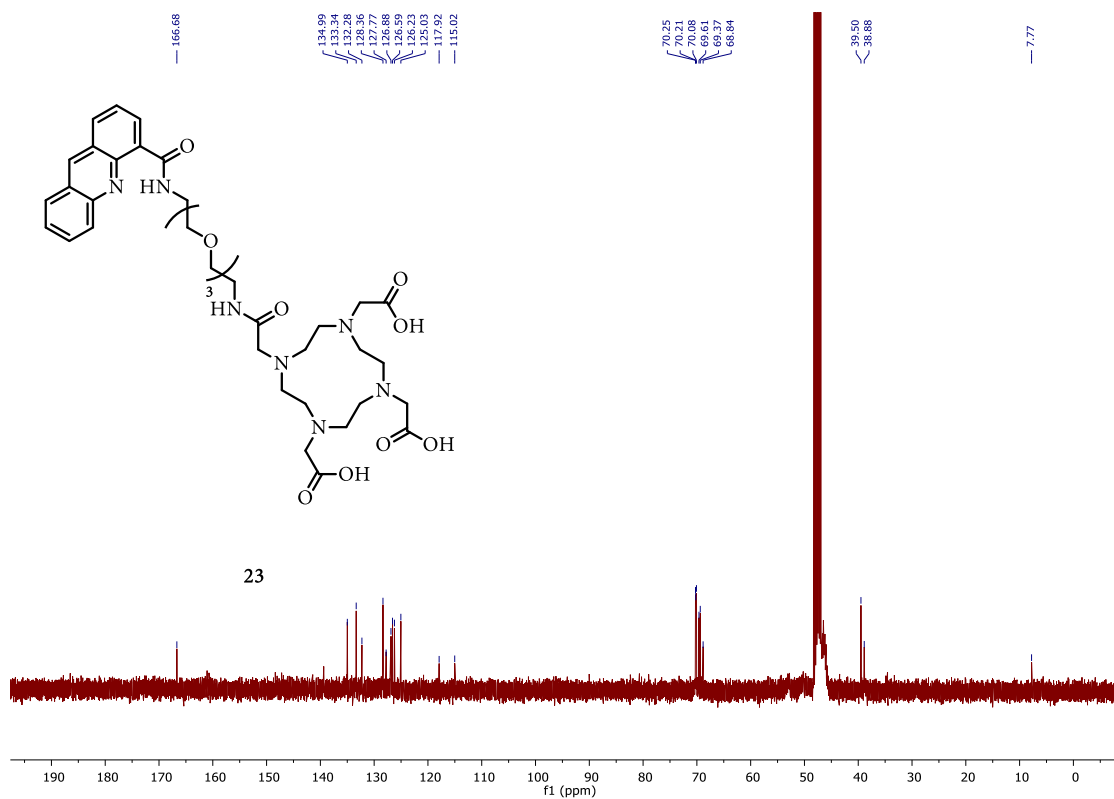
Abb. 83: ¹H-NMR- Spektrum von Verbindung 79.Abb. 84: ¹H-NMR- Spektrum von Verbindung 80.

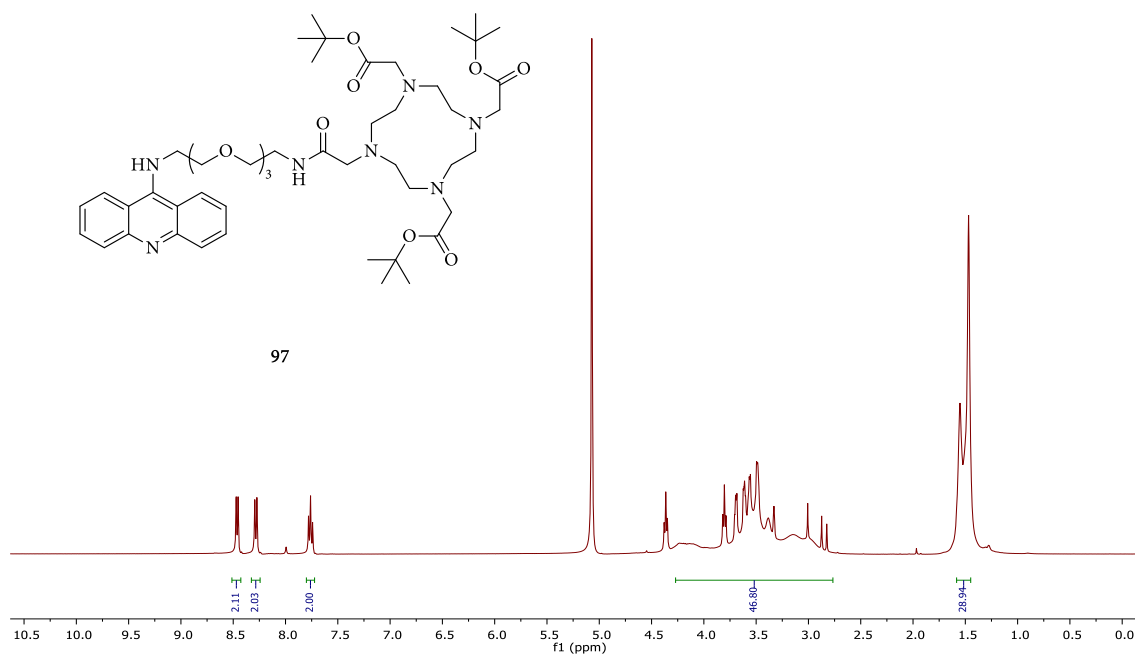
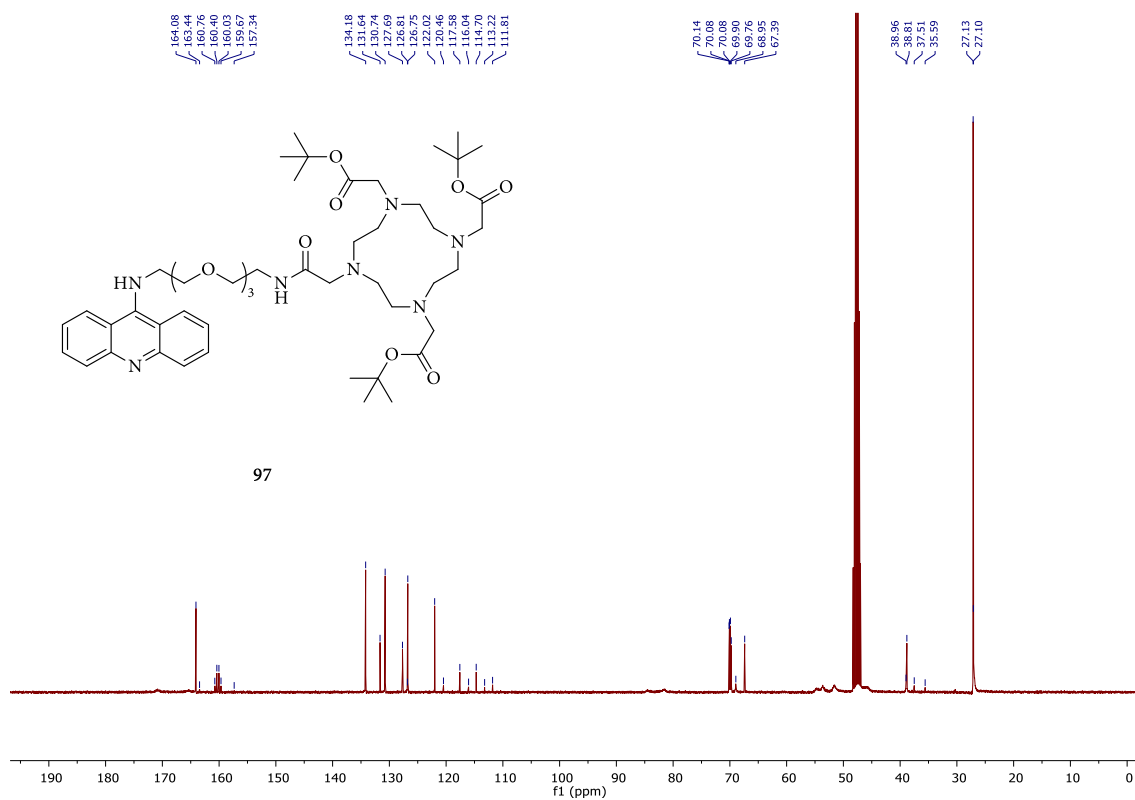


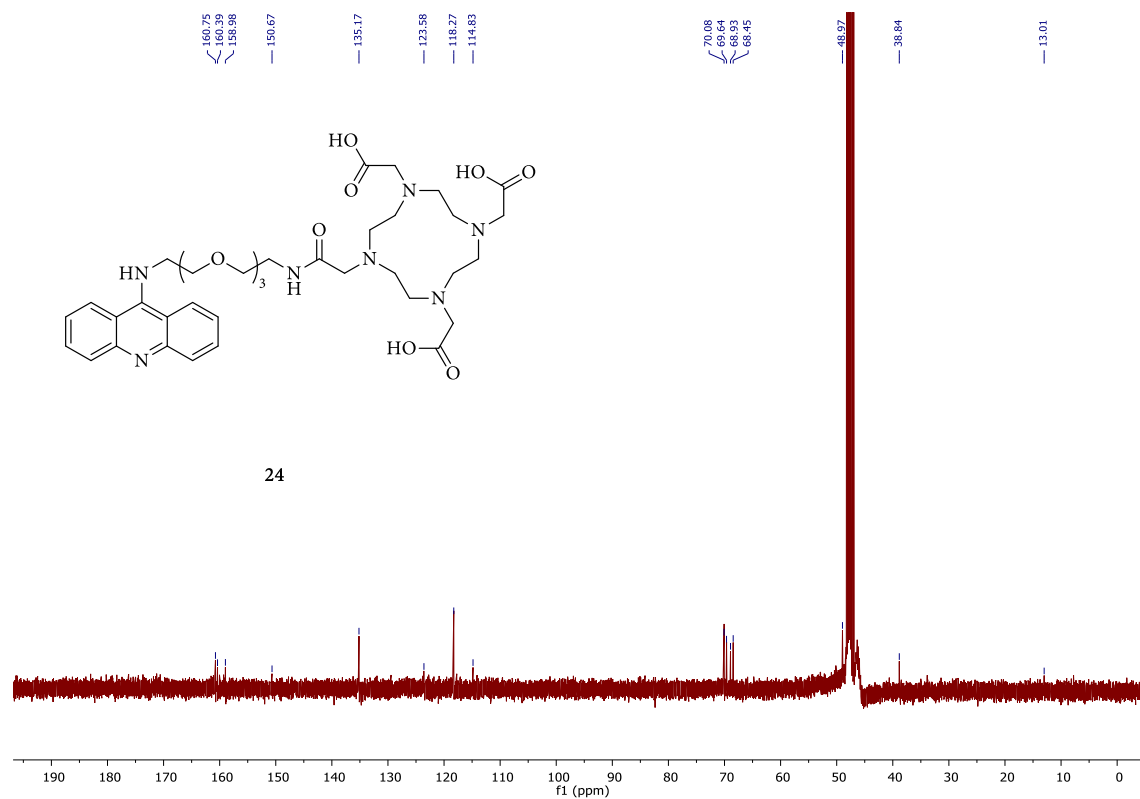
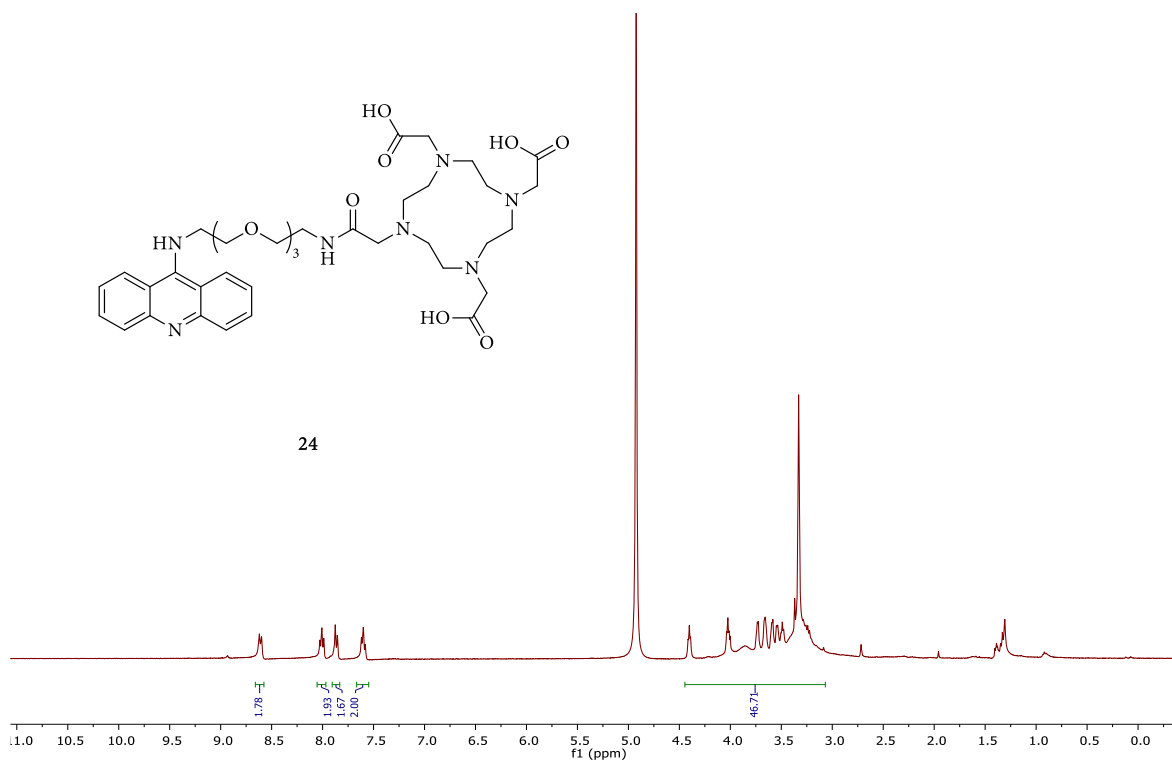
94

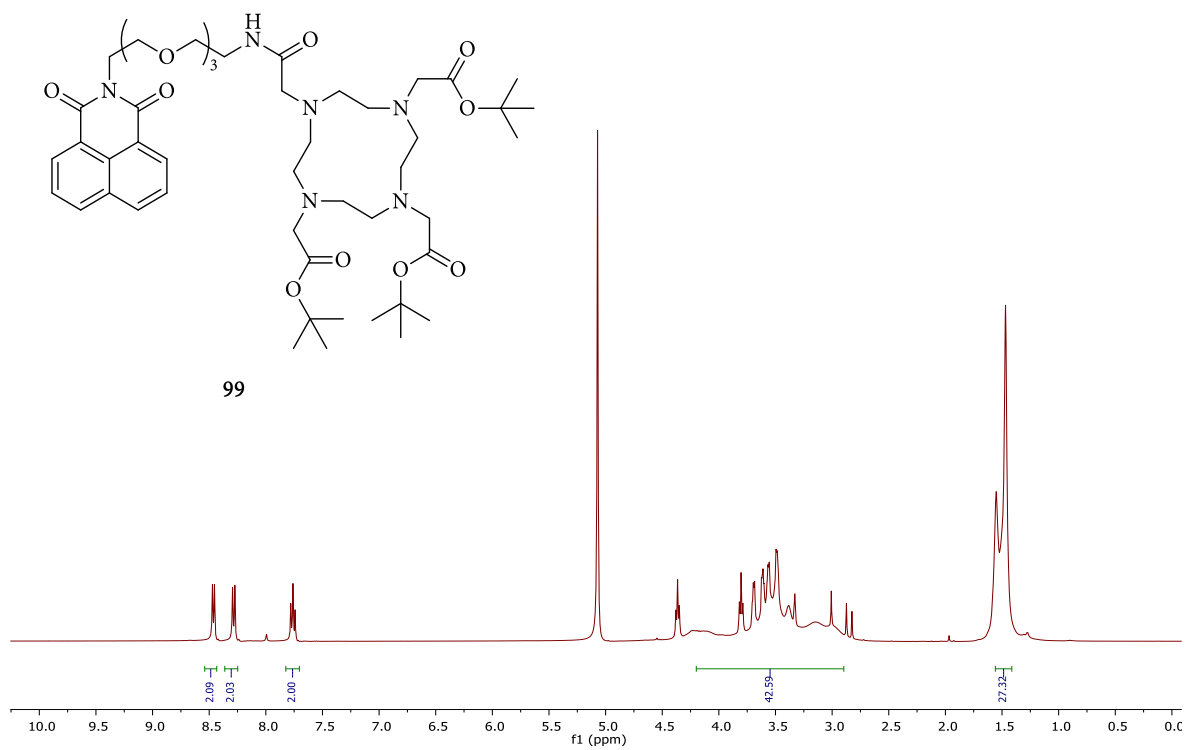
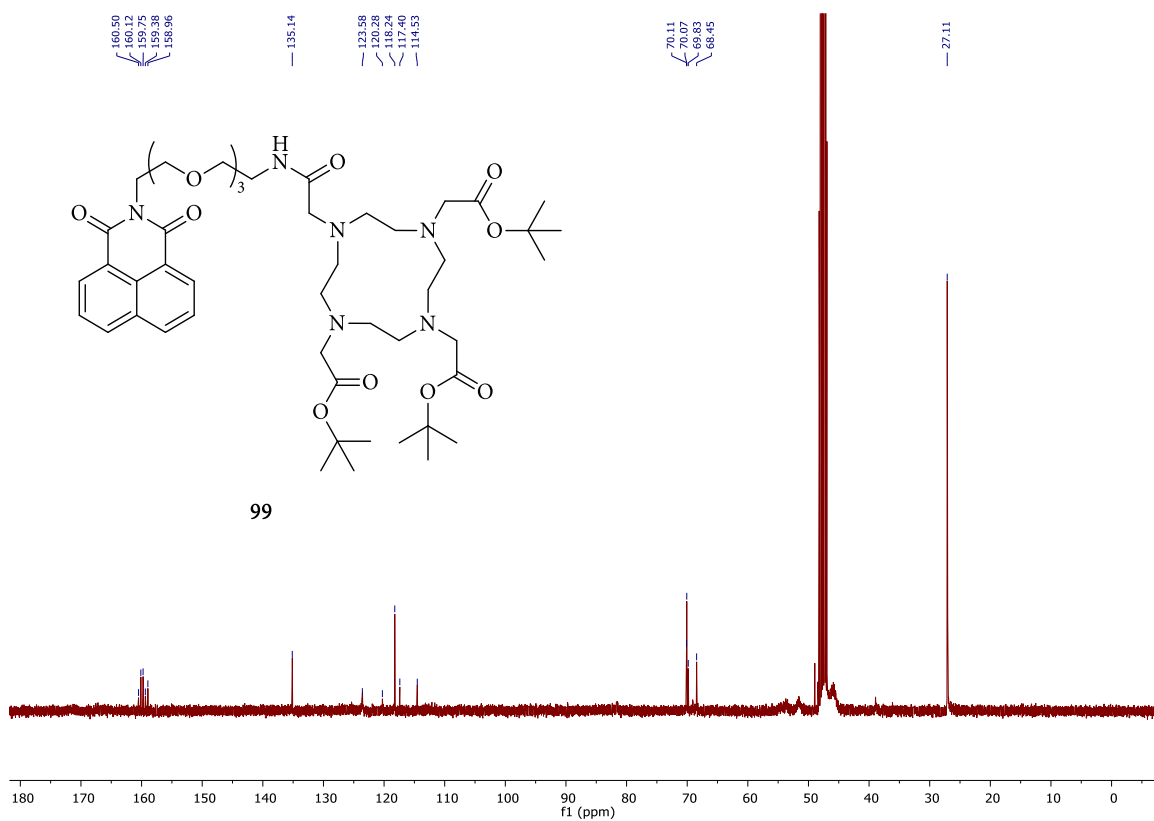
Abb. 85: ¹H-NMR- Spektrum von Verbindung 94.Abb. 86: ¹³C-NMR- Spektrum von Verbindung 94.

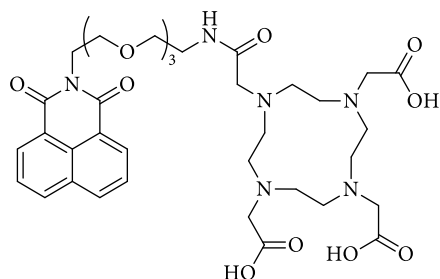
Abb. 87: ^1H -NMR- Spektrum von Verbindung 95.Abb. 88: ^{13}C -NMR- Spektrum von Verbindung 95.

Abb. 89: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung 23.Abb. 90: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Verbindung 23.

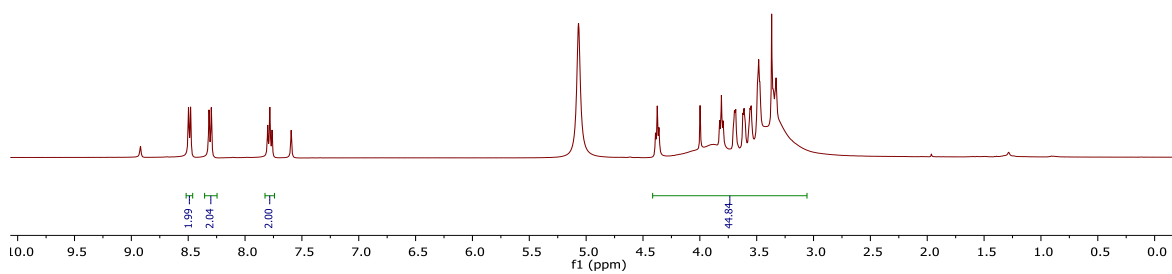
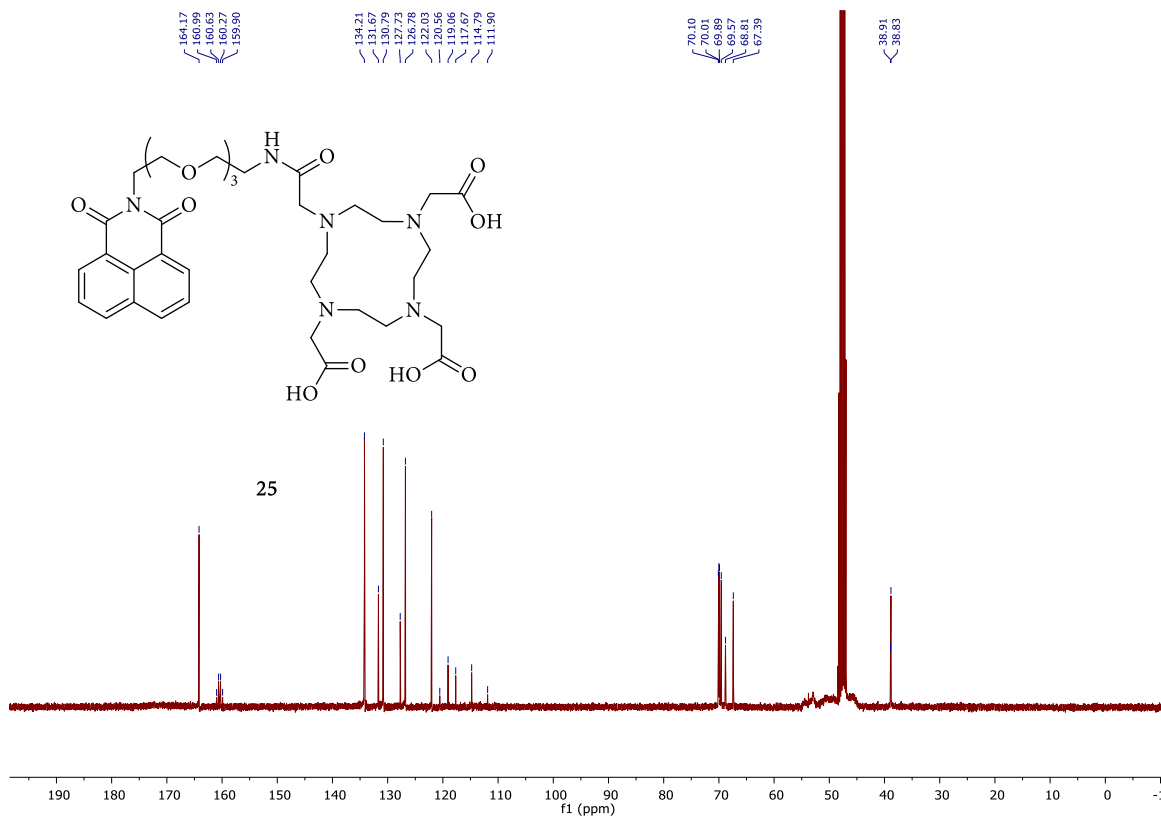
Abb. 91: ^1H -NMR- Spektrum von Verbindung 97.Abb. 92: ^{13}C -NMR- Spektrum von Verbindung 97.

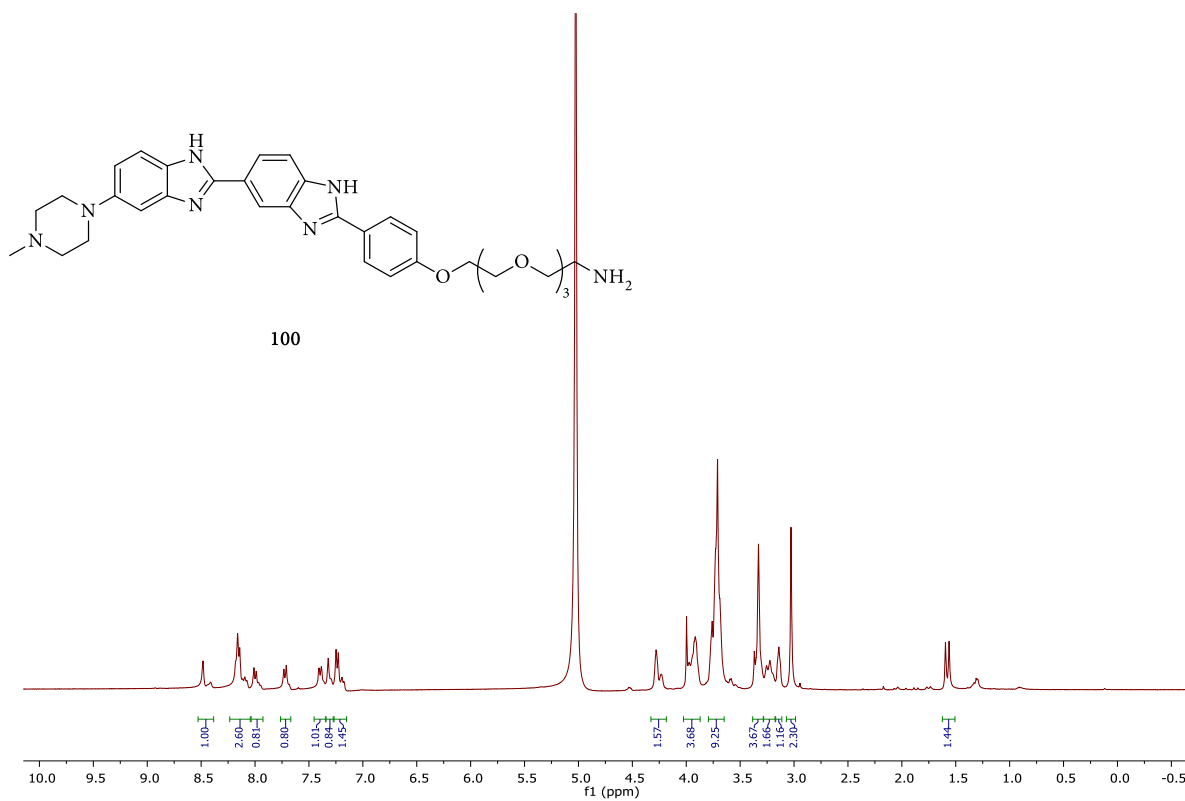
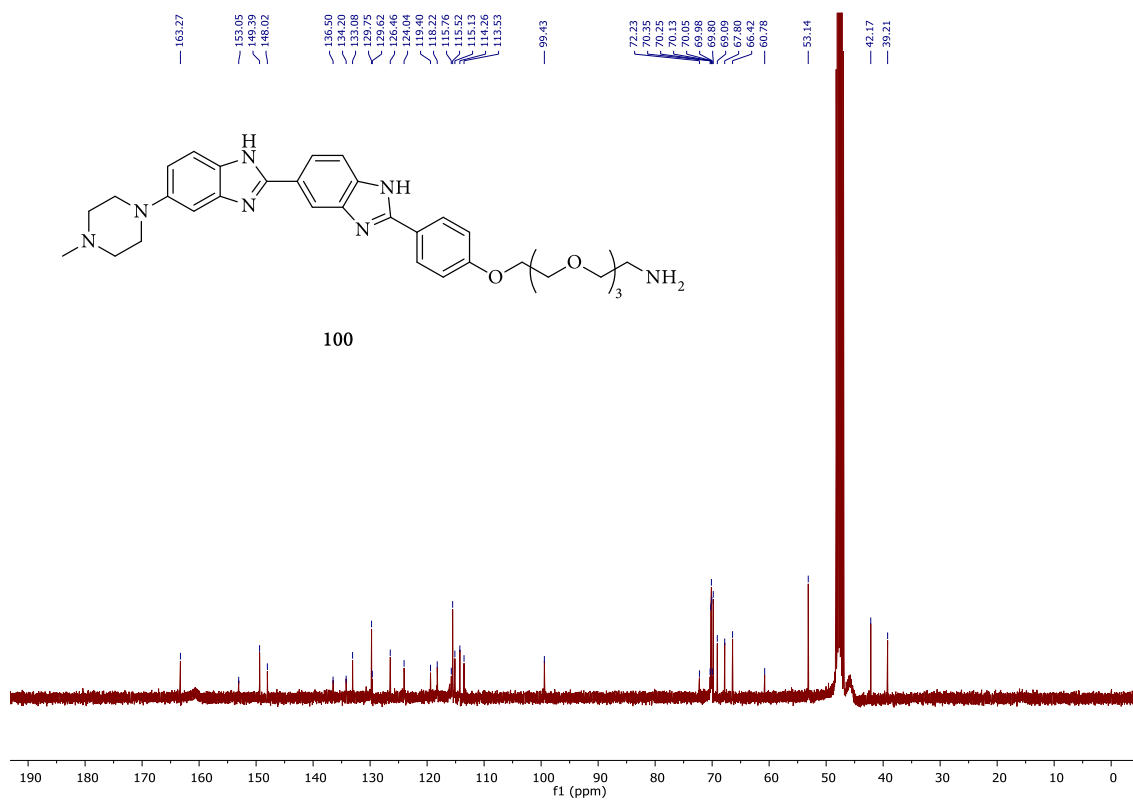


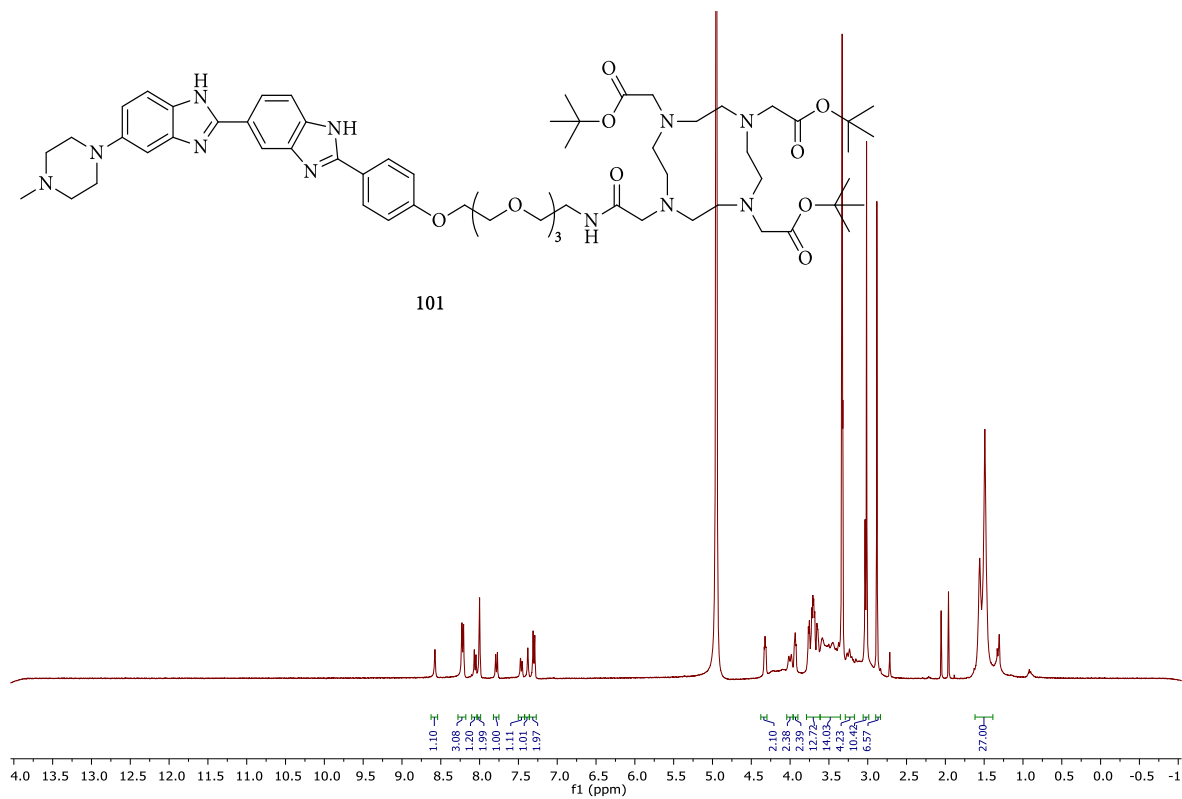
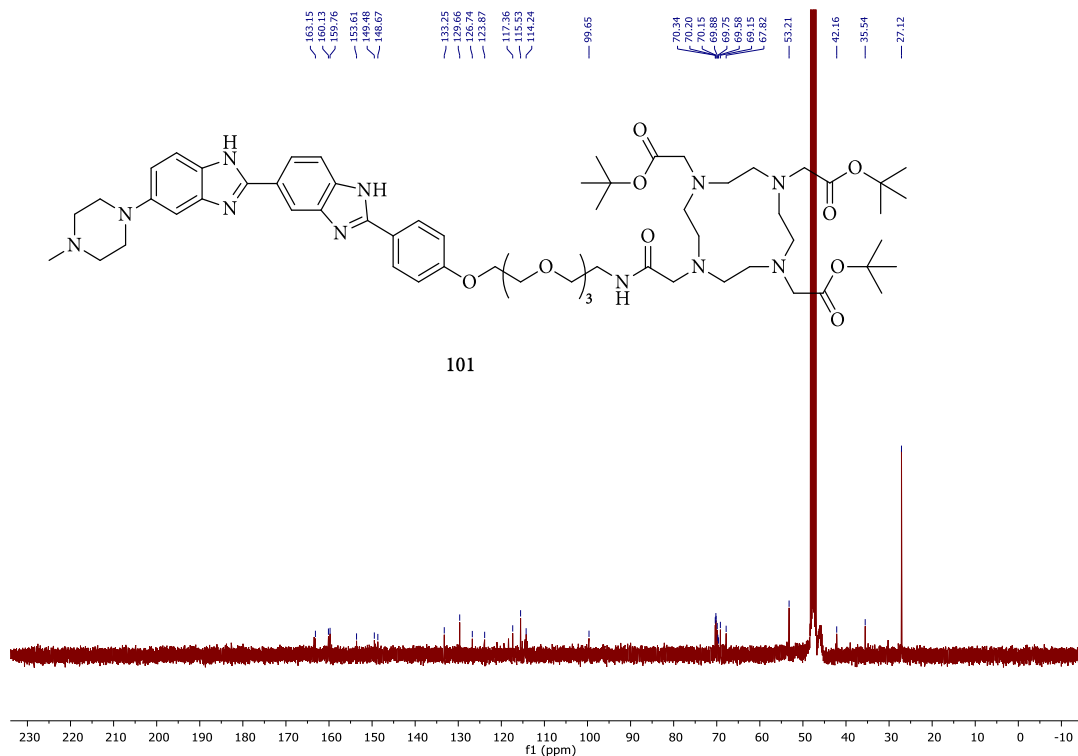
Abb. 95: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Verbindung 99.Abb. 96: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Verbindung 99.

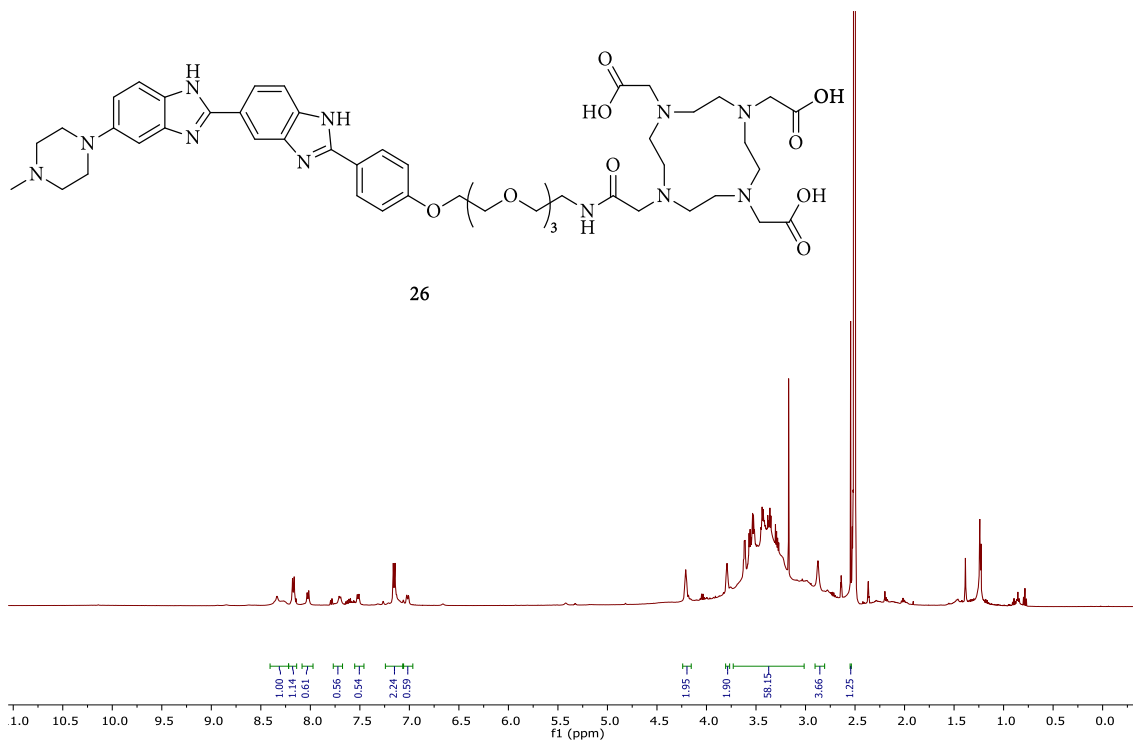
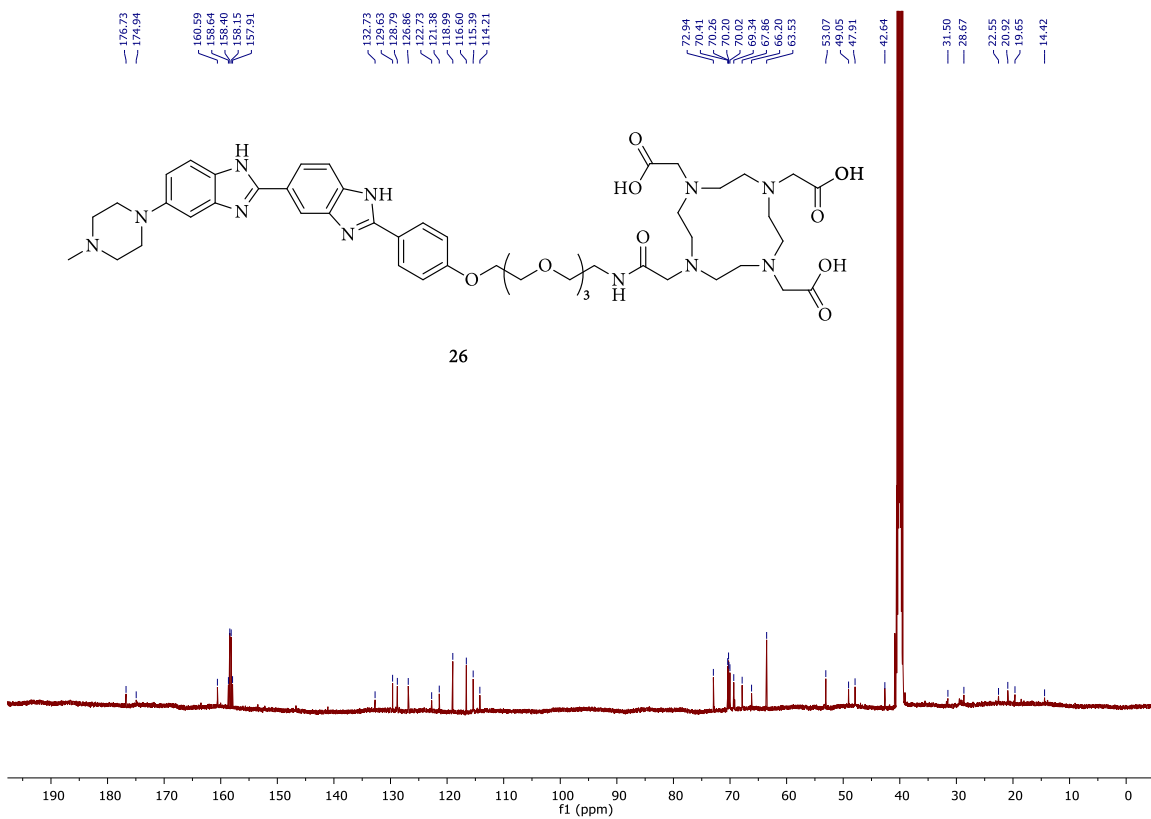


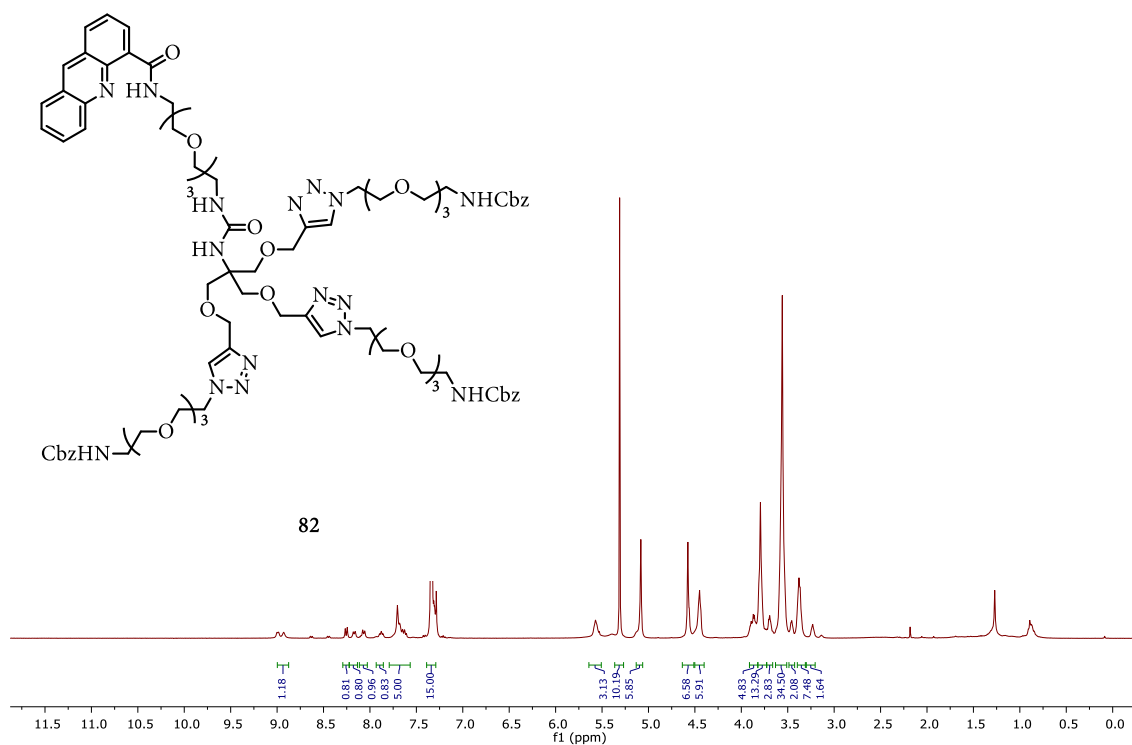
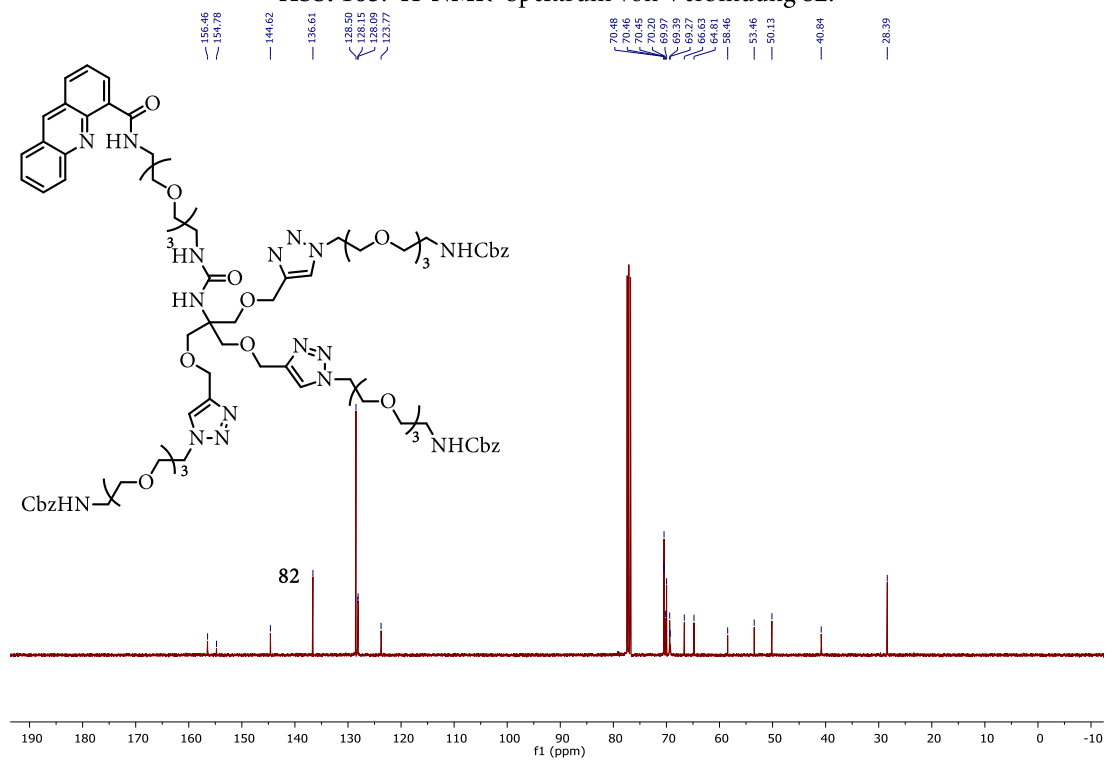
25

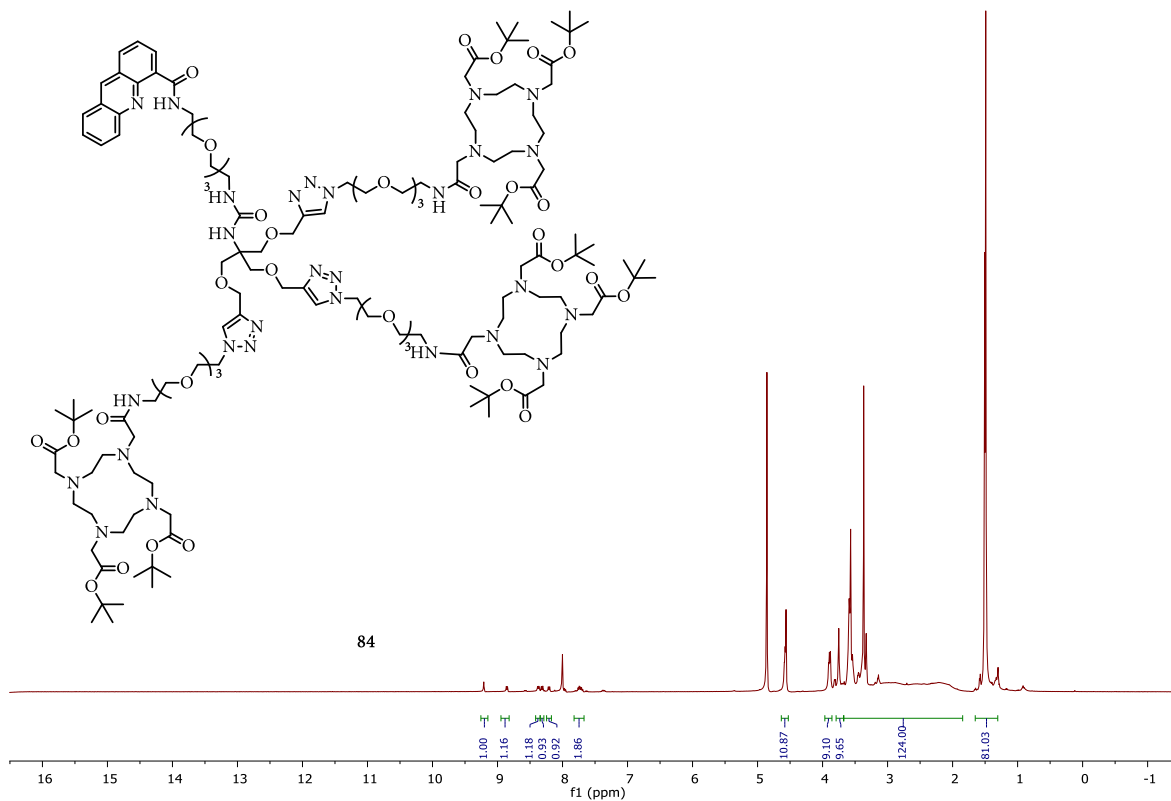
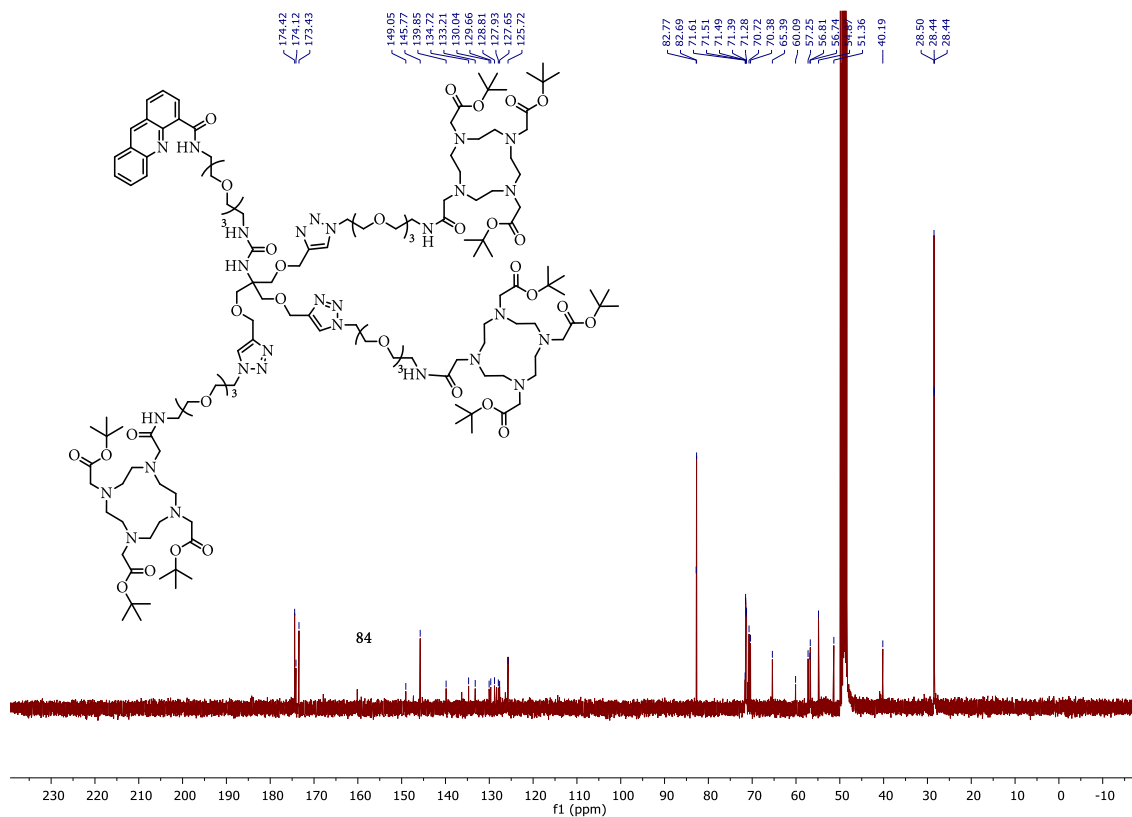
Abb. 97: ^1H -NMR- Spektrum von Verbindung 25.Abb. 98: ^{13}C -NMR- Spektrum von Verbindung 25.

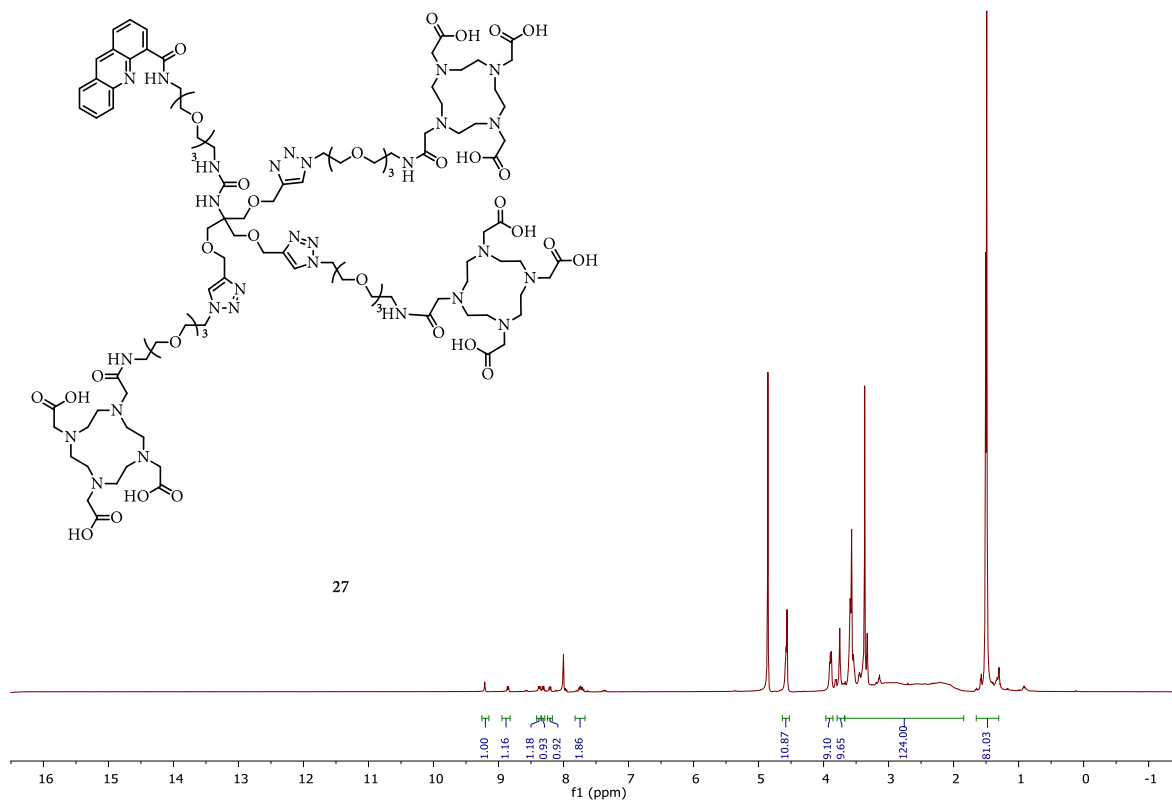
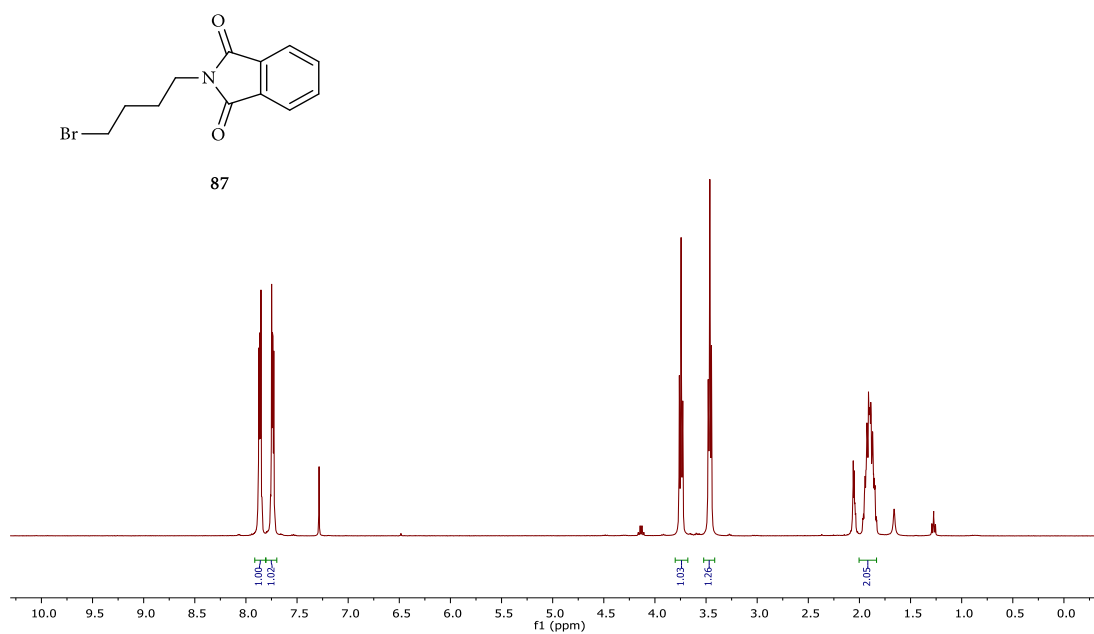
Abb. 99: ¹H-NMR- Spektrum von Verbindung 100.Abb. 100: ¹³C-NMR- Spektrum von Verbindung 100.

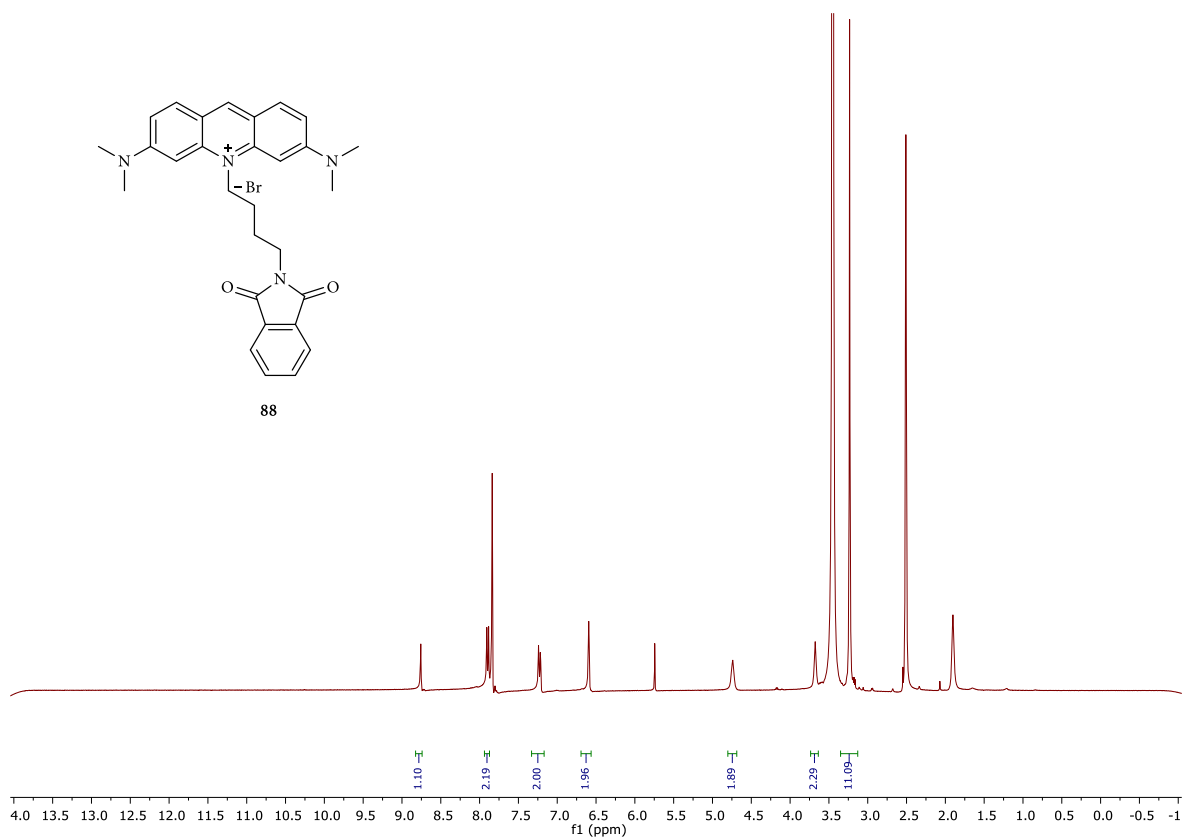
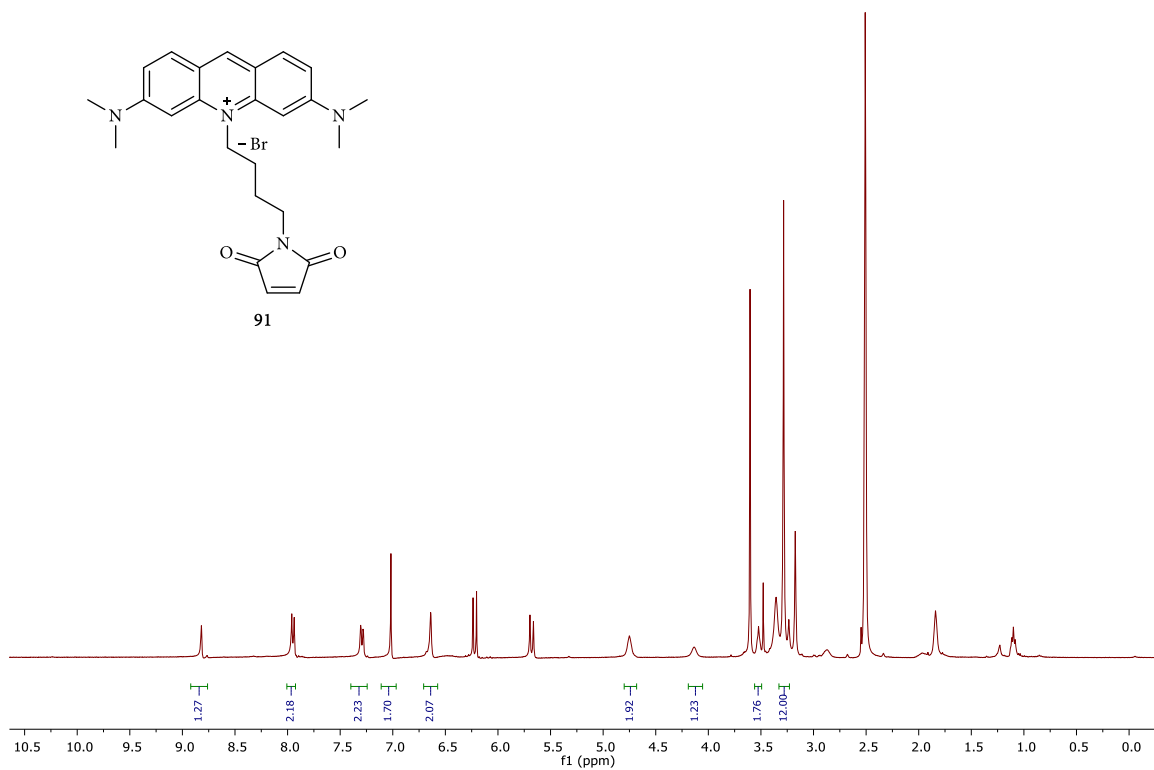
Abb. 101: ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung 101.Abb. 102: ^{13}C -NMR-Spektrum von Verbindung 101.

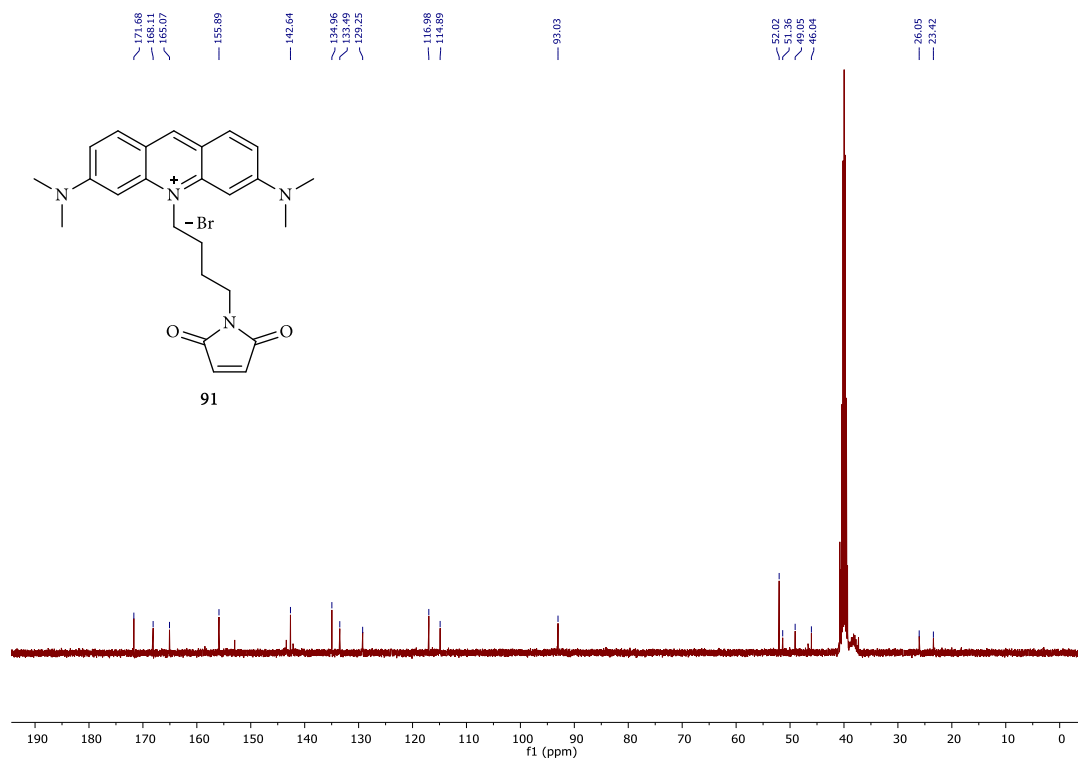
Abb. 103: ¹H-NMR- Spektrum von Verbindung 26.Abb. 104: ¹³C-NMR- Spektrum von Verbindung 26.

Abb. 105: ¹H-NMR- Spektrum von Verbindung 82.Abb. 106: ¹³C-NMR- Spektrum von Verbindung 82.

Abb. 107: ^1H -NMR- Spektrum von Verbindung 84.Abb. 108: ^{13}C -NMR- Spektrum von Verbindung 84.

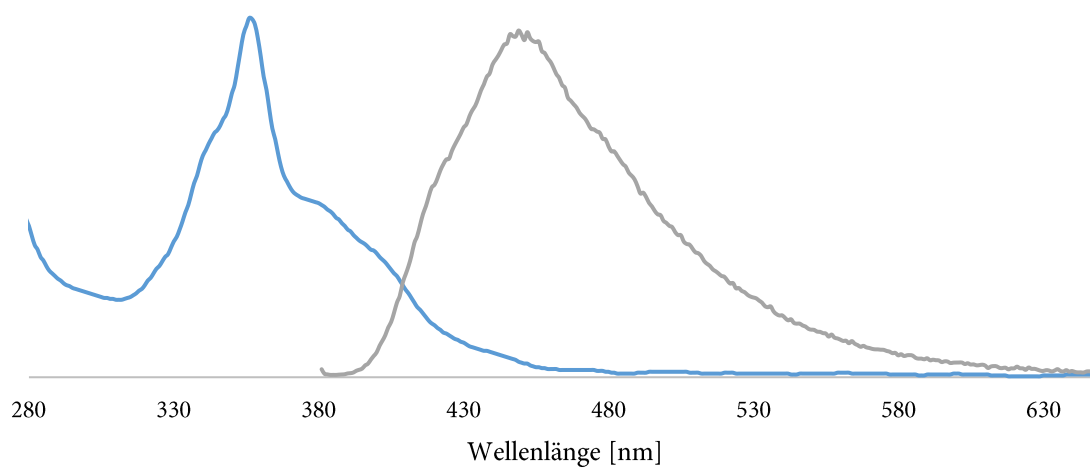
Abb. 109: ¹H-NMR-Spektrum von Verbindung 27.Abb. 110: ¹H-NMR-Spektrum von Verbindung 87.

Abb. 111: ¹H-NMR- Spektrum von Verbindung 88.Abb. 112: ¹H-NMR- Spektrum von Verbindung 91.

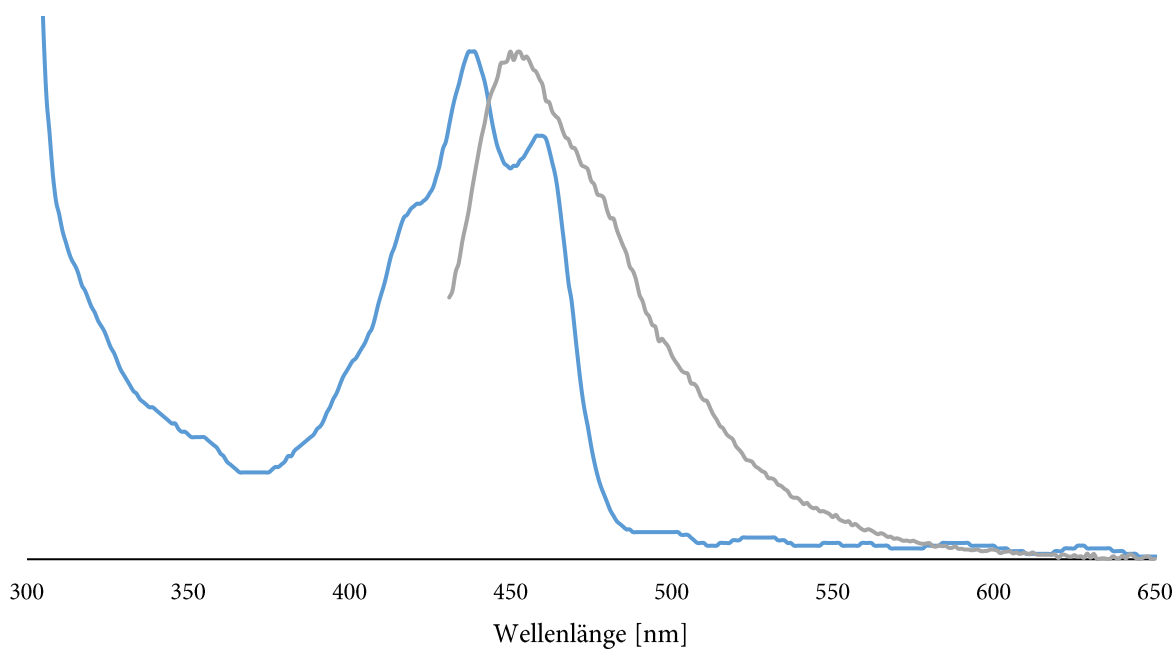
Abb. 113: ^{13}C -NMR- Spektrum von Verbindung 91.

8.2. Absorptions- und Emissionsspektren der Verbindungen 23, 24, 25, 26 und 27

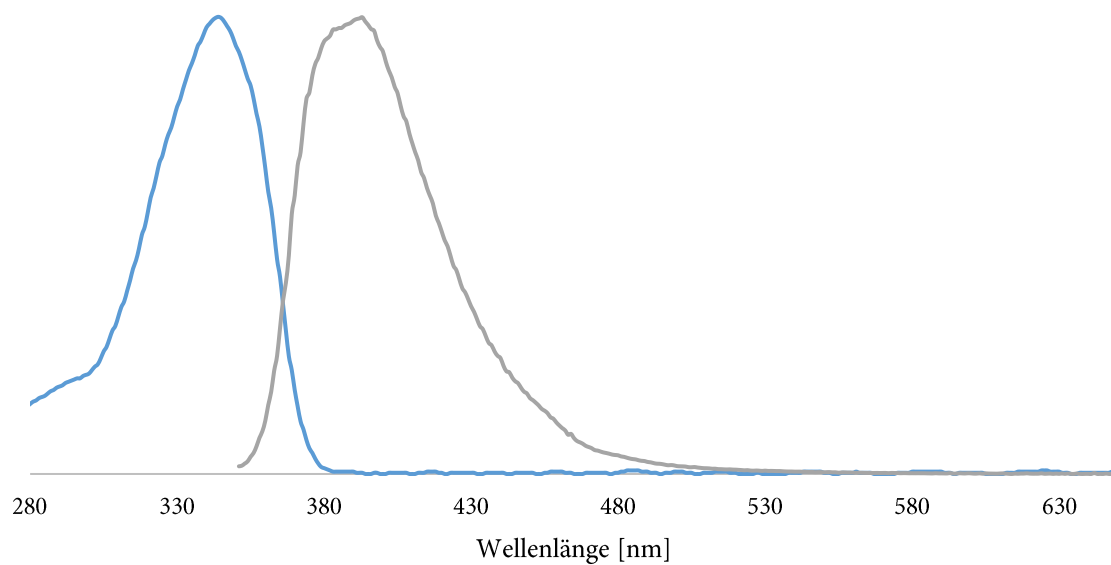
Absorptions- und Emissionsspektrum von Verbindung 23

**Abb. 114:** Absorptions-(blau) und Emissionsspektrum (grau) von Verbindung 23.

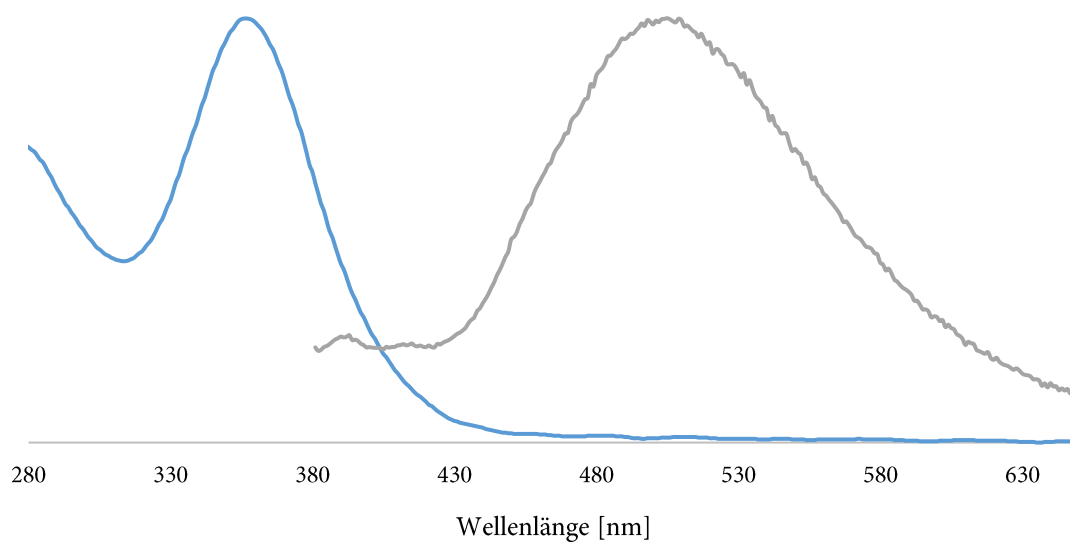
Absorptions- und Emissionsspektrum von Verbindung 24

**Abb. 115:** Absorptions-(blau) und Emissionsspektrum (grau) von Verbindung 24.

Absorptions- und Emissionsspektrum von Verbindung 25

**Abb. 116:** Absorptions-(blau) und Emissionsspektrum (grau) von Verbindung 25.

Absorptions- und Emissionsspektrum von Verbindung 26

**Abb. 117:** Absorptions-(blau) und Emissionsspektrum (grau) von Verbindung 26.

Absorptions- und Emissionsspektrum von Verbindung 27

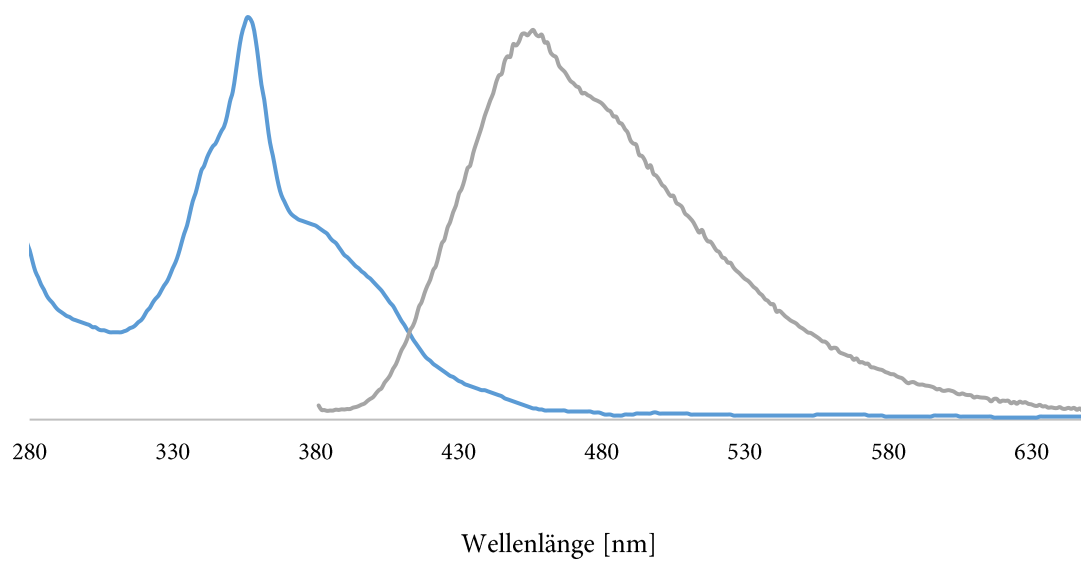


Abb. 118: Absorptions-(blau) und Emissionsspektren (grau) von Verbindung 27.

8.3. Ergänzende Spektren zu den Radioinkubationsexperimenten

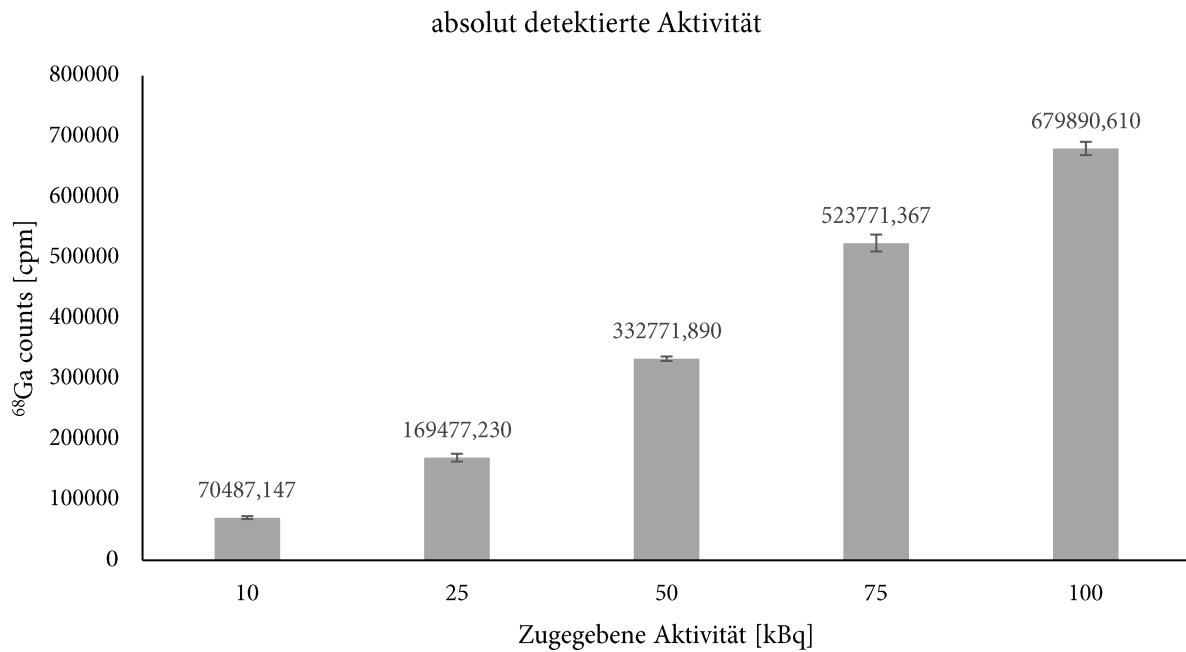


Abb. 120: Detektierte Aktivitäten der, zu jeder Probe zugegebenen Gesamtmenge Radioaktivität. Die Höhe der Säulen repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten. Die Standardabweichung ist angegeben.

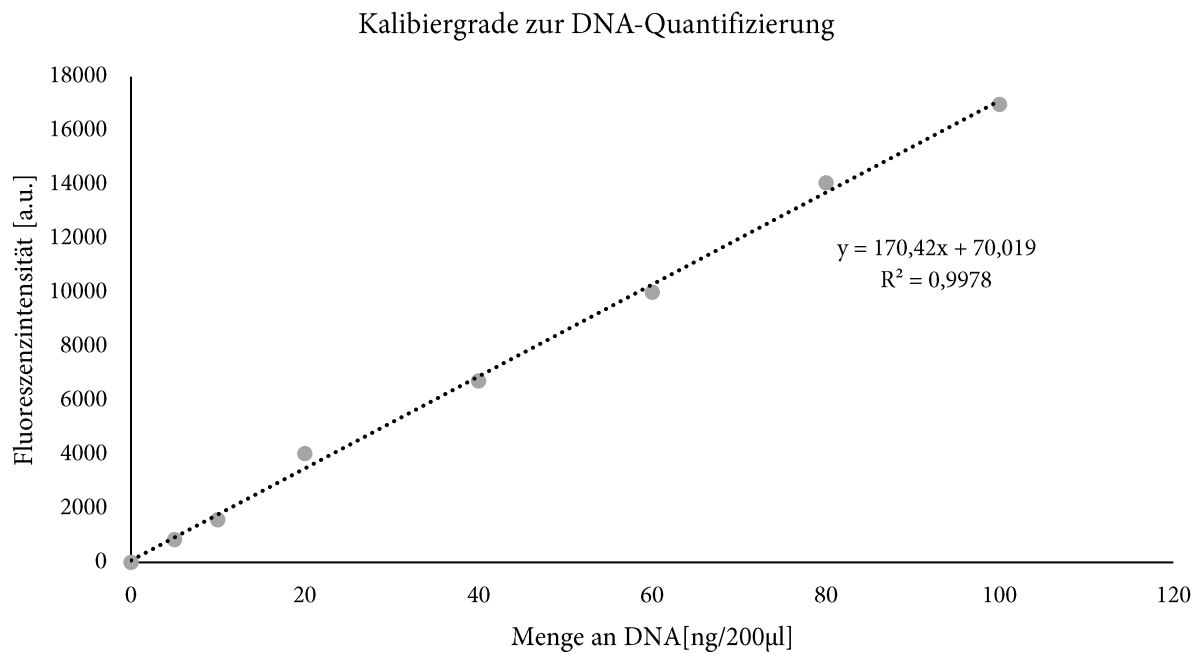


Abb. 121: Kalibriergrade zur DNA-Quantifizierung.

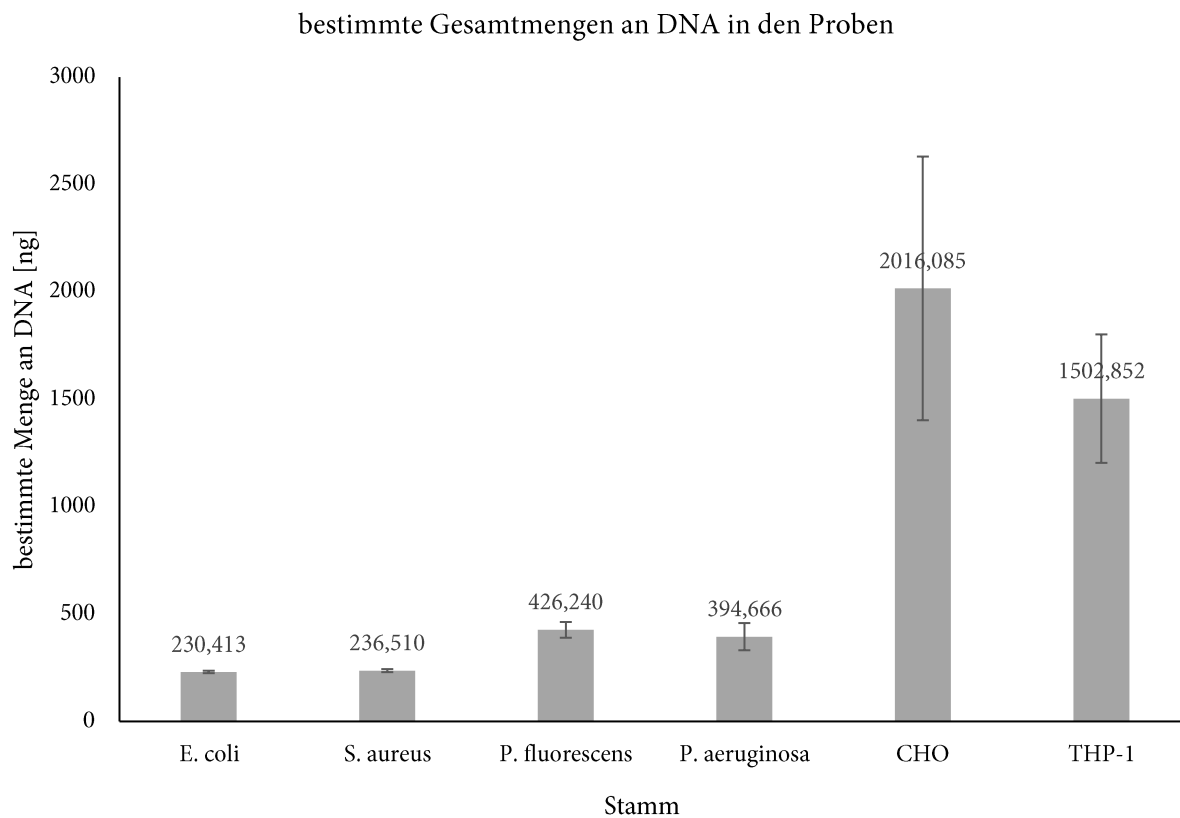


Abb. 122: Bestimmte Gesamtmenge an DNA [ng] in den Proben. Die Höhe der Säulen repräsentieren die gemittelten Werte von drei voneinander unabhängigen Triplikaten. Die Standardabweichung ist angegeben.

Persönliche Daten und Akademischer Werdegang

Name: Fabian Brunswig

Geburtsdatum/ -ort: 03.05.1993 in Braunschweig, Deutschland

PROMOTIONSSTUDIUM– Leibniz Universität Hannover *seit 01/2019*

Promotion zu dem Thema „Entwicklung neuartiger Konzepte zur Unterscheidung bakterieller und steriler Entzündungen“

im Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver Plettenburg am Institut für Medizinalchemie

MASTER STUDIUM – Leibniz Universität Hannover *10/2016 – 11/2018*

Studium M.Sc. Wirk- und Naturstoffchemie (Abschlussnote: 1,6), abschließende Masterarbeit zu dem Thema „Studien zum Aufbau von Disulfidbrücken in Methanobactin-ähnlichen Verbindungen“

(Note: 1,3) im Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver Plettenburg am Institut für Medizinalchemie

FORSCHUNGSaufenthalt –Aberdeen, Schottland *08/2017 – 01/2018*

Praxissemester bei Prof. Laurent Trembleau an der University of Aberdeen

BACHELOR STUDIUM – Leibniz Universität Hannover *10/2015 – 03/2017*

Studium B.Sc. Chemie (Abschlussnote: 1,6), abschließende Bachelorarbeit zu dem Thema „Studien zur Synthese von Pyrronazol“ (Note: 1,0)

im Arbeitskreis von Prof. Dr. Markus Kalesse am Institut für organische Chemie

Wissenschaftliche Beiträge und Publikationen

Posterpräsentation bei dem LUCS 2022 in Hannover

07/2022

Cooperative Functionalities in Porous Nanoparticles

Cooperative Functionalities in Porous Nanoparticles for Seeking Extracellular DNA and Targeting Pathogenic Biofilms via Photodynamic Therapy,

03/2023

F. Brunswig*, H. Bronner*, D. Pluta, Y. Krysiak, N. Bigall, O. Plettenburg und S. Polarz, ACS Appl. Mater. Interfaces, 15, 11, 2023, 14067 – 14076, <https://doi.org/10.1021/acsami.3c00210>

(* geteilte Erstautorenschaft)

Probes for distinction of sterile and bacterial infection

02/2023

O. Plettenburg, F. Brunswig, T. Ross, F. Bengel, S. Al-Bazaz, EP23157867, Prioritätsdatum: 21.02.2023