

Synthese neuer Fluorophore für biologische Bildgebungsverfahren und Imagingexperimente

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Alexander Benedikt Braun

aus Heilbronn

KIT-Dekan: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Referent: Prof. Dr. Stefan Bräse

Korreferent: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2018

2 Einleitung

2.1 Motivation

Zwei der informativsten und sensitivsten analytischen Untersuchungstechniken sind die Fluoreszenzmikroskopie und die fluoreszente Bildgebung. Letztere spielt seit Jahren eine wichtige Rolle in Biologie, Chemie und Physik und ist damit aus der modernen Forschung nicht mehr wegzudenken: *“In normal microscopes the wavelength of light sets a limit to the level of detail possible. However, this limitation can be circumvented by methods that make use of fluorescence, a phenomenon in which certain substances become luminous after having been exposed to light.”*^a Mit diesen Worten wird Stefan W. Hells Entdeckung der STED-Mikroskopie beschrieben, für die er 2014 den Nobelpreis für Chemie, gemeinsam mit Eric Betzig und William Moerner erhielt. Im vergangenen Jahrhundert hat die Zellbiologie durch die Weiterentwicklung zellbiologischer Techniken, vor allem im Bereich der Mikroskopie, enorme Fortschritte erfahren. Die Bedeutung, welche der Entdeckung und Isolierung von GFP aus *Aequorea victoria* beizumessen ist, ist nicht zu unterschätzen. Besonders ein Derivat von GFP, das *monomeric enhanced GFP* (mEGFP), mit verbesserten photophysikalischen Eigenschaften, ist aus der modernen biologischen Forschung nicht mehr wegzudenken. Jedes Labor dieser Welt, welches sich mit *Imaging* beschäftigt, arbeitet oder hat vermutlich schon mit mEGFP gearbeitet. GFP und dessen Derivate sind der Standard für Fluorophore und deren Anwendbarkeit und Nutzen ist nur schwer zu übertreffen. Dennoch gehen mit GFP und anderen gängigen UV-aktiven Fluorophoren zahlreiche Probleme einher: UV-Licht ist toxisch für Zellen und daher sind, besonders für lange Untersuchungen in Zellen, UV-aktive Fluorophore nur bedingt geeignet. Eine Lösung zur Vermeidung von ultraviolettem (UV)-Licht ist die Entwicklung Rot-Fluoreszierender-Proteine (RFP) und die Entwicklung organischer Farbstoffe, welche im Nah-Infrarot-Bereich (NIR) des Lichts absorbieren und emittieren. Mit NIR-Fluorophoren lassen sich biologische Proben auf Grund von verminderter Autofluoreszenz, nur minimal störender Absorption und der Fähigkeit von langwelligem Licht tiefere Gewebeschichten zu erreichen, besser untersuchen.^[1] Cyaninfluorophore sind eine Substanzklasse der organischen Nah-Infrarot-Fluorophore, welche in den vergangenen Jahren stark weiterentwickelt wurde.^[2]

^a "Stefan W. Hell - Facts". *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014. Web. 2 Okt 2015. <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/hell-facts.html>

Das Verständnis von Funktion und Struktur von DNA (Desoxyribonukleinsäure) und RNA (Ribonukleinsäure) ist eine der wichtigsten Aufgaben der modernen Biologie. DNA bildet das Grundgerüst der Vererbung, codiert in Form von Genen die Struktur von Proteinen in jedem lebenden Organismus und RNA ist vermutlich die Antwort auf die Frage wie das Leben entstehen konnte. Viren wie der Zika-Erreger, Ebola, HIV (Humaner Immundefizienz-Virus) oder die Influenza tragen RNA in sich, die sie in die DNA ihres Wirtes einzubauen, um sich zu vermehren. Alleine durch den HI-Virus starben im Jahr 2015 1,1 Millionen Menschen.^[3] Untersuchungen an Nukleinsäuren können jedoch nicht einfach durch kovalent gebundene Fluorophore durchgeführt werden. Diese würden die Struktur der Nukleinsäuren stark beeinflussen und die Nukleinsäuren könnten so ihrer natürlichen Funktion nicht mehr nachkommen. Deshalb ist es unerlässlich neue Methoden zu finden, um Nukleinsäuren untersuchen zu können, ohne ihre physiologische Funktion stark zu beeinträchtigen. Hierfür braucht es jedoch neue Werkzeuge wie beispielsweise synthetisch erzeugte, fluoreszente Nukleobasen, um diese Fragen zu beantworten. Diese Nukleobasen können neue Einblicke in die Welt von DNA und RNA und damit eine Reihe neuer Anwendungen in der Biologie und der chemischen Biologie ermöglichen.^[4]

Aus diesen Gründen ist die Synthese neuer Fluorophore für biologische Bildgebungsexperimente eine wichtige Aufgabe der organischen Chemie und soll in der vorliegenden Doktorarbeit bearbeitet werden. Hierzu wurden zwei Projekte angestoßen. Zum einen wurde die Synthese neuer Nah-Infrarot-Fluorophore, der sogenannten Cyaninfarbstoffe bearbeitet. Das andere Projekt beschäftigt sich mit der Synthese emittierender Nukleobasen, welche von Isothiazol[4,3-*d*]pyrimidin abgeleitet werden. Beide Substanzklassen, die Cyaninfluorophore und die emittierenden Nukleobasen, sollen eine biologische Anwendung finden, um Licht in das Dunkel der Zelle zu bringen.

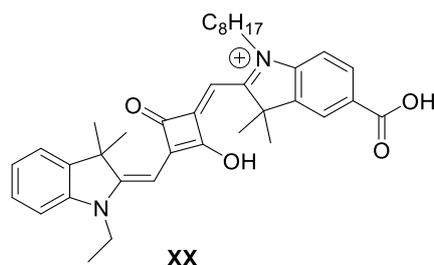
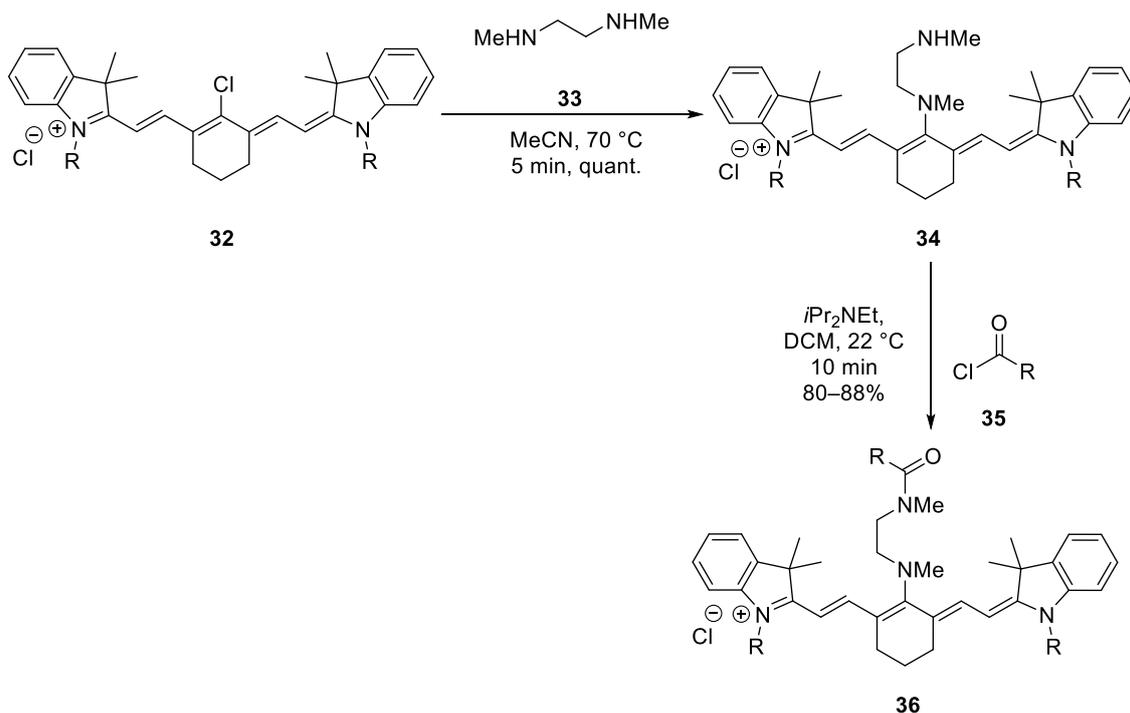


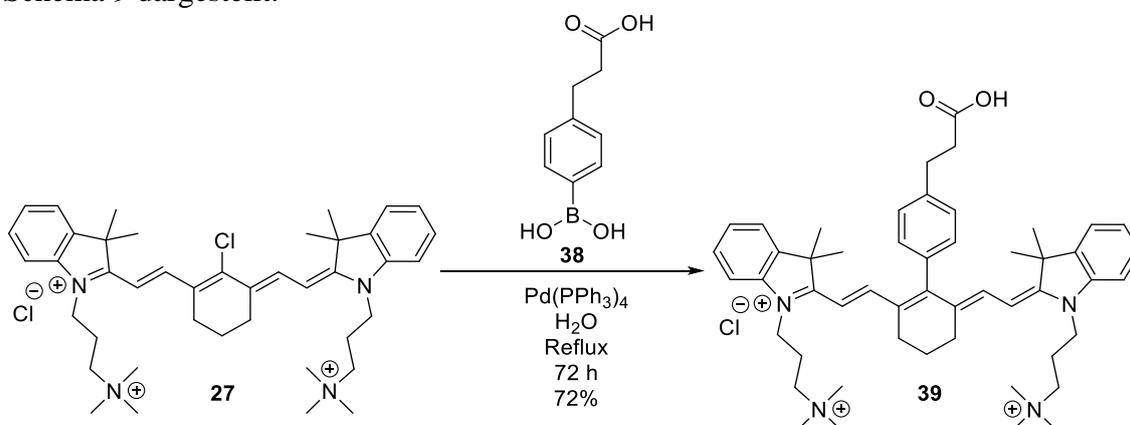
Abbildung 24: Photosensibilisator **31** zur Anwendung in Solarzellen.

Um diese Vielzahl an Konjugations- und Modifikationsmöglichkeiten zu generieren und um die positiven Eigenschaften von Cyaninfluorophoren voll auszuschöpfen, müssen Methoden zur Derivatisierung dieser Moleküle entwickelt werden. Es wurden bereits zahlreiche Konjugationsmethoden für Cyaninfluorophore entwickelt. Konjugationen mittels nukleophiler Substitution über Amine^[151, 169-170], Thiole^[170-173], die Smiles-Umlagerung^[174] oder Alkoholate^[175] sind möglich und wurden häufig durchgeführt. Die Tatsache, dass sich Cyanine mit Aminen funktionalisieren lassen, wurde von Schnermann *et al.* ausgenutzt um eine Synthese von einer NIR-photospaltbaren Gruppe auf Cy7-Basis zu entwickeln. Um dieses Ziel zu erreichen funktionalisierte die Arbeitsgruppe den Cy7-Farbstoff **32** über *N,N'*-Dimethylethyldiamin (**33**). Über diesen Linker konnten daraufhin diverse Carbonsäurechloride **35** angeknüpft werden. Die in Schema 8 dargestellte Reaktionsfolge liefert gute Ausbeuten. So erfolgt die Anbindung des Linkers **33** laut Literatur mit quantitativer Ausbeute und die Reaktion der Säurechloride **35** kann mit Ausbeuten zwischen 80–88% realisiert werden.^[176]



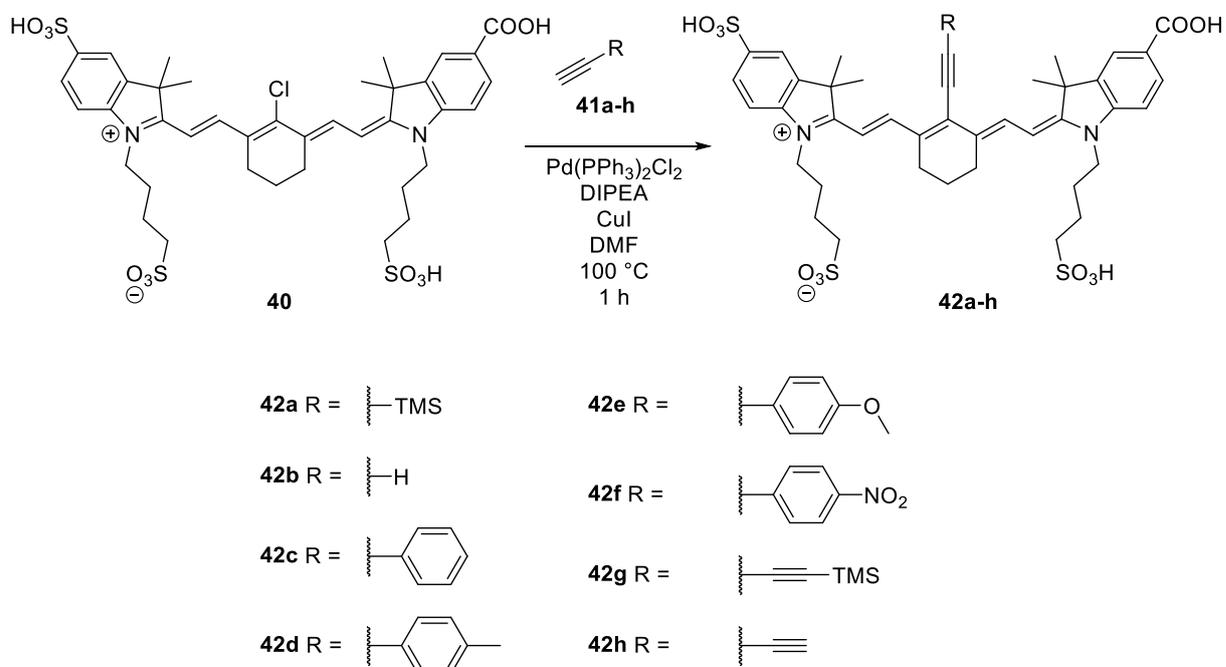
Schema 8: Funktionalisierung eines Cy7-Fluorophors mit *N,N'*-Dimethylethyldiamin (**33**) als Linker.

Es konnte nachgewiesen werden, dass Konjugationen über Heteroatome wie Sauerstoff bei einer Funktionalisierung über Alkoholate Cyaninfluorophore ergeben welche in *in vivo*-Experimenten instabil sind.^[177] Abhilfe schaffen hier Kreuzkupplungsreaktionen wie die Suzuki-Kupplung oder die Sonogashira-Kupplung, da diese eine stabile Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung aufbauen, welche *in vivo* eine geringere Labilität aufweist.^[178-179] Ein Beispiel hierfür stammt von Henary *et al.* welche ein Cyaninfluorophor **37** über eine Boronsäure **38** funktionalisierten.^[177] Die Reaktion ist in Schema 9 dargestellt.



Schema 9: Derivatisierung eines Cyaninfluorophors **37** über Suzuki-Kreuzkupplung.

Kürzlich wurde die Sonogashira-Kupplung als weitere Funktionalisierungsmethode für Cyaninfluorophore von Krämer *et al.* vorgestellt.^[180] Die präsentierten Reaktionsbedingungen und die synthetisierten Cyaninfluorophorderivate **42a-h** sind in Schema 10 dargestellt.



Schema 10: Sonogashira-Kreuzkupplung zur Funktionalisierung von Cyaninfluorophoren **40**.

Aus Schema 10 wird deutlich, dass über Kreuzkupplungsreaktionen ein viel größeres Spektrum an Cyaninfluorophoren gewonnen werden kann, da Kreuzkupplungen unterschiedlichste funktionelle Gruppen tolerieren und keine harschen Reaktionsbedingungen angewendet werden müssen.

Der nächste Abschnitt dieser Arbeit behandelt polyfluorierte Fluoreszenzfarbstoffe und deren Anwendung für die Bildgebung, da diese interessante Eigenschaften aufweisen, aber noch nicht ausreichend untersucht sind. Auch wird ein kurzer Überblick über die Fluor-Kohlenstoff-Bindung gegeben.

2.3.3 Über polyfluorierte Moleküle und Fluorophore

Fluorhaltige Verbindungen sind aus unserem Alltag nicht wegzudenken. Sie umgeben uns täglich, zum Beispiel in Form von Teflon[®], einer extrem stabilen Beschichtung für Materialien, oder als Bestandteil von Pharmazeutika wie zum Beispiel dem Antidepressivum Prozac[®] oder dem Antibiotikum Ciprobay[®].^[181-183]