

Synthese und Anwendung neuartiger fluoreszierender Nitrone auf Naphthalsäureimid-Basis

vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte

DISSERTATION

(D 386)

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Christian Kopp

Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 05.11.2015

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen September 2010 und März 2014 im Fachbereich Chemie / Biochemie der Technischen Universität Kaiserslautern.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung dieses sehr interessanten Themas, die gewährten Freiräume bei der Durchführung dieser Arbeit und für die stetige Diskussionsbereitschaft.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 05.11.2015

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. W. R. Thiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. E. Trommer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. J. Pierik

Für meine Eltern

*"So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muss sie für fertig erklären,
wenn man nach der Zeit und den Umständen
das Möglichste getan hat."*

Johann Wolfgang von Goethe (1749 - 1832)

Inhaltsverzeichnis

1	Theoretische Grundlagen	1
1.1	Reaktive Sauerstoffspezies	1
1.1.1	Was sind ROS und wo werden sie gebildet.....	1
1.1.2	Wie werden ROS im Körper abgebaut	2
1.1.3	Nachweis von ROS.....	2
1.2	ESR-Spektroskopie.....	3
1.3	Fluoreszenz und Fluoreszenzfarbstoffe	6
1.4	Nitrone und Spin-Traps	9
2	Stand der Forschung und Aufgabenstellung	11
3	Eigene Ergebnisse und Diskussion.....	14
3.1	Synthetische Arbeiten.....	14
3.1.1	Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl- <i>N-tert</i> -butylnitrons (11).....	14
3.1.1.1	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (13)	14
3.1.1.2	Synthese von 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)benzonnitril (15)	15
3.1.1.3	Synthese von 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)benzylamin (16).....	15
3.1.1.4	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylbenzylacetal (17).....	16
3.1.1.5	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylbenzaldehyd (18)	16
3.1.1.6	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl- <i>N-tert</i> -butylnitron (11)	17
3.1.2	Vorversuche zur Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl- <i>N-tert</i> - butylnitrons (34)	18
3.1.2.1	Synthese von 1,8-Naphthalimidophenyl-Derivaten	18
3.1.2.1.1	Synthese von 1,8-Naphthalimidobenzol (44)	18

3.1.2.1.2	Synthese von 1,8-Naphthalimidobenzoesäure (45).....	19
3.1.2.1.3	Synthese von 1,8-Naphthalimidobenzoesäure- <i>N</i> -methoxy- <i>N</i> -methylanilid (47).....	19
3.1.2.1.4	Synthese von 1,8-Naphthalimidobenzaldehyd (48).....	20
3.1.2.2	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzol (46).....	20
3.1.3	Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl- <i>N-tert</i> -butylnitrons (34)	21
3.1.3.1	Übersicht der durchgeführten Synthesewege	21
3.1.3.2	Syntheseweg A zur Darstellung von PNIPN (34).....	22
3.1.3.2.1	Synthese von 2-(4-Nitrophenyl)-1,3-dioxolan (36).....	22
3.1.3.2.2	Synthese von 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)anilin (37).....	22
3.1.3.2.3	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenylacetal (38).....	23
3.1.3.3	Syntheseweg B zur Darstellung von PNIPN (34)	24
3.1.3.3.1	Synthese von 4-Aminobenzoesäureethylester (19).....	24
3.1.3.3.2	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäureethylester (40).	25
3.1.3.4	Syntheseweg C zur Darstellung von PNIPN (34)	26
3.1.3.4.1	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäure (31)	26
3.1.3.4.2	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäurechlorid (41) .	26
3.1.3.5	Syntheseweg D zur Darstellung von PNIPN (34)	28
3.1.3.5.1	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäure- <i>N</i> -methoxy- <i>N</i> -methylanilid (32).....	28
3.1.3.5.2	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzaldehyd (33).....	29
3.1.3.5.3	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl- <i>N-tert</i> -butylnitron (34).....	30
3.1.3.5.4	Zusammenfassung der durchgeführten Synthesewege	30
3.1.4	Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimido- α -methyl- <i>N-tert</i> -butylnitrons (21)....	32
3.1.4.1	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoacetophenon (20).....	32

3.1.4.2	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimido- α -methyl- <i>N-tert</i> -butylnitron (21)	33
3.1.5	Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin- <i>N</i> -oxid (24)	34
3.1.5.1	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin (23)	34
3.1.5.2	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin- <i>N</i> -oxid (24)	35
3.1.6	Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethyl- <i>N-tert</i> -butylnitron (29)	36
3.1.6.1	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoessigsäure (26)	36
3.1.6.2	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoessigsäure- <i>N</i> -methoxy- <i>N</i> -methylamid (27)	36
3.1.6.3	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoacetaldehyd (28)	37
3.1.6.4	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethyl- <i>N-tert</i> -butylnitron (29)	38
3.1.7	Zusammenfassung der Syntheseergebnisse	39
3.2	ESR-spektroskopische Untersuchungen	40
3.2.1	ESR-spektroskopische Untersuchungen des PNIP-Nitron (34)	40
3.2.2	ESR-spektroskopische Untersuchungen des PNIEPO (24)	43
3.2.3	ESR-spektroskopische Untersuchungen des PNIM-Nitron (29)	45
3.3	UV- und Fluoreszenzspektroskopie	49
3.3.1	UV- und Fluoreszenzspektren in Ethylacetat	49
3.3.2	UV- und Fluoreszenzspektren in DMSO	51
3.3.3	Fluoreszenz- <i>Quenching</i> -Experimente	54
3.3.3.1	Fluoreszenz- <i>Quenching</i> -Experimente in Ethylacetat	55
3.3.3.2	Fluoreszenz- <i>Quenching</i> -Experimente in DMSO	56
3.3.3.3	Fluoreszenz- <i>Quenching</i> -Experimente mit Rotenon und Antimycin A	57
3.4	Zytotoxizitätstest	59
3.4.1	SRB-Test mit 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl- <i>N-tert</i> -butylnitron (11)	60
3.4.2	SRB-Test mit 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl- <i>N-tert</i> -butylnitron (34)	62
3.4.3	SRB-Test mit 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethyl- <i>N-tert</i> -butylnitron (29)	64

3.4.4	SRB-Test mit 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin- <i>N</i> -oxid (24).....	67
3.4.5	Ergebnis der SRB-Tests.....	70
3.5	<i>In vitro</i> Untersuchungen am konfokalen <i>Laser-Scanning</i> -Mikroskop	71
3.5.1	Eigenfluoreszenz-Versuche an MCF7-Zellen	72
3.5.2	<i>In vitro</i> Akkumulationsversuche.....	73
3.5.2.1	Akkumulation von PNIMPN (11)	73
3.5.2.2	Akkumulation von PNIPN (34).....	74
3.5.2.3	Akkumulation von PNIMN (29)	74
3.5.2.4	Akkumulation von PNIEPO (24)	74
3.5.3	<i>In vitro</i> Untersuchungen mit PNIPN (34).....	75
3.5.3.1	<i>Bleaching</i> von PNIPN (34).....	75
3.5.3.2	Fluoreszenzlöschung mit Rotenon	76
3.5.3.3	Fluoreszenzlöschung mit Antimycin A	77
3.5.3.4	Fluoreszenzlöschung mit Rotenon und Antimycin A	78
3.5.4	<i>In vitro</i> Untersuchungen mit PNIMN (29)	79
3.5.4.1	<i>Bleaching</i> von PNIMN (29)	79
3.5.4.2	Fluoreszenzlöschung mit Rotenon	80
3.5.4.3	Fluoreszenzlöschung mit Antimycin A	81
3.5.4.4	Fluoreszenzlöschung mit Rotenon und Antimycin A	82
3.5.5	<i>In vitro</i> Untersuchungen mit PNIMPN (11).....	83
3.5.5.1	<i>Bleaching</i> von PNIMPN (11)	83
3.5.5.2	Fluoreszenzlöschung mit Rotenon	84
3.5.5.3	Fluoreszenzlöschung mit Antimycin A	85
3.5.5.4	Fluoreszenzlöschung mit Rotenon und Antimycin A	86
3.5.6	<i>In vitro</i> Untersuchungen mit PNIEPO (24)	87
3.5.6.1	<i>Bleaching</i> von PNIEPO (24)	87
3.5.6.2	Fluoreszenzlöschung mit Rotenon	88
3.5.6.3	Fluoreszenzlöschung mit Antimycin A	89

3.5.6.4	Fluoreszenzlöschung mit Rotenon und Antimycin A	90
3.5.7	Ergebnis der <i>In vitro</i> Untersuchungen	90
4	Zusammenfassung und Ausblick	93
5	Experimenteller Teil	97
5.1	Allgemeine Arbeitstechniken	97
5.1.1	Verwendete Geräte	97
5.1.2	Verwendete Chemikalien.....	98
5.2	Synthesen.....	98
5.2.1	Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (13)	98
5.2.2	Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl- <i>N-tert</i> -butylnitrons (11).....	99
5.2.2.1	Synthese von 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)benzonnitril (15)	99
5.2.2.2	Synthese von 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)benzylamin (16).....	100
5.2.2.3	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylbenzylacetal (17).....	101
5.2.2.4	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylbenzaldehyd (18)	102
5.2.2.5	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl- <i>N-tert</i> -butylnitron (11)	103
5.2.3	Vorversuche zur Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl- <i>N-tert</i> - butylnitrons (34)	104
5.2.3.1	Synthese von 1,8-Naphthalimidophenyl-Derivaten	104
5.2.3.1.1	Synthese von 1,8-Naphthalimidobenzol (44)	104
5.2.3.1.2	Synthese von 1,8-Naphthalimidobenzoessäure (45)	105
5.2.3.1.3	Synthese von 1,8-Naphthalimidobenzoessäure- <i>N</i> -methoxy- <i>N</i> -methyramid (47).....	105
5.2.3.1.4	Synthese von 1,8-Naphthalimidobenzaldehyd (48).....	106
5.2.3.2	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzol (46)	107
5.2.4	Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl- <i>N-tert</i> -butylnitrons (34)	108
5.2.4.1	Synthese von 2-(4-Nitrophenyl)-1,3-dioxolan (36).....	108

5.2.4.2	Synthese von 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)anilin (37).....	108
5.2.4.3	Syntheseversuche von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenylacetal (38) ...	109
5.2.4.4	Synthese von 4-Aminobenzoesäureethylester (39)	110
5.2.4.5	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäureethylester (40) ..	110
5.2.4.6	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäure (31).....	111
5.2.4.7	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäurechlorid (41).....	112
5.2.4.8	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäure- <i>N</i> -methoxy- <i>N</i> - methylamid (32)	113
5.2.4.9	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobezaldehyd (33)	114
5.2.4.10	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl- <i>N-tert</i> -butylnitron (34)...	115
5.2.5	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimido- α -methyl- <i>N-tert</i> -butylnitron (21).....	116
5.2.5.1	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoacetophenon (20).....	116
5.2.6	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin- <i>N</i> -oxid (24).....	117
5.2.6.1	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin (23).....	117
5.2.6.2	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin- <i>N</i> -oxid (24) ..	118
5.2.7	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethyl- <i>N-tert</i> -butylnitron (29)....	119
5.2.7.1	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoessigsäure (26)	119
5.2.7.2	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoessigsäure- <i>N</i> -methoxy- <i>N</i> - methylamid (27)	120
5.2.7.3	Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoacetaldehyd (28).....	121
5.2.7.4	Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethyl- <i>N-tert</i> -butylnitron (29)	121
5.3	ESR-Spektroskopie.....	122
5.3.1	Benötigte Lösungen.....	122
5.3.2	Pipettierschemata.....	124
5.3.3	ESR-Parameter	125

5.3.3.1 ESR-Parameter der Messungen mit Hydroxylradikal-erzeugenden Systemen ..	125
5.3.3.2 ESR-Parameter der Messungen mit Superoxidanionradikal-erzeugenden Systemen.....	126
5.4 UV- und Fluoreszenzspektroskopie, Fluoreszenz- <i>Quenching</i> -Experimente.....	127
5.4.1 Benötigte Lösungen	127
5.4.2 Vorgehensweise und Pipettierschemata	127
5.5 Arbeiten mit Zellen.....	129
5.5.1 Zellkultur	129
5.5.2 Ernten von Zellen	130
5.5.3 Bestimmung der Zellzahl.....	130
5.5.4 SRB-Test	130
5.5.5 <i>In vitro</i> Experimente am konfokalen <i>Laser-Scanning</i> -Mikroskop.....	132
5.5.5.1 Vorbereitung der Zellen und benötigte Lösungen.....	132
5.5.5.2 Vorgehensweise.....	133
Literaturverzeichnis	134
Anhang: NMR-Spektren synthetisierter Verbindungen	144

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Superoxidationradikal-Produktion an den Komplexen I und III der mitochondrialen Atmungskette.....	1
Abbildung 2:	Entartung der Energieniveaus des Elektronenspins.....	4
Abbildung 3:	Darstellung des ESR-Spektrums an verschiedenen Stellen der Resonanzlinie..	5
Abbildung 4:	Jablonski-Termschema.	7
Abbildung 5:	Strukturformeln des Naphthalimid Anionensensors 1 und des Färbemittels Lucifer yellow (2).	8
Abbildung 6:	Strukturformel von den Dansyl-Derivaten 3 und Fluorescein-Isocyanat-Derivaten 4.	8
Abbildung 7:	Beispiele für die Darstellungsmöglichkeiten von Nitronen (nach Karbach (2014)).	9
Abbildung 8:	Strukturformeln der Spin-Traps PBN (5), DMPO (6) und BMPO (7).	10
Abbildung 9:	Reaktion einer cyclischen Spin-Trap 8 mit einem Radikal zu einem Spinaddukt 9	10
Abbildung 10:	Beispielreaktion einer fluoreszierenden <i>Spin-Trap</i> mit einem Radikal ($X\cdot$) zu einem ESR-aktiven Spinaddukt unter Zusammenbruch der Fluoreszenz.	11
Abbildung 11:	Struktur des <i>p</i> -Nitrostilbennitrons (10).	11
Abbildung 12:	Struktur des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl- <i>N-tert</i> -butyl-nitrons (11).	12
Abbildung 13:	Syntheserouten der fluoreszierenden Nitrone PNIMP (11), PNIPMN (21), PNIEPO (24), PNIMN (29) und PNIPN (34).	14
Abbildung 14:	Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (13).	14
Abbildung 15:	Darstellung von 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)benzonnitril (15).	15
Abbildung 16:	Darstellung von 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)benzylamin (16).	15
Abbildung 17:	Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzylacetal (17).	16

Abbildung 18: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzaldehyd (18).	16
Abbildung 19: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl- <i>N-tert</i> -butylnitron (11).	17
Abbildung 20: Darstellung von 1,8-Naphthalimidobenzol (44).	18
Abbildung 21: Darstellung von 1,8-Naphthalimidobenzoessäure (45).	19
Abbildung 22: Darstellung von 1,8-Naphthalimidobenzoessäure- <i>N</i> -methoxy- <i>N</i> -methyramid (47).	19
Abbildung 23: Darstellung von 1,8-Naphthalimidobenzaldehyd (48)	20
Abbildung 24: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzol (46).	20
Abbildung 25: Synthesewege zur Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl- <i>N-tert</i> -butylnitron (34).	21
Abbildung 26: Darstellung von 2-(4-Nitrophenyl)-1,3-dioxolan (36).	22
Abbildung 27 : Darstellung von 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)anilin (37).	22
Abbildung 28: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenylacetal (38).	23
Abbildung 29: Darstellung von 4-Aminobenzoessäureethylester (39)	24
Abbildung 30: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoessäureethylester (40).	25
Abbildung 31: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoessäure (31).	26
Abbildung 32: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoessäurechlorid (41). ...	26
Abbildung 33: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoessäure- <i>N</i> -methoxy- <i>N</i> -methyramid (32).	28
Abbildung 34: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzaldehyd (33).	29
Abbildung 35: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl- <i>N-tert</i> -butylnitron (34).	30
Abbildung 36: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoacetophenon (20).	32
Abbildung 37: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl- α -methyl- <i>N-tert</i> -butylnitron (21).	33
Abbildung 38: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin (23).	34
Abbildung 39: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin- <i>N</i> -oxid (24).	35

Abbildung 40: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoessigsäure (26).	36
Abbildung 41: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoessigsäure- <i>N</i> -methoxy- <i>N</i> -methylamid (27).	36
Abbildung 42: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoacetaldehyd (28).	37
Abbildung 43: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethyl- <i>N</i> - <i>tert</i> - (29).	38
Abbildung 44: Postulierte Strukturformeln des PNIPN-OH-Adduktes 35 und des PNIPN-OOH-Adduktes 36.	41
Abbildung 45: Normiertes ESR-Spektrum eines PNIPN-OH-Adduktes 35 nach Inkubation mit 100 µl Fenton-Reagenz.	41
Abbildung 46: Normiertes ESR-Spektrum eines PNIPN-OH-Adduktes 35 nach Inkubation mit 200 µl Fenton-Reagenz.	42
Abbildung 47: Versuch zur Detektion eines PNIPN-OOH Adduktes 36 generiert durch ein Hypoxanthin/XOD-System.	42
Abbildung 48: Postulierte Strukturformeln des PNIEPO-OH Adduktes 37 und des PNIEPO-OOH Adduktes 38.	43
Abbildung 49: Normiertes ESR-Spektrum eines PNIEPO-OH-Adduktes 37 nach Inkubation mit 100 µl Fenton-Reagenz.	44
Abbildung 50: Normiertes ESR-Spektrum eines PNIEPO-OH-Adduktes 37 nach Inkubation mit 200 µl Fenton-Reagenz.	44
Abbildung 51: Versuch zur Detektion eines PNIEPO-OOH-Adduktes 38 in DMSO generiert durch ein Hypoxanthin/XOD-System.	45
Abbildung 52: Postulierte Strukturformeln des PNIMN-OH-Adduktes 39 und des PNIMN-OOH Adduktes 40.	46
Abbildung 53: Normiertes ESR-Spektrum eines PNIMN-OH-Adduktes 39 nach Inkubation mit 100 µl Fenton-Reagenz.	46
Abbildung 54: Normiertes ESR-Spektrum eines PNIMN-OH-Adduktes 39 nach Inkubation mit 200 µl Fenton-Reagenz.	47
Abbildung 55: Versuch zur Detektion eines PNIMN-OOH Adduktes 40 in DMSO generiert durch ein Hypoxanthin/XOD-System.	47

Abbildung 56: Versuch zur Detektion eines PNIMN-OOH-Adduktes 40 in EtOAc generiert durch ein Hypoxanthin/XOD-System.	48
Abbildung 57: Normiertes Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des PNIP-Nitrons (34) in Ethylacetat.	50
Abbildung 58: Normiertes Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des PNIM-Nitrons (29) in Ethylacetat.	51
Abbildung 59: Normiertes Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des PNIMP-Nitrons (11) in DMSO ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).	52
Abbildung 60: Normiertes Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des PNIMP-Nitrons (11) in DMSO ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$).	52
Abbildung 61: Normiertes Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des PNIP-Nitrons (34) in DMSO ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).	53
Abbildung 62: Normiertes Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des PNIM-Nitrons (29) in DMSO ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).	53
Abbildung 63: Normierte Fluoreszenzspektren des PNIP-Nitrons (34) in Ethylacetat nach Inkubation mit Fenton-Lösung.	55
Abbildung 64: Normierte Fluoreszenzspektren des PNIM-Nitrons (29) in Ethylacetat nach Inkubation mit Fenton-Lösung.	55
Abbildung 65: Normierte Fluoreszenzspektren des PNIP-Nitrons (34) in DMSO nach Inkubation mit Fenton-Lösung.	56
Abbildung 66: Normierte Fluoreszenzspektren des PNIM-Nitrons (29) in DMSO nach Inkubation mit Fenton-Lösung.	57
Abbildung 67: Normierte Fluoreszenzspektren des PNIP-Nitrons (34) in Ethylacetat nach Inkubation mit Rotenon und Antimycin A.	58
Abbildung 68: Normierte Fluoreszenzspektren des PNIM-Nitrons (29) in Ethylacetat nach Inkubation mit Rotenon und Antimycin A.	58
Abbildung 69: Strukturformel von Sulforhodamin B.	59
Abbildung 70: SRB-Test von PNIMPN auf MCF7-Zellen (8,3 – 50 μM).	60
Abbildung 71: SRB-Test von PNIMPN auf MCF7-Zellen (0,8 – 5 μM).	60
Abbildung 72: SRB-Test von PNIMPN auf Hela-Zellen (4,2 – 25 μM).	61

Abbildung 73: SRB-Test von PNIMPN auf wt-MEF-Zellen (3,3 – 50 μ M).....	62
Abbildung 74: SRB-Test von PNIPN auf MCF7-Zellen (8,3 – 5 μ M).	63
Abbildung 75: SRB-Test von PNIPN auf Hela-Zellen (8,3 – 50 μ M).	63
Abbildung 76: SRB-Test von PNIPN auf wt-MEF-Zellen (3,3 – 50 μ M).	64
Abbildung 77: SRB-Test von PNIMN auf MCF7-Zellen (8,3 – 50 μ M).	65
Abbildung 78: SRB-Test von PNIMN auf MCF7-Zellen (0,8 – 5 μ M).	65
Abbildung 79: SRB-Test von PNIMN auf Hela-Zellen (8,3 – 50 μ M).	66
Abbildung 80: SRB-Test von PNIMN auf Hela-Zellen (0,8 – 5 μ M).	67
Abbildung 81: SRB-Test von PNIMN auf wt-MEF-Zellen (8,3 – 50 μ M).	67
Abbildung 82: SRB-Test von PNIEPO auf MCF7-Zellen (8,3 – 50 μ M).	68
Abbildung 83: SRB-Test von PNIEPO auf Hela-Zellen (8,3 – 50 μ M).	68
Abbildung 84: SRB-Test von PNIEPO auf Hela-Zellen (0,8 – 5 μ M).	69
Abbildung 85: SRB-Test von PNIEPO auf wt-MEF-Zellen (8,3 – 50 μ M).	69
Abbildung 86: Eigenfluoreszenz der MCF7-Zellen nach Inkubation mit Rotenon und Antimycin A ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).	72
Abbildung 87: MCF7-Zellen nach Inkubation mit A) PNIMPN ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$); B) TMRE ($\lambda_{\text{ex}} = 561 \text{ nm}$); C) Überlagerung von A und B.	73
Abbildung 88: MCF7-Zellen nach Inkubation mit A) PNIPN ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$); B) TMRE ($\lambda_{\text{ex}} = 561 \text{ nm}$); C) Überlagerung von A und B.	74
Abbildung 89: wt-MEF-Zellen nach Inkubation mit A) PNIMN ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$); B) TMRE ($\lambda_{\text{ex}} = 561 \text{ nm}$); C) Überlagerung von A und B.	74
Abbildung 90: Hela-Zellen nach Inkubation mit A) PNIEPO ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$); B) TMRE ($\lambda_{\text{ex}} = 561 \text{ nm}$); C) Überlagerung von A und B.	75
Abbildung 91: MCF7-Zellen inkubiert mit 50 μ M PNIP-Nitron-Lösung.	76
Abbildung 92: wt-MEF-Zellen inkubiert mit 50 μ M PNIP-Nitron-Lösung und Zugabe des Inhibitors Rotenon (0,2 μ M).	76
Abbildung 93: wt-MEF-Zellen inkubiert mit 50 μ M PNIP-Nitron-Lösung und Zugabe des Inhibitors Antimycin A (7,5 μ M).	77

Abbildung 94: MCF7-Zellen inkubiert mit 50 μ M PNIP-Nitron-Lösung und Zugabe der Inhibitoren (0,2 μ M Rotenon und 7,5 μ M Antimycin A).	78
Abbildung 95: Hela-Zellen inkubiert mit 50 μ M PNIM-Nitron-Lösung.	79
Abbildung 96: Hela-Zellen inkubiert mit 50 μ M PNIM-Nitron-Lösung und Zugabe des Inhibitors Rotenon (0,2 μ M).	80
Abbildung 97: Hela-Zellen inkubiert mit 50 μ M PNIM-Nitron-Lösung und Zugabe des Inhibitors Antimycin A (7,5 μ M).	81
Abbildung 98: MCF7-Zellen inkubiert mit 50 μ M PNIM-Nitron-Lösung und Zugabe der Inhibitoren (0,2 μ M Rotenon und 7,5 μ M Antimycin A).	82
Abbildung 99: <i>wt</i> -MEF-Zellen inkubiert mit 50 μ M PNIMP-Nitron-Lösung.	83
Abbildung 100: MCF7-Zellen inkubiert mit 50 μ M PNIMP-Nitron-Lösung und Zugabe des Inhibitors Rotenon (0,2 μ M).	84
Abbildung 101: Hela-Zellen inkubiert mit 50 μ M PNIMP-Nitron-Lösung und Zugabe des Inhibitors Antimycin A (7,5 μ M).	85
Abbildung 102: MCF7-Zellen inkubiert mit 50 μ M PNIMP-Nitron-Lösung und Zugabe der (0,2 μ M Rotenon und 7,5 μ M Antimycin A).	86
Abbildung 103: Hela-Zellen inkubiert mit 5 μ M PNIEPO-Lösung.	87
Abbildung 104: MCF7-Zellen inkubiert mit 5 μ M PNIEPO-Lösung und Zugabe des Inhibitors Rotenon (0,2 μ M).	88
Abbildung 105: Hela-Zellen inkubiert mit 5 μ M PNIEPO-Lösung und Zugabe des Inhibitors Antimycin A (7,5 μ M).	89
Abbildung 106: MCF7-Zellen inkubiert mit 5 μ M PNIEPO-Lösung und Zugabe der Inhibitoren (0,2 μ M Rotenon und 7,5 μ M Antimycin A).	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Variierte Reaktionsbedingungen zur Darstellung von Nitron 21	33
Tabelle 2: Absorptions- und Fluoreszenzmaxima der Nitrone 29 und 34 in EtOAc.....	50
Tabelle 3: Absorptions- und Fluoreszenzmaxima der Nitrone 11, 29 und 34 in DMSO.	54
Tabelle 4: Übersicht der Zeiten bis zur Fluoreszenzlöschung nach Zugabe der Inhibitoren .	92
Tabelle 5: Pipettierschema für die Nitron-Fenton-System-Messungen.....	124
Tabelle 6: Pipettierschema für die Nitron-XOD-System-Messungen nach Leinisch und Mitchell.....	124
Tabelle 7: ESR-Parameter für die Nitron-Fenton-System-Messungen	125
Tabelle 8: ESR-Parameter für die Nitron-XOD-System-Messungen nach Leinisch und Mitchell.....	126
Tabelle 9: Pipettierschema für die Fluoreszenz- <i>Quenching</i> -Experimente in EtOAc	128
Tabelle 10: Pipettierschema für die Fluoreszenz- <i>Quenching</i> -Experimente in DMSO.....	129
Tabelle 11: Pipettierschema für die Fluoreszenz- <i>Quenching</i> -Experimente mit Rotenon und Antimycin A (1 nM Nitron-SL).....	129
Tabelle 12: Pipettierschema für die Zytotoxizitätsmessung mittels SRB-Test (10 mM Nitron-SL)	131
Tabelle 13: Pipettierschema für die Zytotoxizitätsmessung mittels SRB-Test (1 mM Nitron-SL)	131
Tabelle 14: Herstellung der Stammlösungen der zu untersuchenden Nitrone.....	132
Tabelle 15: Herstellung der Lösungen zur Fluoreszenzmikroskopie	133

Abkürzungsverzeichnis

BMPO	5- <i>tert</i> -Butoxycarbonyl-5-methyl-pyrrolin- <i>N</i> -oxid
Bn	Benzyl
Bsp.	Beispiel
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
CH ₂ Cl ₂	Methylenchlorid
CDCl ₃	deutertes Chloroform
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cyt c	Cytochrom C
δ	chemische Verschiebung [ppm]
d	Duplett, Tage
dB	Dezibel
DC	Dünnschichtchromatographie
d. h.	das heißt
DIBAL	Diisobutylaluminiumhydrid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMPO	5,5-Dimethyl-1-pyrrolin- <i>N</i> -oxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESR	<i>electron spin resonance</i> (Elektronenspinresonanz)

EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
G	Gauss
h	Stunde
H	Wasserstoffatom
HeLa	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
Hz	Hertz in s ⁻¹
<i>i</i> Pr	Isopropyl
<i>J</i>	Kopplungskonstante in Hz
Kap.	Kapitel
kHz	Kilohertz in s ⁻¹
l	Liter
LiAlH ₄	Lithiumaluminiumhydrid
Lsg.	Lösung
m	Multiplett, Masse
Max.	Maximal
ml	Milliliter
mM	Millimolar
μM	Mikromolar
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i> , Brustkrebszelllinie

MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHz	Megahertz
MnO ₂	Mangan(IV)oxid
ms	Millisekunde
mW	Milliwatt
nM	Nanomolar
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ WO ₄	Natriumwolframat
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanz)
nm	Nanometer
NOX2	katalytische Untereinheit der NADPH-Oxidase
O ₂	Sauerstoff
PBN	Phenyl- <i>N-tert</i> -butylnitron
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PNIEPO	4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin- <i>N</i> -oxid
PNIMN	4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethyl- <i>N-tert</i> -butylnitron
PNIMPN	4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl- <i>N-tert</i> -butylnitron
PNIPN	4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl- <i>N-tert</i> -butylnitron
PNSN	<i>p</i> -Nitrostilbennitron
ppm	<i>parts per million</i>
sog.	sogenannten
<i>p</i> -TsOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure

RF/Reflux.	Rückfluss
RPMI	Zellkulturmedium (entwickelt am Roswell Park Memorial Institute)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
s	Singulett, Sekunde
TEA	Triethylamin
t	Triplett
<i>tert</i>	tertiär
THF	Tetrahydrofuran
TMRE	Tetramethylrhodaminethylester Perchlorat
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
Vis	Visuell
vgl.	vergleiche
<i>wt</i> -MEF	<i>wildtype</i> Mausembryo-Fibroblasten
z.B.	zum Beispiel
Zn(OAc) ₂	Zinkacetat

1 Theoretische Grundlagen

1.1 Reaktive Sauerstoffspezies

1.1.1 Was sind ROS und wo werden sie gebildet

Radikale bzw. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind in biologischen Systemen ständig vorhanden. Teilweise werden diese hochreaktiven Stoffe, speziell die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), vom Organismus selbst gebildet, um zum Beispiel Bakterien aus dem Organismus zu beseitigen oder aber abgestorbene Zellen abzubauen. Zu diesen ROS gehören beispielsweise Hydroxyl- ($\text{OH}\cdot$), Peroxyl- ($\text{ROO}\cdot$), Alkoxy- ($\text{RO}\cdot$) und Superoxidanion-Radikale ($\text{O}_2^{\cdot-}$), sowie Wasserstoffperoxid, Singulett-Sauerstoff und Ozon (Cadenas *et al.*, 1977). Quellen dieser ROS sind beispielsweise die mitochondriale Elektronen-Transportkette, die Xanthinoxidase, Cytochrom-P450 Enzyme, Myeloperoxidasen sowie die NADPH-Oxidase (Ray & Shah, 2005). Der größte Produzent dieser ROS sind die Mitochondrien, wo sie als schädliche Nebenprodukte des Energiestoffwechsels, an den Komplexen I und III der mitochondrialen Atmungskette entstehen (Abbildung 1) (Cadenas & Davies, 2000).

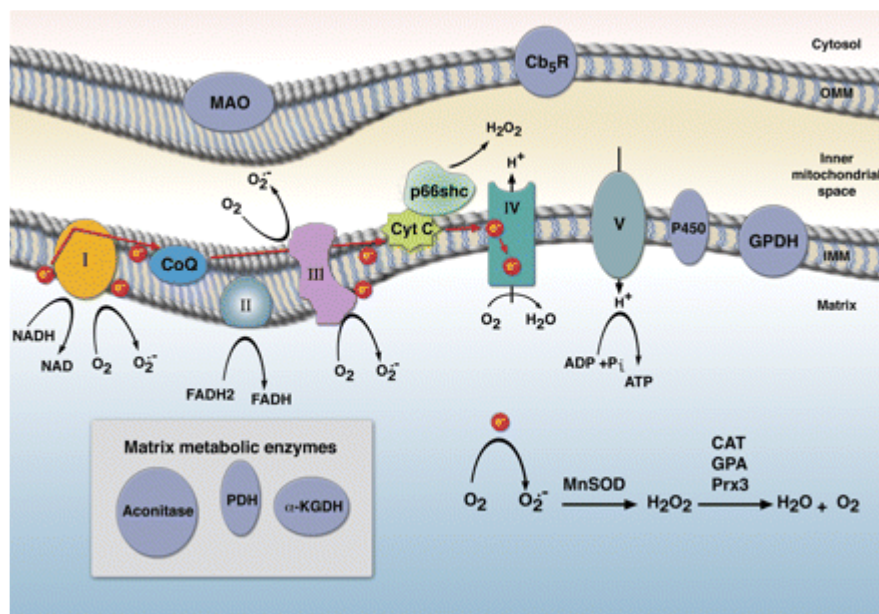


Abbildung 1: Superoxidanionradikal-Produktion an den Komplexen I und III der mitochondrialen Atmungskette (Finkel, 2011).

Wie aus Abbildung 1 zu sehen, ist die Entstehung der ROS innerhalb der mitochondrialen Atmungskette bzw. der Mitochondrien demnach von mehreren Faktoren abhängig. Zum einen erfolgt, durch die Reduktion von NADH und FADH_2 , die Übertragung von Elektronen auf

molekularen Sauerstoff, wodurch, an den bereits erwähnten Komplexen I und III, Superoxidanionradikale gebildet werden. Zum anderen können die ROS durch die Enzyme Monoaminoxidase (MAO) und Cytochrom-b5-Reduktase (Cb5R), welche sich an der äußeren mitochondrialen Membran befinden, gebildet werden (Abbildung 1).

1.1.2 Wie werden ROS im Körper abgebaut

Überschreitet, im Rahmen dieser Stoffwechselfvorgänge, die ROS-Entstehung das pathologische Ausmaß, so spricht man von oxidativem Stress. Es kommt also zu einer Überforderung der Reparatur- und Entgiftungsfunktionen der Zellen (Hansen & Jones 2006; von Zglinicki & Nikolaus 2007). Diese können auf enzymatischem Weg, durch die Superoxiddismutase (SOD) und auf nicht-enzymatischem Weg, durch Antioxidantien, wie Glutathion oder Ascorbat erfolgen (Jacobson *et al.*, 1989). Dementsprechend sind diese Neutralisationsprozesse der limitierende Faktor zur Inaktivierung von ROS, weshalb deren Überschuss viele intra- und extrazelluläre Makromoleküle schädigen kann (Hansen & Jones 2006; von Zglinicki & Nikolaus 2007). Folgen des oxidativen Stresses sind Lipidperoxidation, Proteinoxidation und Schädigungen der DNA, wodurch sie unter anderem mitverantwortlich für den Alterungsprozess gemacht werden (von Zglinicki & Nikolaus 2007). Durch die Oxidation der DNA-Moleküle (Bildung von 8-Oxoguanin und Formamidopyrimidinen) kommt es zu Fehlpaarungen zwischen 8-Oxoguanin und Adenin während der DNA-Replikation und somit zu Basen-Mutationen (Waris & Ahsan, 2006), wodurch ihnen zudem eine entscheidende Rolle in der Krebsentstehung zugeordnet wird. Weitere pathologische Zustände, die durch freie Radikale bzw. ROS hervorgerufen werden können, sind Arteriosklerose, Diabetes Typ II und Bluthochdruck (Marks *et al.*, 1996). Neuere Studien weisen den ROS neben ihrer mutagenen und schädlichen Wirkung auch wichtige Signalfunktionen im Gehirn zu. Diese wirken dort stark gefäßerweiternd, was zu einer verbesserten Signalübertragung und Gedächtnisbildung führt (Kishida & Klann, 2007). Des Weiteren werden Superoxidanionen von neutrophilen Granulozyten (durch die NADPH-Oxidase, NOX2) gebildet und führen bei inflammatorischen Prozessen zur Abtötung von Viren und Bakterien (Kohen & Nyska, 2002).

1.1.3 Nachweis von ROS

ROS können auf Grund ihrer hohen Reaktivität und der damit verbundenen kurzen Lebensdauer nicht direkt nachgewiesen werden. Daher wird ihr Nachweis indirekt geführt, nämlich über die Detektion ihrer Reaktionsaddukte. Hierzu können unter anderem, zwei unterschiedliche Methoden genutzt werden (Bartosz, 2006):

- Nachweis von H_2O_2 z. B. mittels Fluoreszenzspektroskopie
- Nachweis von radikalischen Addukten mittels ESR (*spin trapping*)

Der Nachweis mittels Fluoreszenzspektroskopie, hier am Beispiel der auf Wasserstoffperoxid basierenden Assays erläutert, nutzt die auftretende Fluoreszenzlöschung des zugegebenen Fluoreszenzfarbstoffes aus, um die ROS zu detektieren. Mittels konfokaler *Laser-Scanning-Mikroskopie* lassen sich so Rückschlüsse über den Entstehungsort der ROS ziehen. Hierbei werden die radikalischen Spezies über natürlich vorhandene oder zugesetzte Enzyme in H_2O_2 überführt. Dieses reagiert nun mit dem Farbstoff, was einen Rückgang der Fluoreszenz bewirkt.

Eine weitere Methode stellt der Nachweis von radikalischen Addukten mittels der ESR-Spektroskopie dar. Hierbei können Radikale zwar direkt nachgewiesen werden, allerdings liegen zum einen die Halbwertszeiten der gebildeten Primärradikale in einem Bereich, in dem sie nicht direkt gemessen werden können, zum anderen liegt deren Konzentration im biologischen System nur im nanomolaren Bereich. Dies liegt unterhalb der Nachweisgrenze der ESR-Spektroskopie. Daher nutzt man *spin trapping* Experimente zur Detektion dieser Radikale, bei deren Durchführung die Radikale aufkonzentriert werden (Kalyanaraman *et al.*, 1984; Mason & Kadiiska 2005).

1.2 ESR-Spektroskopie

Die Elektronenspinresonanz (kurz ESR oder *engl. electron paramagnetic resonance*, EPR) ermöglicht die Messung resonanter Mikrowellenabsorption einer Probe in einem äußeren Magnetfeld und eignet sich besonders für Stoffe mit einem permanenten magnetischen Moment. Sie beruht auf Messungen des magnetischen Moments eines Elektrons, dem Elektronenspin. Frühe Experimente der Quantenmechanik zeigten, dass Elektronen, neben ihrem Bahndrehimpuls, einen Eigendrehimpuls besitzen müssen, der durch Rotation des Elektrons um seine eigene Achse entsteht. Dieser Eigendrehimpuls eines Elektrons wird als Spin bezeichnet. Jeder dieser Eigendrehimpulse ist dabei mit einem magnetischen Moment verknüpft. Das Verhältnis zwischen magnetischem Moment und Spin eines Teilchens wird beschrieben durch:

$$\vec{\mu}_s = g \frac{\mu}{\hbar} \vec{s} = \gamma \vec{s} \quad (1)$$

$\vec{\mu}_s$ beschreibt das magnetische Moment, $\hbar = \frac{h}{2\pi}$ das reduzierte Plancksche Wirkungsquantum, μ gibt das Bohrsche Magneton und \vec{s} den Elektronenspin wieder. Der

Proportionalitätsfaktor γ bezeichnet das gyromagnetische Verhältnis. Der gyromagnetische bzw. Landé-Faktor g beschreibt den Zusammenhang zwischen Drehimpuls und magnetischem Moment und hat für ein freies Elektron den Wert $g = 2,0023$. Bringt man ein Elektron nun in ein Magnetfeld B_0 führt sein magnetisches Moment zu einem von der Magnetquantenzahl m_s abhängigen Energieterm:

$$E = m_s g \mu_B B_0 \quad (2)$$

Es bestehen zwei Möglichkeiten der Spinorientierung ($m_s = \pm \frac{1}{2}$). Dabei wird die Entartung der Energieniveaus des Elektronenspins aufgehoben (Zeeman-Effekt), wodurch zwei Zustände unterschiedlicher Energie entstehen zwischen denen Übergänge durch Absorption von Mikrowellenstrahlung möglich sind. Der energetische Abstand ΔE zwischen den beiden Energieniveaus ist dabei nach Gleichung (3) linear von der äußeren Magnetfeldstärke abhängig (Abbildung 2):

$$\Delta E = h\nu = g\mu_B B_0 \quad (3)$$

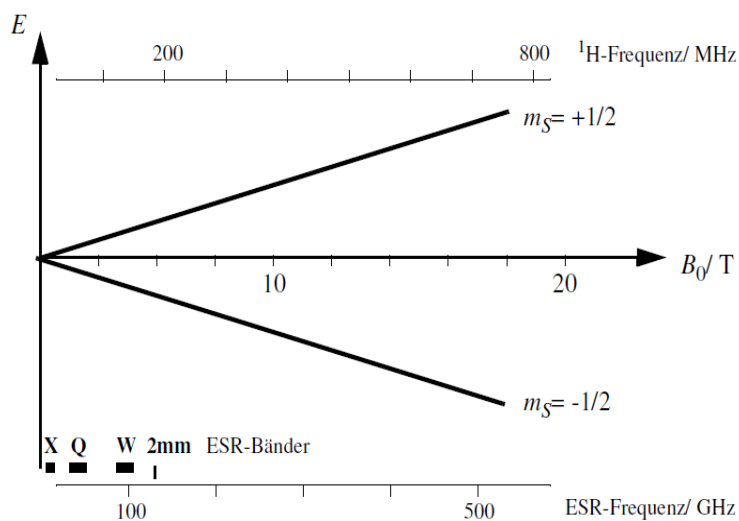


Abbildung 2: Entartung der Energieniveaus des Elektronenspins (Jeschke, 2006).

Aus der Gleichung (3) lässt sich nun für ΔE erkennen, dass für die Energie eines Übergangs, von $m_s = -\frac{1}{2}$ zu $m_s = +\frac{1}{2}$, zwei mögliche Messordnungen variiert werden können. Zum einen kann man die Frequenz der Mikrowellenstrahlung bei konstantem Feld, zum anderen die Magnetfeldstärke bei konstanter Mikrowellenlänge ändern. Aus historischen sowie technischen Gründen arbeitet man heute meist mit Frequenzen von 9-10 GHz (X-Band) und

variiert die Magnetfeldstärke. Die Detektion der Spektren erfolgt somit durch Einstahlen eines kontinuierlichen oder gepulsten elektromagnetischen Wechselfelds. Die Modulation der Magnetfeldstärke ermöglicht bei ersterem dabei die Darstellung des ESR-Spektrums als erste Ableitung des Absorptionsspektrums der Mikrowellenstrahlung in Abhängigkeit von der Magnetfeldstärke. Durch phasenempfindliche Detektion wird die erste Ableitung der Absorptionsintensität registriert. Dieses Signal entspricht dabei der Steigung der Absorption an jedem Punkt (Abbildung 3).

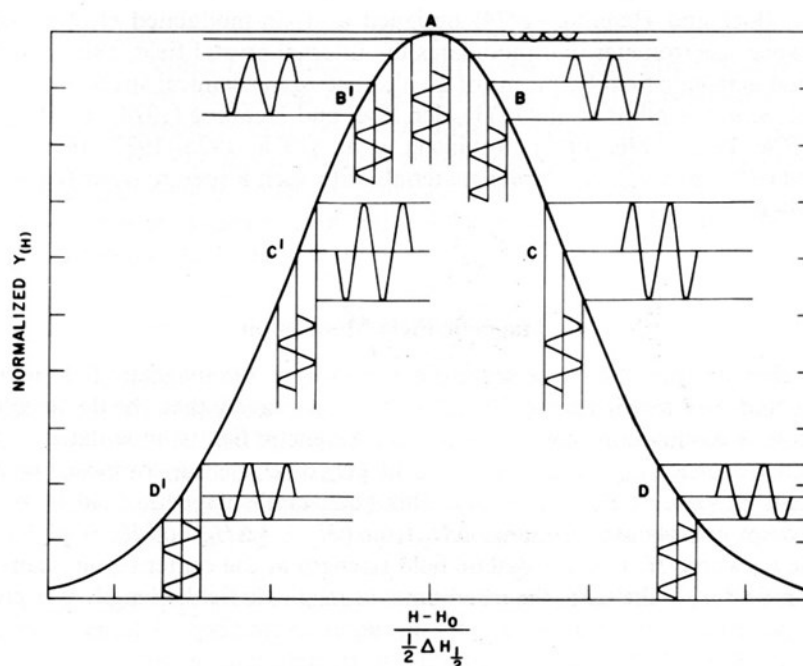


Abbildung 3: Darstellung des ESR-Spektrums an verschiedenen Stellen der Resonanzlinie. Die vertikale Feldmodulation interagiert mit der Absorptionskurve (Gaußsche Kurve) (χ' oder $Y(H)$) und ergibt das horizontale ESR-Signal (Bruker).

Die Wechselwirkung zwischen einem Elektron und einem magnetischen Feld führt zu einem „Ein-Linien-Spektrum“. In Lösung und bei einer guten spektralen Auflösung wird das „Ein-Linien-Signal“ jedoch, durch den Kernspin benachbarter Nuclei, in mehrere Signale aufgespalten. Diese Signalaufspaltung wird als Hyperfeinstruktur bezeichnet. Dabei ist das Magnetfeld, welches das äußere Magnetfeld je nach Orientierung des Kernspins verstärkt oder abschwächt und auf die ungepaarten Elektronen wirkt, wie folgt definiert:

$$B_{\text{lokal}} = B_0 + am_I \quad \text{mit } m_I = \pm \frac{1}{2} \quad (4)$$

Die Konstante a wird als Hyperfein-Kopplungskonstante und m_I als Kernspinquantenzahl bezeichnet. Die Hyperfeinstruktur entsteht durch die Wechselwirkung des Elektronenspins

ungepaarter Elektronen mit dem Kernspin I von Kernen benachbarter Atome und resultiert in $2I + 1$ Linien gleicher Intensität. Betrachtet man beispielsweise ein System mit $S = \frac{1}{2}$ und $I = 1$ so erhält man ein „Drei-Linien-ESR-Spektrum“. Die Hyperfeinstruktur eines ESR-Spektrums trägt daher maßgeblich zur eindeutigen Charakterisierung der zu untersuchenden Probe bei. Wichtige Klassen von Proben sind paramagnetische Systeme, wie z.B. Triplett-Sauerstoff, sterisch abgeschirmte freie Radikale, Übergangsmetallionen mit ungerader sowie teilweise gerader Elektronenanzahl, wie Ti^{3+} , Fe^{3+} oder Cu^{2+} , Systeme mit Leitungselektronen sowie Stickoxide mit ungerader Elektronenzahl. Stabile freie Radikale kommen eher selten vor. Eine sehr interessante Klasse stellen sterisch gehinderte Nitroxide dar. Sie werden vor allem bei biologischen und biochemischen Fragestellungen eingesetzt, da sie in biologischen Systemen entweder beigemischt (engl. *spin probe*) oder chemisch gebunden (engl. *spin label*) werden und somit zu deren Untersuchung beitragen können (Berliner, 2003; Atkins, 2004; Müller *et al.*, 2005; Weil & Bolton, 2006; Jeschke, 2006).

1.3 Fluoreszenz und Fluoreszenzfarbstoffe

Als Fluoreszenz bezeichnet man die spontane Emission von Licht beim Übergang von Elektronen eines elektronisch angeregten Systems in einen Zustand niedrigerer Energie. Durch Absorption von Lichtquanten werden die Valenzelektronen aus dem elektronischen Schwingungsgrundzustand (S_0) in einen angeregten elektronischen Schwingungszustand (S_1 oder S_2) angehoben. Dabei entspricht die Energie des angeregten Schwingungszustands der des absorbierten Photons (Lichtquanten). Anschließend relaxiert das Molekül von höheren Schwingungszuständen in den niedrigsten Energiezustand innerhalb des angeregten S_1 - oder S_2 -Zustandes, je nach angeregtem Ausgangszustand, durch Molekülstöße (*vibrational relaxation*, VR). Von diesem Zustand aus können zudem weitere strahlungslose Prozesse erfolgen, wie z.B. die Rückkehr eines Elektrons in erhöhte angeregte Schwingungszustände des elektronischen Grundzustandes S_0 bzw. in erhöhte angeregte Schwingungszustände des angeregten Zustandes S_1 (*internal conversion*, IC) (Atkins, 2004; Stohrer, 1991). Fällt ein Elektron spontan aus dem ersten S_1 -Zustand wieder auf eines der Schwingungsniveaus des S_0 -Zustands zurück (Regel von Kasha), gibt es dabei Energie in Form von Photonen ab, so spricht man von Fluoreszenz. Eine typische Fluoreszenzdauer liegt bei 10 ns (10^{-9} s). Die Elektronenübergänge, welche bei Absorption und Emission von Licht auftreten, werden für gewöhnlich in einem Jablonski-Termschema dargestellt (Abbildung 4).

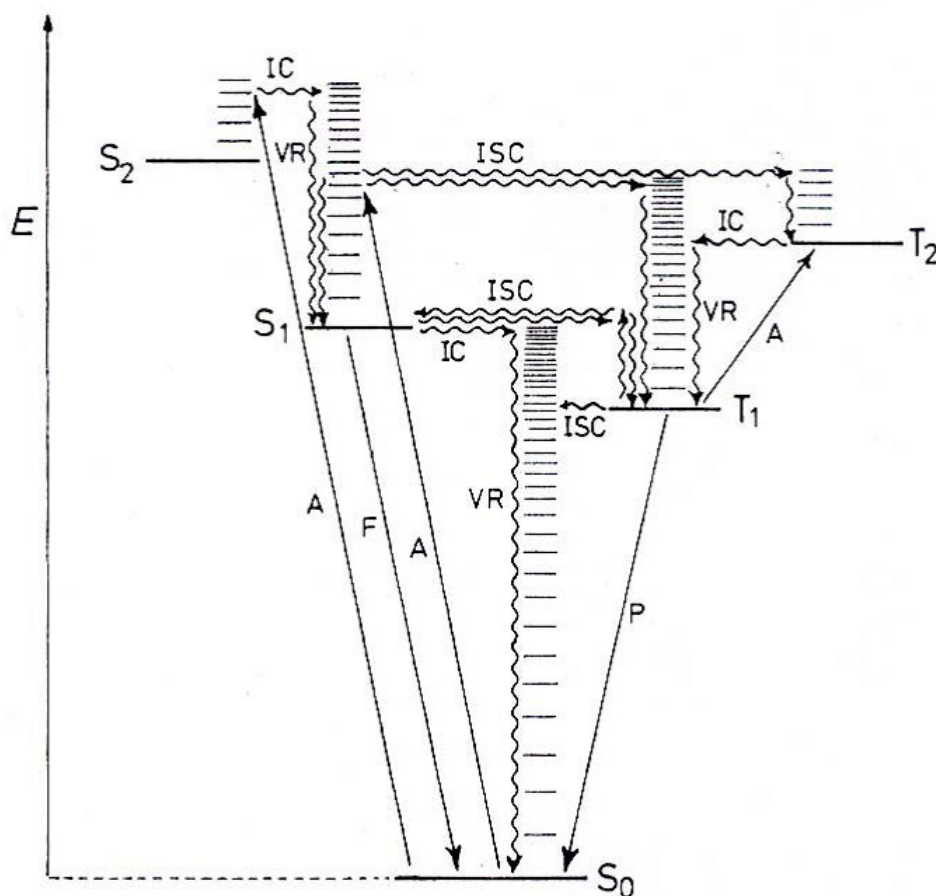


Abbildung 4: Jablonski-Termschema. Absorption (A) und Emissionsprozesse sind mit geraden Pfeilen dargestellt (F = Fluoreszenz, P = Phosphoreszenz); Strahlungslose Prozesse mit gewellten Pfeilen (ISC = *Intersystem crossing*, IC = *Internal conversion*, VR = *Vibrational Relaxation*) (Klessinger & Michl, 1995).

Als Fluorophore bezeichnet man chemische Verbindungen, die nach Aufnahme elektromagnetischer Strahlung diese Energie wieder als Photonen niedrigerer Energie emittieren können. Sie werden typischerweise in zwei Familien eingeteilt. Man unterscheidet zwischen organischen Fluorophoren und biologischen Fluorophoren bzw. fluoreszierenden Proteinen, wie dem *Green Fluorescent Protein* (GFP) (Heim *et al.*, 1995). Das GFP besteht aus 238 Aminosäuren und eignet sich sehr gut zur Untersuchung von *in vivo* Prozessen, da es in nahezu allen eukaryotischen Zellen nicht toxisch wirkt (Tsien, 1998). Neben diesen existiert zudem eine Vielzahl organischer Fluorophore, bestehend aus mehreren aromatischen Systemen bzw. mit mehreren konjugierten π -Bindungen wie z.B. Xanthen-, Diazo-, Oxazin-, Dansyl-, Fluorescein- und Naphthalimid-Derivaten. Letztere zeichnen sich durch ihre enorme Stabilität und Lichtbeständigkeit aus und werden beispielsweise als Anionensensoren (Veale *et al.* 2009) und als Färbemittel (Lucifer yellow) für Neuronen genutzt (Abbildung 5) (Stewart, 1981).

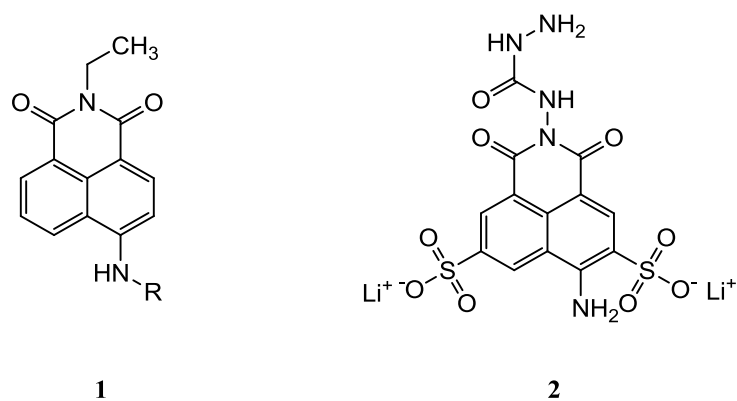


Abbildung 5: Strukturformeln des Naphthalimid Anionensensors 1 und des Färbemittels Lucifer yellow (2).

Auch in der Aminosäureanalytik kommen organische fluoreszierende Farbstoffe zum Einsatz. Beispielsweise werden Dansyl- **3** sowie Fluorescein-Isothiocyanat-Derivate **4** verwendet, da sie mit Aminogruppen reagieren und stabile Produkte bilden (Abbildung 6) (Haugland, 2002; Hauck, 2007).

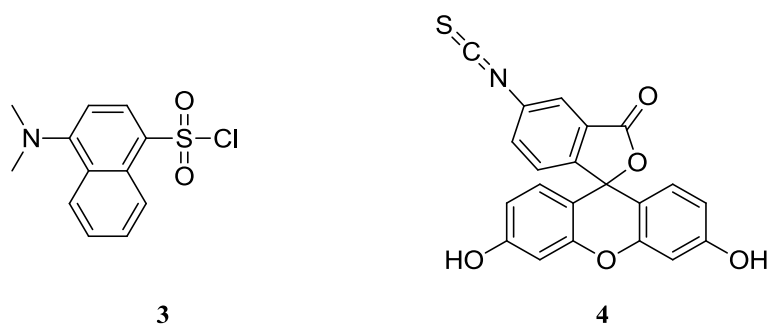


Abbildung 6: Strukturformel von den Dansyl-Derivaten 3 und Fluorescein-Isocyanat-Derivaten 4.

Kommt es dabei zu einer Abschwächung der Fluoreszenz, so spricht man von einer Fluoreszenzlöschung bzw. *Quenching*, z.B. durch Komplex-Bildung, interne Konversion und Energie-Übertragung auf andere Moleküle, sogenannte *Quencher* (Klessinger & Michl, 1995). Die Wechselwirkung zwischen einem Radikal mit der π -Bindung eines fluoreszierenden Moleküls, beispielsweise eines fluoreszierenden Nitrons, kann zu einer Veränderung der elektronischen Struktur des Fluorophors führen, wodurch ein Zusammenbruch der Fluoreszenz beobachtet werden kann (Hauck, 2007).

1.4 Nitronen und Spin-Traps

Als Nitronen werden Verbindungen bezeichnet, deren funktionelle Gruppe ein *N*-Oxid eines Imins ist. Deren Synthese erfolgt meist über eine Kondensationsreaktion von Carbonylen mit *N*-monosubstituierten Hydroxylaminen (Matsuo *et al.*, 2001), oder über die Oxidation von cyclischen sowie aliphatischen sekundären Aminen und Hydroxylaminen mit Metalloxiden, Perwolframaten oder Oxaziridin-Salzen (Grigor'ev, 2008) (Abbildung 7).

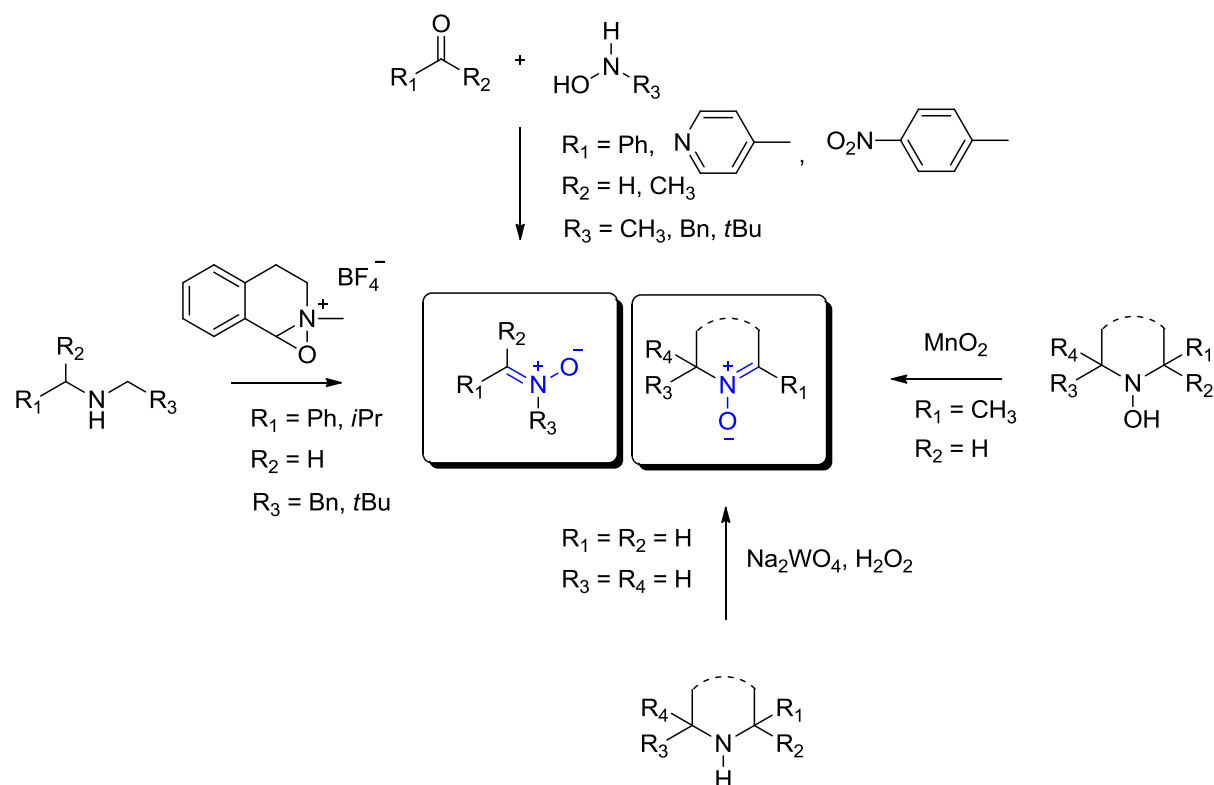


Abbildung 7: Beispiele für die Darstellungsmöglichkeiten von Nitronen (nach Karbach (2014)).

Nitronen sind vielseitig einsetzbare Zwischenprodukte in der organischen Synthese und werden beispielsweise für die stereoselektive Synthese von Isoxazolidinen (Dugovič *et al.*, 2003), zur Synthese von β -Lactamen (Kinugasa & Hashimoto, 1972), sowie als Substrate in der radikalischen Polymerisation (Sciannamea *et al.*, 2005) eingesetzt.

Neben ihrer Vielseitigkeit in der organischen Chemie, kommen Nitronen auch bei biologischen, medizinischen sowie biochemischen Fragestellungen zum Einsatz. Eine Problemstellung ist hierbei der Nachweis freier Radikale in biologischen Systemen mit Hilfe der ESR-Spektroskopie. Direkte Messungen solcher Radikale, z.B. Hydroxyl- und Superoxidanionradikale, sind jedoch, auf Grund ihrer geringen Lebensdauer (10^{-9} - 10^{-6} s), sehr schwierig. Um nun die Detektion freier Radikale zu ermöglichen, werden *spin trapping* Experimente durchgeführt (vgl. Kap. 1.1.3) (Buettner, 1987). Bei dieser Technik werden

Moleküle mit einer Nitron-Funktion, wie z.B. Phenyl-*N-tert*-butylnitron (**5**) (PBN), 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-*N*-oxid (**6**) (DMPO) oder 5-*tert*-Butoxycarbonyl-5-methyl-pyrrolin-*N*-oxid (**7**) (Abbildung 8), als sogenannte Spin-Traps (Spin-Fallen) eingesetzt (Buettner, 1987; Halpern *et al.*, 1995; Mitchell *et al.*, 2013). Hierbei reagieren die Nitronne mit den kurzlebigen Radikalen unter Ausbildung langlebiger (im Bereich mehrerer Minuten), persistenter Radikale (Abbildung 9) (Janzen, 1971; Hauck, 2007; Han *et al.*, 2008).

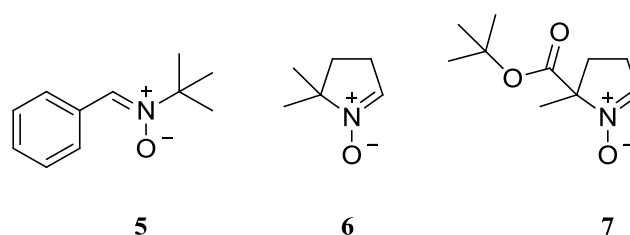


Abbildung 8: Strukturformeln der Spin-Traps PBN (**5**), DMPO (**6**) und BMPO (**7**).

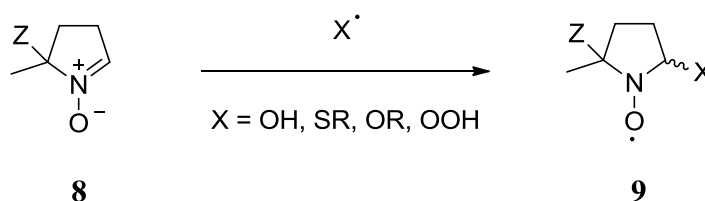


Abbildung 9: Reaktion einer cyclischen Spin-Trap **8** mit einem Radikal zu einem Spinaddukt **9** (Han *et al.*, 2008).

Die gebildeten Addukte **9** führen zu einer erheblichen Steigerung der Lebensdauer der Radikale, wodurch erst ESR-spektroskopische Untersuchungen ermöglicht werden (Mason & Kadiiska, 2005). Neben dem Einsatz cyclischer *Spin-Traps* können auch fluoreszierende Nitronne für *spin trapping* Experimente verwendet werden (Pou *et al.*, 1993). Nach Addition eines Radikals an die π -Bindung des Nitrons kann es zum Zusammenbruch der Fluoreszenz bei gleichzeitiger ESR-Aktivität kommen (Abbildung 10) (Pou *et al.*, 1995; Hauck, 2007). Der Nachweis von Radikalspezies, insbesondere der ROS, mit fluoreszierenden Nitronen kann dabei die Vorteile des Spin-Trappings mit denen der konfokalen *Laser-Scanning-Mikroskopie* kombinieren. Die eingefangenen Radikal-Spezies können somit, zum einen mit Hilfe der ESR-Spektroskopie charakterisiert und zum anderen ihre Entstehungsorte durch die konfokalen *Laser-Scanning-Mikroskopie* subzellulär lokalisiert werden (Hauck, 2007; Karbach *et al.*, 2014).

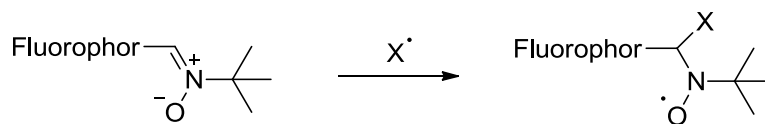


Abbildung 10: Beispielreaktion einer fluoreszierenden *Spin-Trap* mit einem Radikal (X•) zu einem ESR-aktiven Spinaddukt unter Zusammenbruch der Fluoreszenz.

Auf Grund ihrer *spin trapping* Fähigkeiten und antioxidativen Eigenschaften wird Nitronen auch in der Entwicklung von Therapeutika, besonders gegen oxidativen Stress, zunehmend Beachtung geschenkt. Es konnte im Tiermodell bereits beobachtet werden, dass Nitronen, wie z.B. PBN **5**, durch Modulation antioxidativer Enzyme und anschließender Hemmung der Mitochondrien-abhängigen Apoptosekaskade, Endothelzellen einen Schutz gegenüber oxidativem Stress verleihen (Das *et al.*, 2012). In weiteren Tiermodellen konnte die neuroprotektive Wirkung von Nitronen gegen Hirnischämie sowie die Verringerung altersbedingter Protein-Oxidation festgestellt werden (Dhainaut *et al.*, 2000). Darüberhinaus werden Nitronen auch antiinflammatorische Eigenschaften zugesprochen, da ihre inhibierende Wirkung gegen die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und gegen die induzierbare Cyclooxygenase (COX2), zwei Entzündungsfaktoren, nachgewiesen werden konnte (Kotake *et al.*, 1998; Floyd *et al.*, 1999; Sang *et al.*, 1999; Pogrebniak *et al.*, 1992; Carney & Floyd, 1996).

Auch stabilen Nitroxid-Radikalen wird eine antioxidative Wirkung zugeschrieben. So konnte in zahlreichen Studien ein Schutz gegen oxidative Schäden festgestellt werden (Krishna *et al.*, 1998).

2 Stand der Forschung und Aufgabenstellung

Da reaktive Sauerstoffspezies auch bei einer Vielzahl von Krankheiten eine Rolle spielen, ist deren Nachweis ein wichtiger Schritt zum Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen und ist somit letztlich der erste von vielen Schritten zum Ermöglichen einer Therapie, die an den Ursachen angreift, und nicht nur Symptome therapiert (Hauck, 2007). Hierbei stellt die Möglichkeit der Kombination von der ESR-Spektroskopie, für den Nachweis von kurzlebigen Radikalen und der ortsauflösenden konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskopie, eine wichtige Methode zum Verständnis vieler physiologischer Vorgänge dar. Bereits zu Beginn der 1960er Jahre schlugen Janzen, Cox und Gerlock vor, Nitrone zur Detektion kurzlebiger Radikale zu nutzen. Dazu verwendeten sie das Phenyl-*N-tert*-butylnitron (**5**) (Janzen & Blackburn, 1968). Später erfolgte auch der Einsatz cyclischer Nitrone durch Janzen und Liu (Janzen *et al.*, 1996). Likhtenshtein und Hideg hatten dann die Idee, ein Fluorophor mit einer Nitron-Gruppe zu verbinden, wobei diese erst nach der Reduktion in biologischen Systemen beginnen sollten zu fluoreszieren (Bystryak *et al.*, 1986). Hierzu wurden fluoreszierende Pyrroline verwendet, welche durch Singulett-Sauerstoff oxidiert werden konnten (Kálai *et al.*, 1998).

Die Fluoreszenzmikroskopie, insbesondere die konfokale *Laser-Scanning*-Mikroskopie, bietet, wie bereits oben beschrieben, genau diese Eigenschaft. So ist es möglich Zellen in sehr hoher Auflösung dreidimensional abzubilden, wodurch prinzipiell auch die Entstehungsorte von Radikalen nachgewiesen werden können, sofern eine geeignete fluoreszierende Verbindung zur Reaktion mit den Radikalen zur Verfügung steht (siehe Abbildung 10).

Hauck gelang vor einigen Jahren die Darstellung und erste Anwendung eines Nitrons **10** mit einer *p*-Nitrostilben-Einheit als Fluorophor, welches sich spezifisch in Mitochondrien akkumuliert (Abbildung 11) (Hauck *et al.*, 2009;).

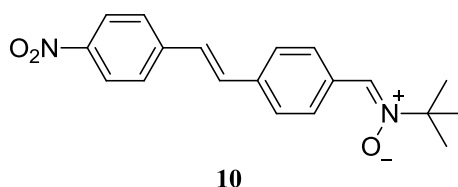


Abbildung 11: Struktur des *p*-Nitrostilbennitrons (10**).**

In meinen früheren Arbeiten wurde ein Nitron **11** mit einer 4-Pyrrolidin-Naphthalimid-Einheit als Fluorophor synthetisiert, wodurch das Absorptionsmaximum, verglichen mit dem des *p*-Nitrostilbennitrons (**10**), bathochrom verschoben wird und somit bei höheren Wellenlängen

des sichtbaren Spektralbereichs auftritt, wodurch Messungen an einem, derzeit konventionellen *Laser-Scanning*-Mikroskop ermöglicht wurden und Störungen, der, im ultravioletten Bereich des Spektrums absorbierenden Zellbestandteile, bei den Untersuchungen vermieden werden konnten (Abbildung 12) (Hauck *et al.*, 2012, Karbach *et al.*, 2014).

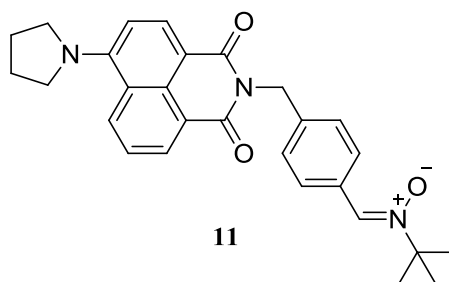


Abbildung 12: Struktur des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl-*N*-*tert*-butylnitrons (11).

Durch die Reaktion des *p*-Nitrostilbennitrons (10) und des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl-*N*-*tert*-butylnitrons (PNIMP-Nitron) (11) mit einem kurzlebigen Radikal gelang es, die ROS in den Zellen nachzuweisen. Bei beiden Verbindungen wurde, unter Bildung von Nitroxid-Radikalen (vgl. Abbildung 11), eine Löschung der Fluoreszenz beobachtet (Hauck *et al.*, 2009; Hauck *et al.*, 2012). Da das von mir bereits synthetisierte 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl-*N*-*tert*-butylnitron (11) nach Radikalaufnahme eine vorübergehende alternierende Fluoreszenz bzw. Fluoreszenz-Löschung zeigte, sollte untersucht werden, ob die Veränderung des delokalisierten π -Elektronensystems eine dauerhafte Löschung der Fluoreszenz bzw. andere Fluoreszenz-Quench-Eigenschaften liefert. In Kooperation mit A. Karbach und T. Stemler wurde 2012 daher eine Synthese zum 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl-*N*-*tert*-butylnitron (PNIPN 34) entwickelt und durchgeführt, welches im Vergleich mit dem PNIMP-Nitron 11 eine verkürzte, komplett konjugierte Variante darstellt. Der Fokus dieser Arbeit lag somit, unter anderem auf der Reproduktion der ersten Versuche zur PNIPN-Synthese, sowie der Optimierung der Reaktionsbedingungen und Steigerung der Ausbeuten.

Zusätzliche Ziele dieser Arbeit waren die Synthese und die Anwendung weiterer neuartiger fluoreszierender Nitronen. Dabei sollten Nitronen basierend auf der 4-Pyrrolidin-naphthalimid-Einheit als Fluorophor synthetisiert werden, darunter ein α -Methyl substituiertes Nitron 21, zur Stabilisierung des entsprechenden Spinaddukts. Wie bereits in Kap. 1.4 beschrieben, werden häufig cyclische Nitronen als *spin traps* eingesetzt. Dazu sollte ein cyclisches Nitron

24, ausgehend von einem Piperazin-Derivat synthetisiert werden. Des Weiteren sollte ein Nitron **29** mit einem geringeren Abstand zwischen Nitron-Funktion und fluoreszierendem Grundkörper **13** synthetisiert werden, um zusätzlich zu überprüfen, ob es zu einer Änderung des *Quench*-Verhaltens kommt. Die synthetisierten Nitrone sollten anschließend auf ihre Fluoreszenz- und *spin trapping*-Eigenschaften hin untersucht werden.

Des Weiteren sollten mit allen synthetisierten Nitronen *in vitro* Fluoreszenz-*Quenching*-Experimente mittels konfokaler *Laser-Scanning*-Mikroskopie durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob ebenfalls das, zuvor erwähnte, Phänomen der alternierenden Fluoreszenz-Löschung auftritt und zur Klärung deren Akkumulationsverhaltens innerhalb der Zelle.

Für die Darstellung der fluoreszierenden Nitrone wurden folgende Synthesewege vorgeschlagen (Abbildung 13).

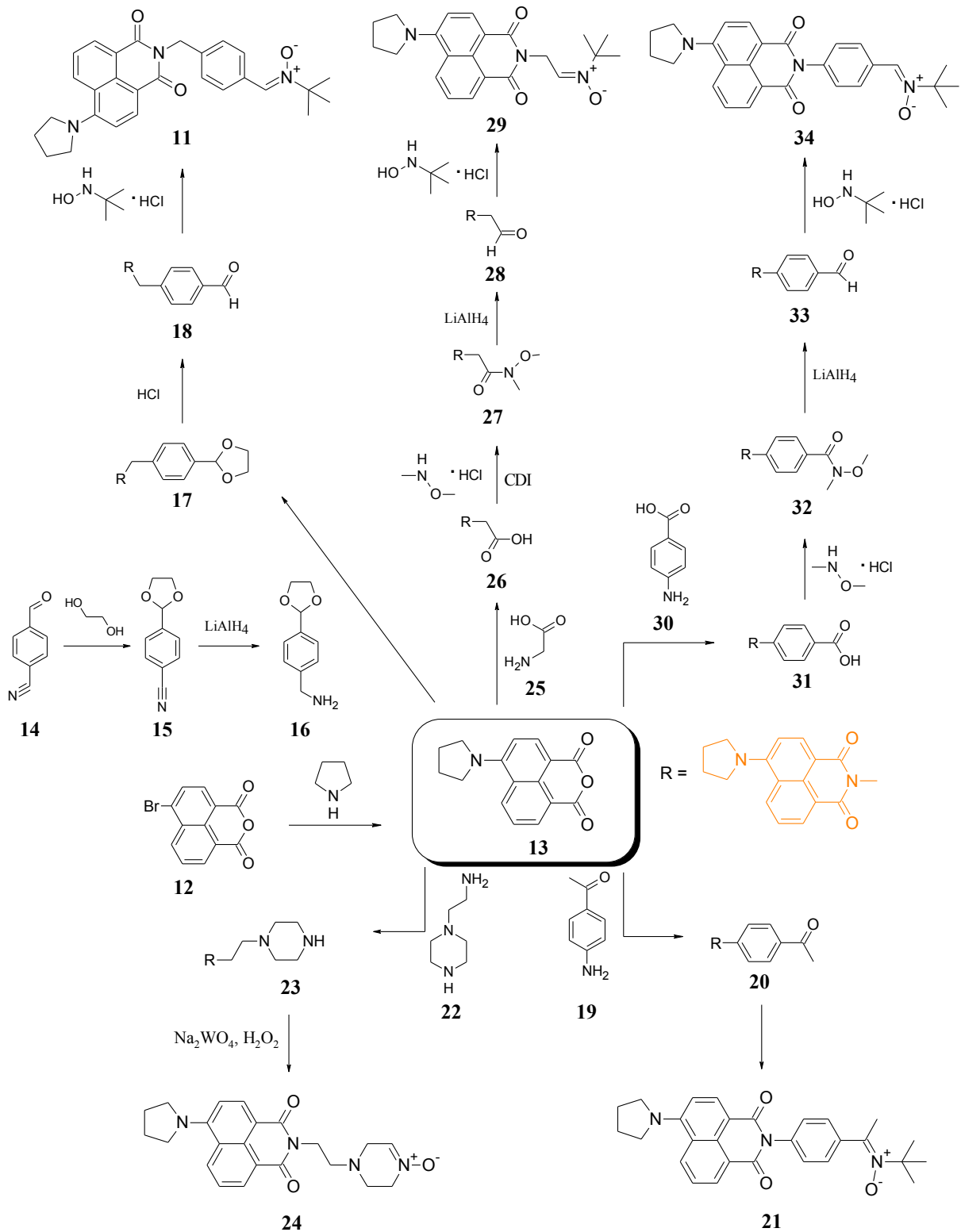


Abbildung 13: Syntheserouten der fluoreszierenden Nitrone PNIMPN (11), PNIPMN (21), PNIEPO (24), PNIMN (29) und PNIPN (34).

3 Eigene Ergebnisse und Diskussion

Die folgenden Arbeiten wurden in Kooperation mit A. Karbach und T. Stemler, TU Kaiserslautern, durchgeführt. Die Messungen am konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop wurden am Universitätsklinikum Homburg im Arbeitskreis Lipp vorgenommen. Die ESR-spektroskopischen Untersuchungen wurden, angelehnt an den Arbeiten von F. Leinisch und S. Hauck, TU Kaiserslautern, durchgeführt.

3.1 Synthetische Arbeiten

3.1.1 Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl-*N-tert*-butylnitrons (11)

3.1.1.1 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (13)

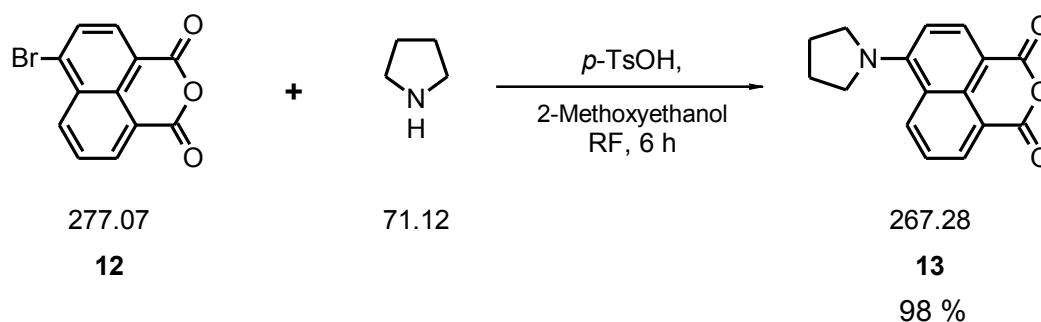


Abbildung 14: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (13).

Für die Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (13) wurde 4-Brom-1,8-naphthalsäureanhydrid (12) mit dem 2-fachen molaren Überschuss an Pyrrolidin und katalytischen Mengen *p*-Toluolsulfonsäure in 2-Methoxyethanol umgesetzt. Nach anschließender Umkristallisation aus *n*-Hexan konnte 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (13) als orangefarbener kristalliner Feststoff isoliert werden (Abbildung 14).

Die Synthese des orangefarbenen Fluorophors 13 erfolgte gemäß einer nukleophilen Substitution am Aromaten, katalysiert durch *p*-Toluolsulfonsäure und unter HBr-Abspaltung als Triebkraft. Der kristalline Feststoff 13 wurde in einer Ausbeute von 98 % erhalten und für alle nachfolgenden Synthesen als fluoreszierender Grundkörper eingesetzt. Die Ausbeute des Fluorophors 13 konnte dabei, im Vergleich zu bisherigen Versuchen, erheblich verbessert werden.

3.1.1.2 Synthese von 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)benzonitril (15)

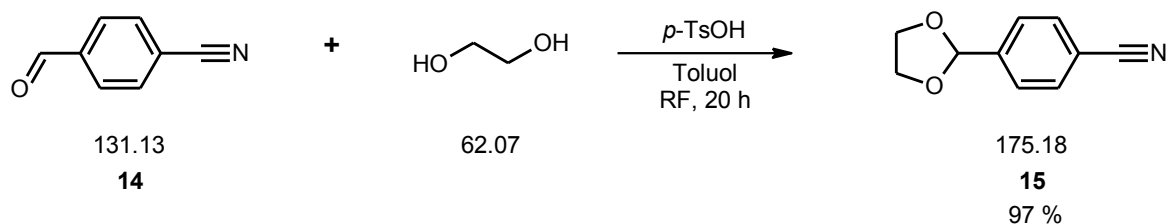


Abbildung 15: Darstellung von 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)benzonitril (15).

Als Kopplungsmolekül für das Anhydrid (13) benötigt man ein Amin (16), welches über die Zwischenstufe des geschützten Aldehyds (15) erhalten wurde. Man muss die Aldehydgruppe schützen, da die im nächsten Schritt folgende Reduktion des Nitrils zum Amin auch den Aldehyd zum Alkohol reduzieren würde. Die Einführung der Schutzgruppe, sowie die anschließende Reduktion des Nitrils, wurde analog einer bereits bekannten Arbeitsvorschrift durchgeführt (Ouari *et al.*, 1998).

Zur Synthese von 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)benzonitril (15) wurde 4-Cyanobenzaldehyd (14) in Toluol gelöst und anschließend mit Ethylenglykol im 4-fachen Überschuss und *p*-Toluolsulfonsäure, als Katalysator, zur Reaktion gebracht. Die in der Literatur beschriebene Reaktionszeit von 9 h wurde auf 20 h verlängert, mit anschließendem Rühren bei Raumtemperatur für weitere 20 h. Nach Aufarbeitung mit Natriumbicarbonat-Lösung und Kristallisation aus *n*-Hexan, erhält man einen weißen, kristallinen Feststoff 15 in einer Ausbeute von 97 % (Abbildung 15).

3.1.1.3 Synthese von 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)benzylamin (16)

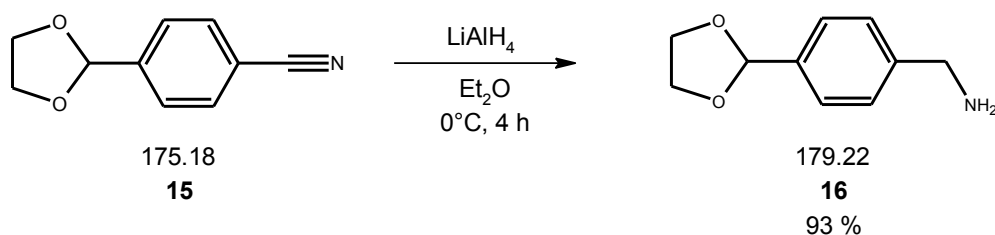


Abbildung 16: Darstellung von 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)benzylamin (16).

Die Umsetzung von 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)benzonitril (15) in trockenem Diethylether erfolgte unter Argonatmosphäre. Hierbei wurde Verbindung 15 zu einer mäßig rührenden Suspension von Lithiumaluminiumhydrid vorsichtig bei 0 °C zu getropft, da die Reaktion stark exotherm verläuft. Nach der Reaktionszeit von 4 h bei 0 °C, wurde bei Raumtemperatur für 18 h nachgerührt. Nach Hydrolyse des überschüssigen LiAlH₄ mit wässriger Ethanol-

Lösung und Extraktion der lyophilisierten wässrigen Phase, konnte Verbindung **16** als gelblich-weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 93 % isoliert werden.

3.1.1.4 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylbenzylacetal (**17**)

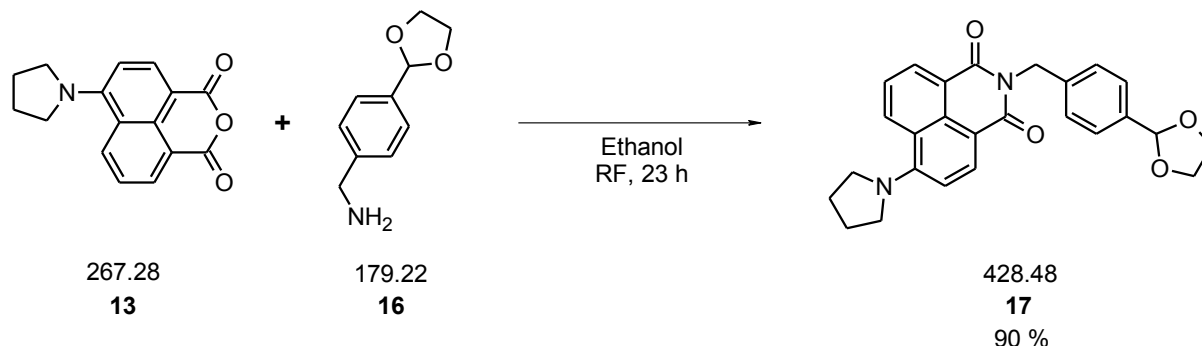


Abbildung 17: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzylacetal (**17**).

Zur Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzylacetal (**17**) wurden 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (**13**) und im 1,5-fachen Überschuss 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)benzylamin (**16**) in Ethanol 23 h unter Rückfluss erhitzt. Verbindung **17** erhielt man als orangefarbenen Feststoff mit einer Ausbeute von 90 %.

Diese Kopplung (Kondensationsreaktion) verläuft, im Gegensatz zu den später geschriebenen Imid-Bildungen, ohne Zugabe von Zinkacetat als Katalysator. Primäre Amine, und vor allem das hier eingesetzte 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)benzylamin (**16**), sind in der Regel Anhydriden gegenüber sehr affin. Die elektronenziehende Acetal-Funktion in *para*-Position, in Verbindung mit der Methylene-Gruppe an der Amin-Funktion, bewirkt eine Steigerung der Reaktivität, für einen nukleophilen Angriff, der Amino-Gruppe, gegenüber der Carbonyl-Gruppe des Anhydrids.

3.1.1.5 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylbenzaldehyd (**18**)

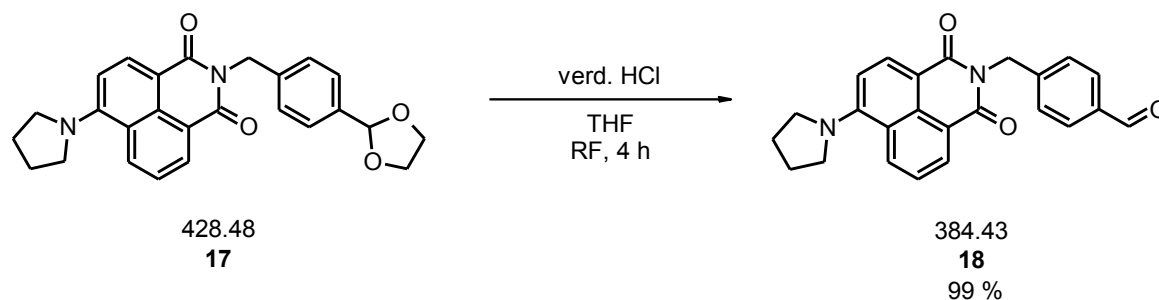


Abbildung 18: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzaldehyd (**18**).

Als nächster Schritt wurde die säurekatalytische Abspaltung der Schutzgruppe durchgeführt. Hierzu versetzte man 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzylacetal (**18**) in THF mit 3%iger Salzsäure und erhitzte für 4 h unter Rückfluss. Mit Triethylamin wurde das Reaktionsgemisch neutralisiert. Verbindung **18** wurde als leuchtend orangefarbener Feststoff mit einer Ausbeute von 99 %, erhalten.

3.1.1.6 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl-*N-tert*-butylnitron

(**11**)

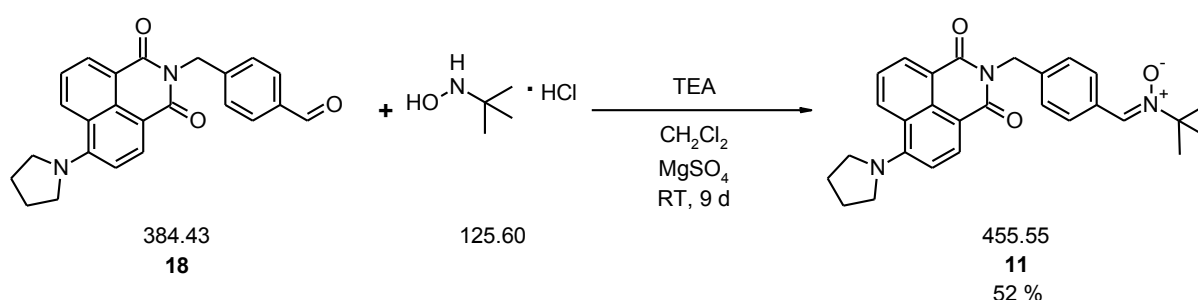


Abbildung 19: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl-*N-tert*-butylnitron (**11**).

Für die Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl-*N-tert*-butylnitron (**11**) wurde 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylbenzaldehyd (**18**) mit dem 2-fachen molaren Überschuss an *N-tert*-Butylhydroxylamin Hydrochlorid und einem 2,2-fachen molaren Überschuss an Triethylamin in Methylenechlorid umgesetzt. Das Reaktionsgemisch wird über 9 d bei Raumtemperatur gerührt. Dabei ist ein Farbumschlag von gelb nach grün zu beobachten. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte ein leuchtend gelber Feststoff **11** in einer Ausbeute von 52 % isoliert werden (Abbildung 35).

Die Imidbildung verläuft gemäß einer Kondensationsreaktion unter basischen Bedingungen, nach nukleophilem Angriff des Stickstoffatoms des freien Hydroxylamins am Carbonyl-Kohlenstoffatom von **18**. In einer, mit Imin/Enaminbildung vergleichbaren Reaktion, kommt es zur Kondensation unter Ausbildung einer Doppelbindung. Das dabei gebildete Wasser, wird mittels Magnesiumsulfat der Reaktion entzogen, um das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite des Produktes **11** zu verschieben.

Die spektroskopischen Daten zeigten, dass das Nitron **11** rein dargestellt und für die nachfolgenden ESR- und Fluoreszenz-spektroskopischen- sowie *in vitro* Untersuchungen eingesetzt werden konnte. Zur Darstellung von **11** wurde, im Gegensatz zu bereits früher durchgeführten Synthese, eine Methode in Methylenechlorid und Triethylamin, über die Dauer

von 9 Tagen, gewählt. Diese Methode wurde bei der Synthese von Nitron **34** das erste Mal erfolgreich eingesetzt. Dadurch konnte auch bei dieser Synthese eine Verbesserung der Ausbeute erreicht werden. Das Triethylamin dient zur Aktivierung und zur Neutralisation des Hydroxylamins. Durch den Einsatz von Magnesiumsulfat wird das entstehende Wasser gebunden, wodurch sich das Gleichgewicht der Reaktion auf die Produktseite verschiebt. Diese Methode lieferte, im Vergleich mit säurekatalysierten, azeotropen Destillation aus Toluol (Hauck, 2007) die besten Ausbeuten und wurde daher als generelle Methode zur Synthese von Nitronen im Arbeitskreis etabliert.

3.1.2 Vorversuche zur Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl-*N*-*tert*-butylnitrons (**34**)

Um die Reaktivität der Anilin-Derivate mit den 1,8-Naphthalsäureanhydrid-Derivaten zu testen, wurden Vorversuche durchgeführt, die nachfolgend beschrieben sind.

3.1.2.1 Synthese von 1,8-Naphthalimidophenyl-Derivaten

3.1.2.1.1 Synthese von 1,8-Naphthalimidobenzol (**44**)

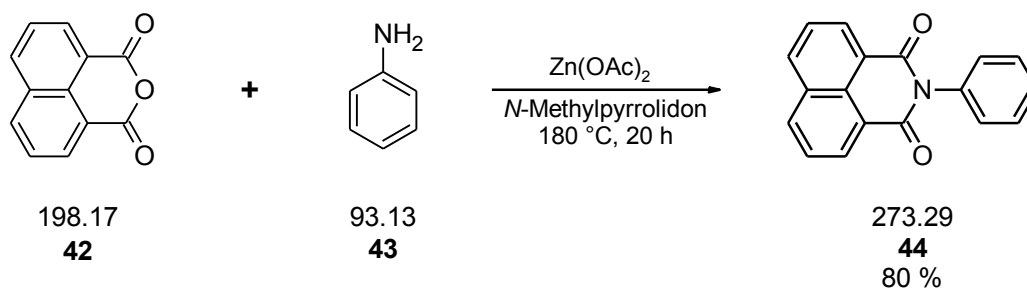


Abbildung 20: Darstellung von 1,8-Naphthalimidobenzol (**44**).

Die Synthese von 1,8-Naphthalimidobenzol (**44**) wurde nach Pschirer *et al.* durchgeführt. Dafür wurden 1,8-Naphthalsäureanhydrid (**42**) mit dem 4-fachen molaren Überschuss an Anilin (**43**) und Zinkacetat mit NMP als Lösungsmittel umgesetzt. Nach wässrig-saurer Aufarbeitung wurde 1,8-Naphthalimidobenzol (**44**) als beigefarbener Feststoff in einer Ausbeute von 80 % erhalten (Abbildung 20).

Um zu testen, ob die Imid-Bildung zwischen dem Anhydrid (**42**) und Anilin (**43**) durchführbar ist, wurde 1,8-Naphthalimidobenzol (**44**) über eine Kondensationsreaktion synthetisiert. Bei ähnlichen Kopplungsversuchen mit Derivaten von **42** und **43** diente diese Reaktion als Referenz (vgl. Kap. 3.1.3.2.3, 3.1.3.3.2, 3.1.3.4.1). Das, in den Reaktionen verwendete Zinkacetat fungiert als Katalysator, indem es als weiche Lewis-Säure an den

Carbonyl-Sauerstoff des Anhydrids koordiniert und somit Elektronendichte aus dem System zieht, wodurch der nukleophile Angriff des aromatischenamins erleichtert wird (Pschirer *et al.*, 2008).

3.1.2.1.2 Synthese von 1,8-Naphthalimidobenzoessäure (45)

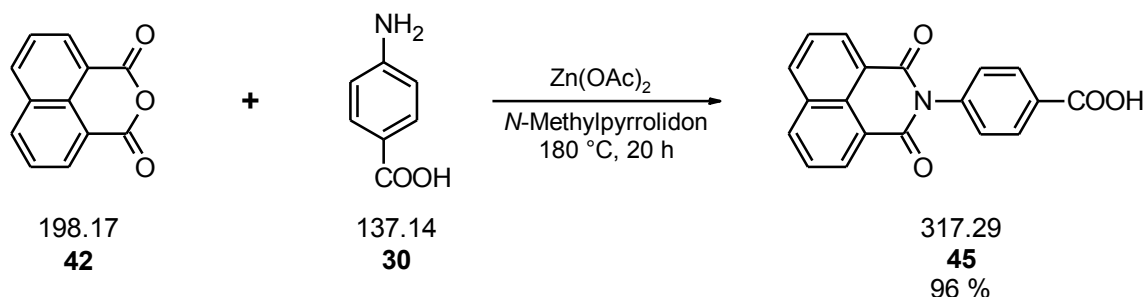


Abbildung 21: Darstellung von 1,8-Naphthalimidobenzoessäure (45).

Zur Synthese von 1,8-Naphthalimidobenzoessäure (45) wurde, wie in Kap. 3.1.2.1.1 beschrieben, 1,8-Naphthalsäureanhydrid (42) mit dem 4-fachen Überschuss an 4-Aminobenzoessäure (30) und wasserfreiem Zinkacetat in *N*-Methylpyrrolidon umgesetzt. Nach wässrig-saurer Aufarbeitung konnte 1,8-Naphthalimidobenzoessäure (45) als grauer Feststoff in einer Ausbeute von 96 % isoliert werden (Abbildung 21).

3.1.2.1.3 Synthese von 1,8-Naphthalimidobenzoessäure-*N*-methoxy-*N*-methyramid (47)

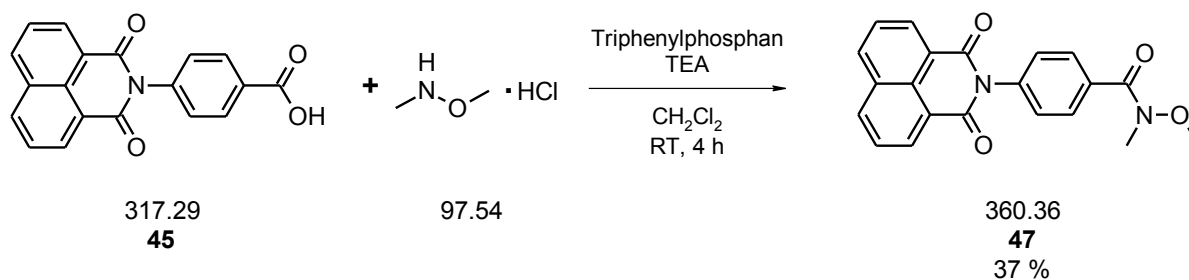


Abbildung 22: Darstellung von 1,8-Naphthalimidobenzoessäure-*N*-methoxy-*N*-methyramid (47).

Zur Synthese von 1,8-Naphthalimidobenzoessäure-*N*-methoxy-*N*-methyramid (47) wurde 1,8-Naphthalimidobenzoessäure (45) mit dem 2-fachen Überschuss an Triphenylphosphan, Trichloracetonitril, sowie *N,O*-Dimethylhydroxylamin und dem 4-fachen Überschuss an Triethylamin in Methylenechlorid umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde Verbindung 37 als brauner Feststoff in einer Ausbeute von 37 % isoliert (Abbildung 22).

3.1.2.1.4 Synthese von 1,8-Naphthalimidobenzaldehyd (48)

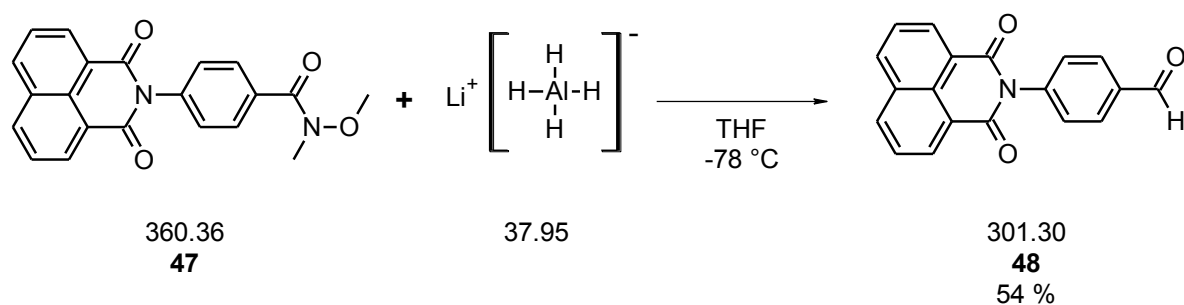


Abbildung 23: Darstellung von 1,8-Naphthalimidobenzaldehyd (48)

Um zunächst einmal die Durchführbarkeit der Reduktion eines Weinreb-Amids, ohne den Einsatz des Fluorophors, zu testen, wurde nach Nahm und Weinreb 1,8-Naphthalimido-*N*-methoxy-*N*-methylamid (47) bei -78 °C mit dem 2-fachen Überschuss an Lithiumaluminiumhydrid in Tetrahydrofuran umgesetzt. Nach Fällungsreaktion mit Bisulfit und Extraktion der organischen Phase wurde 1,8-Naphthalimidobenzaldehyd (48) als blass gelber Feststoff in einer Ausbeute von 54 % erhalten (Abbildung 23) (Nahm & Weinreb, 1981).

3.1.2.2 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzol (46)

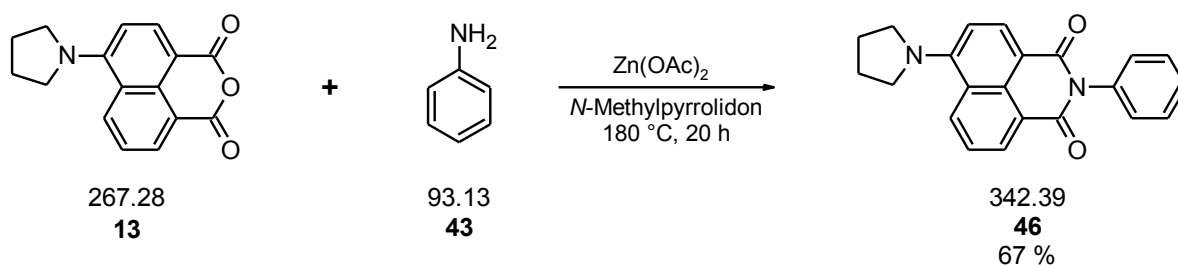


Abbildung 24: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzol (46).

Um nun die Reaktionsfähigkeit des Fluorophors (13), gegenüber Anilin-Derivaten zu testen, wurde ebenfalls nach Pschirer *et al.* folgende Reaktion durchgeführt. Zur Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzol (46) wurde 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (13) mit dem 4-fachen molaren Überschuss an Anilin (43) und Zinkacetat mit NMP als Lösungsmittel versetzt. Nach wässrig-saurer Aufarbeitung wurde 1,8-Naphthalimidobenzol (46) als rot-brauner Feststoff in einer Ausbeute von 67 % isoliert (Abbildung 24).

3.1.3 Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl-*N*-*tert*-butylnitrons (34)

3.1.3.1 Übersicht der durchgeführten Synthesewege

Die Ergebnisse aus den Vorversuchen zeigten, dass eine Kopplung des Fluorophors (**13**) mit Anilin-Derivaten möglich ist. Zur Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl-*N*-*tert*-butylnitrons (**34**), wurden daraufhin 4 Wege getestet. Dabei stellte sich heraus, dass nur ein Syntheseweg (Weg D) zum gewünschten Produkt führte (Abbildung 25).

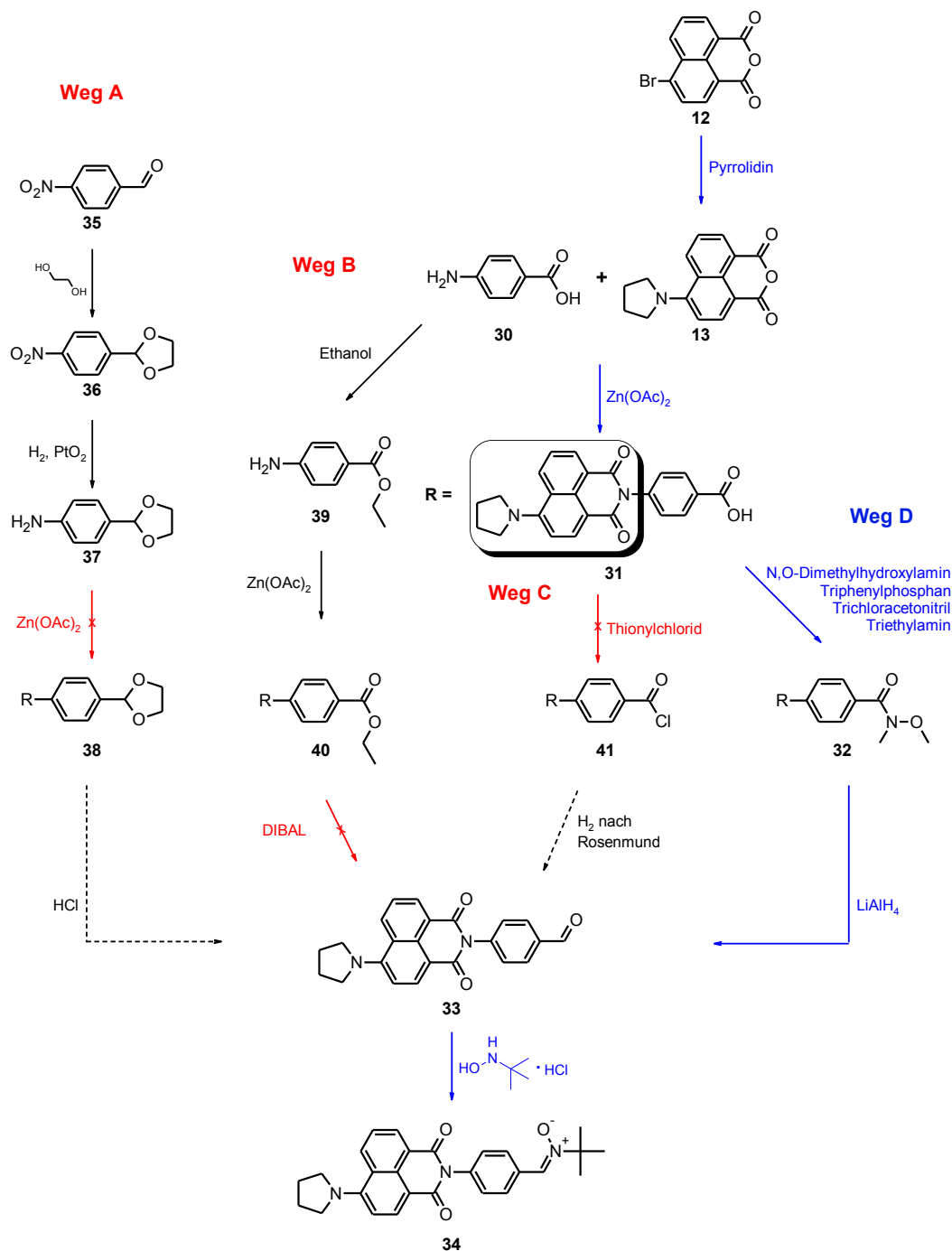


Abbildung 25: Synthesewege zur Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl-*N*-*tert*-butylnitron (**34**).

3.1.3.2 Syntheseweg A zur Darstellung von PNIPN (34)

3.1.3.2.1 Synthese von 2-(4-Nitrophenyl)-1,3-dioxolan (36)

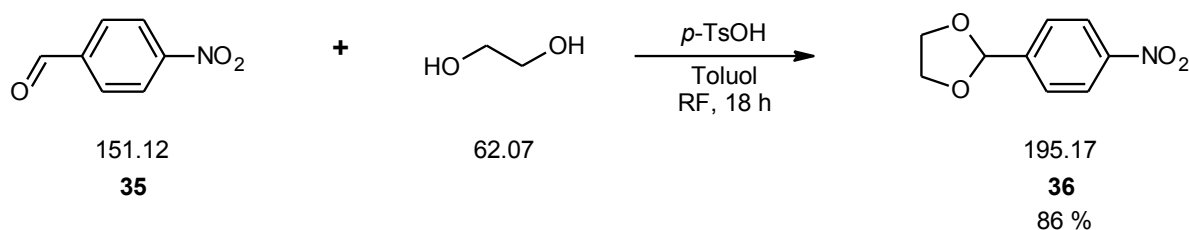


Abbildung 26: Darstellung von 2-(4-Nitrophenyl)-1,3-dioxolan (36).

Wie bereits bei der Synthese von PNIMP (11), muss auch hier der Aldehyd, vor der katalytischen Hydrierung im nächsten Schritt, über eine säurekatalysierte Acetalbildung, geschützt werden. Dazu wurde *p*-Nitrobenzaldehyd (35) mit einem vierfachen Überschuss an Ethylenglykol und *p*-Toluolsulfonsäure als Katalysator umgesetzt. Als Lösungsmittel dieser Reaktion diente Toluol. Nach anschließender Umkristallisation aus *n*-Hexan konnte Verbindung 36 als weißer kristalliner Feststoff in Ausbeute von 86 % erhalten werden (Abbildung 26).

3.1.3.2.2 Synthese von 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)anilin (37)

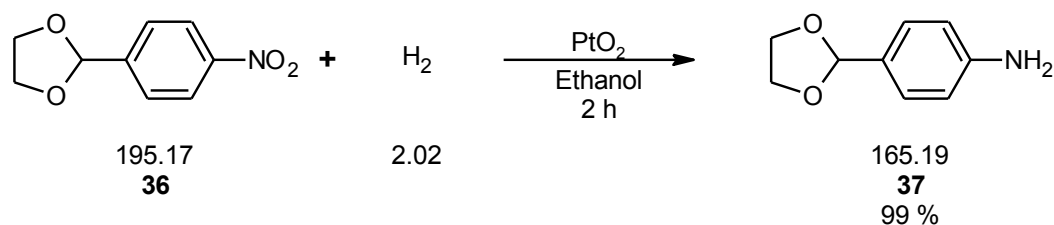


Abbildung 27: Darstellung von 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)anilin (37).

In ein Reaktionsgemisch aus 2-(4-Nitrophenyl)-1,3-dioxolan 36, einer katalytischen Menge PtO₂ und Natriumhydrogencarbonat in Ethanol, wurde Wasserstoff eingeleitet. Nach dem Abfiltrieren des Katalysators konnte Verbindung 37 als farbloses Öl, in einer Ausbeute von 99 % erhalten werden (Abbildung 27).

Wie bereits in Kap. 3.1.3.2.1 erwähnt, muss die Aldehydfunktion vor der Durchführung der Hydrierung geschützt werden, da diese heterogen, katalysierte Hydrierung der Nitrogruppe an Platin(IV)oxid (Adams Hydrierkatalysator) zum Amin, auch die Aldehydfunktion zum entsprechenden Alkohol reduzieren kann.

4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)anilin (**37**) ist instabil, wodurch es allmählich zur Schutzgruppenabspaltung und somit zu einer intramolekularen Polymerisation unter Schiffbasenausbildung gekommen ist. Diese konnte weder durch das Arbeiten unter Luft- und Wasserausschluss, noch durch das Lagern in der Kälte vermieden werden, weshalb das die Verbindung sofort weiter umgesetzt wurde. Beide Schritte wurden in Anlehnung an bereits bekannte Synthesevorschriften durchgeführt. Die ^1H -spektroskopischen Untersuchungen von Verbindung **37** ergaben zeitlich zunehmende Signale der korrespondierenden Schiffischen Base.

3.1.3.2.3 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenylacetal (**38**)

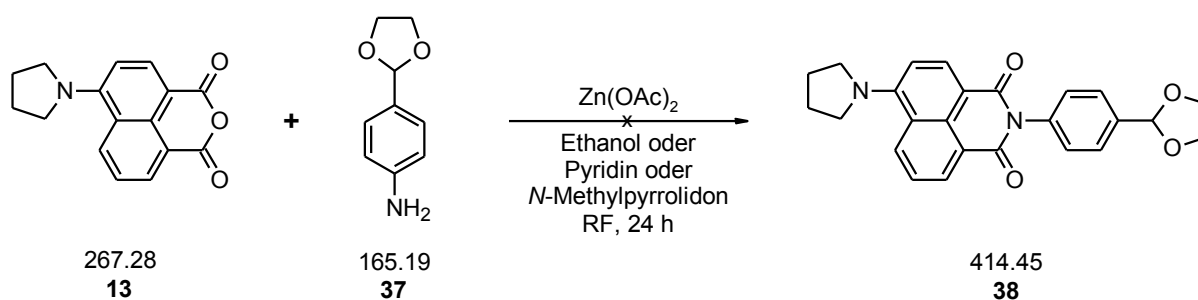


Abbildung 28: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenylacetal (38**).**

Zur Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenylacetal (**38**) wurde 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (**13**) mit dem zweifachen molaren Überschuss an 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)anilin (**37**) unter verschiedenen Reaktionsbedingungen umgesetzt. Als Lösungsmittel wurde zunächst N-Methylpyrrolidon verwendet. Eine äquimolare Menge an $\text{Zn}(\text{OAc})_2$, fungiert dabei als Lewis-Säure. Das Reaktionsgemisch wird für 24 h auf 180°C erhitzt (Pschirer *et al.*, 2008). Auf diese Weise konnte kein gewünschtes Produkt **38** isoliert werden. In zwei weiteren Versuchen wurden Ethanol (siehe Kap. 3.1.1.4) und Pyridin als Solventien getestet. Auch hier entstand jeweils ein brauner Feststoff der filtriert und mit kaltem Ethanol und Wasser gewaschen wurde. Dabei handelte es sich nicht um die gewünschte Verbindung **38**.

In einer Kondensationsreaktion sollte das orangefarbene Anhydrid **13** mit 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)anilin (**37**) unter Ausbildung eine Imid-Bindung gekoppelt werden. Vergleicht man diese Reaktion mit der Imid-Bildung von **17** (Kap. 3.1.1.4), so lässt sich daraus schließen, dass die Aminfunktion von **37** ausschlaggebend dafür ist, dass die Reaktion nicht mit dem erwarteten Ergebnis verlaufen ist. Auf Grund von hier nicht aufgeführten Testreaktionen ist jedoch bekannt, dass Aniline mit dem Anhydrid **13** bei den obigen

Bedingungen reagieren können. Die para-ständige Acetalschutzgruppe mit ihrem leichten +I-Effekt sollte zudem den nukleophilen Angriff des primärenamins begünstigen bzw. zumindest nicht behindern. Eine Erklärung für das Ergebnis, kann eine spontane Eduktpolymerisation von **37** sein. Vergleicht man hierzu wiederum 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)benzylamin (**16**) mit 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)anilin (**37**), so kann man erkennen, dass eine Polymerisation von **37** unter Schiffbasenbildung zu einer Vergrößerung des aromatischen Systems führt. Eine vollständige Autopolymerisation scheint u.a. auch wegen der $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Signale am wahrscheinlichsten.

3.1.3.3 Syntheseweg B zur Darstellung von PNIPN (**34**)

3.1.3.3.1 Synthese von 4-Aminobenzoesäureethylester (**19**)

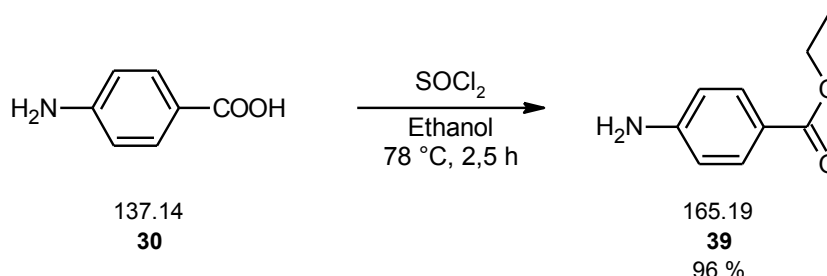


Abbildung 29: Darstellung von 4-Aminobenzoesäureethylester (**39**)

Nach Hosangadi wurde zu einer Lösung von 4-Aminobenzoesäure (**30**) in Ethanol unter Eiskühlung Thionylchlorid tropfenweise zugegeben und anschließend für 2.5 h refluxiert. Das überschüssige Thionylchlorid und Ethanol wurde abdestilliert und nach Neutralisation, Extraktion und wässriger Aufarbeitung konnte Verbindung **39** als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 96 % isoliert werden (Hosangadi & Dave, 1996).

Bei dieser effizienten Methode der säurekatalysierten Veresterung aromatischer, substituierter Carbonsäuren **30**, blieb die Aminofunktion der 4-Aminobenzoesäure (**30**) unbeeinflusst. Die $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Untersuchungen ergaben, dass 4-Aminobenzoesäureethylester (**39**) in ausreichender Reinheit für Folgereaktionen dargestellt werden konnte.

3.1.3.3.2 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoessäureethylester (40)

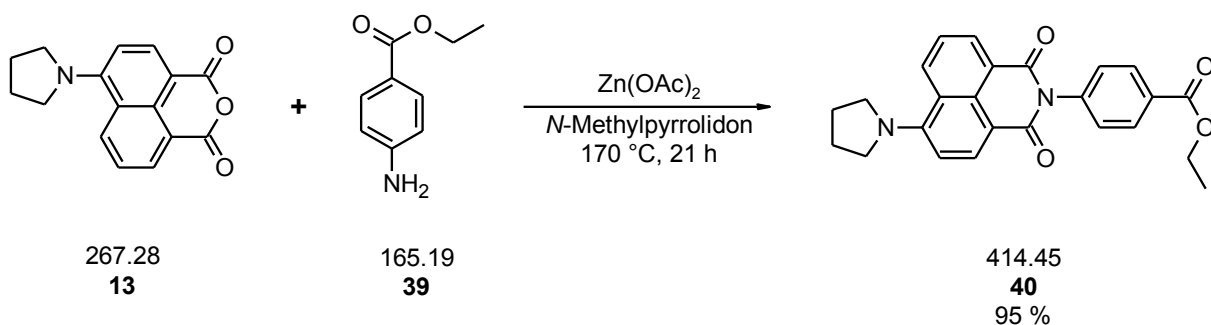


Abbildung 30: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoessäureethylester (**40**).

Die Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoessäureethylester (**40**), wurde nach Pschirer *et al.* durchgeführt. Unter Inertgasatmosphäre wurde wasserfreies Zinkacetat und 4-Aminobenzoessäureethylester (**39**) zu 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (**13**) in trockenem *N*-Methylpyrrolidon als Solvens gegeben. Nach Erhitzen über Nacht folgte eine wässrige Aufarbeitung. Der entstandene orangene Feststoff **40** wurde in einer Ausbeute von 95 % isoliert.

Über eine Kondensationsreaktion konnte 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (**13**) mit 4-Aminobenzoessäureethylester (**40**) unter Ausbildung einer Imid-Bindung gekoppelt werden, wobei Zinkacetat als Katalysator diente (Pschirer *et al.*, 2008). Die spektroskopischen Untersuchungen ergaben, dass 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoessäureethylester (**40**) dargestellt werden konnte.

Von einer weiteren selektiven Reduktion mittels Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL) wurde abgesehen, da sich der entstandene Ester **40** in keinem der gängigen, reduktionsinerten Lösungsmittel löste.

3.1.3.4 Syntheseweg C zur Darstellung von PNIPN (34)

3.1.3.4.1 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäure (31)

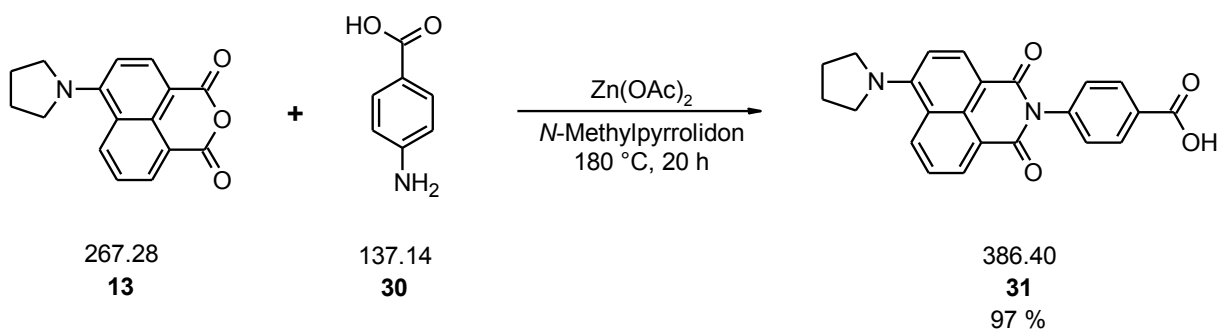


Abbildung 31: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäure (31).

Für die Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäure (31) wurde 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalensäureanhydrid (13) mit dem 4-fachen molaren Überschuss an *p*-Aminobenzoesäure (30) und dem 4,75-fachen molaren Überschuss an wasserfreiem Zinkacetat in *N*-Methylpyrrolidon umgesetzt. Nach Aufarbeitung und Umkristallisation aus Ethanol konnte ein orangefarbener Feststoff 31 in einer Ausbeute von 97 % isoliert werden (Abbildung 31).

Die Kopplungsreaktion zwischen dem fluoreszierenden Grundkörper 13 und *p*-Aminobenzoesäure (30) erfolgt über den nukleophilen Angriff des Amins 30 am Carbonyl-C-Atom des Anhydrids 13. Das verwendete Zinkacetat diente dabei als Katalysator. (Pschirer *et al.*, 2008). Nach Koordination dieser weichen Lewis-Säure an das Carbonyl-Sauerstoffatom zieht es Elektronendichte aus dem System, wodurch der Amin-Angriff von 30 erleichtert und die Knüpfung der Imid-Bindung erst ermöglicht wird. Die analytischen Daten ergaben, dass das Produkt 31 für die nachfolgende Reaktion ohne weitere Aufreinigung eingesetzt werden konnte.

3.1.3.4.2 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäurechlorid (41)

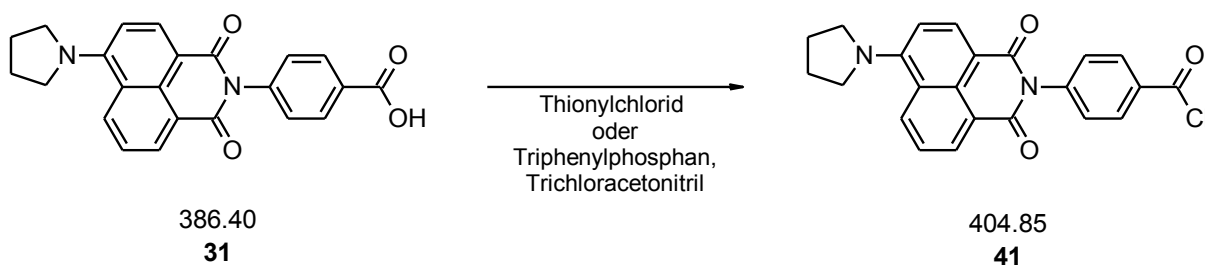


Abbildung 32: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäurechlorid (41).

Zur Darstellung von Verbindung **41**, wurden 2 Wege getestet. Zum einen wurde 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäure (**31**) mit dem 2-fachen Überschuss an Triphenylphosphan und Trichloracetonitril in Methylenchlorid umgesetzt (Kim & Jang, 2010). Zum anderen wurde die Verbindung **31** als Suspension in einem 20-fachen Überschuss an Thionylchlorid unter Rückfluss erhitzt und anschließend überschüssiges Thionylchlorid destillativ entfernt. Die ¹H-NMR-spektroskopischen Untersuchungen ergaben, dass bei beiden Versuchen das gewünschte 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäurechlorid (**41**) nicht dargestellt werden konnte.

Für die selektive Reduktion von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäure (**31**) zu 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzaldehyd (**33**) nach Rosenmund, sollte zunächst das entsprechende Säurechlorid **41** dargestellt werden. Dazu wurde die Carbonsäure **31** nach einer gängigen Methode mit Thionylchlorid umgesetzt. Die analytischen Daten zeigten, dass keine Umsetzung erfolgte, worauf andere Reaktionsbedingungen verwendet wurden, bei denen das Edukt **31** eine etwas bessere Löslichkeit aufwies. In Methylenchlorid wurde 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäure (**31**) mit Trichloracetonitril, durch *in situ* gebildetes Triphenylphosphoniumchlorid, zur Reaktion gebracht. Nach wässriger Aufarbeitung und spektroskopischer Analyse wurde auch hier festgestellt, dass 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäurechlorid (**41**) nicht dargestellt werden konnte und sich somit dieser Weg C zur Synthese des gewünschten 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzaldehyd (**33**) nicht eignete.

Da die aufgezeigten Wege zur direkten Reduktion der Carbonsäure **31**, mittels DIBAL oder nach Rosenmund, auch auf Grund der schlechten Löslichkeit in den gängigen reduktionsinerten Lösungsmitteln, nicht möglich war, wurde eine weniger selektive Variante (vgl. Kap. 3.1.3.5.1) durchgeführt.

3.1.3.5 Syntheseweg D zur Darstellung von PNIPN (34)

3.1.3.5.1 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäure-*N*-methoxy-*N*-methylamid (32)

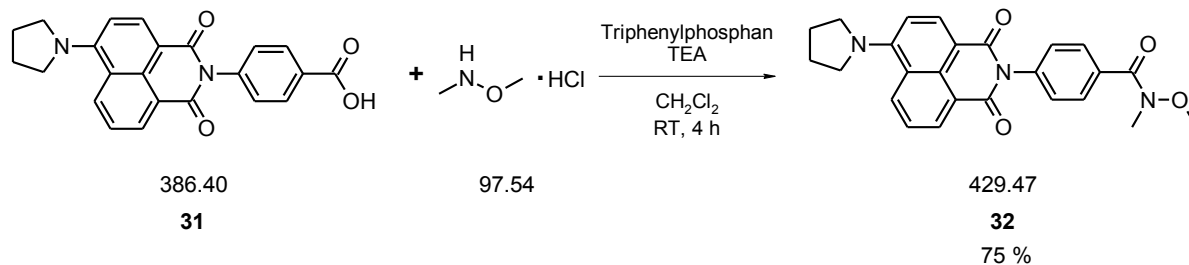


Abbildung 33: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäure-*N*-methoxy-*N*-methylamid (32).

Nach Kim und Jang wurde für die Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäure-*N*-methoxy-*N*-methylamid (32), 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäure (31) mit dem 2-fachen molaren Überschuss an Triphenylphosphan, dem 2-fachen molaren Überschuss an Trichloracetonitril, *N,O*-Dimethylhydroxylamin Hydrochlorid und 4 Äquivalenten Triethylamin in Methylenchlorid umgesetzt. Nach einer Umkristallisation aus Ethanol konnte ein gelber Feststoff 32 in einer Ausbeute von 75 % erhalten werden (Abbildung 33).

Durch die Reaktion von 31 mit Triphenylphosphan und Trichloracetonitril erfolgt zunächst die *in situ* Bildung eines Säurechlorids. Dieses reagiert anschließend mit *N,O*-Dimethylhydroxylamin Hydrochlorid und Triethylamin, wodurch das disubstituierte Säureamid 32 generiert wird.

Um die selektive Reduktion der Carbonsäure 31 zu ermöglichen wurde, auf Grund des zuvor erwähnten Löslichkeitsproblems der 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäure (31) (vgl. Kap. 3.1.3.4.2) die Darstellung der Weinreb-Amid-Zwischenstufe 32 gewählt. Diese Zwischenstufe wies eine erheblich bessere Löslichkeit in Methylenchlorid sowie in Tetrahydrofuran auf und konnte somit problemlos für die nachfolgende Reaktion eingesetzt werden. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass das disubstituierte Säureamid 32, im Vergleich mit den üblicherweise sehr reaktiven Säurechloriden (Rosenmund), sehr stabil ist, wodurch die Isolierung und die anschließende Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid durchgeführt werden konnten.

3.1.3.5.2 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzaldehyd (**33**)

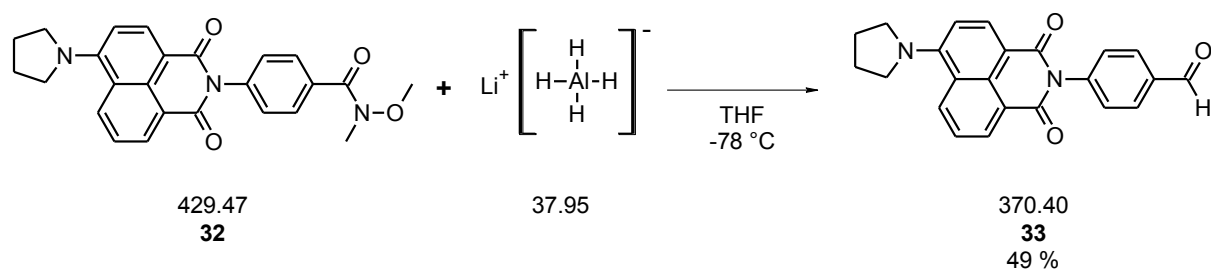


Abbildung 34: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzaldehyd (33**).**

Für die Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzaldehyd (**33**) wurde 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäure-*N*-methoxy-*N*-methylamid (**32**) mit 15-fachen molaren Überschuss an Lithiumaluminiumhydrid in Tetrahydrofuran bei -78 °C umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte ein orange-gelber Feststoff **33** in einer Ausbeute von 49 % isoliert werden (Abbildung 34).

Die Bildung des fluoreszierenden Aldehyds **33** erfolgt durch die teilselektive Reduktion der *N*-Methoxy-*N*-methylamid-Gruppe durch Lithiumaluminiumhydrid, über eine stabile Metall-Chelat-Zwischenstufe und anschließender saurer Aufarbeitung (Nahm & Weinreb, 1981).

Nach der Methode von Nahm und Weinreb konnte **31** über die Amid-Zwischenstufe **32** zur essentiellen Nitron-Vorstufe **33** reduziert werden. Der große Überschuss an LiAlH₄ wurde dabei zur vollständigen Bildung des Metall-Chelat-Komplexes benötigt, wobei die Bildung des korrespondierenden Alkohols kleiner war als erwartet. Nach säulenchromatographischer Abtrennung des Alkohols wurde eine durchaus akzeptable Ausbeute von 49 % erzielt. Um diese weiter zu erhöhen wurden mehrfach der molare Überschuss an LiAlH₄ und die Reaktionszeit variiert. Dabei konnte jedoch die Ausbeute nicht gesteigert werden. Auch das prozentuale Rohproduktverhältnis Aldehyd : Alkohol änderte sich nicht. Die Reinheit des erhaltenen Aldehyds **33** war dennoch ausreichend für die anschließende Nitron-Synthese.

Diese Methode konnte somit als akzeptable Alternative für die Reduktion der Carbonsäure **31** etabliert werden.

3.1.3.5.3 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl-*N*-*tert*-butylnitron (**34**)

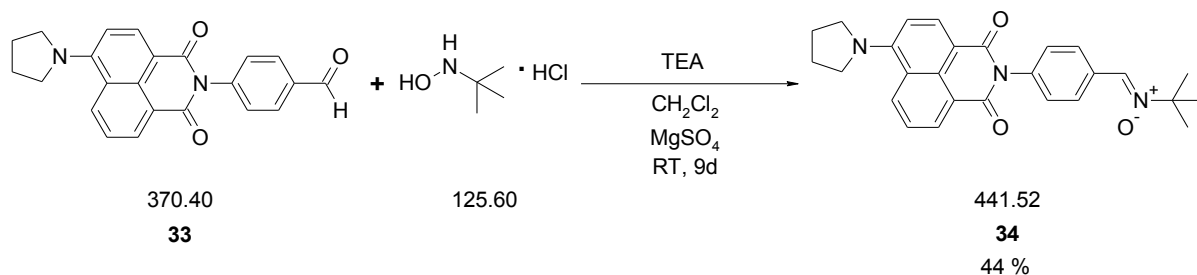


Abbildung 35: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl-*N*-*tert*-butylnitron (**34**).

Für die Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl-*N*-*tert*-butylnitron (**34**) wurde 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzaldehyd (**33**) mit dem 2-fachen molaren Überschuss an *N*-*tert*-Butylhydroxylamin Hydrochlorid und einem 2,2-fachen molaren Überschuss an Triethylamin in Methylenchlorid umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte ein orange-gelber Feststoff **34** in einer Ausbeute von 44 % isoliert werden (Abbildung 35).

Die Imidbildung verläuft gemäß einer Kondensationsreaktion unter basischen Bedingungen, nach nukleophilem Angriff des Stickstoffatoms des freien Hydroxylamins am Carbonyl-Kohlenstoffatom von **33**.

Die spektroskopischen Daten zeigten, dass das Nitron **34** rein dargestellt und für die nachfolgenden ESR- und Fluoreszenz-spektroskopischen- sowie *in vitro* Untersuchungen eingesetzt werden konnte. Zur Darstellung des verkürzten Nitrons **34** wurde, die, bereits in Kap. 3.1.1.6 beschriebene, Methode durchgeführt und als generelle Methode zur Nitronsynthese im Arbeitskreis etabliert.

3.1.3.5.4 Zusammenfassung der durchgeführten Synthesewege

Die Schlüsselverbindung zur Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl-*N*-*tert*-butylnitron (**34**), stellt das 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzaldehyd (**33**) dar. Um dieses Aldehyd zu synthetisieren, wurden die 4 möglichen Synthesewege (A, B, C, D) auf ihre Durchführbarkeit hin getestet (Abbildung 25).

Syntheseweg A

Hierbei wurde versucht, Verbindung **34**, analog zur Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl-*N*-*tert*-butylnitron (**11**), ausgehend von *p*-Nitrobenzaldehyd (**35**) zu synthetisieren (Abbildung 19).

Die Carbonylfunktion ist bereits in der Ausgangsverbindung **35** vorhanden und wurde über eine Acetalbildung vor einer möglichen Autoxidation geschützt. Des Weiteren blieb dadurch diese funktionelle Gruppe auch bei der Reduktion der Nitro- zur Aminogruppe (**36** → **37**) unbeeinflusst. Die anschließenden Versuche zur Kopplung von 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)anilin (**37**) mit dem Fluorophor **13**, führten nicht zu der gewünschten Imid **38**. Stattdessen wurden das nicht umgesetzte Fluorophor **13** und Schiffbasenpolymere des Anilinderivats **37** isoliert (siehe Kap. 3.1.3.2).

Syntheseweg B

Auf diesem Weg sollte nun der gewünschte Aldehyd **33** aus dem korrespondierenden Carbonsäureester **40**, über eine selektive Reduktion durch DIBAL, hergestellt werden. Da sich 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoessäureethylester (**40**), in keinem der gängigen, reduktionsinerten Lösungsmittel löste, wurde davon abgesehen (siehe Kap. 3.1.3.3).

Syntheseweg C

Als nächstes wurde eine selektive Reduktion der Carbonsäure **31** nach Rosenmund in Betracht gezogen. Für die selektive Reduktion von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoessäure (**31**) zu 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzaldehyd (**33**), sollte zunächst das entsprechende Säurechlorid **41** dargestellt werden. Dazu wurde die Carbonsäure **31** mit Thionylchlorid umgesetzt. Dies führte jedoch nicht zum erwünschten Produkt **41**.

Des Weiteren wurde in Methylenchlorid 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoessäure (**31**) mit Trichloracetonitril, durch *in situ* gebildetes Triphenylphosphoniumchlorid, zur Reaktion gebracht, was ebenfalls nicht zum Säurechlorid **41** führte (siehe Kap. 3.1.3.4).

Syntheseweg D

Da die beschriebenen Wege zur direkten Reduktion der Carbonsäure **31**, mittels DIBAL oder nach Rosenmund, auch auf Grund der schlechten Löslichkeit in den gängigen reduktionsinerten Lösungsmitteln, nicht möglich war, wurde eine weniger selektive Variante durchgeführt.

Um die Probleme der Synthesewege B und C zu umgehen, wurde auf die korrespondierende Weinrebverbindung **32** als Zwischenstufe zurückgegriffen. Diese ist in den gängigen organischen Lösungsmitteln weitaus besser löslich als 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoessäureethylester (**40**) oder 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoessäure (**31**). Sie stellt jedoch einen Kompromiss bezüglich der selektiven Reduktion dar, da bei der Reduktion mit

LiAlH₄ der gewünschte Aldehyd **33** weiter zum entsprechenden Alkohol reduziert wurde. 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzaldehyd (**33**) konnte dennoch in einer Ausbeute von 49 % isoliert werden.

3.1.4 Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimido- α -methyl-*N*-*tert*-butylnitrons (**21**)

3.1.4.1 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoacetophenon (**20**)

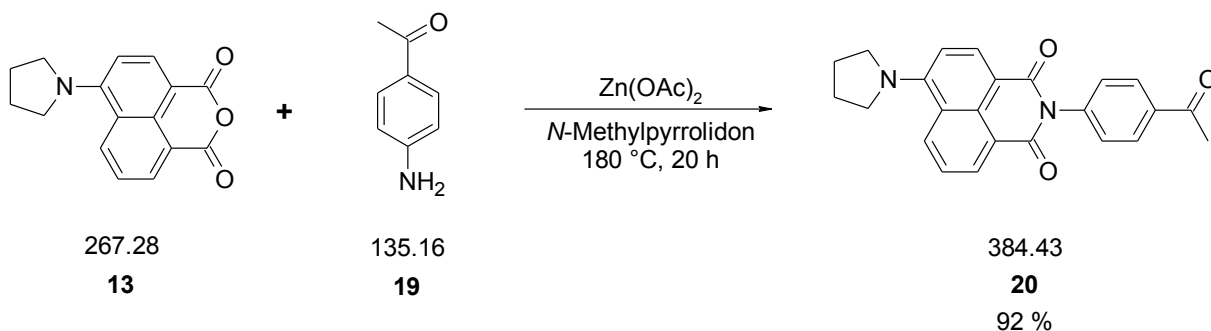


Abbildung 36: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoacetophenon (**20**).

Nach Pschirer *et al.* wurde für die Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoacetophenon (**20**) 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (**13**) mit *p*-Aminoacetophenon (**19**) und wasserfreiem Zinkacetat in *N*-Methylpyrrolidon umgesetzt. Nach Aufarbeitung und Umkristallisation aus Ethanol konnte ein gelber Feststoff **20** in einer Ausbeute von 92 % isoliert werden (Abbildung 36).

Durch eine Kondensationsreaktion konnte der fluoreszierende Grundkörper **13** mit der Aminogruppe von **19** unter Ausbildung einer Imidbindung gebildet werden. Das verwendete Zinkacetat diente auch hier als Katalysator (vgl. Kap. 3.1.3.4.1).

Unter analogen Bedingungen konnte **20**, wie auch schon **31**, in ähnlichen Ausbeuten dargestellt werden. Des Weiteren wurde ebenfalls eine schlechte Löslichkeit in den gängigen reduktionsinerten Lösungsmitteln beobachtet (vgl. Kap. 3.1.3.4.1).

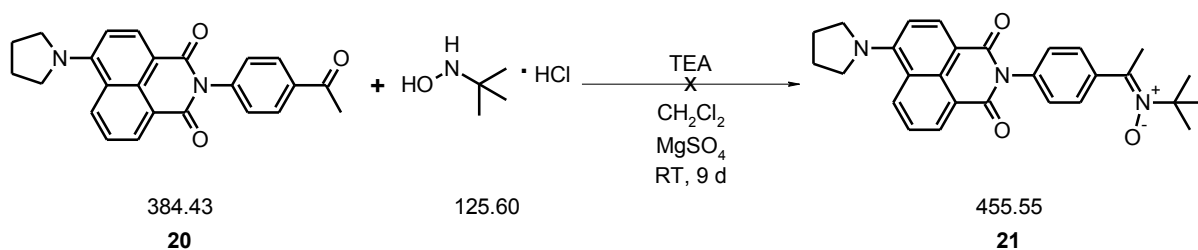
3.1.4.2 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimido- α -methyl-*N*-*tert*-butylnitron (**21**)

Abbildung 37: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl- α -methyl-*N*-*tert*-butylnitron (**21**).

Für die Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl- α -methyl-*N*-*tert*-butylnitron (**21**) wurde 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoacetophenon (**20**) mit dem 2-fachen molaren Überschuss an *N*-*tert*-Butylhydroxylamin Hydrochlorid und einem 2,2-fachen molaren Überschuss an Triethylamin in Methylenchlorid umgesetzt. (Abbildung 37). Dabei sollte gemäß einer Kondensationsreaktion (vgl. Kap. 3.1.1.6 und 3.1.3.5.3), ausgehend von dem fluoreszierenden Keton **20**, die Nitron-Funktion generiert werden. Es wurde jedoch festgestellt, dass das gewünschte Nitron **21** nicht dargestellt werden konnte. Auch nach mehrfachen Variationen der Reaktionsbedingungen konnte das gewünschte Produkt nicht isoliert werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Variierte Reaktionsbedingungen zur Darstellung von Nitron **21**

Variante	Temperatur	Reaktionszeit	Solvent	Katalysator/ Aktivator
A	RT	216 h	CH ₂ Cl ₂	TEA
B	RT	72 h	Ethanol	Na ₂ CO ₃
C	Reflux.	72 h	Ethanol	Na ₂ CO ₃
D	Reflux.	72 h	CH ₂ Cl ₂	TEA
E	Reflux.	20 h	Toluol	<i>p</i> -TsOH
F	Reflux.	20 h	<i>tert</i> -Butanol	-

Da Variante A bereits als erfolgreiche Methode zur Darstellung der Nitron **11** und **34** etabliert werden konnte (vgl. Kap. 3.1.1.6 und 3.1.3.5.3), wurde zunächst diese Methode zur

Darstellung von Nitron **21** gewählt. Da auf diese Weise **21** nicht dargestellt werden konnte, wurden die Reaktionsparameter nach Tabelle 1 (Variante B - F) variiert. Auch unter diesen Bedingungen konnte Nitron **21** nicht isoliert werden. Somit scheint die Ketogruppe für die Kondensationsreaktion nicht ausreichend aktiv zu sein. Der (+)-*I*-Effekt der Methylgruppe beeinflusst möglicherweise die Carbonylaktivität stärker als angenommen. Da Nitron **21** nicht dargestellt werden konnte, konnte daher nicht überprüft werden, ob die Methylgruppe in α -Position zu einer Steigerung der Stabilität des Nitrons und seiner radikalischen Addukte führt.

3.1.5 Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin-*N*-oxid (**24**)

3.1.5.1 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin (**23**)

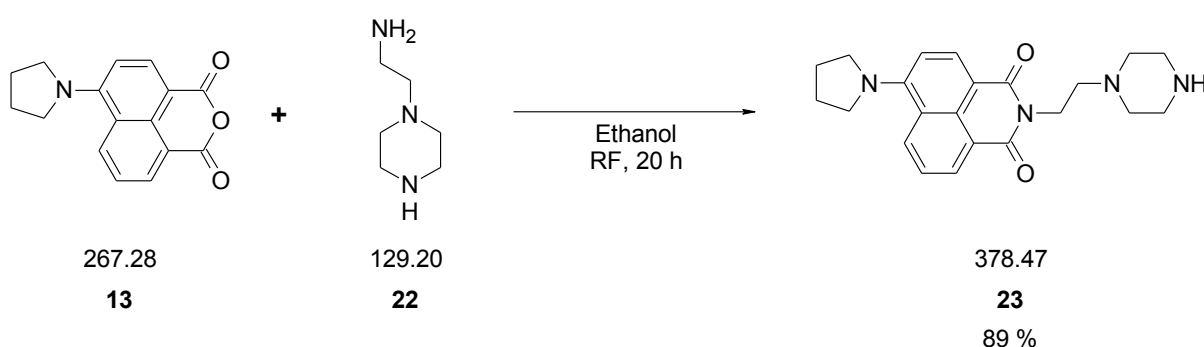


Abbildung 38: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin (**23**).

Für die Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin (**23**), wurde 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (**13**) mit dem 2-fachen molaren Überschuss an Aminoethylpiperazin (**22**) in Ethanol umgesetzt. Nach Umkristallisation aus Toluol konnte ein gelber Feststoff **23** in einer Ausbeute von 89 % erhalten werden (Abbildung 38).

Die Darstellung des fluoreszierenden sekundärenamins **23** verläuft gemäß einer Kondensationsreaktion. Über ein Halbamid und anschließender Abspaltung von Wasser wird die Imid-Bindung generiert.

Das, für die Synthese des cyclischen Nitrons **24** benötigte sekundäre Amin, konnte rein dargestellt werden. Die Ausbeute von **23** konnte dabei nach leichter Erhöhung des molaren Überschusses des Amins **22**, bezüglich vorangegangener Versuche, um ca. 30 % gesteigert werden.

3.1.5.2 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin-*N*-oxid (**24**)

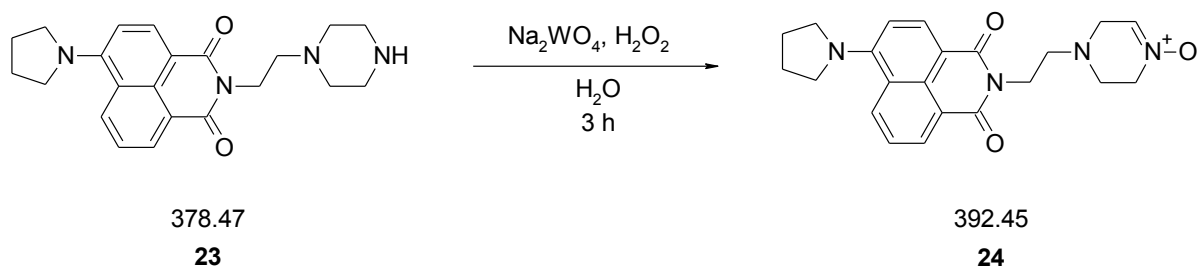


Abbildung 39: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin-*N*-oxid (**24**).

Nach Murahashi wurden zur Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin-*N*-oxid (**24**), 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin (**23**) mit dem 2,2-fachen molaren Überschuss an Wasserstoffperoxid und 0,04 Äquivalenten Natriumwolframat Dihydrat in Wasser umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte ein orangefarbener Feststoff erhalten werden (Abbildung 39) (Murahashi *et al.*, 1998).

Die Oxidation des sekundären Amins **23** zu dem gewünschten *N*-Oxid **24** erfolgt über die Bildung einer katalytischen Perwolframat-Spezies, durch Reaktion des Wasserstoffperoxids mit Natriumwolframat. Dieser Übergangszustand reagiert mit der Amin-Funktion von **23** unter Bildung eines Hydroxylamins ab. Durch erneute Oxidation des zurückgebildeten Wolframats durch H_2O_2 erfolgt dann die Bildung der Nitron-Funktion unter Abspaltung von Wasser (Freysoldt, 2006).

Anhand spektroskopischer Daten wurde festgestellt, dass ein Produkt / Edukt-Gemisch, im Verhältnis 70 : 30 vorlag. Dieser Eduktanteil konnte trotz mehrfach variiertes Säulenchromatographie nicht abgetrennt werden. Um das Gemisch besser trennen zu können sollten daher die verwendeten Bedingungen weiter variiert werden. Das erhaltene Gemisch konnte dennoch für die weiteren Untersuchungen verwendet werden.

3.1.6 Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethyl-*N*-*tert*-butylnitron (29)

3.1.6.1 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoessigsäure (26)

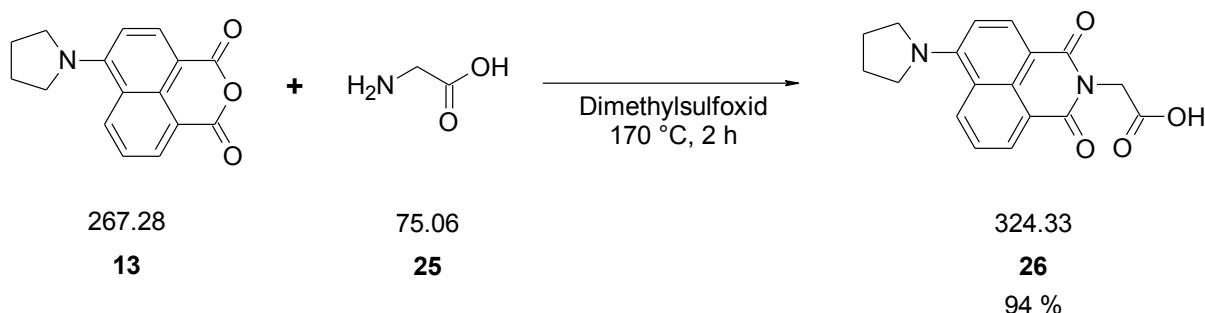


Abbildung 40: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoessigsäure (26).

Nach Donkor wurde für die Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoessigsäure (26), 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (13) mit äquimolaren Mengen an Glycin (25) in Dimethylsulfoxid bei 170 °C umgesetzt. Nach Umkristallisation aus Toluol konnte ein orangefarbener Feststoff 26 in einer Ausbeute von 94 % isoliert werden (Abbildung 40).

Auf Grund von Erfahrungswerten mit Carbonsäure 31 (vgl. Kap. 3.1.3.4.2) wird auch hier von einer Reduktion mit DIBAL oder nach Rosenmund abgesehen und stattdessen die korrespondierende Weinreb-Verbindung 27 hergestellt (vgl. Kap. 3.1.3.5.1). Es musste vorher besonders darauf geachtet werden, die Carbonsäure 26 komplett vom hochsiedenden DMSO zu befreien.

3.1.6.2 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoessigsäure-*N*-methoxy-*N*-methylamid (27)

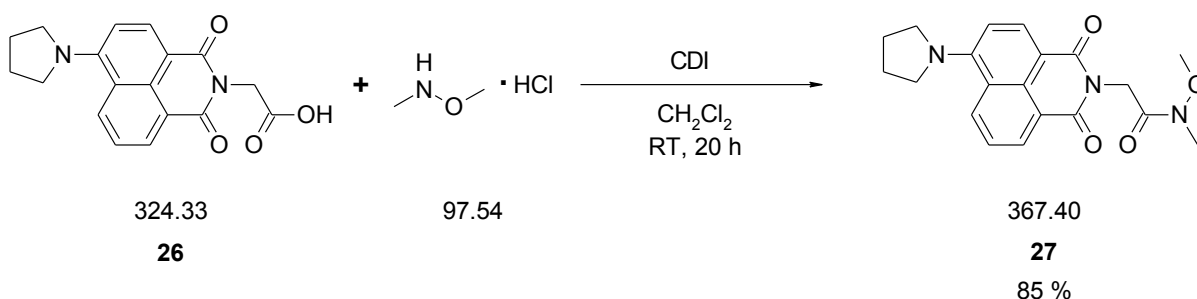


Abbildung 41: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoessigsäure-*N*-methoxy-*N*-methylamid (27).

Nach Gahman wurde zur Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoessigsäure-*N*-methoxy-*N*-methylamid (27), 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoessigsäure (26) mit dem 1,2-fachen molaren Überschuss an 1,1'-Carbonyldiimidazol und dem 1,2-fachen molaren Überschuss an

N,O-Dimethylhydroxylamin Hydrochlorid in Methylenchlorid umgesetzt. Nach einer Umkristallisation aus Toluol wurde ein orangefarbener Feststoff **27** in einer Ausbeute von 85 % erhalten (Abbildung 41).

Zunächst kommt es zur Aktivierung der Carboxylgruppe durch 1,1'-Carbonyldiimidazol. Nach Imidazol-Abspaltung und Eliminierung von CO₂ wird dann ein Acylimidazol gebildet, welches nach Reaktion mit *N,O*-Dimethylhydroxylamin Hydrochlorid und erneuter Abspaltung von Imidazol in das Säureamid **27** übergeht.

Da sich die Reduktion einer Carbonsäure über eine Weinreb-Amid-Zwischenstufe bereits als nützliche Variante erwiesen hat (vgl. Kap. 3.1.3.5.1), wurde diese Methode auch zur Reduktion von **26** genutzt. Die Variante nach Kim und Jang (vgl. Kap. 3.1.3.5.1) lieferte einen unvollständigen Umsatz, weshalb die Carboxylgruppe mittels CDI aktiviert und anschließend mit *N,O*-Dimethylhydroxylamin Hydrochlorid zur Reaktion gebracht wurde. Durch die Variante von Gahman konnte eine Steigerung der Selektivität sowie eine Erhöhung der Ausbeute der Zwischenstufe beobachtet werden (Gahman *et al.*, 2009).

3.1.6.3 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoacetaldehyd (**28**)

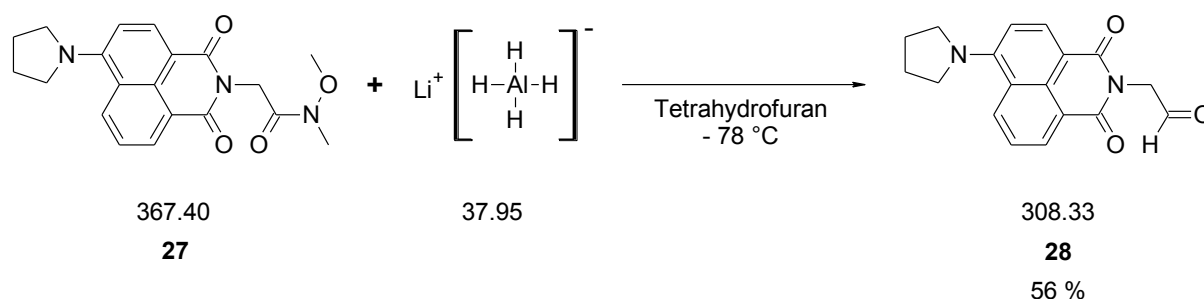


Abbildung 42: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoacetaldehyd (**28**).

Nach Nahm und Weinreb wurde für die Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoacetaldehyd (**28**), 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoessigsäure-*N*-methoxy-*N*-methylamid (**27**) mit Lithiumaluminiumhydrid in Tetrahydrofuran umgesetzt. Nach wässriger Aufarbeitung wurde ein dunkelorange-farbener Feststoff in einer Ausbeute von 56 % erhalten (Abbildung 42).

Die Bildung des fluoreszierenden Aldehyds **28** erfolgt gemäß einer teilselktiven Reduktion der *N*-Methoxy-*N*-methylamid-Gruppe durch Lithiumaluminiumhydrid (vgl. Kap. 3.1.3.5.2).

Analog zur Darstellung von **33** konnte auch bei der Reduktion von **27** die Bildung des korrespondierenden Alkohols sowie nicht umgesetztem Säureamid beobachtet werden.

Mittels Säulenchromatographie konnten diese teilweise abgetrennt werden (vgl. Kap. 3.1.3.5.2). Des Weiteren stellte sich heraus, dass dieser Aldehyd **28** auf der Säule sich zu zersetzen begann. Auch nach mehrfach veränderten Bedingungen konnte dieser, nach säulenchromatographischen Reinigungsschritten, nicht isoliert werden. Das Produkt wurde daher, ohne weitere Aufreinigung, weiter umgesetzt, da die Reinheit dennoch ausreichend war.

3.1.6.4 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethyl-*N-tert*-butylnitron (**29**)

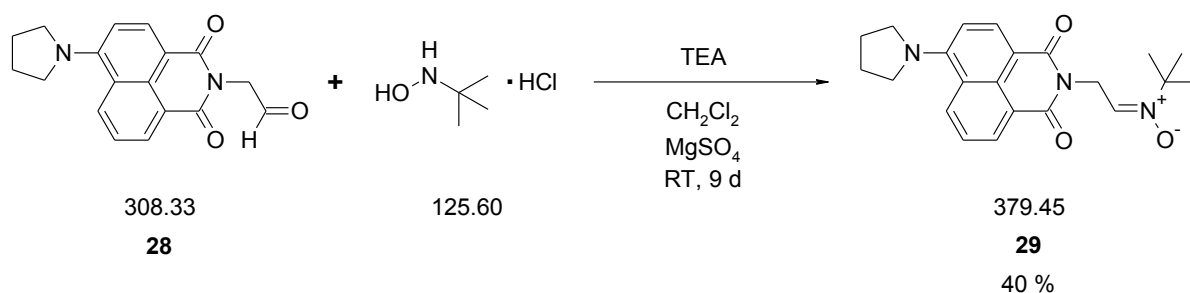


Abbildung 43: Darstellung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethyl-*N-tert*-butylnitron (29**).**

Für die Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethyl-*N-tert*-butylnitron (**29**) wurde 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoacetaldehyd (**28**) mit dem 2-fachen Überschuss an *N-tert*-Butylhydroxylamin Hydrochlorid und einem 2,2 Äquivalenten Triethylamin in Methylenchlorid umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte ein orange-roter Feststoff in einer Ausbeute von 40 % erhalten werden (Abbildung 43).

Die Bildung des Nitrons **29** verläuft gemäß einer Kondensationsreaktion unter basischen Bedingungen (vgl. Kap. 3.1.3.5.3).

Die analytischen und spektroskopischen Daten zeigten, dass das gewünschte Produkt rein dargestellt werden konnte. Für die Synthese von **29** wurde die bereits etablierte Variante gewählt (vgl. Kap. 3.1.3.5.3). Die erfolgreiche Darstellung des PNIM-Nitrons (**29**) ermöglicht nun Vergleichsuntersuchung mit dem PNIP-Nitron (**34**). Besonders interessant ist hierbei der Vergleich der Fluoreszenz-*Quenching*-Eigenschaften von **34** und **29**. Es kann nun überprüft werden, ob der geringere Abstand zwischen Nitron-Funktion und Fluorophor zu einer Beeinflussung des Fluoreszenz-*Quench*-Verhaltens führt. Eine Verschiebung der Absorptions- und Emissionsmaxima, sollte, auf Grund des Fehlens des zweiten π -Elektronensystems, ebenfalls beobachtet werden.

3.1.7 Zusammenfassung der Synthesergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit, konnten 4 neuartige, fluoreszierende Nitronen, auf Naphthalsäureimid-Basis und in ausreichender Reinheit für die weiteren Untersuchungen, synthetisiert werden.

Die Synthese eines Nitrons mit einer α -Methyl-Gruppe, 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl- α -methyl-*N-tert*-butylnitron (**21**), zur Erhöhung der Stabilität, konnte nicht erreicht werden. Mögliche, erfolgreiche Synthesewege, könnte, zum einen, die Umsetzung über eine direkte Oxidation eines sekundären Amins, mit Oxone (Kaliumperoxomonosulfat) sein (Gella *et al.*, 2009). Zum anderen, könnte eine katalytische Oxidation von einem Imin zum Nitron, mittels eines Rhenium-Katalysator-Komplexes (Methylrheniumtrioxid), zum gewünschten Produkt führen (Soldaini *et al.*, 2007).

4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl-*N-tert*-butylnitron (**11**) wurde bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit von mir synthetisiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Ausbeuten der einzelnen Zwischenstufen verbessert werden. Durch die Umstellung auf eine neue Methode, konnte nun auch die Synthese des Nitrons **11** in einer Ausbeute von 52 % und mit einer hohen Reinheitszielt werden. Dabei wurde die bisher durchgeführte säurekatalysierte, azeotrope Destillation aus Toluol (Hauck, 2007), durch eine mildere Variante in Methylenchlorid und Triethylamin bei Raumtemperatur (Karbach *et al.*, 2014), ersetzt (vgl. Kap. 3.1.1.6).

Das, im Gegensatz zum PNIMPN (**11**), mit den beiden direkt verbundenen π -Elektronensystemen, 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl-*N-tert*-butylnitron (**34**), konnte mit einer Ausbeute von 44 % und einer ausreichenden Reinheit hergestellt werden. Dabei wurden verschiedene Vorversuche, bezüglich der Durchführbarkeit und 4 verschiedene Synthesewege durchgeführt, wobei nur der „Syntheseweg D“ letztlich zum erwünschten Produkt führte (siehe Kap. 3.1.2. und 3.1.3). Der entscheidende Schritt bei dieser Synthese, war der Reaktionsweg über ein Weinreb-Amid **32**. Dieses konnte anschließend zum Aldehyd **33** reduziert werden und über die neue Methode zum Nitron weiter umgesetzt werden (vgl. Kap. 3.1.3.5.3). Die Ausbeuten der Zwischenstufen sind geringer bei denen zur Synthese von PNIMPN (**11**). Eine Zusammenfassung der einzelnen Synthesewege ist in Kapitel 3.1.3.5.4 zu lesen.

4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethyl-*N-tert*-butylnitron (**29**) besitzt nur das π -Elektronensystem des Fluorophors **13**, an dem, über eine Methylen-Gruppe, die Nitron-Funktion

gekoppelt ist. Die Ausbeute des letzten Schrittes der Synthese, ist mit 40 % etwas geringer als bei der Synthese von PNIPN (**34**). Die Stufen zum Weinreb-Amid **27** und daraus zum Aldehyd **28**, gelangen mit 85 % bzw. 56 %, in wesentlich besseren Ausbeuten, als die vergleichbaren Stufen bei der Darstellung von PNIPN (**34**) (75 % bzw. 49 %) (vgl. Kap. 3.1.3.5 und 3.1.6).

Das einzige cyclische Nitron, welches innerhalb dieser Arbeit synthetisiert wurde, war das 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin-*N*-oxid (**24**). Es gelang keine vollständige Umsetzung des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazins (**23**) und durch säulenchromatografische Reinigung, konnte trotz variiertes Zusammensetzung der mobilen Phase, keine vollständige Trennung erreicht werden (vgl. Kap. 3.1.5.2). Versuche zur besseren Trennung von Produkt und Edukt, sollten weiterhin versucht werden, auch wenn die Reinheit für die *in vitro* Untersuchungen, ausreichend war.

3.2 ESR-spektroskopische Untersuchungen

Um die synthetisierten Nitron PNIEPO (**24**), PNIMN (**29**) und PNIPN (**34**) auf ihre *spin trapping*-Eigenschaften von Hydroxyl- und Superoxidationradikalen zu untersuchen wurden ESR-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden zunächst Nitron-Lösungen mit einer Konzentration von $c = 1$ mM hergestellt und diese mit unterschiedlichen Parametern vermessen. Die Hydroxyl- und Superoxidationradikale wurden mittels Fenton-Reagenz bzw. aus einem Hypoxanthin/Xanthinoxidase-System generiert, anschließend mit der Nitron-Lösung inkubiert und vermessen (Kuppusamy & Zweier, 1989; Hauck, 2007; Leinisch, 2009). Für die Messungen wurden entgaste und sauerstofffreie Lösungsmittel verwendet. Der Sauerstoff bedingt eine Linienverbreiterung im ESR-Spektrum.

3.2.1 ESR-spektroskopische Untersuchungen des PNIP-Nitron (**34**)

Die radikalischen Spin-Addukte der synthetisierten Nitron wurden mit Hilfe der radikalerzeugenden Systeme (vgl. Kap. 3.2) generiert. Für die 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl-*N-tert*-butylnitron-Spin-Addukte werden folgende Strukturformeln vorgeschlagen (Abbildung 44):

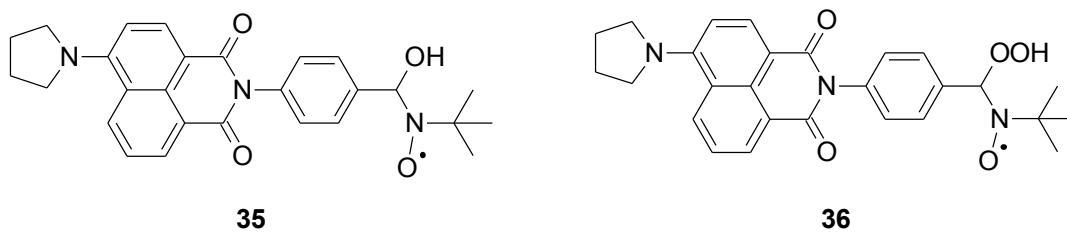


Abbildung 44: Postulierte Strukturformeln des PNIPN-OH-Adduktes 35 und des PNIPN-OOH-Adduktes 36.

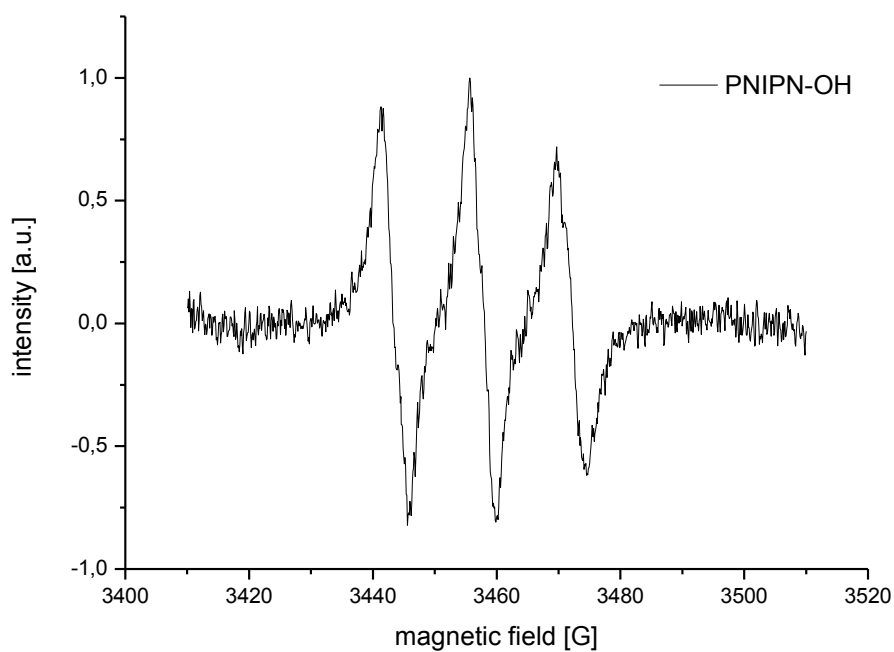


Abbildung 45: Normiertes ESR-Spektrum eines PNIPN-OH-Adduktes 35 nach Inkubation mit 100 µl Fenton-Reagenz.

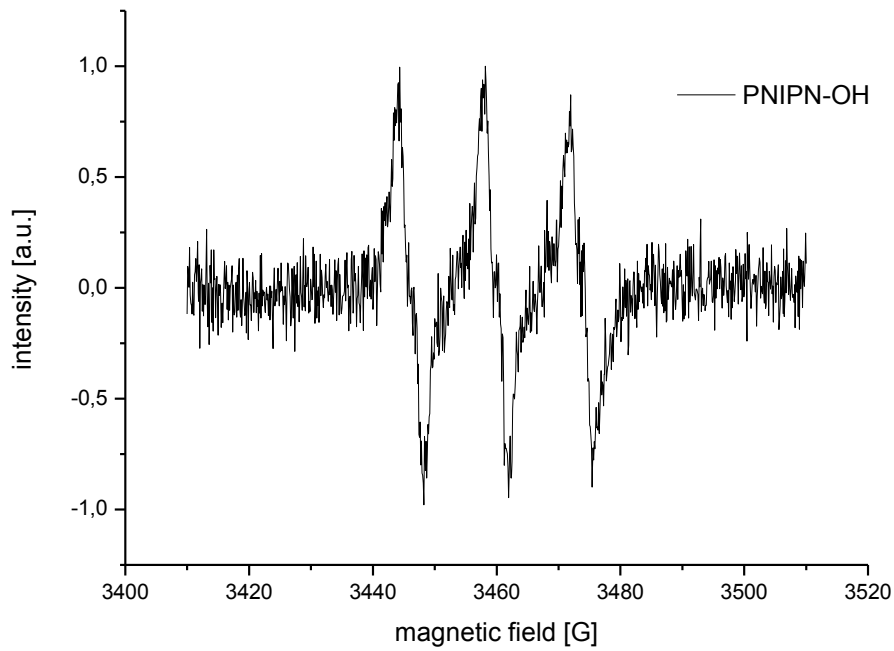


Abbildung 46: Normiertes ESR-Spektrum eines PNIPN-OH-Adduktes 35 nach Inkubation mit 200 μ l Fenton-Reagenz.

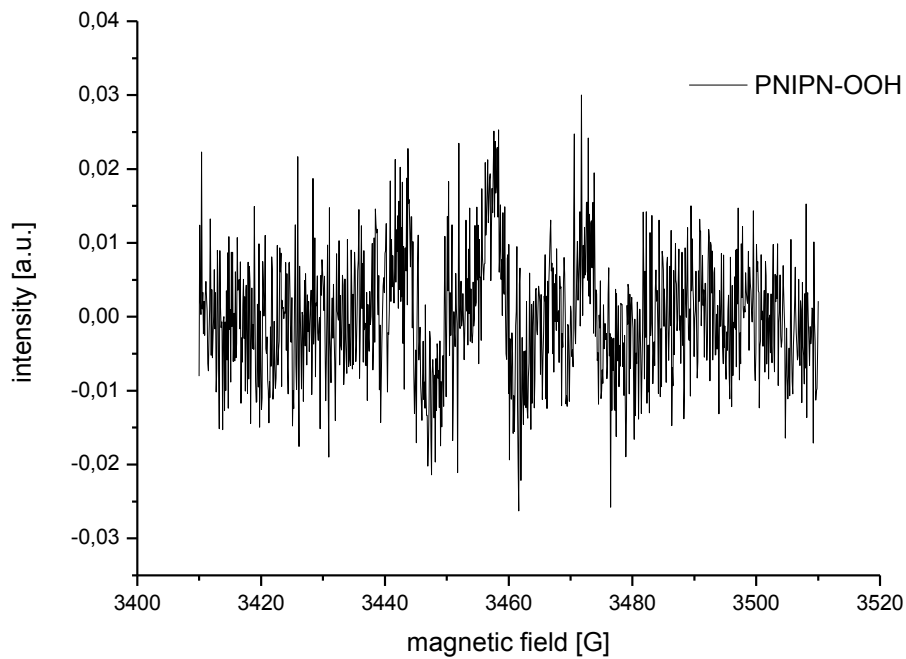


Abbildung 47: Versuch zur Detektion eines PNIPN-OOH Adduktes 36 generiert durch ein Hypoxanthin/XOD-System.

Abbildung 45 und Abbildung 46 zeigen die ESR-Spektren des PNIPN-OH-Addukts **35**. Bei beiden Spektren erkennt man die Aufspaltung der detektierten Signale in drei Linien. Auf Grund dieser spektralen Form, kann von der Bildung langlebiger Nitroxid-Radikale ausgegangen werden. Bei genauerer Betrachtung der Hyperfeinstruktur in Abbildung 45 wurde eine leichte Asymmetrie festgestellt. Die Abnahme des Signals im Hochfeldbereich ist möglicherweise auf Konzentrationseffekte zurückzuführen (Hauck, 2007).

Der Versuch ein PNIPN-OOH-Addukt **36** ESR-spektroskopisch zu detektieren kann Abbildung 47 entnommen werden. Das Spektrum zeigt den Ansatz eines "Drei-Linien-Spektrums" von sehr geringer Intensität. Möglicherweise kann man dafür die Instabilität der radikalischen Addukte oder eine zu geringe Xanthinoxidase-Aktivität in Betracht ziehen (Leinisch, 2009). Spätere Messungen durch A. Karbach mit Stilbennitron-Derivaten, lassen den Schluss zu, dass die Xanthinoxidase in zu geringer Konzentration eingesetzt wurde und eine Änderung in der Durchführung der Extraktion der Addukte mittels Ethylacetat, um eine höhere Konzentration der Addukte zu erlangen, das Spektrum wesentlich verbessern sollte.

3.2.2 ESR-spektroskopische Untersuchungen des PNIEPO (24)

Auch für die Untersuchungen von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin-*N*-oxid (24) wurden zuerst die Spin-Addukte erzeugt. Es werden folgende Strukturformeln postuliert (Abbildung 48):

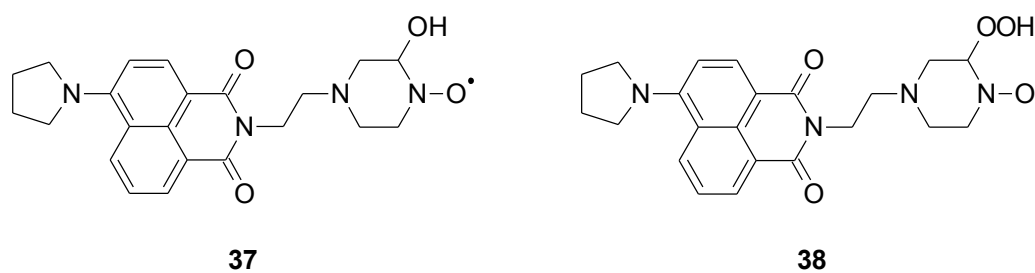


Abbildung 48: Postulierte Strukturformeln des PNIEPO-OH Adduktes **37 und des PNIEPO-OOH Adduktes **38**.**

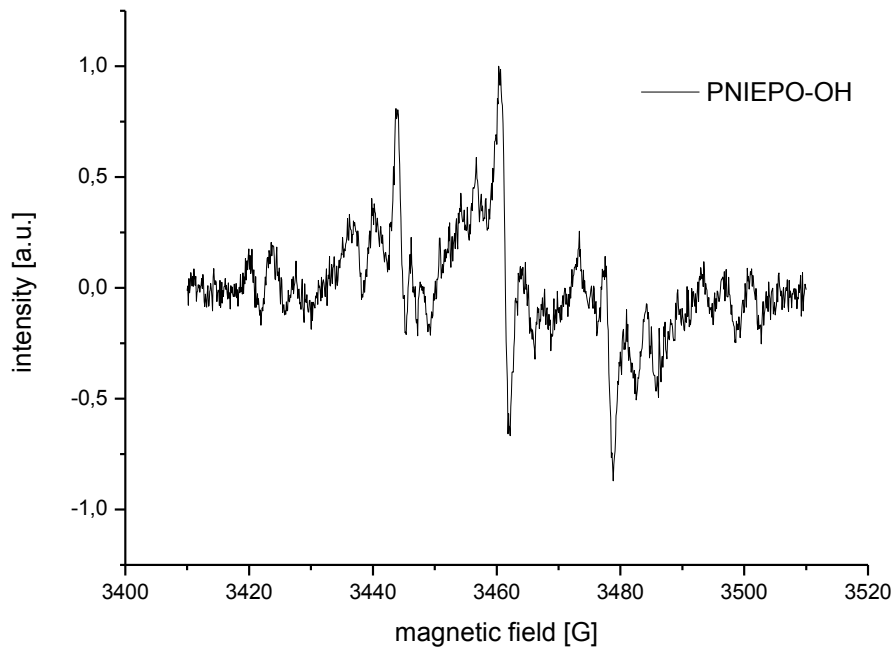


Abbildung 49: Normiertes ESR-Spektrum eines PNIEPO-OH-Adduktes 37 nach Inkubation mit 100 µl Fenton-Reagenz.

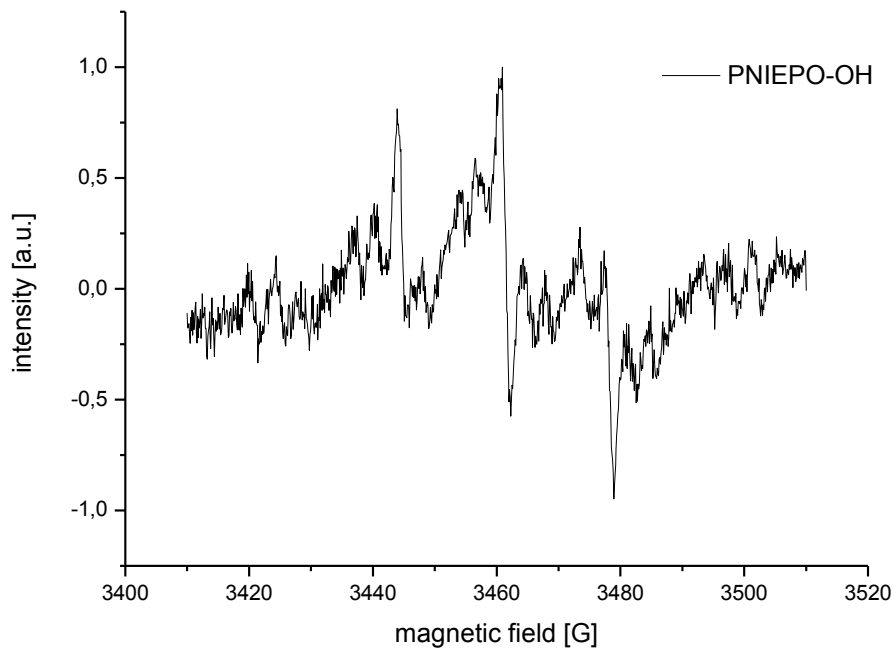


Abbildung 50: Normiertes ESR-Spektrum eines PNIEPO-OH-Adduktes 37 nach Inkubation mit 200 µl Fenton-Reagenz.

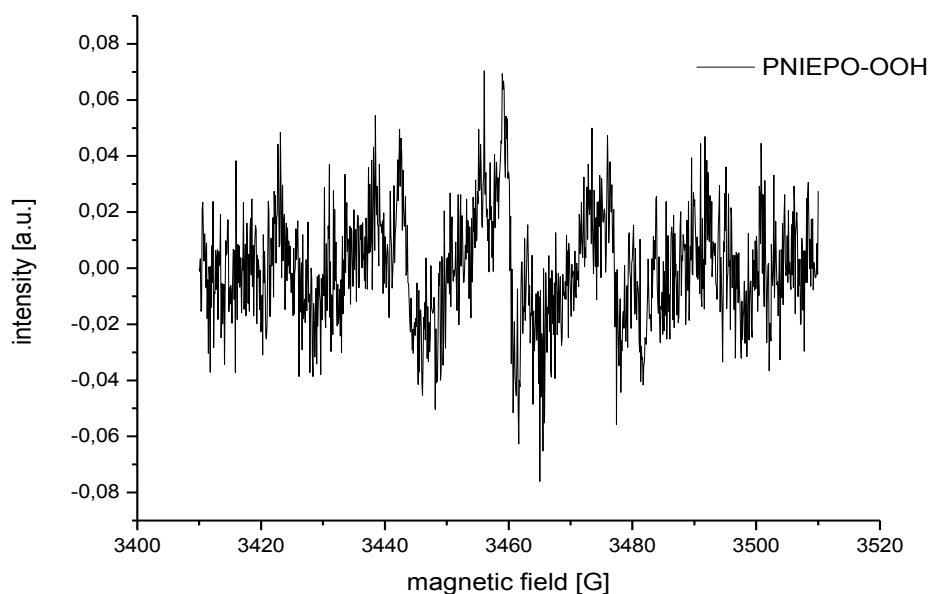


Abbildung 51: Versuch zur Detektion eines PNIEPO-OOH-Adduktes **38 in DMSO generiert durch ein Hypoxanthin/XOD-System.**

In Abbildung 49 ist das Spektrum eines PNIEPO-Spin-Adduktes **37** dargestellt. Die Linienform lässt auf die Bildung eines Nitroxid-Radikals schließen. Auffällig sind hierbei zusätzliche Linienaufspaltungen bei ca. 3420 G und 3440 G sowie bei 3480 G und 3500 G. Diese Besonderheit in der Hyperfeinstruktur ist auf Wechselwirkungen des Nitroxid-Radikals mit benachbarten Wasserstoffatomen zurückzuführen. Dabei kommt es zu Kopplungen des ^1H -Kerns mit dem Spin des ungepaarten Elektrons (Hauck, 2007). Zusätzlich sollte berücksichtigt werden, dass **24** nicht völlig rein vorlag, was zu weiteren Konkurrenzprozessen führen kann. Abbildung 50 zeigt ebenfalls das Signal eines PNIEPO-Adduktes **37**. Auch in diesem Spektrum sind die zusätzlichen Linienaufspaltungen zu erkennen. Für die Detektion der Spektren wurde die Probe, nach Inkubation mit einer Fe^{2+} - und H_2O_2 -Lösung, aus einer Methylenchlorid-Phase entnommen, da aus der Ethylacetat-Phase kein Signal erhalten wurde. Ein PNIEPO-OOH-Addukt **38** konnte nicht detektiert werden (vgl. Kap. 3.2.1). Es wurde der Ansatz eines "Drei-Linien-Spektrums" mit einem schlechten Signal-Rausch-Verhältnis detektiert (Abbildung 51).

3.2.3 ESR-spektroskopische Untersuchungen des PNIM-Nitron (**29**)

Für die ESR-spektroskopische Untersuchungen des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethyl-*N*-*tert*-butylnitrons (**29**) sollten folgende radikalischen Addukte erzeugt werden (Abbildung 52):

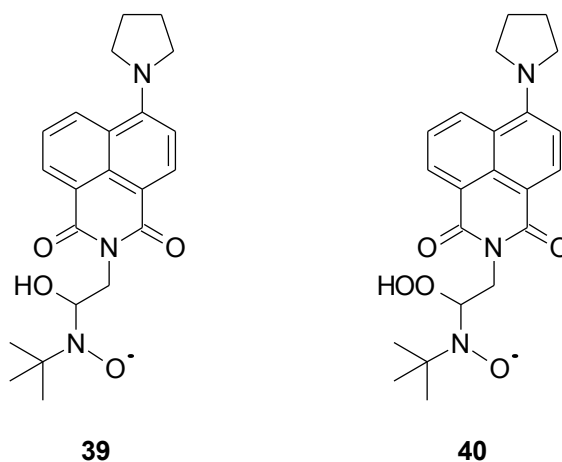


Abbildung 52: Postulierte Strukturformeln des PNIMN-OH-Adduktes 39 und des PNIMN-OOH Adduktes 40.

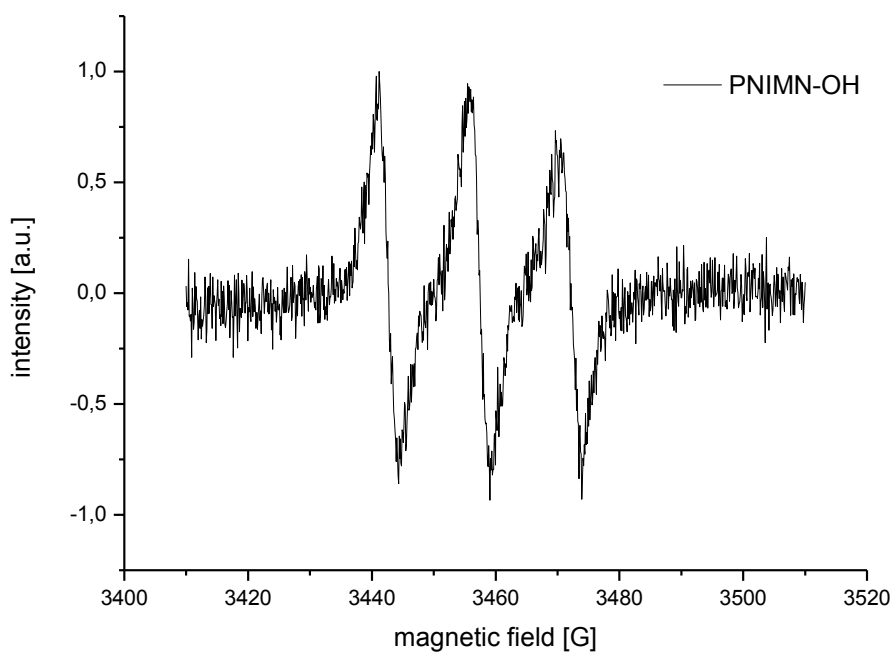


Abbildung 53: Normiertes ESR-Spektrum eines PNIMN-OH-Adduktes 39 nach Inkubation mit 100 μl Fenton-Reagenz.

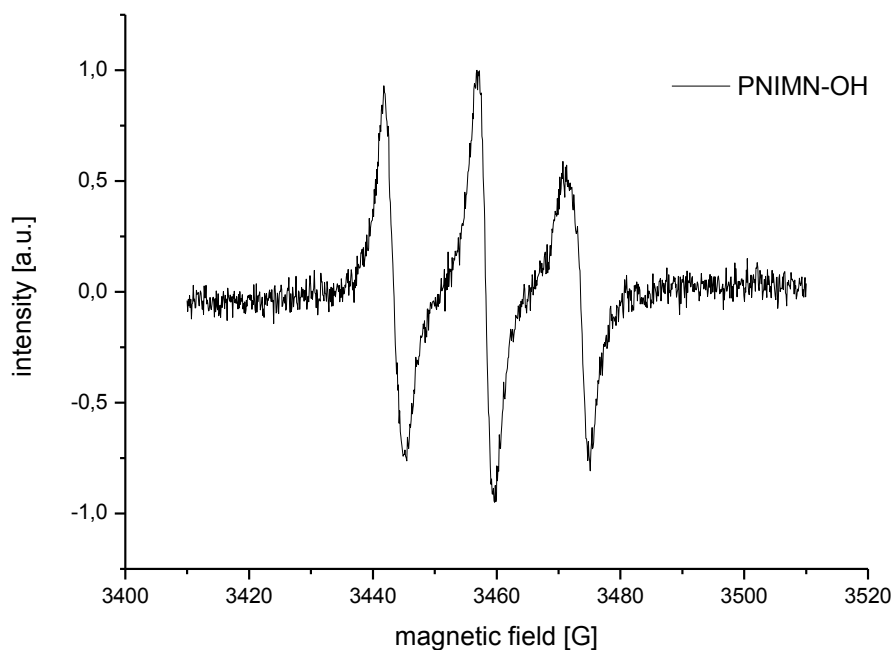


Abbildung 54: Normiertes ESR-Spektrum eines PNIMN-OH-Adduktes 39 nach Inkubation mit 200 μ l Fenton-Reagenz.

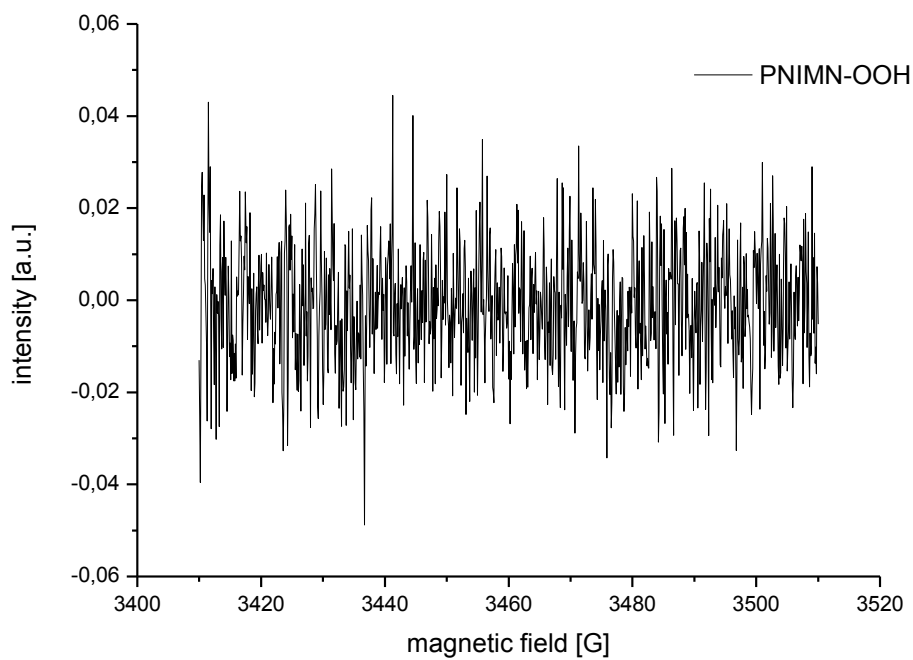


Abbildung 55: Versuch zur Detektion eines PNIMN-OOH Adduktes 40 in DMSO generiert durch ein Hypoxanthin/XOD-System.

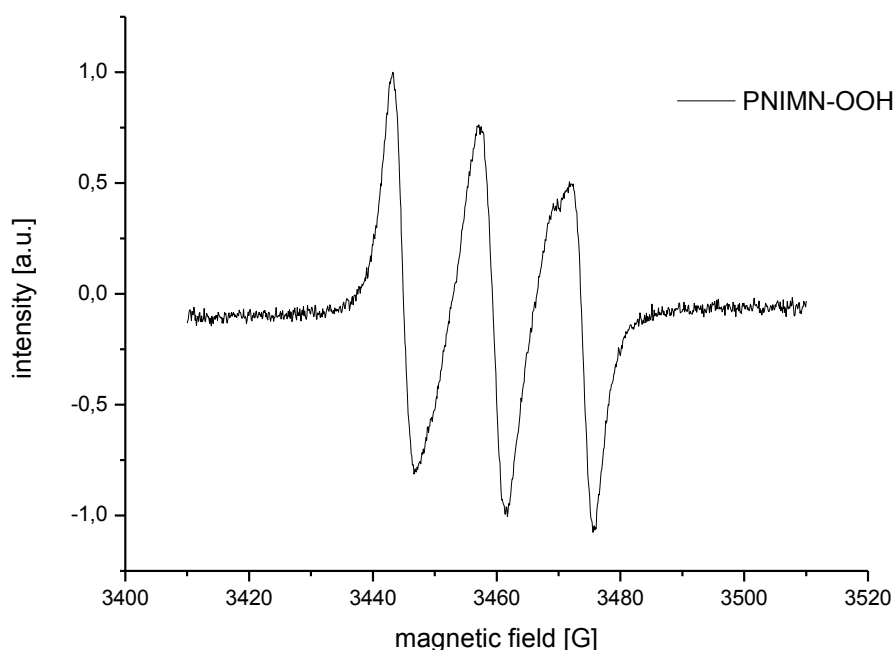


Abbildung 56: Versuch zur Detektion eines PNIMN-OOH-Adduktes **40 in EtOAc generiert durch ein Hypoxanthin/XOD-System.**

Die in Abbildung 53 und Abbildung 54 gezeigten ESR-Spektren zeigen die Signale eines PNIMN-OH-Adduktes **39**. Es sind deutliche Drei-Linien-Spektren zu erkennen, welche auf das gebildete Nitroxidradikal **39** hinweisen. Sowohl nach Inkubation mit 100 μ l Fenton-Reagenz, als auch nach Inkubation mit 200 μ l Fenton-Reagenz, konnten gut ausgeprägte Signale mit der erwarteten Linienform und einem guten Signal-Rausch-Verhältnis detektiert werden.

Diese Nitroxidradikale könnten durch zusätzliche Wasserstoffbrücken-Wechselwirkung zwischen der Hydroxylgruppe von **39** mit dem Carbonylsauerstoff der Naphthalimidfunktion stabilisiert werden (Han *et al.*, 2008).

Zur Detektion von PNIMN-OOH-Addukten **40** wurden erste Arbeiten nach Mitchell durchgeführt. Da sich Nitron **29** (4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethyl-*N-tert*-butylnitron) jedoch nicht in Wasser löst, wurden die Messungen in DMSO durchgeführt. Auch hier konnte kein Signal detektiert werden (vgl. Kap. 3.2.1 und Kap. 3.2.2). Somit wurde die wässrige Phase mit entgastem Ethylacetat extrahiert und anschließend die organische Phase vermessen. Die spektrale Form weist auf die Bildung eines Nitroxid-Radikals hin (Abbildung 56). Trotzdem kann nicht mit völliger Sicherheit gesagt werden, dass ein Hydroperoxid-Addukt **39** detektiert wurde. Auf Grund einer zu hohen Nitron-Konzentration ist zu erkennen, dass die

Signalintensität bei höherem Feld abnimmt (vgl. Kap. 3.2.1). Auch hier sind die Instabilität der Addukte und die zu geringe Enzymaktivität zu berücksichtigen (vgl. Kap. 3.2.1).

Zusammenfassend konnten die *spin trapping*-Eigenschaften der Nitrone PNIEPO (**24**), PNIMN (**29**) und PNIPN (**34**) analog zu dem *p*-Nitrostilbennitron (**10**) (Hauck, 2007), nachgewiesen werden. Für **24**, **29** und **34** konnte gezeigt werden, dass, nach Aufnahme von ROS, langlebige Nitroxid-Radikale gebildet werden, wodurch ESR-spektroskopische Untersuchungen möglich waren. Der Nachweis und die Detektion von Hydroperoxyl-Addukten, blieben, auf Grund der bereits erwähnten Faktoren, aus.

3.3 UV- und Fluoreszenzspektroskopie

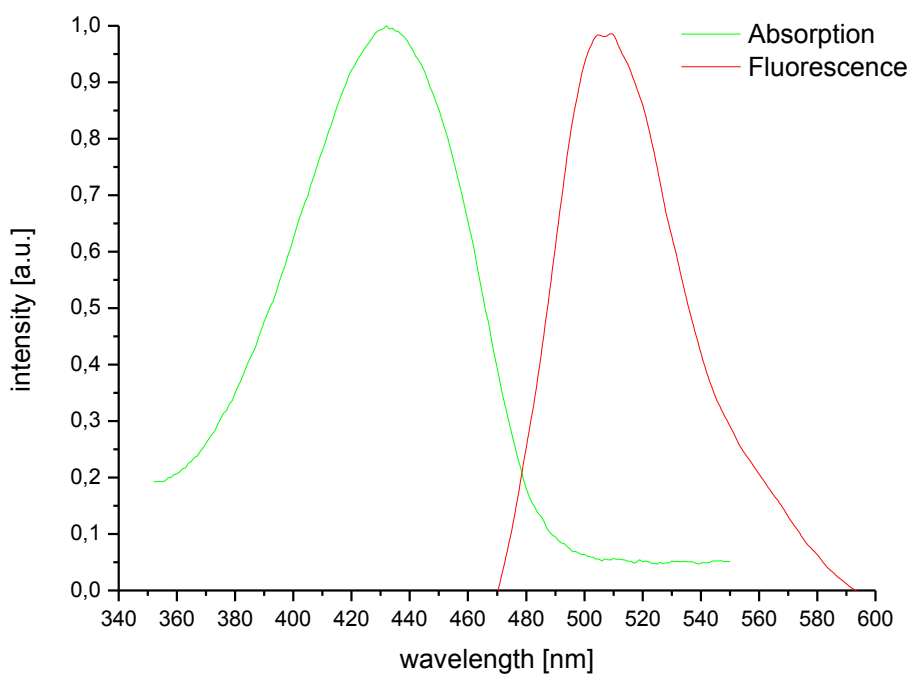
Um die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften der synthetisierten Nitrone, 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethyl-*N-tert*-butylnitron (PNIMN **29**) und 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl-*N-tert*-butylnitron (PNIPN **34**) zu untersuchen und miteinander zu vergleichen, wurden eine 10 μ M Nitron-EtOAc bzw. eine 100 μ M Nitron-DMSO-Lösung verwendet. Für das 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl-*N-tert*-butylnitron (PNIMPN **11**) wurde eine 1 nM Nitron-DMSO-Lösung verwendet, da die Messung an einem empfindlicheren Gerät (AK Gerhards) durchgeführt wurde.

3.3.1 UV- und Fluoreszenzspektren in Ethylacetat

Abbildung 57 und Abbildung 58 zeigen die gemessenen Absorptions- und Emissionsspektren der Nitrone PNIPN (**34**) und PNIMN (**29**). Aus Tabelle 2 lässt sich entnehmen, dass die Maxima in einem ähnlichen Wellenlängenbereich auftreten. Man würde erwarten, dass es, auf Grund des vergrößerten π -Elektronensystems von **34**, zu einer bathochromen Verschiebung kommt. Diese Verschiebung des Absorptions- und Emissionsmaximums von **34** wurde jedoch nicht beobachtet. Möglicherweise könnte dies auf eine sterische Hinderung der Rotation um die Imidbindung von **34** zurückzuführen sein. Eine erste Kraftfeldrechnung bei Raumtemperatur bestätigte diese Vermutung, ergab jedoch keine eindeutigen Werte. Davon ausgehend würde es zu einer zumindest unvollständigen Überlappung der π -Orbitale kommen, wodurch die Delokalisierung der entsprechenden Elektronen auf den substituierten Phenylring und somit die komplette Konjugation über das PNIPN (**34**) beeinträchtigt wäre. Nach persönlichem Austausch mit A. Karbach, wäre es naheliegend, weitere Kraftfeld- sowie *ab initio*-Berechnungen durchzuführen, um dies zu bestätigen. Notwendige Größen, wie z.B. die genaue Energie der Rotationsbarriere und elektronische Effekte im Molekül, nach Aromatizität zu streben, sollten berücksichtigt werden, um diese Theorie zu verifizieren.

Tabelle 2: Absorptions- und Fluoreszenzmaxima der Nitrone 29 und 34 in EtOAc.

Substanz	Max. Absorption in EtOAc	Max. Fluoreszenz in EtOAc
PNIPN	435 nm	505 nm
PNIMN	433 nm	504.5 nm

**Abbildung 57: Normiertes Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des PNIP-Nitrons (34) in Ethylacetat.**

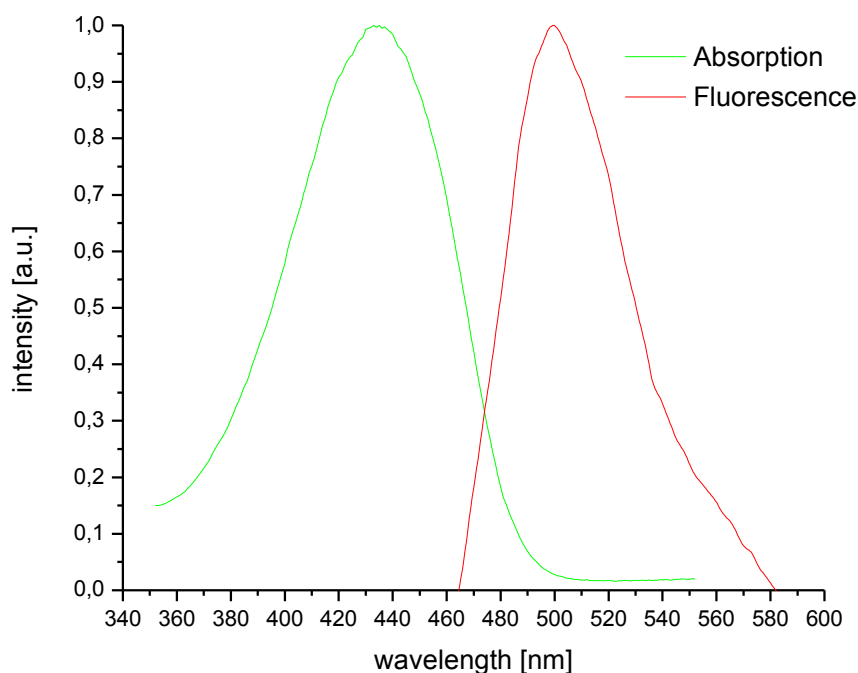


Abbildung 58: Normiertes Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des PNIM-Nitrons (29) in Ethylacetat.

3.3.2 UV- und Fluoreszenzspektren in DMSO

Abbildung 59 zeigt das Fluoreszenzspektrum (rot) von PNIMPN (11) mit einem Maximum bei 522 nm und bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm, was dem verwendeten Laser in den *in vitro* Experimenten entspricht. Das entsprechende Absorptionsmaximum (schwarz) liegt bei 457 nm.

Da zu Beginn der ersten *in vitro* Messungen, ein Laser mit der Wellenlänge von 405 nm benutzt wurde, wurde ein weiteres Fluoreszenzspektrum bei dieser Anregungswellenlänge aufgenommen (Abbildung 60). Hierbei ist zu beobachten, dass sich das Maximum zu 514 nm verschoben hat. Außerdem konnte ein „Pump-Effekt“ der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Dabei steigert sich die Intensität der Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm, wenn zuvor mit 405 nm angeregt wurde. Der gleiche Effekt ist auch umgekehrt zu beobachten (Daten nicht vorhanden). Diese Beobachtungen sind ungewöhnlich und bedürfen noch weiterer Untersuchungen, um die Gründe hierfür zu evaluieren.

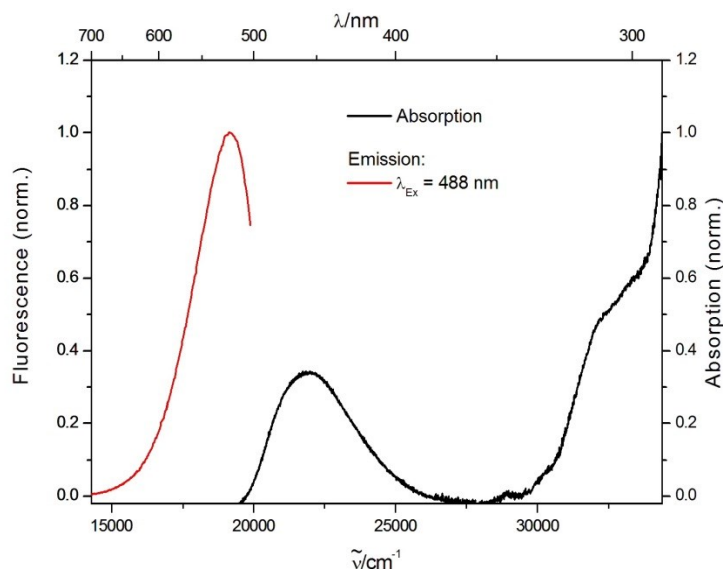


Abbildung 59: Normiertes Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des PNIMP-Nitrons (11) in DMSO ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).

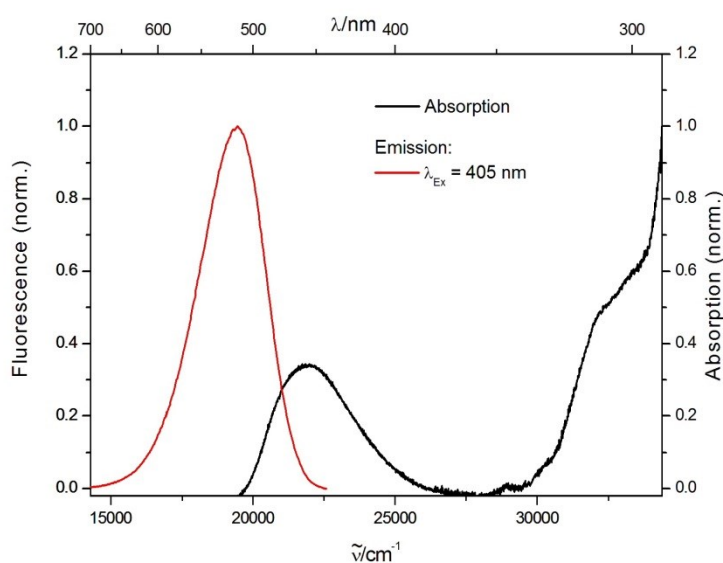


Abbildung 60: Normiertes Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des PNIMP-Nitrons (11) in DMSO ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$).

Auch die gemessenen Absorptions- und Fluoreszenzspektren in Dimethylsulfoxid (Abbildung 61 und Abbildung 62) zeigen, dass die Absorptions- und Fluoreszenzmaxima, für PNIMN (29) und PNIPN (34), in einem ähnlichen Wellenlängenbereich auftreten (Tabelle 3) (vgl. Kap. 3.3.1). Die Absorptionsmaxima sind im Vergleich zu PNIMPN (11) hypsochrom verschoben. Die Verschiebung der Maxima, in Bezug auf Tabelle 2, resultiert aus Lösungsmittelleffekten.

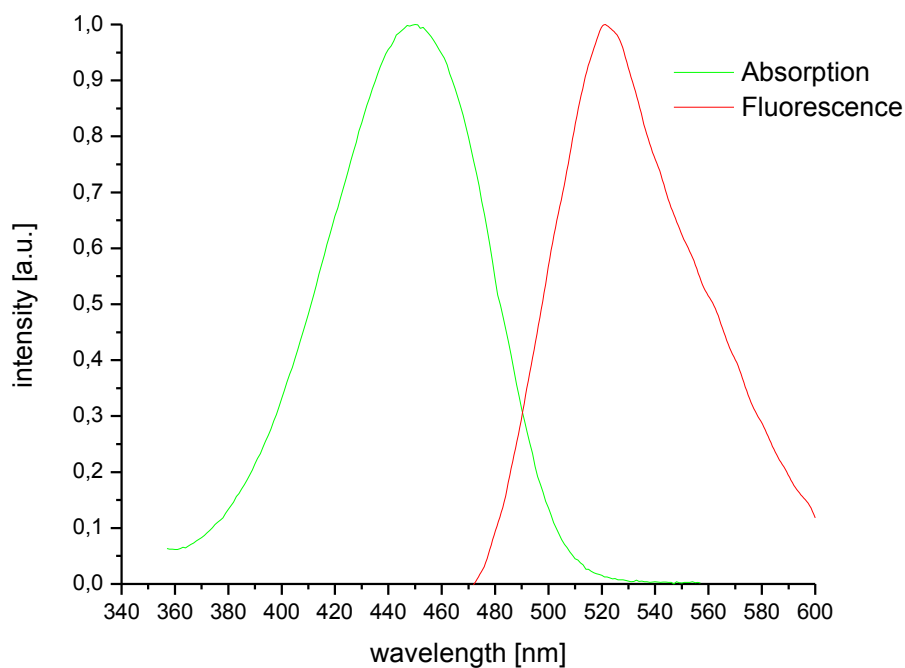


Abbildung 61: Normiertes Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des PNIP-Nitrons (34) in DMSO ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).

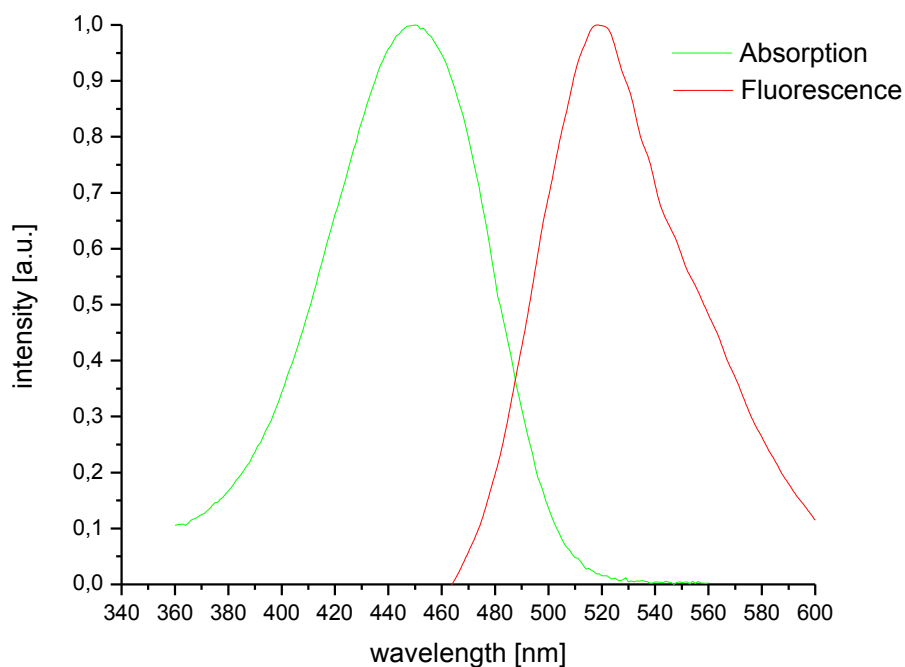


Abbildung 62: Normiertes Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des PNIM-Nitrons (29) in DMSO ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).

Tabelle 3: Absorptions- und Fluoreszenzmaxima der Nitrone 11, 29 und 34 in DMSO.

Substanz	Max. Absorption in DMSO	Max. Fluoreszenz in DMSO
PNIPN ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$)	450 nm	526.5 nm
PNIMN ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$)	450 nm	523 nm
PNIMPN ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$)	457 nm	522 nm
PNIMPN ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$)	457 nm	514 nm

3.3.3 Fluoreszenz-*Quenching*-Experimente

Um die erwartete Löschung der Fluoreszenz der Nitrone PNIMN (**29**) und PNIPN (**34**) zu untersuchen, wurden *Quenching*-Experimente in Zusammenarbeit mit T. Stemler und A. Karbach durchgeführt. Dazu wurden eine 10 nM-Nitron-EtOAc-Lösung bzw. eine 1 μM -Nitron-DMSO-Lösung verwendet, um ein Modellsystem für die Überprüfung der *Quenching*-Eigenschaften von **29** und **34** zu etablieren. Zur Erzeugung der Spin-Addukte wurde, analog zu den ESR-spektroskopischen Untersuchungen, Fenton-Reagenz verwendet.

3.3.3.1 Fluoreszenz-Quenching-Experimente in Ethylacetat

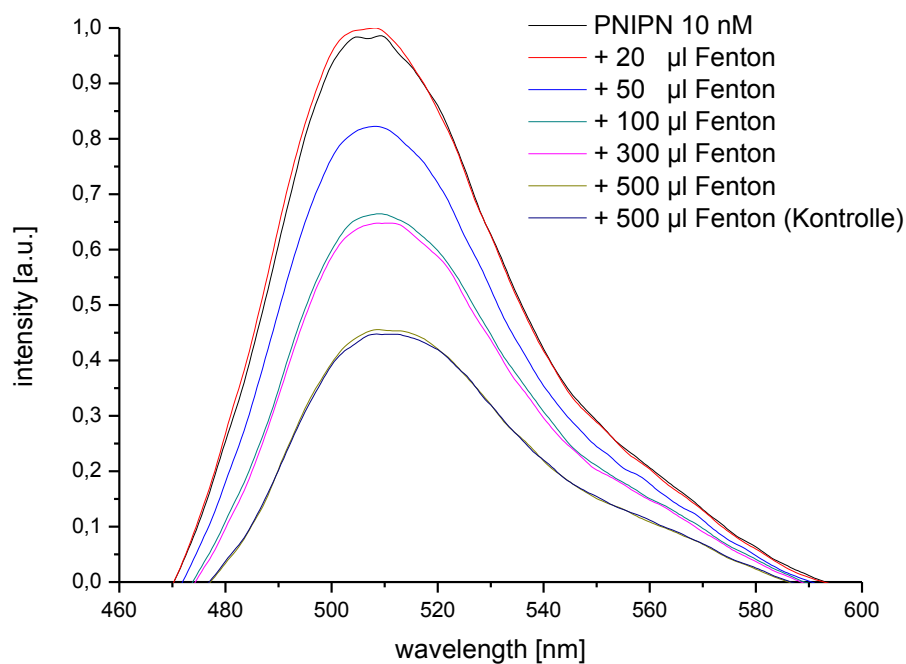


Abbildung 63: Normierte Fluoreszenzspektren des PNIP-Nitrons (34) in Ethylacetat nach Inkubation mit Fenton-Lösung.

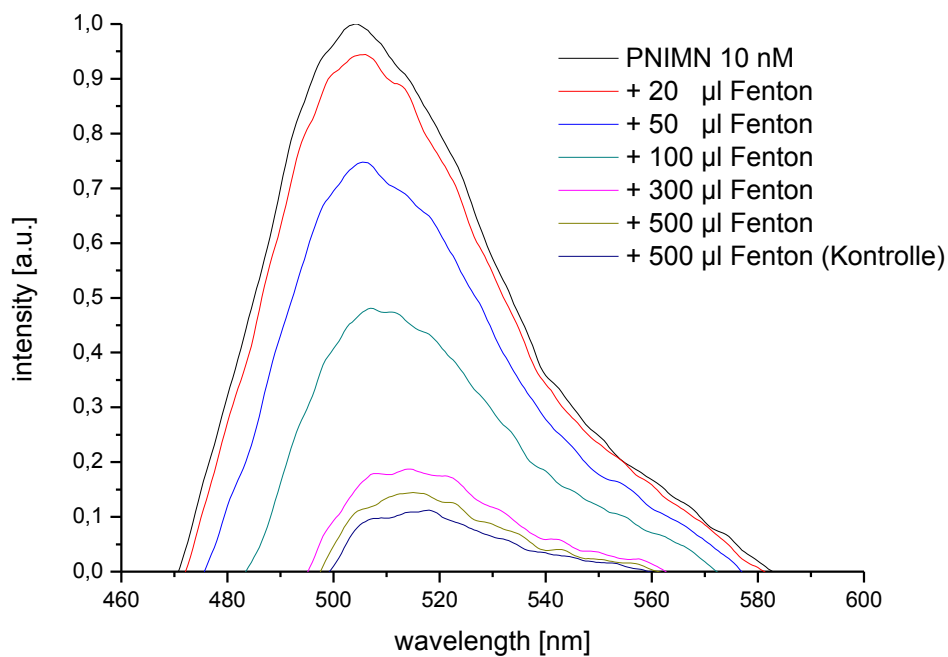


Abbildung 64: Normierte Fluoreszenzspektren des PNIM-Nitrons (29) in Ethylacetat nach Inkubation mit Fenton-Lösung.

Die Betrachtung der normierten Fluoreszenzspektren von PNIPN (**34**) und PNIMN (**29**) (Abbildung 63 und Abbildung 64) zeigt, dass es, nach Inkubation der Nitron-Lösung mit einer Fe^{2+} - und H_2O_2 -Lösung, zu einer Abnahme der Fluoreszenz kommt. Daraus lässt sich schließen, dass es zur erwarteten Reaktion der Nitron-Funktion mit entstandenen Hydroxylradikal-Spezies und somit zur Fluoreszenz-Löschung kommt. Es konnte festgestellt werden, dass PNIMN (**29**) eine stärkere Löschung der Fluoreszenz aufweist als PNIPN (**34**). Dies ist möglicherweise auf eine Stabilisierung der Spin-Addukte von **29** zurückzuführen (vgl. Kap. 3.2.3). Des Weiteren konnte, selbst bei sehr großen Volumina an Fenton-Reagenz, keine vollständige Löschung der Fluoreszenz beobachtet werden. Dafür könnte angenommen werden, dass eine Zersetzung der Spin-Addukte eintritt. Dennoch gelang es auf dieser Grundlage ein Modell für das Fluoreszenz-*Quenching* der Nitrone **34** und **29** in EtOAc zu etablieren.

3.3.3.2 Fluoreszenz-*Quenching*-Experimente in DMSO

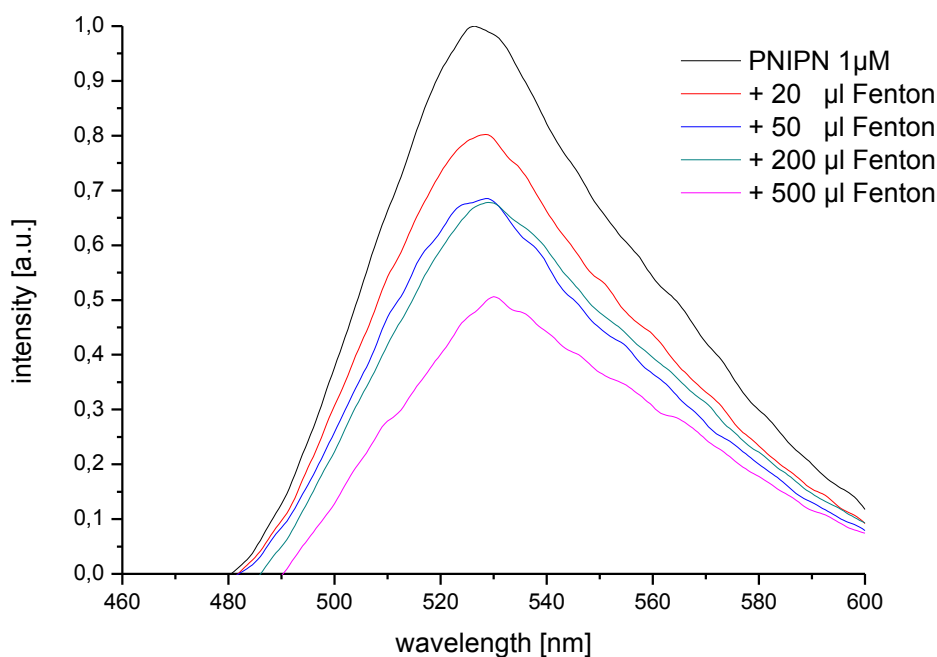


Abbildung 65: Normierte Fluoreszenzspektren des PNIP-Nitrons (**34**) in DMSO nach Inkubation mit Fenton-Lösung.

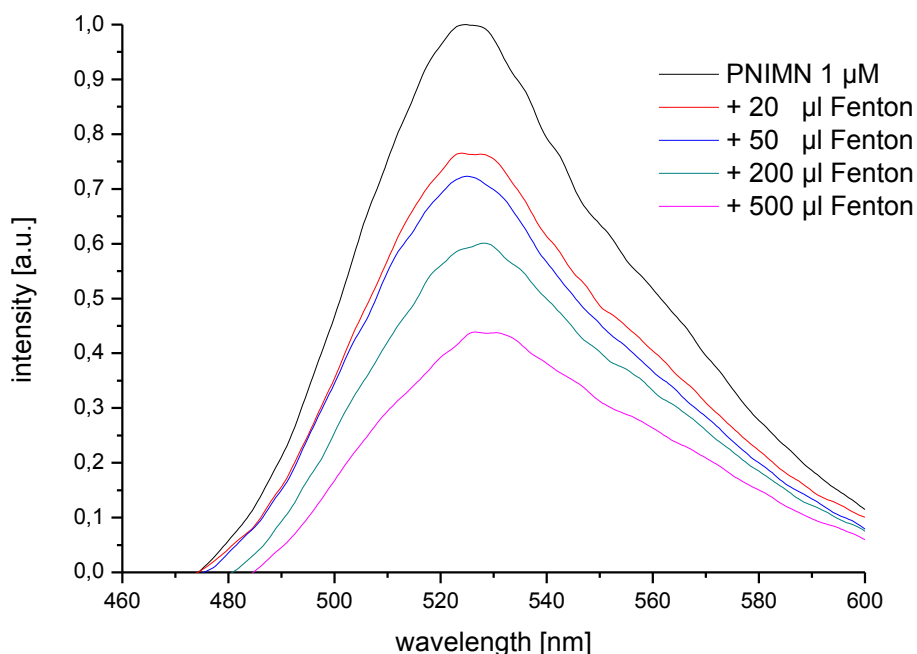


Abbildung 66: Normierte Fluoreszenzspektren des PNIM-Nitrons (29) in DMSO nach Inkubation mit Fenton-Lösung.

Auch bei der Betrachtung der normierten Fluoreszenzspektren der Nitrone **34** und **29** in DMSO lässt sich eindeutig erkennen, dass es nach Inkubation der Hydroxylradikal erzeugenden Fenton-Lösung zu einer Abnahme der Emission kommt (Abbildung 65 und Abbildung 66). Auch in DMSO wurde keine komplette Löschung der Fluoreszenz beobachtet (vgl. Kap. 3.3.3.1).

Im Vergleich mit dem *p*-Nitrostilbennitron (**10**) und dem 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl-*N*-*tert*-butylnitron (**11**) konnte das erwartete Fluoreszenz-*Quenching* bestätigt werden (Hauck, 2007).

3.3.3.3 Fluoreszenz-*Quenching*-Experimente mit Rotenon und Antimycin A

Um zu überprüfen, ob die Zugabe der, für die *in vitro* Untersuchungen benötigten, Atmungsketteinhibitoren Rotenon und Antimycin A eine Auswirkung auf das Fluoreszenz-*Quenching*-Verhalten haben bzw. selbst als *Quencher* agieren, wurden 10 nM Nitron-EtOAc-

Lösungen mit Rotenon- und Antimycin A-Lösungen inkubiert und anschließend vermessen.

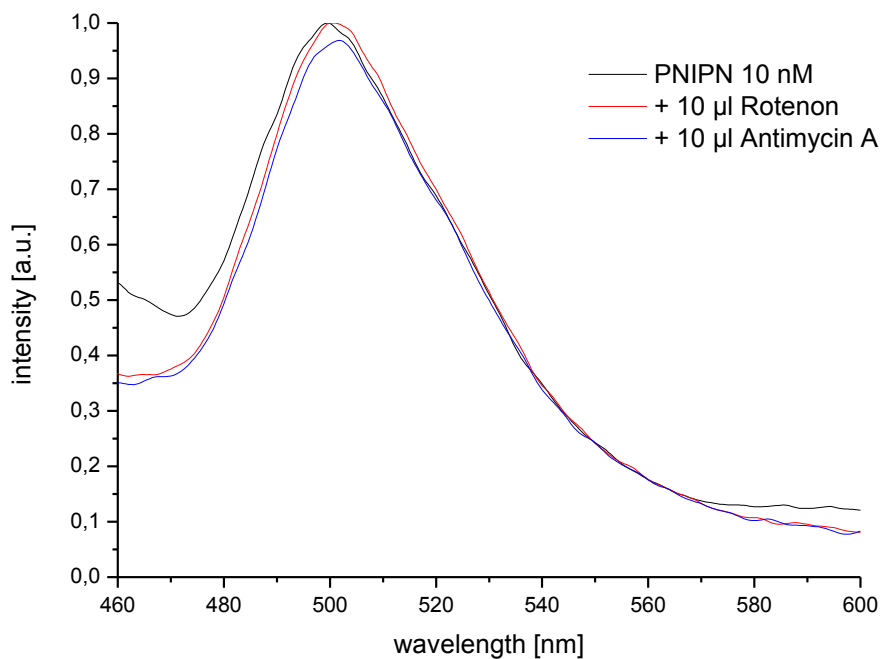


Abbildung 67: Normierte Fluoreszenzspektren des PNIP-Nitrons (34) in Ethylacetat nach Inkubation mit Rotenon und Antimycin A.

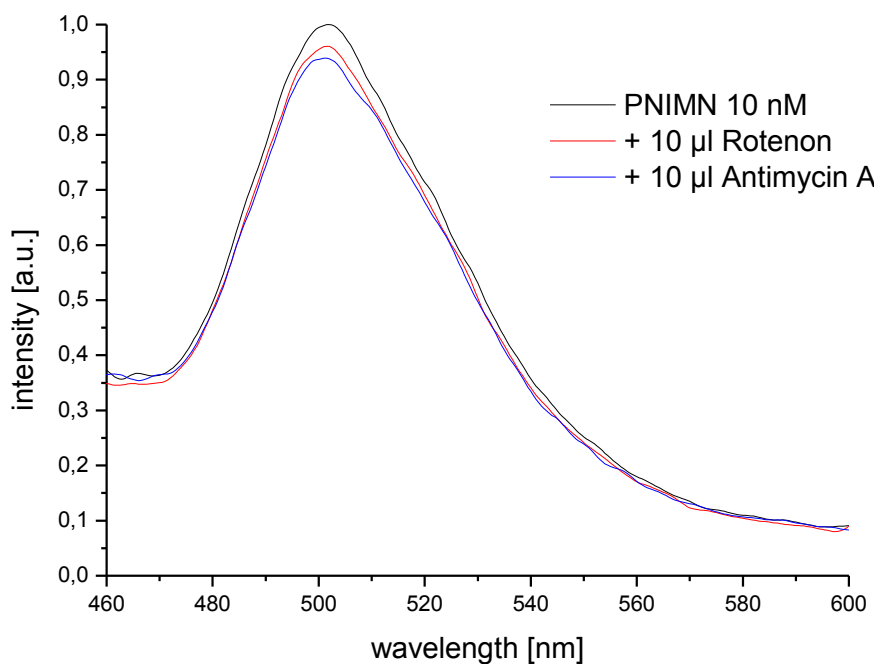


Abbildung 68: Normierte Fluoreszenzspektren des PNIM-Nitrons (29) in Ethylacetat nach Inkubation mit Rotenon und Antimycin A.

Abbildung 67 und Abbildung 68 sind die normierten Fluoreszenzspektren von **34** und **29**, nach Inkubation mit den Atmungsketteinhibitoren Rotenon und Antimycin A, zu entnehmen. Für beide Nitrone konnte ein minimaler quenchender Effekt beobachtet werden. Da das, in diesem Modellsystem verwendete, Volumen der Inhibitor-Lösung um den Faktor 5 höher war als das benötigte Volumen für die Experimente am konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop, kann angenommen werden, dass das Emissionsverhalten der Nitrone nicht maßgeblich beeinflusst wird. Daher konnten die Inhibitoren problemlos für die folgenden *in vitro* Experimente eingesetzt werden.

3.4 Zytotoxizitätstest

Zur Überprüfung der synthetisierten Nitrone auf deren Toxizität gegenüber den verwendeten Zellen, wurde ein Zytotoxizitätstest, hier der SRB-Test, durchgeführt. Dabei wird die Eigenschaft des anionischen Farbstoffes, Sulforhodamin B (SRB) (Abbildung 69), zur elektrostatischen Bindung an Zellproteine ausgenutzt. Das Zellwachstum wird dabei durch die Messung des Gesamtproteins ermittelt. Es wurde die Zytotoxizität aller 4 synthetisierten Nitrone auf den drei verwendeten Zelllinien getestet.

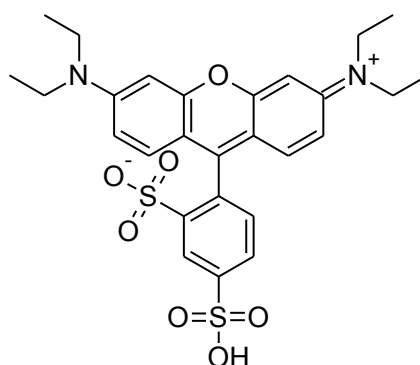


Abbildung 69: Strukturformel von Sulforhodamin B

3.4.1 SRB-Test mit 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl-*N*-*tert*-butylnitron (11)

Das PNIMPN zeigt in den aufgetragenen Konzentrationen keine hohe Zytotoxizität. Der LD₅₀-Wert, wird auf MCF7-Zellen nicht erreicht und das Zellwachstum liegt bei mindestens 75 % der Vergleichsmessung ohne Zugabe des Nitrons (Abbildung 70, Abbildung 71). Die, bei den Fluoreszenzversuchen aufgetragene Konzentration, liegt bei 50 µM des Nitrons in DMSO.

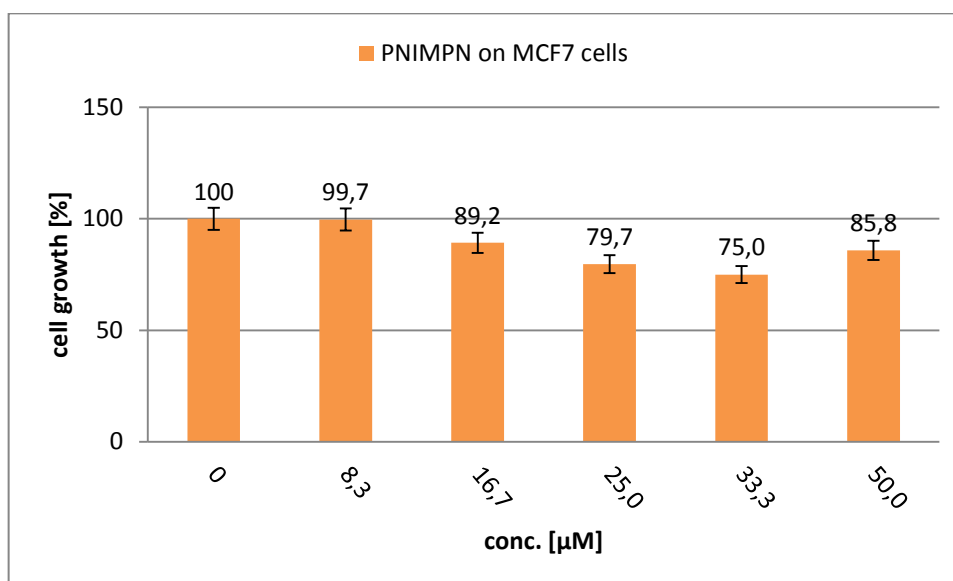


Abbildung 70: SRB-Test von PNIMPN auf MCF7-Zellen (8,3 – 50 µM).

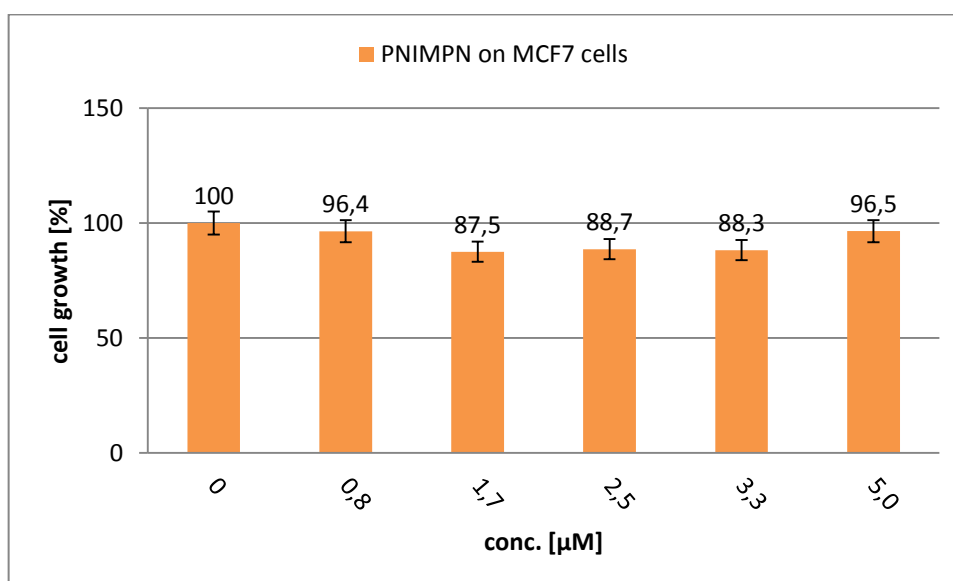


Abbildung 71: SRB-Test von PNIMPN auf MCF7-Zellen (0,8 – 5 µM).

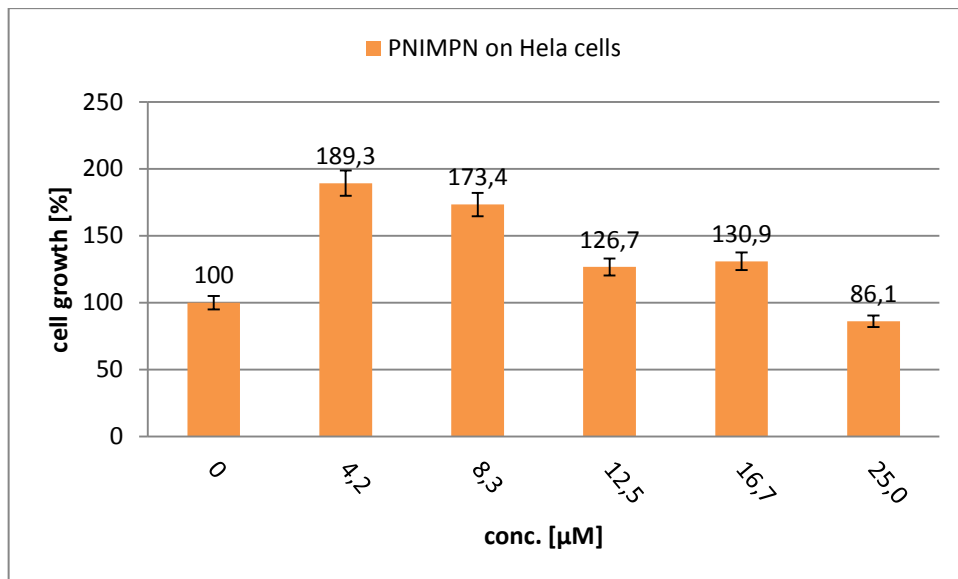


Abbildung 72: SRB-Test von PNIMPN auf HeLa-Zellen (4,2 – 25 μM).

Bei der Untersuchung auf HeLa-Zellen, ist eine deutliche Steigerung des Wachstums zu erkennen. Bei einer Konzentration von 4,2 μM Nitron, erhält man eine 89,3 %iges stärkeres Wachstum, als ohne die Zugabe von PNIMPN. Dies ist zum einen damit zu begründen, dass PNIMPN eine antioxidative Wirkung in den Zellen bzw. Mitochondrien besitzt, indem es mit den entstehenden Radikalen reagiert, diese dadurch abfängt und somit weniger Zellschäden durch oxidativem Stress, auftreten. Zum anderen geht man davon aus, dass die *spin traps*, Transkriptionsfaktoren, genauer gesagt NF- κB regulierte Cytokine und induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), modulieren, und dadurch eine antiinflammatorische Wirkung besitzen (Kotake *et al.*, 1998). Erst bei 25 μM Nitron nimmt das Wachstum ab und die toxische Wirkung des Nitrons überwiegt die der antioxidativen bzw. der antiinflammatorischen Wirkung (Abbildung 72).

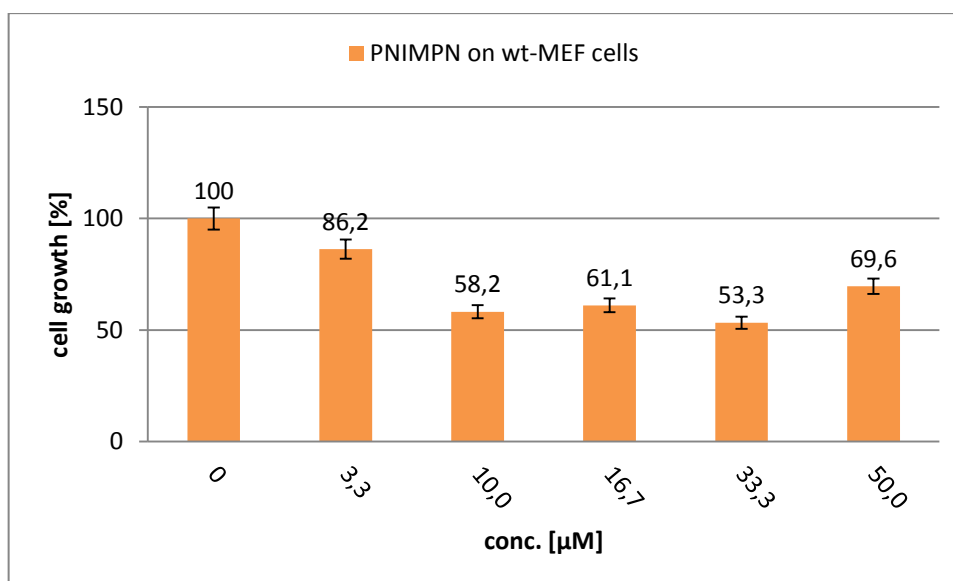


Abbildung 73: SRB-Test von PNIMPN auf wt-MEF-Zellen (3,3 – 50 µM).

Die zytotoxische Wirkung auf *wt*-MEF-Zellen ist wesentlich stärker als bei den beiden vorhergehenden untersuchten Krebszelllinien. Auffallend ist hierbei allerdings das, bei 50 µM PNIMPN, wieder ansteigende Zellwachstum (Abbildung 73). Bei einer Konzentration von 33,3 µM Nitron, ist mit 53,3 % das Zellwachstum der Negativkontrolle erreicht, und damit annähernd der LD₅₀-Wert. Dieses Ergebnis des Wachstumsanstiegs bei höherer Konzentration von PNIMPN ist derzeit nicht zu erklären. Es kann allerdings auch im normalen Schwankungsbereich des Tests liegen, was durch weitere Messreihen verifiziert werden sollte. Diese Messungen konnten innerhalb dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

3.4.2 SRB-Test mit 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl-*N*-*tert*-butylnitron (34)

Das, im Vergleich zum PNIMPN (11), um eine Methyl-Gruppe verkürzte PNIPN (34), zeigt gegenüber MCF7-Zellen, bei Konzentrationen von 8,3 – 50 µM, eine deutlich höhere Toxizität (Abbildung 74), als das „längere“ Nitron. Ab 25 µM Nitron, liegen die Wachstumswerte bei ca. 55 % und somit sehr nah am LD₅₀-Wert. Das PNIMPN liegt demgegenüber im Schnitt rund 20 % höher (Abbildung 70).

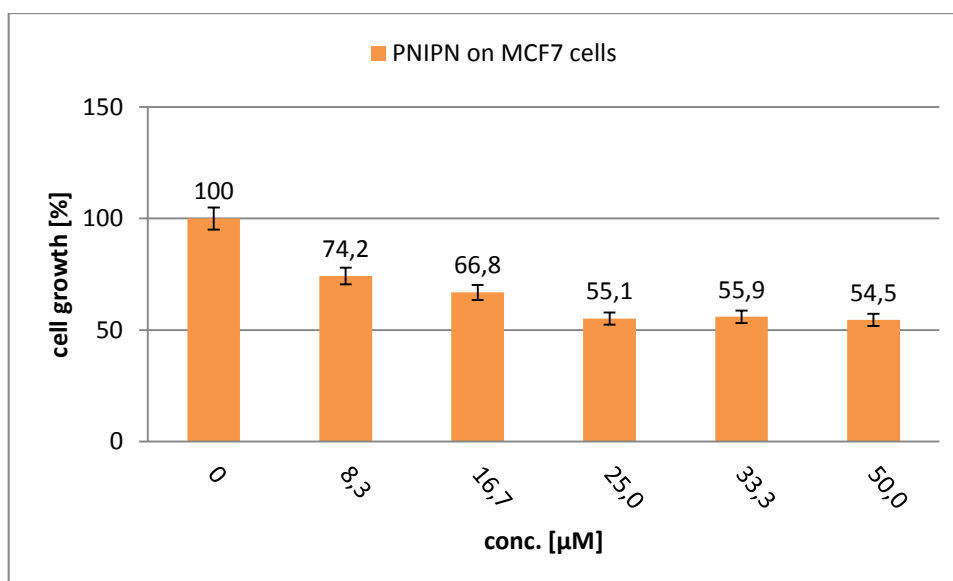


Abbildung 74: SRB-Test von PNIPN auf MCF7-Zellen (8,3 – 5 μM).

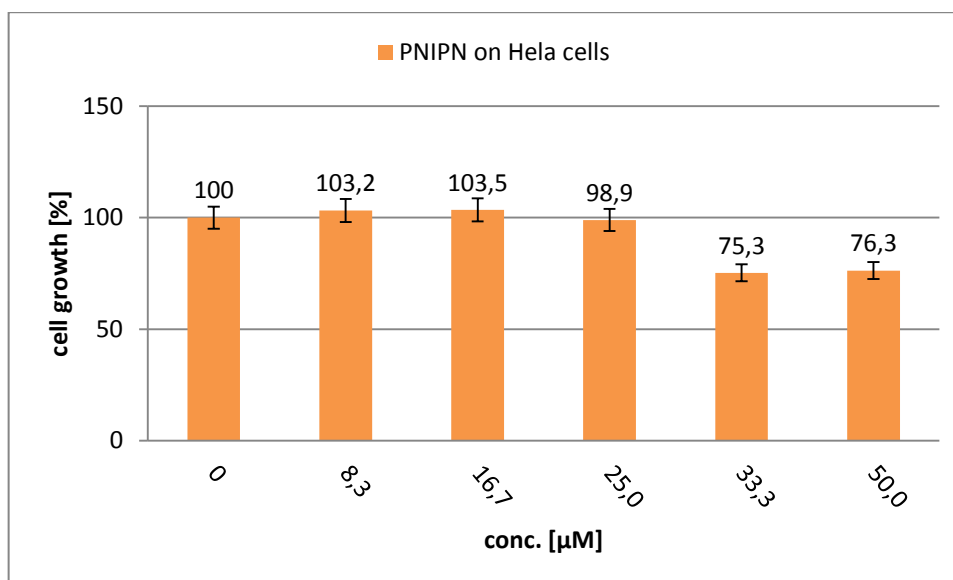


Abbildung 75: SRB-Test von PNIPN auf Hela-Zellen (8,3 – 50 μM).

Bei der Untersuchung auf Hela-Zellen, erhält man, wiederum im Vergleich mit PNIMP (11), ein erwartetes Ergebnis. Das Zellwachstum wird bei Konzentrationen von 8,3 und 16,7 μM , leicht stimuliert (Abbildung 75) und liegt bei 33,3 und 50 μM Nitron, um die 76 %.

Auch hier ist die Erklärung des stimulierten Zellwachstums, in der antioxidativen Wirkung von PNIPN (34) begründet, wobei die toxische Wirkung des Nitrons stärker ist als die des PNIMP (11).

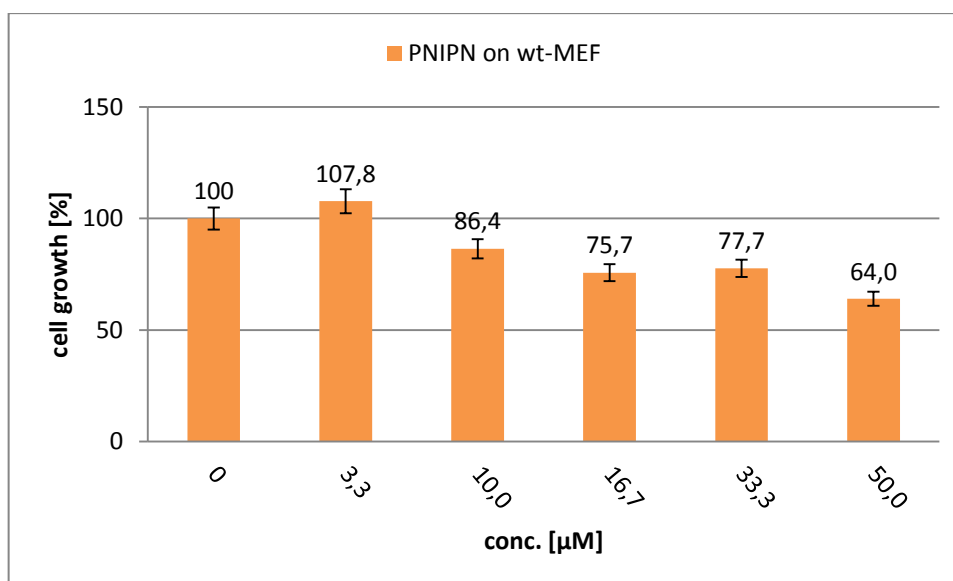


Abbildung 76: SRB-Test von PNIPN auf wt-MEF-Zellen (3,3 – 50 µM).

Abbildung 76 zeigt das Ergebnis des SRB-Tests mit wt-MEF-Zellen. Auch hier ist eine moderate Steigerung des Zellwachstums festzustellen (3,3 µM Nitron). Im Vergleich zu den Ergebnissen mit Hela-Zellen, ist PNIPN bei höheren Konzentrationen etwas toxischer. Allerdings in Bezug auf PNIMP (Abbildung 73) verträglicher für wt-MEF-Zellen.

3.4.3 SRB-Test mit 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethyl-*N*-tert-butylnitron (29)

PNIMN (29) ist für MCF7-Zellen das toxischste der synthetisierten Nitrone (Abbildung 77). Ab einer Konzentration von 8,3 µM, ist mit 51,8 %, der LD₅₀-Wert fast erreicht. Bei der, für die späteren *in vitro* Messungen am konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop, verwendeten Konzentration von 50 µM (Kap. 3.5), gibt es nur noch 20,9 % Zellwachstum. Obwohl dieses Nitron bei der relevanten Konzentration sehr toxisch für MCF7-Zellen ist, kann es für die weiteren Messungen verwendet werden, da die Inkubationszeit nur 20 Minuten beträgt und das Nitron zusätzlich noch ca. 18 Minuten bis zum Ende der Messungen auf die Zellen einwirken kann. Bei dem SRB-Test beträgt die Inkubationszeit 72 Stunden und somit kann die hohe toxische Eigenschaft des PNIMN (29), bei den weiteren Messungen vernachlässigt werden.

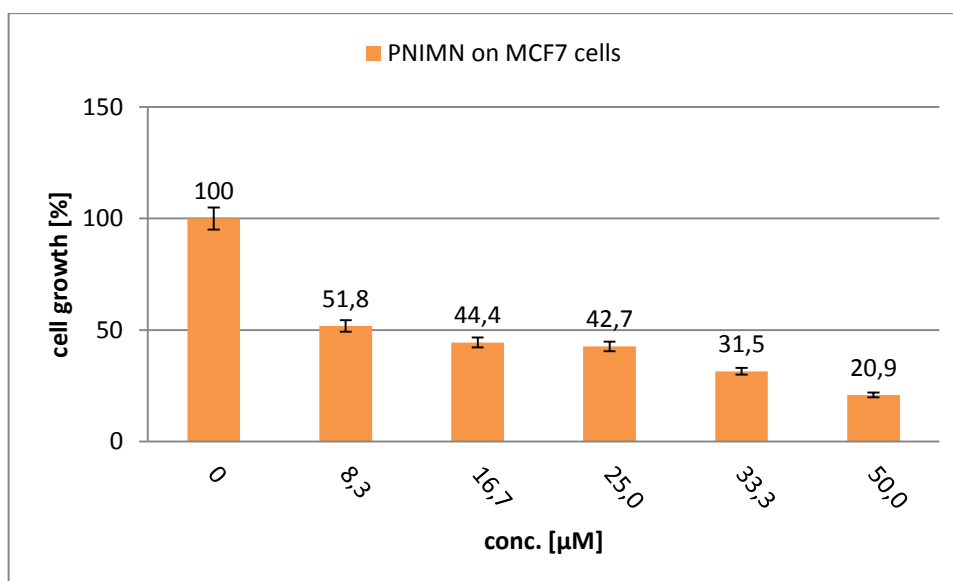


Abbildung 77: SRB-Test von PNIMN auf MCF7-Zellen (8,3 – 50 µM).

Es ist allerdings auch hier eine Verbesserung des Zellwachstums bei niedriger Nitronkonzentration zu erkennen (Abbildung 78). Bei einer Konzentration von 0,8 bzw. 1,7 µM, liegt die Steigerung bei 11 % bzw. 16,7 %, was deutlich ist. Die starke toxische Wirkung bei 5 µM, nur noch 35 % Wachstum im Vergleich zur Kontrolle, liegt unterhalb des Wertes von 8,3 µM (51,8 %) (Abbildung 77). Genauere Messungen im Konzentrationsbereich von 5 – 8 µM, sollten zeigen können, ob die Toxizität innerhalb dieses Bereiches kontinuierlich oder sprunghaft wieder abnimmt. Für die vorliegende Arbeit und das weitere Vorgehen innerhalb dieser, sind diese Messungen nicht von Bedeutung.

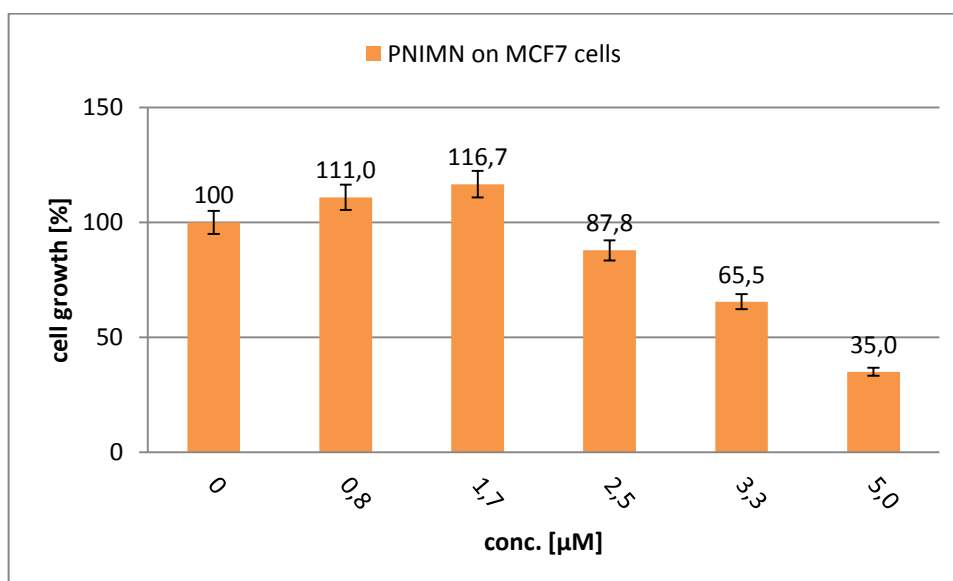


Abbildung 78: SRB-Test von PNIMN auf MCF7-Zellen (0,8 – 5 µM).

Bei HeLa-Zellen, ab einer Konzentration von 16,7 μM PNIMN, ist der toxische Effekt wesentlich stärker ausgeprägt (Abbildung 79). Ab einer Konzentration von 33,3 μM ist nahezu kein Zellwachstum mehr zu beobachten. Allerdings gibt es ein gesteigertes Zellwachstum bei einer Konzentration von 8,3 μM (8,6 %), die bei doppelter Nitronkonzentration fast halbiert wird (55,4 % Wachstum im Vergleich zur Kontrolle).

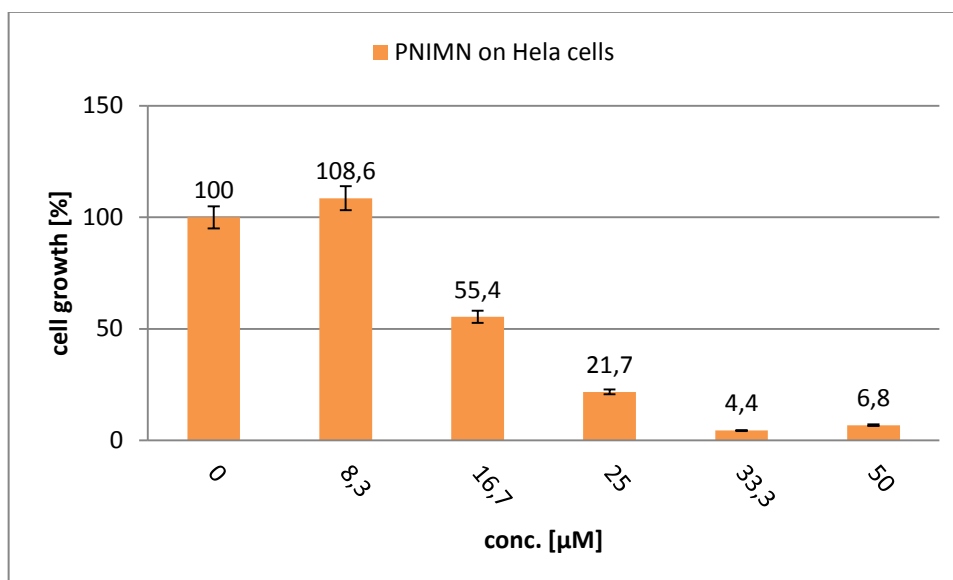


Abbildung 79: SRB-Test von PNIMN auf HeLa-Zellen (8,3 – 50 μM).

Innerhalb des Konzentrationsbereiches von 0,8 – 5 μM liegt das Zellwachstum konstant über 91 % (Abbildung 80). Für die *in vitro* Messungen, konnten diese atoxischen Konzentrationen nicht verwendet werden, da die Färbekraft von PNIMN (29) für die Zellen nicht ausreichend ist.

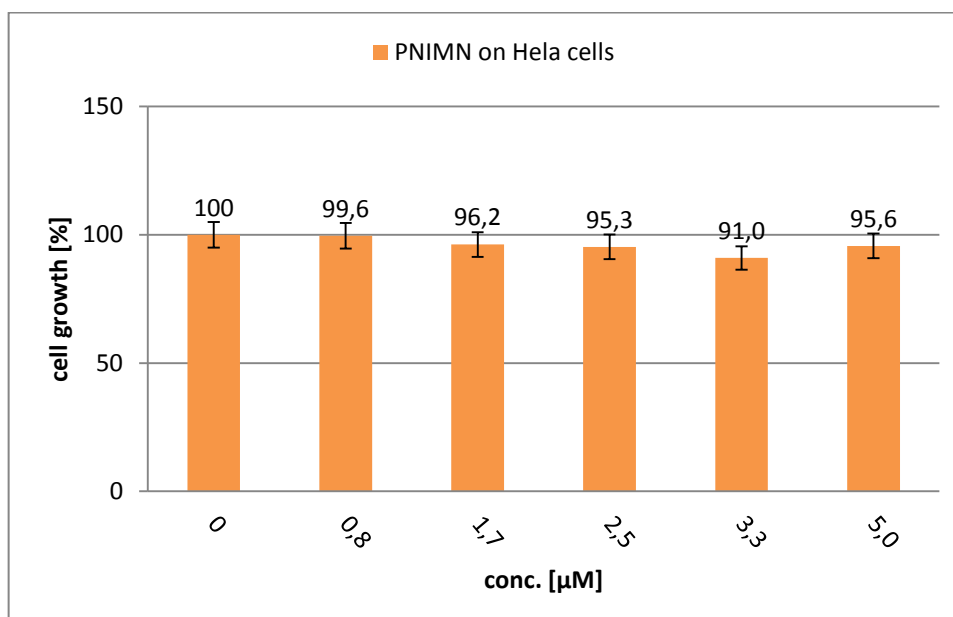
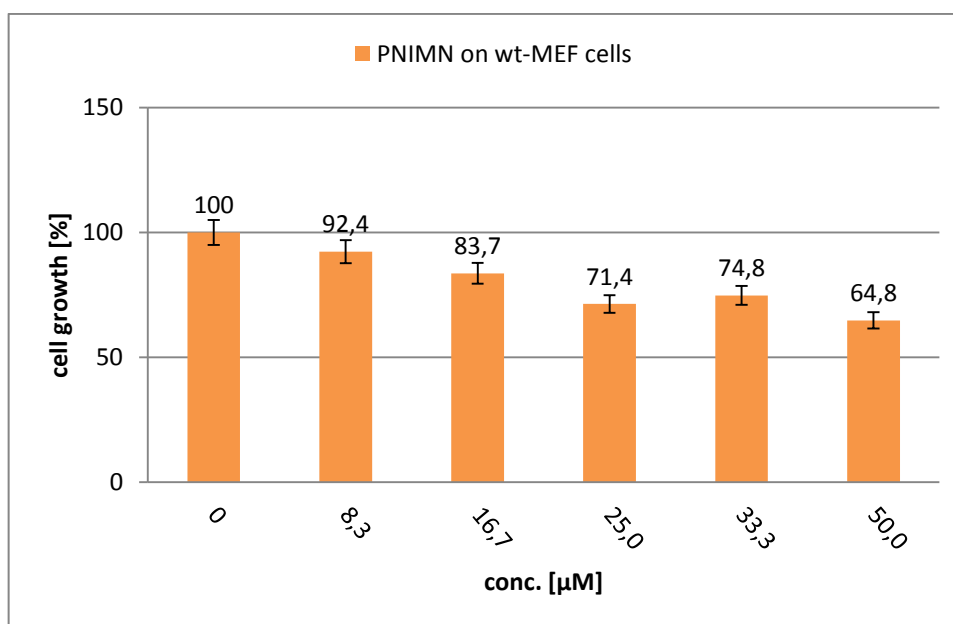


Abbildung 80: SRB-Test von PNIMN auf HeLa-Zellen (0,8 – 5 μM).**Abbildung 81: SRB-Test von PNIMN auf *wt*-MEF-Zellen (8,3 – 50 μM).**

Die *wt*-MEF-Zellen besitzen die stärkste Resistenz gegenüber PNIMN der getesteten Zelllinien (Abbildung 81). Bei einer Konzentration von 50 μM Nitron erhält man noch eine Wachstumsrate von 64,8 % gegenüber der Kontrolle. Dieser festgestellte Unterschied der Zytotoxizität, gegenüber den einzelnen Zelllinien, kann durch die unterschiedliche Ausprägung der Veränderung des Zellmetabolismus bei den unterschiedlichen Krebsarten und der gesunden Zelllinie erklärt werden.

3.4.4 SRB-Test mit 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin-*N*-oxid (24)

PNIEPO (24) ist das einzige cyclische Nitron (N-oxid) das hergestellt wurde. Seine Zytotoxizität gegenüber MCF7-Zellen, liegt im Bereich von PNIMN (29). Bei 33,3 μM Nitron ist der LD_{50} -Wert unterschritten (Abbildung 82). Mit einer Konzentration von 50 μM erhält man eine Wachstumsrate von nur noch 29,9 % in Bezug auf die Kontrolle. Da PNIEPO (24) eine sehr gute Färbekraft von Zellen besitzt, kann man es mit einer Konzentration von 5 μM auf den Zellen in den *in vitro* Messungen anwenden.

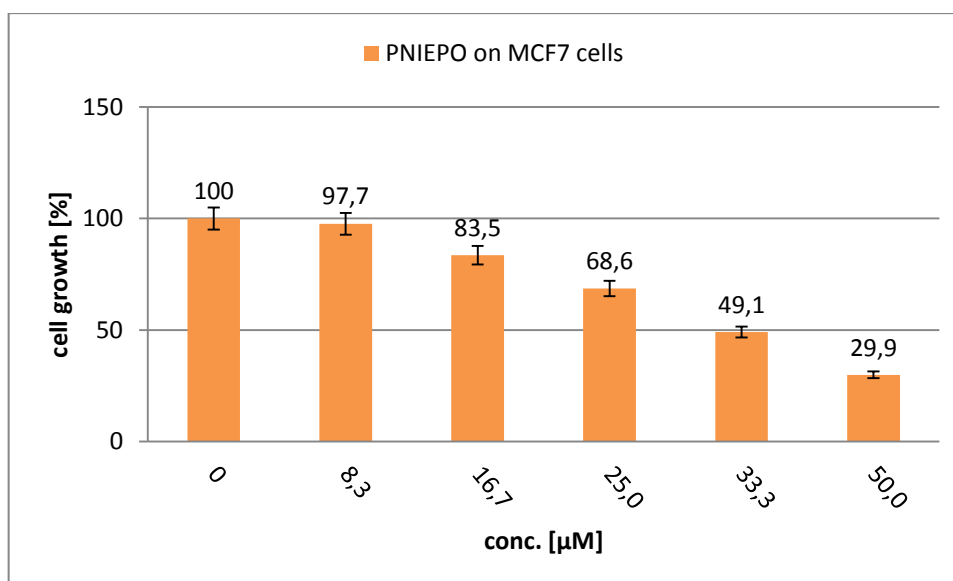


Abbildung 82: SRB-Test von PNIEPO auf MCF7-Zellen (8,3 – 50 μM).

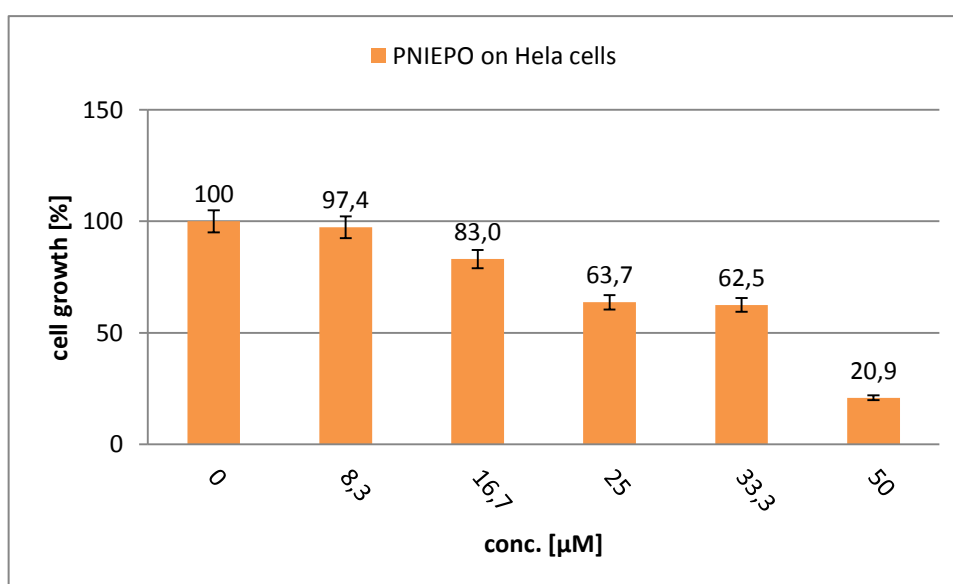


Abbildung 83: SRB-Test von PNIEPO auf HeLa-Zellen (8,3 – 50 μM).

Abbildung 83 zeigt die Ergebnisse des SRB-Tests von PNIEPO (**24**) auf HeLa-Zellen in einem Konzentrationsbereich von 8,3 – 50 μM . Auch hier ist eine hohe Toxizität bei einer Konzentration von 50 μM zu sehen, wobei eine Wachstumsrate von nur noch 20,9 % erhalten wird. Die Zytotoxizität gegenüber HeLa-Zellen ist der gegenüber MCF7-Zellen vergleichbar.

Zur Kontrolle wurde hier eine Messreihe mit Konzentrationen von 0,8 – 5 μM Nitron durchgeführt (Abbildung 84). Diese sollte auch zeigen, ob eine Steigerung des Zellwachstums, wie beispielsweise bei PNIMP (Abbildung 72) und PNIP (Abbildung 75)

zu sehen, erreicht wird. Die Zellen vertragen die niedrigen Nitronkonzentrationen gut und wachsen mit über 89,6 % im Vergleich zu der Kontrolle (Abbildung 84).

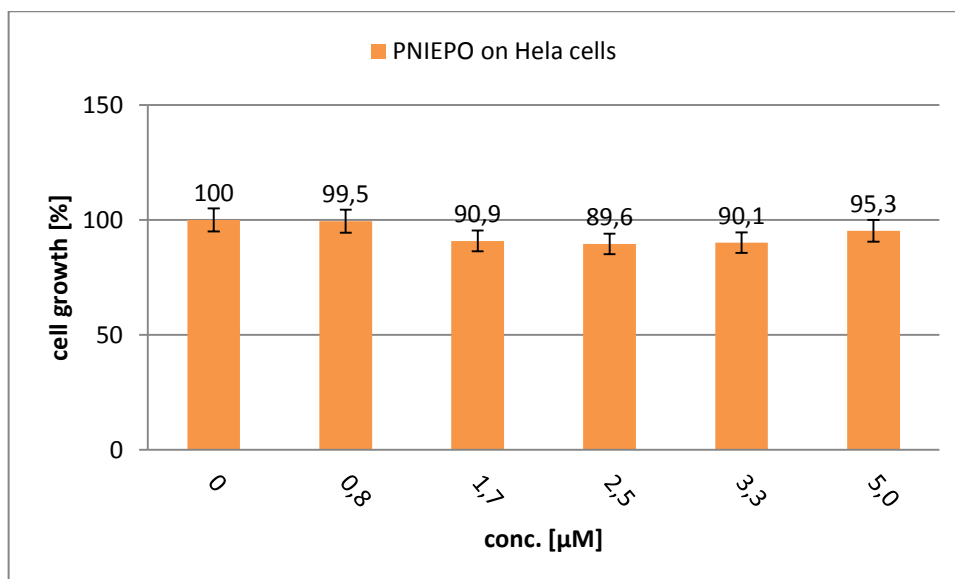


Abbildung 84: SRB-Test von PNIEPO auf HeLa-Zellen (0,8 – 5 μM).

Die Zytotoxizität von PNIEPO (24) gegenüber *wt*-MEF-Zellen (Abbildung 85) ist vergleichbar mit der des PNIMN (29) (Abbildung 81). Der LD_{50} -Wert wird innerhalb des Konzentrationsbereiches von 8,3 – 50 μM nicht erreicht und die Zellwachstumsraten liegen zwischen 59,1 % und 74,7 % Wachstum bezogen auf die Kontrolle.

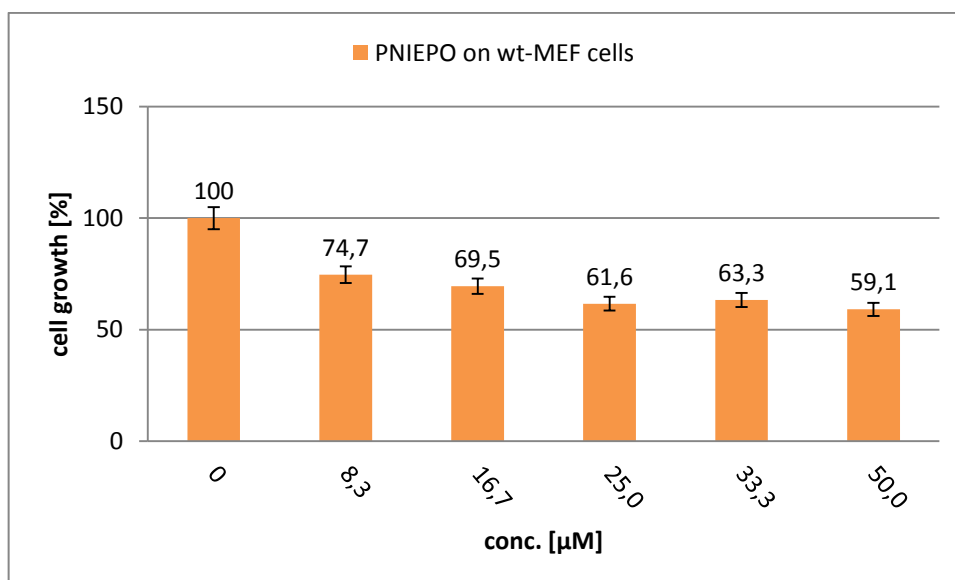


Abbildung 85: SRB-Test von PNIEPO auf *wt*-MEF-Zellen (8,3 – 50 μM).

3.4.5 Ergebnis der SRB-Tests

Die zytotoxikologischen Untersuchungen der synthetisierten Nitrone zeigten, dass alle synthetisierten Nitrone für die folgenden *in vitro* Versuche geeignet waren.

PNIMPN **11** ist für MCF7-Zellen im Konzentrationsbereich von 0,8 – 50 μM atoxisch. Alle Zellwachstumswerte liegen über 75 % im Vergleich mit der Kontrolle (Abbildung 70, Abbildung 71). Bei Hela-Zellen erhält man ein völlig anderes Ergebnis. Das Zellwachstum wird bei Konzentrationen von 4,2 – 16,7 μM teilweise sehr stark stimuliert (Abbildung 72). Ein offensichtlicher Grund für diese Stimulation könnte sein, dass PNIMN (**29**) in der Zelle bzw. in den Mitochondrien, eine antioxidative Wirkung haben. Sie binden freie Radikale in der Zelle und schützen die Zelle vor dem oxidativen Stress. In den späten 1990er Jahren, wurde von verschiedenen Forschungsgruppen, eine völlig andere Wirkweise der *spin traps*, anhand von PBN (α -Phenyl-*N*-*tert*-butylnitron), im Vergleich zu den Antioxidantien postuliert. Dabei geht man davon aus, dass die *spin traps*, Transkriptionsfaktoren, genauer gesagt NF- κ B regulierte Cytokine und induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), modulieren. Diese spielen bei AIDS, Arteriosklerose, Alzheimer und anderen proinflammatorischen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Dieser postulierte Mechanismus geht also eher von Reaktionen auf der Ebene proximal zur oxidationsempfindlichen Signalverstärkung aus, als von der einfachen Neutralisation von freien Radikalen (Pogrebniak *et al.*, 1992; Carney & Floyd, 1996; Kotake *et al.*, 1998; Floyd *et al.*, 1999; Sang *et al.*, 1999). Bei der Untersuchung von PNIMPN (**11**) auf *wt*-MEF-Zellen ist zu erkennen, dass die Zytotoxizität gegenüber dieser Zelllinie höher ist als bei den vorher getesteten Krebszelllinien (Abbildung 73). Der LD₅₀-Wert wird bei einer Konzentration von 33,3 μM Nitron nahezu erreicht (53,3 %).

PNIPN (**34**) besitzt im Vergleich zu PNIMPN (**11**) eine etwas höhere Zytotoxizität gegenüber MCF7-Zellen. Ab einer Konzentration von 25 μM liegt das Zellwachstum bei nur noch ca. 55 % in Bezug auf die Kontrolle (Abbildung 74). Hela-Zellen vertragen PNIPN (**34**) recht gut. Dies zeigt das leicht stimulierte Zellwachstum bei einer Nitronkonzentration von 8,3 μM und 16,7 μM (Abbildung 75). Das Wachstum bei Konzentrationen ab 33,3 μM , liegt im Vergleich zum PNIMPN (**11**) ca. 20 % höher, was bedeutet, dass das PNIPN (**34**) eine geringere Zytotoxizität besitzt als PNIMPN (**11**).

PNIMN (**29**) und PNIEPO (**24**) sind beides Nitrone, deren LD₅₀-Werte mit den untersuchten Konzentrationen, erhalten werden konnten. Die Zytotoxizität bei MCF7-Zellen, ist bei PNIMN (**29**) (Abbildung 77) stärker als bei PNIEPO (**24**) (Abbildung 82). PNIMN (**29**) wirkt

bereits ab einer Konzentration von 8,3 μM sehr zytotoxisch. Der LD_{50} -Wert ist mit 51,8 % Zellwachstum nahezu erreicht. Bei höheren Konzentrationen liegen die Wachstumsraten unter 50 % und bei 50 μM Nitron bei 20,9 % Zellwachstum (Abbildung 77). Bei geringer Konzentration ist allerdings eine moderate Stimulation des Zellwachstums von MCF7- und Hela-Zellen, wie bereits bei PNIMPN (11) und PNIPN (34) beschrieben, zu beobachten (Abbildung 78 und Abbildung 79). Im Konzentrationsbereich von 0,8 – 5 μM , liegt die Wachstumsrate bei über 91 % auf Hela-Zellen (Abbildung 80). PNIEPO (24) unterschreitet den LD_{50} -Wert bei einer Konzentration von 33,3 μM (49,1 % Zellwachstum) (Abbildung 82). Eine stimulierende Wirkung auf das Zellwachstum von MCF7-Zellen, bei geringeren Konzentrationen, konnte nicht beobachtet werden.

Im Konzentrationsbereich von 8,3 – 33,3 μM PNIMN (29) auf *wt*-MEF-Zellen, liegt das Zellwachstum bei über 71 % gegenüber der Kontrolle. Bei 50 μM liegt dieser Wert noch bei 64,8 % (Abbildung 81) und ist damit gut verträglich für diese Zelllinie.

PNIEPO (24) ist für Hela-Zellen von 0,8 – 8,3 μM sehr gut verträglich (Abbildung 83 und Abbildung 84). Das Zellwachstum liegt bei über 90,9 %. 50 μM PNIEPO (24) ist hingegen sehr zytotoxisch, bei 20,9 % Wachstumsrate. *wt*-MEF-Zellen tolerieren Konzentrationen von 8,3 – 50 μM gut (Abbildung 85). Wachstumsstimulation, bei Zugabe von PNIEPO (24) konnte, im Gegensatz zu den anderen Nitronen, bei keiner Zelllinie und niedrigen Konzentrationen, nicht festgestellt werden.

Trotz der teilweise nachgewiesenen Zytotoxizität von PNIMN (29) und PNIEPO (24) gegenüber den, in dieser Arbeit, verwendeten Zelllinien, kann eine Untersuchung der Affinität zur Akkumulation und Reaktionsfähigkeit gegenüber ROS innerhalb der Zellen, durchgeführt werden. Die Inkubationszeiten bei den folgenden c-LSM-Messungen, liegen im Minutenbereich, während die Zellen bei dem SRB-Test 72 Stunden mit den Nitronen inkubiert wurden. Die Ergebnisse müssen aber unter dem Hintergrund der vorhandenen Zytotoxizität der Verbindungen, ausgewertet und bewertet werden.

3.5 *In vitro* Untersuchungen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop

Um die Bildung von ROS auf subzellulärer Ebene zu untersuchen, wurden *in vitro* Experimente an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop durchgeführt. Dafür wurden MCF7-, *wt*-MEF- und Hela-Zellen mit einer Nitron-DMSO-Lösung angefärbt und nach Zugabe eines mitochondrialen Atmungsketteinhibitors (Antimycin A und/oder Rotenon) überprüft, ob es zu einer Löschung bzw. zu einer Abnahme der Fluoreszenz kommt. Rotenon

hemmt dabei den Elektronentransport von Komplex I (NADH-Dehydrogenase) der mitochondrialen Atmungskette (Swanson *et al.*, 2009) und Antimycin A die Elektronenübertragung von Coenzym Q auf Cytochrom c durch Bindung an Komplex III (Huang *et al.*, 2005).

Es wurden zudem Messungen mit dem Farbstoff TMRE durchgeführt, um zu überprüfen, ob, und wenn ja, wo sich die Nitrone **18** und **29** innerhalb der Zelle akkumulieren (Farkas *et al.*, 1989). Des Weiteren wurden die verwendeten Zellen mit Atmungsketteninhibitoren inkubiert, um zu überprüfen, ob es durch die entstehenden Stoffwechselprodukte, wie z.B. NADPH (Lakowicz, 2006) zu einer Eigenfluoreszenz kommt, welche die folgenden *in vitro* Experimente stören könnte.

3.5.1 Eigenfluoreszenz-Versuche an MCF7-Zellen

Um zu ermitteln, ob eine Eigenfluoreszenz der verwendeten Zelllinien nach Inhibitorzugabe, auf Grund der auftretenden Stoffwechselprodukte, eine Beeinträchtigung der eigentlichen Messungen verursachen könnte, wurden MCF7-Zellen in Abwesenheit von Nitronen mit den beiden Atmungsketteninhibitoren, Rotenon und Antimycin A, inkubiert und unter dem konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop untersucht.

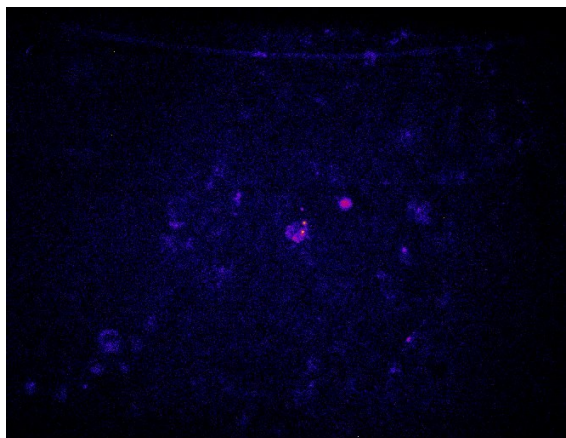


Abbildung 86: Eigenfluoreszenz der MCF7-Zellen nach Inkubation mit Rotenon und Antimycin A ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).

Abbildung 86 zeigt die Entstehung von fluoreszierenden Stoffwechselprodukten, am Beispiel von MCF7-Zellen, verursacht durch die Inhibierung der Atmungskette und daraus resultierender ROS-Bildung. Diese Fluoreszenz ist im Vergleich mit den Messungen mit TMRE und den späteren Experimenten mit den Nitronen sehr gering, und hat daher auf diese *in vitro* Experimente mit fluoreszierenden Nitronen keinen bedeutenden Einfluss. Dies ist darin begründet, dass die Belichtungszeit für die *in vitro* Experimente, bei $\leq 800\text{ms}$ liegen.

Demgegenüber liegen die Belichtungszeiten bei der Messung der Eigenfluoreszenz bei ≥ 3500 ms. Dadurch wird die Helligkeit/Intensität der Fluoreszenz erhöht. Für die anderen Zelllinien erhielt man ein vergleichbares Ergebnis.

3.5.2 *In vitro* Akkumulationsversuche

Um zu überprüfen, ob und wo sich die synthetisierten Nitrone in der Zelle akkumulieren, wurden vergleichende Messungen mit TMRE durchgeführt. Da sich die, in unserem Arbeitskreis bereits synthetisierten Stilbennitronen in den Mitochondrien akkumulieren (Hauck, 2007), wurden die in der vorliegenden Arbeit neu synthetisierten Nitrone, daraufhin untersucht. TMRE dient als Referenzfarbstoff, da es sich spezifisch in den Mitochondrien akkumuliert (Farkas *et al.*, 1989).

3.5.2.1 Akkumulation von PNIMPN (11)

Aus Abbildung 87 ist deutlich zu erkennen, dass sich das synthetisierte Nitron PNIMPN in den Mitochondrien, hier von MCF7-Zellen, akkumuliert. Dies zeigt die „gelbe Mischfarbe“ der überlagerten Bilder von Nitron- (A) und TMRE-Färbung (B) in Bild C. Dadurch konnten die weiteren *in vitro* Experimente mit diesem Nitron durchgeführt werden.

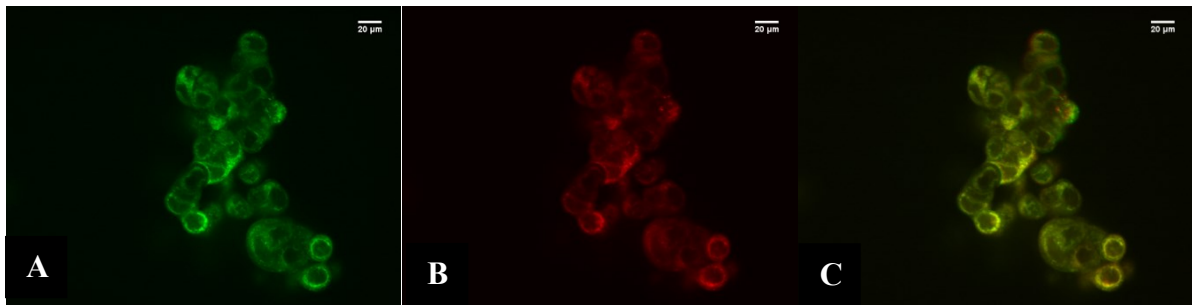


Abbildung 87: MCF7-Zellen nach Inkubation mit A) PNIMPN ($\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm); B) TMRE ($\lambda_{\text{ex}} = 561$ nm); C) Überlagerung von A und B.

3.5.2.2 Akkumulation von PNIPN (34)

Das neu synthetisierte Nitron PNIPN akkumuliert in den Mitochondrien von MCF7-Zellen (Abbildung 88 C) und war somit für weitere *in vitro* Experimente nutzbar.

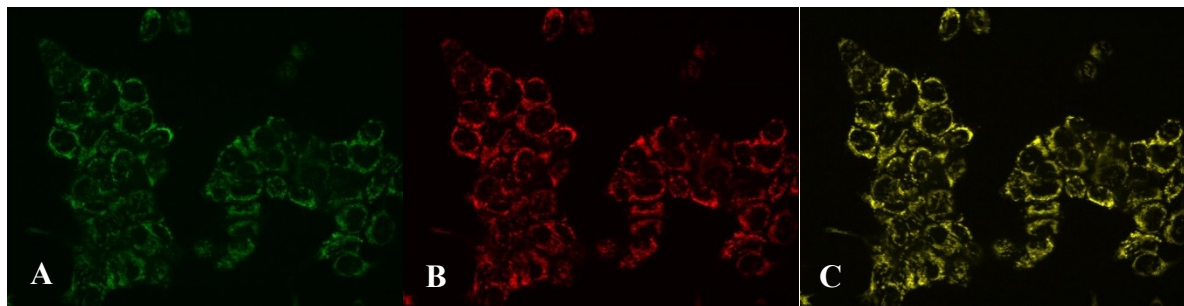


Abbildung 88: MCF7-Zellen nach Inkubation mit A) PNIPN ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$); B) TMRE ($\lambda_{\text{ex}} = 561 \text{ nm}$); C) Überlagerung von A und B.

3.5.2.3 Akkumulation von PNIMN (29)

Das Nitron PNIMN akkumuliert ebenfalls in den Mitochondrien, hier im speziellen von *wt*-MEF Zellen. Allerdings ist eine leichte grüne Färbung in Bild C (Abbildung 89) zu erkennen. Dies zeigt, dass sich das Nitron, in weiteren, unbestimmten Zellorganellen ebenfalls akkumuliert. Der Vergleich mit dem DNA färbenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4'-6-Diamidin-2-phenylindol), konnte auf Grund eines fehlenden Lasers zur Anregung bei 358 nm nicht durchgeführt werden. Diese Akkumulation ist sehr gering, so dass die weiteren *in vitro* Experimente ohne Probleme durchführbar waren.

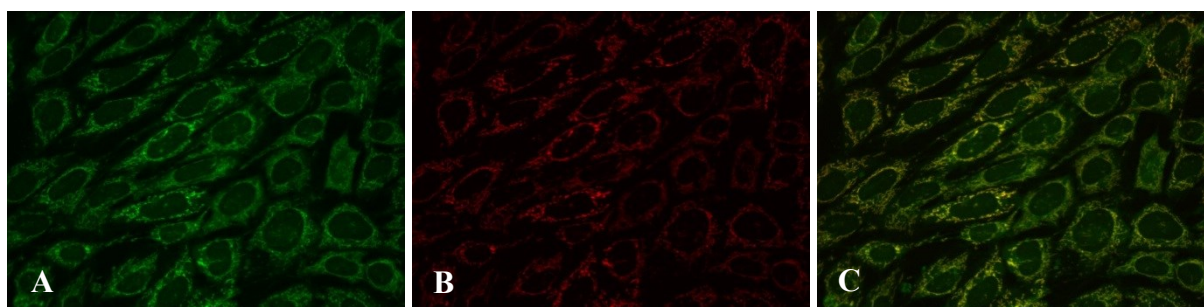


Abbildung 89: *wt*-MEF-Zellen nach Inkubation mit A) PNIMN ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$); B) TMRE ($\lambda_{\text{ex}} = 561 \text{ nm}$); C) Überlagerung von A und B.

3.5.2.4 Akkumulation von PNIEPO (24)

Das cyclische Nitron PNIEPO (24) akkumuliert, wie auch PNIMN (29), nicht nur in den Mitochondrien, hier von Hela-Zellen, sondern überaus stark in Teilen des Zellkerns. Dies ist, auf Grund der grünen Färbung in Bild C (Abbildung 90) zu erkennen. Der Vergleich mit dem DNA färbenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4'-6-Diamidin-2-phenylindol), konnte auf Grund

eines fehlenden Lasers zur Anregung bei 358 nm nicht durchgeführt werden. Vergleichsmessungen mit einem zellkernspezifischen Farbstoff durch A. Karbach, lassen vermuten, dass sich PNIEPO (24), neben den Mitochondrien, auch in den *Nucleoli* im Zellkern akkumulieren. Auch dieses Nitron war zur weiteren Untersuchung geeignet und somit wurden die *in vitro* Experimente durchgeführt.

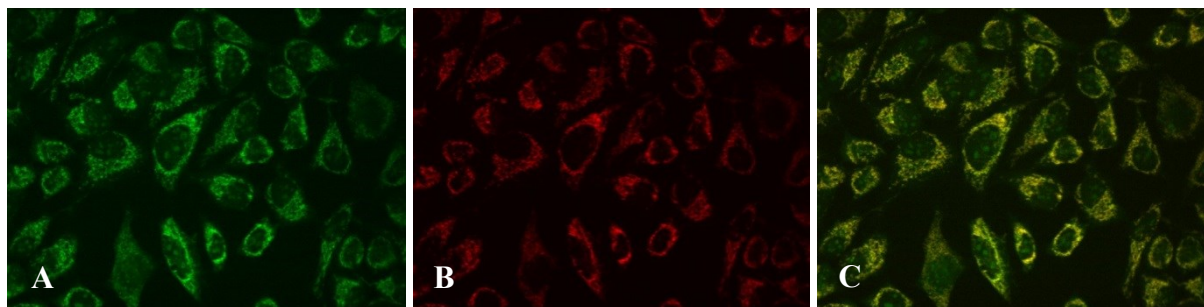


Abbildung 90: Hela-Zellen nach Inkubation mit A) PNIEPO ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$); B) TMRE ($\lambda_{\text{ex}} = 561 \text{ nm}$); C) Überlagerung von A und B.

3.5.3 *In vitro* Untersuchungen mit PNIPN (34)

3.5.3.1 *Bleaching* von PNIPN (34)

Bevor die eigentlichen Messungen mit den Atmungsketteninhibitoren durchgeführt werden konnten, musste zunächst die Fluoreszenzstabilität der Verbindung innerhalb der späteren Messzeit überprüft werden. Hierzu wurde die Zellprobe mit PNIPN 20 min inkubiert und anschließend unter den gleichen Geräteeinstellungen vermessen (*bleaching*).

In Abbildung 91 ist der Fluoreszenzverlauf über 15 min, von, mit PNIP-Nitron angefärbten MCF7-Zellen auf subzellulärer Ebene, zu sehen. Es zeigte sich zwar eine Abnahme der Fluoreszenz innerhalb des Messzeitraumes, die im Vergleich zur Inhibitorzugabe (Abbildung 92), nicht signifikant war. Eine statistische Auswertung dieser Abnahme konnte auf Grund von Softwareproblemen nicht quantitativ ausgewertet werden, da sich das *auto gain* am verwendeten konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop nicht ausstellen lies und somit eine automatische Helligkeitsanpassung der aufgenommenen Bilderserien nicht verhindert werden konnte.

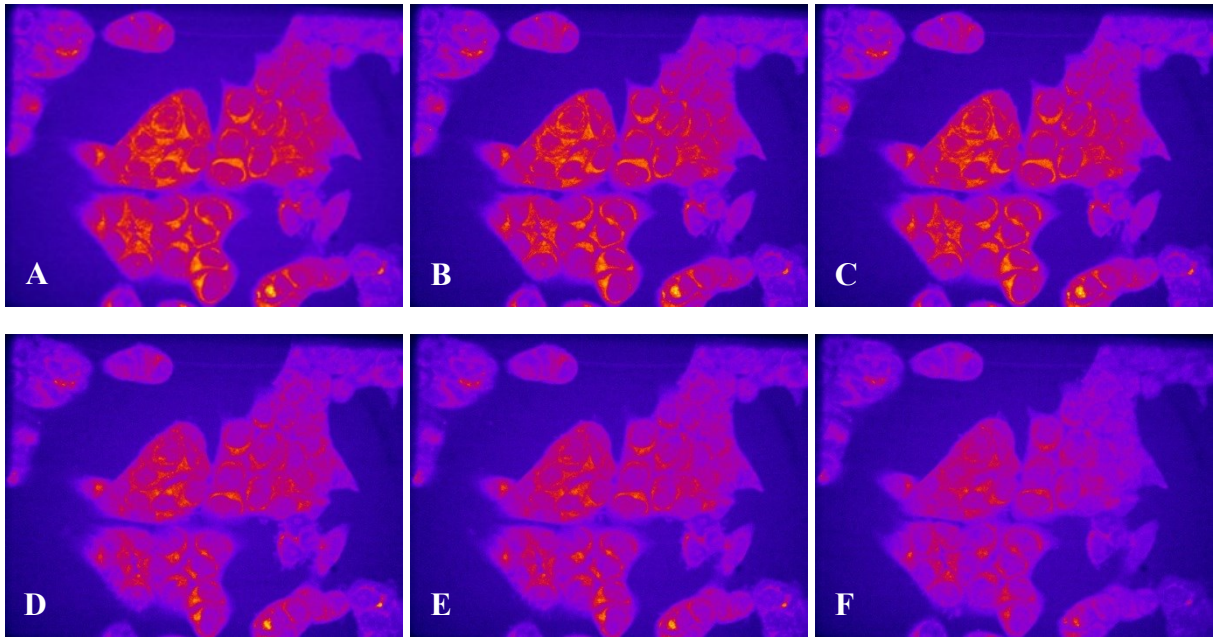


Abbildung 91: MCF7-Zellen inkubiert mit 50 μM PNIP-Nitron-Lösung. A) 0 s, B) 30 s Messung, C) 60 s Messung, D) 120 s Messung, E) 5 min Messung, F) 15 min Messung ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).

3.5.3.2 Fluoreszenzlöschung mit Rotenon

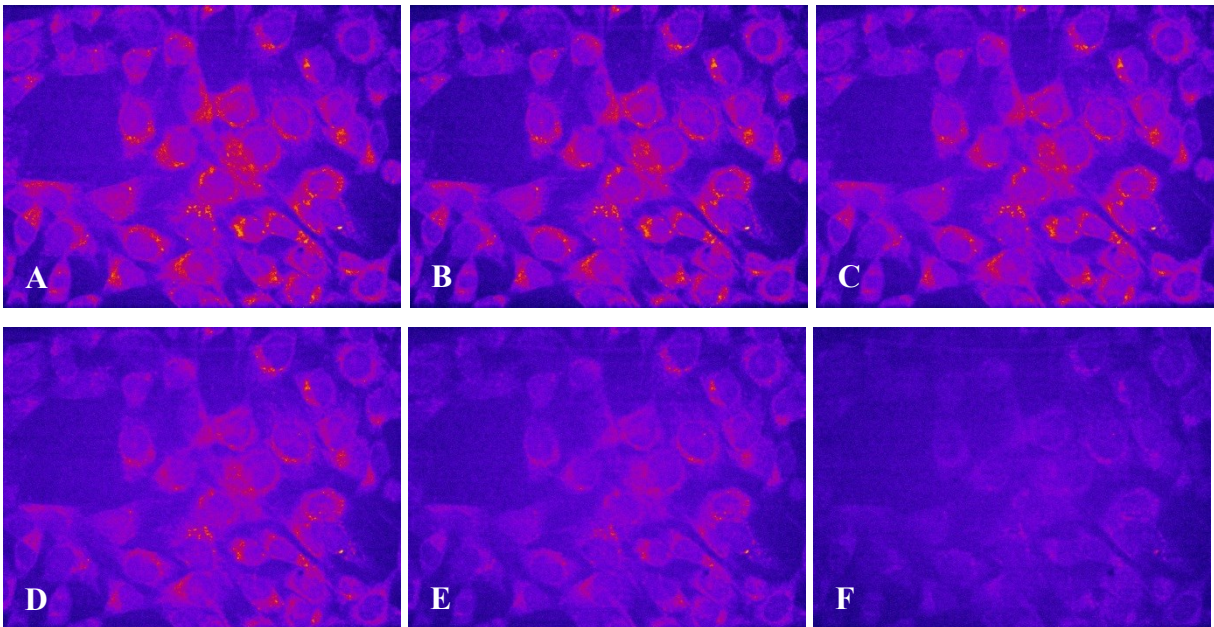


Abbildung 92: *wt*-MEF-Zellen inkubiert mit 50 μM PNIP-Nitron-Lösung und Zugabe des Inhibitors Rotenon (0,2 μM). A) vor Inhibitor-Zugabe, B) 30 s nach Zugabe, C) 60 s nach Zugabe, D) 120 s nach Zugabe, E) 3 min nach Zugabe, F) 5 min nach Zugabe ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).

Abbildung 92 zeigt den zeitlichen Verlauf des Abfalls der Fluoreszenz, von, mit PNIP-Nitron (34) inkubierten, *wt*-MEF-Zellen, unter Einwirkung des Inhibitors Rotenon (0,2 μM). Man erkennt deutlich die Abnahme der Fluoreszenz nach 3 min (Bild E). Nach 5 min ist nur noch

sehr wenig Fluoreszenz zu beobachten (Bild F). Im Vergleich zu dem *bleaching* Experiment (Abbildung 91), ist eine schnellere Fluoreszenzlöschung zu erkennen, die sich deutlich von der Löschung durch das Einwirken des Lasers unterscheidet.

3.5.3.3 Fluoreszenzlöschung mit Antimycin A

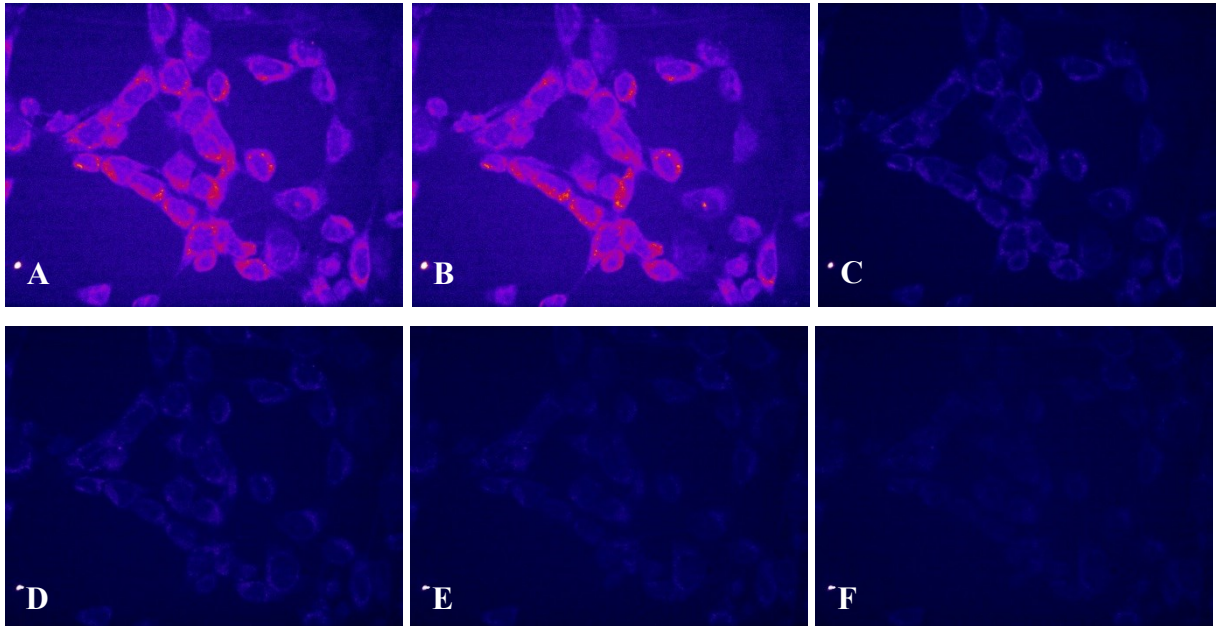


Abbildung 93: *wt*-MEF-Zellen inkubiert mit 50 μM PNIP-Nitron-Lösung und Zugabe des Inhibitors Antimycin A (7,5 μM). A) vor Inhibitor-Zugabe, B) 60 s nach Zugabe, C) 60 s nach Zugabe (Beispiel für das *auto gain*), D) 120 s nach Zugabe, E) 3 min nach Zugabe, F) 5 min nach Zugabe ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).

Der zeitliche Fluoreszenzverlauf nach der Zugabe des Inhibitors Antimycin A (7,5 μM) auf, mit PNIP-Nitron (34) inkubierte, *wt*-MEF-Zellen, ist in Abbildung 93 zu sehen. Wie bereits bei der Zugabe von Rotenon (Abbildung 92) zu sehen war, fällt die Fluoreszenzintensität nach 3 min (Bild E) ab. Die Bilder B und C (Abbildung 93) zeigen die bereits angesprochenen Probleme mit dem *auto gain* des verwendeten konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskops auf. Die Belichtung des Bildes wurde in Bild C so stark verändert, dass das aufgenommene Bild wesentlich dunkler erscheint und man somit fälschlicherweise, von einer starken Löschung ausgehen könnte, welche bei der Beobachtung der „realen“ Aufzeichnung auf dem Bildschirm während der Messung, nicht zu beobachten war. Der Vergleich der Bilder C und E belegt hingegen die beobachtete Abnahme der Fluoreszenz nach 3 min.

3.5.3.4 Fluoreszenzlöschung mit Rotenon und Antimycin A

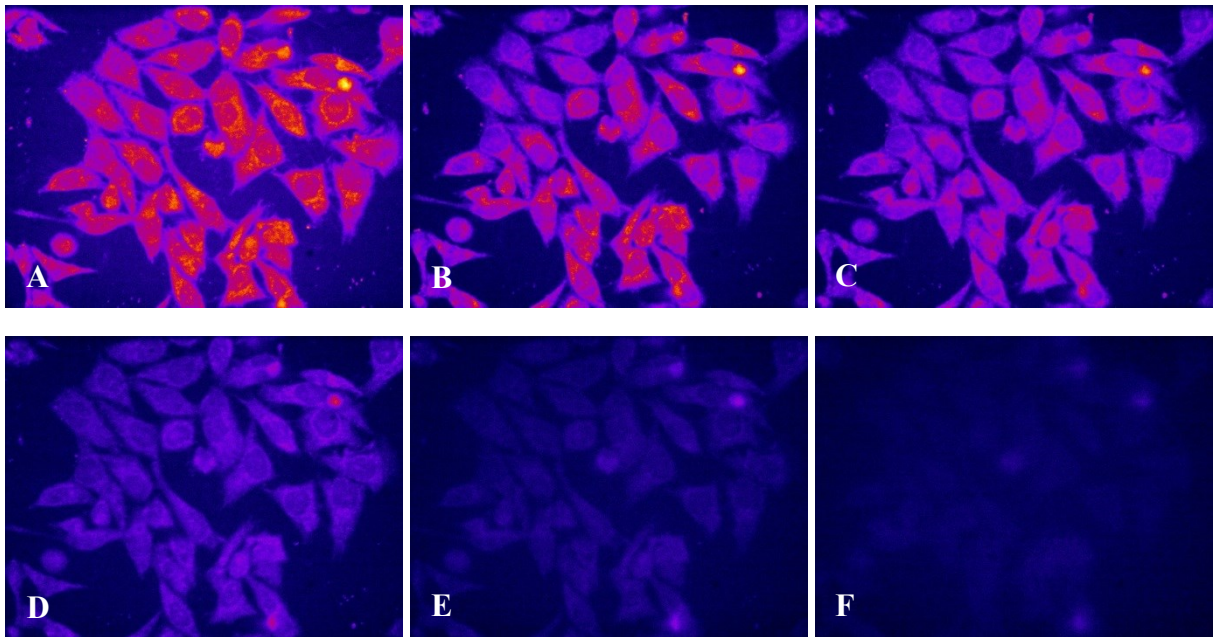


Abbildung 94: MCF7-Zellen inkubiert mit 50 μM PNIP-Nitron-Lösung und Zugabe der Inhibitoren (0,2 μM Rotenon und 7,5 μM Antimycin A). A) vor Inhibitor-Zugabe, B) 8 s nach Zugabe, C) 12 s nach Zugabe, D) 16 s nach Zugabe, E) 20 s nach Zugabe, F) 50 s nach Zugabe ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).

Abbildung 94 zeigt die Abnahme der Fluoreszenz von, mit PNIP-Nitron (**18**) angefärbten, MCF-7-Zellen auf subzellulärer Ebene bei der Zugabe von beiden Inhibitoren. Bereits 12 Sekunden nach der Zugabe der Atmungsketteinhibitoren Rotenon und Antimycin A wurde eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz festgestellt (Bild C), welche nach 16 Sekunden deutlich erkennbar unterhalb von $t_{1/2}$ liegt (Bild D) und nach 50 Sekunden nahezu vollständig erloschen ist (Bild F). Im Vergleich zu dem *bleaching* Experiment ist die Abnahme der Fluoreszenz innerhalb der ersten Minute nach Zugabe der Inhibitoren sehr deutlich zu erkennen (Abbildung 91, Bild C). Auch im Vergleich mit den Versuchen bei separater Zugabe der beiden Inhibitoren, ist eine deutlich schnellere Abnahme der Fluoreszenz zu erkennen. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da die Zugabe von zwei Inhibitoren, die an unterschiedlichen Komplexen der Atmungskette wirken, sollten eine höhere Konzentration von ROS freisetzen, die dementsprechend schneller mit dem Nitron reagieren und dadurch eine zeitlich abhängige Löschung der Fluoreszenz bewirken.

3.5.4 *In vitro* Untersuchungen mit PNIMN (29)

3.5.4.1 *Bleaching* von PNIMN (29)

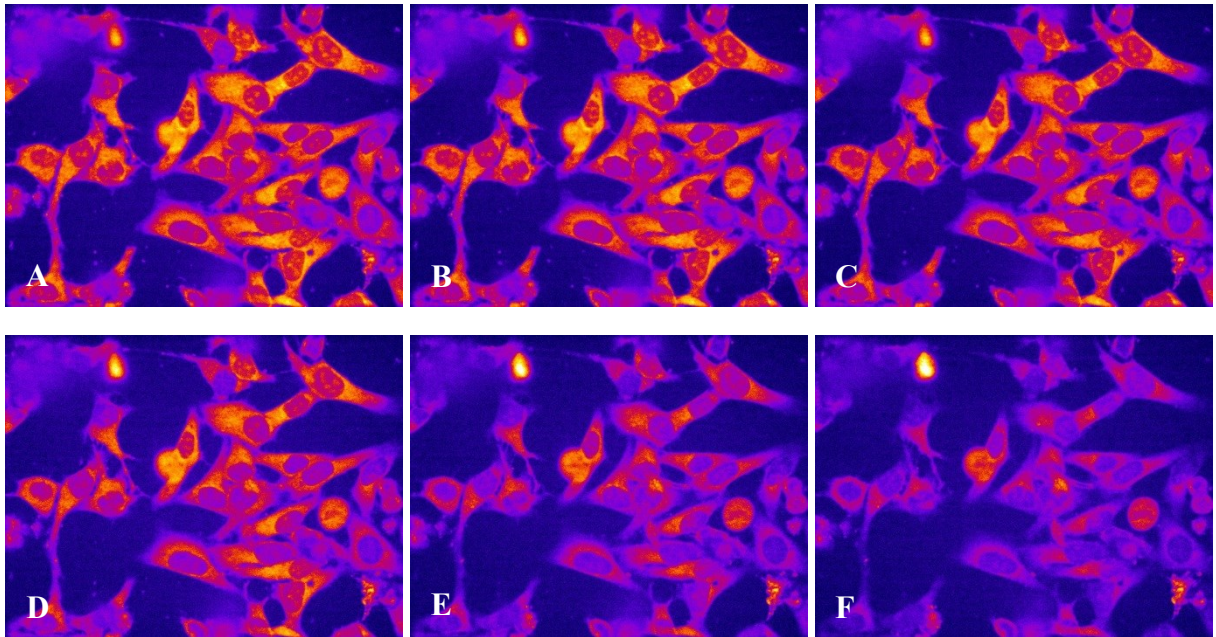


Abbildung 95: HeLa-Zellen inkubiert mit 50 μM PNIMN-Nitron-Lösung. A) 0 s, B) 30 s Messung, C) 60 s Messung, D) 5 min Messung, E) 10 min Messung, F) 15 min Messung ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).

Für das *bleaching* wurden hier HeLa-Zellen für 20 min mit 20 μM PNIMN (29) inkubiert und anschließend eine Messreihe über 15 min gestartet. In Abbildung 95 ist zu erkennen, dass das zu untersuchende Nitron seine Fluoreszenz innerhalb des Messzeitraumes behält und somit zur weiteren Untersuchung mit den Inhibitoren verwendet werden konnte.

3.5.4.2 Fluoreszenzlöschung mit Rotenon

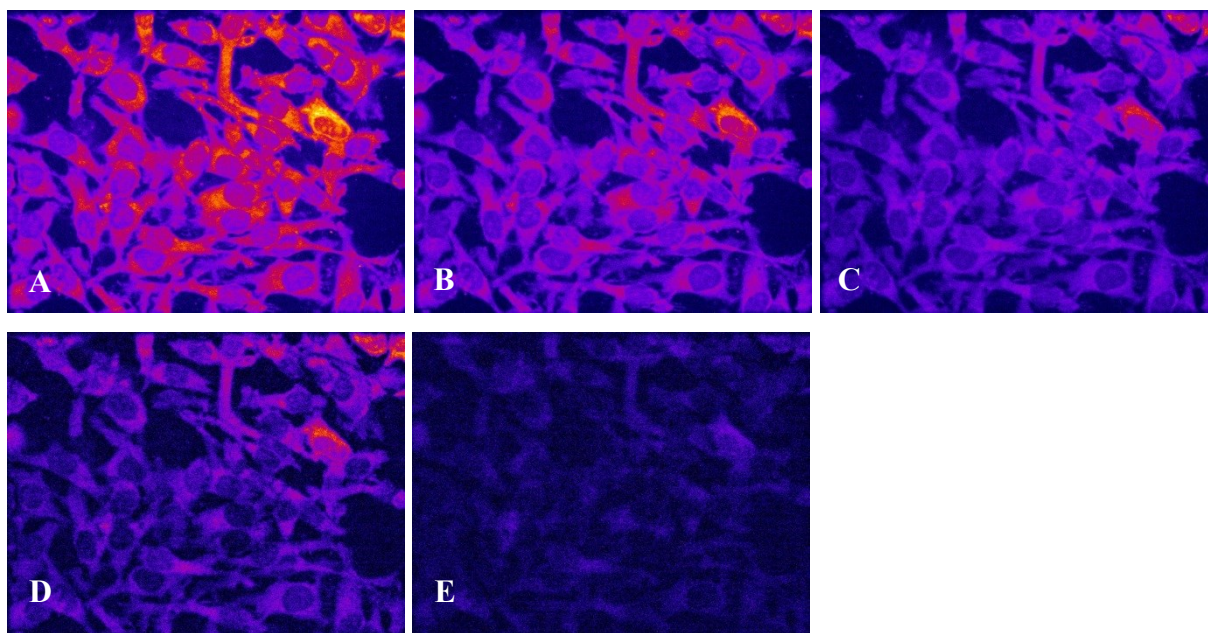


Abbildung 96: HeLa-Zellen inkubiert mit 50 μM PNIM-Nitron-Lösung und Zugabe des Inhibitors Rotenon (0,2 μM). A) vor Inhibitor-Zugabe, B) 8 s nach Zugabe, C) 30 s nach Zugabe, D) 60 s nach Zugabe, E) 180 s nach Zugabe ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).

Nach Zugabe des Atmungsketteninhibitors Rotenon, ist eine Abnahme der Fluoreszenz unter den Wert von $t_{1/2}$ nach 30 Sekunden zu erkennen (Abbildung 96, Bild C). Nach 3 Minuten ist fast keine Fluoreszenz mehr zu beobachten. Diese Abnahme der Fluoreszenz ist, im Vergleich zum vorher beschriebenen PNIPN (**34**), deutlich schneller (Abbildung 92). Daraus lässt sich ableiten, dass eine Verkürzung des Restes am Fluorophor (Phenyl zu Ethyl), eine Steigerung der Reaktivität mit ROS zur Folge hat.

3.5.4.3 Fluoreszenzlöschung mit Antimycin A

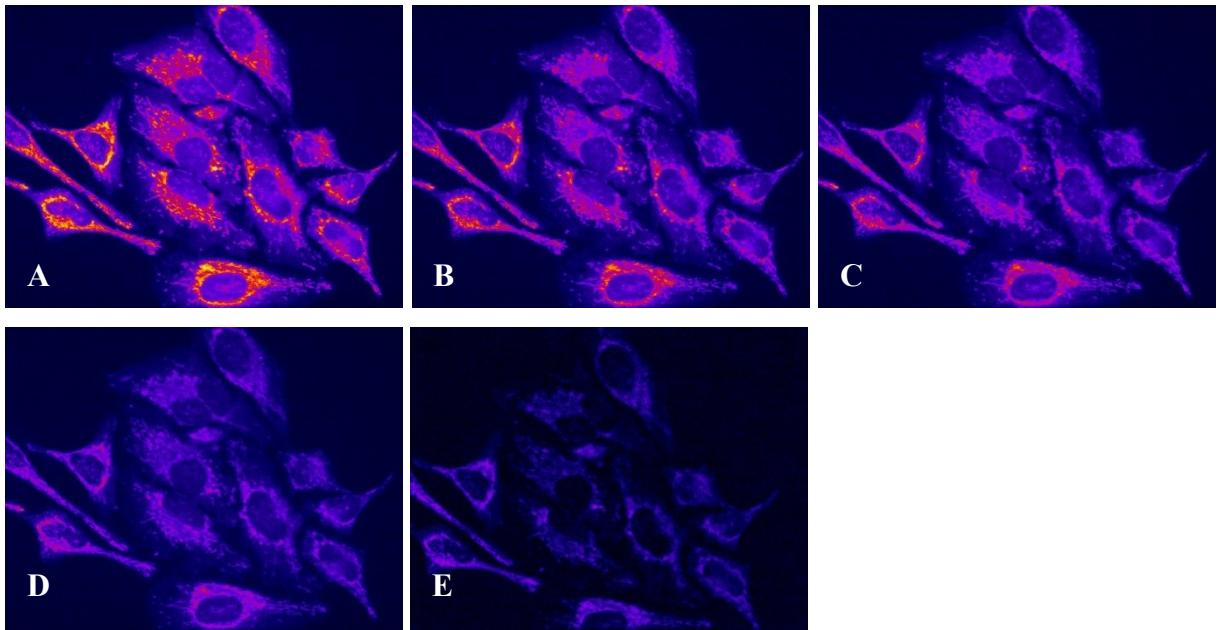


Abbildung 97: HeLa-Zellen inkubiert mit 50 μM PNIM-Nitron-Lösung und Zugabe des Inhibitors Antimycin A (7,5 μM). A) vor Inhibitor-Zugabe, B) 4 s nach Zugabe, C) 30 s nach Zugabe, D) 50 s nach Zugabe, E) 70 s nach Zugabe ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).

Nach Zugabe von Antimycin A, ist eine sichtbare Abschwächung der Fluoreszenz bereits nach 4 Sekunden zu beobachten (Abbildung 97, Bild B). Nach 50 Sekunden ist die Fluoreszenzabnahme so stark, dass diese nicht mehr über das *bleaching* durch den Laser zu erklären ist (Bild D). Die Fluoreszenzlöschung ist bei Zugabe von Antimycin A als Inhibitor, etwas langsamer als bei Rotenon, allerdings ist auch hier ein deutlicher Effekt durch die ROS-Bildung in den Mitochondrien zu erkennen.

3.5.4.4 Fluoreszenzlöschung mit Rotenon und Antimycin A

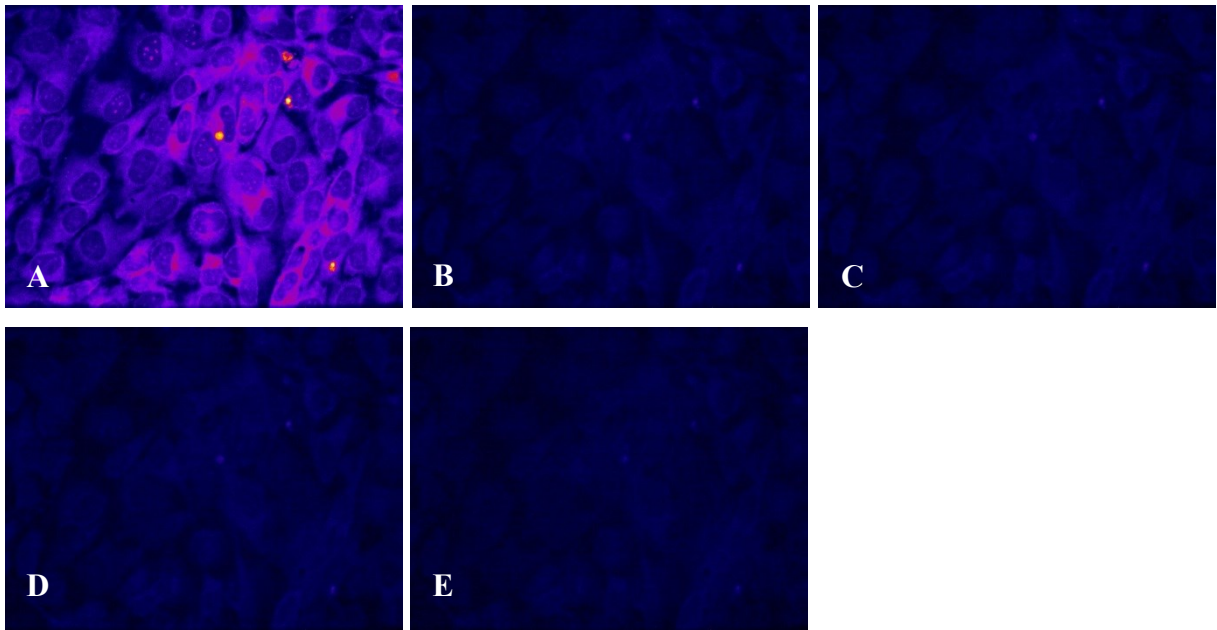


Abbildung 98: MCF7-Zellen inkubiert mit 50 μM PNIM-Nitron-Lösung und Zugabe der Inhibitoren (0,2 μM Rotenon und 7,5 μM Antimycin A). A) vor Inhibitor-Zugabe, B) 2 s nach Zugabe, C) 10 s nach Zugabe, D) 20 s nach Zugabe, E) 40 s nach Zugabe ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).

Abbildung 98 zeigt den Fluoreszenzverlauf nach Zugabe beider Inhibitoren, Rotenon und Antimycin A. Die Fluoreszenz ist bereits nach 2 Sekunden gelöscht (Bild B). Dieser schnelle Abfall der Fluoreszenz ist im Einklang mit der Theorie, dass die Konzentration an ROS, bei der Zugabe von zwei, an jeweils unterschiedlichen Komplexen der Atmungskette eingreifenden, Inhibitoren, steigt. Somit reagieren mehr ROS-Moleküle in gleicher Zeit mit den Nitronmolekülen ab und die Fluoreszenz der Nitrone wird gequencht.

3.5.5 *In vitro* Untersuchungen mit PNIMPN (11)

3.5.5.1 *Bleaching* von PNIMPN (11)

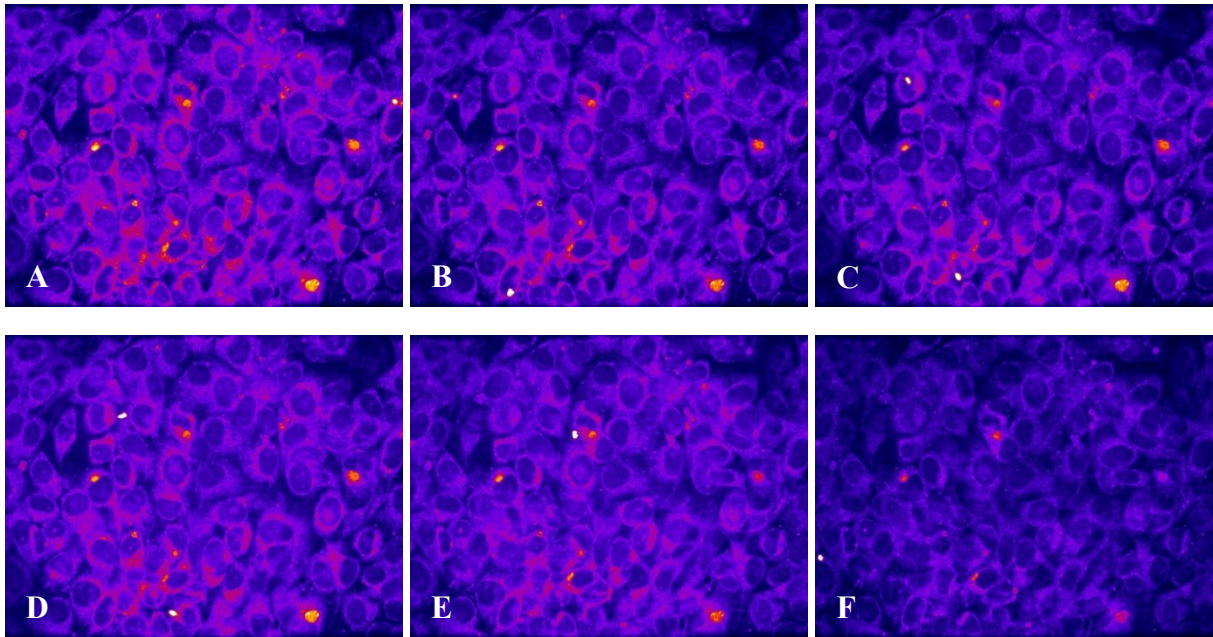


Abbildung 99: *wt*-MEF-Zellen inkubiert mit 50 μ M PNIMP-Nitron-Lösung. A) 0 s, B) 30 s Messung, C) 60 s Messung, D) 120 s Messung, E) 10 min Messung, F) 15 min Messung ($\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm).

Für die *bleaching* Experimente wurden hier *wt*-MEF-Zellen für 20 min mit 20 μ M PNIMPN (11) inkubiert und anschließend eine Messreihe über 15 min gestartet. In Abbildung 99 ist zu erkennen, dass die Fluoreszenz des zu untersuchenden Nitrons zwar leicht abnimmt, aber dennoch eine ausreichend hohe Fluoreszenz, innerhalb des relevanten Messzeitraumes (2 min, Bild D) behält. Somit kann es zur weiteren Untersuchung mit den Inhibitoren verwendet werden.

3.5.5.2 Fluoreszenzlöschung mit Rotenon

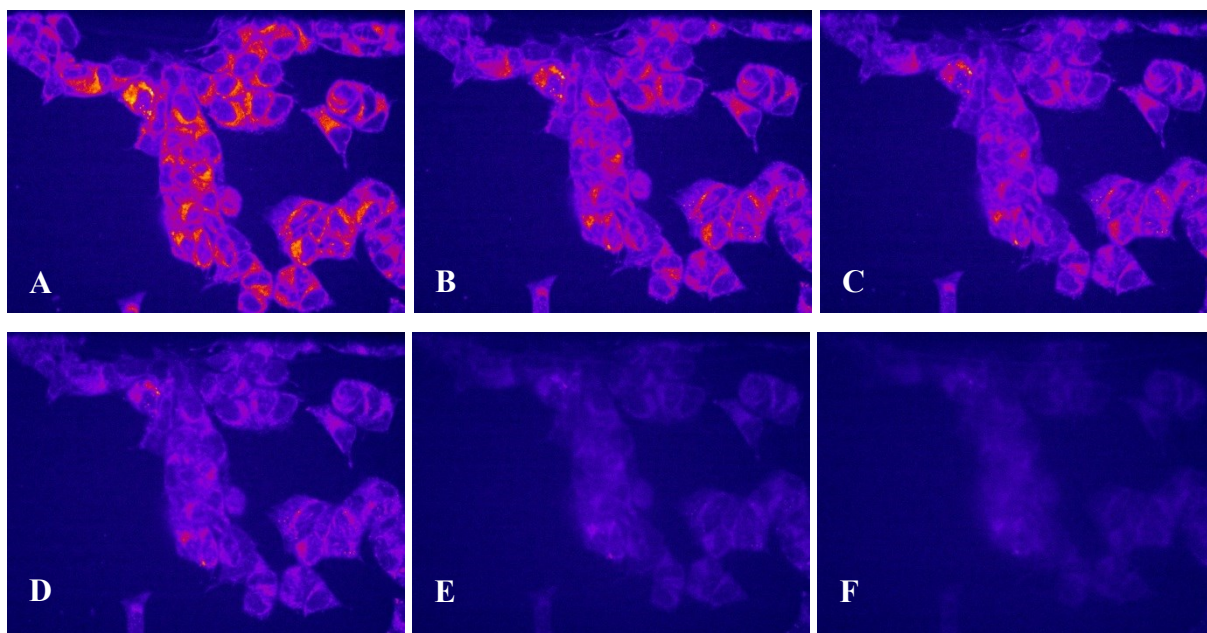


Abbildung 100: MCF7-Zellen inkubiert mit 50 μM PNIMP-Nitron-Lösung und Zugabe des Inhibitors Rotenon (0,2 μM). A) vor Inhibitor-Zugabe, B) 30 s nach Zugabe, C) 50 s nach Zugabe, D) 60 s nach Zugabe, E) 120 s nach Zugabe, F) 180 s nach Zugabe ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).

Zur Untersuchung des PNIMP-Nitrons (**11**), unter der Verwendung von Rotenon als Atmungsketten-Inhibitor, wurden hier MCF7-Zellen über 20 Minuten mit dem Nitron inkubiert und anschließend der Inhibitor zugegeben. Der Fluoreszenzverlauf ist in Abbildung 100 zu sehen. Man erkennt die Abnahme der Fluoreszenz nach 30 Sekunden (Bild B). Nach 60 Sekunden (Bild D) ist immer noch eine deutliche Fluoreszenz zu erkennen, die nach 2 bzw. 3 Minuten (Bilder E, F) nahezu vollständig erloschen ist.

3.5.5.3 Fluoreszenzlöschung mit Antimycin A

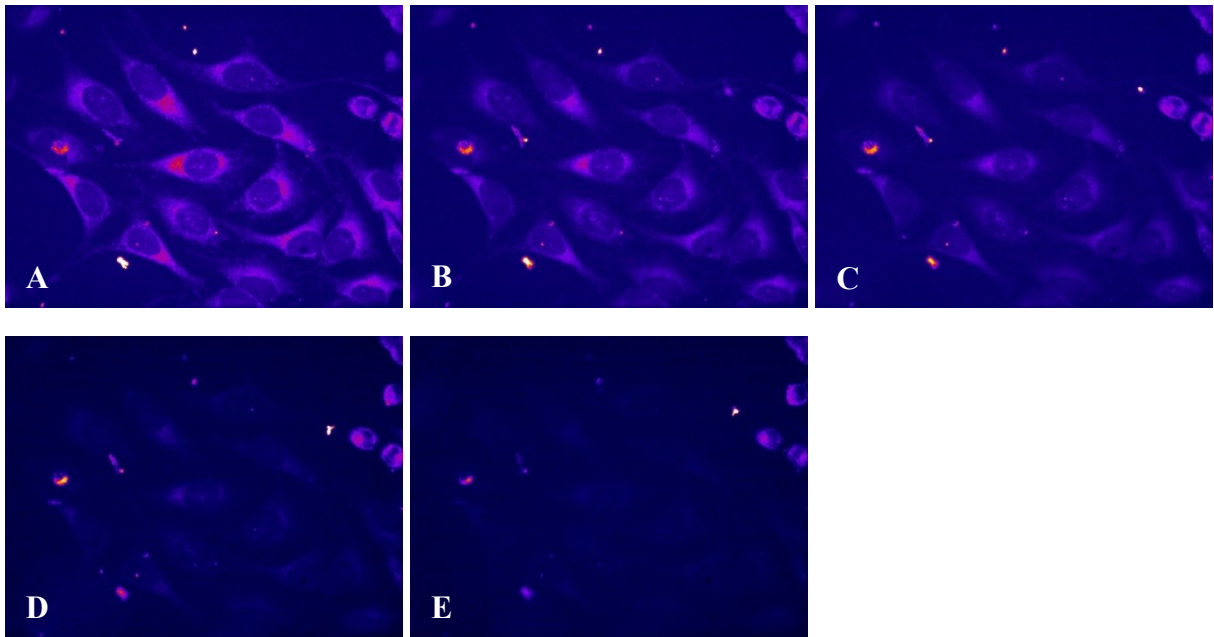


Abbildung 101: Hela-Zellen inkubiert mit 50 µM PNIMP-Nitron-Lösung und Zugabe des Inhibitors Antimycin A (7,5 µM). A) vor Inhibitor Zugabe, B) 10 s nach Zugabe, C) 30 s nach Zugabe, D) 60 s nach Zugabe, E) 120 s nach Zugabe ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).

Die Untersuchung mit Antimycin A als Inhibitor zeigt einen Abfall der Fluoreszenzintensität bereits 10 Sekunden nach Zugabe des Inhibitors (Abbildung 101, Bild B). Nach 60 Sekunden ist die Fluoreszenz nahezu komplett gelöscht (Bild D).

3.5.5.4 Fluoreszenzlöschung mit Rotenon und Antimycin A

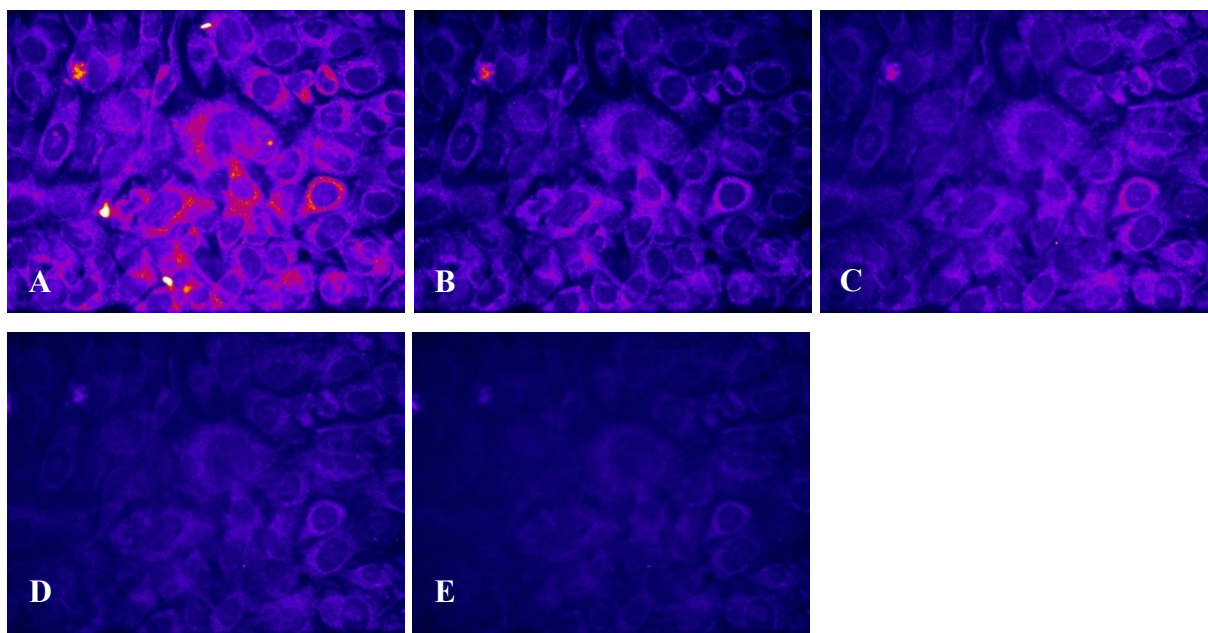


Abbildung 102: MCF7-Zellen inkubiert mit 50 µM PNIMP-Nitron-Lösung und Zugabe der (0,2 µM Rotenon und 7,5 µM Antimycin A). A) vor Inhibitor-Zugabe, B) 10 s nach Zugabe, C) 60 s nach Zugabe, D) 90 s nach Zugabe, E) 120 s nach Zugabe ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).

Der Einsatz beider Inhibitoren hat bei PNIMPN nicht den, wie beispielsweise bei dem PNIMN (**29**) beobachteten, Effekt, dass sich die Zeit bis zur vollständigen Fluoreszenzlöschung, so drastisch (von 30 s auf 2 s) verkürzt (Abbildung 98). Allerdings ist auch hierbei zu erkennen, dass bereits nach 10 Sekunden eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz erfolgt ist (Abbildung 102, Bild B). Der vermeintlich zu beobachtende Anstieg der Fluoreszenz in Bild C, ist in dem *auto gain* des Gerätes begründet. Hierbei wurde die Blendenweite automatisch vergrößert und dadurch erscheint die Fluoreszenz erhöht. Nach 90 Sekunden ist die Fluoreszenz deutlich gelöscht (Bild D).

3.5.6 *In vitro* Untersuchungen mit PNIEPO (24)

3.5.6.1 *Bleaching* von PNIEPO (24)

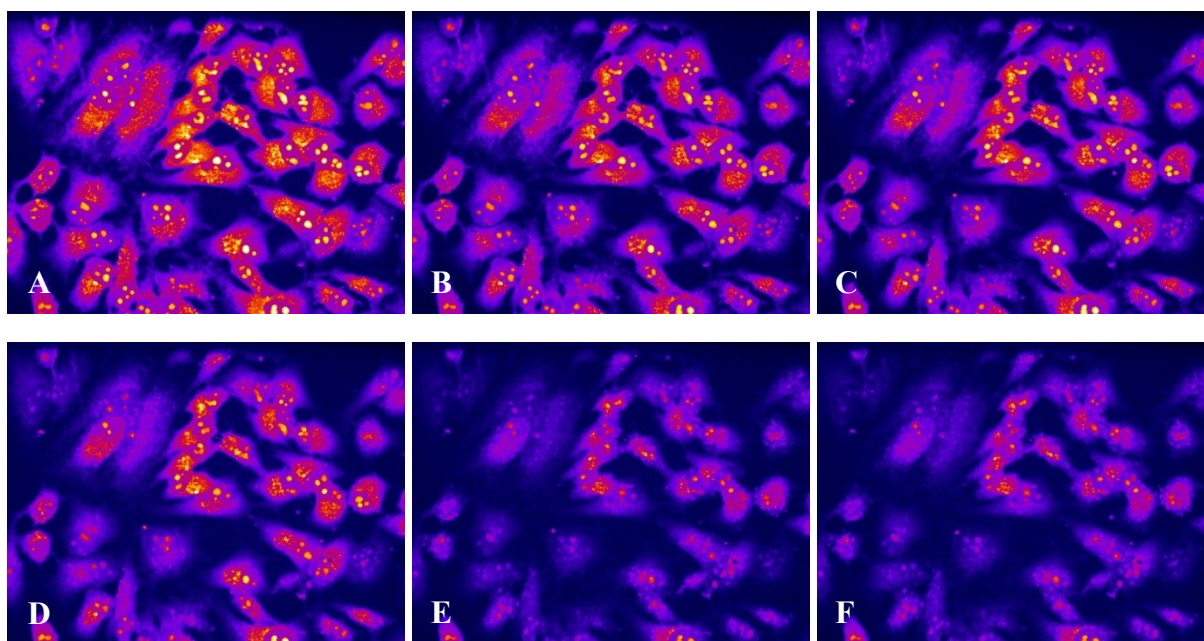


Abbildung 103: Hela-Zellen inkubiert mit 5 μM PNIEPO-Lösung. A) 0 s, B) 30 s Messung, C) 60 s Messung, D) 120 s Messung, E) 10 min Messung, F) 15 min Messung ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).

Zur Untersuchung der Fluoreszenzstabilität von PNIEPO (24), ist hier in Abbildung 67, exemplarisch die Messreihe von, mit PNIEPO (24) inkubierten Hela-Zellen zu sehen. Was im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Nitronen auffällt, ist, dass sich, bei mit PNIEPO (24) inkubierten Zellen, *hotspots* ausbilden. Dies sind Orte erhöhter Konzentrationen von Nitronen. Während bei den anderen Nitronen der Zellkern deutlich abgegrenzt zu sehen ist, scheint sich hier das PNIEPO (24) ebenfalls im Zellkern zu akkumulieren. Wie bereits zu Beginn der *in vitro* Versuche dargestellt, lies sich eine Vergleichsmessung mit DAPI, auf Grund des fehlenden Lasers, nicht durchführen, um diese Hypothese untersuchen zu können. Allerdings liegt es nahe, dass es sich bei den, im Zellkern angefärbten Bereiche, um die *Nucleoli* handelt (siehe Kap. 3.5.2.4). Zudem besitzt PNIEPO (24), im Vergleich mit den anderen Nitronen, eine wesentlich bessere Färbekraft für Zellen. Die eingesetzte Konzentration an PNIEPO (24) liegt um das 10-fache niedriger, wodurch eine geringere Belastung bzw. weniger Stress für die Zellen zur Folge hat.

Die Fluoreszenz ist zwar nur bis ca. 2 Minuten in einem akzeptablen Intensitätsbereich (Bild D), allerdings ist diese Zeitspanne völlig ausreichend für die weiteren Untersuchungen mit den Hemmstoffen. Diese geringere Stabilität des PNIEPO (24), ist indessen nicht pauschal auf

die Wirkung des Lasers zu beziehen, da die, zu den übrigen Nitronen, divergente Akkumulationseigenschaft, auch einen anderen beziehungsweise überhaupt einen Einfluss auf die Reaktionen innerhalb der Zelle selbst haben kann.

3.5.6.2 Fluoreszenzlöschung mit Rotenon

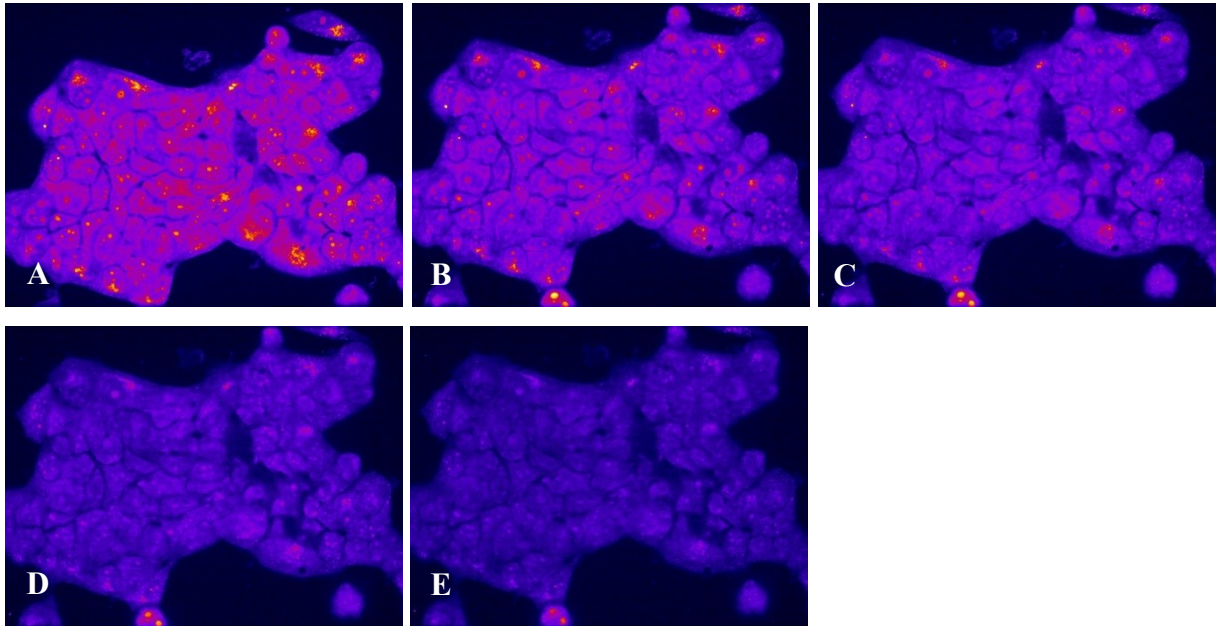


Abbildung 104: MCF7-Zellen inkubiert mit 5 μM PNIEPO-Lösung und Zugabe des Inhibitors Rotenon (0,2 μM). A) vor Inhibitor-Zugabe, B) 15 s nach Zugabe, C) 25 s nach Zugabe, D) 40 s nach Zugabe, E) 55 s nach Zugabe ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).

Abbildung 104 zeigt den Fluoreszenzverlauf, exemplarisch anhand von, mit PNIEPO (**24**) inkubierten, MCF-7-Zellen und der Zugabe des Atmungsketten-Inhibitors Rotenon. Die Fluoreszenzabnahme nach 15 Sekunden ist deutlich zu erkennen (Bild B), und nach 55 Sekunden sind die Bereiche mit starker Fluoreszenz erloschen (Bild E). Allerdings bleibt über diese Zeit hinaus die Fluoreszenz stabil und nimmt innerhalb der nächsten 15 Minuten nicht mehr weiter ab (nicht im Bild).

3.5.6.3 Fluoreszenzlöschung mit Antimycin A

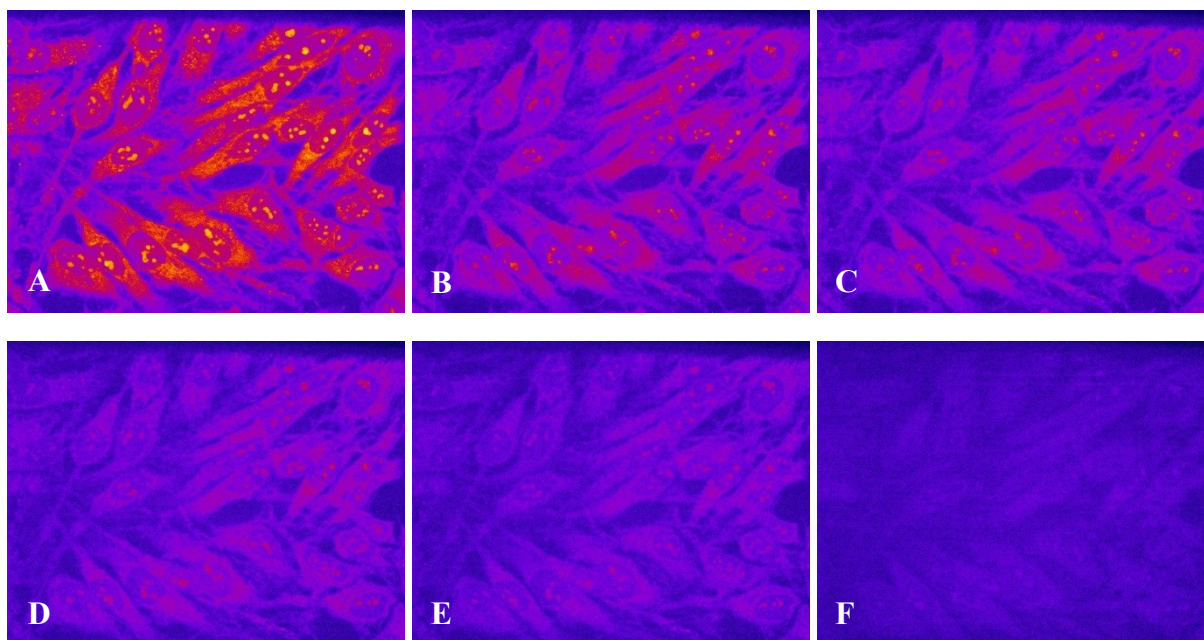


Abbildung 105: Hela-Zellen inkubiert mit 5 μM PNIPO-Lösung und Zugabe des Inhibitors Antimycin A (7,5 μM). A) vor Inhibitor-Zugabe, B) 3 s nach Zugabe, C) 10 s nach Zugabe, D) 15 s nach Zugabe, E) 20 s nach Zugabe, F) 25 s nach Zugabe ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).

Den Fluoreszenzverlauf bei Einwirken von Antimycin A, ist exemplarisch anhand von, mit PNIPO (24) inkubierten, Hela-Zellen in Abbildung 105 zu sehen. Auch hier erkennt man die charakteristische Anfärbung der Zellen. Bereits nach 3 Sekunden (Bild B) ist eine deutliche Fluoreszenzabnahme zu sehen. Bereits nach 25 Sekunden (Bild F) ist die Fluoreszenz, bis auf die bereits oben beschriebene „stabile“ Fluoreszenz gelöscht.

3.5.6.4 Fluoreszenzlöschung mit Rotenon und Antimycin A

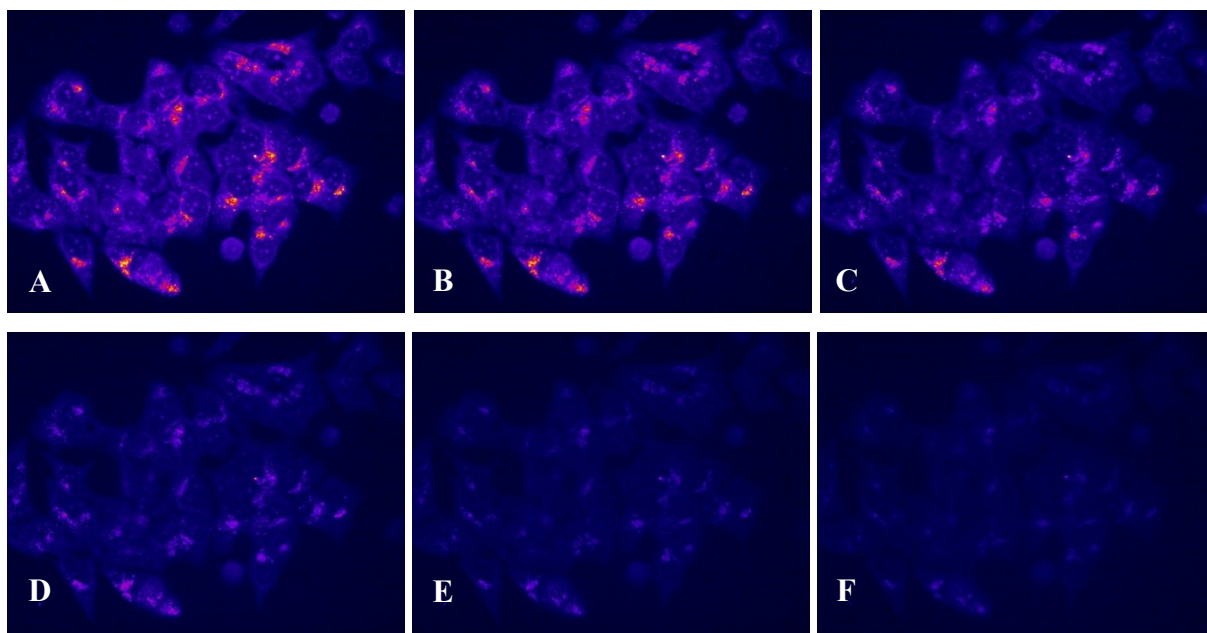


Abbildung 106: MCF7-Zellen inkubiert mit 5 μM PNIEPO-Lösung und Zugabe der Inhibitoren (0,2 μM Rotenon und 7,5 μM Antimycin A). A) vor Inhibitor-Zugabe, B) 20 s nach Zugabe, C) 50 s nach Zugabe, D) 120 s nach Zugabe, E) 4 min nach Zugabe, F) 6 min nach Zugabe ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$).

In Abbildung 106 ist der Fluoreszenzverlauf von PNIEPO (**24**) nach Zugabe beider Inhibitoren, Rotenon und Antimycin A, auf MCF7-Zellen zusehen. Man erkennt eine deutliche Löschung der Fluoreszenz nach 50 Sekunden (Bild C). Dies bedeutet, dass im Vergleich zu der alleinigen Zugabe von Antimycin A (Abbildung 105), eine langsamere Fluoreszenzlöschung eintritt, obwohl mehr ROS entstehen. Für dieses Ergebnis gibt es bisher keine Erklärung. Die zuvor bereits beobachtete „stabile“ Fluoreszenz, kann auch in diesem Experiment nach 6 Minuten beobachtet werden (Bild F).

3.5.7 Ergebnis der *In vitro* Untersuchungen

Die Eigenfluoreszenz der Zellen, durch fluoreszierende Stoffwechselprodukte beziehungsweise durch Reaktionen mit ROS nach Zugabe der Atmungsketteninhibitoren, Rotenon und Antimycin A, ist vorhanden (Abbildung 86). Diese ist allerdings vernachlässigbar gering, da sie erst bei langer Belichtungszeit ($\geq 1500 \text{ ms}$) detektiert werden kann und somit während der Messungen nicht in Erscheinung tritt.

Alle im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Nitrone akkumulieren sich vorwiegend in den Mitochondrien. Dadurch eignen sie sich zur Untersuchung der, durch die eingesetzten Inhibitoren verursachte, Entstehung von ROS. PNIMN (**34**) akkumuliert zudem in weiteren

Zellorganellen, die nicht näher bestimmt werden konnten (Abbildung 89). Auch PNIEPO (**24**) akkumuliert, neben den Mitochondrien, vermutlich auch im Zellkern (Abbildung 90).

Bei den *bleaching* Experimenten zeigte sich, dass alle untersuchten Nitrone, innerhalb der relevanten Messzeit, gegenüber der Bestrahlung mit dem Laser, stabil waren. Bei PNIMPN (**11**) und PNIEPO (**24**) lagen die Zeiten bei ca. 2 Minuten (Abbildung 99 und Abbildung 103). Diese relativ kurze Zeitspanne der Fluoreszenzstabilität bei Laserbestrahlung reichte allerdings für die weiteren Untersuchungen aus.

Nach Zugabe von Rotenon und Antimycin A wird die Fluoreszenz von PNIPN (**34**) (20 μM) nach 16 Sekunden gelöscht (Abbildung 94). Dies ist wesentlich schneller als bei der einzelnen Zugabe der Atmungsketteninhibitoren (Abbildung 92 und Abbildung 93). Hierbei dauert es ca. 3 Minuten bis eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz zu beobachten ist. Selbst diese Abnahme ist deutlich schneller als bei dem *bleaching* Experiment (Abbildung 91).

Auch bei PNIMN (**29**) (20 μM) ist die Fluoreszenzlöschung nach Zugabe beider Inhibitoren erwartungsgemäß deutlich schneller als bei einfacher Zugabe. Bereits nach 2 Sekunden ist die Fluoreszenz deutlich gelöscht (Abbildung 98). Im Vergleich dazu, tritt die Fluoreszenzlöschung nach Zugabe von Rotenon nach 30 Sekunden (Abbildung 96) und von Antimycin A nach 50 Sekunden (Abbildung 98) ein. Daraus lässt sich ableiten, dass PNIMN (**29**) schneller mit den gebildeten ROS reagiert als PNIPN (**34**) bei vergleichbarer Färbekraft der Zellen. Dies kann auf Grund der geringeren sterischen Hinderung an der Nitron-Doppelbindung in PNIMN (**29**) erklärt werden. Wohingegen bei dem PNIPN (**34**), die Phenyl-Gruppe eine größere sterische Abschirmung dieser Doppelbindung ausübt und zudem das π -Elektronensystem des Fluorophors vergrößert.

PNIMPN (**11**) liegt in seiner Affinität gegenüber ROS zwischen PNIPN (**34**) und PNIMN (**29**). Die Fluoreszenzlöschung von PNIMPN (**11**) (20 μM) tritt, nach Zugabe beider Atmungsketteninhibitoren, nach 10 Sekunden ein (Abbildung 102). Dieses zuerst synthetisierte Nitron, besitzt eine Methylen-Gruppe zwischen den beiden π -Elektronensystemen des Fluorophors und der Phenyl-Gruppe. Der Synthese von PNIPN (**34**) ging unter anderem die Annahme voraus, dass durch eine direkte Kopplung dieser π -Elektronensysteme, eine bessere Eigenschaft zum *Quenching* resultiert. Dies konnte nicht bestätigt werden.

PNIEPO (**24**) ist das einzige cyclische Nitron, welches innerhalb dieser Arbeit synthetisiert wurde. Es besitzt gegenüber den anderen, im Rahmen der vorliegenden Arbeit synthetisierten Nitrone, eine 10-fach höhere Färbekraft auf Zellen (2 μM zum Färben der Zellen

verwendet). Die Fluoreszenzlöschung nach Zugabe des Atmungsketteninhibitors Rotenon, erfolgte nach 40 Sekunden (Abbildung 104) und liegt im Bereich von PNIMN (**29**) und PNIMPN (**11**). Mit Antimycin A als Inhibitor, tritt die Fluoreszenzlöschung nach bereits 3 Sekunden ein (Abbildung 105). Dies ist die schnellste Löschung nach Zugabe nur eines Inhibitors aller untersuchten Nitrone. Allerdings erfolgt die Fluoreszenzlöschung nach Zugabe beider Inhibitoren erst nach 50 Sekunden und ist daher langsamer als bei den jeweiligen Einzelzugaben (Abbildung 106). Für dieses Ergebnis gibt es bisher keine Erklärung. Es kann sein, dass die divergente Akkumulation von PNIEPO (**24**) gegenüber den anderen Nitronen, auch einen Einfluss auf die Zellreaktionen mit sich bringt und PNIEPO (**24**) direkt in Mechanismen der Zelle eingreift, die dieses unerwartete Ergebnis bewirken. Wohingegen die schnelle Löschung nach Zugabe von Antimycin A dagegen spricht. Ebenfalls ungeklärt ist die Tatsache, dass bei PNIEPO (**24**) eine stabile Fluoreszenz nach Zugabe der Inhibitoren bestehen bleibt. Es kommt also nicht zu einer vollständigen Fluoreszenzlöschung.

Tabelle 4 zeigt die Zeiten bis zur Fluoreszenzlöschung der untersuchten Nitrone, nach Zugabe der Atmungsketteninhibitoren, unabhängig von den verwendeten Zelllinien.

Tabelle 4: Übersicht der Zeiten bis zur Fluoreszenzlöschung nach Zugabe der Inhibitoren

Verbindung	Rotenon (c = 0.2 μ M)	Antimycin A (c = 7.5 μ M)	Rotenon / Antimycin A (c _{Rot} = 0.2 μ M; c _{Ant} = 7.5 μ M)
PNIPN (c = 50 μ M)	180 s	180 s	16 s
PNIMN (c = 50 μ M)	30 s	50 s	2 s
PNIMPN (c = 50 μ M)	60 s	60 s	10 s
PNIEPO (c = 5 μ M)	40 s	3 s	50 s

4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neuartige fluoreszierende Nitronen auf Naphthalimid-Basis, zur Lokalisierung von ROS auf subzellulärer Ebene und deren Identifizierung mittels ESR-Spektroskopie, synthetisiert und erste Anwendungen durchgeführt.

Die Synthese von 4 fluoreszierenden Nitronen auf Naphthalsäureimid-Basis wurde erreicht und die jeweiligen Ausbeuten und Reinheit, ermöglichten weitere Untersuchungen. Die neuen Verbindungen unterscheiden sich in der Größe des π -Elektronensystems bzw. in der Konjugation der Einzelsysteme zueinander. 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl-*N*-*tert*-butylnitron (**11**), kurz: PNIMP, besitzt zwischen seinen beiden π -Elektronensystemen des Fluorophors und des Phenyl-Restes, eine Methylen-Gruppe als *spacer*. Um Veränderungen im UV/Vis Spektrum (bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums), bei den Fluoreszenzeigenschaften (höhere Empfindlichkeit für Fluoreszenz-*quenching*), der Akkumulation in bestimmten Zellkompartimenten und/oder bei der Reaktivität mit ROS und der Stabilität dieser Reaktionsaddukte hervorzurufen, wurden weitere Nitronen synthetisiert. Um eine Änderung dieser Eigenschaften, durch das Fehlen des erwähnten *spacers* zu überprüfen, wurde das komplett konjugierte 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl-*N*-*tert*-butylnitron (**34**), kurz: PNIPN, dargestellt. Hierbei fehlt die Methylen-Gruppe und die beiden π -Elektronensysteme sind direkt miteinander verknüpft. Vorläufige Kraftfeldberechnungen, legen nahe, dass die beiden Systeme auf Grund der sterischen Hinderung gegeneinander verdreht sind und somit kein komplett konjugiertes π -Elektronensystem vorliegt.

Die Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl- α -methyl-*N*-*tert*-butylnitron (**21**), kurz: PNIPMN, sollte, durch die Methyl-Gruppe in α -Position zur Nitron-Funktion, eine Stabilisierung der Spin-Addukte bewirken. Selbst durch mehrere Variationen der Reaktionsbedingungen, gelang es nicht dieses Nitron darzustellen.

Auch die Synthese eines cyclischen Nitrons, sollte die Stabilität der Spin-Addukte erhöhen. Daher wurde 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin-*N*-oxid (**24**), kurz: PNIEPO, synthetisiert. Die Aufreinigung führte nicht zum reinen Produkt, allerdings zeigte sich in den weiteren Messungen, dass PNIEPO als *spin trap* in Zellen eingesetzt werden kann. Eine Besonderheit, stellte hierbei dessen Akkumulationseigenschaft, sowohl in den Mitochondrien, als auch, mit großer Wahrscheinlichkeit in den *Nucleoli* innerhalb des Zellkerns dar (gezeigt

durch neuere Vergleichsmessungen von A. Karbach mit einem zellkernspezifischen Farbstoff).

Die ESR-Messungen zu den *spin trapping* Eigenschaften der synthetisierten Nitrone PNIEPO (**24**), PNIMN (**29**) und PNIPN (**34**), wurden analog zu dem *p*-Nitrostilbennitron (**10**) (Hauck, 2007), durchgeführt. Diese bestätigen die Aufnahme von ROS und die damit verbundene Bildung langlebiger Nitroxid-Radikale. Die Versuche zum Nachweis und Detektion von der Hydroperoxyl-Addukten, konnten nicht positiv durchgeführt werden. Als Gründe hierfür sind die zu geringe Konzentration der eingesetzten Xanthinoxidase und eine vorgeschlagene andere Vorgehensweise bei der Extraktion der Addukte zu sehen (vgl. Kap. 3.2.1).

Untersuchungen der Absorptions- und Emissionsmaxima der Nitrone, PNIMPN (**11**), PNIPN (**34**) und PNIMN (**29**), ergaben, dass sowohl **34** als auch **29**, keine bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima, im Vergleich zu **11** festgestellt werden konnte (siehe Tabelle 3). Daraus lässt sich folgern, dass PNIPN (**34**) kein komplett konjugiertes π -Elektronensystem besitzt. Erste Kraftfeldrechnungen bestätigten dies, ergaben jedoch keine eindeutigen Werte. Genauere Kraftfeld- und *ab initio*-Berechnungen, sollten daher noch durchgeführt werden.

4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl-*N-tert*-butylnitron (**11**) zeigte zudem eine Besonderheit bei den Messungen der Absorptions- und Emissionsmaxima. Es konnte ein „Pump-Effekt“ beobachtet werden. Hierbei steigert sich die Intensität der Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, wenn zuvor mit 405 nm angeregt wurde. Der gleiche Effekt ist auch umgekehrt zu beobachten. Außerdem ist eine hypsochrome Verschiebung der Emissionmaxima, je nach eingestrahelter Anregungswellenlänge, von 522 nm zu 514 nm zu beobachten (siehe Kap. 3.3.2). Diese Ergebnisse sind ungewöhnlich und bedürfen noch weiterer Untersuchungen, um die Gründe hierfür zu evaluieren.

Die Untersuchung der Zytotoxizität der synthetisierten Nitrone, wurde mittels eines SRB-Tests untersucht. Hierbei zeigte sich, dass PNIMPN (**11**), PNIPN (**34**) und PNIMN (**29**) auf Hela-Zellen, in einem gewissen Konzentrationsbereich, einen wachstumsstimulierenden Effekt haben, der zwischen 3.5 % und 89.3 % höheren Wachstums liegt. Wobei PNIMPN die stärkeren Effekte zeigt. PNIPN auf *wt*-MEF-Zellen und PNIMN auf MCF7-Zellen, zeigen diesen Effekt auch bei anderen Zelllinien. Als Gründe hierfür kommen zwei Wirkungsweisen der Nitrone in Betracht. Zum einen, eine antioxidative Wirkung, da die Nitrone die kurzlebigen Radikale innerhalb der Zelle abfangen und somit die Zelle vor oxidativem Stress schützt. Zum anderen wurde bei der Untersuchung von α -Phenyl-*N-tert*-butylnitron (PBN) ein

völlig anderes Verhalten des Nitrons im Gegensatz zu Antioxidantien postuliert. Die Nitrone modulieren Transkriptionsfaktoren und iNOS (siehe Kap. 3.4.5).

Die *in vitro*-Messungen am konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop zeigten, dass sich alle vier untersuchten Nitrone, in den Mitochondrien der Zellen akkumulieren. Des Weiteren, zeigte PNIEPO (**24**) eine divergente Akkumulation gegenüber den anderen untersuchten Nitronen. Es akkumuliert sehr wahrscheinlich, neben den Mitochondrien, auch in den *Nucleoli*. Außerdem besitzt es eine stärkere Färbekraft und konnte in einer 10-fach geringeren Konzentration auf die Zellen aufgebracht werden. Die Fluoreszenzlöschung erfolgte ebenfalls konträr zu den anderen Verbindungen, indem die Löschung nach Zugabe von Antimycin A als Atmungsketteninhibitor, bereits nach 3 Sekunden erfolgte. Nach Zugabe beider Inhibitoren, Rotenon und Antimycin A, dauerte es 50 Sekunden bis zur Fluoreszenzlöschung (siehe Kap. 3.5.7).

Alle, im Rahmen dieser Arbeit, synthetisierten und untersuchten Nitrone, zeigten einen deutlichen *Quenching*-Effekt, der sich nicht mit der Fluoreszenzlöschung durch den eingesetzten Laser erklären lässt. Somit sind alle hier beschriebenen Nitrone in der Lage, ROS, unter Bildung von Nitroxid-Radikalen und unter Fluoreszenzlöschung, in der Zelle zu binden. Verbesserungen bei der Durchführung dieser Experimente bestehen weiterhin, da eine manuelle Zugabe der Inhibitoren erfolgen musste und daher, trotz aller Genauigkeit, nicht bei jeder Messung dieselben Bedingungen herrschten. Unterschiede in der Diffusionsgeschwindigkeit der Inhibitoren und eine kurzzeitige Löschung der Fluoreszenz, nach der manuellen Zugabe der Inhibitorlösungen, sowie ein Abdriften der zu beobachtenden Zellen, waren einige der Probleme, welche mitunter auftraten.

Die, im Rahmen dieser Arbeit, synthetisierten fluoreszierenden Nitrone 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl-*N-tert*-butylnitron (**11**), 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl-*N-tert*-butylnitron (**34**), 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin-*N-oxid* (**24**) und 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethyl-*N-tert*-butylnitron (**29**), ermöglichen die Detektion und Identifizierung von ROS auf subzellulärer Ebene. Es sollten weitere Versuche, vor allem zu *spin trapping* von Superoxidationradikalen durchgeführt werden und die dadurch generierten Hydroperoxyl-Addukte ESR-spektroskopisch untersucht werden. Zudem sollte die Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl- α -methyl-*N-tert*-butylnitron (**21**) weiter verfolgt werden, um dieses mit dem PNIPN (**34**) vergleichen zu können und eventuell stabilere Addukte mit ROS zu generieren, um diese besser ESR-spektroskopisch vermessen zu können. Auch die Aufreinigung von PNIEPO (**24**) sollte verbessert werden, um zu evaluieren, dass die

erhaltenen Daten, ausschließlich auf PNIEPO und nicht auf dessen Vorstufe, 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin (**23**), zurückzuführen ist. Außerdem bietet das beobachtete besondere Verhalten von PNIMP (11) bei der UV/Vis-Spektroskopie, einen interessanten Forschungspunkt, um den „Pump-Effekt“ genauer zu untersuchen zu können. Auch könnten vergleichende Studien dieser, innerhalb dieser Arbeit synthetisierten, Nitrone mit den auxochrom substituierten Derivaten des *p*-Nitrostilbennitrons (**10**), welche A. Karbach synthetisiert hat, interessante Ergebnisse, bezüglich dem Akkumulationsverhalten, Stabilität der ROS-Addukte, der Zytotoxizität und des Quenchverhaltens, bringen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeine Arbeitstechniken

5.1.1 Verwendete Geräte

Die Aufnahme der Kernresonanzspektren (^1H -NMR, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR) erfolgte an einem *Bruker Advance DPX 200*, *Bruker Advance DPX 400* und einem *Bruker Advance 600*. Sämtliche Spektren wurden bei 295 K aufgenommen. Die Resonanzsignale der für die ^1H -NMR-Spektren verwendeten Lösungsmittel ($\delta_{\text{H}} = 7.27$ ppm für CDCl_3 , $\delta_{\text{H}} = 2.50$ ppm für DMSO-d_6) sowie für die ^{13}C -NMR-Spektren verwendeten Lösungsmittel ($\delta_{\text{C}} = 77.0$ ppm für CDCl_3 , $\delta_{\text{C}} = 39.5$ ppm für DMSO-d_6) dienten als interner Standard (Gottlieb, 1997). Die Multiplizität der Signale der gemessenen Spektren wurden wie folgt abgekürzt: m Multiplett, s Singulett, d Duplett, t Triplett.

Die Elementaranalysen (CHN-Analyse) zur Bestimmung der gewichtsprozentualen Anteile an Stickstoff, Kohlenstoff und Wasserstoff erfolgte an einem *Elemental Analyzer CHN 2400* und an einem *Elemental Analyzer EA240* der Firma Perkin Elmer. Die Messungen wurden im Analytiklabor der TU Kaiserslautern durchgeführt.

Die ESR-Messungen wurden mit dem CW/FT-ESR-Spektrometer *Bruker Elexsys E580* unter Verwendung einer *dielektrischen cavity ER4118X-MD-5* aufgenommen (Leinisch, 2009; Hauck, 2007).

Die Aufnahme der UV/Vis-Spektren erfolgte an dem UV/Vis-Spektrometer *GENESYS 10 uv Scanning* der Firma Thermo Scientific. Die Detektion der Fluoreszenzspektren und die Fluoreszenz-*Quenching*-Experimente erfolgten am *Luminescence spectrometer LS50B* der Firma Perkin Elmer.

Für die *in vitro* Messungen wurde ein *Nikon Eclipse E600* Mikroskop verwendet. Dazu wurde ein *Nikon Fluor 40 x/0,80 w DIC M ∞ /0 WD 2.0*-Objektiv, eine *Mamamatsu ORCA-ER Digitalcamera C4742-80-12AG*- Digitalkamera sowie ein *Dichroic mirror T405/488/568/647*-Filter benötigt. Als Laser wurde ein *DPSS-Festkörperlaser Sapphire 488* mit einem *Coherent Sapphire* als Steuergerät verwendet. Die Fluoreszenz wurde im Bereich von 500 - 550 nm aufgenommen.

Zur Dünnschichtchromatographie kamen DC-Alufolien Polygram Sil G/UV254 mit 0.2 mm Kieselgel der Firma *Macherey-Nagel* zum Einsatz. Zur Säulenchromatographie diente Kieselgel der Firma Merck mit einer Korngröße von 40–63 μm als Füllmaterial. Die Säulen wurden nach entsprechenden Verfahren nass befüllt. Bei der Flashsäulenchromatographie wurde die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase vorsichtig unter Druck reguliert.

Die Zellen wurden in dem Inkubator *Innova CO-170* der Firma Eppendorf aufbewahrt. Die Arbeiten in der Zellkultur wurden unter einer *LaminAir HLB 2448* Sterilbank der Firma Heraeus Instruments verwendet. Die Begutachtung der biologischen Systeme erfolgte unter dem Mikroskop *In Wert IT 400 Trino* der Firma VWR.

5.1.2 Verwendete Chemikalien

Die benötigten Chemikalien wurden, wenn möglich, über die Firmen Sigma-Aldrich, Roth, Acros und Merck bzw. über die Chemikalienausgabe der TU Kaiserslautern erworben. Die kommerziell erwerblichen Chemikalien wurden, wenn nicht explizit angegeben, ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Eingesetzte Lösungsmittel wurden nach Standardverfahren bzw. über 3 Å Molekularsieb getrocknet und entsprechend gelagert. Als Inertgas wurden Stickstoff oder Argon mit der Reinheit 5.0 verwendet. Bei Arbeiten unter Inertgasatmosphäre wurden die gängigen Schlenk-Techniken genutzt.

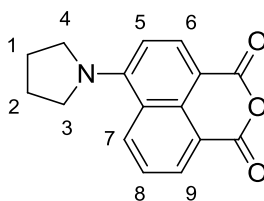
5.2 Synthesen

5.2.1 Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (**13**)

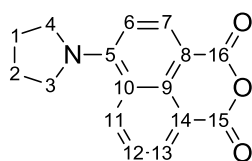
Zu einer Suspension aus 4-Bromnaphthalsäureanhydrid (**12**) (5.00 g, 17.1 mmol) in 2-Methoxyethanol (100 ml) wurden Pyrrolidin (2.46 g, 2.84 ml, 34.2 mmol) sowie eine Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure zugegeben und die Reaktionsmischung für 6 h unter Rückfluss gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf 0 °C abgekühlt, der ausgefallene Feststoff abfiltriert und mit kaltem *n*-Hexan (2 x 50 ml) gewaschen. Der orangefarbene kristalline Feststoff **13** wurde danach im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 4.49 g (16.8 mmol, 98 %) eines orangefarbenen kristallinen Feststoffes **13**.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm] = 2.14 - 2.18 (m, 4 H, $\text{H}_{1,2}$), 3.84 - 3.87 (m, 4 H, $\text{H}_{3,4}$), 6.80 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.80$ Hz, 1 H, H_5), 7.55 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8.60$ Hz, 7.3 Hz, 1 H, H_8), 8.35 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.80$ Hz, 1 H, H_7), 8.53 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.30$ Hz, 1 H, H_6), 8.67 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.60$ Hz, 1 H, H_9).



$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 26.1 ($\text{C}_{1,2}$), 53.3 ($\text{C}_{3,4}$), 105.0 (C_6), 108.8 (C_8), 118.6 (C_9), 122.3 (C_{14}), 123.2 (C_{10}), 133.0 (C_{12}), 133.4 (C_{11}), 134.0 (C_7), 135.4 (C_{13}), 153.2 (C_5), 160.9 (C_{15}), 162.4 (C_{16}).



$\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_3$ (267.28 g/mol)

CHN-Analyse: theoretisch: N: 5.24 %, C: 71.90 %, H: 4.90 %

gemessen: N: 5.23 %, C: 71.76 %, H: 4.88 %

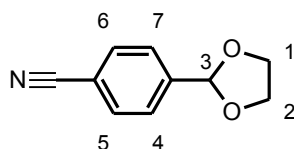
5.2.2 Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl-*N-tert*-butylnitrons (11)

5.2.2.1 Synthese von 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)benzimidazol (15)

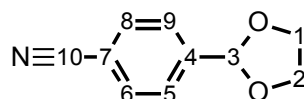
Es wurden 4-Cyanobenzaldehyd (10.43 g, 79.54 mmol) in Toluol (60 ml) gelöst. Anschließend wurden im 4-fachen Überschuss Ethylenglykol (17.8 ml, 0.32 mol), eine Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure und Toluol (90 ml) zugegeben. Das Reaktionsgemisch (RG) wurde 20 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das RG weitere 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Es erfolgte eine Aufarbeitung mit einer 5 %igen Natriumbicarbonat-Lösung (60 ml). Die organische Phase wurde mit bidest. Wasser (3×25 ml) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und über eine P3-Glasfritte abgesaugt. Das Lösungsmittel wurde danach abrotiert. Die so erhaltene farblose Flüssigkeit wurde aus 25 ml *n*-Hexan (25 ml) auskristallisiert und der Überstand mit einer Pipette separiert

Ausbeute: 13.37 g (75.89 mmol, 95 %) eines weißen, kristallinen, hygroskopischen Feststoffes **15**.

^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 4.02 – 4.11 (m, 4 H, $\text{H}_{1,2}$), 5.83 (s, 1 H, H_3), 7.58 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.56$ Hz, 2 H, $\text{H}_{4,7}$), 7.66 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.06$ Hz, 2 H, $\text{H}_{5,6}$).



$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 65.4 ($\text{C}_{1,2}$), 102.4 (C_3), 112.9 (C_7), 118.6 (C_{10}), 127.2 ($\text{C}_{5,9}$), 132.2 ($\text{C}_{6,8}$), 143.1 (C_4).



$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$ (175.18 g/mol)

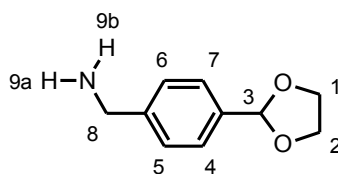
CHN-Analyse: theoretisch: C, 68.56 %; H, 5.18 %; N, 8.00 %
 gemessen: C, 68.58 %; H, 5.12 %; N, 8.09 %

5.2.2.2 Synthese von 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)benzylamin (16)

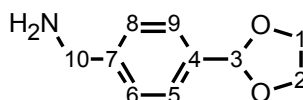
Unter einer Inertgasatmosphäre wurden Lithiumaluminiumhydrid (3.21 g, 84.46 mmol) in trockenem Diethylether (100 ml) vorgelegt. 7.44 g (42.23 mmol) 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)benzylamin (**15**) wurden in trockenem Diethylether (50 ml) gelöst und zu der stark rührenden Suspension bei 0°C vorsichtig zugegeben. Anschließend wurde für 4 h bei 0°C, danach 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 95 %igen Ethanol (35 ml) und anschließend mit 50 %igen Ethanol (35 ml) vorsichtig und unter starkem Rühren hydrolysiert. Die organische Phase wurde mit einer Pipette separiert. Die wässrige Phase wurde lyophilisiert (Gefriertrocknung) und danach mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, über eine P3-Glasfritte abgesaugt und das Lösungsmittel abrotiert. Die erhaltene gelbliche Flüssigkeit wurde im Kühlschrank auskristallisiert.

Ausbeute: 7.07 g (39.45 mmol, 93 %) eines gelblich-weißen, kristallinen Feststoffes **16**.

^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 1.49 (s, 2 H, $\text{H}_{9a,9b}$), 3.87 (s, 2 H, H_8), 3.99 – 4.15 (m, 4 H, $\text{H}_{1,2}$), 5.80 (s, 1 H, H_3), 7.32 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.19$ Hz, 2 H, $\text{H}_{4,7}$), 7.44 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.19$ Hz, 2 H, $\text{H}_{5,6}$).



$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 46.3 (C_{10}), 65.3 ($\text{C}_{1,2}$), 103.6 (C_3), 126.7 ($\text{C}_{6,8}$), 127.1 ($\text{C}_{5,9}$), 136.4 (C_4), 144.4 (C_7).



$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2$ (179.22 g/mol)

CHN-Analyse: theoretisch: C, 67.02 %; H, 7.31 %; N, 7.82 %

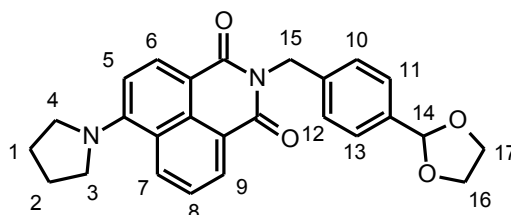
gemessen: C, 67.09 %; H, 7.26 %; N, 7.86 %

5.2.2.3 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylbenzylacetal (**17**)

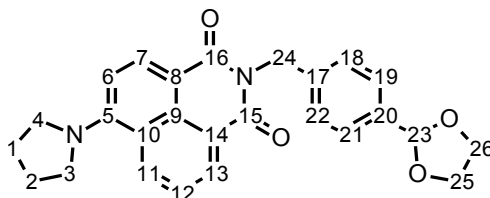
Es wurden 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (**13**) (2.01 g, 7.52 mmol) in Ethanol (100 ml) vorgelegt und im 1,5-fachen Überschuss 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)benzylamin (**16**) (2.02 g, 11.28 mmol) zugegeben und mit Ethanol (30 ml) nachgespült. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch (RG) für 23 h unter Rückfluss erhitzt. Danach auf 0°C abgekühlt, der orangefarbene Niederschlag über eine P3-Glasfritte abgesaugt und kaltem Ethanol (4×20 ml) gewaschen. Das Rohprodukt wurde aus Toluol umkristallisiert und am Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 2.90 g (6.77 mmol, 90 %) eines orangefarbenen Feststoffes **17**.

^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 2.05 – 2.12 (m, 4 H, $\text{H}_{1,2}$), 3.74 – 3.80 (m, 4 H, $\text{H}_{3,4}$), 3.95 – 4.09 (m, 4 H, $\text{H}_{16,17}$), 5.37 (s, 2 H, H_{15}), 5.78 (s, 1 H, H_{14}), 6.80 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.61$ Hz, 1 H, H_5), 7.38 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.83$ Hz, 2 H, $\text{H}_{11,13}$), 7.51 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8.61$ Hz, 1 H, H_8), 7.56 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.22$ Hz, 2 H, $\text{H}_{10,12}$), 8.41 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.86$ Hz, 1 H, H_6), 8.56 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5.09$ Hz, 2 H, $\text{H}_{7,9}$).



$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 26.1 ($\text{C}_{1,2}$), 43.0 (C_{24}), 53.2 ($\text{C}_{3,4}$), 65.2 ($\text{C}_{25,26}$), 103.6 (C_{23}), 108.5 (C_6), 110.5 ($\text{C}_{8,14}$), 122.5 (C_{13}), 122.6 (C_{12}), 123.0 (C_{10}), 126.4 ($\text{C}_{19,21}$), 128.9 ($\text{C}_{18,22}$), 131.2 (C_7), 132.0 (C_9), 133.6 (C_{11}), 136.9 (C_{17}), 138.9 (C_{20}), 152.7 (C_5), 164.0 (C_{16}), 164.8 (C_{15}).



$\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$ (428.48 g/mol)

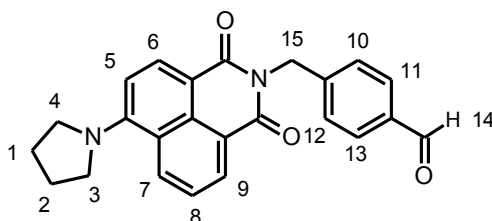
CHN-Analyse: theoretisch: C, 72.88 %; H, 5.65 %; N, 6.54 %
 gemessen: C, 72.68 %; H, 5.70 %; N, 6.36 %

5.2.2.4 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylbenzaldehyd (18)

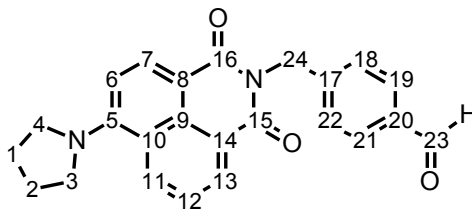
Es wurden 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzylacetal (**17**) (3.54 g, 8.26 mmol) in THF (100 ml) vorgelegt und unter Rühren 3 %ige Salzsäure (25 ml) zugegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch (RG) für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Danach wurde auf 0°C abgekühlt und mit Triethylamin (ca. 3.4 ml) neutralisiert. Die wässrige Phase anschließend abgetrennt und die organische Phase über MgSO_4 getrocknet, anschließend über eine P3-Glasfritte abgesaugt und das Lösungsmittel einrotiert. Danach wurde der leuchtend orangefarbene Feststoff aus Toluol umkristallisiert und am Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 3.14 g (8.18 mmol, 99 %) eines leuchtend orangefarbenen Feststoffes **18**.

^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 2.05 – 2.14 (m, 4 H, $\text{H}_{1,2}$), 3.74 – 3.84 (m, 4 H, $\text{H}_{3,4}$), 5.43 (s, 2 H, H_{15}), 6.81 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.61$ Hz, 1 H, H_5), 7.53 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.43$ Hz, 1 H, H_8), 7.65 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.22$ Hz, 2 H, $\text{H}_{10,12}$), 7.80 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.22$ Hz, 2 H, $\text{H}_{11,13}$), 8.43 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.61$ Hz, 1 H, H_6), 8.60 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.43$ Hz, 2 H, $\text{H}_{7,9}$), 9.95 (s, 1 H, H_{14}).



$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 26.1 ($\text{C}_{1,2}$), 43.2 (C_{24}), 53.2 ($\text{C}_{3,4}$), 108.6 (C_6), 122.2 ($\text{C}_{8,14}$), 122.6 (C_{12}), 123.1 (C_{10}), 126.4 (C_{13}), 129.1 (C_7), 129.9 ($\text{C}_{18,22}$), 131.4 ($\text{C}_{19,21}$), 132.3 (C_9), 133.8 (C_{11}), 135.4 (C_{20}), 144.9 (C_{17}), 152.9 (C_5), 163.9 ($\text{C}_{15,16}$), 192.0 (C_{23}).



$\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$ (384.43 g/mol)

CHN-Analyse: theoretisch: C, 74.98 %; H, 5.24 %; N, 7.29 %

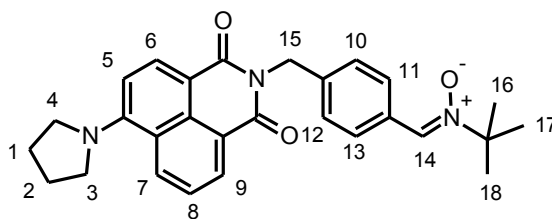
gemessen: C, 74.60 %; H, 5.27 %; N, 6.91 %

5.2.2.5 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl-*N*-*tert*-butylnitron (11)

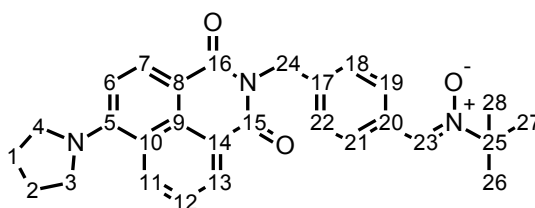
Unter einer Inertgasatmosphäre wurde zu einer Lösung aus 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylbezaldehyd (**18**) (223 mg, 0.58 mmol) in Methylenchlorid (50 ml) eine Lösung aus *N*-*tert*-Butylhydroxylamin Hydrochlorid (146 mg, 1.16 mmol) und Triethylamin (129 mg, 177 μl , 1.28 mmol) in Methylenchlorid (10 ml) sowie Magnesiumsulfat zugegeben und die fluoreszierende Lösung für 9 d bei Raumtemperatur gerührt. Alle 2 d wurde, die oben angegebene Menge, *N*-*tert*-Butylhydroxylamin Hydrochlorid und Triethylamin zugegeben. Anschließend wurde der Feststoff abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Ethylacetat : Triethylamin / 1 : 0.01; Kieselgel 50 x 250 mm) wurde ein leuchtend gelber Feststoff **11** erhalten.

Ausbeute: 137 mg (0.30 mmol, 52 %) eines leuchtend gelber Feststoffes **11**.

^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 1.56 (s, 9 H, $\text{H}_{16,17,18}$), 2.06 – 2.16 (m, 4 H, $\text{H}_{1,2}$), 3.73 – 3.85 (m, 4 H, $\text{H}_{3,4}$), 5.37 (s, 2 H, H_{15}), 6.75 (s, 1 H, H_{14}), 6.78 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.81$ Hz, 1 H, H_5), 7.45 – 7.58 (m, 5 H, $\text{H}_{8,10,11,12,13}$), 8.32 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.81$ Hz, 1 H, H_6), 8.56 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8.56$ Hz, 2 H, $\text{H}_{7,9}$).



$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 26.1 ($\text{C}_{1,2}$), 28.3 ($\text{C}_{16,17,18}$), 43.2 (C_{24}), 53.3 ($\text{C}_{3,4}$), 70.6 (C_{25}), 110.5 (C_6), 122.3 ($\text{C}_{8,14}$), 122.6 (C_{12}), 123.0 (C_{10}), 123.2 (C_{13}), 129.6 (C_7), 129.9 ($\text{C}_{18,22}$), 131.3 ($\text{C}_{19,21}$), 133.4 (C_9), 133.7 (C_{23}), 134.0 (C_{11}), 135.4 (C_{20}), 140.0 (C_{17}), 152.8 (C_5), 163.9 ($\text{C}_{15,16}$).



$\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3$ (455.55 g/mol)

CHN-Analyse: theoretisch: C, 73.82 %; H, 6.42 %; N, 9.22 %

gemessen: C, 73.60 %; H, 6.49 %; N, 9.41 %

5.2.3 Vorversuche zur Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl-*N*-tert-butylnitrons (34)

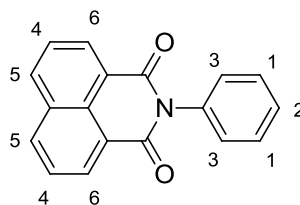
5.2.3.1 Synthese von 1,8-Naphthalimidophenyl-Derivaten

5.2.3.1.1 Synthese von 1,8-Naphthalimidobenzol (44)

Unter Inertgasatmosphäre wurden zu einer Suspension aus 1,8-Naphthalsäureanhydrid (**42**) (500 mg, 2.52 mmol) in *N*-Methylpyrrolidon (25 ml), Anilin (**43**) (940 mg, 0.92 ml, 10.1 mmol) und wasserfreies Zinkacetat (1.85 g, 10.1 mmol) zugegeben und für 20 h bei 160 °C gerührt. Die dunkelorange-farbene Lösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend mit 5%iger HCl (200 ml) versetzt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und mit 5%iger HCl (20 ml) sowie heißem Wasser (2 x 15 ml) gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum wurde ein gelb-brauner Feststoff **44** erhalten.

Ausbeute: 550 mg (2.02 mmol, 80 %) eines gelb-braunen Feststoffes **44**.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 7.38 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.56$ Hz, 2 H, H_1), 7.50 (m, 1 H, H_2), 7.56 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.80$ Hz, 2 H, H_3), 7.81 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.80$ Hz, 7.80 Hz, 2 H, H_4), 8.28 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.82$ Hz, 2 H, H_5), 8.65 (d, $^3J_{\text{HH}} = 6.60$ Hz, 2 H, H_6).



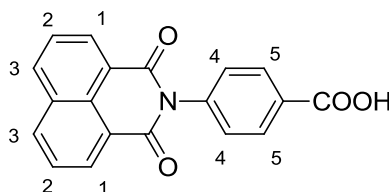
$\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{NO}_2$ (273.29 g/mol)

5.2.3.1.2 Synthese von 1,8-Naphthalimidobenzoesäure (**45**)

Für die Synthese von **45** wurde, unter einer Inertgasatmosphäre, zu einer Suspension aus 1,8-Naphthalsäureanhydrid (**42**) (1.00 g, 4.92 mmol) in *N*-Methylpyrrolidon (50 ml), im 4-fachen Überschuss, *p*-Aminobenzoesäure (**30**) (2.70 g, 19.68 mmol) und wasserfreies Zinkacetat (3.68 g, 19.68 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend für 20 h auf 160 °C erhitzt. Danach wurde die dunkelorange-farbene Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 5%iger HCl-Lösung (20 ml) versetzt und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Nach Trocknen im Vakuum wurde ein grauer Feststoff **45** isoliert.

Ausbeute: 1.50 g (4.73 mmol, 96 %) eines grauen Feststoffes **45**.

$^1\text{H-NMR}$ (THF-d_8 , 400 MHz): δ [ppm] = 7.41 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.56$ Hz, 2 H, H_1), 7.81 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.80$, 0.98 Hz, 2 H, H_2), 8.14 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.82$ Hz, 2 H, H_3), 8.38 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.07$ Hz, 2 H, H_4), 8.58 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.30$ Hz, 2 H, H_5).



$\text{C}_{19}\text{H}_{11}\text{NO}_4$ (317.29 g/mol)

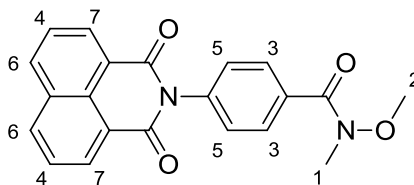
5.2.3.1.3 Synthese von 1,8-Naphthalimidobenzoesäure-*N*-methoxy-*N*-methyramid (**47**)

Unter Inertgasatmosphäre wurde zu einer Suspension aus 1,8-Naphthalimidobenzoesäure (**45**) (1.00 g, 2.59 mmol) in Methylenchlorid (30 ml) eine Lösung aus Triphenylphosphan (1.37 g, 5.18 mmol) in Methylenchlorid (20 ml) und Trichloracetonitril (0.75 g, 0.52 ml, 5.18 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend

wurden *N,O*-Dimethylhydroxylamin (0.25 g, 2.59 mmol) und Triethylamin (1.05 g, 1.44 ml, 10.4 mmol) zugegeben und die dunkelorangefarbene Lösung für weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung mit destilliertem Wasser (3 x 20 ml) gewaschen und mit Methylenchlorid (3 x 30 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Laufmittel: Ethylacetat : Hexan / 1 : 1) und Trocknem im Vakuum wurde ein grauen Feststoff **47** erhalten.

Ausbeute: 411 mg (0.96 mmol, 37 %) eines grauen Feststoffes **47**.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = 3.41 (s, 3 H, H₁), 3.62 (s, 3 H, H₂), 7.38 (d, ³J_{HH} = 8.56 Hz, 2 H, H₃), 7.81 (m, 2 H, H₄), 7.89 (d, ³J_{HH} = 8.31 Hz, 2 H, H₅), 8.29 (d, ³J_{HH} = 7.82 Hz, 2 H, H₆), 8.65 (d, ³J_{HH} = 7.09 Hz, 2 H, H₇).



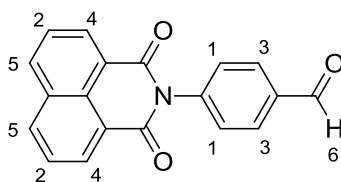
C₂₁H₁₆N₂O₄ (360.36 g/mol)

5.2.3.1.4 Synthese von 1,8-Naphthalimidobenzaldehyd (**48**)

1,8-Naphthalimidobenzoesäure-*N*-methoxy-*N*-methylamid (**47**) (1.11 g, 3.08 mmol) wurde in THF (20 ml) gelöst und bei -78 °C Lithiumaluminiumhydrid (0.23 g, 6.06 mmol) zugegeben. Die Suspension wurde für 15 min auf dieser Temperatur gehalten. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf 0 °C erwärmt und zu 5%igen HCl-Ethanol-Lösung (50 ml) gegeben. Danach wurde die Reaktionsmischung mit gesättigter NaCl-Lösung (50 ml) versetzt und mit einem Gemisch aus Diethylether : Methylenchlorid (1 : 1, 3 x 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in THF (50 ml) gelöst und mit einer Bisulfitlösung sowie HCl versetzt. Die Lösung wurde 2 h refluxiert und anschließend die organische Phase bei 4 °C auskristallisiert. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und mit destilliertem Wasser (2 x 10 ml) gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum wurde ein beigefarbener Feststoff **48** erhalten.

Ausbeute: 501 mg (1.66 mmol, 54 %) eines beigefarbenen Feststoffes **48**.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d₆, 400 MHz): δ [ppm] = 7.67 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.31$ Hz, 2 H, H₁), 7.91 (m, 2 H, H₂), 8.08 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.40$ Hz, 2 H, H₃), 8.51 – 8.54 (m, 4 H, H_{4,5}), 10.1 (s, 1 H, H₆).



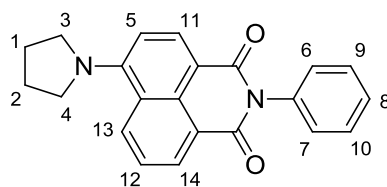
C₁₉H₁₁NO₃ (301.30 g/mol)

5.2.3.2 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzol (46)

Unter einer Inertgasatmosphäre wurden zu einer Suspension aus 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (**13**) (500 mg, 1.87 mmol) in *N*-Methylpyrrolidon (25 ml), Anilin (**43**) (0.70 g, 0.68 ml, 7.48 mmol) und wasserfreies Zinkacetat (1.37 g, 7.48 mmol), jeweils im 4-fachen Überschuss, zugegeben und für 20 h auf 160 °C erhitzt. Die dunkelorange-farbene Lösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend mit 5%iger HCl (200 ml) versetzt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und mit 5%iger HCl (20 ml) sowie heißem Wasser (2 x 15 ml) gewaschen. Nach Trocknem im Vakuum wurde ein gelb-brauner Feststoff **46** erhalten.

Ausbeute: 430 mg (1.26 mmol, 67 %) eines dunkelgelben Feststoffes **46**.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d₆, 400 MHz): δ [ppm] = 2.04 (m, 4 H, H_{1,2}), 3.82 (m, 4 H, H_{3,4}), 6.92 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.70$ Hz, 1 H, H₅), 7.32 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.32$ Hz, 2 H, H_{6,7}), 7.45 (m, 1 H, H₈), 7.65 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8.40$ Hz, 7.65 Hz, 2 H, H_{9,10}), 8.23 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.66$ Hz, 2 H, H₁₁), 8.45 (m, 1 H, H_{12,13}), 8.84 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.40$ Hz, 1 H, H₁₄).



C₂₂H₁₈N₂O₂ (342.39 g/mol)

5.2.4 Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl-*N*-*tert*-butylnitrons (34)

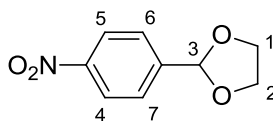
Syntheseweg A

5.2.4.1 Synthese von 2-(4-Nitrophenyl)-1,3-dioxolan (36)

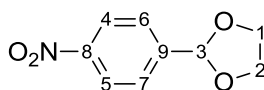
Zu einer Lösung aus *p*-Nitrobenzaldehyd (**35**) (7.56 g, 50.0 mmol) in Toluol (100 ml) wurden Ethylenglykol (31.0 g, 27.9 ml, 500 mmol) und eine Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure zugegeben. Die Lösung wurde 18 h unter Rückfluss gerührt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die schwach gelbe Lösung wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (100 ml) gewaschen und die organische Phase über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der gelbliche Rückstand aus *n*-Hexan umkristallisiert und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 8.39 g, (43.0 mmol, 86 %) eines weißen kristallinen Feststoffes **36**.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = 4.08-4.13 (m, 4 H, H_{1,2}), 5.90 (s, 1 H, H₃), 7.66 (d, ³J_{HH} = 8.60 Hz, 2 H, H_{4,5}), 8.25 (d, ³J_{HH} = 8.56 Hz, 2 H, H_{6,7}).



¹³C{¹H}-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ [ppm] = 65.5 (C_{1,2}), 102.2 (C₃), 123.6 (C_{4,5}), 127.4 (C_{6,7}), 144.9 (C₈), 148.4 (C₉).



C₉H₁₁NO₂ (165.19 g/mol)

CHN-Analyse: theoretisch: C, 55.39 %; H, 4.65 %; N, 7.18 %.

gemessen: C, 55.46 %; H, 4.53 %; N, 7.14 %.

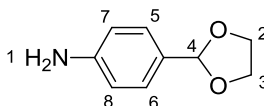
5.2.4.2 Synthese von 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)anilin (37)

Unter Inertgasatmosphäre wurde eine Lösung aus 2-(4-Nitrophenyl)-1,3-dioxolan (**36**) (976 mg, 5.00 mmol) in Ethanol (30 ml) und THF (20 ml) zu einem Gemisch aus NaHCO₃ (420 mg, 5.00 mmol) und Platin(IV)oxid (227 mg, 1.00 mmol) gegeben. Anschließend wurde für 2.5 h Wasserstoff in das Reaktionsgemisch eingeleitet. Nach Beendigung der Gaseinleitung wurde die Suspension über basische Celite filtriert, mit Methanol (3 x 20 ml)

gewaschen und danach das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Trocknen im Vakuum wurde ein gelber Feststoff **17** erhalten.

Ausbeute: 826 mg (5.00 mmol, 100 %) eines gelben Feststoffes **17**.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 3.75 (br.s, 2H, H_1), 4.01-4.16 (m, 4 H, $\text{H}_{2,3}$), 5.73 (s, 1 H, H_4), 7.66 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.60$ Hz, 2 H, $\text{H}_{5,6}$), 7.29 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.40$ Hz, 2 H, $\text{H}_{7,8}$).



$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$ (165.19 g/mol)

5.2.4.3 Syntheserversuche von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenylacetal (**38**)

A) Unter Inertgasatmosphäre wurden zu einer Suspension aus 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (**13**) (1.13 g, 4.42 mmol) in *N*-Methylpyrrolidon (25 ml), 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)anilin (**37**) (3.08 g, 22.4 mmol) und wasserfreies Zinkacetat (4.12 g, 22.4 mmol) gegeben und die Reaktionsmischung für 24 h bei 170 °C gerührt. Die dunkelorange-farbene Lösung wurde anschließend auf Raumtemperatur gebracht und auf Wasser (100 ml) gegeben. Der ausgefallene Feststoff wurde filtriert und mit heißem Wasser (3 x 25 ml) gewaschen. Nach trocknen im Vakuum wurde ein orange-brauner Feststoff isoliert.

B) Zu einer Suspension von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (**13**) (992 mg, 3.71 mmol) in Ethanol (100 ml) wurde 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)anilin (**37**) (1.23 g, 7.42 mmol) zugegeben und mit Ethanol (30 ml) nachgespült. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 18 h unter Rückfluss erhitzt, danach auf 0 °C abgekühlt, der orange-braune Niederschlag isoliert und kaltem Ethanol (4 x 15 ml) gewaschen. und im Hochvakuum getrocknet.

C) Zu einer Suspension von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (**13**) (612 mg, 2.29 mmol) in Pyridin (20 ml) wurde 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)anilin (**37**) (757 mg, 4.58 mmol) zugegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 24 h unter Rückfluss erhitzt, danach auf 0 °C abgekühlt, der rot-braune Niederschlag isoliert, mit kaltem Pyridin (2 x 25 ml) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.

Das gewünschte Produkt **38** wurde jeweils nicht erhalten.

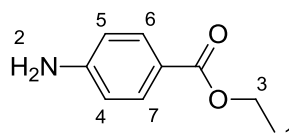
Syntheseweg B

5.2.4.4 Synthese von 4-Aminobenzoesäureethylester (**39**)

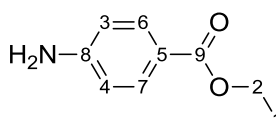
Zu einer Lösung aus 4-Aminobenzoesäure (**30**) (2.74 g, 20 mmol) in Ethanol (50 ml) wurde unter Eiskühlung die 1,5-fache Menge Thionylchlorid (3.57 g, 2.18 ml, 30 mmol) innerhalb von 15 min tropfenweise zugegeben. Anschließend wurde die Reaktionsmischung für 2.5 h unter Rückfluss gerührt und das überschüssige Ethanol und Thionylchlorid abdestilliert. Nach Zugabe von gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (200 ml) fiel ein weißer Feststoff aus der in Ethylacetat (100 ml) aufgenommen wurde. Die wässrige Phase wurde von der organischen Phase getrennt. Die wässrige Phase mit Ethylacetat (2 x 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Feststoff **39** wurde im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 3.18 g (19.3 mmol, 96 %) eines weißen Feststoffes **19**.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 1.37 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.09$ Hz, 3 H, H_1), 4.05 (br. s., 2 H, H_2), 4.33 (q, $^3J_{\text{HH}} = 7.25$ Hz, 2 H, H_3), 6.62 - 6.68 (m, 2 H, $\text{H}_{4,5}$), 7.83 - 7.90 (m, 2 H, $\text{H}_{6,7}$).



$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 14.4 (C_1), 60.3 (C_2), 113.7 ($\text{C}_{3,4}$), 120.1 (C_5), 131.5 ($\text{C}_{6,7}$), 150.7 (C_8), 166.7 (C_9).



$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$ (165.19 g/mol)

CHN-Analyse: theoretisch: C, 65.44 %; H, 6.71 %; N, 8.48 %.

gemessen: C, 65.49 %; H, 6.75 %; N, 8.49 %.

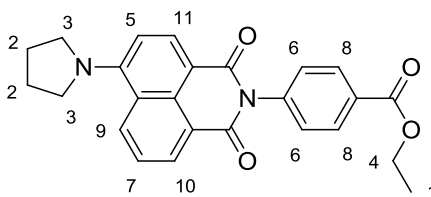
5.2.4.5 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäureethylester (**40**)

Wasserfreies Zinkacetat (1.75 g, 9.53 mmol) und 4-Aminobenzoesäureethylester (**39**) (3.15 g, 19.1 mmol) wurden unter Inertgasatmosphäre zu einer Mischung von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (**13**) (2.55 g, 9.53 mmol) in trockenem N-Methylpyrrolidon (50 ml) gegeben. Anschließend wurde für 21 h bei 170 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raum-

temperatur wurde das Reaktionsgemisch mit Wasser (300 ml) versetzt, der Rückstand mit Wasser (3 x 200 ml) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 3.74 g (9.04 mmol, 95 %) eines orangenen Feststoffes **40**.

¹H-NMR (THF-d₈, 600 MHz): δ [ppm] = 1.38 (t, ³J_{HH} = 7.19 Hz, 3 H, H₁), 2.08 - 2.10 (m, 4 H, H₂), 3.78 - 3.85 (m, 4 H, H₃), 4.37 (q, ³J_{HH} = 7.14 Hz, 3 H, H₄), 6.93 (d, ³J_{HH} = 8.80 Hz, 1 H, H₅), 7.36 - 7.40 (m, 2 H, H₆), 7.58 (dd, ³J_{HH} = 8.51, 7.34 Hz, 1 H, H₇), 8.07 - 8.13 (m, 2 H, H₈), 8.35 (d, ³J_{HH} = 8.51 Hz, 1 H, H₉), 8.51 (d, ³J_{HH} = 7.34 Hz, 1 H, H₁₀), 8.75 (d, ³J_{HH} = 7.63 Hz, 1 H, H₁₁).



C₂₅H₂₂N₂O₄ (414.45 g/mol)

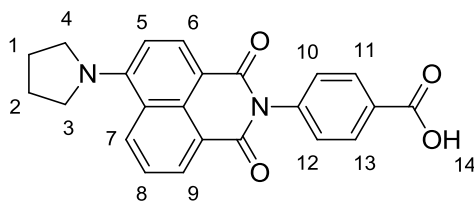
Syntheseweg C

5.2.4.6 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäure (**31**)

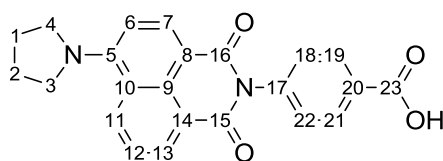
Unter einer Inertgasatmosphäre wurden zu einer Suspension aus 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (**13**) (3.00 g, 11.2 mmol) in *N*-Methylpyrrolidon (50 ml) 4-Aminobenzoesäure (**30**) (6.14 g, 44.8 mmol) und wasserfreies Zinkacetat (9.76 g, 53.2 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung für 20 h bei 180 °C gerührt. Die dunkelorangene Lösung wurde anschließend auf Raumtemperatur gebracht und mit 5%iger HCl-Lösung (100 ml) versetzt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und mit 5%iger HCl-Lösung (50 ml), heißem Wasser (2 x 50 ml) sowie Ethanol (2 x 50 ml) gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum wurde ein orangener Feststoff **31** erhalten.

Ausbeute: 4.21 g (10.9 mmol, 97 %) eines orangefarbenen Feststoffes **31**.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ [ppm] = 2.03 (m, 4 H, H_{1,2}), 3.80 (m, 4 H, H_{3,4}), 6.93 (d, ³J_{HH} = 8.40 Hz, 1 H, H₅), 7.45 (d, ³J_{HH} = 7.00 Hz, 2 H, H_{10,12}), 7.65 (t, 1 H, H₈), 8.05 (d, ³J_{HH} = 7.30 Hz, 2 H, H_{11,13}), 8.25 (d, ³J_{HH} = 8.10 Hz, 2 H, H₇), 8.45 (d, ³J_{HH} = 6.60 Hz, 1 H, H₆), 8.80 (d, ³J_{HH} = 8.40 Hz, 1 H, H₉).



$^{13}\text{C}\{\text{H}\}$ -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ [ppm] = 25.5 ($\text{C}_{1,2}$), 52.8 ($\text{C}_{3,4}$), 108.9 (C_6), 109.3 (C_8), 118.6 (C_9), 122.4 (C_{20}), 123.7 (C_{14}), 130.1 ($\text{C}_{18,22}$), 130.2 ($\text{C}_{19,21}$), 130.8 (C_{10}), 131.3 (C_{12}), 131.6 (C_{11}), 133.5 ($\text{C}_{7,13}$), 141.2 (C_{17}), 153.0 (C_5), 163.4 (C_{15}), 164.4 (C_{16}), 167.4 (C_{23}).



$\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$ (386.41 g/mol)

CHN-Analyse: theoretisch: C: 71.49 %, H: 4.70 %, N: 7.25 %

gemessen: C: 70.84 %, H: 5.05 %, N: 7.20 %

5.2.4.7 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoeschlorid (**41**)

A) Es wurde 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoeschure (**31**) (463 mg, 1.20 mmol) in Thionylchlorid (2.85 g, 1.74 ml, 21.9 mmol) suspendiert und 2 h unter Ruckfluss erhitzt, wobei sich die Reaktionslosung schwarz farbte. Das uberschussige Thionylchlorid wurde destillativ entfernt (1013 mbar, 80 °C) und der Ruckstand im Hochvakuum getrocknet.

B) Zu einer Suspension aus 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoeschure (**31**) (1.00 g, 2.59 mmol) in Dichlormethan (30 ml) wurden unter Inertgasatmosphare eine Losung aus Triphenylphosphan (1.37 g, 5.18 mmol) in Dichlormethan (20 ml) und Trichloracetonitril (0.75 g, 0.52 ml, 5.18 mmol) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde fur 2 h bei Raumtemperatur geruhrt und anschliessend mit Methylenchlorid (2 x 25 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden uber MgSO_4 getrocknet. Anschliessend wurde die organische Losung unter vermindertem Druck eingengt und der Ruckstand im Hochvakuum getrocknet.

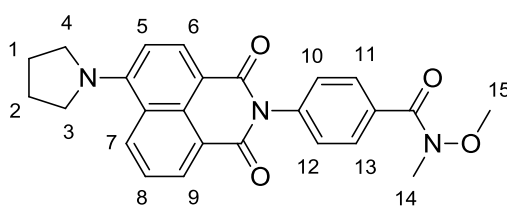
Das gewunschte Produkt **41** wurde jeweils nicht erhalten.

Syntheseweg D**5.2.4.8 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoessäure-*N*-methoxy-*N*-methylamid (32)**

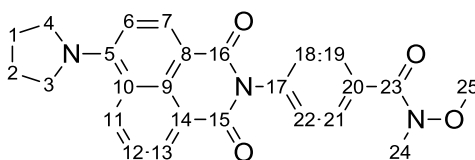
Zu einer Suspension aus 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoessäure (**31**) (3.00 g, 7.76 mmol) in Dichlormethan (100 ml) wurden unter einer Inertgasatmosphäre eine Lösung aus Triphenylphosphan (4.11 g, 15.5 mmol) in Dichlormethan (50 ml) und Trichloracetonitril (2.24 g, 1.56 ml, 15.5 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden *N,O*-Dimethylhydroxylamin (0.76 g, 7.76 mmol) und Triethylamin (3.14 g, 4.31 ml, 31.0 mmol) zugegeben und die dunkelorangene Lösung für weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Lösung mit destilliertem Wasser (2 x 50 ml) gewaschen und mit Dichlormethan (2 x 50 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach Umkristallisation aus Ethanol und Trocknen im Vakuum wurde ein gelber Feststoff **32** erhalten.

Ausbeute: 2.49 g (5.80 mmol, 75 %) eines gelben Feststoffes **32**.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ [ppm] = 2.04 (m, 4 H, H_{1,2}), 3.31 (s, 3 H, H₁₄), 3.64 (s, 3 H, H₁₅), 3.80 (m, 4 H, H_{3,4}), 6.94 (d, ³J_{HH} = 8.80 Hz, 1 H, H₅), 7.41 (d, ³J_{HH} = 8.40 Hz, 2 H, H_{10,12}), 7.66 (dd, ³J_{HH} = 8.40 Hz, 7.50 Hz, 1 H, H₈), 7.71 (d, ³J_{HH} = 8.40 Hz, 2 H, H_{11,13}), 8.26 (d, ³J_{HH} = 8.80 Hz, 1 H, H₇), 8.45 (d, ³J_{HH} = 6.60 Hz, 1 H, H₆), 8.81 (d, ³J_{HH} = 8.10 Hz, 1 H, H₉).



¹³C{¹H}-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ [ppm] = 25.5 (C_{1,2}), 33.2 (C₂₄), 52.8 (C_{3,4}), 60.8 (C₂₅), 108.5 (C₆), 108.9 (C₈), 121.9 (C₉), 123.2 (C₂₀), 128.1 (C_{18,22}), 129.0 (C_{19,21}), 130.8 (C₁₄), 131.3 (C₁₀), 132.9 (C₁₂), 133.0 (C_{7,13}), 133.9 (C₁₁), 138.3 (C₁₇), 152.5 (C₅), 163.4 (C₁₅), 162.9 (C₁₆), 168.8 (C₂₃).



$C_{25}H_{23}N_3O_4$ (429.47 g/mol)

CHN-Analyse: theoretisch: C: 69.90 %, H: 5.40 %, N: 9.78 %

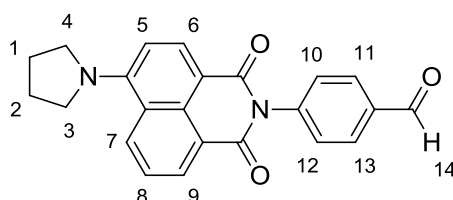
gemessen: C: 69.62 %, H: 5.39 %, N: 9.51 %

5.2.4.9 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzaldehyd (33)

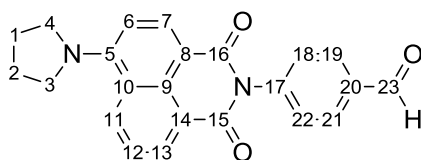
Unter einer Inertgasatmosphäre wurde zu einer Lösung aus 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoesäure-*N*-methoxy-*N*-methyl-amid (**32**) (2.00 g, 4.66 mmol) in THF, (150 ml) bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$, Lithiumaluminiumhydrid (2.65 g, 69.9 mmol) zugegeben. Die Suspension wurde für 1 h bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ gebracht und zu einer gekühlten 5%igen HCl-Ethanol-Lösung (100 ml) gegeben. Danach wurde die Reaktionslösung mit gesättigter NaCl-Lösung (50 ml) versetzt und mit einem 1:1 Diethylether : Dichlormethan Gemisch (100 ml) extrahiert. Die organische Phase wurden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Ethylacetat : Hexan / 1 : 1; Kieselgel 50 x 250 mm) und Trocknen im Vakuum wurde ein orangefarbener Feststoff **33** erhalten.

Ausbeute: 864 mg (2.28 mmol, 49 %) eines orangefarbenen Feststoffes **33**.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) : δ [ppm] = 2.05 (m, 4 H, $H_{1,2}$), 3.82 (m, 4 H, $H_{3,4}$), 6.96 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.40$ Hz, 1 H, H_5), 7.61 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.10$ Hz, 2 H, $H_{10,12}$), 7.68 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8.40$ Hz, 7.30 Hz, 1 H, H_8), 8.06 (m, 2 H, $H_{11,13}$), 8.28 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.40$ Hz, 1 H, H_7), 8.47 (d, $^3J_{\text{HH}} = 6.20$ Hz, 1 H, H_6), 8.83 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.70$ Hz, 1 H, H_9), 10.1 (s, 1 H, H_{14}).



$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ [ppm] = 25.6 ($C_{1,2}$), 53.0 ($C_{3,4}$), 108.5 (C_6), 108.8 (C_8), 121.8 (C_9), 123.2 (C_{20}), 126.7 (C_{14}), 129.9 ($C_{18,22}$), 130.3 ($C_{19,21}$), 130.8 (C_{10}), 131.2 (C_{12}), 133.1 ($C_{7,13}$), 135.6 (C_{11}), 142.1 (C_{17}), 152.6 (C_5), 162.8 (C_{15}), 163.9 (C_{16}), 192.7 (C_{23}).



$C_{23}H_{18}N_2O_3$ (370.40 g/mol)

CHN-Analyse: theoretisch: C: 74.58 %, H: 4.90 %, N: 7.56 %

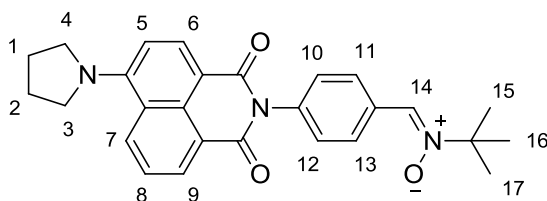
gemessen: C: 73.80 %, H: 4.82 %, N: 7.45 %

5.2.4.10 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl-*N*-*tert*-butylnitron (34)

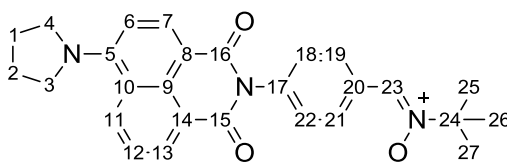
Unter einer Inertgasatmosphäre wurde zu einer Lösung aus 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobezaldehyd (**33**) (210 mg, 0.57 mmol) in Methylenchlorid (50 ml) eine Lösung aus *N*-*tert*-Butylhydroxylamin Hydrochlorid (142 mg, 1.13 mmol) und Triethylamin (126 mg, 173 μ l, 1.25 mmol) in Methylenchlorid (10 ml) sowie Magnesiumsulfat zugegeben und die fluoreszierende Lösung für 9 d bei Raumtemperatur gerührt. Alle 2 d wurde, die oben angegebene Menge, *N*-*tert*-Butylhydroxylamin Hydrochlorid und Triethylamin zugegeben. Anschließend wurde der Feststoff abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Ethylacetat : Triethylamin / 1 : 0.01; Kieselgel 50 x 250 mm) wurde ein gelb-orangefarbener Feststoff **34** erhalten.

Ausbeute: 110 mg (0.25 mmol, 44 %) eines gelb-orangefarbenen Feststoffes **34**.

1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) : δ [ppm] = 1.55 (s, 9 H, $H_{15,16,17}$), 2.04 (m, 4 H, $H_{1,2}$), 3.80 (m, 4 H, $H_{3,4}$), 6.94 (d, $^3J_{HH} = 9.00$ Hz, 1 H, H_5), 7.37 (d, $^3J_{HH} = 8.60$ Hz, 2 H, $H_{10,12}$), 7.66 (dd, $^3J_{HH} = 8.40$ Hz, 7.75 Hz, 1 H, H_8), 7.96 (s, 1 H, H_{14}), 8.26 (d, 1 H, $^3J_{HH} = 8.60$ Hz, H_7), 8.45 (d, $^3J_{HH} = 7.30$ Hz, 1 H, H_6), 8.48 (d, $^3J_{HH} = 8.60$ Hz, 2 H, $H_{11,13}$), 8.81 (d, $^3J_{HH} = 8.10$ Hz, 1 H, H_9).



$^{13}C\{^1H\}$ -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ [ppm] = 25.6 ($C_{1,2}$), 27.8 ($C_{25,26,27}$), 52.9 ($C_{3,4}$), 70.5 (C_{24}), 108.5 (C_6), 109.0 (C_8), 121.8 (C_9), 121.9 (C_{20}), 123.2 (C_{14}), 128.6 ($C_{18,22}$), 129.0 ($C_{19,21}$), 130.7 (C_{10}), 131.1 (C_{12}), 131.2 (C_{11}), 132.9 (C_7), 133.0 (C_{13}), 137.1 (C_{17}), 152.5 (C_5), 162.9 (C_{15}), 164.0 (C_{16}).



$C_{27}H_{27}N_3O_3$ (441.52 g/mol)

CHN-Analyse: theoretisch: C: 73.45 %, H: 6.16 %, N: 9.52 %

gemessen: C: 73.22 %, H: 6.17 %, N: 9.33 %

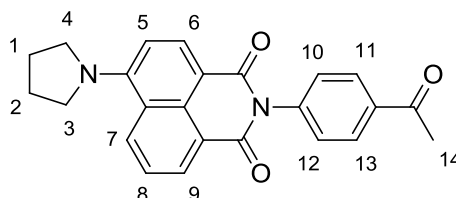
5.2.5 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimido- α -methyl-*N*-*tert*-butylnitron (21)

5.2.5.1 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoacetophenon (20)

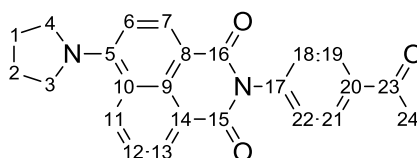
Unter einer Inertgasatmosphäre wurden zu einer Suspension aus 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalensäureanhydrid (**13**) (1.40 g, 5.24 mmol) in *N*-Methylpyrrolidon (50 ml), *p*-Aminoacetophenon (**19**) (2.83 g, 21.0 mmol) und wasserfreies Zinkacetat (4.57 g, 24.9 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung für 20 h bei 180 °C gerührt. Die dunkelorangene Lösung wurde anschließend auf Raumtemperatur gebracht und mit 5%iger HCl-Lösung (100 ml) versetzt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und mit 5%iger HCl-Lösung (50 ml), heißem Wasser (2 x 50 ml) sowie Ethanol (2 x 50 ml) gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum wurde ein gelber Feststoff **20** erhalten.

Ausbeute: 1.85 g (4.81 mmol, 92 %) eines gelben Feststoffes **20**.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 2.12 (m, 4 H, $H_{1,2}$), 2.65 (s, 3 H, H_{14}), 3.82 (m, 4 H, H_3), 6.83 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.80$ Hz, 1 H, H_5), 7.43 (m, 2 H, $H_{10,12}$), 7.56 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8.60$ Hz, 7.50 Hz, 1 H, H_8), 8.12 (m, 2 H, $H_{11,13}$), 8.44 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.70$ Hz, 1 H, H_7), 8.63 (m, 2 H, $H_{6,9}$).



$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 26.1 ($C_{1,2}$), 26.8 (C_{24}), 53.3 ($C_{3,4}$), 108.6 (C_6), 110.2 (C_8), 122.5 (C_{20}), 122.7 (C_{14}), 123.1 ($C_{18,22}$), 129.3 ($C_{19,21}$), 131.6 (C_{10}), 132.6 (C_{12}), 133.9 ($C_{7,13}$), 136.8 (C_{11}), 140.6 (C_{17}), 153.1 (C_5), 163.9 (C_{15}), 164.8 (C_{16}), 197.4 (C_{23}).



$C_{24}H_{20}N_2O_3$ (384.43 g/mol)

CHN-Analyse: theoretisch: C: 74.98 %, H: 5.24 %, N: 7.29 %

gemessen: C: 73.80 %, H: 5.51 %, N: 7.50 %

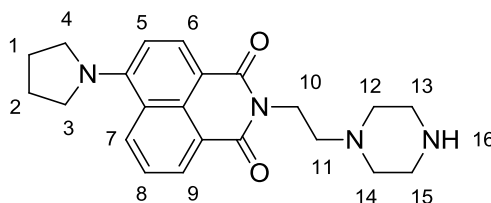
5.2.6 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin-*N*-oxid (**24**)

5.2.6.1 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin (**23**)

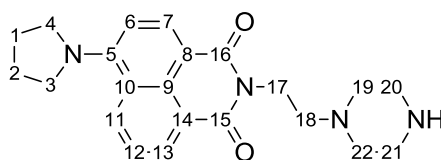
Zu einer Lösung aus Aminoethylpiperazin (**22**) (1.95 g, 15 mmol) in Ethanol (100 ml) wurde 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (**13**) (2.00 g, 7.48 mmol) zugegeben und das RG für 20 h unter Rückfluss gerührt. Die orangefarbene Lösung wurde auf 0 °C abgekühlt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde aus Toluol umkristallisiert und der erhaltene gelbe Feststoff **23** im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 2.52 g (6.66 mmol, 89 %) eines gelben Feststoffes **23**.

1H -NMR ($CDCl_3$, 200 MHz): δ [ppm] = 1.66 (s, 1 H, H_{16}), 2.11 (m, 4 H, $H_{1,2}$), 2.59 (m, 4 H, $H_{12,14}$), 2.69 (m, 2 H, H_{11}), 2.89 (t, $^3J_{HH} = 4.50$ Hz, 4.50 Hz, 4 H, $H_{13,15}$), 3.79 (m, 4 H, $H_{3,4}$), 4.34 (m, 2 H, H_{10}), 6.79 (d, $^3J_{HH} = 8.70$ Hz, 1 H, H_5), 7.52 (t, $^3J_{HH} = 7.90$ Hz, 1 H, H_8), 8.39 (d, $^3J_{HH} = 8.60$ Hz, 1 H, H_7), 8.56 (m, 2 H, $H_{6,9}$).



$^{13}C\{^1H\}$ -NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ [ppm] = 26.1 ($C_{1,2}$), 37.1 (C_{18}), 46.1 ($C_{20,21}$), 53.2 ($C_{3,4}$), 54.7 ($C_{19,22}$), 56.4 (C_{17}), 108.5 (C_{13}), 110.7 (C_{11}), 122.5 (C_6), 122.6 (C_{12}), 123.0 (C_{10}), 131.1 (C_7), 131.9 (C_9), 133.4 ($C_{8,14}$), 152.7 (C_5), 164.0 (C_{15}), 164.9 (C_{16}).



$C_{22}H_{26}N_4O_2$ (378.47 g/mol)

CHN-Analyse: theoretisch: C: 69.82 %, H: 6.92 %, N: 14.80 %

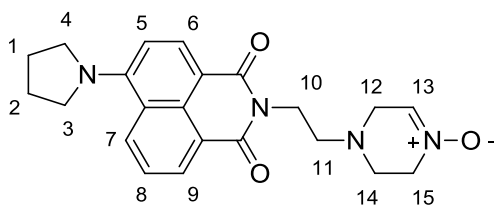
gemessen: C: 69.10 %, H: 6.88 %, N: 14.92 %

5.2.6.2 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin-N-oxid (**24**)

Unter einer Inertgasatmosphäre wurde zu einer Lösung aus Natriumwolframat Dihydrat (50.8 mg, 0.15 mmol) in Wasser (50 ml) 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin (**23**) (0.50 g, 3.85 mmol) zugegeben und die Lösung auf $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Danach wurde 30 %iges Wasserstoffperoxid (0.29 g, 0.26 ml, 8.47 mmol) innerhalb 30 min. langsam zu getropft und die Reaktionsmischung für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die orangefarbene Lösung mit NaCl gesättigt, mit Methylenchlorid (8 x 50 ml) extrahiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach einer Säulenchromatographie (Ethylacetat : Petrolether : Trimethylamin / 1 : 3 : 0.01; Kieselgel 50 x 250 mm) wurde ein gelb-orangefarbener Feststoff erhalten.

Das Produkt **24** konnte jedoch nicht von Edukt **23** getrennt werden. Das prozentuale Verhältnis lag, laut $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischer Analyse, bei 70% (**24**) zu 30% (**23**).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 2.11 (m, 4 H, $H_{1,2}$), 2.60 (m, 4 H, $H_{12,14}$), 2.76 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.80\text{ Hz}$, 6.80 Hz, 2 H, H_{11}), 3.34 - 3.44 (m, 4 H, H_{15}), 3.79 (m, 4 H, $H_{3,4}$), 4.34 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.80\text{ Hz}$, 6.80 Hz, 2 H, H_{10}), 6.81 (m, 1 H, H_5), 7.55 (m, 1 H, H_8), 8.01 (s, 1 H, H_{13}), 8.40 (m, 1 H, H_7), 8.58 (m, 2 H, $H_{6,9}$).



$C_{22}H_{24}N_4O_3$ (392.45 g/mol)

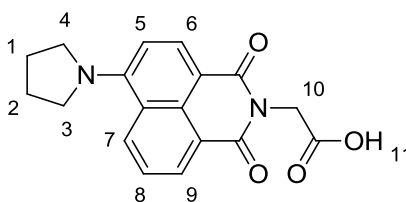
5.2.7 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethyl-*N*-*tert*-butylnitron (29)

5.2.7.1 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoessigsäure (26)

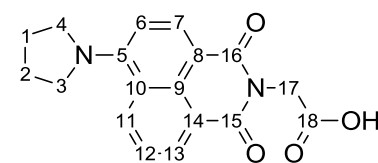
Zu einer Suspension aus 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (**13**) (3.00 g, 11.2 mmol) in Dimethylsulfoxid (100 ml) wurde Glycin (**25**) (0.84 g, 11.2 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung für 2 h bei 170 °C gerührt. Anschließend wurde zu der dunkelorange-farbenen Lösung Aktivkohle gegeben, das Reaktionsgemisch heiß filtriert und auf Eis gegeben. Der ausgefallene Feststoff wurde mit heißem Wasser (3 x 50 ml) gewaschen und aus Toluol umkristallisiert. Der erhaltene orange-farbene Feststoff **26** wurde danach im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 3.30 g (10.2 mmol, 91 %) eines orange-farbenen Feststoffes **26**.

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ [ppm] = 2.08 (m, 4 H, H_{1,2}), 3.78 (m, 4 H, H_{3,4}), 4.97 (s, 2 H, H₁₀), 6.79 (d, ³J_{HH} = 8.70 Hz, 1 H, H₅), 7.51 (m, 1 H, H₈), 8.41 (d, ³J_{HH} = 8.80 Hz, 1 H, H₇), 8.58 (m, 2 H, H_{6,9}).



¹³C{¹H}-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ [ppm] = 25.5 (C_{1,2}), 52.8 (C₁₇), 59.7 (C_{3,4}), 108.0 (C₆), 113.1 (C₈), 121.0 (C₉), 123.1 (C₁₄), 130.6 (C₁₀), 130.7 (C₁₂), 133.1 (C_{7,13}), 139.8 (C₁₁), 152.3 (C₅), 162.3 (C₁₅), 163.5 (C₁₆), 169.6 (C₁₈).



C₁₈H₁₆N₂O₄ (324.33 g/mol)

CHN-Analyse: theoretisch: C: 66.66 %, H: 4.97 %, N: 8.46 %

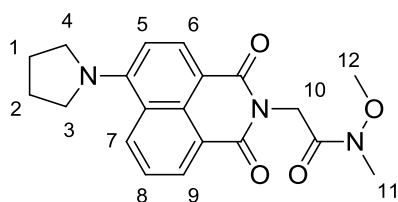
gemessen: C: 66.23 %, H: 4.86 %, N: 8.37 %

5.2.7.2 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoessigsäure-*N*-methoxy-*N*-methylamid (27)

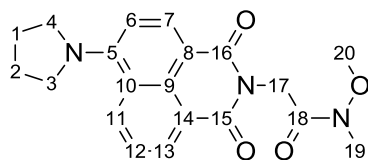
Zu einer Suspension aus 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoessigsäure (**26**) (2.64 g, 8.14 mmol) in Methylenchlorid (100 ml) wurde 1,1'-Carbonyldiimidazol (1.58 g, 9.77 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Gasentwicklung wurde *N,O*-Dimethylhydroxylamin Hydrochlorid (0.97 g, 9.77 mmol) zugegeben und die Lösung für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das RG mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (2 x 50 ml) extrahiert und mit destilliertem Wasser (2 x 50 ml) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde aus Toluol umkristallisiert und der erhaltene orangefarbene Feststoff **27** im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 2.55 g (6.94 mmol, 85 %) eines orangefarbenen Feststoffes **27**.

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ [ppm] = 2.08 (m, 4 H, H_{1,2}), 3.23 (s, 3 H, H₁₁), 3.75 (m, 4 H, H_{3,4}), 3.88 (s, 3 H, H₁₂), 5.11 (s, 2H, H₁₀), 6.75 (m, 1 H, H₅), 7.48 (t, ³J_{HH} = 8.00 Hz, 1 H, H₈), 8.38 (d, ³J_{HH} = 8.60 Hz, 1 H, H₇), 8.54 (m, 2 H, H_{6,9}).



¹³C{¹H}-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ [ppm] = 26.1 (C_{1,2}), 40.8 (C₁₇), 32.5 (C₁₉), 53.2 (C_{3,4}), 61.5 (C₂₀), 108.5 (C₆), 110.4 (C₈), 122.3 (C₉), 122.7 (C₁₄), 123.0 (C₁₀), 131.3 (C₁₂), 132.2 (C₁₁), 133.7 (C_{7,13}), 152.9 (C₅), 163.9 (C_{15,16}), 164.9 (C₁₈).



C₂₀H₂₁N₃O₄ (367.40 g/mol)

CHN-Analyse: theoretisch: C: 65.38 %, H: 5.76 %, N: 11.44 %

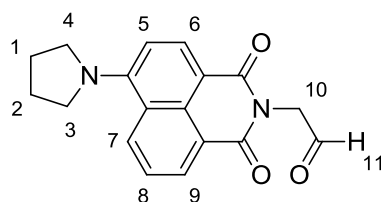
gemessen: C: 65.28 %, H: 5.68 %, N: 11.57 %

5.2.7.3 Synthese von 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoacetaldehyd (**28**)

Unter einer Inertgasatmosphäre wurde zu einer Lösung aus 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoessigsäure-*N*-methoxy-*N*-methyl-amid (**27**) (1.07 g, 2.91 mmol) in THF (150 ml), bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, Lithiumaluminiumhydrid (1.66 g, 43.6 mmol) zugegeben. Die Suspension wurde für 1 h bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gebracht und zu einer 5%igen HCl-Ethanol-Lösung (100 ml) gegeben. Danach wurde die Reaktionslösung mit gesättigter NaCl-Lösung (50 ml) versetzt und mit einem 1:1 Diethylether : Dichlormethan Gemisch (100 ml) extrahiert. Die organische Phase wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene dunkelorange-farbene Feststoff **28** wurde anschließend im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 700 mg (2.27 mmol, 56 %) eines dunkelorange-farbenen Feststoffes **28**.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ [ppm] = 2.05 (m, 4 H, $\text{H}_{1,2}$), 3.71 (m, 4 H, $\text{H}_{3,4}$), 4.95 (s, 2 H, H_{10}), 6.67 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.60$ Hz, 1 H, H_5), 7.44 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.90$ Hz, 1 H, H_8), 8.27 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.60$ Hz, 1 H, H_7), 8.48 (m, 2 H, $\text{H}_{6,9}$), 9.68 (s, 1 H, H_{11}).



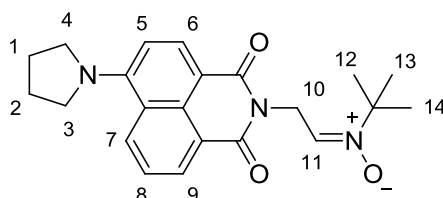
$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ (308.33 g/mol)

5.2.7.4 Synthese des 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethyl-*N*-*tert*-butylnitron (**29**)

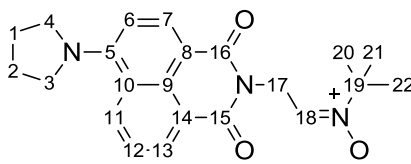
Unter einer Inertgasatmosphäre wurde zu einer Lösung aus 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobezaldehyd (**28**) (700 mg, 2.27 mmol) in Methylenchlorid (50 ml) eine Lösung aus *N*-*tert*-Butylhydroxylamin Hydrochlorid (570 mg, 4.54 mmol) und Triethylamin (505 mg, 0.69 ml, 4.99 mmol) in Methylenchlorid (10 ml) sowie MgSO_4 zugegeben und die fluoreszierende Lösung für 9 d bei Raumtemperatur gerührt. Alle 2 d wurde, die oben angegebene Menge, *N*-*tert*-Butylhydroxylamin Hydrochlorid und Triethylamin zugegeben. Anschließend wurde der Feststoff abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Ethylacetat : Petrolether : Triethylamin / 1 : 4 : 0.01; Kieselgel 50 x 250 mm) wurde ein gelb-orangefarbener Feststoff **29** erhalten.

Ausbeute: 340 mg (0.90 mmol, 40 %) eines gelb-orangefarbenen Feststoffes **29**.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200MHz): δ [ppm] = 1.44 (s, 9 H, $\text{H}_{12,13,14}$), 2.05 (m, 4 H, $\text{H}_{1,2}$), 3.73 (m, 4 H, $\text{H}_{3,4}$), 5.10 (d, $^3J_{\text{HH}} = 4.30$ Hz, 2 H, H_{10}), 6.72 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.80$ Hz, 1 H, H_5), 6.80 (t, $^3J_{\text{HH}} = 4.30$ Hz, 4.30 Hz, 1 H, H_{11}), 7.46 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8.40$ Hz, 7.50 Hz, 1 H, H_8), 8.33 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.70$ Hz, 1 H, H_7), 8.49 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.30$ Hz, 1 H, H_6), 8.53 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.50$ Hz, 1 H, H_9).



$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 26.1 ($\text{C}_{1,2}$), 27.9 ($\text{C}_{20,21,22}$), 38.6 (C_{17}), 53.3 ($\text{C}_{3,4}$), 69.3 (C_{19}), 108.5 (C_6), 110.0 (C_8), 122.1 (C_9), 122.5 (C_{14}), 123.0 (C_{10}), 131.4 (C_{12}), 132.2 (C_7), 132.4 (C_{13}), 133.8 (C_{11}), 152.9 (C_5), 163.8 (C_{15}), 164.8 (C_{16}).



$\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$ (379.45 g/mol)

CHN-Analyse: theoretisch: C: 69.90 %, H: 5.40 %, N: 9.78 %

gemessen: C: 69.95 %, H: 5.31 %, N: 9.66 %

5.3 ESR-Spektroskopie

5.3.1 Benötigte Lösungen

Zur ESR-spektroskopischen Untersuchung der Nitrone **24**, **29** und **34** wurden folgende Lösungen benötigt:

Herstellung einer 1 mM Nitron-Lösung

1 mM PNIP-Nitron-Lösung: 1.10 mg PNIP-Nitron ad 2.49 ml entgastem Ethylacetat

1 mM PNIEPO-Lösung: 1.29 mg PNIEPO ad 3.29 ml entgastem Ethylacetat

1 mM PNIEPO-Lösung: 1.29 mg PNIEPO ad 3.29 ml entgastem Methylenchlorid

1 mM PNIM-Nitron-Lösung: 1.38 mg PNIM-Nitron ad 3.64 ml entgastem Ethylacetat

Herstellung einer Fenton-Lösung

100 mM H ₂ O ₂ -Lösung:	510 µl 30%iges H ₂ O ₂ ad 50 ml H ₂ O _{dd}
10 mM Fe ²⁺ -Lösung:	196.10 mg (NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ × 6 H ₂ O ad 50 ml H ₂ O _{dd}

Herstellung der Lösungen zur Erzeugung von Superoxidanionradikalen (Leinisch, 2009):

4 mM Hypoxanthin-Lösung:	5.44 mg Hypoxanthin in 1 ml 0.5 M NaOH lösen ad 10 ml mit PBS-Puffer, pH = 7.2 mit HCl wieder eingestellt
10 mM DTPA-Lösung:	39.34 mg DTPA ad 10 ml PBS, pH = 7.2
Xanthinoxidase:	1 u/ml, Fa. Serva, Heidelberg

Herstellung der Lösungen zur Erzeugung von Superoxidanionradikalen (Mitchell *et al.*, 2013):

400 µM Hypoxanthin-Lösung:	1.46 mg Hypoxanthin ad 26.8 ml PBS-Puffer, pH = 7.4
Xanthinoxidase:	1 u/ml, Fa. Serva, Heidelberg
100 mM PNIM-Nitron-Lösung:	0.95 mg PNIM-Nitron ad 25 µl PBS-Puffer, pH = 7.4
1 mM DTPA-Lösung:	3.93 mg DTPA ad 10 ml PBS-Puffer, pH = 7.4

5.3.2 Pipettierschemata

Für die ESR-spektroskopischen Messungen der Nitrone PNIEPO (24), PNIMN (29) und PNIPN (34) wurde folgende Pipettierschemata benutzt:

Tabelle 5: Pipettierschema für die Nitron-Fenton-System-Messungen

Substanz	Volumen/ μl	Volumen/ μl
1 mM-Nitron-Lösung	100	100
Fe^{2+} -Lösung	50	100
H_2O_2 -Lösung	50	100

Für die Messungen mit einem Hydroxylradikal-generierenden System wurden 100 μl einer 1 mM-Nitron-Lösung entnommen und danach 50 μl bzw. 100 μl einer 10 mM Fe^{2+} -Lösung sowie 50 μl bzw. 100 μl einer 100 mM H_2O_2 -Lösung zugegeben. Anschließend wurden die Phasen gevortext, die organische Phase entnommen und vermessen.

Tabelle 6: Pipettierschema für die Nitron-XOD-System-Messungen nach Leinisch und Mitchell

Substanz	Volumen/ μl	Volumen/ μl
1 mM-Nitron-Lösung	129	50
Hypoxanthin-Lösung	50	100
DTPA-Lösung	100	50
Xanthinoxidase	0,2	4
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	46.7	-

Für die Messungen mit einem Superoxidanionradikal-erzeugenden System wurden 129 μl einer 1 mM-Nitron-Lösung entnommen und danach 50 μl einer 4 mM Hypoxanthin-Lösung, 100 μl einer 10 mM DTPA-Lösung sowie 46.7 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ zugegeben. Die Phasen wurden gevortext und anschließend die Xanthinoxidase zu pipettiert. Die Phasen wurden erneut gevortext, die organische Phase entnommen und schnellstmöglich vermessen (Leinisch, 2009).

Für die Messungen mit einem Superoxidationradikal-erzeugenden System nach Mitchell wurde die Xanthinoxidase zu einer DTPA-Hypoxanthinlösung in PBS-Puffer und anschließend die Nitron-PBS-Puffer-Suspension zugegeben. Es wurde 10 min gewartet und die Messung gestartet.

5.3.3 ESR-Parameter

5.3.3.1 ESR-Parameter der Messungen mit Hydroxylradikal-erzeugenden Systemen

Für die ESR-Untersuchungen der erwarteten OH-Addukte der fluoreszierenden Nitrone PNIEPO (**24**), PNIMN (**29**) und PNIPN (**34**) wurden folgende Messparameter eingestellt:

Tabelle 7: ESR-Parameter für die Nitron-Fenton-System-Messungen

Parameter	1. Messung	2. Messung
Center field [G]	3460	3460
Sweep width [G]	100	100
Number of points	1024	1024
Number of scans	10	10
Microwave frequency [GHz]	9.71	9.71
Conversion Time [ms]	81.92	40.96
Time Constant [ms]	1.28	1.28
Sweep Time [s]	83.89	41.94
Modulation Frequency [kHz]	100	100
Modulation Amplitude [G]	10	10
Power [mW]	20	20
Power attenuation [dB]	25	25
Receiver gain [dB]	85	85

5.3.3.2 ESR-Parameter der Messungen mit Superoxidanionradikal-erzeugenden Systemen

Für die ESR-Untersuchungen der erwarteten OOH-Addukte der fluoreszierenden Nitrone PNIEPO (**24**), PNIMN (**29**) und PNIPN (**34**) wurden folgende Messparameter eingestellt:

Tabelle 8: ESR-Parameter für die Nitron-XOD-System-Messungen nach Leinisch und Mitchell

Parameter	1. Messung nach Leinisch	2. Messung nach Mitchell
Center field [G]	3460	3460
Sweep width [G]	100	55
Number of points	1024	1024
Number of scans	5	10
Microwave frequency [GHz]	9.71	9.71
Conversion Time [ms]	40.96	20.48
Time Constant [ms]	1.28	1.28
Sweep Time [s]	41.94	20.97
Modulation Frequency [kHz]	100	100
Modulation Amplitude [G]	1	1
Power [mW]	20	20
Power attenuation [dB]	25	25
Receiver gain [dB]	85	85

5.4 UV- und Fluoreszenzspektroskopie, Fluoreszenz-*Quenching*-Experimente

5.4.1 Benötigte Lösungen

Zur Herstellung der benötigten Nitron-Lösungen wurden zuerst 1 mM Nitron-Lösungen in entgastem Ethylacetat und in Dimethylsulfoxid hergestellt:

Herstellung einer 1 mM Nitron-Lösung in entgastem EtOAc

1 mM PNIP-Nitron-Lösung: 0.54 mg PNIP-Nitron ad 1.23 ml entgastem EtOAc

1 mM PNIM-Nitron-Lösung: 0.70 mg PNIM-Nitron ad 1.80 ml entgastem EtOAc

Herstellung einer 1 mM Nitron-Lösung in DMSO

1 mM PNIP-Nitron-Lösung: 1.33 mg PNIP-Nitron ad 3.01 ml DMSO

1 mM PNIM-Nitron-Lösung: 1.19 mg PNIP-Nitron ad 3.14 ml DMSO

1 mM PNIMP-Nitron-Lösung 1.34 mg PNIMP-Nitron ad 3.05 ml DMSO

Danach wurde eine 1 μM Nitron-Lösung hergestellt. Dazu wurden jeweils 1 μl aus der 1 mM Nitron-Stammlösung entnommen und ad 1000 μl entgastem EtOAc bzw. DMSO verdünnt. Zur Herstellung der 10 nM Nitron-EtOAc-Lösung wurden 10 μl aus der 1 μM Nitron-Lösung entnommen und ad 1000 μl entgastem EtOAc verdünnt. Zur Herstellung der 1 μM Nitron-DMSO-Lösung wurden 1 μl aus der 1 mM Nitron-Lösung entnommen und ad 1000 μl DMSO verdünnt. Zur Messung der UV/Vis-Spektren wurde eine 100 μM Lösung verwendet. Dazu wurden jeweils 100 μl der 1 mM Nitron-Stammlösung entnommen und ad 1000 μl Lösungsmittel aufgefüllt. Zur Überprüfung der Inhibitor-Auswirkung wurde ebenfalls eine 10 nM Nitron-EtOAc-Lösung verwendet.

Für die durchgeführten Fluoreszenz-*Quenching*-Experimente wurde eine Fenton-Lösung verwendet. Die dazu benötigten 100 mM H_2O_2 - und eine 10 mM Fe^{2+} -Lösungen wurden gemäß Kapitel 5.3.1 hergestellt. Die Rotenon-Lösung wurde gemäß Tabelle 15 hergestellt.

5.4.2 Vorgehensweise und Pipettierschemata

Zur Detektion der UV- und Fluoreszenzspektren der fluoreszierenden Nitrone wurde zuerst ein Lösungsmittelspektrum als Blank aufgenommen. Dazu wurden 1.5 ml entgastes EtOAc bzw. DMSO vermessen. Anschließend wurde das UV-Spektrum des Nitrons aufgenommen. Dafür wurde ein Volumen von ebenfalls 1.5 ml der 10 μM bzw. 100 μM Stammlösung benötigt.

Für die Fluoreszenz-*Quenching*-Experimente wurden 1.5 ml 1 nM Nitron-Lösung vorgelegt, diese anschließend mit unterschiedlichen Volumina an 100 mM H₂O₂- sowie 10 mM Fe²⁺-Lösung für 60 Sekunden inkubiert und danach vermessen (Tabelle 9). Nach anschließenden 5 Minuten wurde die entsprechende Messung wiederholt. Bei größeren Volumina an Fenton-Lösung wurde nach 30 Minuten jeweils noch eine Kontroll-Messung durchgeführt, um die Fluoreszenz-Abnahme zu kontrollieren. Für die Messungen in DMSO wurde ein Gesamtvolumen von 2 ml eingestellt (Tabelle 10). Dafür wurde, nach der Zugabe der Fenton-Lösung, das Volumen mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Für die Fluoreszenz-*Quenching*-Experimente mit Rotenon und Antimycin A wurden 1 µM Nitron-Lösungen in entgastem Ethylacetat verwendet und unterschiedliche Volumina der Atmungsketteinhibitoren zu pipettiert (Tabelle 11). Vor jeder Zugabe der Inhibitor-Lösung wurde eine Kontroll-Messung durchgeführt.

Tabelle 9: Pipettierschema für die Fluoreszenz-*Quenching*-Experimente in EtOAc

Messung	1 nM Nitron-Stammlösung [µl]	Volumen 100 mM H ₂ O ₂ -Lösung [µl]	Volumen 10 mM Fe ²⁺ [µl]
1	1500	0	0
2	1500	10	10
3	1500	25	25
4	1500	50	50
5	1500	150	150
6	1500	250	250

Tabelle 10: Pipettierschema für die Fluoreszenz-*Quenching*-Experimente in DMSO

Messung	1 nM Nitron-Stammlösung [µl]	Volumen 100 mM H ₂ O ₂ -Lösung [µl]	Volumen 10 mM Fe ²⁺ [µl]	Volumen H ₂ O _{dd} [µl]
1	1500	0	0	500
2	1500	10	10	480
3	1500	25	25	450
4	1500	100	100	300
5	1500	250	250	0

Tabelle 11: Pipettierschema für die Fluoreszenz-*Quenching*-Experimente mit Rotenon und Antimycin A (1 nM Nitron-SL)

Messung	V(Nitron-SL) [µl]	V(Inhibitor-Lsg.) [µl]
1	1500	0
2	1500	3
3	1500	0
4	1500	10
5	1500	0
6	1500	100

5.5 Arbeiten mit Zellen

5.5.1 Zellkultur

Für die *in vitro* Experimente wurden die adhärende MCF7-, *wt*-MEF- und Hela-Zelllinien kultiviert. Dies wurde in einem Inkubator bei 37 °C und mit 5 % CO₂ vorgenommen. Alle

Arbeiten, außer bei der Inkubation mit Nitron-Lösung bei den Messungen am cLSM, wurden mit sterilen Lösungen, Medien und Geräten, unter einer Sterilbank durchgeführt. In der Regel wurde nach 2 Tagen bzw. nach Bedarf früher oder später, das jeweilige Medium (RPMI für MCF-7- und DMEM für *wt*-MEF- und Hela-Zellen; jeweils mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin) gegen frisches ausgetauscht.

Zum Passagieren wurden die Zellen wie in Kap. 5.5.2 abgeerntet und 2 – 3 Tropfen der Zellsuspension in 20 ml frischem, vorgewärmten Medium inokuliert.

5.5.2 Ernten von Zellen

Alle verwendeten Geräte, Lösungen und Medien müssen unter sterilen Bedingungen gehandhabt werden, sowie vor dem Kontakt mit den Zellen auf 37 °C erwärmt werden. Das Medium wurde zunächst unter der Sterilbank vom Zellrasen entfernt und der Rasen mit PBS-Puffer (10 ml) gewaschen. Anschließend wurde 2.5 ml Trypsin-Lösung mit EDTA zugegeben und für 5 min im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch Klopfen vom Boden der Kulturflasche gelöst. Durch Zugabe von 5 ml des jeweiligen Mediums wurde die Lyse abgestoppt und die Zellsuspension, nach 5-maligem Spülen des Flaschenbodens, in ein *falcon-tube* umgefüllt.

5.5.3 Bestimmung der Zellzahl

Mittels einer Neubauer-*improved*-Zählkammer, wurde die Zellzahl bestimmt. Dies war für den SRB-Test notwendig. Zur Bestimmung der Zellzahl, wurden 10 µl gevortexte Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung versetzt, gut gemischt und 10 µl dieser Mischung in die Zählkammer gegeben. Bei der Betrachtung im Durchsichtmikroskop sind geschädigte Zellen blau gefärbt. Diese wurden bei der Zählung nicht erfasst.

5.5.4 SRB-Test

Die Arbeiten wurden unter der Sterilbank mit sterilen Medien und Geräten durchgeführt. Zunächst wurden die jeweiligen Zellen, wie in Kap. 5.5.2 beschrieben, abgeerntet und die Anzahl der Zellen wie in Kap. 5.5.3 bestimmt. Es zeigte sich, dass für den Test eine Zellzahl von 10000 Zellen pro ml am besten eignete.

Das entsprechende Volumen an Zellsuspension wurde in 50 ml Medium gegeben, gut durchmischt und jeweils 1 ml dieser Zellsuspension pro Napf, in 24-*well*-Platten gegeben. Diese wurden im Brutschrank für 2 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Es wurde eine 10 mM Stammlösung (SL) der jeweiligen Nitrone in DMSO hergestellt, das Medium aus den Näpfen der 24-well-Platte abgesaugt und durch, mit der jeweiligen Nitronlösung versetztes Medium, nach den Pipettierschemata (Tabelle 12; Tabelle 13) aufgefüllt. Die DMSO-Konzentration betrug 0.5 %, was zuvor mittels einem separaten SRB-Test, als atoxisch bei allen verwendeten Zelllinien, bewertet wurde. Die Nitron-Stammlösungen wurden nach Tabelle 14 hergestellt.

Tabelle 12: Pipettierschema für die Zytotoxizitätsmessung mittels SRB-Test (10 mM Nitron-SL)

c(Nitron) _{Napf} [μ M]	V(Nitron-SL) [μ l]	V(DMSO) [μ l]	V(Medium) [μ l]
0	0	30	5970
8.3	5	25	5970
16.7	10	20	5970
25.0	15	15	5970
33.3	20	10	5970
50.0	30	0	5970

Tabelle 13: Pipettierschema für die Zytotoxizitätsmessung mittels SRB-Test (1 mM Nitron-SL)

c(Nitron) _{Napf} [μ M]	V(Nitron-SL) [μ l]	V(DMSO) [μ l]	V(Medium) [μ l]
0	0	30	5970
0.8	5	25	5970
1.7	10	20	5970
2.5	15	15	5970
3.3	20	10	5970
5.0	30	0	5970

Tabelle 14: Herstellung der Stammlösungen der zu untersuchenden Nitrone

Lösung	Bestandteile
10 mM PNIMP-Nitron-SL	2.33 mg PNIMP-Nitron ad 511 μ l DMSO
10 mM PNIP-Nitron-SL	2.16 mg PNIP-Nitron ad 490 μ l DMSO
10 mM PNIM-Nitron-SL	1.69 mg PNIM-Nitron ad 445 μ l DMSO
10 mM PNIEPO-SL	2,03 mg PNIEPO ad 516 μ l DMSO

Nach 72 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂, wurden 100 μ l einer 50 %igen Trichloressigsäure-Lösung zum Medium gegeben und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Das TCA-haltige Medium wurde verworfen und die *wells* 4 mal mit kaltem Leitungswasser gewaschen und für 1 h bei 50 °C getrocknet.

Anschließend wurden pro *well* 250 μ l SRB-Lösung gegeben und für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Färbelösung wurde verworfen und die *wells* 3 mal mit kaltem Leitungswasser sowie 3 mal mit 1 %iger Essigsäure gewaschen. Anschließend wurde die Platte wiederum für 1 h bei 50 °C getrocknet.

Zur eigentlichen Messung wurden nun die *wells* mit je 500 μ l *Tris Base* Puffer befüllt und die Platten bei $\lambda = 564$ nm im *plate reader* vermessen. Zur Korrektur, wurde eine Platte mit *Tris Base* Puffer vermessen und bei der Auswertung subtrahiert.

5.5.5 *In vitro* Experimente am konfokalen *Laser-Scanning-Mikroskop*

5.5.5.1 Vorbereitung der Zellen und benötigte Lösungen

Für die *in vitro* Messungen am konfokalen *Laser-Scanning-Mikroskop* wurden zunächst die verwendeten MCF-7-, *wt*-MEF- und Hela-Zellen unter sterilen Bedingungen vorbereitet. Dazu wurden die verwendeten Zellen zuerst geerntet (siehe Kap. 5.5.2). Anschließend wurden, die zur Fluoreszenzmikroskopie benötigten, *coverslips* in die *wells* von 6-Well-Platten gegeben und je 1 ml RPMI-Medium bzw. DMEM-Medium hinzugefügt. Danach wurden 3-5 Tropfen der MCF7-, *wt*-MEF- bzw. Hela-Zellsuspension zu pipettiert und die 6-Well-Platten für mindestens 3 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inokuliert. Die benötigten Lösungen für die folgenden Messungen wurden wie in Tabelle 15 hergestellt.

Tabelle 15: Herstellung der Lösungen zur Fluoreszenzmikroskopie

Lösung	Bestandteile
Nitron-Lösungen	Siehe Tabelle 14
TMRE-Lösung	100 mM (510 µg) TMRE + 1000 µl PBS-Puffer, davon 40 µl ad 1000 µl PBS-Puffer ($c_{SL} = 40 \mu\text{M}$)
Rotenon-Lösung	3 mM (5.64 mg in 4.74 ml DMSO) Rotenon davon 10 µl ad 290 µl DMSO ($c_{SL} = 100 \mu\text{M}$)
Antimycin A-Lösung	50 mg / ml (5 mg in 100 µl DMSO) Antimycin A davon 40 µl ad 1000 µl DMSO ($c_{SL} = 2 \text{ mg / ml}$)

5.5.5.2 Vorgehensweise

Für die Messungen am cLSM wurde zunächst eine 0,5 %-ige Nitron-DMSO-Lösung hergestellt (Tabelle 14). Dazu wurden jeweils 5 µl Nitron-Stammlösung ad 1000 µl DMEM-Medium (Hela- und *wt*-MEF-Zellen) bzw. RPMI-Medium (MCF-7-Zellen) aufgefüllt. Die, auf den *coverslips* angewachsenen, Zellen wurden anschließend mit 1 ml der 0,5 %igen-Nitron-DMSO-Medium-Lösung für 20 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Medium (3 x 1 ml) gewaschen und vorsichtig in der Probenhalterung eingelegt. Nach Einstellung der Ebene auf die maximale Fluoreszenz werden 2 µl der jeweiligen Inhibitoren zugegeben und die Zellen vermessen. Es wurden zuerst Rotenon und Antimycin A einzeln und später zusammen zugegeben. Für die Messungen mit dem Zellkompartiment-spezifischen Farbstoff TMRE wurde analog verfahren. Es wurde allerdings bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt. Für die TMRE-Messung wurde bei 561 nm angeregt.

Bei den Messungen zur Fluoreszenzlöschung wurden für 60 s, jede Sekunde, und direkt anschließend, für 15 min, alle 10 s, ein Bild bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und mit einer Belichtungsdauer von 500 ms aufgenommen. Um die verwendeten Zellen auf ihre Eigenfluoreszenz zu überprüfen wurden, die auf den Objektträgern befindlichen, Zellen mit je 2 µl Antimycin A und Rotenon für 20 min inkubiert und danach vermessen.

Es ist anzumerken, dass der *auto gain* der Kamera nicht abgestellt werden konnte und somit bei manchen Aufnahmen, die Belichtung verändert wurde, sodass keine quantitative Aussage zur Fluoreszenzlöschung möglich war.

Literaturverzeichnis

- Atkins, P. W. *Physikalische Chemie, 3rd Ed.* Weinheim: Wiley-VCH, 2004.
- Bartosz, G. „Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species.“ *Clinica Chimica Acta*, 368, 2006: 53-76.
- Berliner, L. J. *In Vivo EPR (ESR) - Theory and Application.* New York: Springer, 2003.
- Buettner, G. R. „Spin Trapping: ESR parameters of spin adducts.“ *Free Radical Biology Medicine*, 3, 1987: 259-303.
- Bystryak, I. M., G. I. Likhtenshtein, A. I. Kotel'nikov, O. Hankovsky, and K. Hideg. „The influence of the molecular dynamics of the solvent on the photoreduction of nitroxy radicals.“ *Russian J. Phys. Chem.*, 60, 1986: 1679-1683.
- Cadenas, E., A. Boveris, C. I. Ragan, and A. Stoppani. „Production of Superoxide Radicals and Hydrogen Peroxide by NADH-Ubiquinone Reductase and Ubiquinol-Cytochrome c Reductase from Beef-Heart Mitochondria.“ *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 180, 1977: 248-257.
- Cadenas, E., and K. J. Davies. „Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging.“ *Free Radic. Biol. Med.*, 29, 2000: 222-230.
- Carney, J. M., and R. A. Floyd. Method and compositions for treating age related disorders. US Patent US5578617 A. 1996.
- Das, A., B. Gopalakrishnan, O. H. Voss, A. Doseff, and F. A. Villamena. „Inhibition of ROS-induced apoptosis in endothelial cells by nitron spin traps via induction of phase II enzymes and suppression of mitochondria-dependent pro-apoptotic signaling.“ *Biochemical Pharmacology*, 84, 2012: 486-497.
- Dhainaut, A., A. Tizot, E. Raimbaud, B. Lockhart, P. Lestage, and S. Goldstein. „Synthesis, Structure, and Neuroprotective Properties of Novel Imidazolyl Nitrones.“ *J. Med. Chem.*, 43, 2000: 2165-2175.
- Dugovič, B., C. Hametner, and N. Prónayová. „Diastereoselectivity of nitron 1,3-dipolar cycloaddition to Baylis-Hillman adducts.“ *ARKIVOC*, XIV, 2003: 162-169.

- Farkas, D. L., M. D. Wei, P. Febroriello, J. H. Carson, und L. M. Loew. „Simultaneous imaging of cell and mitochondrial membrane potentials.“ *Biophys. J.*, 56, 1989: 1053-1069.
- Finkel, T. „Signal transduction by reactive oxygen species.“ *Journal of Cell Biology*, 194, 2011: 7-15.
- Floyd, R. A., et al. „Increased oxidative stress brought on by pro-inflammatory cytokines in neurodegenerative processes and the protective role of nitronone-based free radical traps.“ *Life Science*, 65, 1999: 1893-1899.
- Freysoldt, T. *Cyclische Nitronone - Synthese und Anwendungen*. Berlin, 2006.
- Gahman, T. C., H. Lang, M. E. Massari, und C. Zhao. Heterocyclodiazepine cannabinoid receptor modulators for treatment of disease. US Patent WO2009032754 A3. 2009.
- Gella, C., È. Ferrer, R. Alibés, F. Busqué, P. de March, M. Figueredo, J. Font. „A Metal-Free General Procedure for Oxidation of Secondary Amines to Nitronones.“ *J. Org. Chem.*, 74, 2009: 6365-6367.
- Grigor'ev, I. A. „Nitronones: Novel Strategies in Synthesis.“ In *Nitrile Oxides, Nitronones and Nitronates in Organic Synthesis: Novel Strategies in Synthesis, 2nd Ed.*, Herausgeber: H. Feuer, 129-435. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2008.
- Halpern, H. J., C. Yu, E. Barth, M. Peric, und G. M. Rosen. „In situ detection, by spin trapping, of hydroxyl radical markers produced from ionizing radiation in the tumor of a living mouse.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1995: 796-800.
- Han, Y., B. Tuccio, R. Lauricella, A. Rockenbauer, J. L. Zweier, und F. A. Villamena. „Synthesis and spin-trapping properties of a new spirolactonyl nitronone.“ *J. Org. Chem.*, 73, 2008: 2533-2541.
- Hansen, J. M., und D. P. Jones. „Thiols in Cancer.“ In *Nutrition in Oncology, 2nd Ed.*, von D. Heber, G. L. Blackburn, V. L. W. Go und J. Milner, 314. Academic Press, 2006.
- Hauck, S. *Versuche zur Synthese neuartiger fluoreszierender Spin-Traps*. Kaiserslautern, 2007.

- Hauck, S., Y. Lorat, F. Leinisch, C. Kopp, J. Abrossinow, und W. E. Trommer. „Fluorescent Nitrones for the Study of ROS Formation with Subcellular Resolution.“ In *Nitroxides - Theory, Experiment and Applications*, Herausgeber: A. I. Kokorin, 347-368. Rijeka (Croatia): InTech, 2012.
- Hauck, S., Y. Lorat, F. Leinisch, und W. E. Trommer. „p-Nitrostilbene-tert-Butyl-Nitron: a Novel Fluorescent Spin Trap for the Detection of ROS with Subcellular Resolution.“ *App. Magn. Reson.*, 36, 2009: 133-147.
- Haugland, R. P. *Handbook of fluorescent probes and research products, 9th Ed.* Eugene: Molecular Probes, 2002.
- Heim, R., A. B. Cubitt, und R. Y. Tsien. „Improved green fluorescence.“ *Nature*, 373, 1995: 663-664.
- Hosangadi, B. D., und R. H. Dave. „An efficient general method for esterification of aromatic carboxylic acids.“ *Tetrahedron Letters*, 37, 1996: 6375-6378.
- Huang, L., D. Cobessi, E. Y. Tung, und E. A. Berry. „Binding of the Respiratory Chain Inhibitor Antimycin to the Mitochondrial bc1 Complex: A New Crystal Structure Reveals an Altered Intramolecular Hydrogen-bonding Pattern.“ *J. Mol. Biol.*, 351, 2005: 573-597.
- Jacobson, F. S., R. W. Morgan, M. F. Christman, und B. N. Ames. „An Alkyl Hydroperoxide Reductase from Salmonella typhimurium Involved in the Defense of DNA against Oxidative Damage.“ *J. Biol. Chem.*, 264, 1989: 1488-1496.
- Janzen, E. G. „Spin trapping.“ *Acc. Chem. Res.*, 4, 1971: 31-40.
- Janzen, E. G., N. Sankuratri, und Y. Kotake. „Chiral spin traps. The spin trapping chemistry of 5-methyl-5-phenylpyrroline-N-oxide (MPPPO).“ *J. Magn. Reson. B.*, 111, 1996: 254-261.
- Janzen, E. G., und B. J. Blackburn. „Detection and identification of short-lived free radicals by an electron spin resonance trapping technique.“ *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 1968: 5909-5910.
- Jeschke, G. „EPR ETH Zürich.“ 2006.
http://www.epr.ethz.ch/education/epr_skript_mainz_1998.pdf (Zugriff am 11. Januar 2014).

- Kálai, T., É. Hideg, I. Vass, und K. Hideg. „Double (Fluorescent and Spin) Sensors for Detection of Reactive Oxygen Species in the Thylakoid Membrane.“ *Free Radical. Biol. Med.*, 24, 1998: 649-652.
- Kalyanaraman, B., C. Mottley, und R. P. Mason. „On the use of organic extraction in the spin-trapping technique as applied to biological systems.“ *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 9, 1984: 27-31.
- Karbach, A., T. Stemler, C. Kopp, und W. E. Trommer. „Synthesis of Novel Fluorescent Stilbenenitrones via a Mild, Ligand-Free Heck-Type Reaction of (E)-[4-(1,3-Dioxolan-2-yl)styryl]trimethylsilane with Benzene Diazonium Tetrafluoroborate Derivatives.“ *Synthesis*, 46, 2014: 3103-3109.
- Kim, J. G., und D. O. Jang. „A Convenient One-Pot Method for the Synthesis of N-Methoxy-N-methyl Amides from Carboxylic Acids.“ *Bull. Korean Chem. Soc.*, 31, 2010: 171-173.
- Kinugasa, M., und S. Hashimoto. „The reactions of copper(I) phenylacetylide with nitrones.“ *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1972: 466-467.
- Kishida, K. T., und E. Klann. *Antioxid Redox Signal.*, 9, 2007: 233-244.
- Klessinger, M., und J. Michl. „Photophysical Processes.“ In *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*, von M. Klessinger und J. Michl, 243-306. VCH, 1995.
- Kohen, R., und A. Nyska. „Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification.“ *Toxicologic Pathology*, 30, 2002: 620-650.
- Kotake, Y., H. Sang, T. Miyajima, und G. L. Wallis. „Inhibition of NF- κ B, iNOS mRNA, COX2 mRNA, and COX catalytic activity by phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN).“ *Biochimica et Biophysica Acta*, 1448, 1998: 77-84.
- Krishna, M. C., et al. „Studies of Structure–Activity Relationship of Nitroxide Free Radicals and Their Precursors as Modifiers Against Oxidative Damage.“ *J. Med. Chem.*, 41, 1998: 3477-3492.
- Kuppusamy, P., und J. L. Zweier. „Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation.“ *J. Biol. Chem.*, 264, 1989: 9880-9884.

- Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd Ed.* Springer, 2006.
- Leinisch, F. *Untersuchungen am Entkopplerprotein UCP-2; Detektion reaktiver Sauerstoffspezies in biologischen Systemen mit konventionellen und fluoreszierenden nitronbasierten spin traps.* Kaiserslautern, 2009.
- Marks, D. B., A. D. Marks, und C. M. Smith. *Basic Medical Biochemistry.* Pitman: Lippincott Williams & Wilkins, 1996.
- Mason, R. P., und M. B. Kadiiska. „In Vivo Spin Trapping of Free Radical Metabolites of Drugs and Toxic Chemicals Utilizing Ex Vivo Detection.“ In *Biological Magnetic Resonance; Biomedical EPR, Part A: Free Radicals, Metals, Medicine, and Physiology*, von L. J. Berliner, G. R. Eaton und S. R. Eaton, 93-109. New York: Kluwer Academic Publishers, 2005.
- Matsuo, J., T. Shibata, H. Kitagawa, und T. Mukaiyama. „A convenient method for the synthesis of nitrones by oxidation of N,N-disubstituted hydroxylamines with N-tert-butylphenylsulfonimidoyl chloride.“ *ARKIVOC*, X, 2001: 58-65.
- Mitchell, D. G., G. M. Rosen, M. Tseitlin, B. Symmes, S. S. Eaton, und G. R. Eaton. „Use of Rapid-Scan EPR to Improve Detection Sensitivity for Spin-Trapped Radicals.“ *Biophys. J.*, 105, 2013: 338-342.
- Müller, J., D. Rösch, und L. W. Kroh. „www.behrs.de.“ 2005.
www.behrs.de/media/catalog/product/3/1/317_lp.pdf (Zugriff am 20. Dezember 2013).
- Murahashi, S.-I., Y. Imada, und T. Shiota. „Oxidation of Secondary Amines to Nitrones: 6-Methyl-2,3,4,5-Tetrahydropyridine N-Oxide.“ *Organic Syntheses*, 70, 1992: 265-268.
- Nahm, S., und S. M. Weinreb. „N-Methoxy-N-methylamides as effective acylating agents.“ *Tetrahedron Letters*, 22, 1981: 3815-3818.
- Ouari, O., F. Chalier, R. Bonaly, B. Pucci, und P. Tordo. „Synthesis and spin-trapping behaviour of glycosylated nitrones.“ *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 10, 1998: 2299-2307.
- Pogrebniak, H. W., M. J. Merino, J. B. Hahn, J. B. Mitchell, und H. I. Pass. „Spin trap salvage from endotoxemia: the role of cytokine down-regulation.“ *Surgery*, 112, 1992: 130-139.

- Pou, S., A. Bhan, V. S. Bhadti, S. Y. Wu, R. S. Hosmane, und G. M. Rosen. „The use of fluorophore-containing spin traps as potential probes to localize free radicals in cells with fluorescence imaging methods.“ *FASEB J.*, 9, 1995: 1085-1090.
- Pou, S., Y. I. Huang, A. Bhan, V. S. Bhadti, R. Hosmane, und S. Y. Wu. „A Fluorophore-Containing Nitroxide as a Probe to Detect Superoxide and Hydroxyl Radical Generated by Stimulated Neutrophils.“ *Anal. Biochem.*, 212, 1993: 85-90.
- Pschirer, N. G., F. Eickemeyer, J. Schoneboom, J. Qu, M. Konemann, K. Mullen, C. Li, A. Herrmann, P. Erk, G. Nordmann, A. Kuhn, A. Hagfeldt, T. Edvinsson. Use of Rylene Derivatives as Photosensitizers in Solar Cells. US Patent US20080269482 A1. 2008.
- Ray, R., und A. M. Shah. „NADPH oxidase and endothelial cell function.“ *Clinical Science*, 109, 2005: 217-226.
- Sang, H., G. L. Wallis, C. A. Stewart, und Y. Kotake. „Expression of Cytokines and Activation of Transcription Factors in Lipopolysaccharide-Administered Rats and Their Inhibition by PhenylN-tert-Butylnitron (PBN).“ *Arch. Biochem. Biophys.*, 363, 1999: 341-348.
- Sciannamea, V., C. A. Guerrero-Sanchez, U. S. Schubert, J.-M. Catala, R. Jerome, und C. Detrembleur. „Ability of nitrones of various structures to control the radical polymerization of styrene mediated by in situ formed nitroxides.“ *Polymer*, 46, 2005: 9632-9641.
- Soldaini, G., F. Cardona, und A. Goti. „Catalytic oxidation of imines based on methyltrioxorhenium/urea hydrogen peroxide: a mild and easy chemo- and regioselective entry to nitrones.“ *Org. Letters*, 9, 2007: 473-476.
- Stewart, W. W. „Synthesis of 3,6-disulfonated 4-aminonaphthalimides.“ *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 1981: 7615-7620.
- Stohrer, W.-D. „Die konzeptionellen Grundlagen der Photochemie.“ *Praxis der Naturwissenschaften. Chemie*, 40, 1991: 15-22.
- Swanson, T. A., S. I. Kim, und M. J. Glucksman. *Biochemistry, Molecular Biology & Genetics, 5th Ed.* Pitman: Lippincott Williams & Wilkins, 2009.
- Tsien, R. „The green fluorescent protein.“ *Annual Review in Biochemistry*, 67, 1998: 509-544.

-
- Veale, E. B., G. M. Tocci, F. M. Pfeffer, P. E. Kruger, und T. Gunnlaugsson. „Demonstration of bidirectional photoinduced electron transfer (PET) sensing in 4-amino-1,8-naphthalimide based thiourea anion sensors.“ *Organic Biomolekular Chemistry*, 7, 2009: 3447-3454.
- von Zglinicki, T., und T. Nikolaus. „Alter und Altern.“ In *Physiologie des Menschen, 30th Ed.*, von R. F. Schmidt, F. Lang und M. Heckmann, 957 ff. Berlin Heidelberg: Springer, 2007.
- Waris, G., und H. Ahsan. „Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions.“ *Journal of Carcinogenesis*, 5, 2006: 14-21.
- Weil, J. A., und J. R. Bolton. *Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications, 2nd Ed.* Hoboken: Wiley, 2006.

Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, für die Vergabe dieses interessanten Themas, für sein Vertrauen und die hervorragende Betreuung während dieser Arbeit.
- Herrn Prof. Dr. Antonio J. Pierik für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.
- Herrn Prof. Dr. Werner R. Thiel für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.
- Herrn Prof. Dr. Peter Lipp und insbesondere Herrn Dr. Lars Kästner und dem Laborteam für die Unterstützung und Bereitstellung des konfokalen Laser-Scanning Mikroskopes (UKS Homburg).
- Herrn André Karbach und Herrn Tobias Stemler für die humorvolle sowie freundschaftliche und fachliche Zusammenarbeit im Rahmen dieser Arbeit, sowie deren beider Unterstützung bei der Verfassung dieser Arbeit. Außerdem für die angeregten und anregenden Gespräche.
- Frau Sandra Theison für die Einführung am ESR-Spektrometer und den aufmunternden Gesprächen.
- allen Mitgliedern des Arbeitskreises, Anna, Anja, Anneken, Asma, Angela, Benjamin, Carolin, Carina, Chakour, Chen, Doreen, Elke, Fabian, Fips, Jessica, Jörg, Kathrin, Michaela, Mo 1, Nicole, Peter, Rudi, Stefan, Thérèse, für ihre Hilfsbereitschaft, das wundervolle Arbeitsklima und die schöne Zeit.
- ebenso meinen Praktikanten, Julia, Thomas, Lukas und Christian, für die Hilfe und die gute Arbeit.
- meinen Freunden, die ich während meines Studiums kennenlernen durfte und die mich auch mal von der Arbeit ablenken konnten. Danke Astrid, Carolin S., Tina, Carolin K., Filipe, Dennis, Silke, Anders, Christian, Yvonne, Anne, Ralf und alldiejenigen, die hier nicht stehen.
- Frau Carmen Eggert für die oftmals schnelle und unkomplizierte Hilfe bei der Instandsetzung und Optimierung diverser Glasgeräte.
- Bei dem Team der Chemikalienausgabe (Dipl.-Chem. Ludvik Napast, Jürgen Rahm und Frank Schröder) für Geduld mit mir während meines Studiums und das ich in

Notfällen auch außerhalb der Öffnungszeiten wichtige Chemikalien bekommen habe.
Und natürlich für die vielen Gespräche zur Zerstreuung.

- Frau Heike Schramm für die oftmals erforderliche schnelle und unkomplizierte Hilfe in Verwaltungsfragen und bei der Durchführung von Festlichkeiten.
- Den Analytikabteilungen des Fachbereichs für die Aufnahme der benötigten Spektren und Elementaranalysen.
- meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung während meines Studiums.
- An alle denen ich vergessen habe zu danken: Seid mir nicht böse. Ihr kennt mich.

Lebenslauf

Name Christian Kopp

Studium

2010 – 2014 Anfertigung der Dissertation

Thema: Synthese und Anwendung neuartiger fluoreszierender Nitrone auf Naphthalsäureimid-Basis. Betreuung: Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer.

2010 Diplomarbeit in der Biochemie

Thema: Synthese der fluoreszierenden Spin-Trap 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzyliden-*tert.*-butylnitron. Betreuung: Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer.

2001 – 2010 Studium der Chemie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg und der Technischen Universität Kaiserslautern

Ausbildung

1998 – 2001 Ausbildung zum Chemielaboranten bei der BASF AG

Schulbildung

1997 Abitur

Publikationen

Karbach, A., T. Stemler, **C. Kopp**, and W. E. Trommer.

„Synthesis of Novel Fluorescent Stilbenenitrones via a Mild, Ligand-Free Heck-Type Reaction of (E)-[4-(1,3-Dioxolan-2-yl)styryl]trimethylsilane with Benzene Diazonium Tetrafluoroborate Derivatives.“ *Synthesis*, 46, 2014: 3103-3109.

Badr M., **C. Kopp**, S. Theison, J. Meyer and W. E. Trommer.

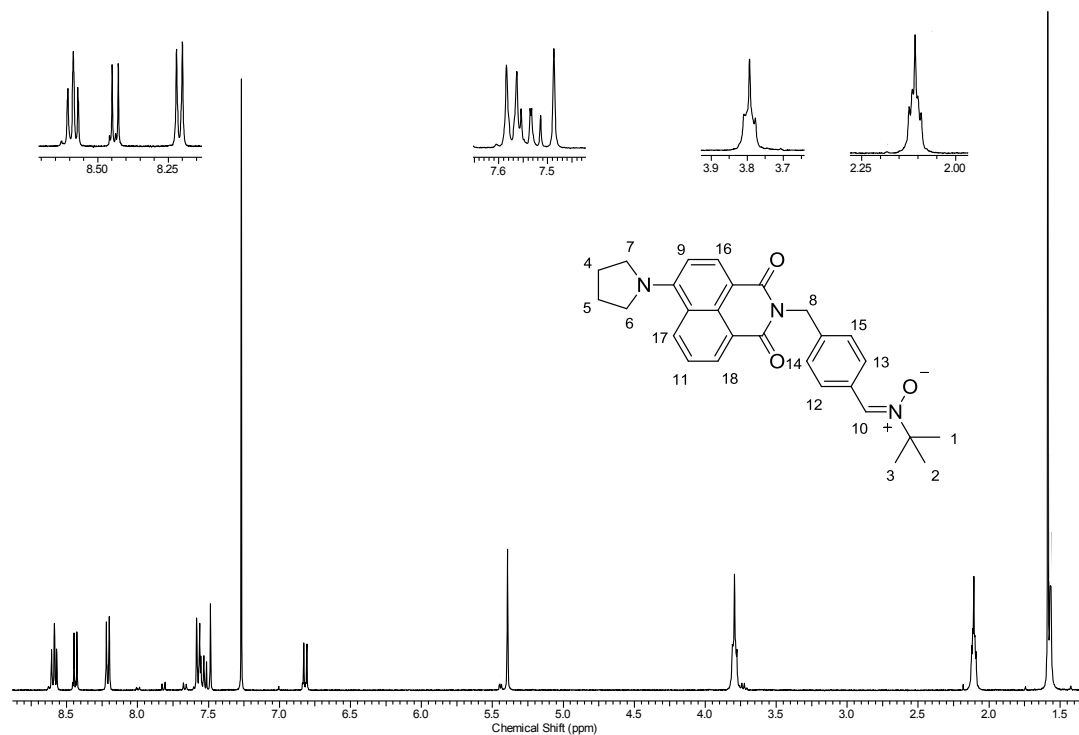
„Methotrexate-gelonin conjugate - an inhibitor of MCF-7 cells expressing the dihydrofolate receptor“, *Biological Chemistry*, 395, 2014: 1461-1466.

Hauck, S., Y. Lorat, F. Leinisch, **C. Kopp**, J. Abrossinow, and W. E. Trommer.

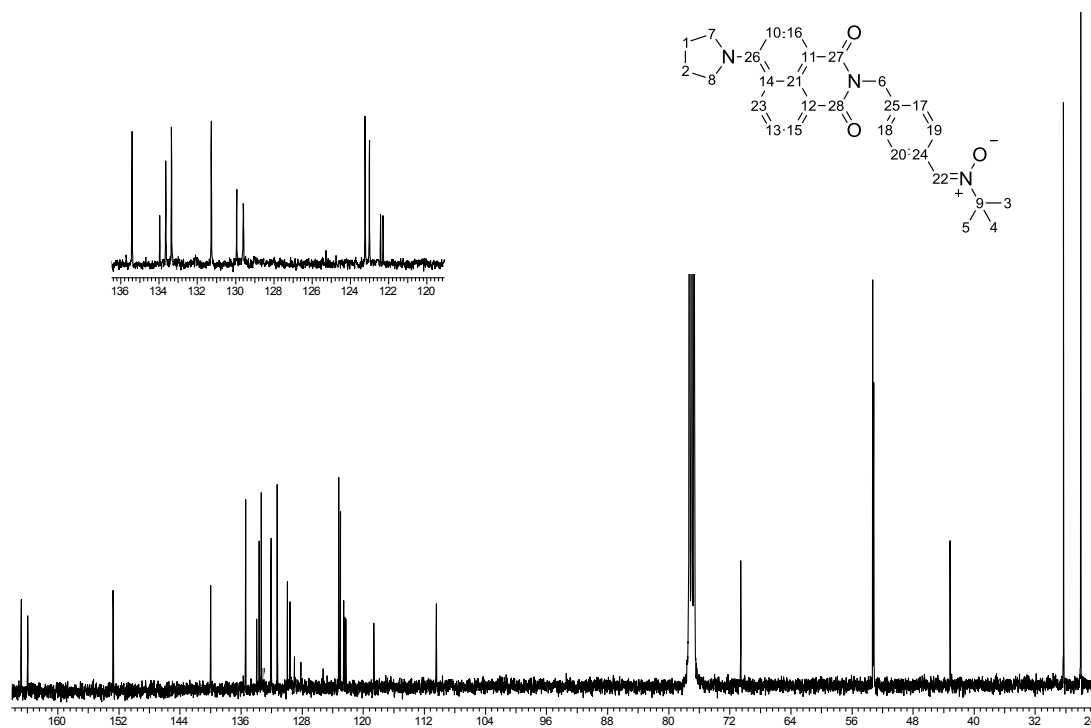
„Fluorescent Nitrones for the Study of ROS Formation with Subcellular Resolution.“ In *Nitroxides - Theory, Experiment and Applications*, Herausgeber: A. I. Kokorin, 347-368. Rijeka (Croatia): InTech, 2012.

Anhang: NMR-Spektren synthetisierter Verbindungen

A.1 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylphenyl-*N-tert*-butylnitron (11)

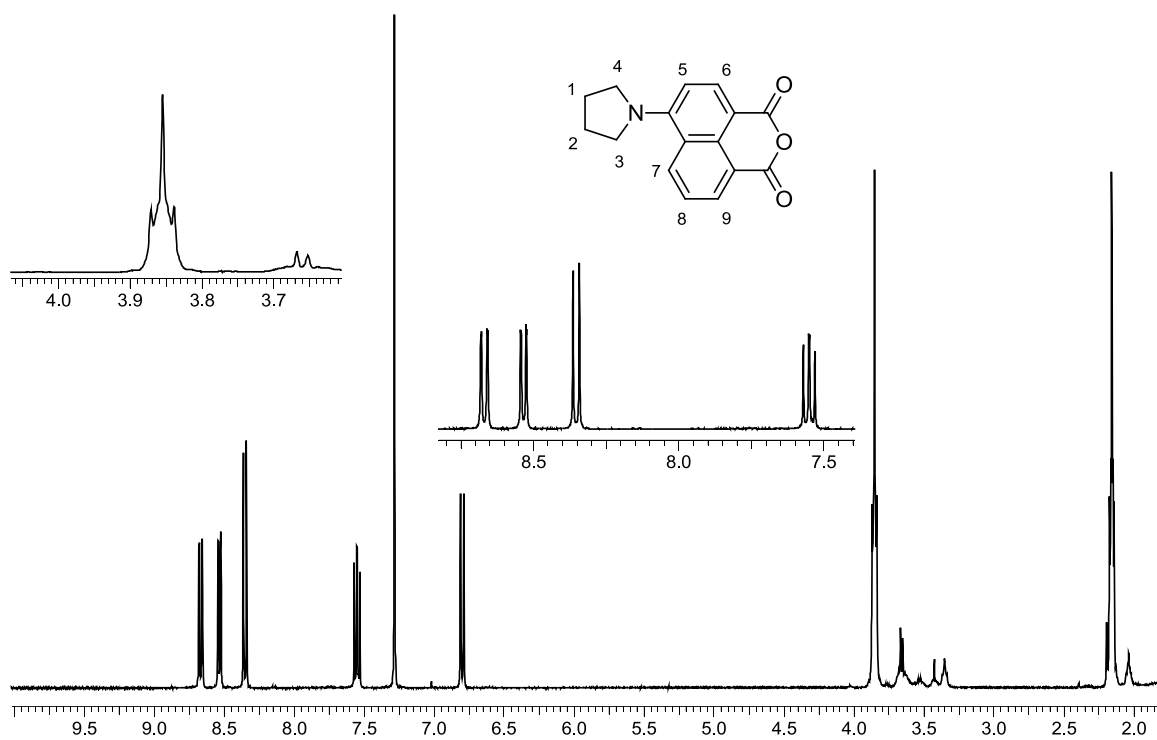


$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 1.56 (s, 9 H, $\text{H}_{1,2,3}$), 2.06–2.16 (m, 4 H, $\text{H}_{4,5}$), 3.73–3.85 (m, 4 H, $\text{H}_{6,7}$), 5.37 (s, 2 H, H_8), 6.80 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.80$ Hz, 1 H, H_9), 7.47 (s, 1 H, H_{10}), 7.51 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8.56, 7.43$ Hz, 1 H, H_{11}), 7.56 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.56$ Hz, 2 H, $\text{H}_{12,13}$), 8.19 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.56$ Hz, 2 H, $\text{H}_{14,15}$), 8.41 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.80$ Hz, 1 H, H_{16}), 8.57 (m, 2 H, $\text{H}_{17,18}$).

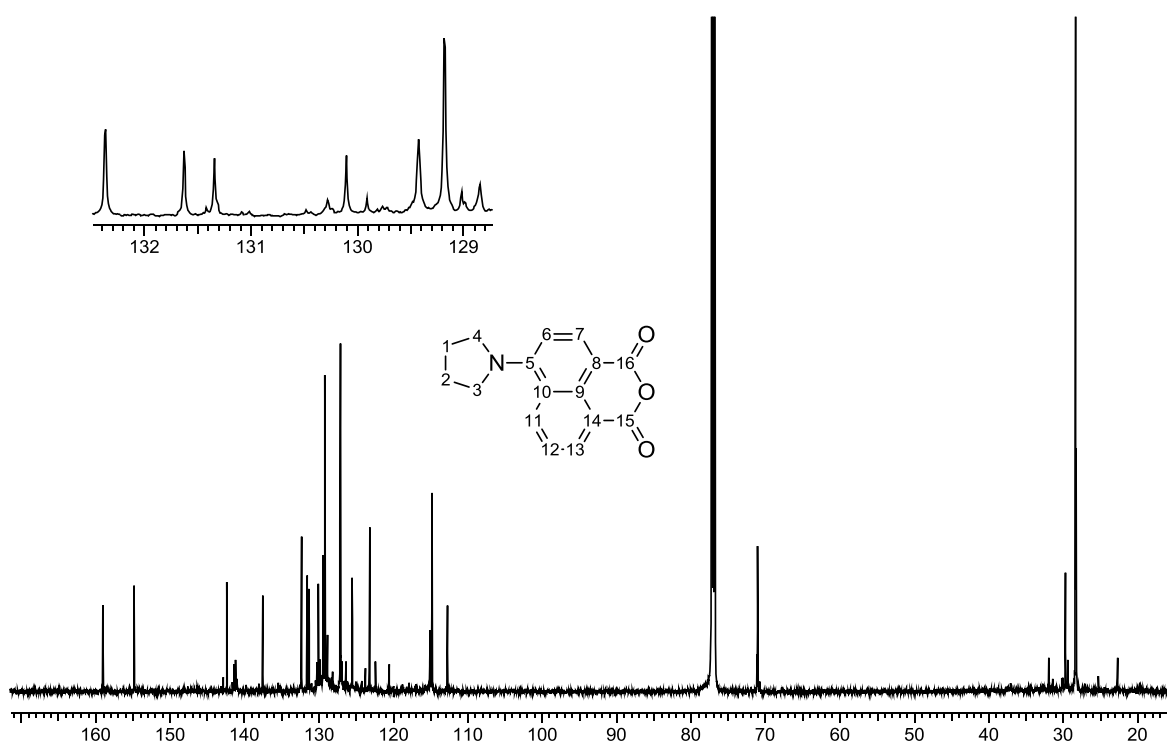


$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 26.1 ($\text{C}_{1,2}$), 28.3 ($\text{C}_{3,4,5}$), 43.2 (C_6), 53.3 ($\text{C}_{7,8}$), 70.6 (C_9), 110.5 (C_{10}), 122.3 ($\text{C}_{11,12}$), 122.6 (C_{13}), 123.0 (C_{14}), 123.2 (C_{15}), 129.6 (C_{16}), 129.9 ($\text{C}_{17,18}$), 131.3 ($\text{C}_{19,20}$), 133.4 (C_{21}), 133.7 (C_{22}), 134.0 (C_{23}), 135.4 (C_{24}), 140.0 (C_{25}), 152.8 (C_{26}), 163.9 (C_{27}), 164.8 (C_{28}).

A.2 4-Pyrrilidin-1,8-naphthalsäureanhydrid (13)

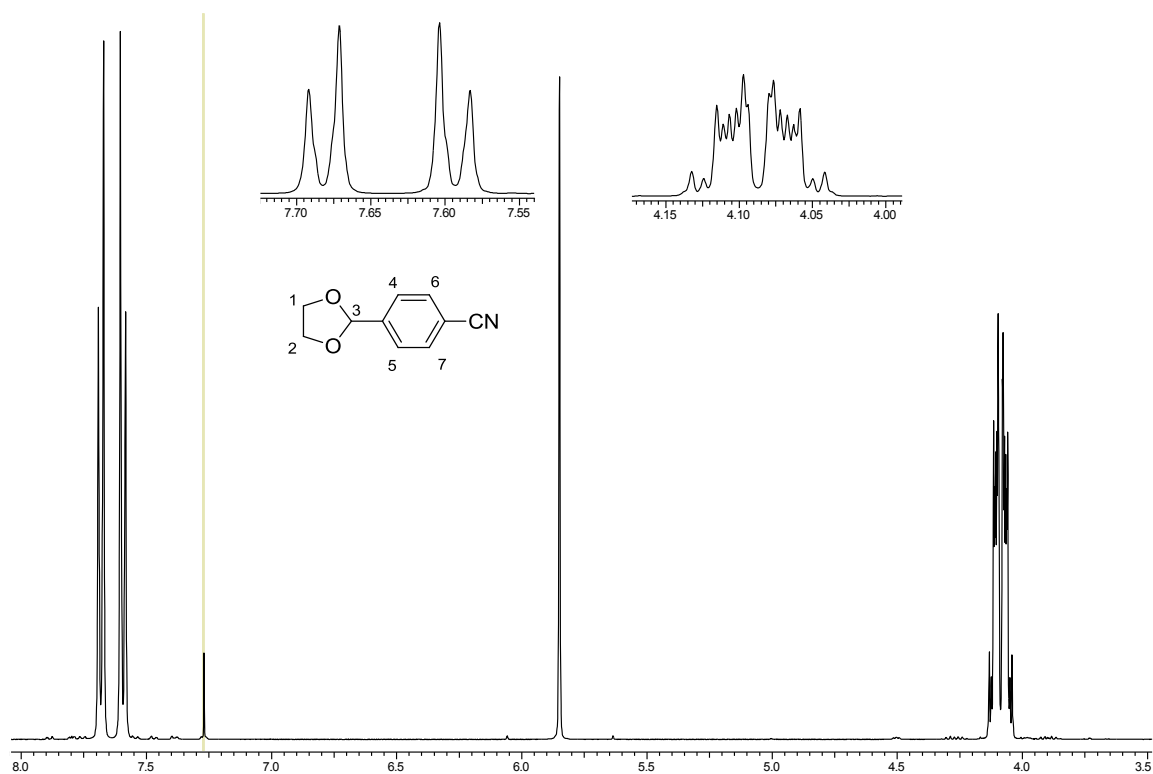


$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm] = 2.14 - 2.18 (m, 4 H, $\text{H}_{1,2}$), 3.84 - 3.87 (m, 4 H, $\text{H}_{3,4}$), 6.80 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.80$ Hz, 1 H, H_5), 7.55 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8.60$ Hz, 7.3 Hz, 1 H, H_8), 8.35 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.80$ Hz, 1 H, H_7), 8.53 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.30$ Hz, 1 H, H_6), 8.67 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.60$ Hz, 1 H, H_9).

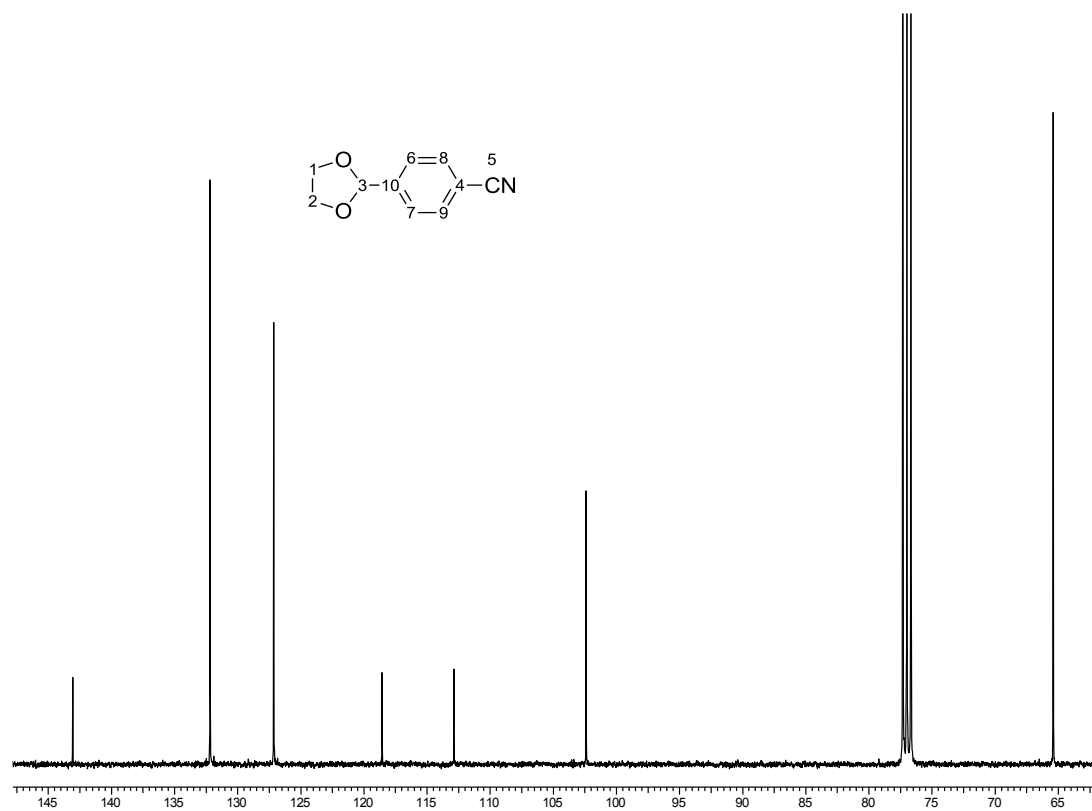


$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ [ppm] = 26.1 ($\text{C}_{1,2}$), 53.3 ($\text{C}_{3,4}$), 105.0 (C_6), 108.8 (C_8), 118.6 (C_9), 122.3 (C_{14}), 123.2 (C_{10}), 133.0 (C_{12}), 133.4 (C_{11}), 134.0 (C_7), 135.4 (C_{13}), 153.2 (C_5), 160.9 (C_{15}), 162.4 (C_{16}).

A.3 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)benzonitril (15)

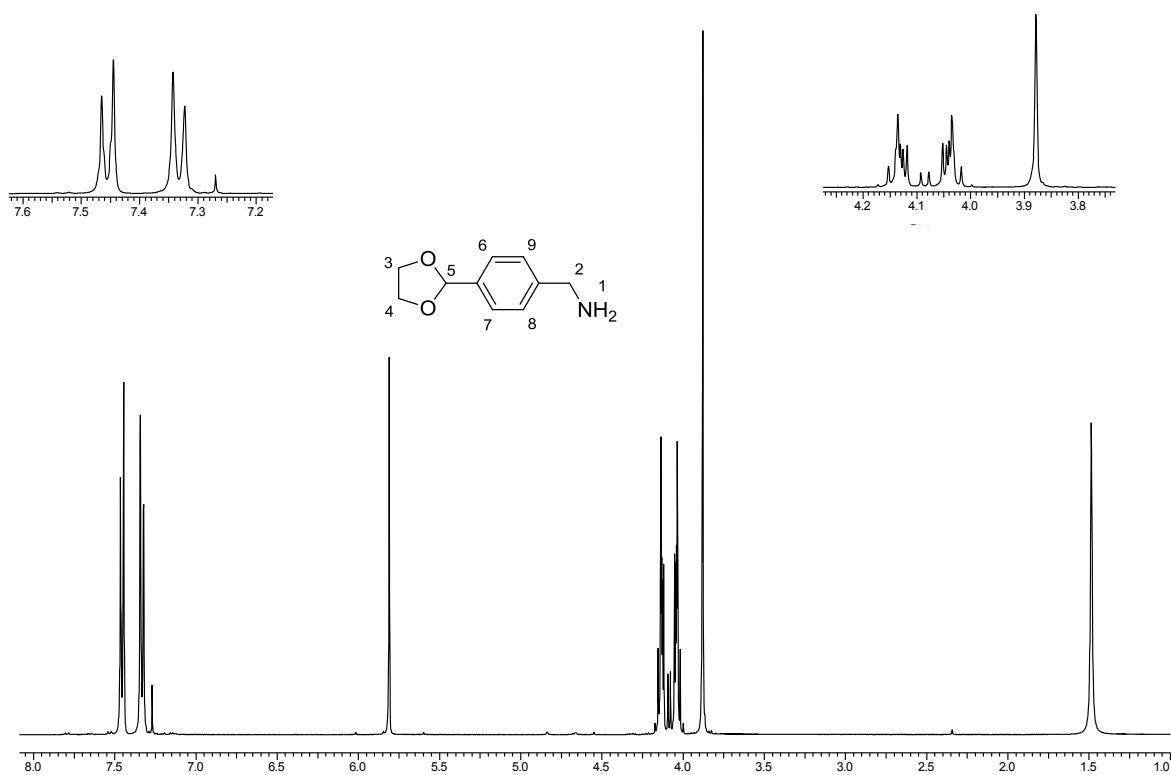


$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 4.03 - 4.14 (m, 4 H, $\text{H}_{1,2}$), 5.85 (s, 1 H, H_3), 7.59 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.31$ Hz, 2 H, $\text{H}_{4,5}$), 7.68 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.31$ Hz, 2 H, $\text{H}_{6,7}$).

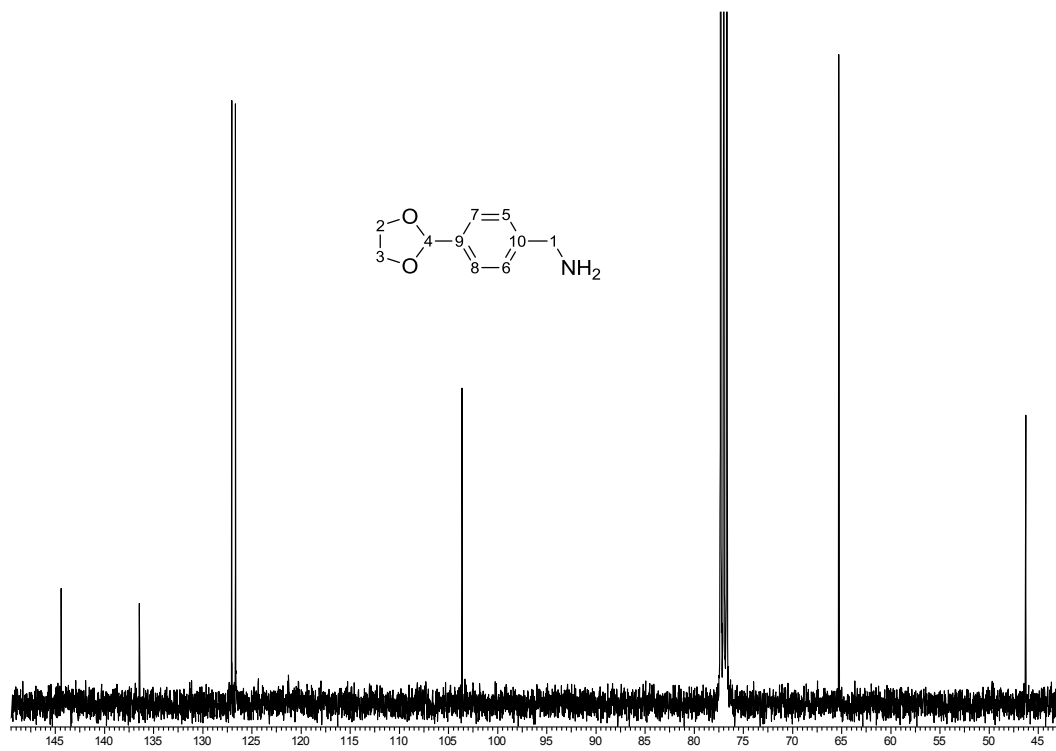


$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 65.4 ($\text{C}_{1,2}$), 102.4 (C_3), 112.9 (C_4), 118.6 (C_5), 127.2 ($\text{C}_{6,7}$), 132.2 ($\text{C}_{8,9}$), 143.1 (C_{10}).

A.4 4-(1,3-Dioxacyclopent-2-yl)benzylamin (16)

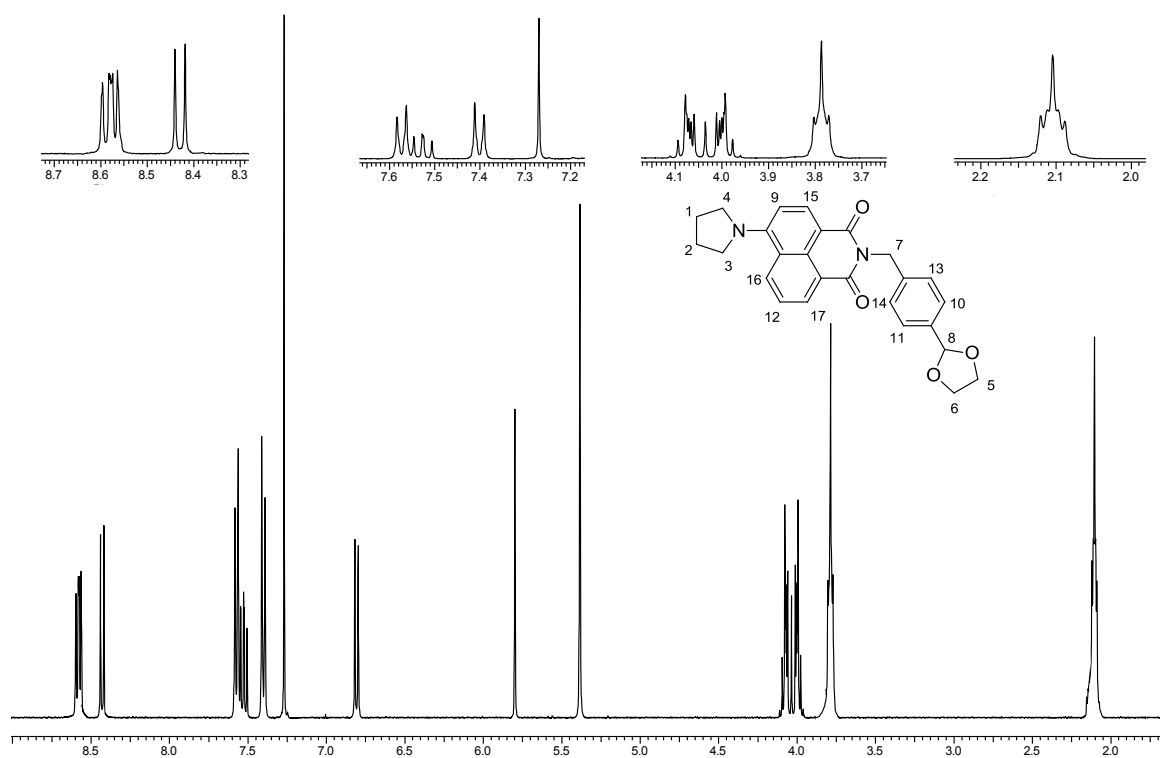


$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 1.49 (s, 2 H, H_1), 3.88 (s, 2 H, H_2), 4.00 – 4.16 (m, 4 H, $\text{H}_{3,4}$), 5.81 (s, 1 H, H_5), 7.33 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.07$ Hz, 2 H, $\text{H}_{6,7}$), 7.46 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.07$ Hz, 2 H, $\text{H}_{8,9}$).

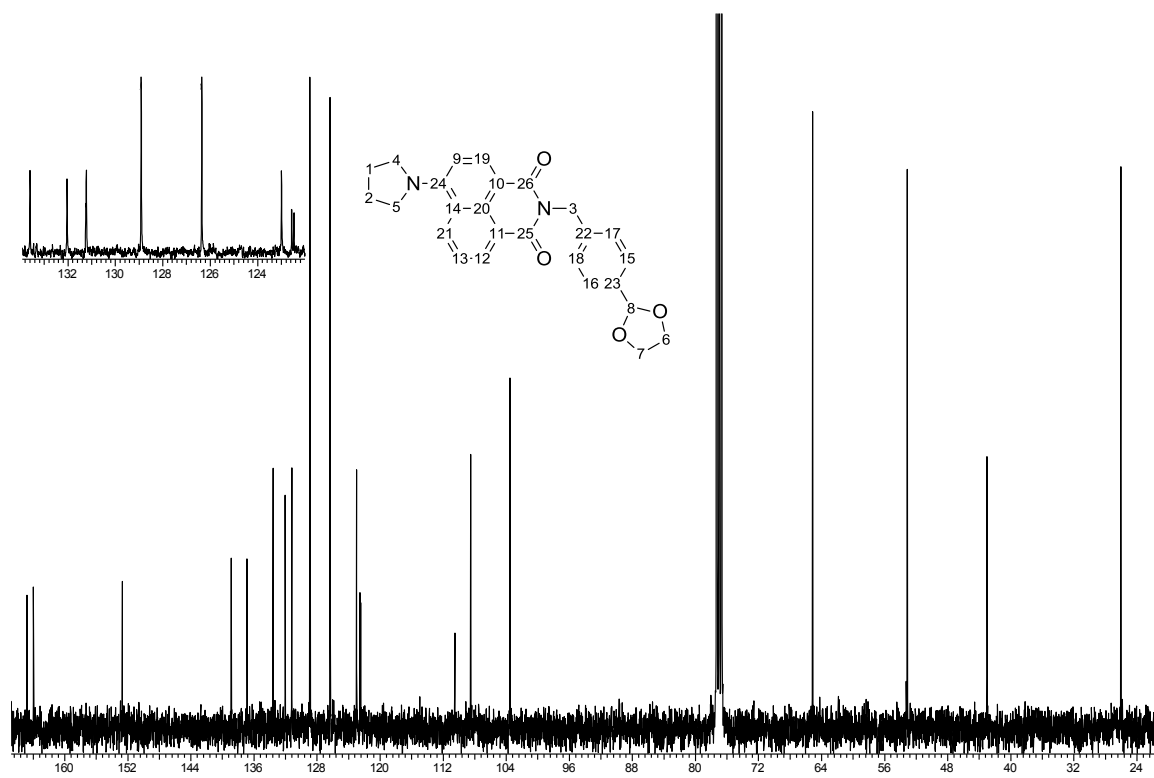


$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 46.3 (C_1), 65.3 ($\text{C}_{2,3}$), 103.6 (C_4), 126.7 ($\text{C}_{5,6}$), 127.1 ($\text{C}_{7,8}$), 136.4 (C_9), 144.4 (C_{10}).

A.5 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylbenzylacetal (17)

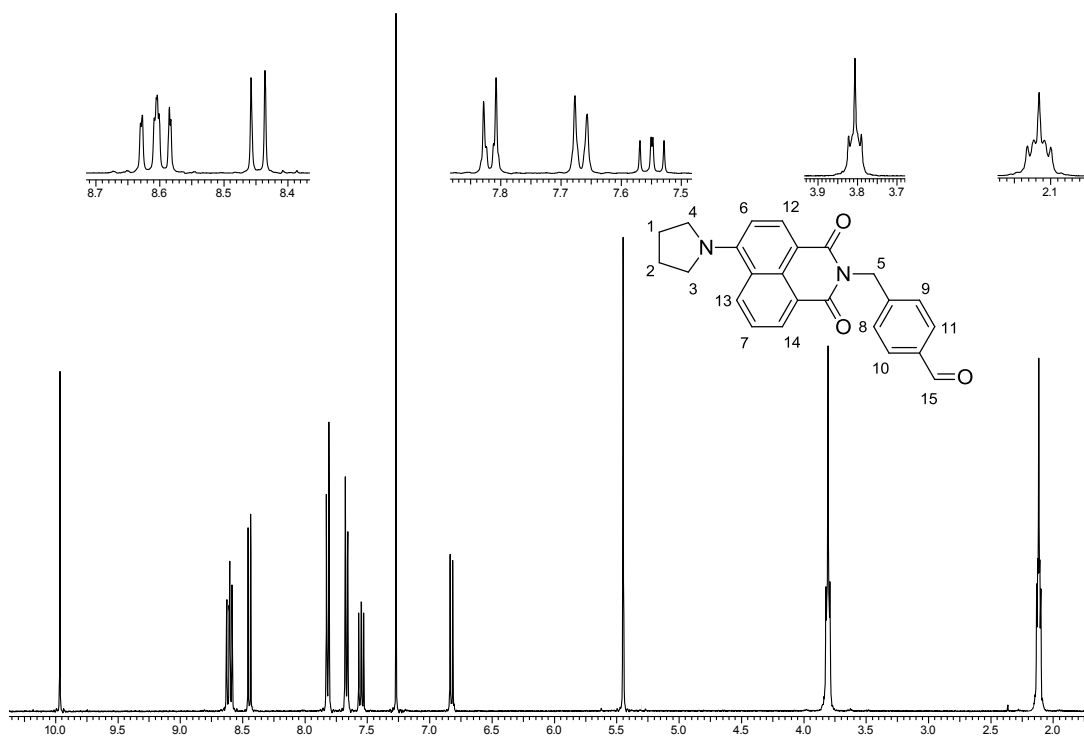


$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 2.07 – 2.14 (m, 4 H, $\text{H}_{1,2}$), 3.76 – 3.82 (m, 4 H, $\text{H}_{3,4}$), 3.96 – 4.11 (m, 4 H, $\text{H}_{5,6}$), 5.38 (s, 2 H, H_7), 5.80 (s, 1 H, H_8), 6.81 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.80$ Hz, 1 H, H_9), 7.40 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.30$ Hz, 2 H, $\text{H}_{10,11}$), 7.53 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8.60$ Hz, 1 H, H_{12}), 7.56 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.30$ Hz, 2 H, $\text{H}_{13,14}$), 8.43 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.80$ Hz, 1 H, H_{15}), 8.58 (t, 2 H, $\text{H}_{16,17}$).

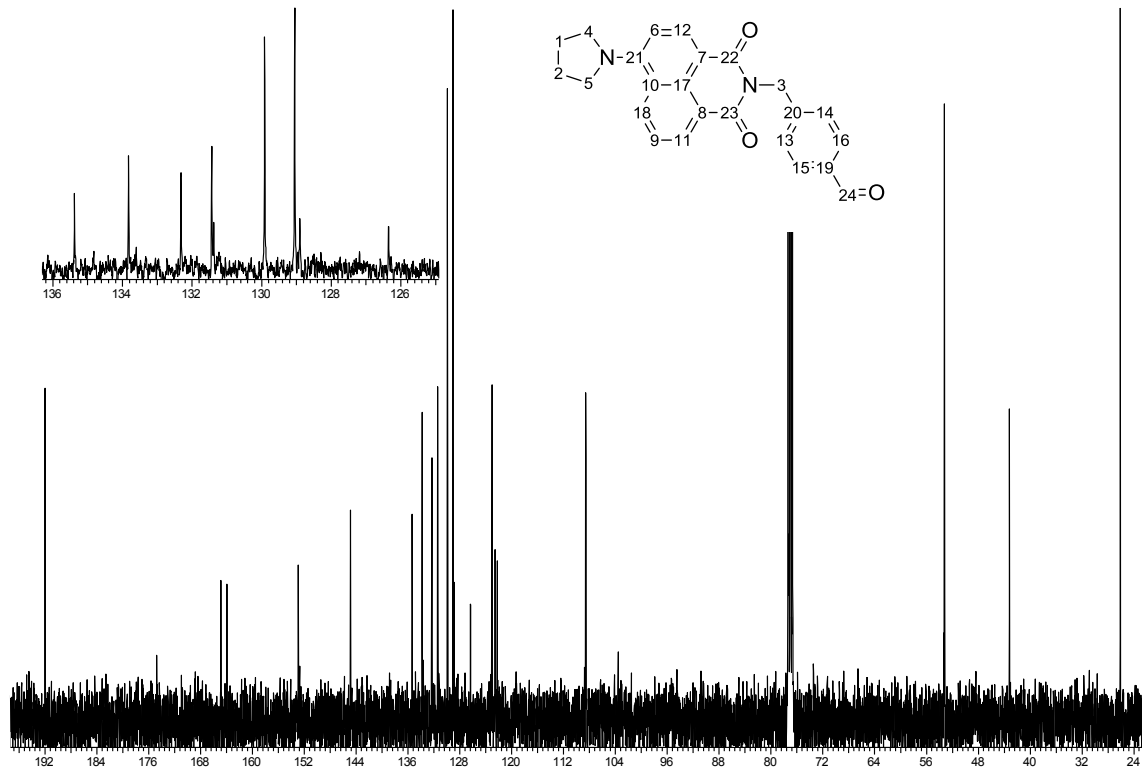


$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 26.1 ($\text{C}_{1,2}$), 43.0 (C_3), 53.2 ($\text{C}_{4,5}$), 65.2 ($\text{C}_{6,7}$), 103.6 (C_8), 108.5 (C_9), 110.5 ($\text{C}_{10,11}$), 122.5 (C_{12}), 122.6 (C_{13}), 123.0 (C_{14}), 126.4 ($\text{C}_{15,16}$), 128.9 ($\text{C}_{17,18}$), 131.2 (C_{19}), 132.0 (C_{20}), 133.6 (C_{21}), 136.9 (C_{22}), 138.9 (C_{23}), 152.7 (C_{24}), 164.0 (C_{25}), 164.8 (C_{26}).

A.6 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethylbenzaldehyd (18)

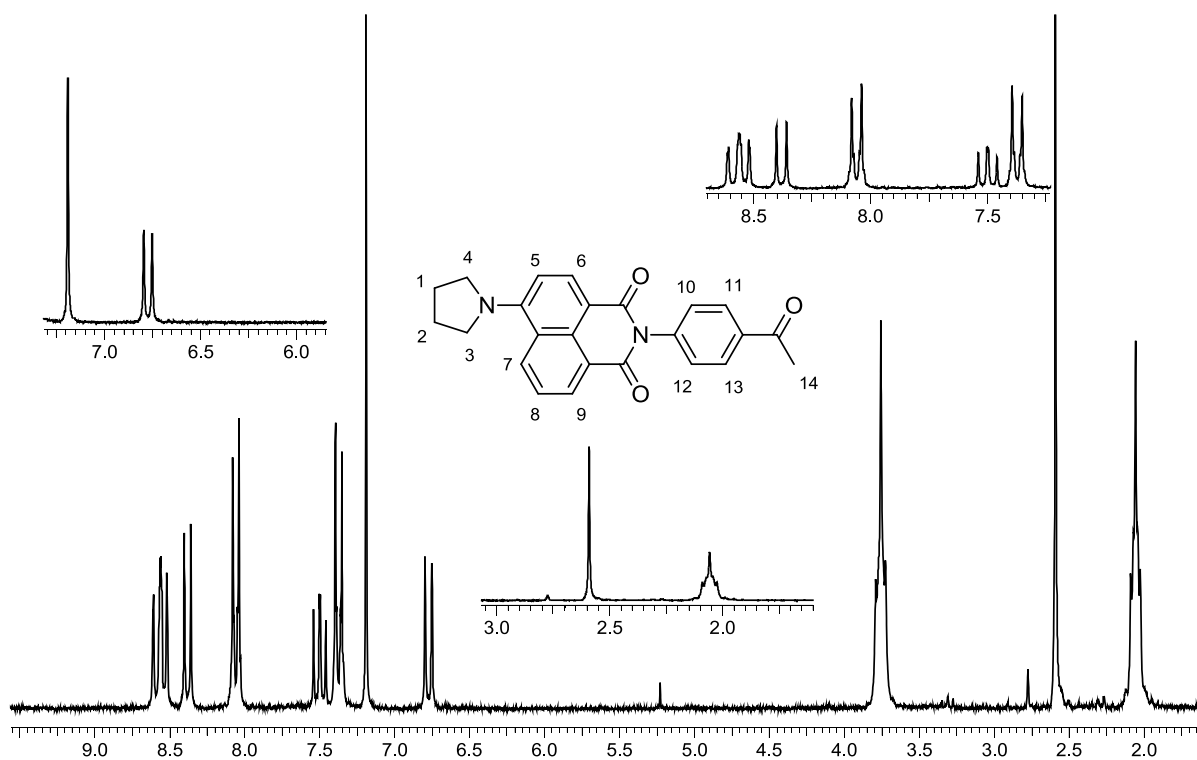


$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 2.07 – 2.16 (m, 4 H, $\text{H}_{1,2}$), 3.78 – 3.83 (m, 4 H, $\text{H}_{3,4}$), 5.45 (s, 2 H, H_5), 6.83 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.80$ Hz, 1 H, H_6), 7.55 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8.60, 7.30$ Hz, 1 H, H_7), 7.67 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.10$ Hz, 2 H, $\text{H}_{8,9}$), 7.82 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.30$ Hz, 2 H, $\text{H}_{10,11}$), 8.45 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.80$ Hz, 1 H, H_{12}), 8.61 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 10.00, 8.10$ Hz, 2 H, $\text{H}_{13,14}$), 9.97 (s, 1 H, H_{15}).

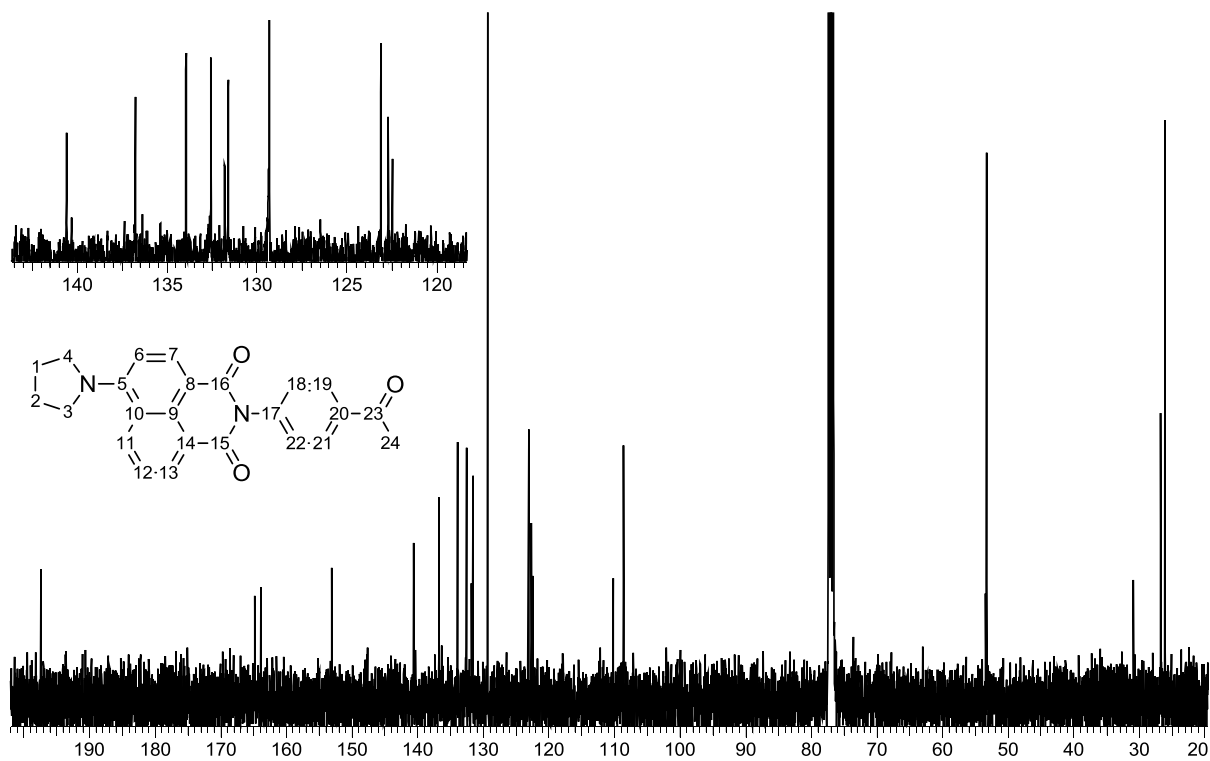


$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 26.1 ($\text{C}_{1,2}$), 43.2 (C_3), 53.2 ($\text{C}_{4,5}$), 108.6 (C_6), 122.2 ($\text{C}_{7,8}$), 122.6 (C_9), 123.1 (C_{10}), 126.4 (C_{11}), 129.1 (C_{12}), 129.9 ($\text{C}_{13,14}$), 131.4 ($\text{C}_{15,16}$), 132.3 (C_{17}), 133.8 (C_{18}), 135.4 (C_{19}), 144.9 (C_{20}), 152.9 (C_{21}), 163.9 (C_{22}), 164.9 (C_{23}), 192.0 (C_{24}).

A.7 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoacetophenon (20)

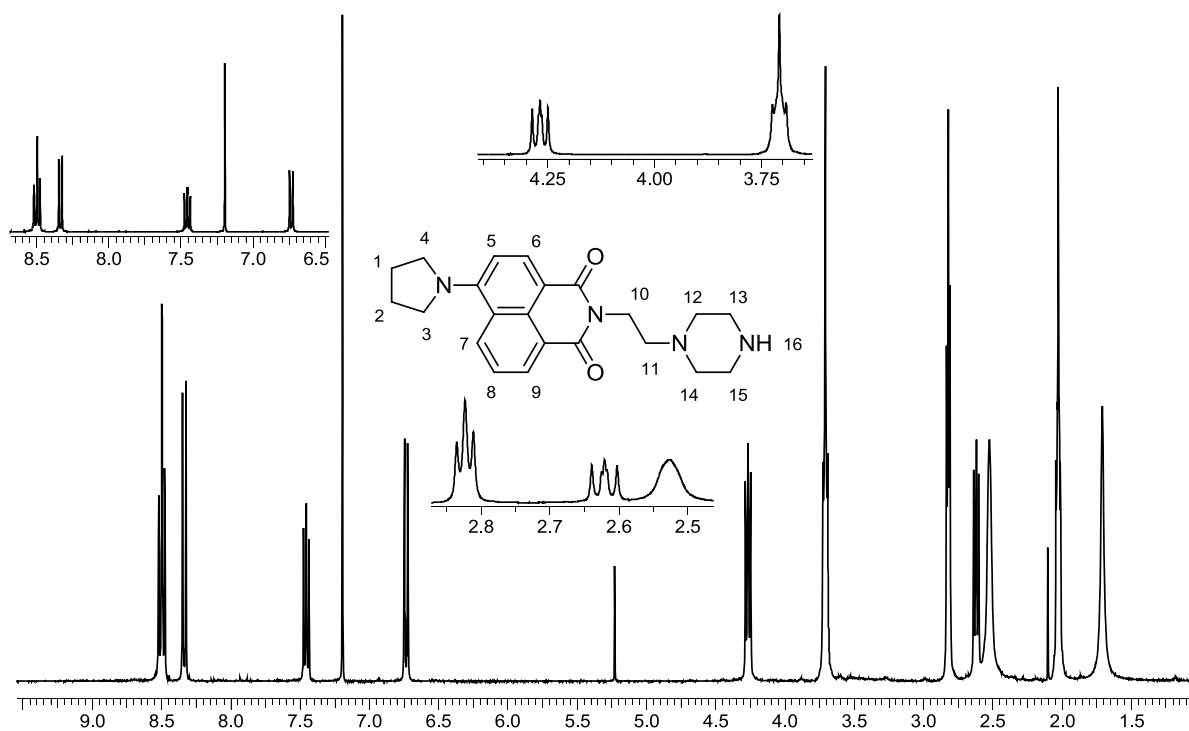


$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 2.12 (m, 4 H, $\text{H}_{1,2}$), 2.65 (s, 3 H, H_{14}), 3.82 (m, 4 H, $\text{H}_{3,4}$), 6.83 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.80$ Hz, 1 H, H_5), 7.43 (m, 2 H, $\text{H}_{10,12}$), 7.56 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8.60$ Hz, 7.50 Hz, 1 H, H_8), 8.12 (m, 2 H, $\text{H}_{11,13}$), 8.44 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.70$ Hz, 1 H, H_7), 8.63 (m, 2 H, $\text{H}_{6,9}$).

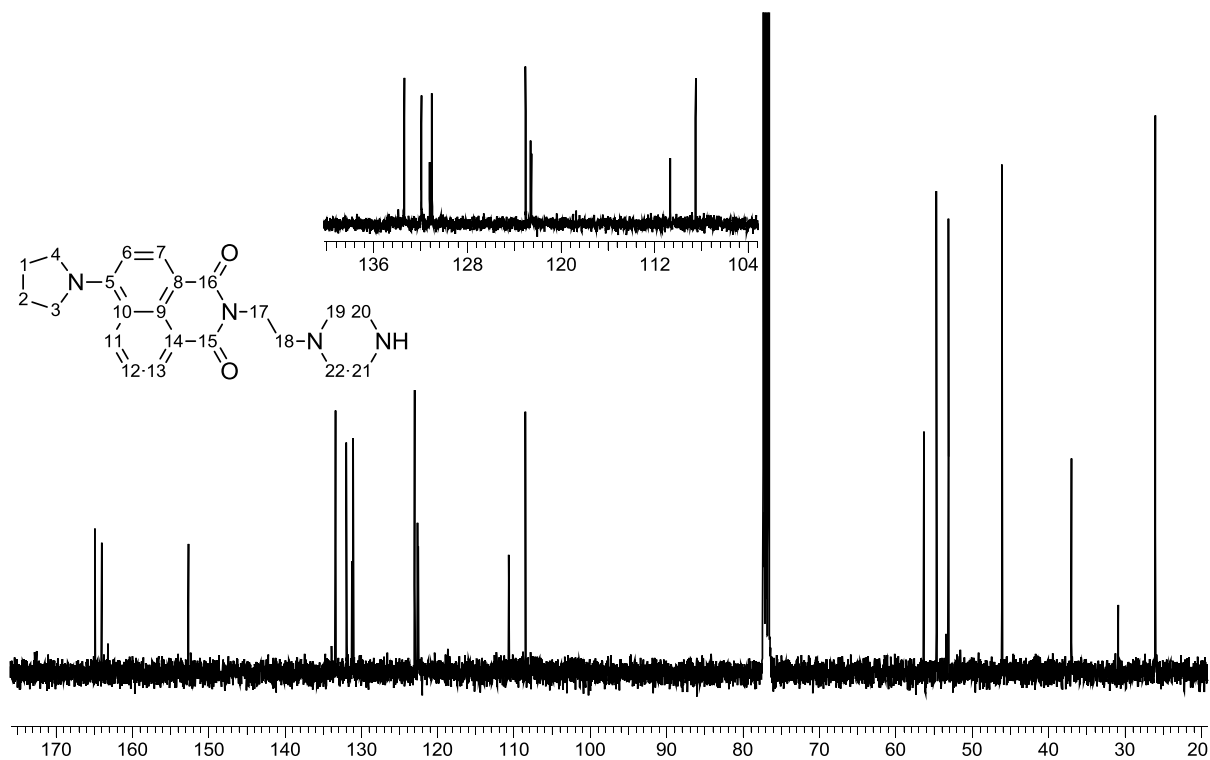


$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 26.1 ($\text{C}_{1,2}$), 26.8 (C_{24}), 53.3 ($\text{C}_{3,4}$), 108.6 (C_6), 110.2 (C_8), 122.5 (C_{20}), 122.7 (C_{14}), 123.1 ($\text{C}_{18,22}$), 129.3 ($\text{C}_{19,21}$), 131.6 (C_{10}), 132.6 (C_{12}), 133.9 ($\text{C}_{7,13}$), 136.8 (C_{11}), 140.6 (C_{17}), 153.1 (C_5), 163.9 (C_{15}), 164.8 (C_{16}), 197.4 (C_{23}).

A.8 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin (23)

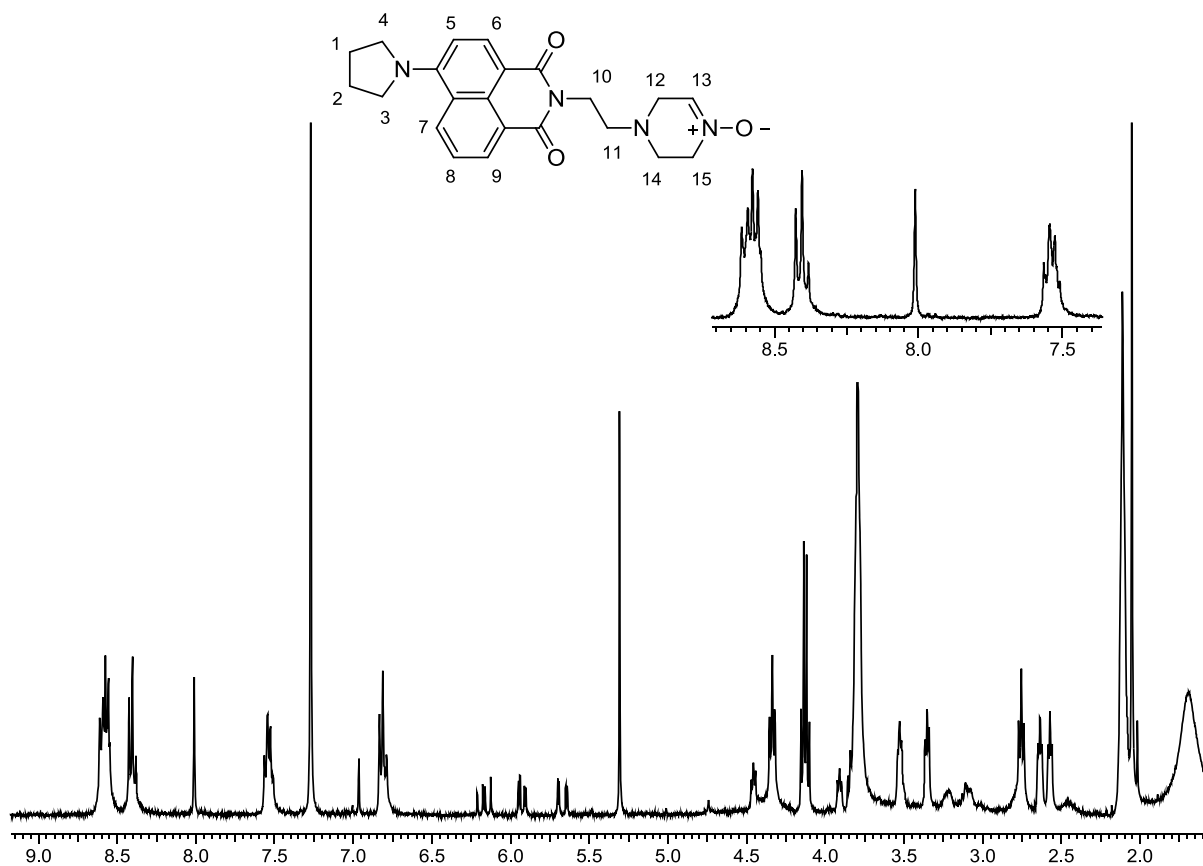


$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ [ppm] = 1.66 (s, 1 H, H_{16}), 2.11 (m, 4 H, $\text{H}_{1,2}$), 2.59 (m, 4 H, $\text{H}_{12,14}$), 2.69 (m, 2 H, H_{11}), 2.89 (t, $^3J_{\text{HH}} = 4.50$ Hz, 4.50 Hz, 4 H, $\text{H}_{13,15}$), 3.79 (m, 4 H, $\text{H}_{3,4}$), 4.34 (m, 2 H, H_{10}), 6.79 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.70$ Hz, 1 H, H_5), 7.52 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.90$ Hz, 7.90 Hz, 1 H, H_8), 8.39 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.60$ Hz, 1 H, H_7), 8.56 (m, 2 H, $\text{H}_{6,9}$).



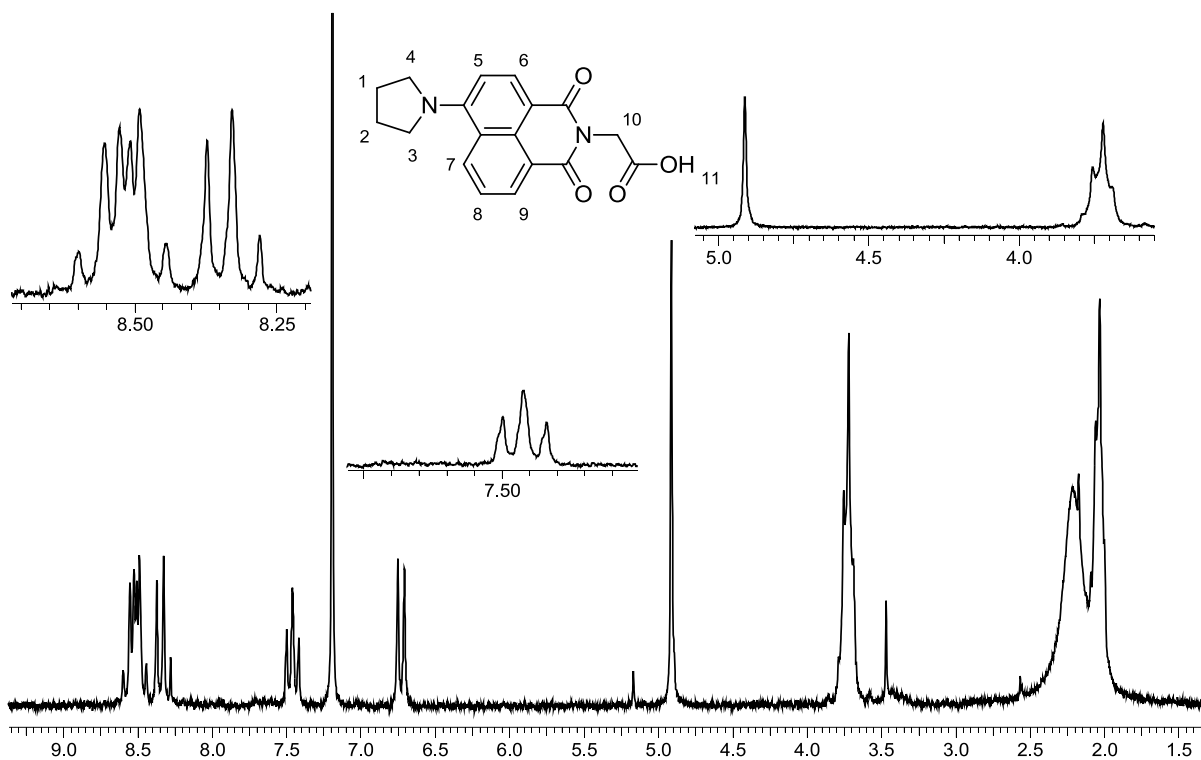
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 26.1 ($\text{C}_{1,2}$), 37.1 (C_{18}), 46.1 ($\text{C}_{20,21}$), 53.2 ($\text{C}_{3,4}$), 54.7 ($\text{C}_{19,22}$), 56.4 (C_{17}), 108.5 (C_{13}), 110.7 (C_{11}), 122.5 (C_6), 122.6 (C_{12}), 123.0 (C_{10}), 131.1 (C_7), 131.9 (C_9), 133.4 ($\text{C}_{8,14}$), 152.7 (C_5), 164.0 (C_{15}), 164.9 (C_{16}).

A.9 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoethylpiperazin-*N*-oxid (24)

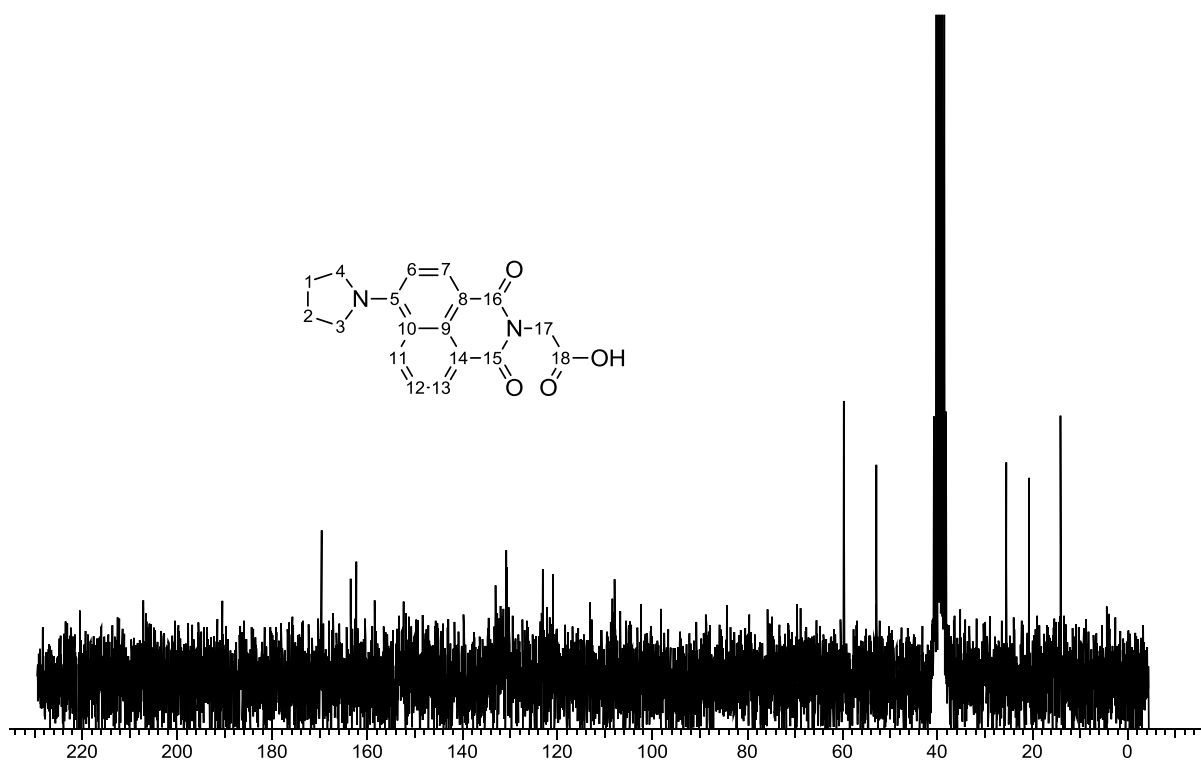


¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = 2.11 (m, 4 H, H_{1,2}), 2.60 (m, 4 H, H_{12,14}), 2.76 (t, ³*J*_{HH} = 6.80 Hz, 6.80 Hz, 2 H, H₁₁), 3.34 - 3.44 (m, 4 H, H₁₅) 3.79 (m, 4 H, H_{3,4}), 4.34 (t, ³*J*_{HH} = 6.80 Hz, 6.80 Hz, 2 H, H₁₀), 6.81 (m, 1 H, H₅), 7.55 (m, 1 H, H₈), 8.01 (s, 1 H, H₁₃), 8.40 (m, 1 H, H₇), 8.58 (m, 2 H, H_{6,9}).

A.10 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoessigsäure (26)

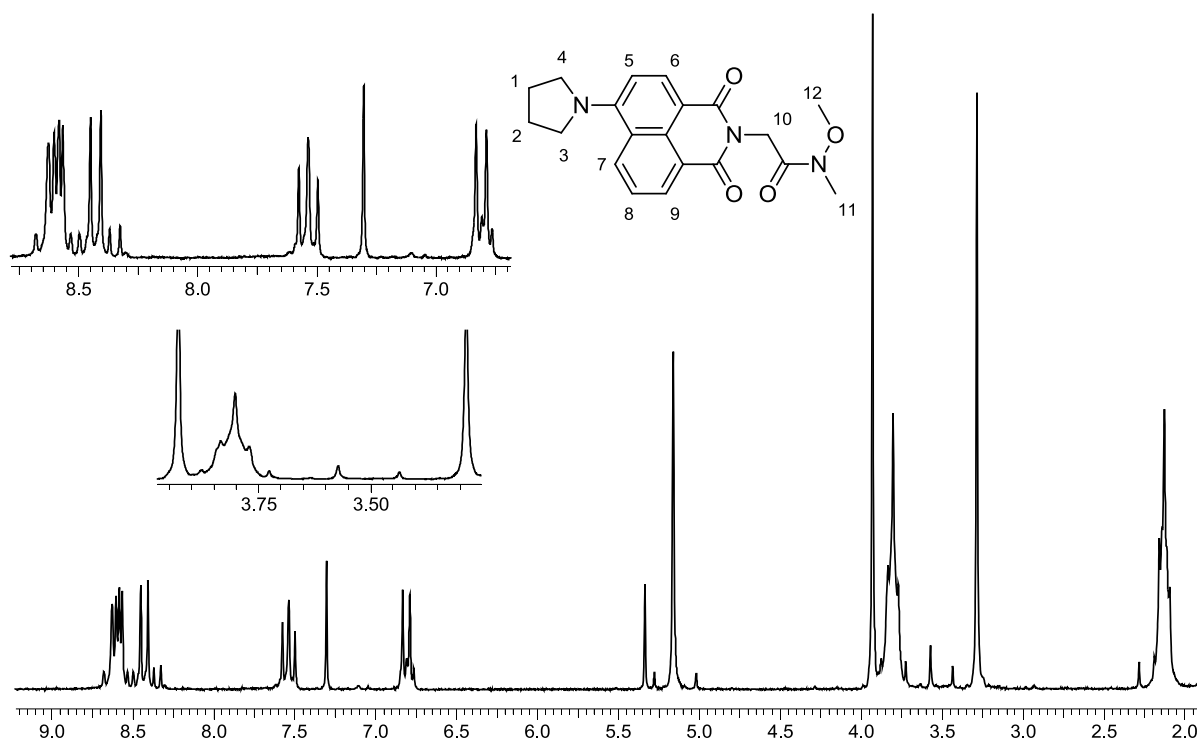


$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ [ppm] = 2.08 (m, 4 H, $\text{H}_{1,2}$), 3.78 (m, 4 H, $\text{H}_{3,4}$), 4.97 (s, 2 H, H_{10}), 6.79 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.70$ Hz, 1 H, H_5), 7.51 (m, 1 H, H_8), 8.41 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.80$ Hz, 1 H, H_7), 8.58 (m, 2 H, $\text{H}_{6,9}$).

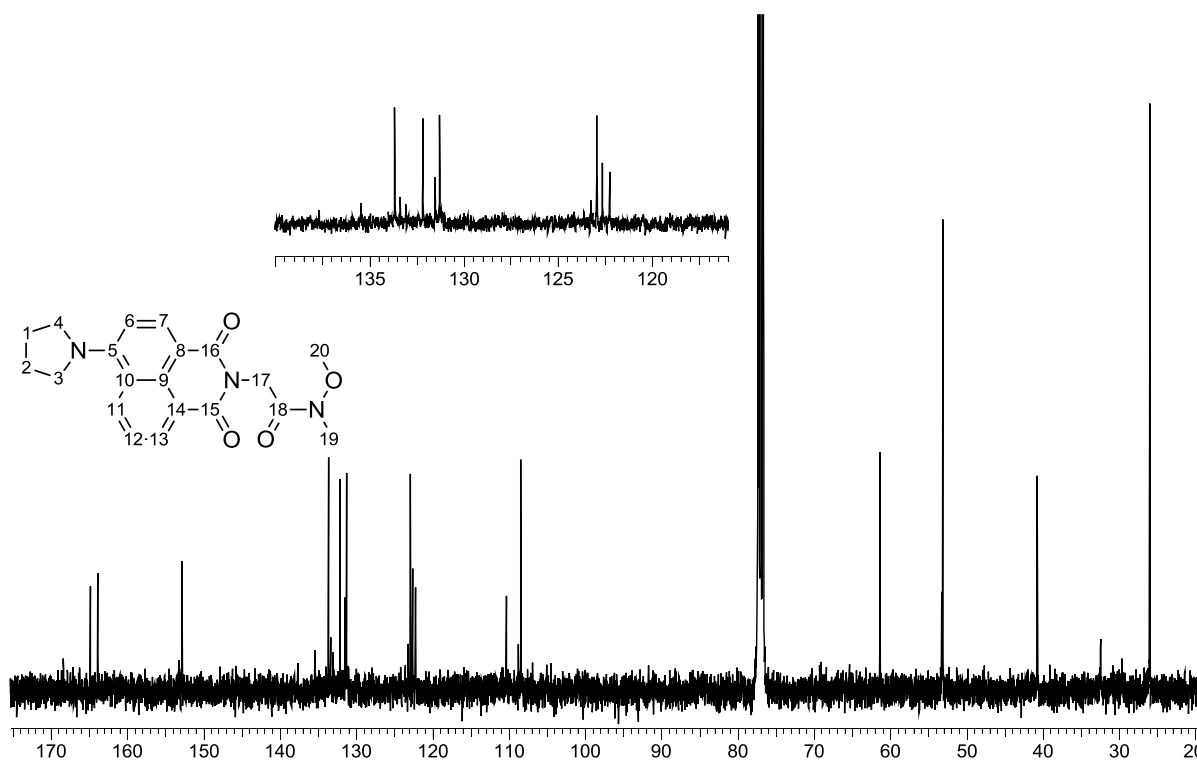


$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (DMSO-d_6 , 100 MHz): δ [ppm] = 25.5 ($\text{C}_{1,2}$), 52.8 (C_{17}), 59.7 ($\text{C}_{3,4}$), 108.0 (C_6), 113.1 (C_8), 121.0 (C_9), 123.1 (C_{14}), 130.6 (C_{10}), 130.7 (C_{12}), 133.1 ($\text{C}_{7,13}$), 139.8 (C_{11}), 152.3 (C_5), 162.3 (C_{15}), 163.5 (C_{16}), 169.6 (C_{18}).

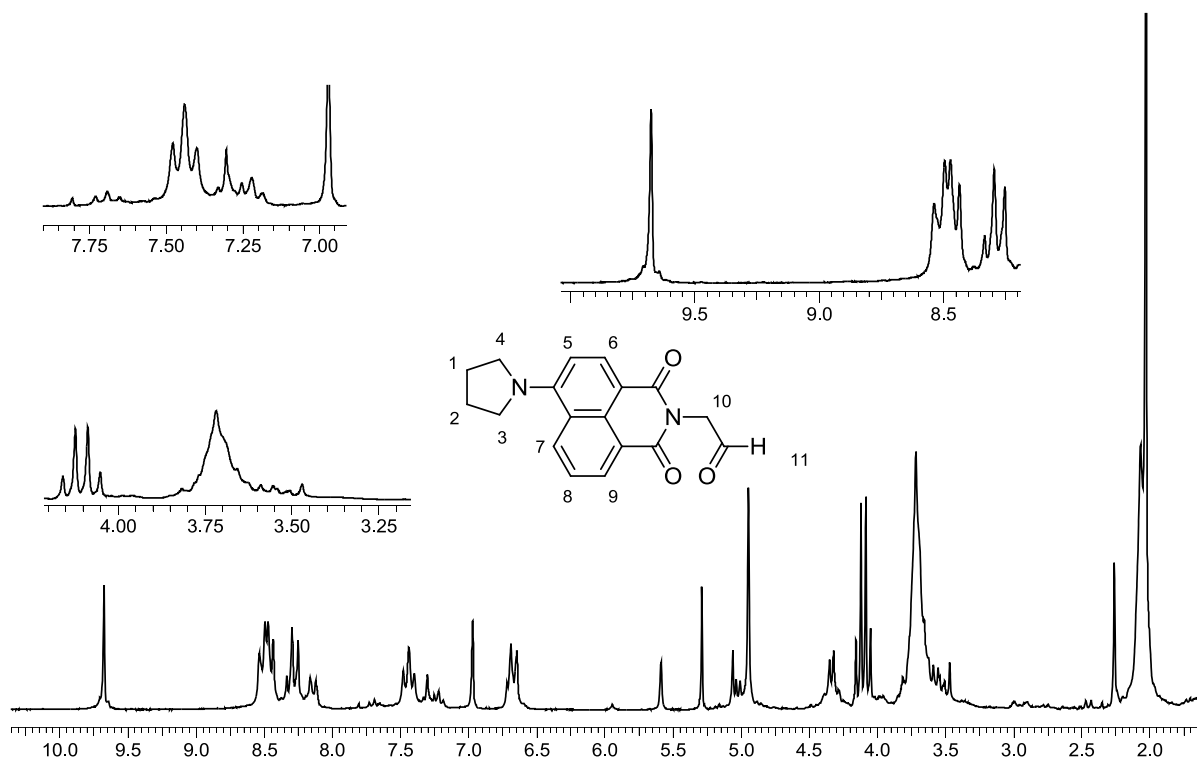
A.11 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoessigsäure-*N*-methoxy-*N*-methyamid (27)



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ [ppm] = 2.08 (m, 4 H, $\text{H}_{1,2}$), 3.23 (s, 3 H, H_{11}), 3.75 (m, 4 H, $\text{H}_{3,4}$), 3.88 (s, 3 H, H_{12}), 5.11 (s, 2 H, H_{10}), 6.75 (m, 1 H, H_3), 7.48 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8.00$ Hz, 1 H, H_8), 8.38 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.60$ Hz, 1 H, H_7), 8.54 (m, 2 H, $\text{H}_{6,9}$).

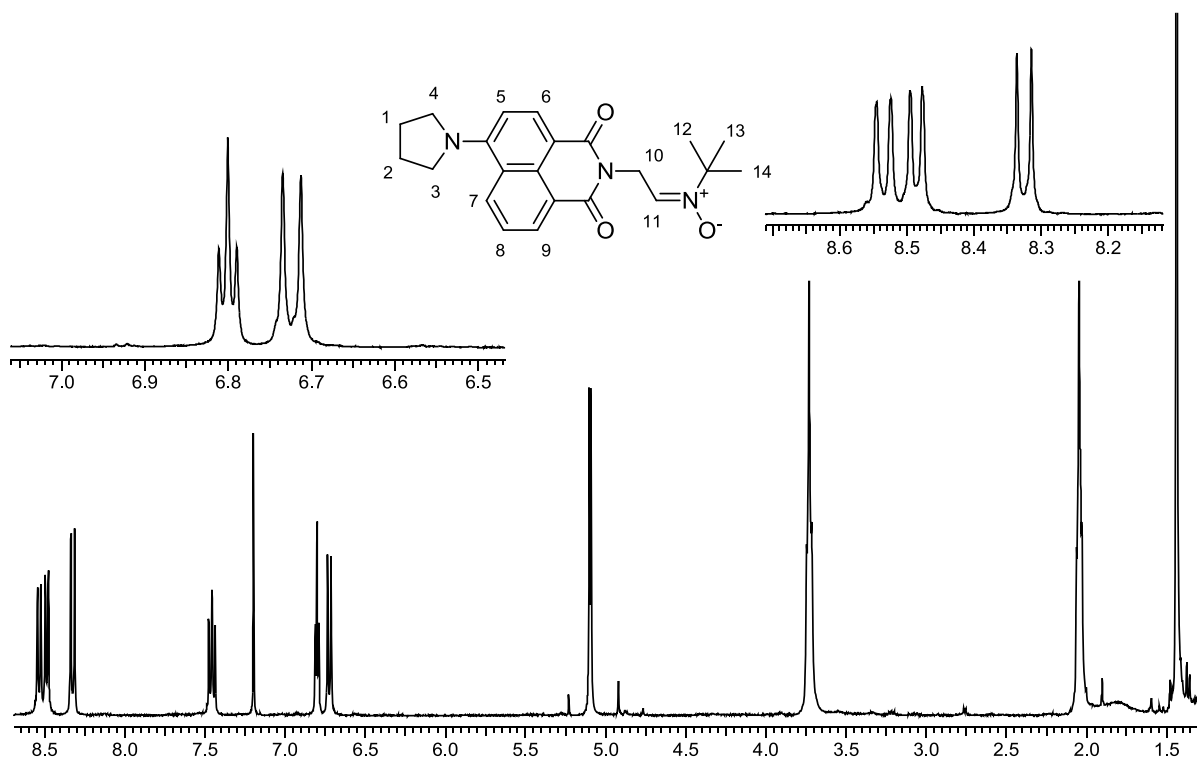


$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 26.1 ($\text{C}_{1,2}$), 40.8 (C_{17}), 32.5 (C_{19}), 53.2 ($\text{C}_{3,4}$), 61.5 (C_{20}), 108.5 (C_6), 110.4 (C_8), 122.3 (C_9), 122.7 (C_{14}), 123.0 (C_{10}), 131.3 (C_{12}), 131.9 (C_{14}), 132.2 (C_{11}), 133.7 ($\text{C}_{7,13}$), 152.9 (C_5), 163.9 ($\text{C}_{15,16}$), 164.9 (C_{18}).

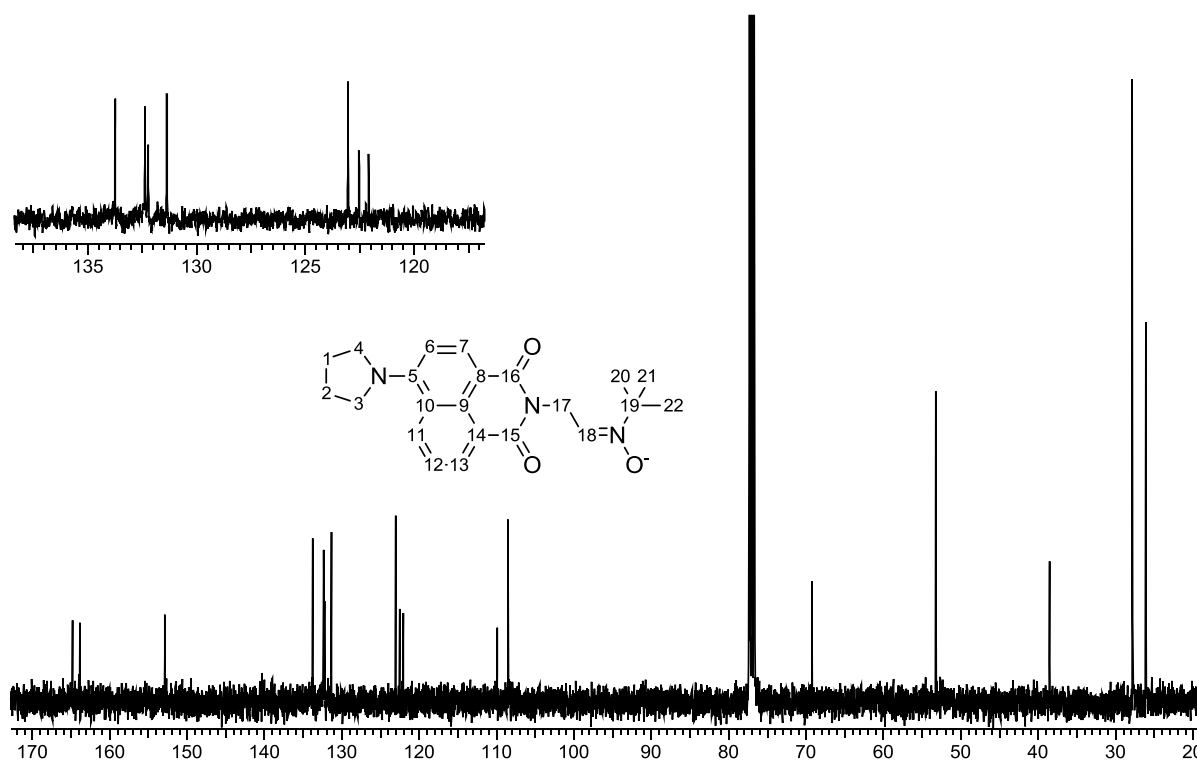
A.12 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidoacetaldehyd (28)

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ [ppm] = 2.05 (m, 4 H, H_{1,2}), 3.71 (m, 4 H, H_{3,4}), 4.95 (s, 2 H, H₁₀), 6.67 (d, ³J_{HH} = 8.60 Hz, 1 H, H₅), 7.44 (t, ³J_{HH} = 7.90 Hz, 7.90 Hz, 1 H, H₈), 8.27 (d, ³J_{HH} = 8.60 Hz, 1 H, H₇), 8.48 (m, 2 H, H_{6,9}), 9.68 (s, 1 H, H₁₁).

A.13 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidomethyl-*N*-*tert*-butylnitron (29)

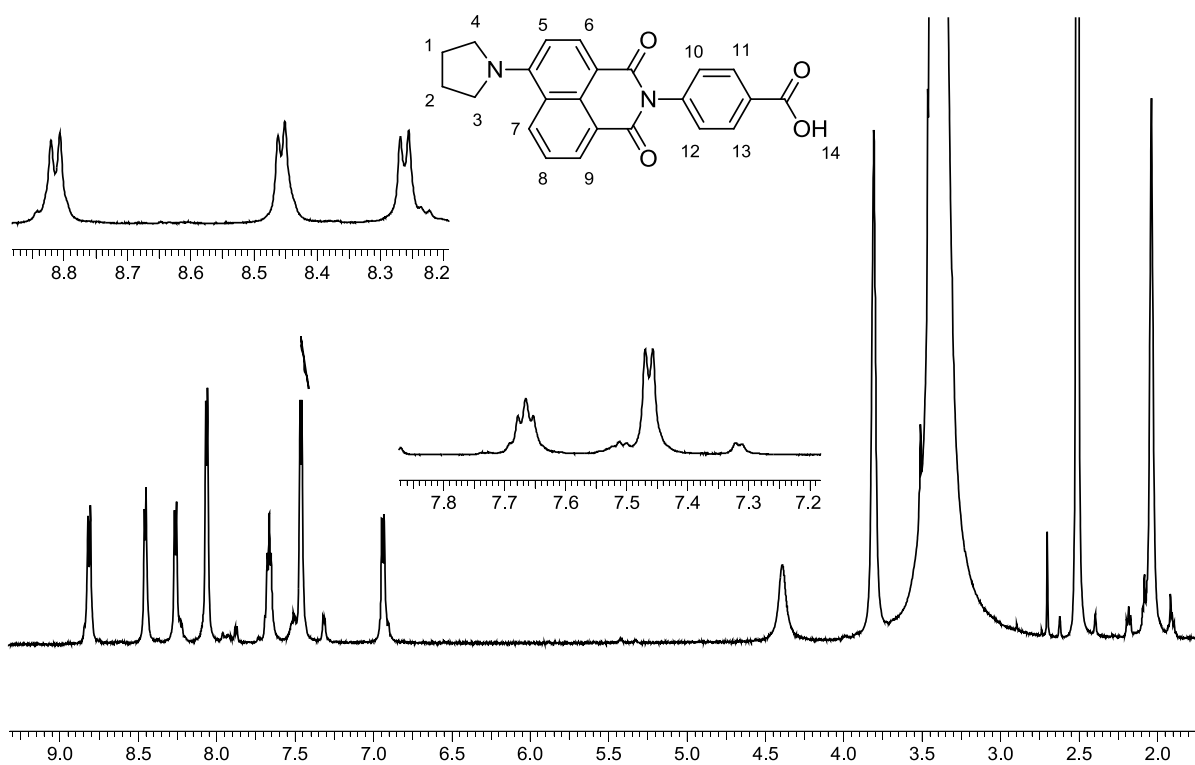


$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz): δ [ppm] = 1.44 (s, 9 H, $\text{H}_{12,13,14}$), 2.05 (m, 4 H, $\text{H}_{1,2}$), 3.73 (m, 4 H, $\text{H}_{3,4}$), 5.10 (d, $^3J_{\text{HH}} = 4.30$ Hz, 2 H, H_{10}), 6.72 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.80$ Hz, 1 H, H_5), 6.80 (t, $^3J_{\text{HH}} = 4.30$ Hz, 4.30 Hz, 1 H, H_{11}), 7.46 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8.40$ Hz, 7.50 Hz, 1 H, H_8), 8.33 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.70$ Hz, 1 H, H_7), 8.49 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.30$ Hz, 1 H, H_6), 8.53 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.50$ Hz, 1 H, H_9).

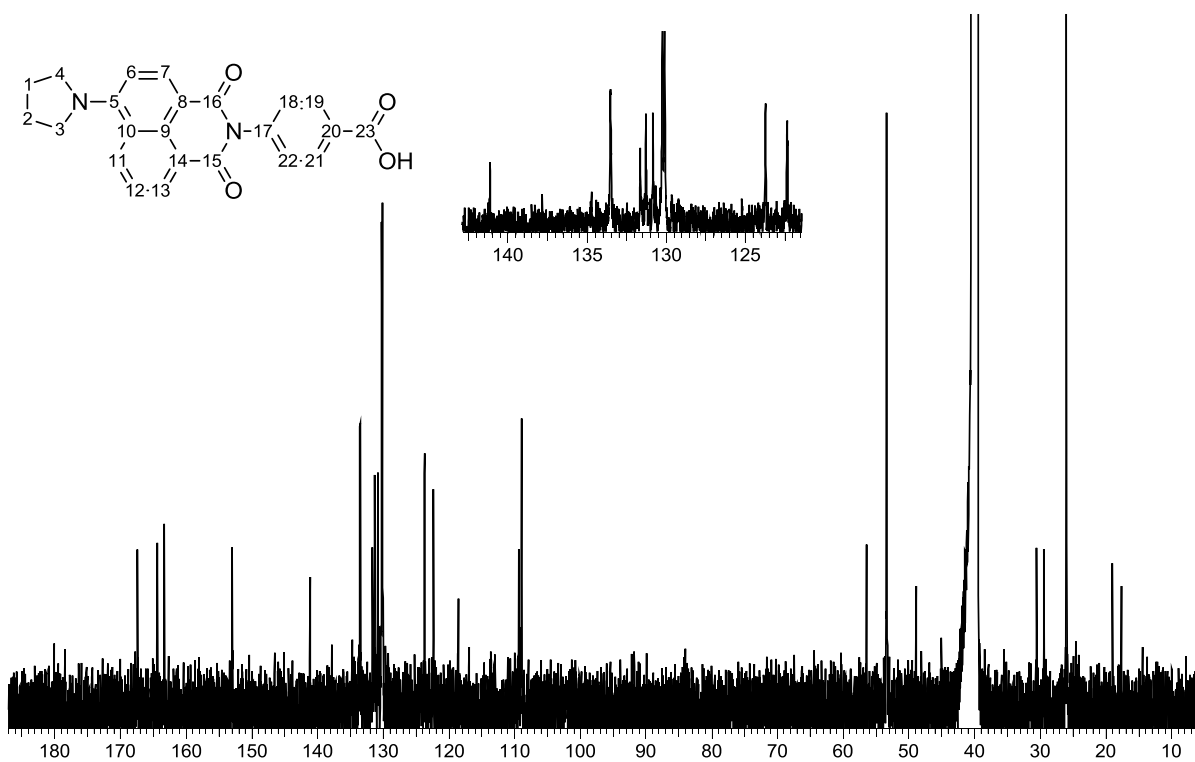


$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 26.1 ($\text{C}_{1,2}$), 27.9 ($\text{C}_{20,21,22}$), 38.6 (C_{17}), 53.3 ($\text{C}_{3,4}$), 69.3 (C_{19}), 108.5 (C_6), 110.0 (C_8), 122.1 (C_9), 122.5 (C_{14}), 123.0 (C_{10}), 131.4 (C_{12}), 132.2 (C_7), 132.4 (C_{13}), 133.8 (C_{11}), 152.9 (C_5), 163.8 (C_{15}), 164.8 (C_{16}).

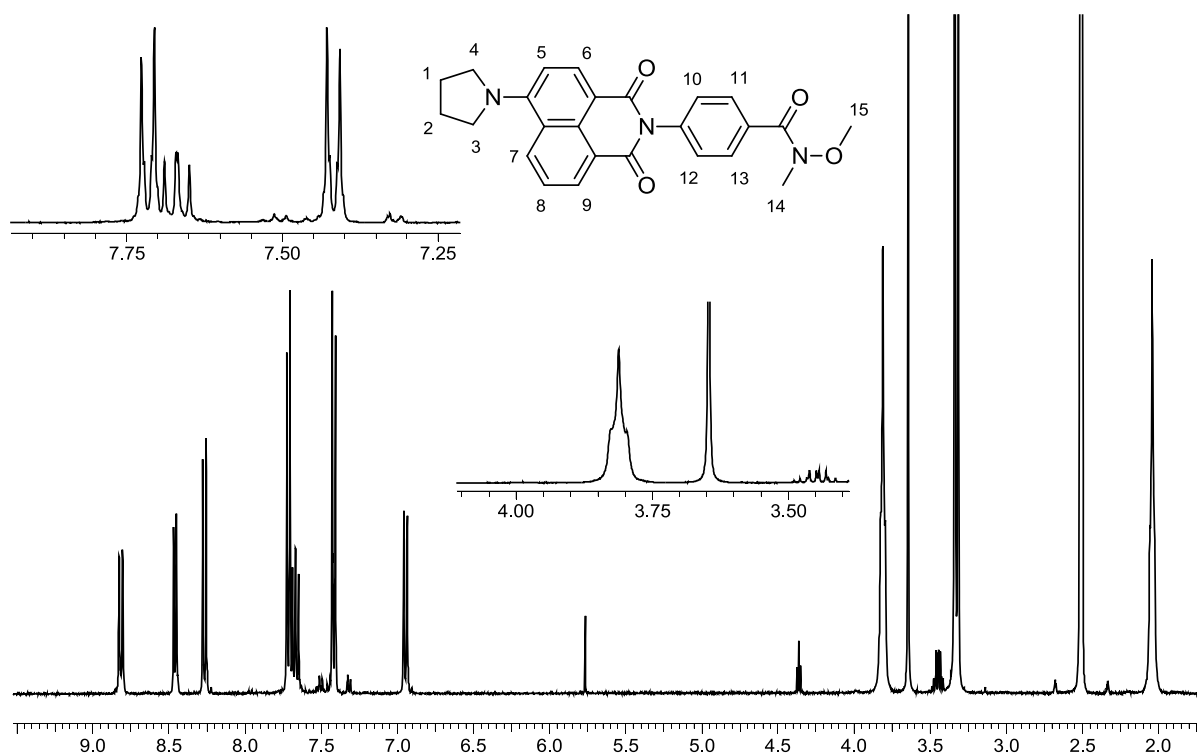
A.14 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoessäure (31)



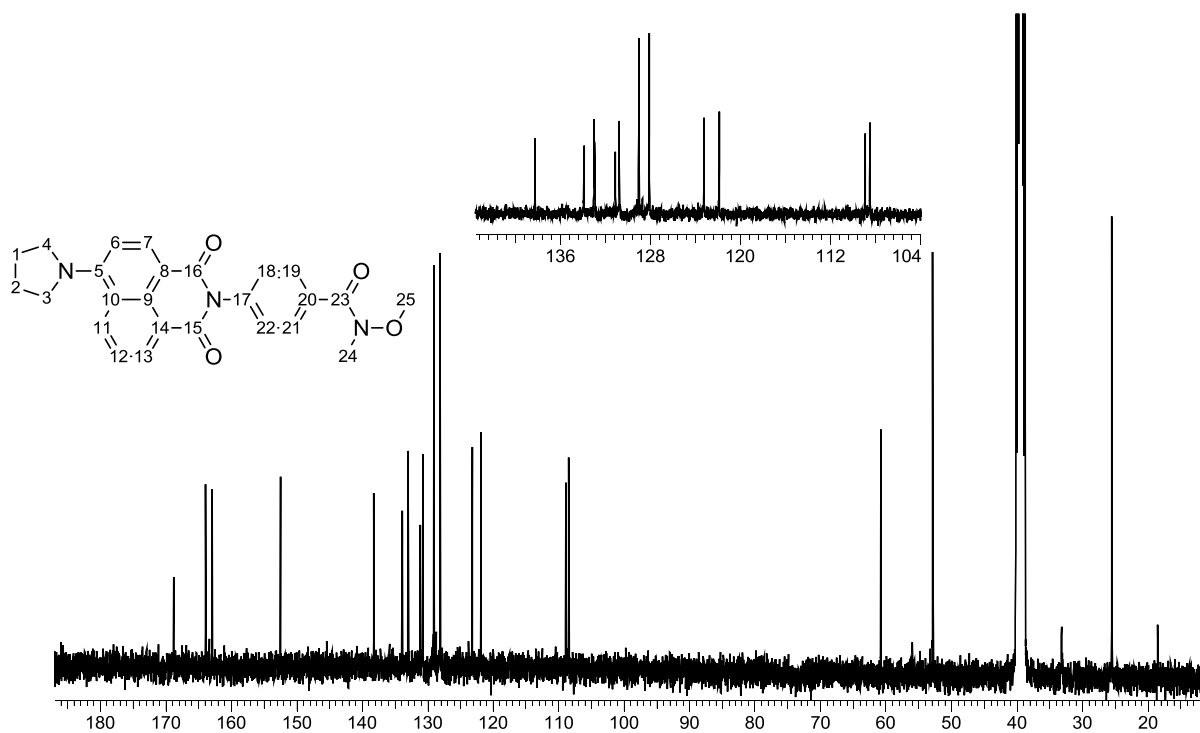
¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ [ppm] = 2.03 (m, 4 H, H_{1,2}), 3.80 (m, 4 H, H_{3,4}), 6.93 (d, ³J_{HH} = 8.40 Hz, 1 H, H₅), 7.45 (d, ³J_{HH} = 7.00 Hz, 2 H, H_{10,12}), 7.65 (t, 1 H, H₈), 8.05 (d, ³J_{HH} = 7.30 Hz, 2 H, H_{11,13}), 8.25 (d, ³J_{HH} = 8.10 Hz, 2 H, H₇), 8.45 (d, ³J_{HH} = 6.60 Hz, 1 H, H₆), 8.80 (d, ³J_{HH} = 8.40 Hz, 1 H, H₉).



¹³C{¹H}-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ [ppm] = 25.5 (C_{1,2}), 52.8 (C_{3,4}), 108.9 (C₆), 109.3 (C₈), 118.6 (C₉), 122.4 (C₂₀), 123.7 (C₁₄), 130.1 (C_{18,22}), 130.2 (C_{19,21}), 130.8 (C₁₀), 131.3 (C₁₂), 131.6 (C₁₁), 133.5 (C_{7,13}), 141.2 (C₁₇), 153.0 (C₅), 163.4 (C₁₅), 164.4 (C₁₆), 167.4 (C₂₃).

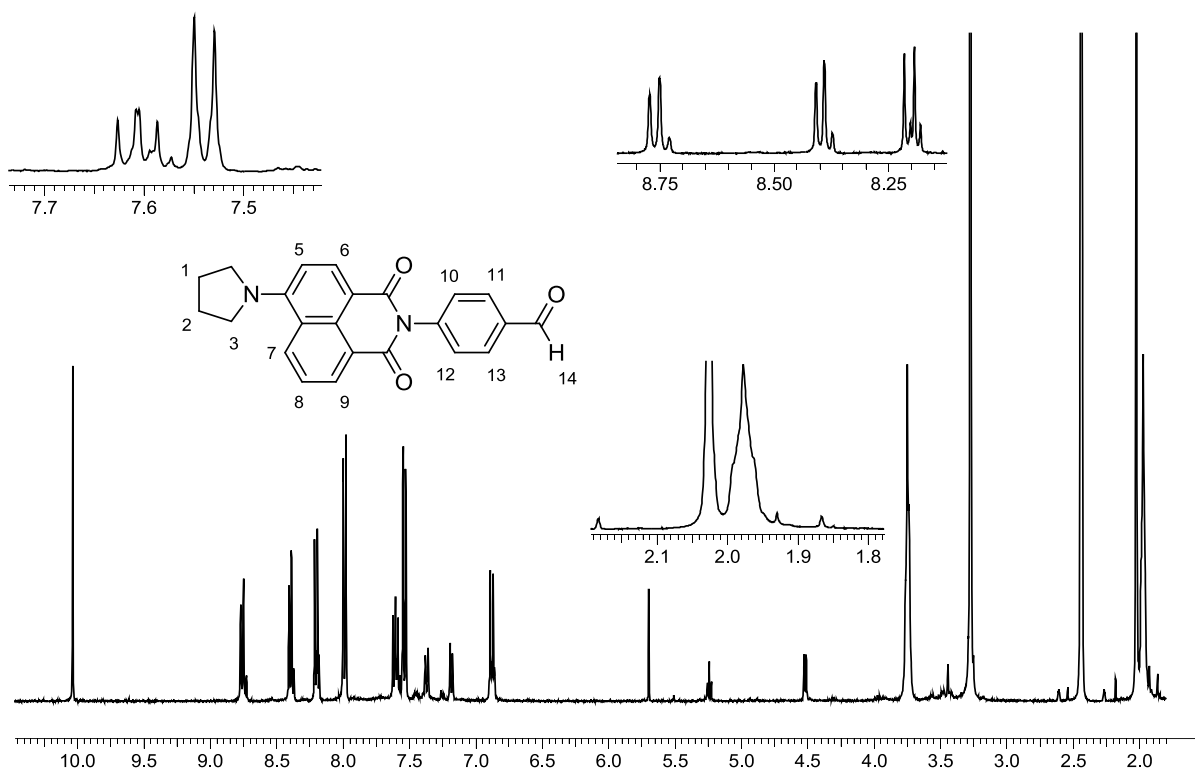
A.15 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoësäure-*N*-methoxy-*N*-methyamid (32)


$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ [ppm] = 2.04 (m, 4 H, $\text{H}_{1,2}$), 3.31 (s, 3 H, H_{14}), 3.64 (s, 3 H, H_{15}), 3.80 (m, 4 H, $\text{H}_{3,4}$), 6.94 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.80$ Hz, 1 H, H_5), 7.41 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.40$ Hz, 2 H, $\text{H}_{10,12}$), 7.66 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8.40$ Hz, 7.50 Hz, 1 H, H_8), 7.71 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.40$, 2 H, $\text{H}_{11,13}$), 8.26 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.80$ Hz, 1 H, H_7), 8.45 (d, $^3J_{\text{HH}} = 6.60$ Hz, 1 H, H_6), 8.81 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.10$ Hz, 1 H, H_9).

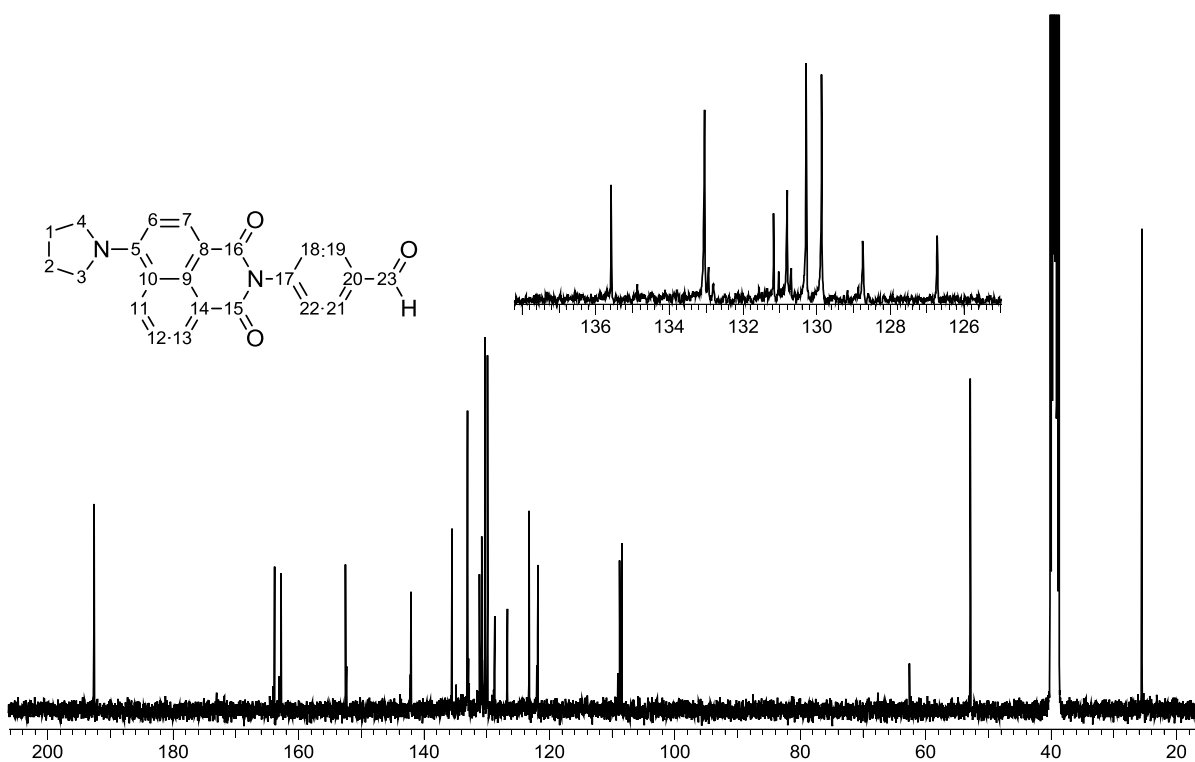


$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ [ppm] = 25.5 ($\text{C}_{1,2}$), 33.2 (C_{24}), 52.8 ($\text{C}_{3,4}$), 60.8 (C_{25}), 108.5 (C_6), 108.9 (C_8), 121.9 (C_9), 123.2 (C_{20}), 128.1 ($\text{C}_{18,22}$), 129.0 ($\text{C}_{19,21}$), 130.8 (C_{14}), 131.3 (C_{10}), 132.9 (C_{12}), 133.0 ($\text{C}_{7,13}$), 133.9 (C_{11}), 138.3 (C_{17}), 152.5 (C_5), 163.4 (C_{15}), 162.9 (C_{16}), 168.8 (C_{23}).

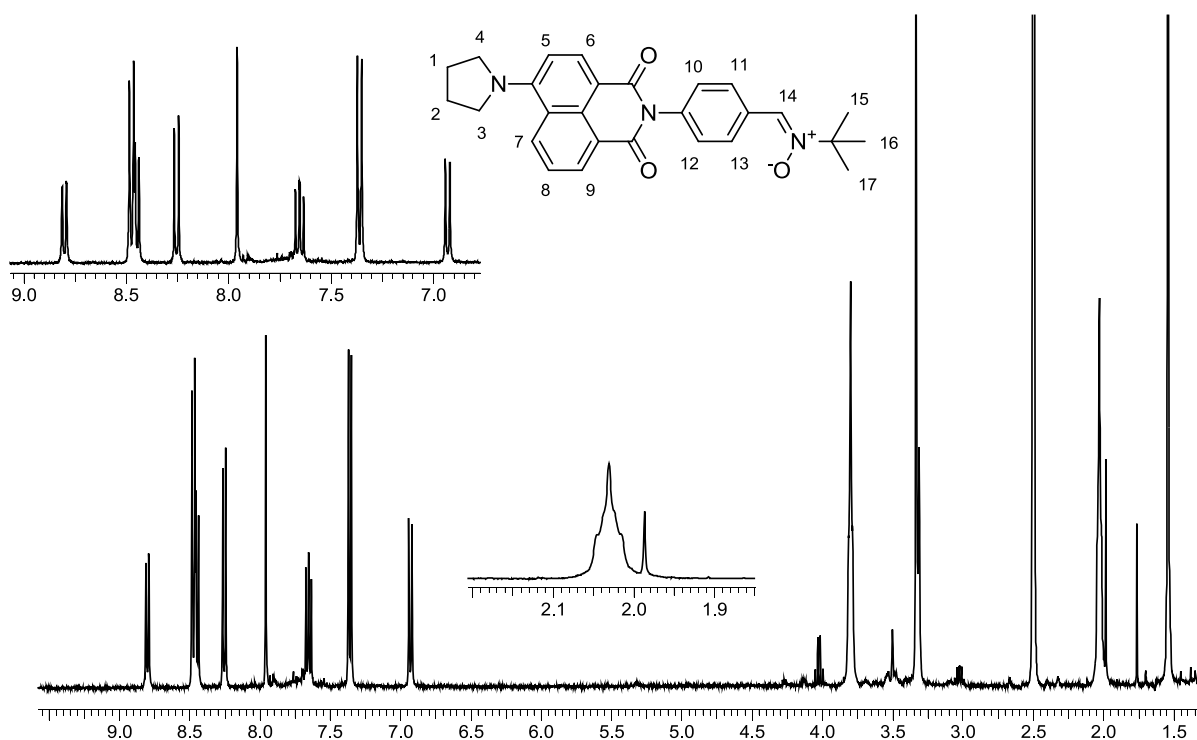
A.16 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzaldehyd (33)



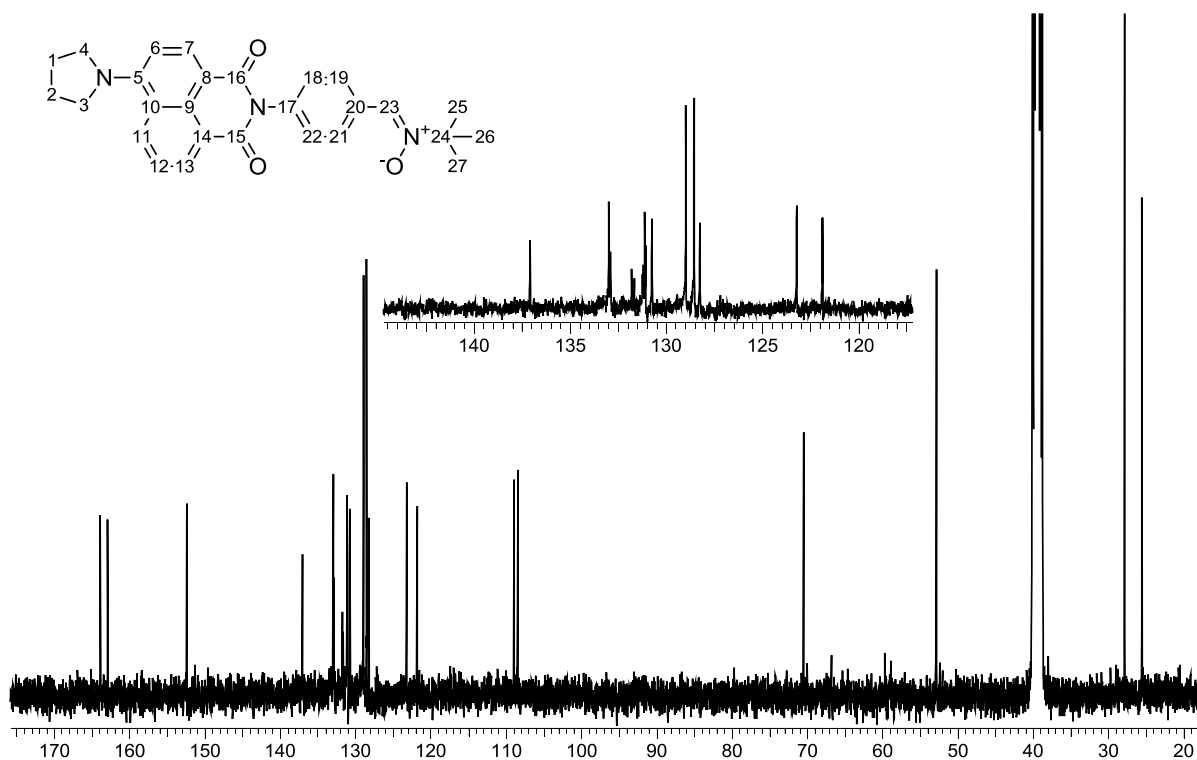
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ [ppm] = 2.05 (m, 4 H, $\text{H}_{1,2}$), 3.82 (m, 4 H, $\text{H}_{3,4}$), 6.96 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.40$ Hz, 1 H, H_5), 7.61 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.10$ Hz, 2 H, $\text{H}_{10,12}$), 7.68 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8.40$ Hz, 7.30 Hz, 1 H, H_8), 8.06 (m, 2 H, $\text{H}_{11,13}$), 8.28 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.40$ Hz, 1 H, H_7), 8.47 (d, $^3J_{\text{HH}} = 6.20$ Hz, 1 H, H_6), 8.83 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.70$ Hz, 1 H, H_9), 10.1 (s, 1 H, H_{14}).



$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ [ppm] = 25.6 ($\text{C}_{1,2}$), 53.0 ($\text{C}_{3,4}$), 108.5 (C_6), 108.8 (C_8), 121.8 (C_9), 123.2 (C_{20}), 126.7 (C_{14}), 129.9 ($\text{C}_{18,22}$), 130.3 ($\text{C}_{19,21}$), 130.8 (C_{10}), 131.2 (C_{12}), 133.1 ($\text{C}_{7,13}$), 135.6 (C_{11}), 142.1 (C_{17}), 152.6 (C_5), 162.8 (C_{15}), 163.9 (C_{16}), 192.7 (C_{23}).

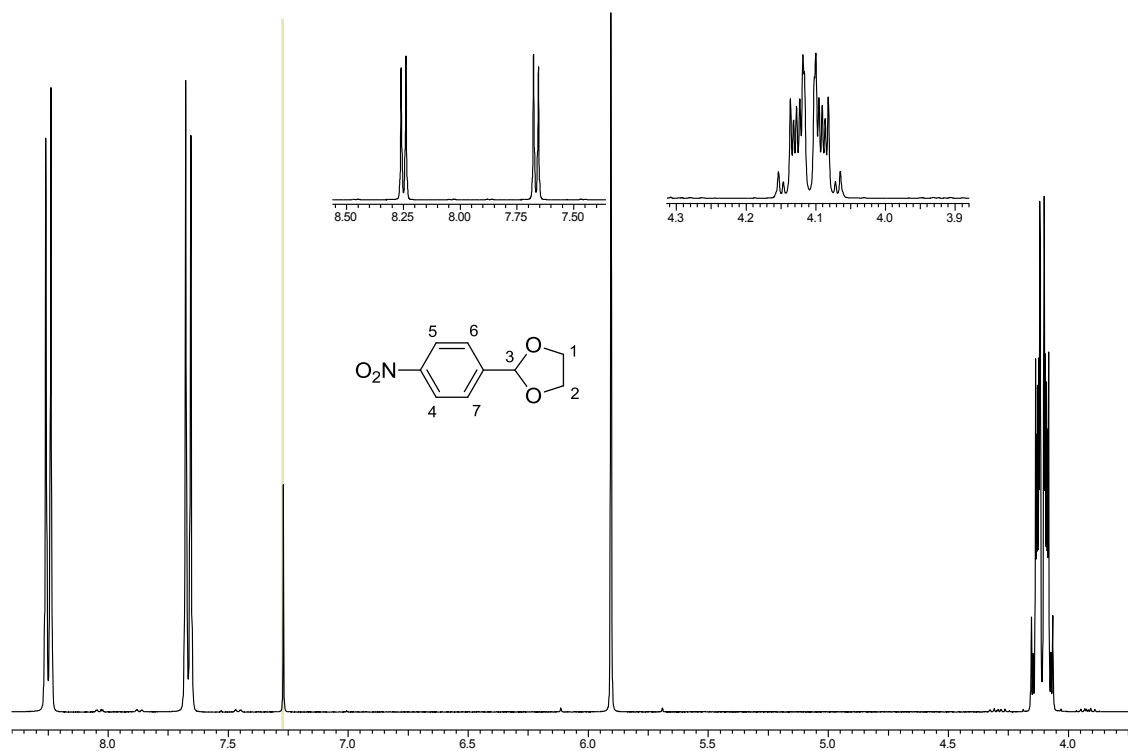
A.17 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidophenyl-*N*-*tert*-butylnitron (34)


¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ [ppm] = 1.55 (s, 9 H, H_{15,16,17}), 2.04 (m, 4 H, H_{1,2}), 3.80 (m, 4 H, H_{3,4}), 6.94 (d, ³J_{HH} = 9.00 Hz, 1 H, H₅), 7.37 (d, ³J_{HH} = 8.60 Hz, 2 H, H_{10,12}), 7.66 (dd, ³J_{HH} = 8.40 Hz, 7.75 Hz, 1 H, H₈), 7.96 (s, 1 H, H₁₄), 8.26 (d, 1 H, ³J_{HH} = 8.60 Hz, H₇), 8.45 (d, ³J_{HH} = 7.30 Hz, 1 H, H₆), 8.48 (d, ³J_{HH} = 8.60 Hz, 2 H, H_{11,13}), 8.81 (d, ³J_{HH} = 8.10 Hz, 1 H, H₉).

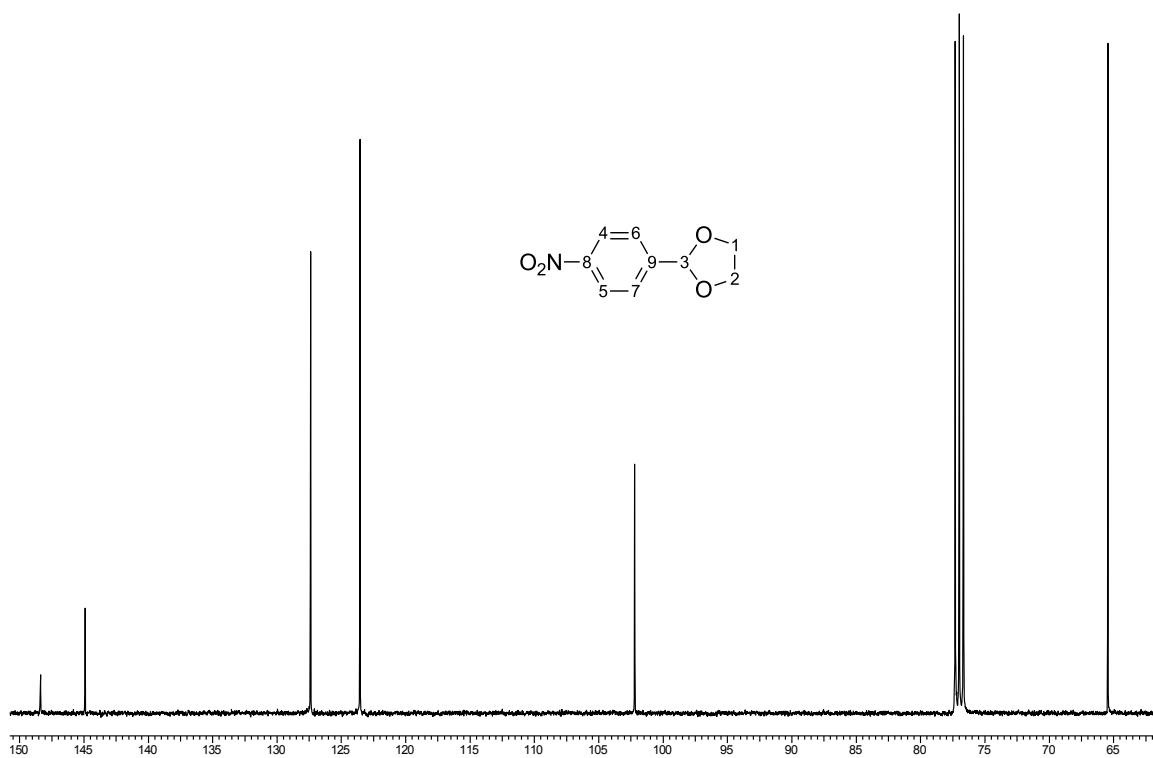


¹³C{¹H}-NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): δ [ppm] = 25.6 (C_{1,2}), 27.8 (C_{25,26,27}), 52.9 (C_{3,4}), 70.5 (C₂₄), 108.5 (C₆), 109.0 (C₈), 121.8 (C₉), 121.9 (C₂₀), 123.2 (C₁₄), 128.6 (C_{18,22}), 129.0 (C_{19,21}), 130.7 (C₁₀), 131.1 (C₁₂), 131.2 (C₁₁), 132.9 (C₇), 133.0 (C₁₃), 137.1 (C₁₇), 152.5 (C₅), 162.9 (C₁₅), 164.0 (C₁₆).

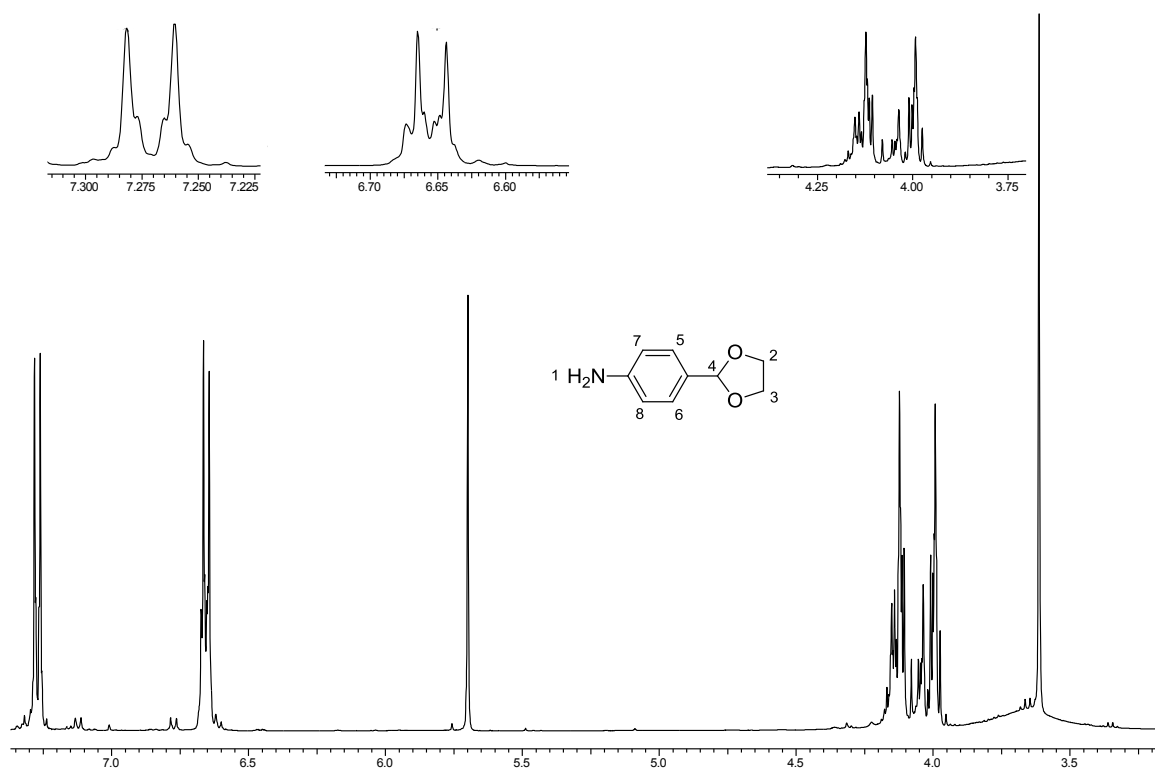
A.18 2-(4-Nitrophenyl)-1,3-dioxolan (36)



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 4.08-4.13 (m, 4 H, $H_{1,2}$), 5.90 (s, 1 H, H_3), 7.66 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.60$ Hz, 2 H, $H_{4,5}$), 8.25 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.56$ Hz, 2 H, $H_{6,7}$).

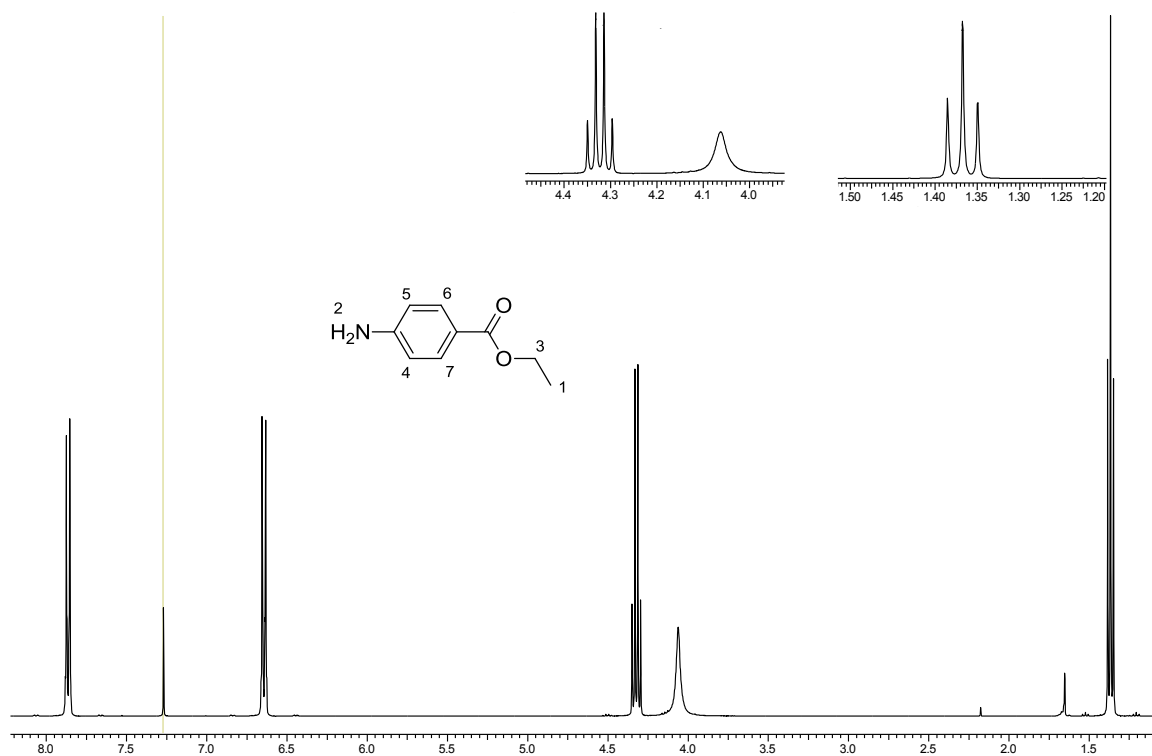


$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 65.5 ($\text{C}_{1,2}$), 102.2 (C_3), 123.6 ($\text{C}_{4,5}$), 127.4 ($\text{C}_{6,7}$), 144.9 (C_8), 148.4 (C_9).

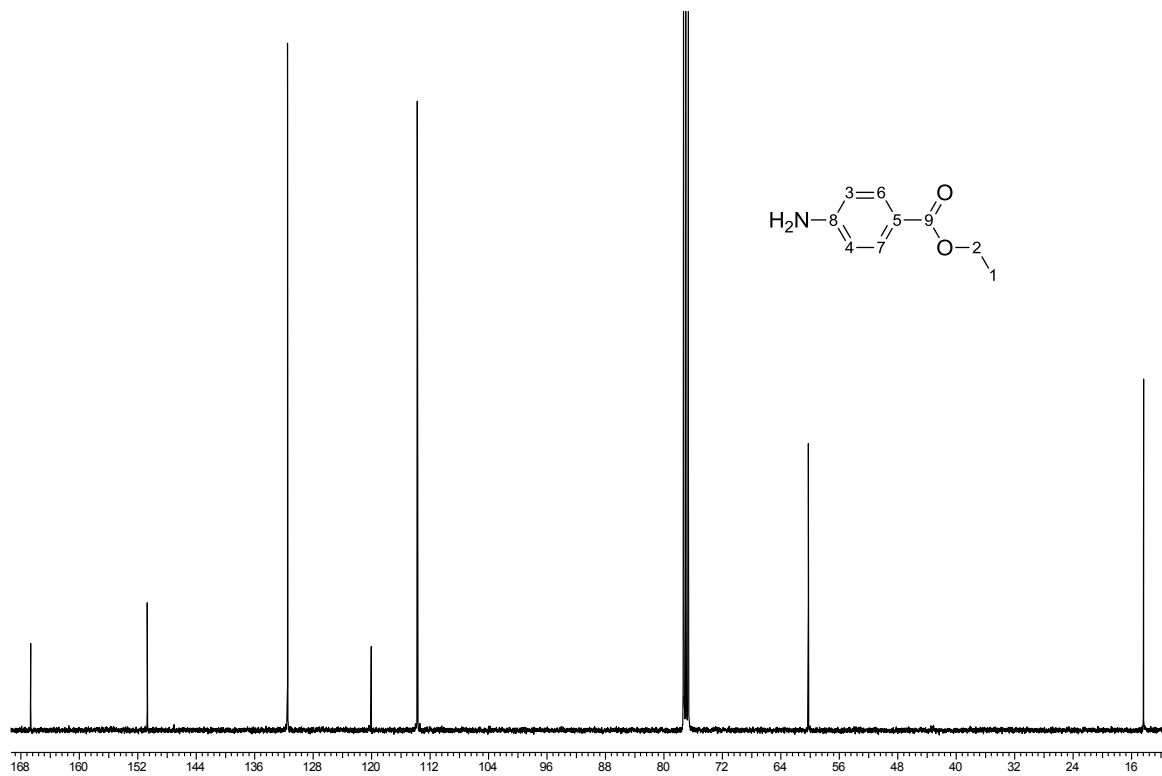
A.19 4-(Dioxacyclopent-2-yl)anilin (37)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm] = 3.75 (br.s, 2 H, H₁), 4.01-4.16 (m, 4 H, H_{2,3}), 5.73 (s, 1 H, H₄), 6.66 (d, ³J_{HH} = 8.60 Hz, 2 H, H_{5,6}), 7.29 (d, ³J_{HH} = 8.40 Hz, 2 H, H_{7,8}).

A.20 4-Aminobenzoessäureethylester (39)

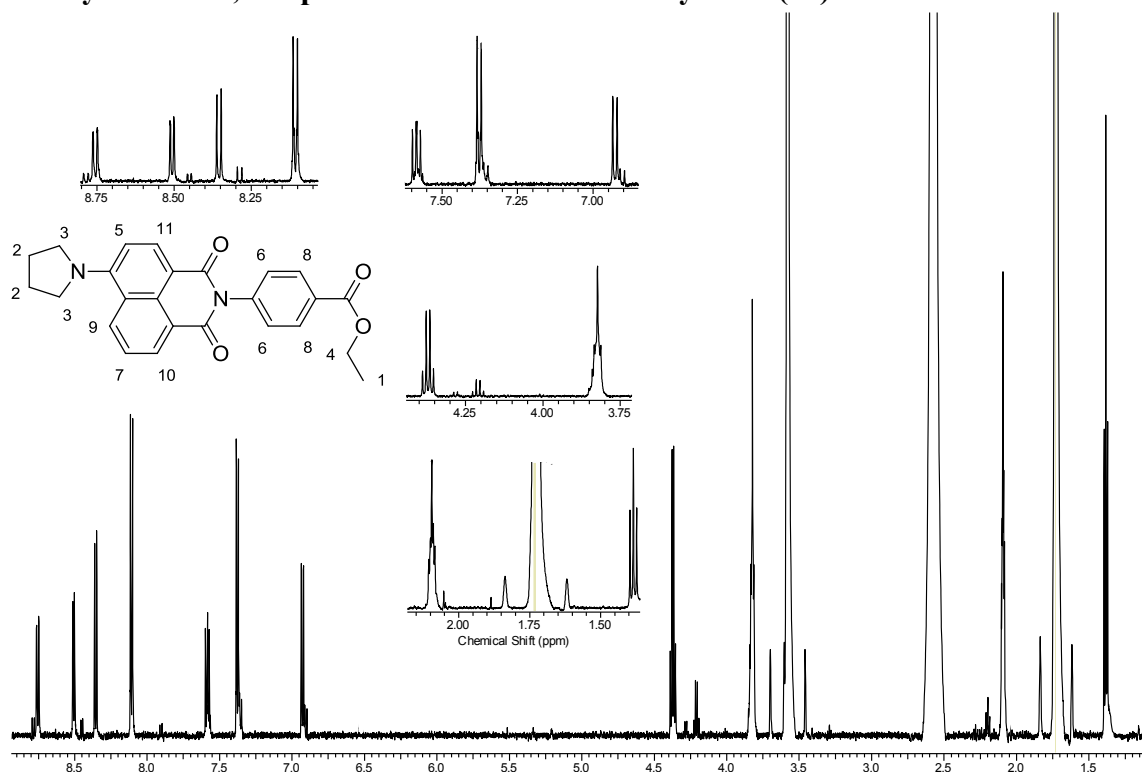


$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 1.37 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.09$ Hz, 3 H, H₁), 4.05 (br. s., 2 H, H₂), 4.33 (q, $^3J_{\text{HH}} = 7.25$ Hz, 2 H, H₃), 6.62 - 6.68 (m, 2 H, H_{4,5}), 7.83 - 7.90 (m, 2 H, H_{6,7}).

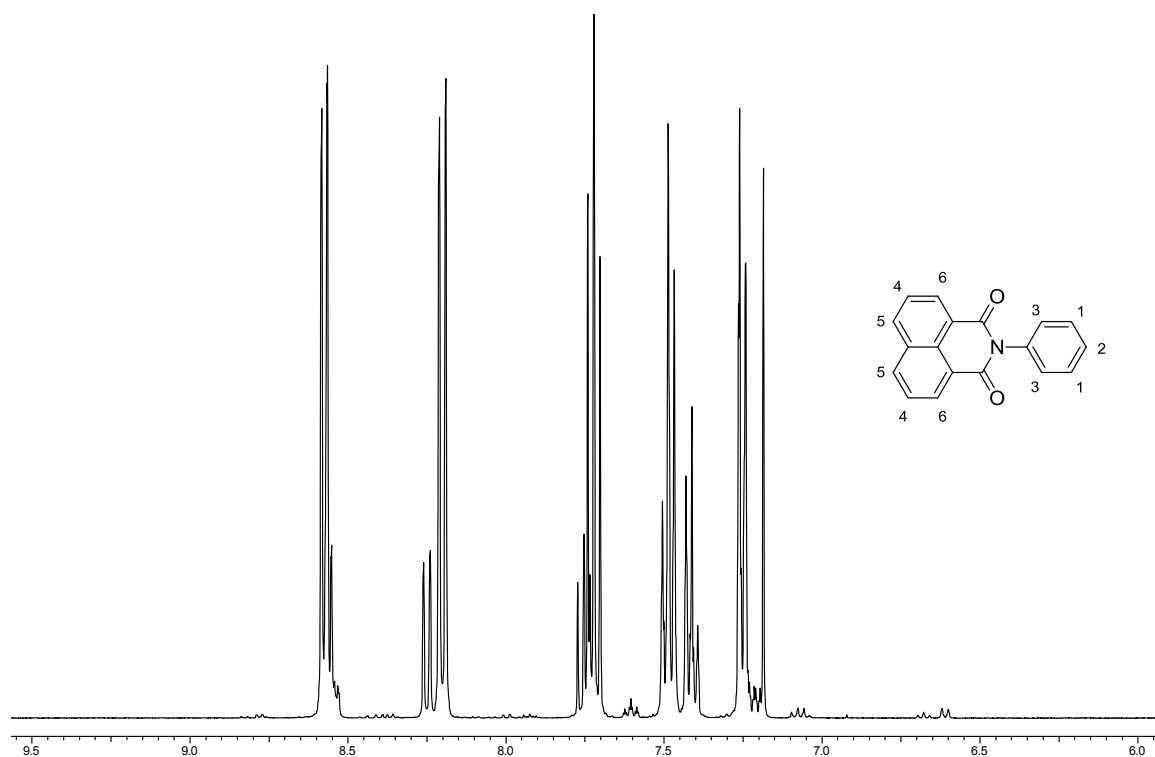


$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 14.4 (C₁), 60.3 (C₂), 113.7 (C_{3,4}), 120.1 (C₅), 131.5 (C_{6,7}), 150.7 (C₈), 166.7 (C₉).

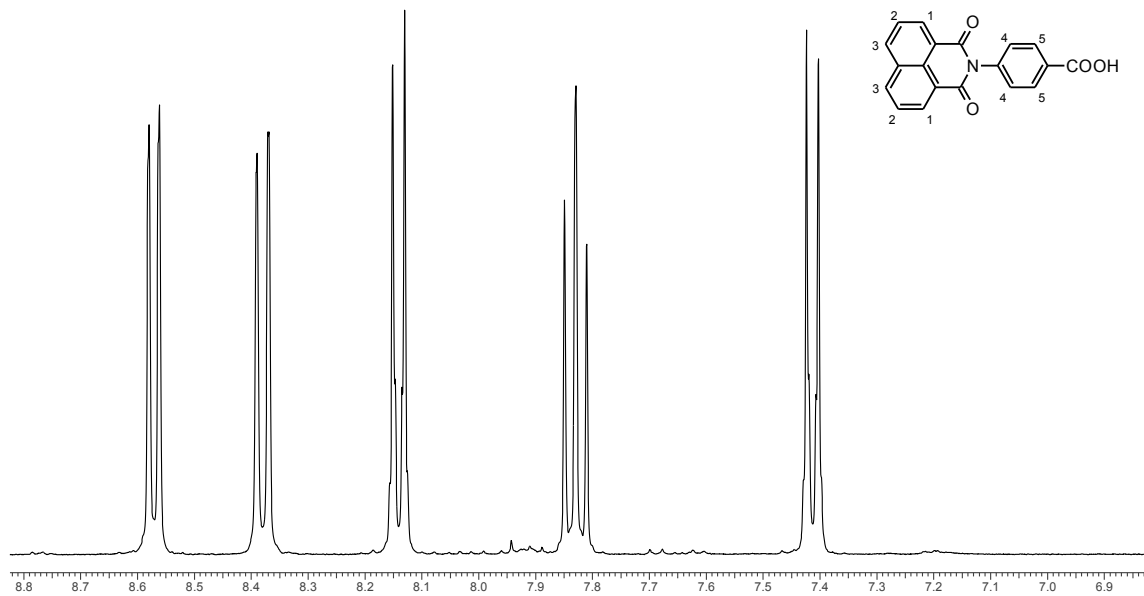
A.21 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzoessäureethylester (40)



¹H-NMR (THF-d₈, 600 MHz): δ [ppm] = 1.38 (t, ³J_{HH} = 7.19 Hz, 3 H, H₁), 2.08-2.10 (m, 4 H, H₂), 3.78 - 3.85 (m, 4 H, H₃) 4.37 (q, ³J_{HH} = 7.14 Hz, 3 H, H₄), 6.93 (d, ³J_{HH} = 8.80 Hz, 1 H, H₃), 7.36 - 7.40 (m, 2 H, H₆), 7.58 (dd, ³J_{HH} = 8.51, 7.34 Hz, 1 H, H₇) 8.07 - 8.13 (m, 2 H, H₈) 8.35 (d, ³J_{HH} = 8.51 Hz, 1 H, H₉) 8.51 (d, ³J_{HH} = 7.34 Hz, 1 H, H₁₀) 8.75 (d, ³J_{HH} = 7.63 Hz, 1 H, H₁₁).

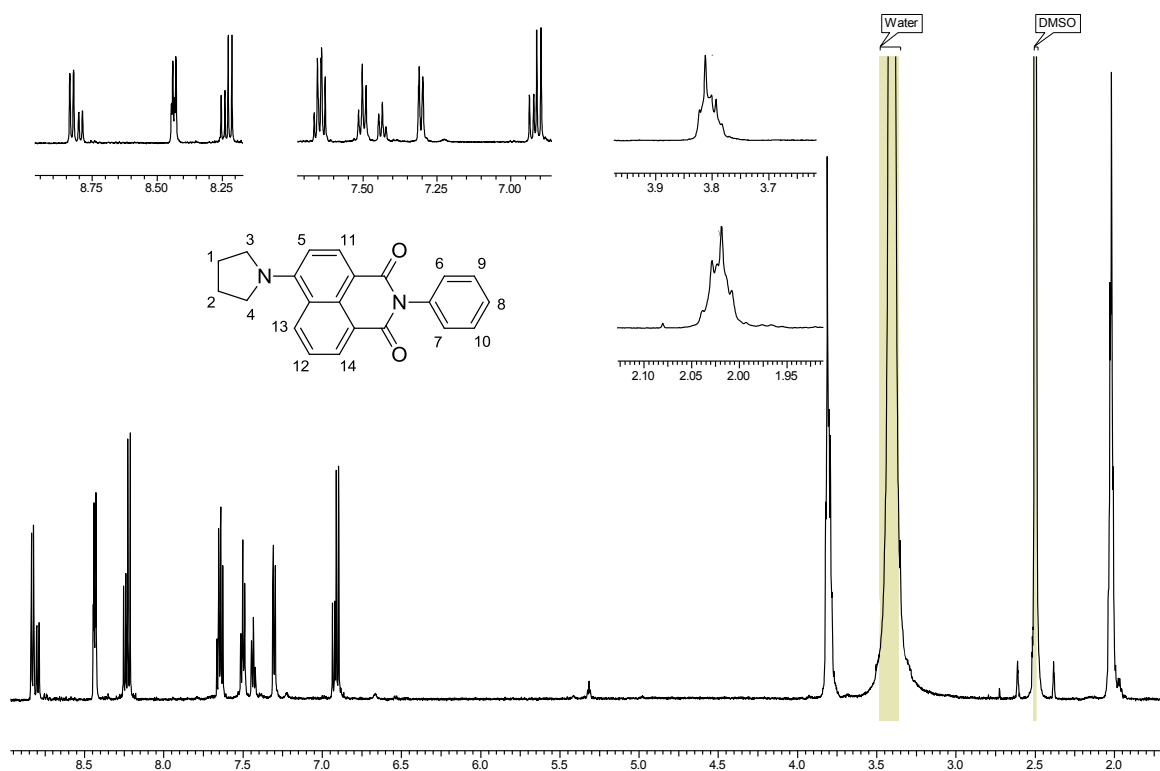
A.22 1,8-Naphthalimidobenzol (44)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm] = 7.38 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.56$ Hz, 2 H, H1), 7.50 (m, 1 H, H2), 7.56 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.80$ Hz, 2 H, H3), 7.81 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.80$ Hz, 7.80 Hz, 2 H, H4) 8.28 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.82$ Hz, 2 H, H5), 8.65 (d, $^3J_{\text{HH}} = 6.60$ Hz, 2 H, H6).

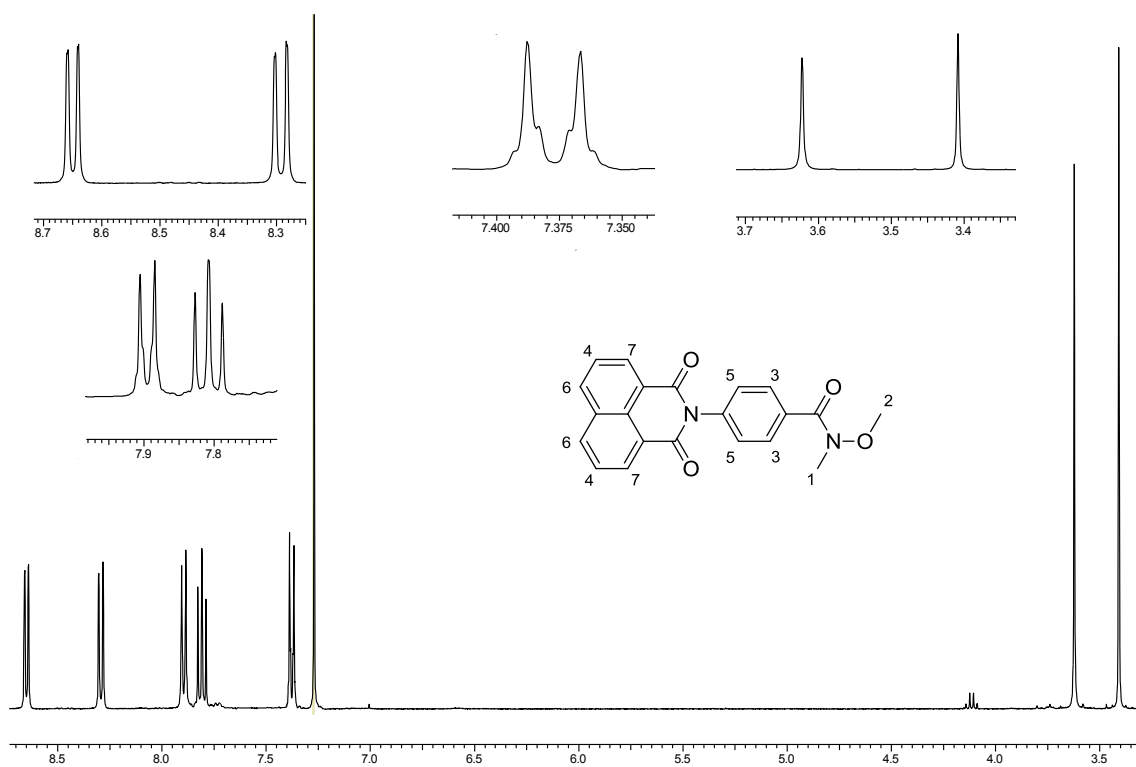
A.23 1,8-Naphthalimidobenzoessäure (45)

¹H-NMR (THF-d₈, 400 MHz): δ [ppm] = 7.41 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.56$ Hz, 2 H, H₁), 7.81 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.80$, 0.98 Hz, 2 H, H₂), 8.14 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.82$ Hz, 2 H, H₃), 8.38 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.07$ Hz, 2 H, H₄), 8.58 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.30$ Hz, 2 H, H₅).

A.24 4-Pyrrolidin-1,8-naphthalimidobenzol (46)

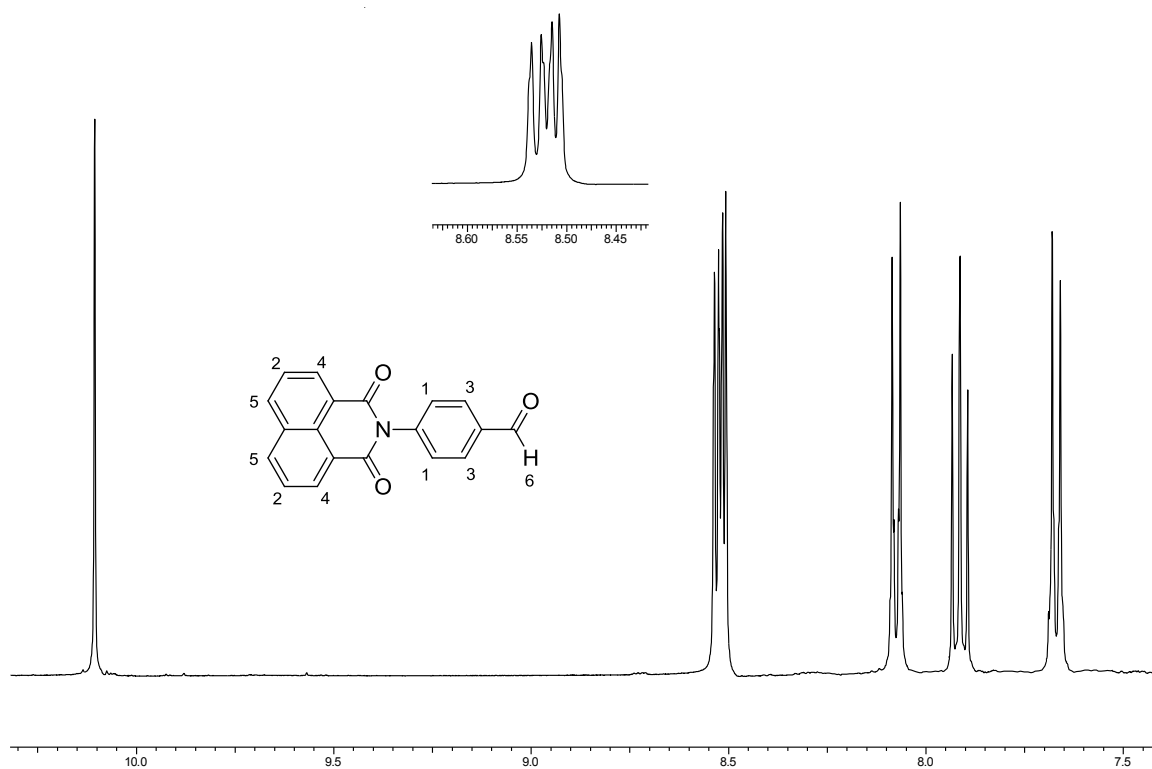


¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ [ppm] = 2.04 (m, 4 H, H_{1,2}), 3.82 (m, 4 H, H_{3,4}), 6.92 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.70$ Hz, 1 H, H₅), 7.32 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.32$ Hz, 2 H, H_{6,7}), 7.45 (m, 1 H, H₈), 7.65 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8.40$ Hz, 7.65 Hz, 2 H, H_{9,10}), 8.23 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.66$ Hz, 2 H, H₁₁), 8.45 (m, 1 H, H_{12,13}), 8.84 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.40$ Hz, 1 H, H₁₄).

A.25 1,8-Naphthalimidobenzoessäure-*N*-methoxy-*N*-methyamid (47)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm] = 3.41 (s, 3 H, H₁), 3.62 (s, 3 H, H₂), 7.38 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.56$ Hz, 2 H, H₃), 7.81 (m, 2 H, H₄), 7.89 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.31$ Hz, 2 H, H₅), 8.29 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.82$ Hz, 2 H, H₆), 8.65 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.09$ Hz, 2 H, H₇).

A.26 1,8-Naphthalimidobenzaldehyd (48)



¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ [ppm] = 7.67 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.31$ Hz, 2 H, H₁), 7.91 (m, 2 H, H₂), 8.08 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.40$ Hz, 2 H, H₃), 8.51 – 8.54 (m, 4 H, H_{4,5}), 10.1 (s, 1 H, H₆).