

**Synthese und Charakterisierung neuer
fluoreszenzmarkierter Adenosinrezeptor-Liganden
als pharmakologische Sonden**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Sabrina Gollos

aus

Siegen

Bonn 2013

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Christa E. Müller

2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Anke C. Schiedel

Tag der Promotion: 13.12.2013

Erscheinungsjahr: 2014

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulserver der ULB Bonn :

http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2007 bis Juni 2013 am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Christa E. Müller durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Christa E. Müller für das interessante und abwechslungsreiche Promotionsthema, das es mir ermöglichte die Vielseitigkeit der pharmazeutischen Forschung kennenzulernen. Zudem möchte ich ihr für ihre stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen in mich und meine Arbeit danken.

Frau Priv.-Doz. Dr. Anke Schiedel danke ich sehr herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferats. Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde und Herrn Prof. Dr. Sigurd Höger danke ich für die Mitwirkung in meiner Promotionskommission.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Graduiertenkollegs 804 „Analyse von Zellfunktionen durch kombinatorische Chemie und Biochemie“ in Form von der Kostenübernahme von Kongressbeiträgen und Reisekosten sowie der Förderung im Rahmen von vielfältigen Workshops und Graduiertentagungen.

Meinen Eltern

In Liebe und Dankbarkeit

*„Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker;
er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt.“*

(Marie Curie, 1867-1934)

1. INHALTSVERZEICHNIS

1. INHALTSVERZEICHNIS	1
2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
3. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	9
4. EINLEITUNG	13
4.1 REZEPTOREN	13
4.1.1 G-PROTEIN-GEKOPPELTE REZEPTOREN	15
4.1.2 PURINERGE REZEPTOREN	24
4.2 LIGANDEN	42
4.3 FLUORESZENZ	46
4.4 FLUORESZENZMARKIERUNG VON KLEINEN MOLEKÜLEN	50
4.4.1 FLUORESZENZMARKIERTE LIGANDEN	52
4.5 FLUORESZENZFARBSTOFFE	55
4.5.1 FLUORESCEIN	55
4.5.2 RHODAMIN-FARBSTOFFE	57
4.5.3 COUMARIN-FARBSTOFFE	58
4.5.4. ALEXA-FARBSTOFFE	59
4.5.5 QUANTUM DOTS	60
4.5.6 BODIPY-FLUOROPHORE	62
5. ZIELSETZUNG	69
6. DARSTELLUNG FUNKTIONALISierter BODIPY-DERIVATE	73
6.1 BROMALKYL-BODIPY-DERIVATE	73
6.1.1 STABILITÄTSUNTERSUCHUNGEN	76
6.2 AMINOALKYL-BODIPY-DERIVATE	81
6.3 IODALKYL-BODIPY-DERIVATE	82
6.4 THIOALKYL-BODIPY-DERIVATE	83
6.5 CARBONSÄURE-BODIPY-DERIVAT	86
6.6 WASSERLÖSLICHE BODIPY-DERIVATE	87
6.7 TERMINALES ALKEN-BODIPY-DERIVAT	89
6.8 α,β-DIBROMIERTE BODIPY-DERIVATE	90

7	<u>DARSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG FLUORESZENZMARKIERTER THIOADENOSIN-DERIVATE</u>	97
7.1	EINLEITUNG	97
7.2	SYNTHESE FLUORESZENZMARKIERTER THIOADENOSIN-DERIVATE	98
7.3	PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER FLUORESZENZMARKIERTEN THIOADENOSIN-DERIVATE	100
7.4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	109
8	<u>FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG NEUER ADENOSIN-REZEPTORLIGANDEN</u>	113
8.1.	EINLEITUNG	113
8.2	KOMPETITIVE RADIOLIGAND-REZEPTOR-BINDUNGSSTUDIEN AN A ₁ -, A _{2A} - UND A ₃ -ADENOSIN-REZEPTOREN: ANALYSE DER STRUKTURWIRKUNGSBEZIEHUNGEN	115
8.3	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	156
9.	<u>CHARAKTERISIERUNG VON 1H-PURIN-6,8-DIONEN UND 8H-PURIN-8-ONEN ALS NEUE ADENOSIN-REZEPTOR-LIGANDEN</u>	161
9.1	EINLEITUNG	161
9.2	KOMPETITIVE RADIOLIGAND-REZEPTOR-BINDUNGSSTUDIEN AN ADENOSIN A _{2B} - UND A ₃ -REZEPTOREN: ANALYSE DER STRUKTURWIRKUNGSBEZIEHUNGEN	162
9.3	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	169
10.	<u>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</u>	173
11	<u>EXPERIMENTELLER TEIL</u>	181
11.1	CHEMIKALIEN UND GERÄTE BEI DER SYNTHESE VON FLUORESZIERENDEN PURINREZEPTORLIGANDEN	181
11.2	CHEMIKALIEN UND GERÄTE BEI DER TESTUNG VON PURINREZEPTORLIGANDEN	185
11.2.1	GERÄTE UND MATERIALIEN	185
11.2.2	SUBSTANZEN UND REAGENZIEN	187
11.2.3.	RADIOLIGANDEN	188
11.2.4.	ZELLKULTURBEDARF UND NÄHRMEDIEN	189
11.2.5.	KULTIVIERTE ZELLINIEN	189
11.3	PUFFERLÖSUNGEN	190
11.4	VERWENDETE NÄHRMEDIEN	191
11.5	SYNTHESEN	193
11.6	FLUORESZENZQUANTENAUSBEUTE	277
11.7	ZELLKULTUR	279
11.7.1	AUFTAUEN VON ZELLEN	279
11.7.2	ZELLKULTUR	279

11.7.3	MEMBRANPRÄPARATION VON CHO-ZELLEN	281
11.7.4	MEMBRANPRÄPARATION VON RATTENCORTEX	281
11.7.5	MEMBRANPRÄPARATION VON RATTENSTRIATUM	282
11.8	PROTEINBESTIMMUNG	283
11.8.1	PROTEINBESTIMMUNG NACH LOWRY	283
11.8.2	PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD	286
11.9	RADIOLIGAND-BINDUNGSSTUDIEN AN ADENOSIN-REZEPTOREN	287
11.10	FUNKTIONELLE STUDIEN AN ADENOSIN-REZEPTOREN	292
12.	LITERATUR	295
13.	DANKSAGUNG	313

2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintri-phosphat
AR	Adenosinrezeptor
Bn	Benzyl
BODIPY	4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen
Bu	Butyl
br	breites Singulett
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCPA	N ⁶ -Cyclopentyl-2-chloradenosin
CGS21680	3-[4-[2-[6-Amino-9-[(2R,3R,4S,5S)-5-(ethylcarbamoyl)-3,4-dihydroxy-oxolan-2-yl]purin-2-yl]amino]ethyl]phenyl]propansäure
CHO-Zellen	chinesische Hamster-Ovarzellen
CREP	cAMP responsive element binding protein
d	Dublett
DAG	Diacylglycerol
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Dublett von Dubletts
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dq	Dublett von Quartetts
EDC	<i>N</i> -(Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> '-ethylcarbodiimid-HCl
ERK	extracellular-signal regulated kinase
eq	Äquivalente
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
FRET	Fluorescence resonance energy transport
FCS	Fluorescence correlation spectroscopy
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
hA ₁	humaner A ₁ -Adenosinrezeptor
hA _{2A}	humaner A _{2A} -Adenosinrezeptor
hA _{2B}	humaner A _{2B} -Adenosinrezeptor
hA ₃	humaner A ₃ -Adenosinrezeptor
HCTU	2-(7-Aza-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium
HEK-Zellen	humane embryonale Nierenzellen
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie

Hz	Hertz
m	Multipllett
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
MAPKinase	Mitogen-aktivierte-Protein Kinasen
Me	Methyl
MHz	Megahertz
MS	Massenspektrometrie
MSX-2	3-(3-Hydroxypropyl)-7-methyl-8-(<i>m</i> -methoxystyryl)-1-propargylxanthin
m/z	Verhältnis Masse/Ladung
NECA	5'- <i>N</i> -Ethylcarboxamidoadenosine
NMR	Nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanz)
PKB	Protein Kinase B
PSB-11	2-Phenyl-8-ethyl-4-methyl-(8R)-4,5,7,8-tetrahydro-1 <i>H</i> -imidazo-[2,1- <i>i</i>]purin-5-on
PSB-603	8-[4-[4-(4-Chlorophenyl)piperazide-1-sulfonyl]phenyl]-1-propylxanthin
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat
R	organischer Rest
rA ₁	Ratten-A ₁ -Adenosinrezeptor
rA _{2A}	Ratten-A _{2A} -Adenosinrezeptor
rA _{2B}	Ratten-A _{2B} -Adenosinrezeptor
rA ₃	Ratten-A ₃ -Adenosinrezeptor
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RP-HPLC	reverse phase high pressure liquid chromatography

RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Schmp.	Schmelzpunkt
stöch.	Stöchiometrisch
t	Triplet
Tab.	Tabelle
TEA	Triethylamin
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular endothelial growth factor
YFP	gelb fluoreszierendes Protein
Zers.	Zersetzung

3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABB. 1 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES G-PROTEIN-GEKOPPELTEN REZEPTORS DER KLASSE A	15
ABB. 2 ZYKLUS DER AKTIVIERUNG UND INAKTIVIERUNG EINES G-PROTEIN GEKOPPELTEN REZEPTORS	18
ABB. 3 SIGNALTRANSDUKTION BEI G _s -GEKOPPELTEN REZEPTOREN	20
ABB. 4 SIGNALTRANSDUKTION BEI G _{i/o} -GEKOPPELTEN REZEPTOREN	21
ABB. 5 SIGNALTRANSDUKTION BEI G _q -GEKOPPELTEN REZEPTOREN	22
ABB. 6 REGULATION DER ERK-MAP-KINASE AKTIVITÄT AUSGELÖST DURCH GPCR-AKTIVIERUNG	23
ABB. 7 KLASSIFIZIERUNG DER PURINERGEN REZEPTOREN	24
ABB. 8 BEISPIELE A ₁ -AR-SELEKTIVER AGONISTEN	27
ABB. 9 AUSWAHL A ₁ -AR SELEKTIVER ANTAGONISTEN	28
ABB. 10 BEISPIELE SELEKTIVER A _{2A} -AR AGONISTEN	29
ABB. 11 BEISPIELE EINIGER SELEKTIVER A _{2A} -AR ANTAGONISTEN	30
ABB. 12 A _{2A} -ANTAGONIST ZM241385	31
ABB. 13 KRISTALLSTRUKTUR DES HUMANEN A _{2A} -T4L-DC-REZEPTORS	31
ABB. 14 AMINOSÄUREN IN EINEM ABSTAND VON 5 Å ZU DEM AN DEN HUMANEN A _{2A} -REZEPTOR GEBUNDENEN ZM241385	32
ABB. 15 A _{2A} -AGONIST UK-432097	33
ABB. 16 LIGAND UK-432097 IN DER BINDUNGSTASCHE DES HUMANEN A _{2A} -ADENOSINREZEPTORS	33
ABB. 17 VERGLEICH DER KRISTALLSTRUKTUREN DES A _{2A} -T4L REZEPTORS GEBUNDEN AN ZM241385 MIT DEM A _{2A} -GL31 REZEPTOR GEBUNDEN AN NECA	34
ABB. 18 VERGLEICH DER REZEPTOR-LIGAND WECHSELWIRKUNGEN FÜR DEN A _{2A} -AR GEBUNDEN AN DEN INVERSEN AGONISTEN ZM241385(LINKS), UND DIE AGONISTEN NECA UND ADENOSIN	35
ABB. 19 KONFORMATIONS UND STRUKTURELLE ÄNDERUNGEN DER TRANSMEMBRANÄREN HELICES VERURSACHT DURCH AGONISTISCHE BINDUNG	36
ABB. 20 BEISPIELE EINIGER SELEKTIVER A _{2B} -AR ANTAGONISTEN	38
ABB. 21 BEISPIEL EINES SELEKTIVEN A _{2B} -AR AGONISTEN	39
ABB. 22 BEISPIELE EINIGER SELEKTIVER A ₃ -AR AGONISTEN	40
ABB. 23 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES SIGNALÜBERTRAGUNGSWEGES NACH AKTIVIERUNG DES A ₃ -REZEPTORS	41
ABB. 24 BEISPIELE SELEKTIVER A ₃ -AR ANTAGONISTEN	42
ABB. 25 ZWEI-ZUSTÄNDE-MODELL EINES REZEPTORS	43
ABB. 26 JABLONSKI-DIAGRAMM FÜR ORGANISCHE FARBSTOFFMOLEKÜLE	46
ABB. 27 MECHANISMUS DER PRÄDISSOZIATION	49
ABB. 28 STRUKTUREN FLUORESCENZMARKIERTER A ₁ -AGONISTEN VON MIDDELTON <i>ET AL</i>	53
ABB. 29 FLUORESCIEIN UND SEINE DERIVATE	55
ABB. 30 RHODAMIN-FLUORESCENZFARBSTOFFE	57
ABB. 31 COUMARIN-FARBSTOFFE	58
ABB. 32 ALEXA-FLUORESCENZFARBSTOFFE	60
ABB. 33 STRUKTUR EINES MULTIFUNKTIONALEN QUANTUM DOTS MIT COPOLYMERSCHICHT BESTEHEND AUS TOPO UND VERSCHIEDENEN LIGANDEN FÜR DIE WECHSELWIRKUNG MIT DEM TARGET	60
ABB. 34 SCHEMATISCHES ENERGIEBÄNDERMODELL EINES ISOLATORS, HALBLEITERS UND LEITERS	61
ABB. 35 BODIPY-GRUNDGERÜST	62
ABB. 36 PYRROL-AUSTAUSCHREAKTION NACH TREIBS <i>ET AL</i>	64
ABB. 37 DARSTELLUNG DES BODIPY-GRUNDGERÜSTES NACH TREIBS UND KREUTZER	65
ABB. 38 DARSTELLUNG DES BODIPY GRUNDGERÜSTES NACH HAUGHLAND	65
ABB. 39 C- BZW. E-BODIPY DERIVATE MIT VERGRÖßERTEM STOKES-SHIFT	66
ABB. 40 BEISPIELE FÜR O-BODIPY-DERIVATE	67
ABB. 41 BODIPY-GRUNDGERÜST MIT DEN ZU MODIFIZIERENDEN RESTEN R ¹ UND R ²	69

ABB. 42 LEITSTRUKTUR FÜR DIE ENTWICKLUNG POTENTER UND SELEKTIVER A _{2A} -ADENOSINREZEPTOR AGONISTEN.....	70
ABB. 43 2-PHENYLPURIN-6,8-DION-GRUNDGERÜST MIT DEN ZU MODIFIZIERENDEN RESTEN R ¹ , R ² UND R ³	71
ABB. 44 SYNTHES DER BROMALKYL- BODIPY-DERIVATE	73
ABB. 45 NEBENPRODUKTE BEI DER DARSTELLUNG DER BROMALKYL-BODIPY-DERIVATE.....	74
ABB. 46 ABSORPTIONSSPEKTREN DER VERBINDUNGEN 3 - 8.....	75
ABB. 47 EMISSIONSSPEKTREN DER VERBINDUNGEN 3 - 8.....	76
ABB. 48 BODIPY-DERIVATE DER VON YANG ET AL. DURCHFÜHRTE STABILITÄTSUNTERSUCHUNG.....	77
ABB. 49 ZERSETZUNG EINES 4,4-DIMETHOXY-BODIPY DERIVAT NACH YANG ET AL.	77
ABB. 50 LC/ESI-MS-SPEKTREN UND UV-ABSORPTION (254 NM) DER REFERENZSUBSTANZ 5.....	78
ABB. 51 ZERSETZUNG VON VERBINDUNG 5 UNTER SAUREN BEDINGUNGEN.....	79
ABB. 52 LC/ESI-MS-SPEKTREN UND UV-ABSORPTION DES ZERSETZUNGSPRODUKTS VON 5.....	80
ABB. 53 SYNTHES DER AMINOALKYL- BODIPY-DERIVATE.....	82
ABB. 54 SYNTHES DER IODALKYL-BODIPY-DERIVATE.....	83
ABB. 55 SYNTHES DES THIOALKYL-BODIPY-DERIVATE 29 NACH METHODE A.....	84
ABB. 56 SYNTHES DER THIOALKYL-BODIPY-DERIVATE NACH METHODE B	85
ABB. 57 NEBENPRODUKT 36.....	85
ABB. 58 SYNTHES DES CARBOXYLALKYL-BODIPY-DERIVATS 37 NACH LI ET AL.	86
ABB. 59: MONOSULFONIERUNG NACH WORRIES ET AL.	87
ABB. 60 SYNTHES DER WASSERLÖSLICHEN BROMALKYL-BODIPY-DERIVATE.....	88
ABB. 61 NEBENPRODUKT 42A.....	88
ABB. 62 SYNTHES DES WASSERLÖSLICHEN AMINOALKYL-BODIPY-DERIVAT 44.....	88
ABB. 63 DARSTELLUNG DES BODIPY-DERIVATS 46.....	90
ABB. 64 CISPLATIN UND OXALIPLATIN.....	90
ABB. 65 BODIPY-DERIVAT MIT α,β -DIAMINOFUNKTIONALITÄT	91
ABB. 66 SYNTHES DES 3,4-DIBROMPENTANSÄURECHLORIDS	91
ABB. 67 SYNTHES DES BODIPY-DERIVATS 50.....	93
ABB. 68 NEBENPRODUKT 51.....	93
ABB. 69 SYNTHES DES EPOXID-BODIPY-DERIVATS.....	94
ABB. 70 SYNTHES DES DIOL-BODIPY-DERIVATS 53.....	94
ABB. 71 SYNTHES DES DIAZID-BODIPY-DERIVATS 54.....	94
ABB. 72 SYNTHES DER FLUORESZIERENDEN THIOADENOSIN-DERIVATE.....	98
ABB. 73 ABSORPTIONSSPEKTREN DER VERBINDUNGEN 56-60.....	99
ABB. 74 EMISSIONSSPEKTREN DER VERBINDUNGEN 56-60.....	100
ABB. 75 KOMPETITIONSKURVEN DER VERBINDUNGEN 56-60 AN A ₁ -ADENOSINREZEPTOREN GEGEN 1 nM [³ H]CCPA.....	102
ABB. 76 KOMPETITIONSKURVEN DER VERBINDUNGEN 56-60 GEGEN 1 nM [³ H]CCPA AN REKOMBINANTEN CHO-ZELLMEMBRANEN, DIE DEN HUMANEN A ₁ -REZEPTOR EXPRIEREN	103
ABB. 77 KOMPETITIONSKURVEN DER VERBINDUNGEN 56-60 AN A _{2A} -ADENOSINREZEPTOREN GEGEN 5 nM [³ H]CGS21680.....	103
ABB. 78 KOMPETITIONSKURVEN DER VERBINDUNGEN 56-60 AN REKOMBINANTEN CHO-ZELLMEMBRANEN, DIE DEN HUMANEN A _{2A} -REZEPTOR EXPRIEREN GEGEN 5 nM [³ H]CGS21680.....	104
ABB. 79 KOMPETITIONSKURVEN DER VERBINDUNGEN 56-60 AN REKOMBINANTEN CHO-ZELLMEMBRANEN, DIE DEN RATTEN A ₃ -REZEPTOR EXPRIEREN, GEGEN 10 nM [³ H]NECA.....	105
ABB. 80 KOMPETITIONSKURVEN DER VERBINDUNGEN 56-60 AN REKOMBINANTEN CHO-ZELLMEMBRANEN, DIE DEN HUMANEN A ₃ -REZEPTOR EXPRIEREN GEGEN 10 nM [³ H]NECA.....	105
ABB. 81 VERGLEICH DER pK _i -WERTE DER GETESTETEN FLUORESZENZMARKIERTEN 2-THIOADENOSIN- DERIVATE AN HUMANEN UND RATTEN-A ₁ -ADENOSINREZEPTOREN (A) UND AN HUMANEN UND RATTEN A _{2A} -ADENOSINREZEPTOREN (B).....	106
ABB. 82 VERGLEICH DER pK _i -WERTE DER GETESTETEN FLUORESZENZMARKIERTEN 2-THIOADENOSIN- DERIVATE AM HUMANEN UND RATTEN-A ₃ -ADENOSINREZEPTOREN.....	107

ABB. 83 DURCH TESTVERBINDUNGEN 56-60 INDUZIERTER CAMP- AKKUMULATION IN CHO-ZELLEN, DIE DEN HUMANEN A _{2A} -ADENOSINREZEPTOR EXPRIEMIEREN, IM VERGLEICH ZUM VOLLAGONISTEN NECA.....	107
ABB. 84 DURCH DIE TESTVERBINDUNGEN 56-60 INDUZIERTER REDUKTION DER FORSKOLIN-ABHÄNGIGEN CAMP- AKKUMULATION IN CHO-ZELLEN, DIE DEN HUMANEN A ₃ -ADENOSINREZEPTOR EXPRIEMIEREN, IM VERGLEICH ZUM VOLLAGONISTEN NECA.....	108
ABB. 85 FLUORESZENZMARKIERTE 2-THIOADENOSIN-DERIVATE ALS NEUE PHARMAKOLOGISCHE TOOLS FÜR DIE CHARAKTERISIERUNG VON ADENOSINREZEPTOREN.....	109
ABB. 86 LEITSTRUKTUR FÜR DIE ENTWICKLUNG POTENTER UND SELEKTIVER A _{2A} -ADENOSINREZEPTOR-AGONISTEN.....	113
ABB. 87 STRUKTURFORMEL DER LEITSTRUKTUR 55.....	115
ABB. 88 KOMPETITIONSKURVEN DER VERBINDUNGEN 73, 74 UND 75 (PSB-0777) AN A _{2A} -ADENOSINREZEPTOREN GEGEN 5 nM [³ H]CGS21680.....	127
ABB. 89 KOMPETITIONSKURVEN DER VERBINDUNGEN 79, 80, 81 UND 82 (A) AN A ₁ -ADENOSINREZEPTOREN GEGEN 1 nM [³ H]CCPA AN RATTENCORTEX UND (B) AN A _{2A} -ADENOSINREZEPTOREN GEGEN 5 nM [³ H]CGS21680 AN RATTENSTRIATUM.....	128
ABB. 90 KOMPETITIONSKURVEN DER VERBINDUNGEN 91, 93 UND 94 AN A _{2A} -ADENOSINREZEPTOREN GEGEN 5 nM [³ H]CGS21680.....	130
ABB. 91 KOMPETITIONSKURVEN DER VERBINDUNGEN 99, 100, 101, 102 UND 103 (A) AN A ₁ -ADENOSINREZEPTOREN GEGEN 1 nM [³ H]CCPA AN RATTENCORTEX UND (B) AN A _{2A} -ADENOSINREZEPTOREN GEGEN 5 nM [³ H]CGS21680.....	130
ABB. 92 STRUKTURWIRKUNGSBEZIEHUNGEN DER ADENOSIN-DERIVATE 55-108.....	131
ABB. 93 KOMPETITIONSKURVEN DER VERBINDUNGEN 113, 116 UND 117 AN A _{2A} -ADENOSINREZEPTOREN GEGEN 5 nM [³ H]CGS21680.....	139
ABB. 94 KOMPETITIONSKURVEN DER VERBINDUNGEN 131, 132, 135 UND NECA IN CAMP-AKKUMULATIONSEXPERIMENTEN IN STABIL MIT DEM HUMANEN A _{2A} -REZEPTOR-TRANSFIZIERTEN CHO-ZELLEN.....	141
ABB. 95 STRUKTURWIRKUNGSBEZIEHUNGEN DER ADENOSIN-DERIVATE 109-142.....	143
ABB. 96 KOMPETITIONSKURVEN DER VERBINDUNGEN 147, 113 (BINODENOSON) AN A _{2A} -ADENOSINREZEPTOREN GEGEN 5 nM [³ H]CGS21680.....	148
ABB. 97 KOMPETITIONSKURVEN VON NECA UND VERBINDUNG 147 IN CAMP-AKKUMULATIONSEXPERIMENTEN IN STABIL MIT DEM HUMANEN A _{2A} -REZEPTOR-TRANSFIZIERTEN CHO-ZELLEN.....	149
ABB. 98 KOMPETITIONSKURVEN DER VERBINDUNGEN 153 UND 159 AN A _{2A} -ADENOSINREZEPTOREN GEGEN 5 nM [³ H]CGS21680.....	154
ABB. 99 STRUKTURWIRKUNGSBEZIEHUNGEN DER ADENOSIN-DERIVATE 153-159.....	155
ABB. 100 ADENOSINDERIVATE MIT SUBSTITUTION IN POSITION 2 ALS NEUE A ₁ - BZW. A _{2A} -ADENSOSINREZEPTORLIGANDEN.....	157
ABB. 101 ADENOSINDERIVATE MIT SUBSTITUTION IN POSITION 2 ALS NEUE A _{2A} - BZW. A ₃ -ADENSOSINREZEPTORLIGANDEN.....	159
ABB. 102 ZUSAMMENFASSENDE STRUKTUR-WIRKUNGSBEZIEHUNG DER ADENOSIN-DERIVATE 61 - 159.....	160
ABB. 103 GRUNDGERÜST DER 1 <i>H</i> -PURIN-6,8-DION- UND DER 8 <i>H</i> -PURIN-8-ON-DERIVATE.....	161
ABB. 104 KOMPETITIONSKURVEN DER VERBINDUNGEN 168, 174 UND 176 GEGEN 1 nM [³ H]PSB-11 AN REKOMBINANTEN CHO-ZELLEN, DIE DEN HUMANEN A ₃ -ADENOSINREZEPTOR EXPRIEMIEREN.....	168
ABB. 105 STRUKTUREN DER HOCHPOTENTEN UND SELEKTIVEN A ₃ -ADENOSINREZEPTORLIGANDEN 168, 174 UND 176.....	170
ABB. 106 DIE IN DIESER ARBEIT DARGESTELLTEN FUNKTIONALISIERTEN ALKYL-BODIPY-DERIVATE.....	173
ABB. 107 FLUORESZENZMARKIERTE-ADENOSIN-DERIVATE MIT UNTERSCHIEDLICHEN LINKERLÄNGEN.....	174
ABB. 108 POTENTESTE VERBINDUNGEN DER SERIE AM A _{2A} -UND A ₃ -ADENOSINREZEPTORLIGAND.....	177
ABB. 109 HOCHPOTENTE UND SELECTIVE A ₃ -ADENOSINREZEPTOR ANTAGONISTEN.....	179
ABB. 110 NEUBAUER HÄMAZYTOMETER.....	280

4 EINLEITUNG

Nach Veröffentlichung des menschlichen Genoms im Jahr 2001¹ wurde intensiv daran gearbeitet, ein besseres Verständnis über die komplexe Regulation und das Zusammenspiel der Proteine innerhalb der Zelle zu erlangen.² Die anfängliche Euphorie, aufgrund der nun bekannten DNA-Sequenz schnelle Erkenntnisse über die Funktion von Proteinen zu gewinnen, wurde durch die Einsicht getrübt, dass Proteine mehr als eine Funktion ausüben können. Dies stellt zweifelsfrei eine große Herausforderung dar, die bis zum heutigen Tag nicht vollständig bewältigt wurde. Aber gerade die Kenntnis über die Funktionsweise der Proteine und ihre Regulation kann die Ursachen für Krankheiten und damit auch mögliche Therapieoptionen bei deren Fehlfunktion aufzeigen. Das 1000-Genom-Projekt wurde 2008 ins Leben gerufen, um die genetischen Ursachen verschiedener Erkrankungen zu untersuchen. Ende 2012 konnte das Genom von sogar schon 1092 Individuen, die 14 Populationen entstammen, sequenziert und veröffentlicht werden.³ Zukünftig soll das Genom von 1500 weiteren Individuen aus 14 Populationen sequenziert werden, um dann das gesamte Spektrum der humanen genetischen Variationen zu erhalten und anhand der erhaltenen Daten Rückschlüsse auf die genetischen Ursachen für bestimmte Erkrankungen ziehen zu können. Damit stellt sich auch ein Jahrzehnt nach Beendigung des humanen Genomprojekts immer noch die Herausforderung, nichts Geringeres als das Leben im Kleinsten zu verstehen.

4.1 Rezeptoren

Die Wirkung eines Arzneimittels wird häufig durch eine spezifische Interaktion des Arzneistoffs mit einer Zielstruktur in einem Organismus hervorgerufen. Diese Zielstrukturen stellen häufig Enzyme, Transporter, spannungsabhängige Ionenkanäle und Rezeptorproteine dar. Rezeptorproteine sind intrazellulär oder membranständig lokalisierte Proteine bzw. aus mehreren Proteinen zusammengesetzte Komplexe, die nach Bindung eines physiologischen Liganden an eine spezifische Bindungsstelle entweder direkt oder indirekt durch eine Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion einen Effekt hervorrufen können.⁴

Membranständige Rezeptoren können unterteilt werden in:

- Rezeptorproteinkinasen (Enzym-assoziierte Rezeptoren)
- Ligand-gesteuerte Ionenkanäle
- G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

Enzym-assoziierte Rezeptoren sind dadurch gekennzeichnet, dass nach Bindung eines Liganden, an der extrazellulären Bindungsstelle ein intrazelluläres Enzym aktiviert wird. Zu dieser Gruppe gehören Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität, Rezeptoren mit assoziierten Tyrosinkinasen, Rezeptoren mit Guanylatcyclase-Aktivität und Rezeptor-Serin- /Threonin-Kinasen.

Ligand-gesteuerte Ionenkanäle bestehen aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzter transmembranärer Proteine und können im Gegensatz zu spannungsabhängigen Ionenkanälen durch die spezifische Bindung eines Liganden geöffnet oder geschlossen werden. Aufgrund der Ionen-selektiven Permeabilität können nur bestimmte Ionen hindurchtreten. Man unterscheidet daher Natrium-, Kalium-, Calcium- und Chlorid-Kanäle. Die treibende Kraft des Ioneneinstroms bzw. -ausstroms ist der vorherrschende Konzentrationsgradient zwischen Extrazellular- und Intrazellularraum. Als Beispiele für ionotrope Rezeptoren können P2X-, GABA_A-, ionotrope Glutamat-, Glycin-, 5-HT₃- und nicotinische Acetylcholin-Rezeptoren aufgeführt werden.⁴

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) stellen die größte Gruppe der membranständigen Rezeptoren dar und weisen außerdem eine außerordentliche Diversität auf. GPCR besitzen sieben transmembranäre Domänen und sind intrazellulär an ein Guanin-Nucleotid-bindendes Protein (G-Protein) gekoppelt. Die Signalkaskade wird durch die Bindung eines Liganden an die Bindungsstelle des Rezeptors ausgelöst. Zu den G-Protein-gekoppelten Proteinen gehören unter anderem Adenosin-, P2Y-, Dopamin, adrenerge-, GABA_B-, Histamin-, Muscarin-, Opioid-, und Serotonin-Rezeptoren.^{4,5}

Da im Rahmen dieser Arbeit Liganden für Rezeptoren entwickelt werden sollten, die der Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zuzuordnen sind, wird nachfolgend auf diese Klasse weiter eingegangen.

4.1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Im Rahmen des humanen Genom-Projekts wurden ca. 20.000 bis 25.000 Gene gefunden, die verschiedene Proteine codieren.⁶ Von diesen Genen wurden bislang 800 bis 1000 identifiziert, die G-Protein-gekoppelte Rezeptoren exprimieren.^{7, 8} G-Protein-gekoppelte Proteine stellen damit eine der größten Proteinfamilien im Säugetiergenom dar.⁹ Wie bereits in Kapitel 4.1 erwähnt, besitzen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sieben transmembranäre Domänen, die aus je 25 bis 35 Aminosäuren bestehen (s. Abb. 1). Der Name „G-Protein-gekoppelter Rezeptor“ basiert auf der Interaktion mit einem Guanin-Nucleotid-bindenden Kopplungsprotein (G-Protein). Außerdem weisen G-Protein-gekoppelte Proteine je drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen, einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus auf.⁵

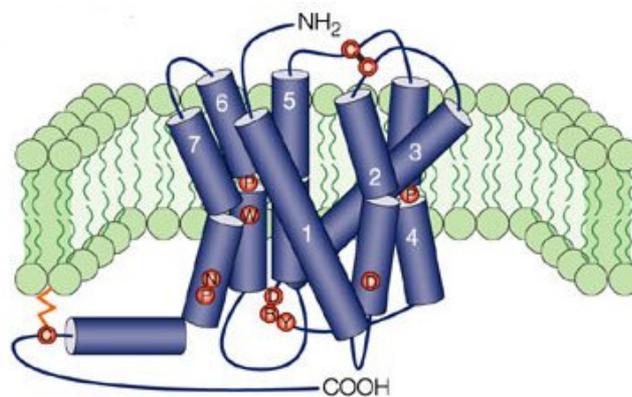


Abb. 1 Schematische Darstellung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors der Klasse A.¹⁰

Biogene Amine, Purine, Lipide, Peptide oder Proteine, Geruchsstoffe, Calciumionen, Protonen und sogar Photonen wurden bereits als Liganden für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren identifiziert.¹¹ Mit der Verleihung des Nobelpreises im Jahr 2012 an R. Lefkowitz und B. Kobilka wurde die Bedeutung dieser Rezeptorklasse für die Entwicklung neuer Arzneimittel hervorgehoben.

Die erste Röntgenkristallstruktur eines GPCR war die des Rinderrhodopsins in der inaktiven Konformation zusammen mit 11-*cis*-Retinal und wurde 2000 von Palczewski *et al.* veröffentlicht.¹² Röntgenkristallstrukturen von GPCR liefern entscheidende Informationen über die Bindungstasche und die räumliche Konformation des Rezeptors und können damit ein wertvolles Mittel bei der Suche nach neuartigen Liganden sein.

Mittlerweile wurden 72 weitere Kristallstrukturen¹³ von 15 GPCRs veröffentlicht. Darunter finden sich unter anderem die des adrenergen β_1 ¹⁴- und β_2 -Rezeptors,^{15, 16} des Dopamin-D₃-Rezeptors,¹⁷ des Histamin-H₁-Rezeptors¹⁸ und des Muskarin-M₂-¹⁹ und M₃-Rezeptors¹⁹. Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Adenosinrezeptoren sind insbesondere die Röntgenkristallstrukturen des humanen A_{2A}-Rezeptors interessant.²⁰ Auf diese wird eingehend in Kap. 4.1.2.1.2 eingegangen.

4.1.1.1 KLASSIFIZIERUNG

Obgleich alle GPCR sieben transmembranäre Helices aufweisen und an ein G-Protein gekoppelt sind, unterscheiden sie sich in ihrer Gensequenz beträchtlich. Aufgrund der daraus resultierenden unterschiedlichen strukturellen und funktionellen Eigenschaften teilten Attwood und Findlay²¹ und Kolakowski²² die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in die Klassen A bis F ein (A-F-System). Zur Klasse A der GPCR werden die Rhodopsin-verwandten Rezeptoren gerechnet zu denen auch die Adenosinrezeptoren gehören (s. Kapitel 4.1.2.1). Klasse B beinhaltet Glycoproteinrezeptoren, die auch als „Secretin-ähnliche Rezeptoren“ bezeichnet werden, da diese durch große Peptid-Moleküle, wie beispielsweise Secretin oder Glucagon, aktiviert werden. Die metabotropen Glutamatrezeptoren werden zur Klasse C gerechnet. Die Rezeptoren der Klassen D und E kommen nicht in Wirbeltieren vor, sondern fungieren als Pheromon-Rezeptoren in Hefen bzw. als cAMP-Rezeptoren in Nematoden. Die Klasse F beinhaltet Rhodopsine von Archaeobakterien und spielt eine eher untergeordnete Rolle.²³

Während das A-F-System die GPCR aufgrund der funktionellen und strukturellen Eigenschaften einteilt, führten Fredriksson et al. 2003 das sog. GRAFS- oder Fredriksson-System ein, das auf den phylogenetischen Merkmalen beruht.²⁴ Dazu werden die Rezeptoren in 5 Gruppen einsortiert. Glutamat-, Rhodopsin-, Adhäsions-, Frizzled/Taste2- und Secretin-Rezeptoren. Der Familie von Glutamatrezeptoren gehören 15 Rezeptoren an, deren Ligandenerkennungsdomäne am 280 bis 580 Aminosäuren langen N-Terminus liegt. Dazu werden acht metabotrope Glutamat- und zwei GABA_B-Rezeptoren gerechnet. Die Rhodopsin-Familie umfasst insgesamt 701 Rezeptoren, wovon 241 nicht-olfaktorische Rezeptoren darstellen. Damit ist diese Familie die mit Abstand größte Klasse. Den meisten Rezeptoren dieser Klasse gemein ist das sog. „DRY“- (oder „ERY“-) Motiv, das eine

konservierte Aminosäuresequenz zwischen der zweiten intrazellulären Schleife und der dritten transmembranären Helix darstellt. Seit Veröffentlichung der Röntgenstrukturanalyse des A_{2A}-Adenosinrezeptors ist bekannt, dass die Ligandenbindung dieser Familie entgegen früherer Vermutungen unter Beteiligung der extrazellulären Schleifen bzw. des N-Terminus erfolgt.²⁰

Aufgrund phylogenetischer Untersuchungen wird die Klasse der Rhodopsine weiter unterteilt in die Unterfamilien α , β , γ und δ . Der Unterfamilie α gehören 89 Rezeptoren an. Darunter sind beispielsweise Prostaglandinrezeptoren, Rezeptoren für biogene Amine wie Serotonin-, Dopamin-, muscarinische-, Histamin- und adrenerge Rezeptoren, und Melatonin-Rezeptoren. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Adenosinrezeptoren gehören dieser Unterfamilie an. Die Familie der β -Rezeptoren umfasst 35 Rezeptoren. Allen Rezeptoren dieser Gruppe ist gemein, dass sie durch Peptide aktiviert werden. Tachykinin, Neurotensin und einige Releasing Hormone wurden als Liganden identifiziert. Die Gruppe der γ -Unterfamilie weist 59 Rezeptoren auf. Zu dieser Klasse werden die Opioid-, Somatostatin-, Chemokin- und Angiotensinrezeptoren gezählt. Die δ -Unterfamilie beinhaltet 58 Rezeptoren und geschätzte 460 olfaktorische Rezeptoren. Die Hauptgruppen der δ -Familie sind die MRG- („MAS related gene“), die Glycoprotein-, die Purin-, die olfaktorischen Rezeptoren und eine große Zahl an sogenannten „Orphan“-Rezeptoren. Letztere sind Rezeptoren, die eine ähnliche Struktur wie bereits identifizierte Rezeptoren aufweisen, deren endogener Ligand allerdings bislang nicht bekannt ist.

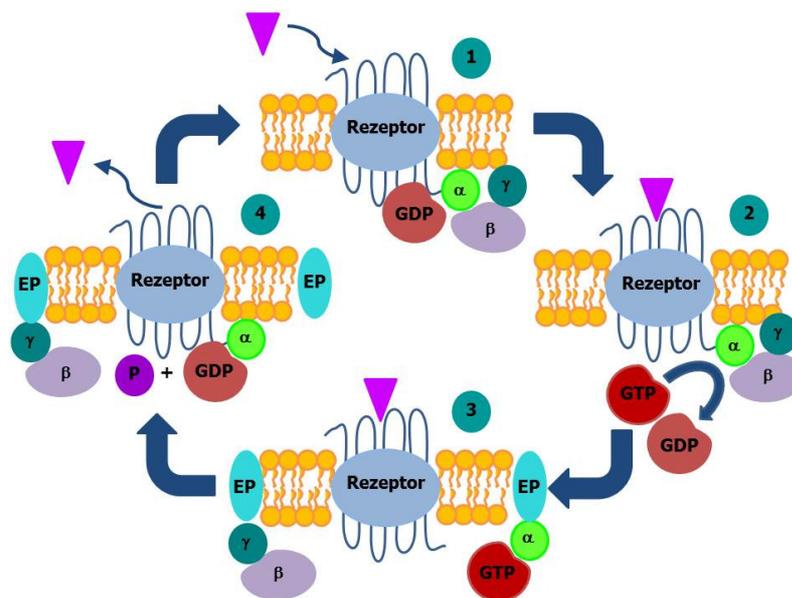
Die Gruppe der Adhäsionsrezeptoren besteht aus 24 Rezeptoren, deren N-Terminus in der Länge variieren kann (zwischen 200 und 2800 Aminosäuren lang) und Adhäsionssequenzen aufweist. Diese Sequenzen sind meist stark glycosyliert oder weisen Cystein-reiche Motive auf.²⁵

Die Familie der Frizzled/Taste2-Rezeptoren beinhalten Geschmacksrezeptoren, die einen kurzen N-Terminus besitzen. Die Rezeptoren weisen extrazellulär Cystein-reiche Regionen auf, die in vielen Proteinen konserviert sind und als Wnt-Bindungsdomäne angesehen werden. Wnt spielt eine Rolle im Wnt-Signalweg. Dieser ist nach dem Liganden Wnt (Wingless Int-1) benannt worden und trägt beispielsweise entscheidend zur Embryonalentwicklung bei.²⁴

Die Familie der Secretin-Rezeptoren weist Ähnlichkeiten zu der Klasse der Adhäsionsrezeptoren auf, obgleich phylogenetische Unterschiede bestehen. Der N-Terminus weist Disulfidbrücken auf, die bei der Ligandenerkennung eine Rolle spielen.²⁴

4.1.1.2 SIGNALTRANSDUKTION

Bei der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren führt die Ligandenbindung zur Aktivierung der Rezeptor-assoziierten G-Proteine. Diese bestehen aus drei funktionellen Untereinheiten, die als $G\alpha$, $G\beta$ und $G\gamma$ bezeichnet werden. Die $G\alpha$ -Untereinheit weist eine Bindestelle für Guanin-Nucleotid-Guanosindiphosphat (GDP) bzw. Guanosintriphosphat (GTP) auf. Die hydrophobe β,γ -Untereinheit verankert das G-Protein in der Membran. Die durch Ligandenbindung induzierte Signaltransduktion ist schematisch in Abb. 2 dargestellt.



GDP = Guanosindiphosphat; GTP = Guanosintriphosphat; α = α -Untereinheit; β = β -Untereinheit;
 γ = γ -Untereinheit; EP = Effektorprotein; P = Phosphat

Abb. 2 Zyklus der Aktivierung und Inaktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors (Details s. Text).

Bindet ein Ligand an den Rezeptor führt dies zu einer Konformationsänderung (1), die auf das assoziierte G-Protein übertragen wird. Dies führt zu einem Austausch von GDP gegen GTP (2). Im nächsten Schritt erfolgt die Dissoziation der α -Untereinheit vom G-Protein-

Komplex. Sowohl die noch immer GTP-bindende α -Untereinheit als auch die β,γ -Untereinheit aktivieren (im Fall eines G_s -Poteins) oder deaktivieren (im Fall eines $G_{i/o}$ -Proteins) die jeweiligen Effektorproteine. Diese Effektorproteine, wie beispielsweise die Adenylylcyclase oder Phospholipase C bzw. Ionenkanäle, können wiederum zur Bildung von sekundären Botenstoffen wie beispielsweise cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) oder Diacylglycerol (DAG) führen, die ihrerseits eine Folgereaktion auslösen. So können unter anderem Proteinkinasen aktiviert und somit Proteine phosphoryliert und Calciumionen freigesetzt werden.²⁶ Anschließend erfolgt die Hydrolyse des an die α -Untereinheit gebundenen GTP zu GDP und Phosphat (4). Dieser Vorgang wird durch GAP-Proteine (GTPase-aktivierende Proteine), einer Gruppe von Enzymen, die der Superfamilie der RGS-Proteine (Regulatoren der G-Protein-Signalgebung) angehören, deutlich beschleunigt. Nach der GTP-Spaltung kehrt der Rezeptor in den ursprünglichen Ruhezustand zurück.

Anhand der Homologie der bis zum heutigen Zeitpunkt bekannten G-Protein-Subtypen der α -Untereinheit können vier Familien unterschieden werden: G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$, $G_{12/13}$. Die meisten dieser α -Untereinheiten wurden Ende der 1980er-Jahre kloniert.^{27,28} In Tabelle 1 sind die verschiedenen G-Protein-Subtypen mit ihren Effektorsystemen aufgeführt.

Tabelle 1 G-Proteine und ihre Effektorsysteme.

↑ = stimulierend; ↓ = hemmend

G_α -Familie	Effektorsystem (Effekt)	Rezeptoren (Auswahl)
$G_s\alpha$	Adenylylcyclase↑, Tyrosinkinase↑, K^+ -Kanäle↑, Tubulin-GTPase↑	A_{2A} -AR, A_{2B} -AR, β -Rezeptoren, D_1 , D_5 -Rezeptoren,
$G_{i/o}\alpha$	Adenylylcyclase↓, ERK/MAPK↑, Ca^{2+} - Kanäle↓, K^+ -Kanäle↑, Tubulin-GTPase↑	A_1 AR, A_3 AR, $GABA_B$ -Rezeptor, D_2 , D_3 , D_4 -Rezeptoren, M_2 , M_4 -Rezeptoren, Opioid-Rezeptoren, α_2 -Rezeptor
$G_{q/11}\alpha$	Phospholipase C↑, K^+ -Kanäle, Tyrosinkinasen↑	α_1 -Rezeptor, H_1 -Rezeptor, M_1 , M_3 , M_5 -Rezeptor, A_3 -AR, $P2Y_2$

$G_{12/13}\alpha$	Phospholipase C \uparrow , Phospholipase D \uparrow , Rho-Proteine \uparrow	P2Y ₂
-------------------	--	------------------

Der Klasse der $G_s\alpha$ -Proteine gehören neben den ubiquitär vorkommenden G_s -Proteinen auch die G_{olf} -Proteine an, die nach Bindung eines Geruchsstoffes die Adenylylcyclase aktivieren und somit zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration in den Cilien führt, wodurch wiederum Proteinkinasen aktiviert werden. Diese Proteinkinasen öffnen Ionenkanäle und beeinflussen somit das Membranpotential, so dass ein Signal über den Riechkolben letztendlich an das ZNS zur Auswertung des olfaktorischen Eindrucks übertragen wird.²⁸ Bei G_s -gekoppelten Rezeptoren bindet die durch Austausch von GDP gegen GTP aktivierte α -Untereinheit an das Enzym Adenylylcyclase, welches in Folge dessen vermehrt ATP in cAMP umwandelt, so dass die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht wird (s. Abb. 3).

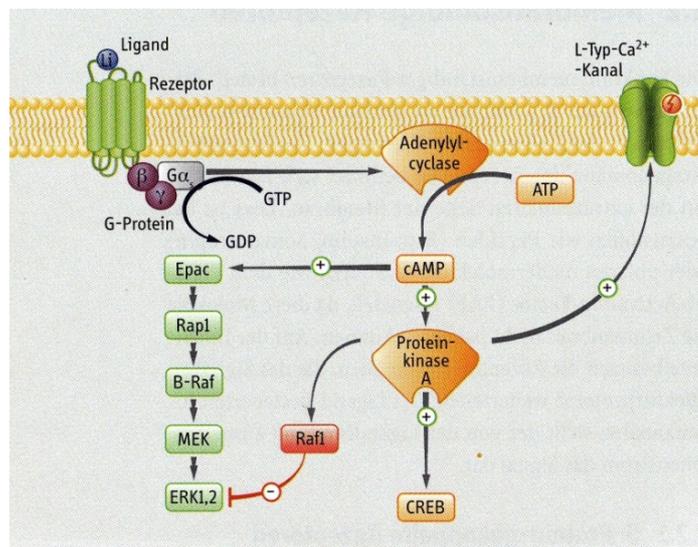


Abb. 3 Signaltransduktion bei G_s -gekoppelten Rezeptoren (Details s. Text).²⁶

Die erhöhte cAMP-Konzentration führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und zur Phosphorylierung von Substratproteinen, wie beispielsweise dem Transkriptionsfaktor CREB (cAMP Responsive Element Binding Protein) und zum anderen zur Aktivierung verschiedener MAP-Kinasen wie zum Beispiel ERK1 und ERK2. Über die Aktivierung der PKA kann es außerdem zur Aktivierung von L-Typ-Calciumionen-Kanälen kommen.

Charakteristische Reaktionen nach cAMP-Stimulation sind Lipolyse, Glykolyse, Relaxation der glatten Muskulatur und der antiphlogistische (entzündungshemmenden) Effekt bei Entzündungsprozessen.²⁶

Der Klasse der $G_{i/o}\alpha$ -Proteine gehören die G_i -(inhibitorisch) und G_o -(other) Proteine an. $G_{i/o}$ -gekoppelte Rezeptoren weisen ein assoziiertes G-Protein auf, welches eine inhibitorische α -Untereinheit (α_i oder α_o) enthält, die zur Hemmung der Adenylylcyclase und damit zu einer verminderten cAMP-Konzentration führt (s. Abb. 4).²⁶⁻²⁸

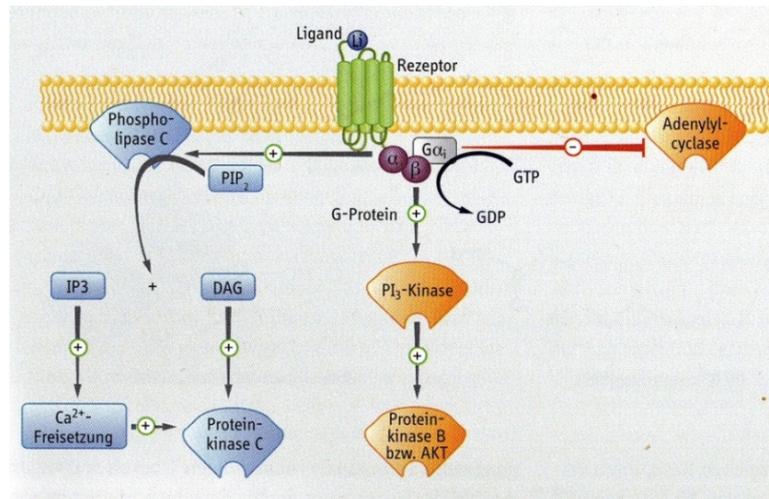


Abb. 4 Signaltransduktion bei $G_{i/o}$ -gekoppelten Rezeptoren (Details s. Text).²⁶

Außerdem kann es bei Ligandenbindung an $G_{i/o}$ -gekoppelte Rezeptoren zelltypabhängig zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI₃) und der nachgeschalteten Proteinkinase B (PKB) kommen. In einigen Zelltypen konnte auch eine Aktivierung der Phospholipase C und damit die Bildung der „second messenger“ IP₃ und DAG beobachtet werden, was wiederum zur Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führt, beobachtet führt.²⁶

Kennzeichnende Reaktionen von $G_{i/o}$ -gekoppelten Rezeptoren sind Sekretionshemmung, zelluläre Hyperpolarisation und die negativ inotrope Wirkung am Herzen.

Bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die an ein $G_{q/11}$ -Protein gekoppelt sind, aktiviert die α -Untereinheit die Phospholipase C, die daraufhin Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) umwandelt (s. Abb. 5).

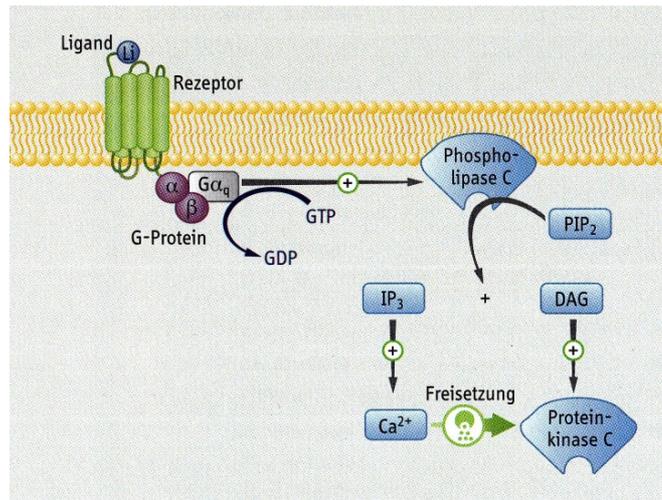


Abb. 5 Signaltransduktion bei G_q -gekoppelten Rezeptoren (Details s. Text).²⁶

IP_3 führt zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum, wohingegen DAG die Proteinkinase C aktiviert. Typische Prozesse von G_q -gekoppelten Rezeptoren sind die Sekretion von Botenstoffen und Signalsubstanzen und die Kontraktion der glatten Muskulatur.²⁶

$G_{12/13}$ -gekoppelte Rezeptoren führen zu einer Aktivierung der GTPase Rho, wodurch mittels Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts die Zellmorphologie gesteuert werden kann.^{29, 30}

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren können außer den oben bereits erwähnten sekundären Botenstoffen auch Einfluss auf das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung oder auf die Apoptose der Zelle nehmen, indem sowohl die α -Untereinheit von G_s -, $G_{i/o}$ - und G_q -Proteinen als auch die β , γ -Untereinheiten bei der Regulation der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKinasen) beteiligt sind (s. Abb. 6).³¹

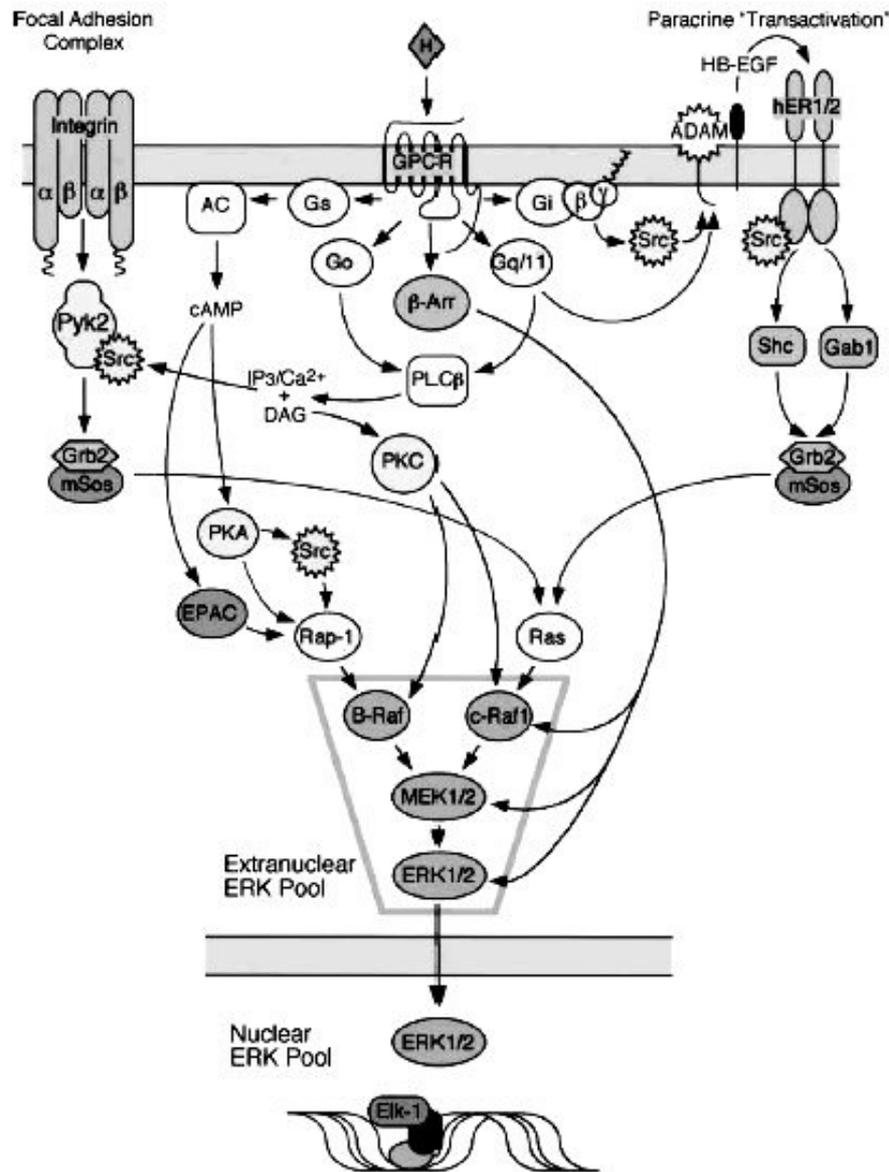


Abb. 6 Regulation der ERK-MAP-Kinase Aktivität ausgelöst durch GPCR-Aktivierung.³¹

Außerdem konnte gezeigt werden, dass GPCR nach Bindung eines Agonisten GPCR-Kinasen aktivieren können, die zu einer Anlagerung von β -Arrestinen an den Rezeptor führen, wodurch eine Aktivierung von nachgeschalteten MAPKinasen wie zum Beispiel ERK, p38 oder JNK-3 erfolgt.³²⁻³⁴ Somit besteht nach Aktivierung eines GPCR auch die Möglichkeit einer G-Protein-unabhängigen Signaltransduktion.³⁵⁻³⁷

4.1.2 PURINERGE REZEPTOREN

Zur Klasse der purinergen Rezeptoren werden die Familien der P0-, P1- und P2-Rezeptoren gezählt. Die P2-Rezeptoren bestehen aus den P2X-Rezeptoren (ligandgesteuerte Ionenkanäle) und den P2Y-Rezeptoren (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren). Während P2X-Rezeptoren lediglich durch das Nucleotid ATP aktiviert werden können, kann die Aktivierung der P2Y-Rezeptoren sowohl durch die Nucleotide ATP, ADP, UTP und UDP als auch durch Adenindinucleotide und UDP-Glucose erfolgen.^{38, 39} Die P1-Rezeptoren bestehen aus den Subtypen A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃. Adenosin stellt dabei den physiologischen Agonisten an diesen Rezeptoren dar.⁴⁰ Die Klasse der P0-Rezeptoren beinhaltet die vor kurzer Zeit entdeckten Adenin-Rezeptoren AdeR1 und AdeR2, die durch Adenin aktiviert werden.⁴¹⁻⁴³ Im Rahmen dieser Arbeit wurden Adenosin-Rezeptoren untersucht, die zu der Familie der P1-Rezeptoren gehören (s. Abb. 7).

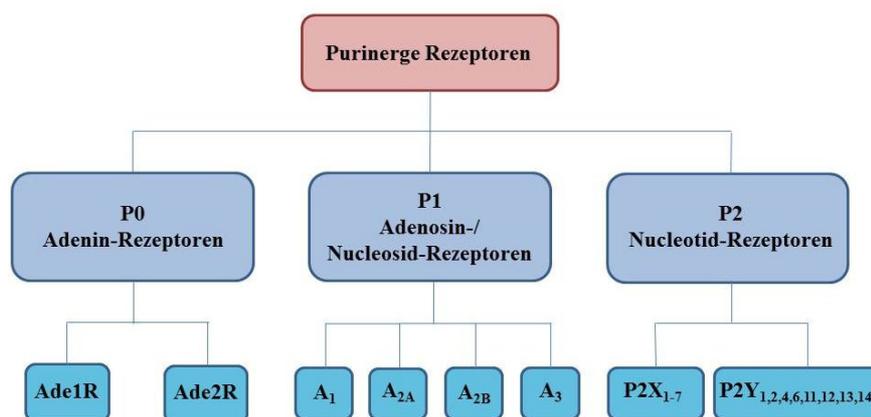


Abb. 7 Klassifizierung der purinergen Rezeptoren.

Drury und Szent-Györgyi entdeckten 1929 erstmals, dass durch die Bindung von Purinen an extrazelluläre Strukturen ein intrazelluläres Signal ausgelöst werden kann.⁴⁴ Die Bezeichnung „purinerge Rezeptoren“ wurde von Burnstock 1978 erstmals verwendet.⁴⁵ Die Unterteilung in P1- und P2-Rezeptoren erfolgte kurze Zeit darauf im Jahre 1978 aufgrund der verschiedenen Aktivitäten von ATP, ADP, AMP und Methylxanthinen an P1- und P2-Rezeptoren und deren funktionellen Effekten auf die Adenylylcyclase.⁴⁶ Die Unterteilung der P2-Rezeptoren in P2X- und P2Y-Rezeptoren erfolgte 1985 aufgrund der verschiedenen Aktivitäten bestimmter Agonisten und Antagonisten und 1994 unter Einbeziehung der jeweiligen Signaltransduktionswege.^{47, 48} Momentan werden zu dieser

Rezeptorfamilie sieben P2X-Rezeptoren (P2X₁₋₇) und acht P2Y-Rezeptoren (P2Y_{1,2,4,6,11-14}) gezählt.⁴⁹⁻⁵¹

4.1.2.1 ADENOSINREZEPTOREN

Die Familie der P1-Rezeptoren – auch Adenosinrezeptoren genannt – wird aufgrund der unterschiedlichen pharmakologischen und strukturellen Eigenschaften in die vier Subtypen A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃ unterteilt. Der endogene Ligand Adenosin bindet hierbei mit hoher nanomolarer Affinität an A₁- und A_{2A}-Rezeptoren, wohingegen A_{2B}- und A₃-Rezeptoren meist erst durch mikromolare Adenosinkonzentrationen aktiviert werden. A₁- und A₃-Rezeptoren sind G_i-gekoppelt, so dass die agonistische Ligandenbindung eine Hemmung der Adenylylcyclase zur Folge hat. Dies führt letztendlich zu einer Senkung der intrazellulären cAMP-Konzentration. A_{2A}- und A₃-Rezeptoren sind G_s-gekoppelte Rezeptoren. Eine Aktivierung durch Agonisten bewirkt eine Stimulation der Adenylylcyclase und führt zu einer erhöhten cAMP-Konzentration. Es sind neben dem Einfluss auf den „second messenger“ cAMP auch andere Signaltransduktionswege für Adenosinrezeptoren beschrieben worden. A_{2B}- und A₃-Adenosinrezeptoren können nicht nur G_i-, sondern auch G_{q/11}-Protein gekoppelt sein und so zu einer Stimulation der Phospholipase C führen, welche die IP₃- und DAG-Konzentration erhöht.⁵²⁻⁵⁵ In Tabelle 2 ist eine umfassende Übersicht über die Effektorsysteme und wichtige Agonisten und Antagonisten für die verschiedenen Adenosinrezeptorsubtypen zusammengestellt.

Tabelle 2 Effektorsysteme und ausgewählte Agonisten und Antagonisten von Adenosinrezeptoren.

Rezeptor	A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃
G-Protein	G _i , G _o	G _s , G _{olf}	G _s , G _{q/11}	G _i
Effekt	cAMP↓ K ⁺ ↑ Ca ²⁺ _{intrazellulär} ↑	cAMP↑	cAMP↑, IP ₃ /DAG↑ Ca ²⁺ _{intrazellulär} ↑	cAMP↓, IP ₃ /DAG↑ Ca ²⁺ _{intrazellulär} ↑
Agonist	CPA ⁵⁶ CCPA ⁵⁶ R-PIA ⁵⁶	CGS-21680 ⁵⁶	BAY-60-6583 ^{57, 58}	AB-MECA ⁵⁶ CI-IB-MECA ⁵⁹ PENECA ⁵⁹
Antagonist	DPCPX ⁵⁶ LUF5417 ⁶⁰ PSB-36 ⁶¹ PSB-63 ⁶²	SCH-58261 ⁶³ ZM-241385 ⁶³ MSX-2 ⁶⁴	MRS-1754 ⁶³ OSIP-339391 ⁶⁵ MRE-2029F20 ⁶⁶ PSB-601 ⁶⁷ PSB-603 ⁶⁸	PSB-10 ⁶⁹ PSB-11 ⁶⁹ MRS-3008F20 ⁷⁰

4.1.2.1.1 A₁-ADENOSINREZEPTOR

Die vier Adenosinrezeptorsubtypen werden in verschiedenen Bereichen des Körpers in unterschiedlicher Konzentration exprimiert. So wird der A₁-Rezeptor in hoher Dichte in bestimmten Bereichen des Gehirns (Cortex, Cerebellum und Hippocampus) sowie in Herz, Rückenmark, Auge und in der Nebenniere exprimiert.^{40, 71, 72} Eine Aktivierung der A₁-Rezeptoren führt u.a. zu einer Hemmung der Neurotransmitter-Freisetzung aufgrund der Senkung der Erregbarkeit von Neuronen und einer Hyperpolarisation der neuronalen Membranen. Daraus resultiert ein sedativer, antikonvulsiver und anxiolytischer Effekt, hervorgerufen durch A₁-Agonisten.⁷²⁻⁷⁵ Die Strukturen einiger A₁-selektiver Agonisten sind in Abb. 8 dargestellt.

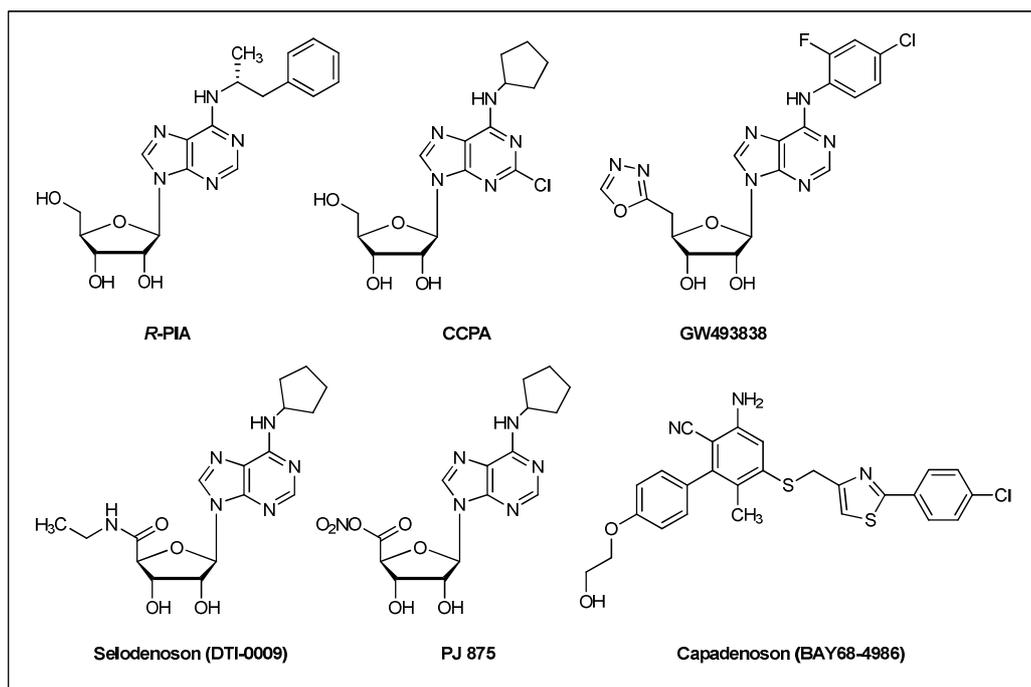


Abb. 8 Beispiele A₁-AR-selektiver Agonisten.

A₁-Rezeptoren werden im Herzen am Sinuatrial- und Atrioventrikularknoten exprimiert und vermitteln negativ chronotrope, dromotrope und inotrope Effekte.⁷⁶ Aus diesem Grund wird Adenosin klinisch bei Tachykardien eingesetzt. Andere Agonisten wie beispielsweise Tecadenoson, Selodenoson oder PJ-875 befinden sich derzeit in klinischen Studien für die Behandlung atrialer Arrhythmien.⁷⁷

Die Aktivierung von A₁-Rezeptoren führt auch zu analgetischen Effekten beispielsweise zu einer Reduktion von Schmerzen im Rückenbereich durch Effekte auf Neuronen. Der A₁-Agonist GW493838 (s. Abb. 8) wurde daher in Phase II der klinischen Studien auf die Indikation peripherer neuropathischer Schmerz bei Patienten mit Post-Zoster-Neuralgie oder peripheren Nervenschädigungen in Folge eines Traumas hin untersucht.⁷⁸

Adenosin führt außerdem in der Niere – vermittelt über A₁-Rezeptoren – zu einer Gefäßverengung und damit zu einer Reduktion der glomerulären Filtrationsrate.⁷⁹⁻⁸¹ A₁-Antagonisten besitzen somit einen diuretischen Effekt und könnten bei der Behandlung von Niereninsuffizienz eingesetzt werden.⁸²⁻⁸⁴ Einige selektive A₁-Rezeptor Antagonisten sind in Abb. 9 dargestellt.

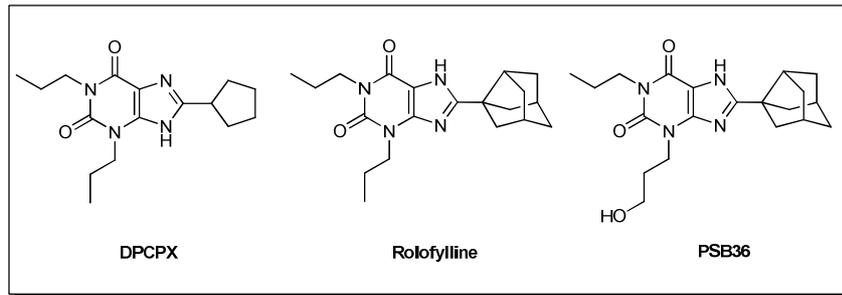


Abb. 9 Auswahl A₁-AR selektiver Antagonisten.

Die zentral anregende, positiv inotrope und diuretische Wirkung des unselektiven Antagonisten Coffein ist durch die beschriebenen Effekte erklärbar.

4.1.2.1.2 A_{2A}-ADENOSINREZEPTOR

A_{2A}-Adenosinrezeptoren werden ebenfalls im Gehirn, insbesondere im Striatum, Caudate-Putamen, Nucleus accumbens und Tuberculum olfactorium exprimiert.^{40, 71} Außerdem finden sich A_{2A}-Rezeptoren auf Endothelzellen, Leukozyten, Thrombozyten und auf glatten Muskelzellen.⁷¹ Die Aktivierung von A_{2A}-Rezeptoren führt im Endothel bzw. in der glatten Muskulatur zu einer Gefäßerweiterung und spielt bei der Blutdruckregulation daher eine Rolle.⁸⁵⁻⁸⁷ In A_{2A}-Rezeptor-Knockout-Mäusen wurde außerdem ein Einfluss auf die Thrombozytenaggregation und die Schmerzweiterleitung festgestellt.⁸⁸ Desweiteren wurde ein Potential für die Behandlung von Psychosen⁸⁴ und Chorea Huntington⁸⁵ erkannt. Die entzündungshemmenden und immunsuppressiven Eigenschaften von A_{2A}-Agonisten bieten großes therapeutisches Potential. Aufgrund ihres Einflusses auf die Blutgefäße und das Herz ist die systemische Gabe von A_{2A}-Agonisten stark eingeschränkt. Daher wurden in unserem Arbeitskreis phosphorylierte A_{2A}-Agonisten entwickelt, die bevorzugt in entzündetem Gewebe, in dem eine erhöhte *ecto-5'-Nucleotidase*-Expression beobachtet wird, dephosphoryliert werden. Die notwendige Konzentration des aktiven Medikaments kann damit lediglich lokal im entzündeten Gewebe erreicht werden.^{89, 90} Neben den phosphorylierten A_{2A}-Agonisten wurde, ebenfalls in unserem Arbeitskreis, ein polarer Agonist (**75**), der peroral nicht absorbiert werden kann für die lokale Therapie, beispielsweise von entzündlichen Darmkrankheiten entwickelt.³ In Abb. 10 sind einige Strukturen von A_{2A}-Agonisten dargestellt.

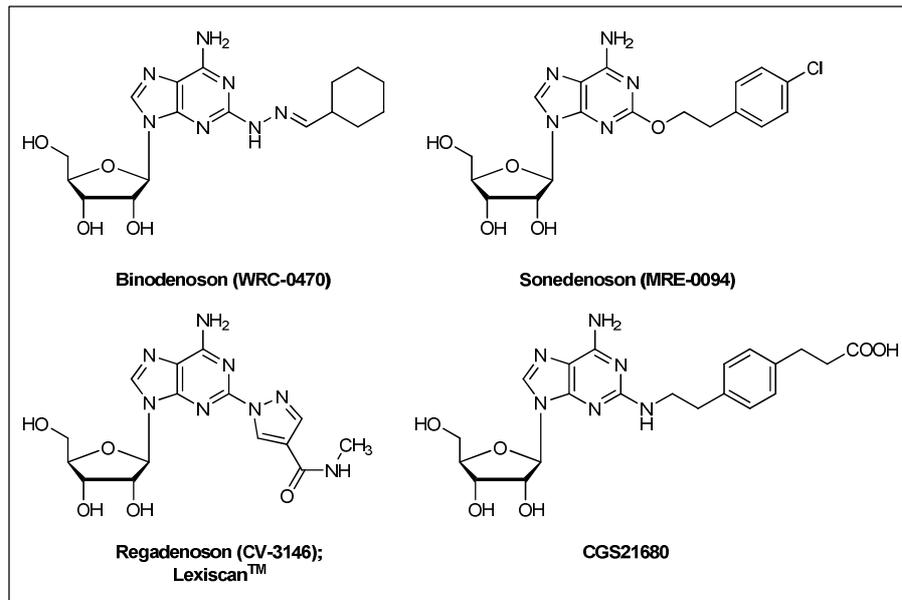


Abb. 10 Beispiele selektiver A_{2A}-AR Agonisten.

Im Jahr 2011 wurde Regadenoson (US: Lexiscan[®]; EU: Rapiscan[®]) als Diagnostikum bei koronaren Herzerkrankungen eingeführt.⁹¹ Dabei löst das Medikament pharmakologisch herbeigerufenen Stress aus, so dass Radionukliduntersuchungen zur Myokardperfusion durchgeführt werden können.⁹² Die auftretenden Nebenwirkungen ähneln denen von Adenosin. Der Vorteil von Regadenoson liegt in der Möglichkeit, die Substanz intravenös zu applizieren, wohingegen Adenosin in die Coronararterie verabreicht werden muss. Binodenoson wurde ebenfalls in klinischen Studien als Diagnostikum bei koronaren Herzerkrankungen untersucht (CorVue[™]).⁹³ Die Verbindung weist eine ähnliche Wirksamkeit wie Adenosin auf, allerdings unter Auftreten von Fieber und weniger schwerwiegenden Nebenwirkungen. Aufgrund von Fehlern im Studiendesign und der daraus resultierenden notwendigen weiterführenden Untersuchungen, ist eine Zulassung durch die FDA bislang noch nicht erfolgt.⁹⁴ Apadenoson (Stedivaze[™]) zeigte in Phase II der klinischen Prüfung ein verbessertes Nebenwirkungsprofil verglichen mit Adenosin. Nach Beendigung der Phase III wurde die Entwicklung allerdings von Seiten der Firma ohne Angabe von Gründen beendet.⁹⁵ Die Verbindung BVT115959 befindet sich derzeit in Phase II der klinischen Studien für die Indikation neuropathischer Schmerz bei Diabetespatienten.⁹⁶

Eine Coexpression von A_{2A}-Rezeptoren mit Dopamin-D₂-Rezeptoren innerhalb des Striatums wurde beschrieben. Die Aktivierung von A_{2A}-Rezeptoren führt zu einer Affinitätsabnahme von D₂-Rezeptoren gegenüber Agonisten.⁹⁷⁻¹⁰⁰ Daher stellen A_{2A}-

Antagonisten potenzielle Therapeutika für die Behandlung von Morbus Parkinson dar.¹⁰¹
In Abb. 11 sind einige selektive A_{2A}-Antagonisten aufgeführt.

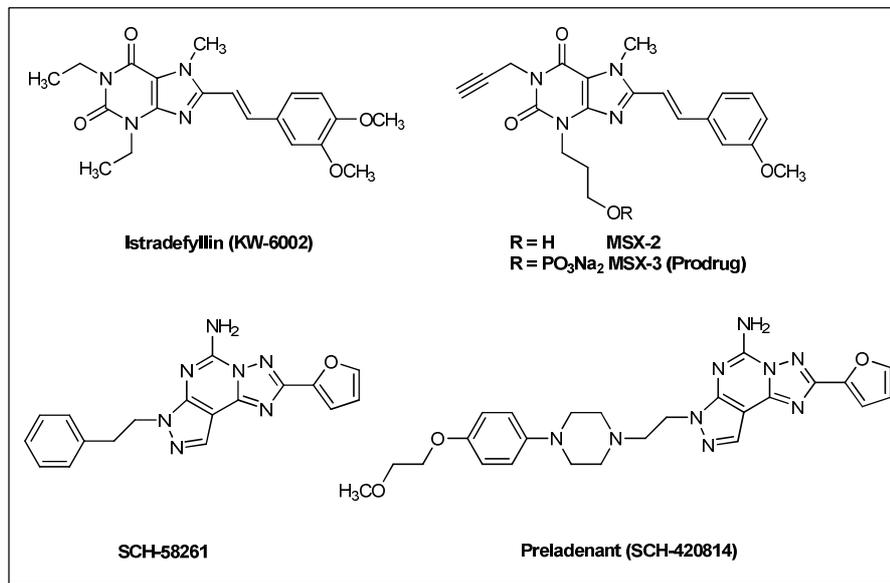


Abb. 11 Beispiele einiger selektiver A_{2A}-AR Antagonisten.

Der selektive A_{2A}-Antagonist Istradefylline wurde intensiv in Phase III-Studien der klinischen Prüfung für die Indikation Morbus Parkinson untersucht.^{102, 103} Bislang ist die Zulassung allerdings nicht erteilt worden. Vipadenant befand sich in Phase II, Preladenant in Phase III der klinischen Prüfung ebenfalls für die Indikation Morbus Parkinson. Erste Studienergebnisse zeigen, dass Preladenant bei alleiniger Gabe die motorischen Fähigkeiten verbessert ohne dabei Dyskinesien auszulösen.¹⁰⁴ Bei kombinierter Medikation mit Levodopa, zeigte sich in Primatenstudien ebenfalls eine signifikante Verbesserung der motorischen Fähigkeiten bei nichtsignifikanter Steigerung von Dyskinesien.¹⁰⁵ Die Entwicklung von Vipadenant wurde aufgrund von unerwünschten Nebenwirkungen gestoppt.²

Es konnte gezeigt werden, dass neuroendokrine Tumore A_{2A}- und A_{2B}-Rezeptoren exprimieren, die das Zellwachstum und die Sekretion von Chromogranin A vermitteln. Chromogranin A ist ein Vorläufermolekül für verschiedene funktionelle Peptide wie beispielsweise Vasostatin, Pancreastatin, Catestatin oder Parastatin. Selektive A_{2A}-Antagonisten könnten demnach als zusätzliches Target, neben Somostatin und VEGF (Vascular endothelial growth factor) für die Behandlung dieser Art von Tumoren dienen.¹⁰⁶

Jaakola *et al.* veröffentlichten 2008 die erste Kristallstruktur des humanen A_{2A} -Rezeptors kokristallisiert mit dem hoch affinen und Subtyp-spezifischen Vollantagonisten ZM241385 (s. Abb. 12).

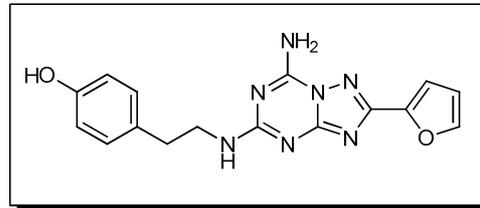
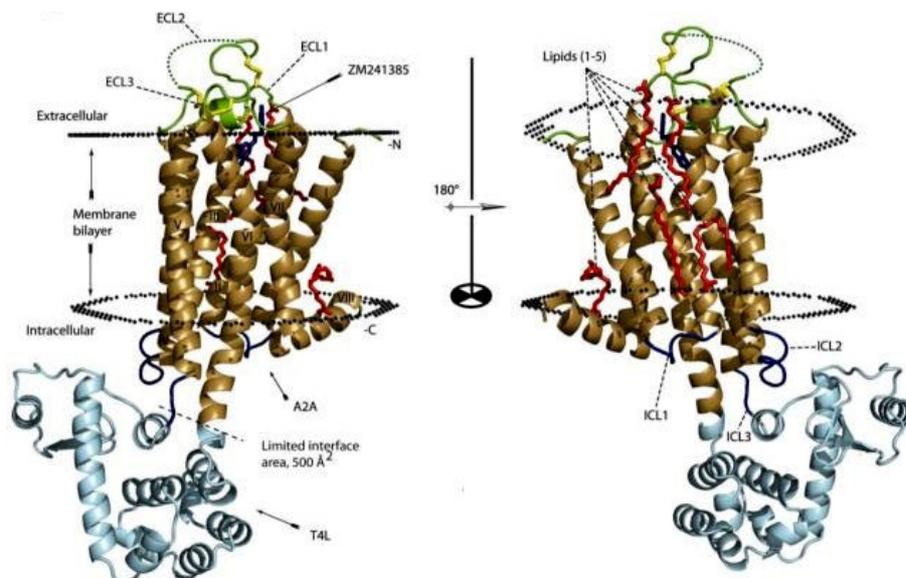


Abb. 12 A_{2A} -Antagonist ZM241385.

Im Gegensatz zu den Liganden des β -adrenergen Rezeptors und Retinal bindet ZM241385 nahezu senkrecht zu der Membranoberfläche des Rezeptors (s. Abb. 13).



ZM241385 ist blau markiert; rot markiert sind die vier Lipid Moleküle; Disulfidbindungen wurden gelb markiert, wohingegen die Sulfat-Ionen weggelassen wurden; die extrazellulären Schleifen 1-3 sind grün eingefärbt, die intrazellulären Schleifen hingegen sind blau markiert worden.

Abb. 13 Kristallstruktur des humanen A_{2A} -T4L-DC-Rezeptors.²⁰

Der bizyklische Triazolotriazin-Grundkörper geht dabei π - π -stacking-Wechselwirkungen mit Phe168, aliphatische hydrophobe Wechselwirkungen mit Ile274 und Wasserstoffbrückenbindungen mit Asn253 ein. Die polare Aminosäure Glu169 wechselwirkt mit der exocyclischen Aminogruppe, die an den Bicyklus gebunden ist. Die Phenolgruppe von ZM241385 wechselwirkt mit Leu269 und Met270. Die phenolische Hydroxylgruppe geht Wasserstoffbrückenbindungen mit einem gebundenen Wassermolekül ein. Der Furan-Ring von ZM241385 reicht tief in die Bindungstasche

hinein und wechselwirkt dort mit Asn253. Hydrophobe Wechselwirkungen geht der Furan-Ring über His250 und Leu249 ein (s. Abb. 14).

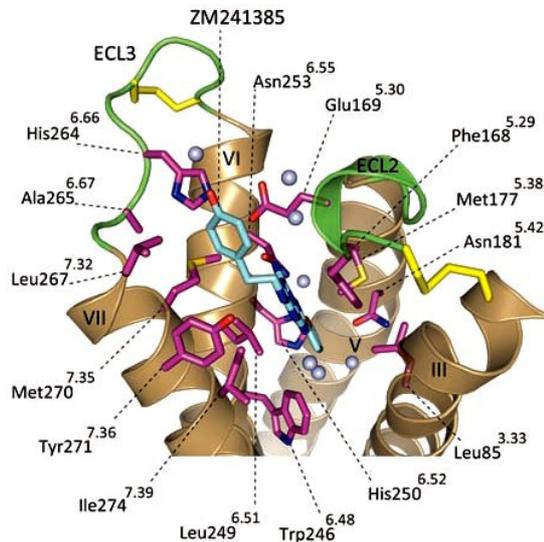


Abb. 14 Aminosäuren in einem Abstand von 5 Å zu dem an den humanen A_{2A}-Rezeptor gebundenen ZM241385.²⁰

Aus der Kristallstruktur können neben den Wechselwirkungen des Liganden mit der Bindungstasche auch Disulfidbrücken innerhalb des Rezeptors identifiziert werden, die maßgeblich für die Tertiärstruktur des Proteins verantwortlich sind. So konnten Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen Cys71 und Cys159 und zwischen Cys74 und Cys146, die jeweils die extrazellulären Schleifen 1 und 2 miteinander verbinden, zwischen Cys77 und Cys166, die eine Bindung zwischen der transmembranen Domäne 3 und der extrazellulären Schleife 2 vermittelt und zwischen Cys259 und Cys262 beobachtet werden, wodurch eine Bindung innerhalb der extrazellulären Schleife 3 resultiert.²⁰

Lediglich drei Jahre später veröffentlichten Xu et al die Kristallstruktur des humanen A_{2A}-Rezeptors, der zusammen mit einem hochaffinen und selektiven Vollagonisten, UK-432097 (s. Abb. 15), kokristallisiert wurde. Dieser Ligand wurde als Testverbindung für die Therapie von COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) entwickelt.

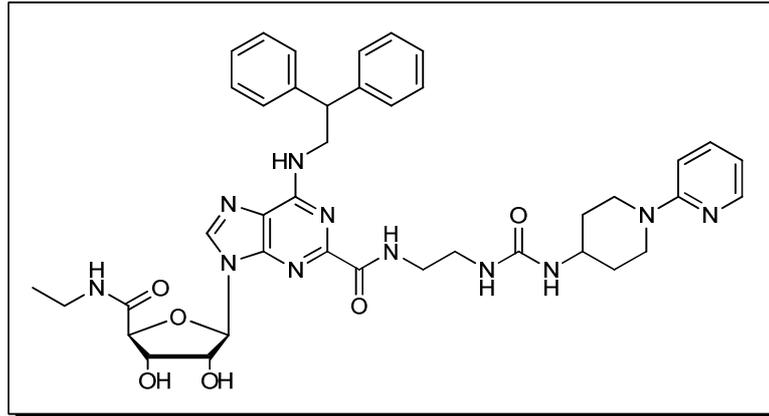


Abb. 15 A_{2A} -Agonist UK-432097.

Der kokristallisierte Vollagonist UK-43097 ist wesentlich größer als der Antagonist ZM241385 und besetzt nahezu die gesamte Bindungstasche des A_{2A} -Rezeptors (s. Abb. 16).

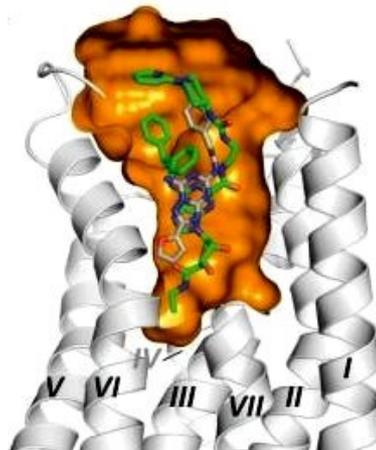
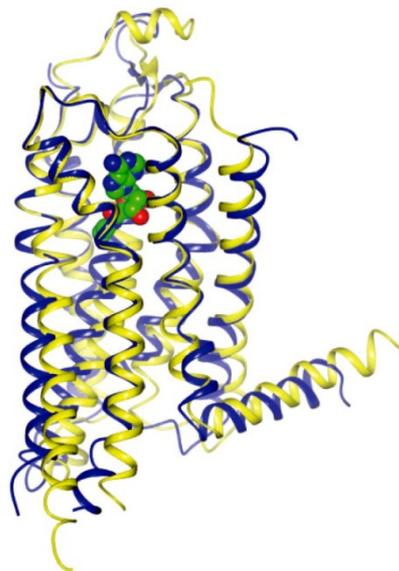


Abb. 16 Ligand UK-432097 in der Bindungstasche des humanen A_{2A} -Adenosinrezeptors.¹⁰⁷

Der bityklische Grundkörper von UK-43097 ist in nahezu allen typischen Adenosinrezeptor-Agonisten (CGS21680, NECA, etc.) oder Antagonisten anzutreffen.¹⁰⁸ Der Ribose-Ring hingegen ist lediglich bei den bislang bekannten Adenosinrezeptor-Agonisten anzutreffen und fehlt bei Antagonisten. In der erhaltenen Kristallstruktur ragt der Ribosering tief in die hauptsächlich hydrophobe Region der Bindungstasche. Viele Adenosinrezeptor-Agonisten weisen am Ribosering einen 5'-*N*-Ethyluronamidrest auf, der vielfach zu einer verbesserten Affinität führt. Die Erklärung für dieses Verhalten ist die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen von Thr88 zu dem in diesem Rest vorkommenden Stickstoff-Atom.

Die Kopplung von großen Resten in Position 2 des Adenins, wie beispielsweise des 2-(3-(1-(Pyridin-2-yl)piperidin-4-yl)ureido)ethyl-carboxyamido-Substituenten in UK-432097, ist bei zahlreichen A_{2A} -Adenosinrezeptor Agonisten anzutreffen. Die Amidfunktionalität dieses Restes geht in der Bindungstasche des Rezeptors eine indirekte Wasser-vermittelte Wasserstoffbindung mit Thy271 ein. Die Carbonylgruppe hingegen wechselwirkt mit Ala63. Die Stickstoffatome der Harnstoffgruppe des Substituenten gehen Wasserstoffbrückenbindungen mit Glu169 ein, während der Sauerstoff eine Wasserstoffbrückenbindung mit Tyr271 ausbildet. Der Pyridinyl-piperidin-Rest ist in Richtung Helix VII und der extrazellulären Schleife 3 geneigt. Xu *et al.* vermuten, dass dieser Rest zu einer allosterischen Bindung beiträgt und somit einen Einfluss auf strukturelle und konformelle Änderungen des Rezeptors nimmt und damit einen Beitrag zur Selektivität dieser Verbindung gegenüber den anderen Adenosinrezeptor-Subtypen leistet.¹⁰⁷

Kurze Zeit später veröffentlichten Lebon *et al.* zwei Kristallstrukturen des A_{2A} -Rezeptors, der sowohl mit dem endogenen Liganden Adenosin als auch mit dem unselektiven Agonisten NECA kokristallisiert wurde (s. Abb. 17).¹⁰⁹



NECA ist als raumfüllendes Modell dargestellt (C: grün; N: blau; O: rot); Die Struktur von A_{2A} -GL31 gebunden an NECA ist gelb eingefärbt; Die Struktur von A_{2A} -T4L gebunden an ZM241385 ist blau gefärbt

Abb. 17 Vergleich der Kristallstrukturen des A_{2A} -T4L Rezeptors gebunden an ZM241385 mit dem A_{2A} -GL31 Rezeptor gebunden an NECA.¹⁰⁹

Der Rezeptor befindet sich in diesen Kristallstrukturen, aufgrund der für die Thermostabilität notwendigen Punktmutationen, in einem Übergangszustand zwischen aktiviertem und inaktivem Rezeptorzustand. Dafür spricht auch die Tatsache, dass der auf einem thermostabilisiertem Konstrukt dargestellte Rezeptor lediglich schwach durch den Agonisten CGS21680 aktiviert wird. Nichtsdestotrotz kann auf ähnliche Bindungsmodi wie bei der von Xu *et al.* dargestellten Kristallstruktur geschlossen werden.

Vergleicht man nun die A_{2A} -AR Kristallstruktur, die zum einen mit ZM241385 und zum anderen mit UK-432097, NECA und Adenosin komplexiert wurde, so ist ersichtlich, dass die Wechselwirkungen des Adenin-Grundgerüsts in der Bindungstasche unverändert und damit konserviert sind (s. Abb. 18).

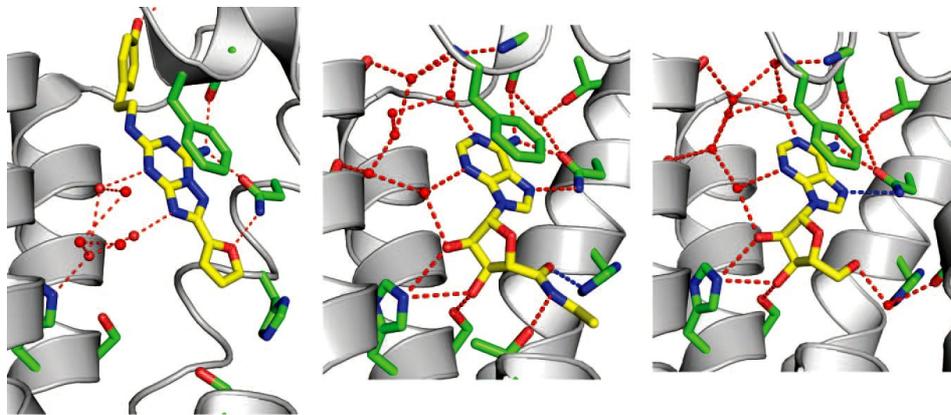


Abb. 18 Vergleich der Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen für den A_{2A} -AR gebunden an den inversen Agonisten ZM241385(links), und die Agonisten NECA (Mitte) und Adenosin (rechts).

Die Helices I-IV weisen in beiden Kristallstrukturen lediglich minimale konformelle Abweichungen auf. Die Bindung der Agonisten UK-432097, NECA und Adenosin führen allerdings zu einer Reihe von konformellen Änderungen in der Bindungstasche bei den Helices V-VII. Beispielsweise rücken die intrazellulären Enden der Helices V und VI im direkten Vergleich zwischen agonistisch und antagonistisch komplexierter Struktur näher zusammen (s. Abb. 19). Dabei induziert die Bindung des Agonisten zum einen eine Verschiebung der intrazellulären Helix nach außen und zum anderen eine Rotation um 30° .

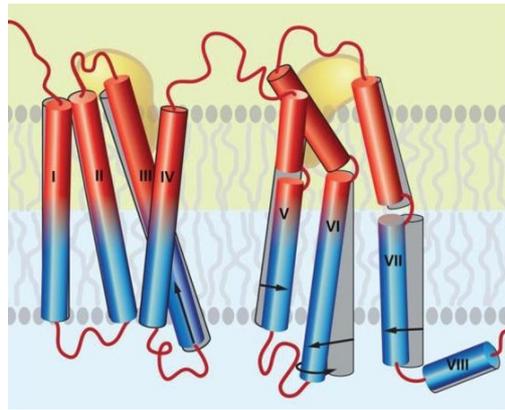


Abb. 19 Konformations- und strukturelle Änderungen der transmembranären Helices verursacht durch agonistische Bindung.¹⁰⁷

Außerdem ist erkennbar, dass Helix VII durch die Wechselwirkung von den Aminosäuren Ser277 und His278 mit dem Ribosering nach innen gezogen werden. Die Abstoßung der Phenylringe mit Leu267, Met270, Tyr271 und den Resten der extrazellulären Schleife 3 führt dazu, dass der extrazelluläre Teil der Helix VII nach außen verschoben wird. Dies bewirkt, dass die Helix VII um den Ribosering schwingt. Die erhaltene Kristallstruktur des A_{2A}-Adenosinrezeptors, der mit dem voluminösen Agonisten UK-432097 kokristallisiert wurde, lässt Grund zu der Annahme, dass mögliche Agonisten mehr strukturelle Variationen aufweisen und insgesamt größer sein können als zuvor angenommen. Einige Liganden stabilisieren dabei anscheinend vornehmlich eine Rezeptorkonformation, während andere lediglich das dynamische Gleichgewicht der verschiedenen Rezeptorkonformationen beeinflussen.¹⁰⁷

Mittlerweile konnten insgesamt 8 Kristallstrukturen mit verschiedenen Liganden kokristallisiert werden (s. Tabelle 3). Unter diesen Liganden befanden sich sowohl Agonisten als auch Antagonisten, so dass beide Rezeptorzustände (aktiv und inaktiv) beschrieben werden können. Neben den Kristallstrukturen mit synthetischen Liganden konnten Lebon *et al.* auch eine Kristallstruktur mit dem endogenen Ligand Adenosin erhalten und charakterisieren. Die Verbindung ZM241385 wurde, nachdem sie erstmals von Jaakola *et al.* mit dem humanen A_{2A}-Rezeptor kokristallisiert wurde, von zwei weiteren Gruppen erneut kristallisiert. Die Auflösung der drei erhaltenen Kristallstrukturen stellt allerdings keine Verbesserung zu derjenigen von Jaakola *et al.* dar.^{110, 111}

Tabelle 3 Kristallstrukturen des humanen Adenosin-A_{2A}-Rezeptors.

Ligand		Auflösung	Literatur
ZM241385	Antagonist	2.60 Å	Jaakola <i>et al.</i> ²⁰
UK-432097	Agonist	2.71 Å	Xu <i>et al.</i> ¹⁰⁷
Adenosin	Agonist	3.00 Å	Lebon <i>et al.</i> ¹⁰⁹
NECA	Agonist	2.60 Å	Lebon <i>et al.</i> ¹⁰⁹
XAC	Antagonist	3.31 Å	Doré <i>et al.</i> ¹¹⁰
Coffein	Antagonist	3.60 Å	Doré <i>et al.</i> ¹¹⁰
1,2,4-Triazin 4e	Antagonist	3.27 Å	Congreve <i>et al.</i> ¹¹²
1,2,4-Triazin 4g	Antagonist	3.24 Å	Congreve <i>et al.</i> ¹¹²

4.1.2.1.3 A_{2B}-ADENOSINREZEPTOR

A_{2B}-Adenosinrezeptoren werden vor allem in Blase, Gastrointestinaltrakt, Lunge und Mastzellen exprimiert. Im Gehirn ist die Expressionsrate gering.^{40, 113} A_{2B}-Rezeptoren haben neben dem bereits oben diskutierten Effekt auf die „second messenger“ cAMP, IP₃ und DAG einen Einfluss auf Mitogen-aktivierte Proteinkinasen wie JNK, ERK und p38 MAPK.¹¹⁴

Durch Stimulation von A_{2B}-Adenosinrezeptoren können die Interleukine IL-4, IL-8 und IL-13 aus Mastzellen ausgeschüttet werden. Diese spielen eine entscheidende Rolle bei asthmatischen Prozessen.¹¹⁵ Die proinflammatorischen Effekte von A_{2B}-Adenosinrezeptoren in der Lunge sind vielfach beschrieben worden.^{114, 116, 117} Desweiteren kann die Aktivierung von A_{2B}-Rezeptoren zu einer Freisetzung von entzündungsfördernden Cytokinen aus Darmepithelzellen, Lungenfibroblasten, Bronchialepithelzellen und der glatten Bronchialmuskulatur führen.¹¹⁸⁻¹²¹ Sowohl in *in vitro*- als auch in *in vivo*-Studien konnte eine A_{2B}-Rezeptor vermittelte Ausschüttung des

proinflammatorischen Cytokins IL-6 im Darmepithel bei der Entstehung von Colitis beobachtet werden.¹²²⁻¹²⁵

Die Gabe von A_{2B}-Rezeptor-Antagonisten könnte demnach Möglichkeiten für die Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Lungenentzündungen, Lungenfibrosen und Asthma bieten. In Abb. 20 sind einige Strukturen selektiver A_{2B}-Antagonisten dargestellt.

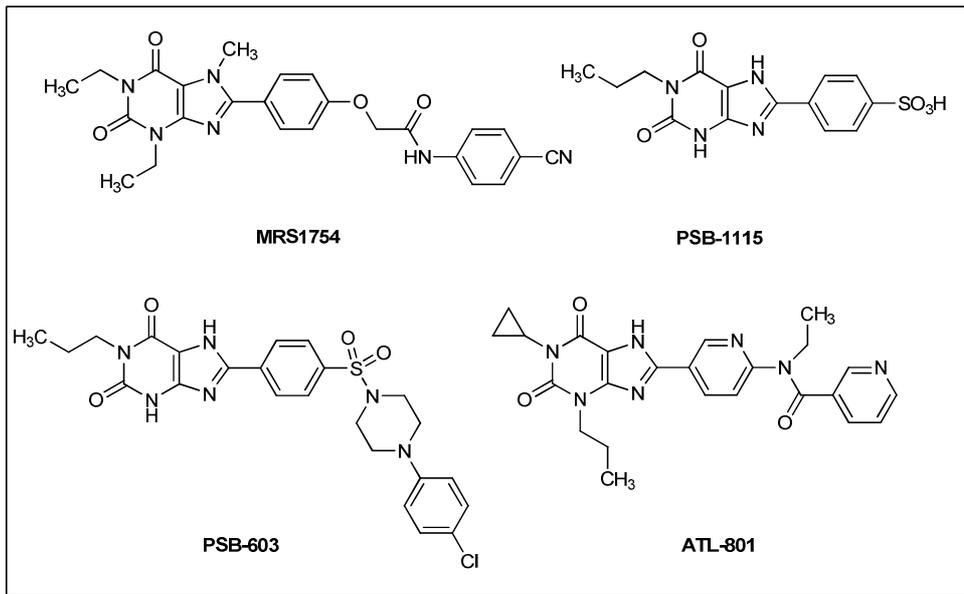


Abb. 20 Beispiele einiger selektiver A_{2B}-AR Antagonisten.

A_{2B}-Rezeptoren scheinen außerdem an der Angiogenese von Tumoren beteiligt zu sein. So konnte in A_{2B}-Knock-out Mäusen, die mit Lungencarcinom beimpft wurden, gezeigt werden, dass im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen ein verringertes Tumorstadium und eine verringerte VEGF-Konzentration (vascular endothelial growth factor) im Tumor auftrat.¹²⁶

A_{2B}-Antagonisten könnten damit bei Tumorerkrankungen zum Einsatz kommen, indem die Gefäßneubildung in Tumoren gehemmt wird.

Neben diesen Einsatzgebieten könnten A_{2B}-Antagonisten auch in der Therapie von inflammatorischem Schmerz eingesetzt werden. Für die A_{2B}-selektiven Antagonisten PSB-50, PSB-53, PSB-55, PSB-1115 konnte eine dosisabhängige Schmerzreduktion im „Hot-plate test“¹²⁷ mit Mäusen gezeigt werden. PSB-1115 zeigte dabei in Kombination mit Morphin einen synergistischen Effekt.¹²⁸ Eine dosisabhängige Reduktion der Schmerzwahrnehmung in der zweiten inflammatorischen Phase nach Formalin-Injektion bei Mäusen konnte ebenfalls beobachtet werden.⁶¹

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass A_{2B} -Rezeptoren die Freisetzung von IL-6 aus Astrozytomzellen vermitteln und in Gegenwart von TNF- α die Ausbildung einer Astrogliose verstärken.^{129, 130} Astrogliosen werden in Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Alzheimer oder multipler Sklerose gebracht. A_{2B} -Antagonisten könnten damit auch bei deren Therapie zur Anwendung kommen.

Adipositas und Insulinresistenz sind verbunden mit einem geringen Grad einer systemischen Entzündung. Durch Aktivierung von A_{2B} -Rezeptoren mit dem unselektiven Agonisten NECA konnten Figler *et al.* zeigen, dass in Mäusen, die an Diabetes litten, die Produktion von Adenosin und die Expressionsrate von A_{2B} -Rezeptoren gesteigert wurde. Beides führt zu einer gesteigerten IL-6- und CRP (C-reaktives Protein)-Produktion, so dass die Insulinresistenz verstärkt wurde. Die Gabe des selektiven A_{2B} -Antagonisten ATL-801 verminderte dagegen die Insulinresistenz.¹³¹ Selektive A_{2B} -Antagonisten könnten damit mögliche Therapeutika bei der Behandlung von Insulinresistenz darstellen.

Der einzige selektive A_{2B} -Agonist stellt derzeit die Verbindung BAY60-6583 (s. Abb. 21) dar. Diese befindet sich derzeit in der präklinischen Phase und könnte zur Behandlung von Arteriosklerose eingesetzt werden. Es besteht allerdings ein enormer Bedarf an neuartigen, selektiven und hochpotenten A_{2B} -Rezeptor Agonisten, da einerseits derzeit kein radioaktiv markierter A_{2B} -Rezeptor-Agonist für die Charakterisierung neuer agonistischer Substanzen verfügbar ist, und solche andererseits für die Entwicklung neuartiger Medikamente für die Behandlung von Entzündungen, renalen Ichämien, und der erwähnten Ateriosklerose benötigt werden.

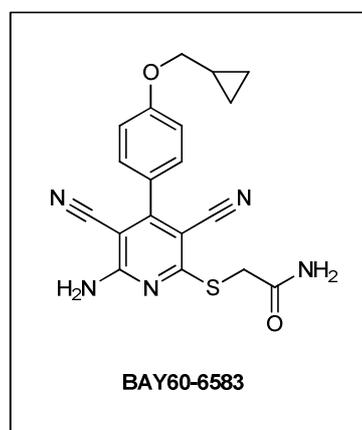


Abb. 21 Beispiel eines selektiven A_{2B} -AR Agonisten.

4.1.2.1.4 A₃-ADENOSINREZEPTOR

Von den vier Adenosinrezeptorsubtypen ist der A₃-Rezeptor der zuletzt geklont und charakterisierte. A₃-Adenosinrezeptoren werden hauptsächlich in Leber, Lunge, Aorta, Immunzellen, Hoden und Gehirn (Cerebellum, Hippocampus) exprimiert.^{132, 133} Die Physiologie der A₃AR-Aktivierung ist sehr komplex und wird durch die unterschiedliche Rezeptorfunktion und Gewebeverteilung in Nagern und Primaten erschwert.² In Abb. 22 sind einige selektive A₃-Agonisten dargestellt.

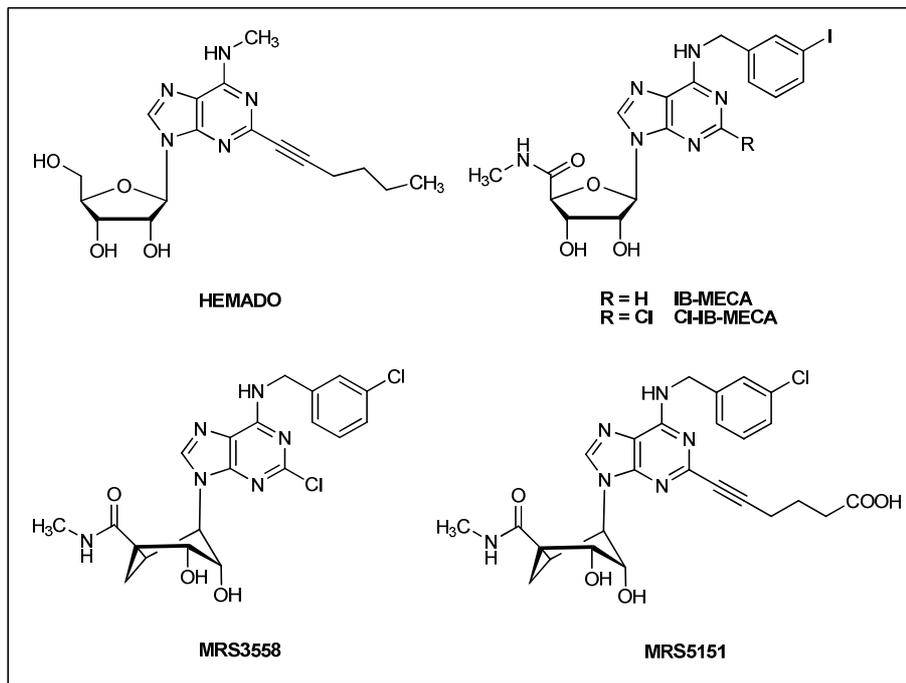


Abb. 22 Beispiele einiger selektiver A₃-AR Agonisten.

Es konnte gezeigt werden, dass A₃-Rezeptoren den regulatorischen Signalweg der Mitogen-aktivierten Kinasen (MAPKs) modulieren, der aus dem ERKs (extracellular signal regulated kinases), JNKs (c-Jun N-terminal kinases) und den p38 Kinasen besteht.¹³⁴ Es konnten verschiedene durch A₃-Rezeptor-Aktivierung ausgelöste Effekte auf den Akt/Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg in unterschiedlichen Zellen beobachtet werden (s. Abb. 23).¹³⁵

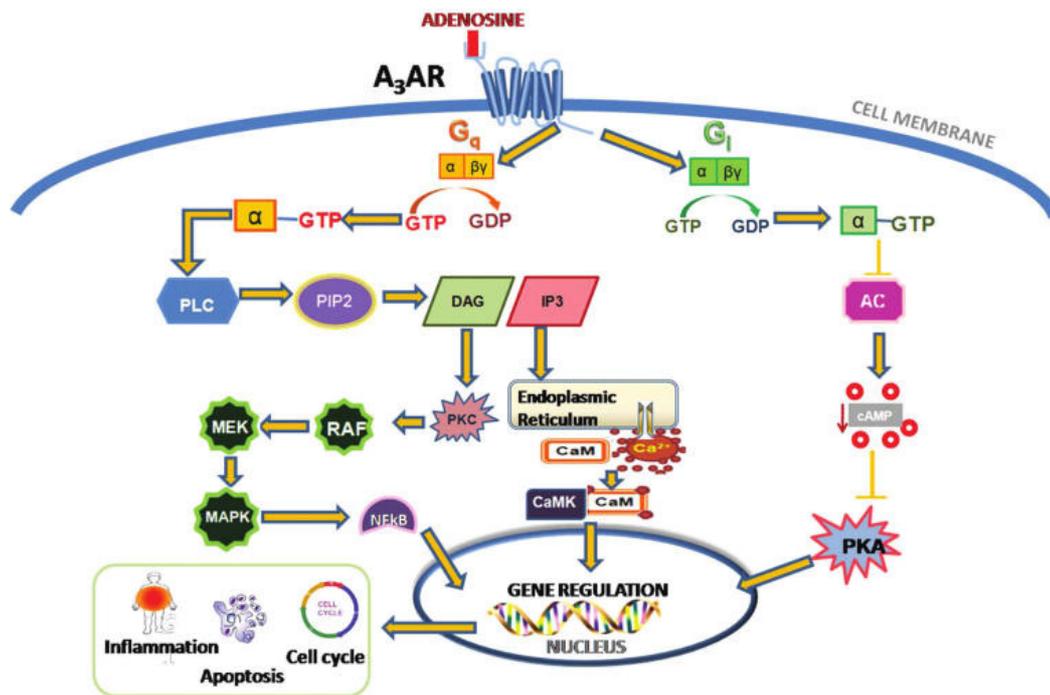


Abb. 23 Schematische Darstellung des Signalübertragungsweges nach Aktivierung des A₃-Rezeptors.¹³³

Die Verbindung CF101 (IB-MECA) wird derzeit in klinischen Studien (Phase II) für die Indikation Psoriasis untersucht.¹³⁶ Für weitere Indikationen wie beispielsweise Keratokonjunktivitis sicca (*engl.*: dry eye syndrome) (Phase III)¹³⁷, erhöhtem Augeninnendruck (Phase II)¹³⁸, Kniegelenksarthrose (Phase II)¹³⁹ und rheumatoider Arthritis (Phase II)¹⁴⁰ werden derzeit Patienten rekrutiert. Auch die Verbindung CI-IB-MECA (CF102) befindet sich derzeit in klinischen Studien für die Indikationen chronische Hepatitis C Genotype 1 (Phase 2)¹⁴¹ und fortgeschrittenem Leberzellkarzinom (Phase 1-2)¹⁴².

A₃-Rezeptoren spielen ebenfalls eine Rolle bei der Rezeptor-vermittelten Apoptose von verschiedenen Tumorzellen wie beispielsweise humanen Lungenkrebszellen, humanen Leukämiezellen, humane Blasenkrebszellen, humane Prostatakrebszellen, humane Schilddrüsenkrebszellen, Leberzellkarzinom oder Mesotheliom.¹⁴³⁻¹⁴⁹ A₃-Rezeptoren werden ebenfalls bei Adenosin-vermittelten cardioprotektiven Effekten diskutiert.¹⁵⁰⁻¹⁵³ In Abb. 24 sind einige Strukturen selektiver A₃-Antagonisten dargestellt.

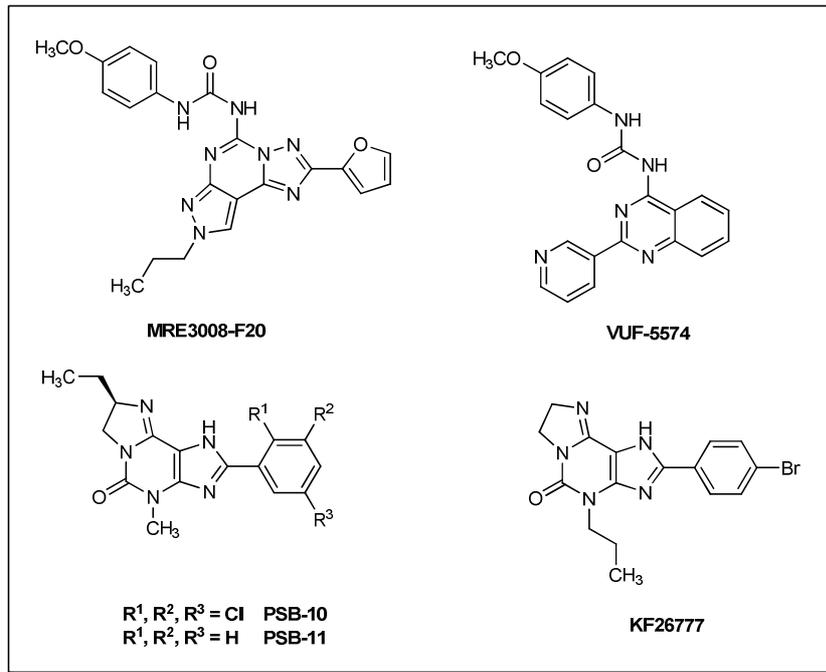
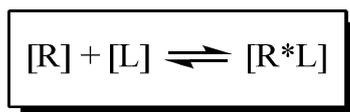


Abb. 24 Beispiele selektiver A₃-AR Antagonisten.

4.2 LIGANDEN

Die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor kann mittels Ionenbindung, Wasserstoffbrückenbindung oder hydrophoben Wechselwirkungen, verursacht durch van-der-Waals-Kräfte, erfolgen. Diese Bindungsarten besitzen unterschiedliche Reichweiten und spielen damit in den verschiedenen Phasen der Ligandenbindung eine jeweils unterschiedliche Rolle. So ist die Ionenbindung in der ersten Phase der Annäherung zwischen Ligand und Rezeptor von entscheidender Bedeutung während bei der eigentlichen (reversiblen) Bindung des Liganden hauptsächlich Dipol-Dipol-, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen eine Rolle spielen.

Diese Interaktion eines Liganden mit einem Rezeptor kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:



Gl. 1 Rezeptor-Ligandgleichgewicht.

[R] = Konzentration des Rezeptors; [L] = Konzentration des freien Liganden; [R**L*] = Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes

Durch Aufstellen des Massenwirkungsgesetzes erhält man die Assoziations- bzw. die Dissoziationskonstante K_D , die ein Maß für die Affinität des Liganden an den Rezeptor darstellt (Gl. 2).

$$K_D = \frac{[R] \cdot [L]}{[R \cdot L]} = \frac{k_2}{k_1}$$

Gl. 2 Massenwirkungsgesetz.

K_D = Dissoziationskonstante; $[R]$ = Konzentration des Rezeptors; $[L]$ = Konzentration des freien Liganden;
 $[R \cdot L]$ = Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes; k_1 = Assoziationsgeschwindigkeitskonstante;
 k_2 = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

Bei der Bindung eines Liganden treten dabei konformelle Veränderungen am Rezeptor selber auf. So wurde insbesondere für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ein sog. „Zwei-Zustände-Modell“ aufgestellt (s. Abb. 25).

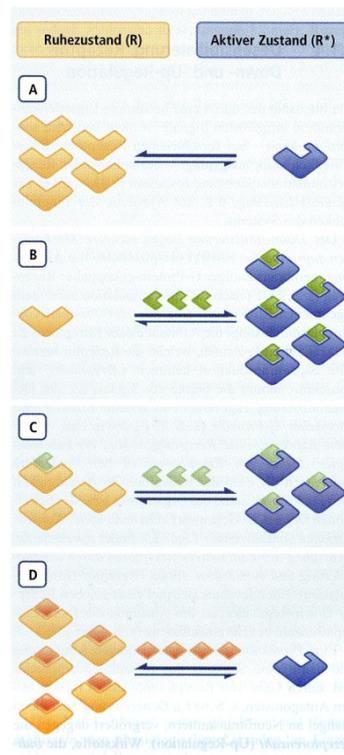


Abb. 25 Zwei-Zustände-Modell eines Rezeptors (Details s. Text).⁴

Demnach kann der Rezeptor entweder in einem inaktiven oder aktivierten Zustand vorliegen. Zwischen diesen beiden Konformationen herrscht ein dynamisches

Gleichgewicht, das bei Fehlen eines Liganden zumeist auf die Seite des inaktivierten Zustandes hin verschoben ist (s. Abb. 4, A). Generell lassen sich so Liganden in drei unterschiedliche Gruppen unterteilen. Agonistische Substanzen (**Agonisten**) binden bevorzugt an Rezeptoren, die sich im aktivierten Zustand befinden und verschieben das Gleichgewicht nahezu vollständig hin zur aktiven Konformation (s. Abb. 4, B). Agonisten weisen eine intrinsische Aktivität auf, die ein Maß für die maximale Wirkung ist, die mit einer Substanz in dem jeweiligen biologischen System erreichbar ist. Bei Anwesenheit eines **partiellen Agonisten** wird das Gleichgewicht hingegen weniger stark zum aktivierten Zustand hin verschoben. **Antagonisten** blockieren den Rezeptor durch Bindung an alle Zustände des Rezeptors. Sie verschieben das Gleichgewicht nicht (s. Abb. 4, C). **Inverse Agonisten/Antagonisten** setzen die Anzahl der ursprünglich aktiven Rezeptoren herab, so dass sich mehr Rezeptoren im inaktivierten Zustand befinden als im Ruhezustand, sie verschieben also das Gleichgewicht hin zu inaktiven Rezeptoren (s. Abb. 4, D).^{4, 26, 154}

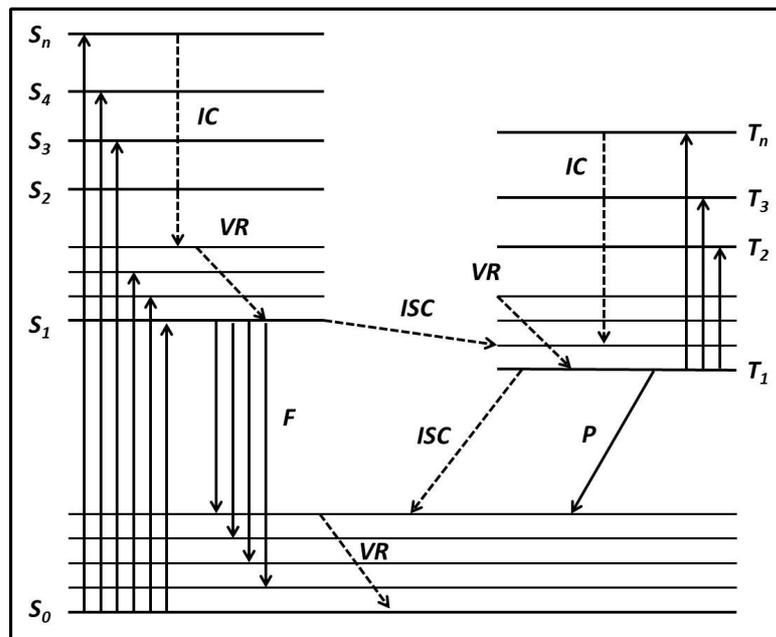
Die Klasse der Agonisten kann weiter unterteilt werden in volle und partielle Agonisten. Diese Unterteilung erfolgt durch Betrachtung der intrinsischen Aktivität, die das Verhältnis zwischen dem hervorgerufenen Effekt und dem maximal möglichen Effekt in einem biologischen System angibt. Die intrinsische Aktivität kann somit Werte zwischen null und eins annehmen. Beträgt die intrinsische Aktivität eins, so ist der Ligand als Vollagonist zu betrachten. Liegt der Wert zwischen 0 und 1 so ist der vorliegende Ligand ein partieller Agonist. Partielle Agonisten wirken dualistisch. In Anwesenheit eines vollen Agonisten zeigen partielle Agonisten antagonistische Effekte, wohingegen in Abwesenheit eines Agonisten agonistische Effekte beobachtet werden.^{26, 154}

Auch die Gruppe der Antagonisten kann in weitere Untergruppen unterteilt werden. **Kompetitive Antagonisten** konkurrieren mit einem Agonisten um die Bindung an denselben Rezeptor, wobei Agonist und kompetitiver Antagonist einander gegenseitig durch Konzentrationserhöhung von der Bindungsstelle verdrängen können. Dies zeigt sich in der Parallelverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve des Agonisten nach rechts bei Anwesenheit des kompetitiven Antagonisten. **Nichtkompetitive** oder auch **allosterische Antagonisten** können den Effekt eines Agonisten abschwächen. So kann der Antagonist an einer von der Bindungsstelle des Agonisten verschiedenen Stelle des Rezeptors binden und somit die Konformation des Rezeptors dahingehend verändert, dass die Affinität des Agonisten sinkt. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass nicht die Bindung des

Agonisten an den Rezeptor beeinflusst wird, sondern die nachfolgende Signaltransduktion. Allen Fällen gemein ist, dass die Konzentrations-Wirkungskurve des Agonisten in Anwesenheit des Antagonisten eine geringere Steigung und auch einen erniedrigten Maximaleffekt aufweist. **Kompetitiv-nichtkompetitive Antagonisten** wirken in niedrigen Konzentrationen kompetitiv antagonistisch und bei höheren Konzentrationen nichtkompetitiv. Das führt dazu, dass die Konzentrations-Wirkungskurve des Antagonisten in Anwesenheit niedriger Konzentrationen des Antagonisten nach rechts verschoben ist und bei höheren Konzentrationen die Steigung und der Maximaleffekt verringert werden. Fungiert eine Verbindung als Agonist und schwächt durch einen entgegengesetzten Effekt die Wirkung eines anderen Agonisten, der an einem anderen Rezeptor bindet, ab, so spricht man von einem **funktionellen Antagonisten**. Unter **chemischen Antagonisten** versteht man Substanzen, die chemisch mit einem Wirkstoff reagieren und diesen damit inaktivieren. ^{4, 26, 154}

4.3 FLUORESCENZ

Wird einem Molekül Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung zugeführt, so wird diese Energie im Molekül transformiert. Handelt es sich bei der Strahlung um niederenergetische Strahlung, wie z.B. Infrarot- oder Mikrowellenstrahlung, so wird diese in Schwingungsenergie, sprich in Wärme, umgewandelt. Trifft allerdings höherenergetisches Licht (sichtbares oder ultraviolettes Licht) auf ein Molekül, werden Elektronen aus dem elektronischen Grundzustand (S_0) in ein unbesetztes Orbital mit höherem Energiegehalt (S_1) angehoben. Das Molekül befindet sich dann in einem elektronisch angeregten Zustand¹⁵⁵. Das folgende *Jablonski*-Diagramm illustriert diese Vorgänge (s. Abb. 26).



Der Übersichtlichkeit halber wurde auf Rotationsenergieniveaus verzichtet.
 (F: Fluoreszenz, P: Phosphoreszenz, IC: internal conversion (strahlungslose Deaktivierung), ISC: intersystem crossing, VR: vibrational relaxation, S_{0-n} : Singulettzustände, T_{1-n} : Triplettzustände).

Abb. 26 Jablonski-Diagramm für organische Farbstoffmoleküle in Anlehnung an G. Wedler.¹⁵⁶

In diesem Diagramm werden die Energie-Niveaus durch horizontale Linien dargestellt. Das niedrigste Energieband ist der elektronische Grundzustand S_0 , die niedrigste Energie des ersten angeregten Singulett-Zustands wird als S_1 bezeichnet, wohingegen T_1 die niedrigste Energie des Triplett-Zustandes darstellt.

Bei der Anregung wird ein Photon von dem sich im Grundzustand befindlichen Molekül absorbiert und in den angeregten Zustand angehoben. Dieser angeregte Zustand ist unterteilt in energetisch unterschiedliche Schwingungsniveaus. In welches Schwingungsniveau das Elektron angehoben wird, ist abhängig von der Energie des absorbierten Photons. Diese angeregten Zustände relaxieren rasch in die *Boltzmann-Verteilung* der Schwingungszustände des ersten elektronisch angeregten Singulett-Zustands S_1 (*Kasha-Regel*)¹⁵⁷ mittels strahlungsloser Relaxation (internal conversion, IC). Durch Stöße mit seiner Umgebung kann das Molekül Energie durch strahlungslose Desaktivierung abgeben und in den Schwingungsgrundzustand des angeregten Zustandes gelangen (Schwingungsrelaxation, VR). Da die Umgebung nicht in der Lage ist den großen Energiebetrag, der bei der Rückkehr des Moleküls in den elektronischen Grundzustand freigesetzt wird, aufzunehmen, existiert der angeregte Zustand lange genug, um diese verbliebene Energie spontan in Form von Strahlung (Fluoreszenz) abzugeben ($\tau \approx 10^{-8}$ s). Der Übergang erfolgt hier unter Erhalt der Spin-Multiplizität. Dies erfolgt insbesondere bei stabilen, konjugierten, polyaromatischen Kohlenwasserstoffen oder Heterocyclen. Der Übergang erfolgt dabei gemäß dem Franck-Condon-Prinzip, so dass sich die Geometrie des Fluoreszenzfarbstoffes im angeregten und Grundzustand unterscheiden lässt (unterschiedliche Bindungslängen und -winkel).^{155, 156} Das resultierende Fluoreszenzspektrum weist eine für den elektronischen Grundzustand charakteristische Schwingungsstruktur auf. Die Photoemission ist ein unimolekularer Vorgang bezogen auf die Konzentration des angeregten Zustandes. Die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz liegt in der Größenordnung von 10^7 bis 10^9 s⁻¹.

Falls die Spin-Bahn-Kopplung stark genug ist, besteht die Möglichkeit der Spinentkopplung der Elektronen, d.h. es besteht die Möglichkeit des Übergangs von dem Singulett- in den Triplettzustand durch ein sogenanntes *Intersystem crossing* (IC). IC gewinnt an Bedeutung beim Vorhandensein von schweren Atomen, da die Spin-Bahn-Kopplung dann groß genug wird. Nach dem Übergang des Moleküls in den Triplettzustand tritt auch hier Schwingungsrelaxation ausgelöst durch Stöße des Moleküls mit der Umgebung auf, so dass der Schwingungsgrundzustand des Triplettzustandes erreicht wird (T_1). Da dieser Schwingungsgrundzustand energetisch unterhalb dessen des Singulettzustandes liegt, kann das Intersystem crossing nicht umgekehrt werden und das Molekül ist dort quasi „gefangen“ (*Hund'sche-Regel*). Die Umgebung ist nicht in der Lage den Energiebeitrag, der bei der Rückkehr in den elektronischen Grundzustand freigesetzt

wird, aufzunehmen. Aber auch die Freisetzung der Energie in Form von Strahlung ist nicht möglich, da die Rückkehr in den elektronischen Grundzustand unter Spinumkehr erfolgen müsste und dies einen verbotenen Übergang darstellt. Da allerdings die Spin-Bahn-Kopplung, die bereits das Intersystem Crossing ermöglichte, die Auswahlregel für strahlende Singulett/Triplett-Übergänge durchbricht, ist dieser Übergang schwach erlaubt. Die Deaktivierung ist in Folge dessen sehr langsam und die Emission ist auch lange nach Abschalten der anregenden Strahlungsquelle beobachtbar. Die Lebensdauer des T_1 -Zustandes kann von Millisekunden bis hin zu mehreren Stunden reichen. Die Anregungsenergie wird, im Gegensatz zur Fluoreszenz, also in einer Art Reservoir gespeichert. Dieser Vorgang wird als Phosphoreszenz bezeichnet. Phosphoreszenz tritt häufig in Festkörpern auf, da der Energietransfer an die Umgebung langsam von statten geht und so das Intersystem crossing und die langsame Schwingungsrelaxation begünstigt wird. Die Anwesenheit schwerer Atome erhöht die Effizienz der Phosphoreszenz, da diese eine große Spin-Kopplung aufweisen.

Da bei beiden Vorgängen, wie bereits oben erwähnt, ein Energieverlust durch Stöße des Moleküls mit der Umgebung auftritt, kann ein Unterschied zwischen den Wellenlängenmaxima der Absorptions- und Emissionsmaxima beobachtet werden. Dieser Effekt wurde von Stokes erstmals beschrieben und ist als *Stokes-Verschiebung* bekannt.^{155,}
156

Eben diese Zusammenstöße des Fluorophors mit dessen unmittelbaren Umgebung können auch zu einem vollständigen Verlust der Fluoreszenz, dem sog. Quenching führen. Dabei spielt es keine Rolle, ob es sich bei den Zusammenstößen um Lösungsmittelmoleküle oder um andere Fluorophore handelt. In letzterem Fall spricht man auch von „self-quenching“. Dieser Prozess ist bei Beseitigung der Ursache – sprich Wechsel des Lösungsmittels bzw. stärkere Verdünnung – reversibel.

Aber nicht nur durch Quenching sondern auch durch die Einwirkung von Licht kann ein Verlust der Fluoreszenz beobachtet werden. In diesem Fall spricht man von Photobleaching. Insbesondere bei photosensitiven Fluorophoren, wie beispielsweise bei Fluorescein, stellt dieser photophysikalische Parameter in praktisch jeder fluoreszenzspektroskopischen Anwendung, die eine hohe Sensitivität oder hohe Ausleseraten benötigt, einen kritischen Faktor dar, da hierbei der Fluorophor irreversibel geschädigt wird.¹⁵⁸ Bei der Planung von Experimenten, die die oben genannten

Anforderungen stellen, sollte daher bereits bei der Wahl des Fluorophors auf dessen Photostabilität geachtet werden, um diese Problematik zu umgehen.

Eine Alternative zu der Rückkehr in den elektronischen Grundzustand ist die Möglichkeit des angeregten Zustandes zur Dissoziation. Im elektronischen Absorptionsspektrum lässt sich das Einsetzen der Dissoziation an einem Abbruch der Schwingungsstruktur bei einer definierten Energie beobachten (s. Abb. 27).

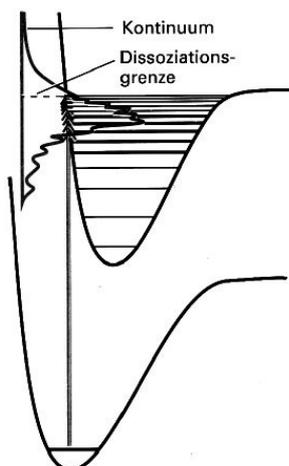


Abb. 27 Mechanismus der Prädissociation.¹⁵⁵

Ab diesem Punkt findet die Absorption in einem kontinuierlichen Frequenzband statt, da die Energie in unquantisierte Translationsbewegungen der Bruchstücke umgewandelt wird. Gelegentlich kann aber auch das Abbrechen der Schwingungsstruktur bei einer definierten Energie beobachtet werden, wobei diese bei höheren Energien wieder einsetzt. Dieses Phänomen wird als Prädissociation bezeichnet. Die Ursache dieser Beobachtung kann durch das Vorhandensein von zwei sich überschneidenden Potentialkurven erklärt werden. An diesem Punkt weisen die beiden Kerne die gleiche Anordnung auf, so dass das Molekül an diesem Schnittpunkt in einen anderen angeregten Zustand übergehen kann, der allerdings im Gegensatz zu dem bereits oben angesprochenem Intersystem Crossing die gleiche Multiplizität aufweist. Dieser Vorgang ist als innere Umwandlung bekannt. Der Zustand, in den das Molekül übergegangen ist, kann dissoziativ sein, so dass die Potentialkurve kein Energieminimum aufweist. Aus diesem Grund sind die Energien der Schwingungszustände in der Nähe des Potentialkurvenschnittpunktes nur unscharf definiert und das Absorptionsspektrum ist in unmittelbarer Nähe dieser Stelle „verschmiert“. Falls das eingestrahelte Photon allerdings so energiereich ist, dass das

Molekül in einen Schwingungszustand weit oberhalb des Schnittpunktes angehoben wird, so ist die Wahrscheinlichkeit für eine innere Umwandlung aufgrund der geringeren Wahrscheinlichkeit, dass die Kerne gleiche Anordnung aufweisen, sehr gering. Daraus resultiert, dass die Energie-Schwingungsniveaus wieder scharf definiert sind und die Schwingungsstrukturen im Absorptionsspektrum bei höheren Frequenzen wieder sichtbar werden.^{155, 156}

4.4 FLUORESCENZMARKIERUNG VON KLEINEN MOLEKÜLEN

Die Vergabe des Chemie-Nobelpreises im Jahr 2008 an Shimomura, Chalfie und Tsien macht deutlich, dass die Fluoreszenzmarkierung von Proteinen, Rezeptoren und Liganden ein wichtiges Werkzeug darstellt, um Prozesse innerhalb der Zelle aufzuklären und um letztendlich auch ein Verständnis dafür zu erlangen, welche Konsequenzen eine Fehlfunktion in diesem Bereich hat. Die drei Preisträger entwickelten ein grün fluoreszierendes Protein (GFP), welches aus einer Quallenart *Aequorea victoria* isoliert und in der Folgezeit weiterentwickelt wurde, so dass verschiedenste Proteine und Zellen in einer breiten Farbpalette fluoreszenzmarkiert werden können und damit eine Vielzahl von simultanen Prozessen beobachtet werden können. Die Fluoreszenzmarkierung mittels Proteinen wie GFP oder YFP (gelb fluoreszierendes Protein) wird heutzutage fast als Standardtechnik in den Laboren verwendet und führte zum Teil zu faszinierenden Erkenntnissen.

Wenn nun allerdings anstelle von Proteinen Liganden, d.h. „kleine Moleküle“ fluoreszenzmarkiert werden sollen, ist die Verwendung von fluoreszierenden Proteinen wie z.B. GFP nicht sinnvoll, da Proteine eine wesentlich größere Molekülmasse aufweisen als der zu markierende Ligand selber.

Diese „kleinen Moleküle“ (im englischen Sprachgebrauch wird oft von sogenannten „small molecules“ gesprochen) sind kleine Wirkstoffmoleküle (sowohl synthetische als auch natürliche), die bei der klassischen Verwendung als Medikamente in der Therapie oder Diagnostik von Erkrankungen verwendet werden können. Ein weiteres Anwendungsgebiet der „kleinen Moleküle“ ist unter dem Begriff „chemical biology“ oder „chemical genetics“ bekannt. Dabei handelt es sich um die Nutzung biologisch aktiver, kleiner Moleküle, die bei der Aufklärung von Genfunktionen und molekularer Mechanismen eingesetzt werden.

Das Konzept der kleinen Moleküle, die spezifisch an Proteine (Zielproteine) binden können, wurde von Paul Ehrlich¹⁵⁹ bereits am Anfang des 20. Jahrhunderts entwickelt und führte zu der allgemeinen Vorstellung, dass mit Hilfe von kleinen organischen Molekülen für jedes Protein das passende kleine Molekül identifiziert werden könnte, das dessen Funktion inhibiert.¹⁶⁰

Dabei muss allerdings beachtet werden, dass die Moleküle Wasser- und DMSO-löslich sein sollten und außerdem den Lipinski-Regeln („rule of five“) folgen sollten.^{161, 162} Die Lipinski-Regeln besagen, dass ein Wirkstoffmolekül einen Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient kleiner fünf, weniger als fünf Wasserstoffbrückendonoren und weniger als zehn Wasserstoffbrückenakzeptoren aufweisen sollte. Weicht das Molekül von zwei dieser Parameter ab, ist es sehr wahrscheinlich, dass dieses eine geringe Absorptionsfähigkeit bzw. eine niedrige Permeabilität aufweist und damit als Wirkstoffmolekül ungeeignet ist.

Die Markierung von kleinen Molekülen ist wie bereits oben erwähnt mit GFP nicht durchführbar. Daher wurden kleinere Fluorophore entwickelt, die in etwa der Molmasse - am besten aber deutlich darunter - des zu markierenden Liganden entsprechen. Dies ist wichtig, da ansonsten das „small molecule“ eine zu große Änderung seiner Eigenschaften erfährt und damit die realen Zustände innerhalb der Zelle nicht mehr widerspiegelt werden. Fluorophore für „small molecules“ werden heutzutage standardmäßig eingesetzt, z.B. um kleine Liganden zu markieren und so die Bindung an einen Rezeptor oder die Verteilung des „small molecules“ in der Zelle zu beobachten. Desweiteren besteht die Möglichkeit anstelle von Radioligandbindungsstudien einen Fluoreszenz-Assay mit einem solchen fluoreszenzmarkierten „small molecule“ zu entwickeln. Die Verwendung von fluoreszenzbasierten Assays hat beispielsweise den Vorteil, dass der Umgang mit Radioaktivität und damit auch die speziellen Anforderungen an Labor und Mitarbeiter sowie das Anfallen von kostenintensivem, radioaktivem Abfall umgangen werden.

4.4.1 FLUORESCENZMARKIERTE LIGANDEN

Fluoreszenzmarkierte Liganden sind wichtige Hilfsmittel bei der Charakterisierung und Identifizierung biologischer Zielstrukturen (Targets) und heutzutage aus den Laboren nicht mehr wegzudenken. Seit Mitte der 1970er werden diese verwendet, wobei die Darstellung durch einfache Verknüpfung an einen bekannten affinen Liganden erreicht wurde. Hauptsächlich wurden diese fluoreszenzmarkierten Liganden für die Färbung von histologischen Schnitten entwickelt und meistens wurde weder dessen Affinität an den Rezeptor noch die verwendete Konzentration berücksichtigt.

Heutzutage hat sich die Erkenntnis durchgesetzt, dass fluoreszenzmarkierte Liganden signifikante Unterschiede der Bindungseigenschaften im Vergleich mit dem nativen Liganden aufweisen können. Eine Bestimmung der Affinität und der Selektivität dieser neuen Liganden ist daher zwingend notwendig, um einerseits pharmakologische Rückschlüsse ziehen zu können und andererseits diese in stör anfälligen, fluoreszenzbasierten Assays verwenden zu können. Die Entwicklung neuer fluoreszenzmarkierter Liganden ist daher nicht trivial, da zum Teil große Fluorophore in die bereits bekanntermaßen affine Ligandenleitstruktur eingebaut werden. Dies führt zwangsläufig dazu, dass der Fluorophor sich wesentlich dichter am Pharmacophor befindet, als dies beispielsweise bei fluoreszenzmarkierten Peptiden der Fall ist, und somit die Ligandenaffinität und dessen Effekt stark beeinflussen kann. Um dieses Problem zu umgehen, ist es gängige Praxis, den Liganden und den Fluorophor durch einen Linker oder Spacer voneinander zu trennen. Die chemische Beschaffenheit sowie dessen Länge werden daraufhin variiert und für die gewünschte biologische Aktivität optimiert.¹⁶³ Dabei kann die Optimierung des Liganden so erfolgreich verlaufen, dass der entwickelte fluoreszierende-Ligand eine höhere Affinität als die ihm zugrunde liegenden Leitstruktur aufweist. Ein Beispiel für diesen Fall zeigen die Untersuchungen von Tahtaoui *et al.* an dem mit EGFP fusionierten humanen M₁ muscarinischen Rezeptor. Zwei der mit dem Fluorophor BODIPY markierten Liganden wiesen geringer K_i-Werte am humanen M₁-Rezeptor auf, als die ihnen zugrunde liegende Leitstruktur Pirenzipin.¹⁶⁴

Der gegenteilige Effekt ist bei den Untersuchungen von Middleton *et al.* am humanen A₁-Adenosin-Rezeptor aufgetreten. Dort wurde der physiologische Ligand Adenosin¹⁶⁵ und XAC^{166, 167} mit dem kommerziell erhältlichen BODIPY 630/650 fluoreszenzmarkiert.

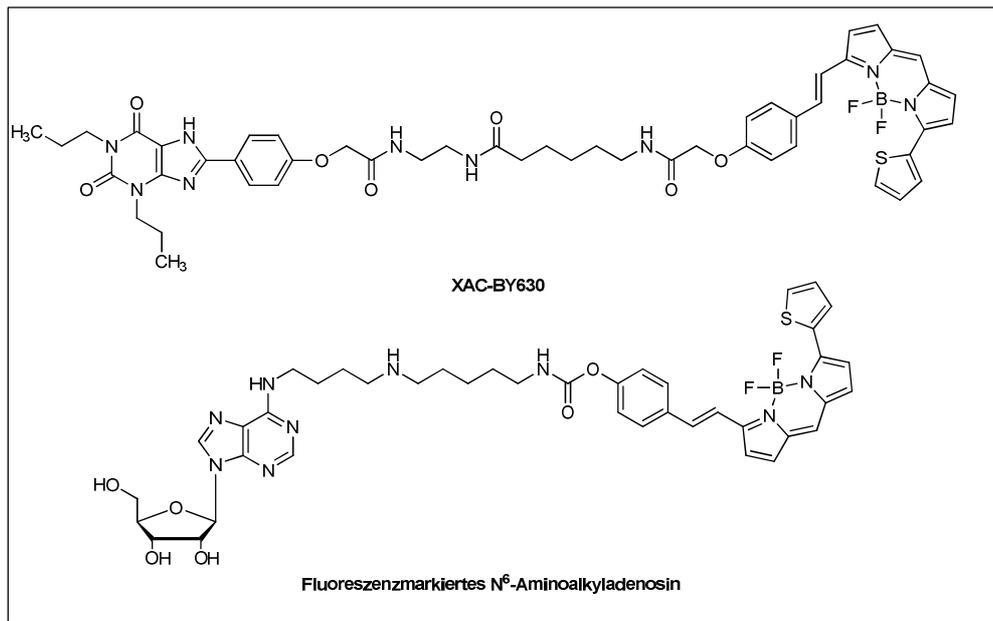


Abb. 28 Strukturen fluoreszenzmarkierter A₁-Agonisten von Middleton *et al.*¹⁶⁷

Beide Strukturen wiesen eine zehnfach niedrigere Affinität an den humanen A₁-Adenosinerezeptor auf, als die jeweils unmarkierten Liganden.

Die großen Vorteile von fluoreszenzmarkierten Liganden bestehen darin, dass diese ein wesentlich geringeres Sicherheits- und Abfallproblem darstellen und nebenbei auch kostengünstiger sind als beispielsweise radioaktivmarkierte Liganden. Ein weiterer großer Vorteil ist die teilweise höhere Sensitivität von fluoreszenzbasierten Assays im Vergleich zu radioaktiv basierten Assays.

Der ideale Fluorophor für die Markierung von Liganden sollte so klein wie möglich sein, um die Eigenschaften des Moleküls so wenig wie möglich zu verändern, da nur so das tatsächliche Verhalten an dem zu untersuchenden Target möglichst realistisch wiedergegeben werden kann. Außerdem sollte der fluoreszenzmarkierte Ligand spezifisch sein, um unspezifische Bindung so gering wie möglich zu halten und damit ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis zu erlangen. Des Weiteren sollte der fluoreszenzmarkierte Ligand zellgängig sein und keinerlei Cytotoxizität aufweisen. Ein breiter Anwendungsbereich, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als auch auf Zelloberflächen und an oder auf Zellmembranbruchstücken wäre wünschenswert.¹⁶⁸

Natürlich ist es nahezu unmöglich all diese Eigenschaften in einem Molekül zu vereinigen. Daher hat jedes fluoreszierende Molekül seine Vor- und Nachteile und keines erfüllt zugleich alle genannten Anforderungen. Für die Planung eines aussagekräftigen und damit erfolgreichen Experiments ist es daher hilfreich, die Stärken und Schwächen des jeweiligen Farbstoffes zu kennen, um den für das Experiment am besten passenden auszuwählen.

4.5 FLUORESZENZFARBSTOFFE

4.5.1 FLUORESCEIN

Fluorescein wurde erstmals von Bayer 1871 durch Reaktion von Phthalsäureanhydrid mit Resorcin unter Zugabe der Lewis-Säure Zinnchlorid dargestellt. BASF reichte in den folgenden Jahren Patente für die Synthese von Fluorescein-Derivaten ein.¹⁶⁹ Fluorescein ist stark fluoreszierend und weist ein Absorptionsmaximum von 492 nm und ein Emissionsmaximum von 521 nm in Wasser auf. Für Fluorescein liegt die Fluoreszenzquantenausbeute bei einem pH-Wert > 8 bei $\Phi = 0,92$.¹⁷⁰ Es wurden zahlreiche Derivate des Fluoresceins dargestellt, um eine verbesserte Photostabilität und pH-Stabilität zu erzielen. Einige dieser Derivate sind in Abb. 29 dargestellt.

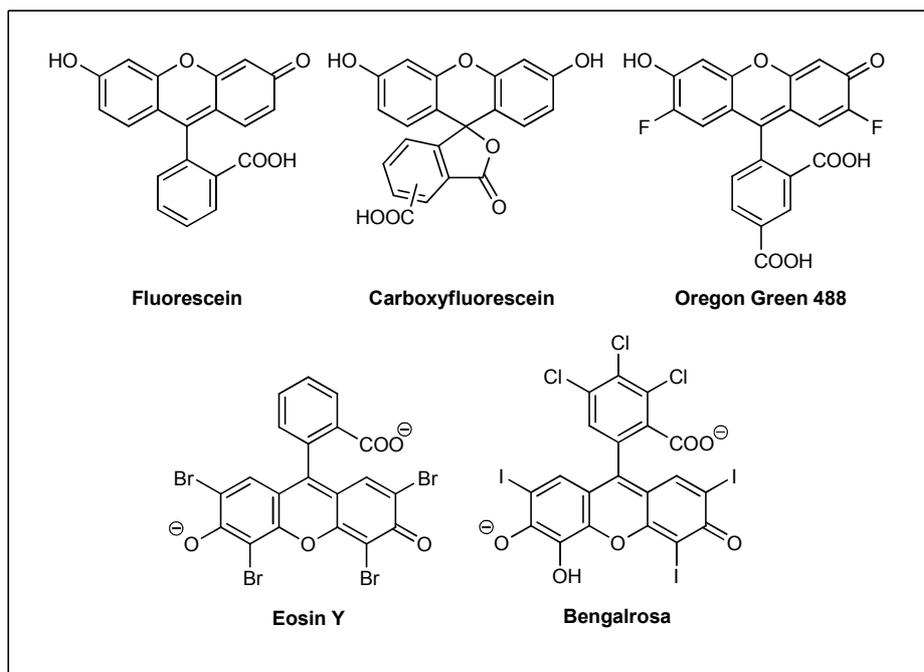


Abb. 29 Fluorescein und seine Derivate.

Die so dargestellten Derivate, beispielsweise Eosin oder Bengalrosa weisen allesamt deutlich geringere Fluoreszenzquantenausbeuten auf als die Leitstruktur Fluorescein.¹⁷¹ Fluorescein liegt in wässriger Lösung abhängig vom pH-Wert als Kation, Anion oder als Neutralteilchen vor. Somit sind die spektroskopischen Eigenschaften von Fluorescein sehr stark vom pH-Wert abhängig. Der pK_a -Wert von Fluorescein beträgt 6,4. Damit liegt Fluorescein bei physiologischen pH-Wert größtenteils in der nicht-fluoreszierenden

Spirolactonform vor.^{170, 172, 173} Der pK_a -Wert fluorierter Fluorescein-Derivate (beispielsweise Oregon Green) ist deutlich niedriger als der von Fluorescein. So bleibt bei diesen Derivaten auch bei niedrigen pH-Werten die Fluoreszenzquantenausbeute ausreichend hoch für biologische Anwendungen.¹⁷³

Die Photostabilität von Fluorescein und seinen Derivaten ist als großer Nachteil dieser Farbstoffklasse anzusehen, da bei vielen Anwendungen, wie beispielsweise langer Beobachtungszeiträume bei der Fluoreszenzmikroskopie oder Detektion geringer Rezeptordichten ein Ausbleichen der Strukturen bereits nach sehr kurzer Zeit beobachtet wird.¹⁷⁴

4.5.2 RHODAMIN-FARBSTOFFE

Rhodamin-Farbstoffe weisen eine strukturelle Ähnlichkeit zu Fluorescein auf und zählen ebenso zu den Xanthenfarbstoffen. Ein Patent für die Synthese von Tetramethylrhodamin wurde bereits 1888 eingereicht. In den 1970er Jahren wurden erstmals die Vorteile von Rhodamin-Farbstoffen gegenüber Fluorescein herausgestellt.¹⁷⁵ Ein entscheidender Vorteil der Rhodamin-Farbstoffe liegt vor allem in dem höherwelligem Absorptionsmaximum, so dass eine Fluoreszenzmarkierung unter Umgehung der Eigenfluoreszenz des Gewebes erfolgen kann. Mittlerweile wurden zahlreiche symmetrische aber auch unsymmetrische Derivate beschrieben (s. Abb. 30).

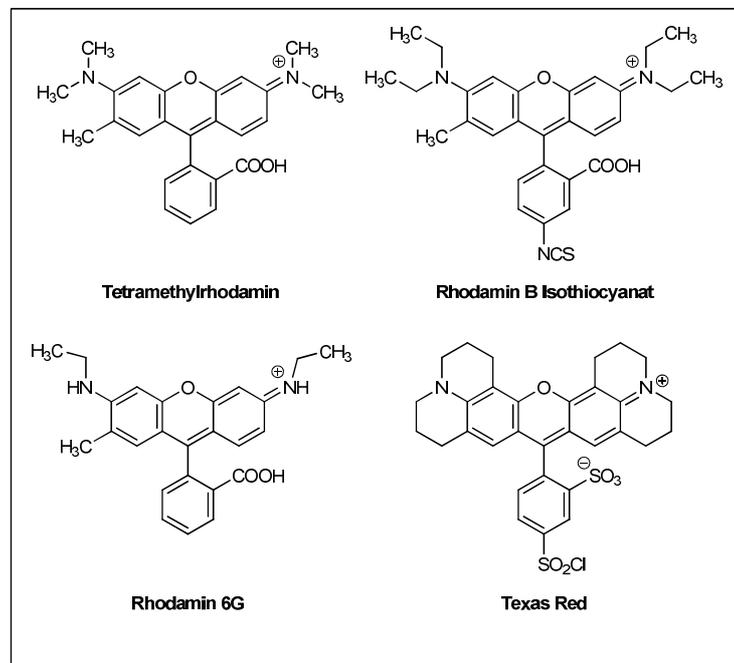


Abb. 30 Rhodamin-Fluoreszenzfarbstoffe.

Die meisten Rhodamin-Derivate besitzen sehr hohe Fluoreszenzquantenausbeuten von nahezu $\Phi = 1$. Wie bereits oben erwähnt besteht eine strukturelle Ähnlichkeit zu Fluorescein, so dass die Tatsache, dass Rhodamin-Derivate im basischen ebenfalls in der Spirolactam-Form vorliegen, welche nicht fluoresziert, nicht erstaunt.¹⁷² Neuere Rhodamin-Derivate konnten durch Substitutionen an Position 2 des Phenylrestes eine Erhöhung der Stabilität in einem pH-Wert-Bereich zwischen 4 und 10 erreichen.¹⁷⁴ Ein entscheidender Nachteil der Rhodamin-Derivate stellt ihre Tendenz zum Photobleichen dar, so dass die Fluorophor-Klasse für viele biologische Anwendungen mit langer Beobachtungszeit, ebenso wie Fluorescein-Derivate, ungeeignet ist. Ein weiteres Problem

einiger Rhodamin-Farbstoffe stellt die potentielle kanzerogene-, mutagene- und Öko-Toxizität dar. Rhodamin B ist hierbei besonders hervorzuheben.

4.5.3 COUMARIN-FARBSTOFFE

Das Grundgerüst der Coumarin-Farbstoffe leitet sich von Coumarin, einem sekundären Pflanzenstoff ab. Dieser wird von vielen verschiedenartigen Pflanzen gebildet wie beispielsweise von Schmetterlingsblütlern, gelbem Steinklee (*Melilotus officinalis*), Waldmeister (*Gallium odoratum*), Datteln (*Phoenix dactylifera*) oder der Tonkabohne (*Dipteryx odorata*).¹⁷⁶ Synthetische Coumarin-Derivate wurden ursprünglich für die Verwendung von Farbstofflasern entwickelt.¹⁷⁷ Die fluoreszierenden Eigenschaften wurden bereits in den 1940er Jahren beschrieben.^{178, 179} Während Coumarine in unpolaren Lösungsmitteln sehr hohe Fluoreszenzquantenausbeuten aufweisen, sinken diese bei steigender Polarität des Lösungsmittels. Durch Einführung einer rigiden Seitenkette in Position 7 ist dieser Effekt schwächer ausgeprägt.¹⁸⁰ Am häufigsten werden 7-Aminocoumarine oder Derivate des Hydroxycoumarins verwendet (s. Abb. 31). Ein bekannter Coumarin-Farbstoff ist Marina Blue™, der von der Firma *Molecular Probes* vertrieben wird.¹⁷⁴

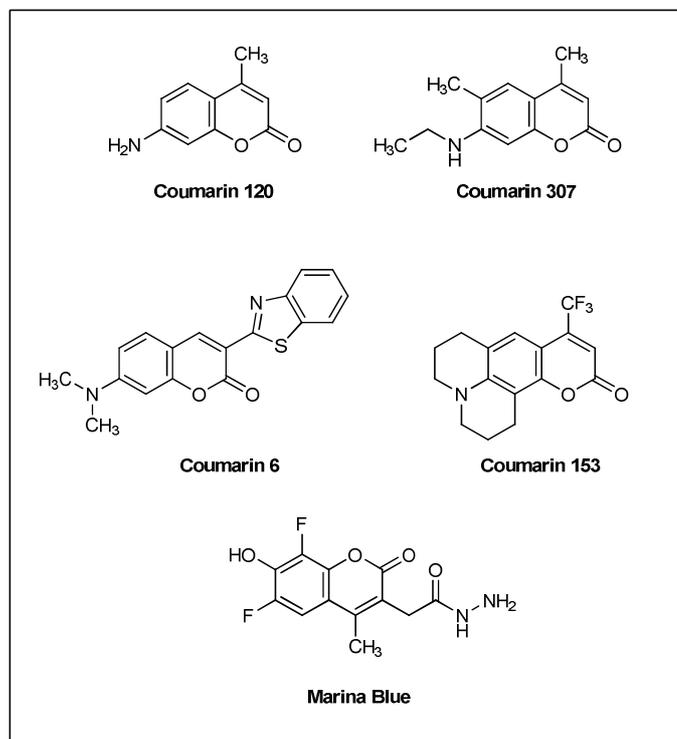


Abb. 31 Coumarin-Farbstoffe.

Der Absorptionsbereich der Coumarine erstreckt sich vom nicht sichtbaren Bereich im nahen UV bis hin in den sichtbaren Bereich im blauen Spektralbereich. Die Emission liegt bei dieser Substanzklasse zwischen 420 und 590 nm. Coumarine weisen hohe Fluoreszenzquantenausbeuten bei allerdings mittleren Absorptionskoeffizienten auf.¹⁸¹ Aufgrund der Absorptionsmaxima im nahen UV-Bereich vieler Coumarin-Farbstoffe besteht die Gefahr, dass es aufgrund der energiereichen Strahlung zu Schäden in den biologischen Strukturen kommt. Außerdem bestehen Schwierigkeiten aufgrund der Eigenfluoreszenz des Gewebes, dessen Emissionsmaxima sich mit denen der Coumarine überlagert.¹⁷⁴

4.5.4. ALEXA-FARBSTOFFE

Alexa-Farbstoffe werden häufig in der Fluoreszenzmikroskopie und Zellbiologie zur Fluoreszenzmarkierung von Zellen und Geweben verwendet.

Die Alexa-Fluoreszenzfarbstoffe wurden nach dem Sohn des Gründers der Firma *Molecular Probes* Alex Haughland benannt. Den Farbstoff Marina Blue, der allerdings zur Klasse der Coumarine gezählt wird (s. Kapitel 4.5.3), benannte er nach seiner Tochter Marina. (s. Abb. 31) Die Farbstoffe sind kommerziell erhältlich, allerdings kostenintensiv.

Alexa-Fluorophore werden durch Sulfonierung von Rhodamin-, Coumarin-, Cyanin- oder Xanthenderivaten erhalten. Die Sulfonierung führt dazu, dass Alexa-Farbstoffe bei physiologischem pH-Wert eine negative Ladung tragen und damit wasserlöslicher als die Grundstrukturen sind. Die so sulfonierten Fluorophore zeigen eine verringerte Aggregation und damit eine reduzierte Quenchrage.¹⁸² Außerdem sind Alexa-Farbstoffe photochemisch und über einen breiten pH-Wert-Bereich stabil und weisen eine höhere Leuchtkraft neben verminderter Neigung zum Photobleichen im Vergleich zu analogen Rhodamin oder Cyanin-Derivaten auf.¹⁸³

Das Absorptions- und Emissionsspektrum von Alexa-Fluorophoren reicht über den gesamten sichtbaren Bereich des Lichts bis hin zum NIR (naher Infrarotbereich). Die Nummern hinter den einzelnen Namen der Fluorophoren geben das jeweilige Absorptionsmaximum an (s. Abb. 32).

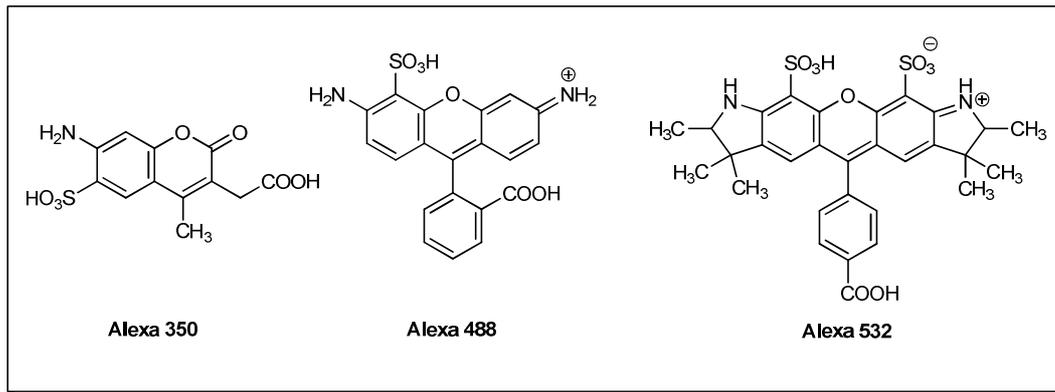
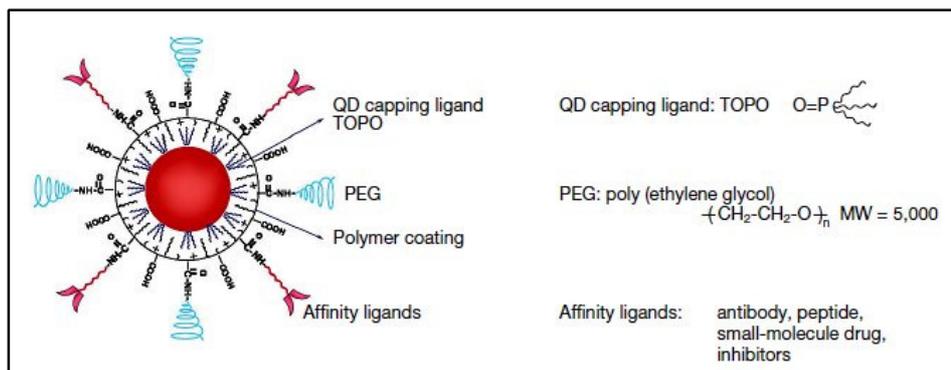


Abb. 32 Alexa-Fluoreszenzfarbstoffe.

4.5.5 QUANTUM DOTS

Quantum Dots (QD) (oft auch als „colloidal semiconductor nanocrystals“ bezeichnet) wurden Anfang der 1980er von Alexei Ekimov und Louis E. Brus entdeckt. QD sind monodisperse kristalline Cluster und weisen eine Größe zwischen 1-10 nm auf. Der Kern besteht hauptsächlich aus Atomen der Hauptgruppen II-VI, III-V oder IV-VI. Große Bedeutung haben dabei die Verbindungen CdSe, CdTe, ZnSe, CdS, InP und CdSe/ZnS erlangt. Die Hülle der Quantum Dots besteht oftmals aus ZnS auf dessen Oberfläche Liganden gebunden werden können (s. Abb. 33). Diese Liganden können beispielsweise durch hydrophilere Liganden ausgetauscht werden, so dass die Wasserlöslichkeit, die für viele biologische Testsysteme erforderlich ist, erhöht wird.



TOPO = Tri \underline{t} ocetylphosphin \underline{o} xid; PEG = Poly \underline{e} thylenglykol

Abb. 33 Struktur eines multifunktionalen Quantum Dots mit Copolymerschicht bestehend aus TOPO und verschiedenen Liganden für die Wechselwirkung mit dem Target.¹⁸⁴

Quantum Dots zeigen aufgrund ihrer Größe optische, elektronische und mechanische Eigenschaften, die sich stark von den klassischen, eine sehr große Anzahl an Atomen

umfassenden Halbleitern unterscheiden. In Halbleitern herrscht zwischen dem Valenz und dem Leitungsband eine feste Energielücke (s. Abb. 34).

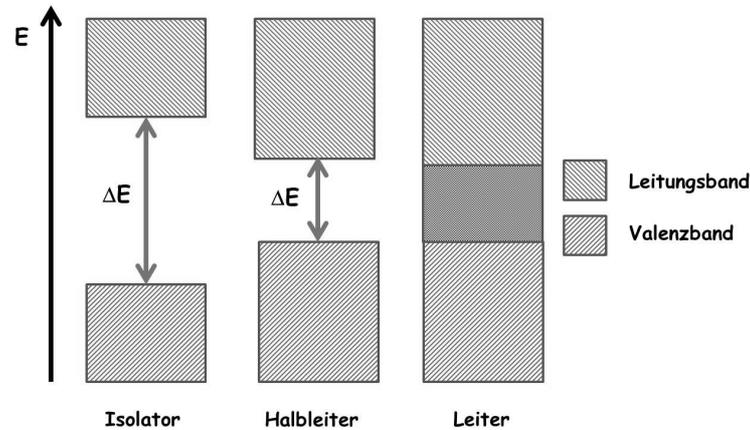


Abb. 34 Schematisches Energiebändermodell eines Isolators, Halbleiters und Leiters.

In Quantum Dots sind die Energieniveaus aufgrund der sehr geringen Größe diskret, so dass die Energielücke abhängig ist von der Größe des Quantum Dots. Je kleiner die Größe des Quantum Dots ist, desto größer wird die Energielücke zwischen Valenz- und Leitungsband. Dies resultiert in einer Emission von Licht mit kürzerer Wellenlänge (hypsochromer Effekt).¹⁸⁵

Die Vorteile bei der Verwendung von Quantum Dots zur Markierung von Biomolekülen liegen zum einen in der hohen photochemischen Stabilität gegenüber vielen organischen Farbstoffen und zum anderen in der Möglichkeit, mehrere Strukturen gleichzeitig darstellen zu können. Dies ist aufgrund der freien Wählbarkeit der Absorptionswellenlänge und den sehr symmetrischen Emissionsspektren mit geringerer Halbwertsbreite (FWHM zwischen 30-90 nm) möglich. Mittlerweile sind Quantum Dots kommerziell erhältlich, was zu einem sprunghaften Anstieg der Anzahl der Veröffentlichungen führte, die biologische Targets mit Quantum Dots markieren. Ein großer Nachteil der Quantum Dots ist die Verwendung von Cadmiumselenid oder Cadmiumtellurid im Kern der Quantum Dots.¹⁸⁶ Cadmium und Selen sind dafür bekannt, in Zellen und Organismen akut und chronisch toxisch zu wirken, da beide in Zellen aufgenommen werden, in Calciumkanäle eingelagert werden und so akkumulieren.^{187, 188} Cadmium führt außerdem sowohl zu einer Inhibition der DNA-, RNA- und Proteinsynthese als auch zu einem Aufbrechen der DNA-Stränge und zu Mutationen innerhalb der Chromosomen.¹⁸⁹⁻¹⁹¹ Allgemein wird angenommen, dass die toxischen Ionen durch die Oxidation der Oberfläche des Quantum Dots freigesetzt

werden. In Bakterien ist dieser Vorgang bereits beschrieben worden.¹⁹² Da die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*engl.* „reactive oxxygen intermediates“ (ROI)) schlecht kontrollierbar ist aufgrund des Energie-Resonanz-Transfers von den Quantum Dots auf Sauerstoff,^{188, 193, 194} stellt die Toxizität bislang ein enormes Problem bei vielen biologischen Anwendungen dar.

4.5.6 BODIPY-FLUOROPHORE

Der Begriff BODIPY steht für eine ganze Klasse von Fluoreszenzfarbstoffen und ist eine Abkürzung des IUPAC-Namens des Grundgerüsts **Bordipyrrols** oder auch **Bor-Dipyrromethins** (s. Abb. 35).

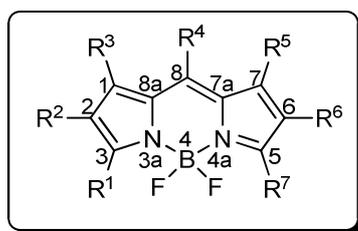


Abb. 35 BODIPY-Grundgerüst.

Treibs und Kreuzer beschrieben 1968, in Kenntnis der von Daltrozzo¹⁹⁵ entwickelten Methode zur Synthese von BPh₂- und BBrPh-Komplexen des Dichinolylmethans, die ersten Derivate durch Komplexierung von Dipyrromethenen mit BF₂.¹⁹⁶ Die so erhaltenen Derivate wiesen allesamt eine intensive gelbgrüne Fluoreszenz auf. Spektroskopische Daten, wie beispielsweise Absorptions- und Emissionsspektren und Fluoreszenzquantenausbeuten, wurden allerdings erst 1977 von Vos de Wael *et al.* untersucht und veröffentlicht.¹⁹⁷ Um diese neue Fluoreszenzklasse mit den bis zum damaligen Zeitpunkt verschiedenen spektroskopischen Eigenschaften in biologischen Testsystemen anwenden zu können, entwickelten Worries *et al* zwei wasserlösliche BODIPY-Derivate.¹⁹⁸ Aber erst Mitte der 1980er Jahre wurde der Entdeckung dieser Verbindungsklasse Beachtung geschenkt.¹⁹⁹⁻²⁰¹ Haughland (*Molecular Probes*²⁰²) erkannte das enorme Potential dieser Farbstoffe,²⁰³ meldete ein Patent an²⁰⁴ und vermarktete sie unter dem Namen BODIPYs.¹⁷⁴ 1989 wurde dann zum ersten Mal ein Dopamin-Rezeptor-Agonist mit Hilfe eines BODIPY-Fluorophors gelabelt und mit Fluorescein- und Rhodamin markierten Derivaten

verglichen.²⁰³ Mittlerweile wurden zahlreiche Derivate des BODIPY-Grundkörpers synthetisiert und diese wurden eingehend untersucht und vielfach für diverse Anwendungsgebiete eingesetzt.²⁰⁵⁻²⁰⁸ Auf dem Gebiet der Fluoreszenzfarbstoffe ist diese Substanzklasse mittlerweile nicht mehr wegzudenken. Dies liegt vor allem an den zahlreichen Vorteilen, die BODIPYs im Gegensatz zu anderen Fluorophoren, wie beispielsweise Fluorescein, aufweisen. So kann bei BODIPY-Derivaten, im Gegensatz zu vielen anderen Fluorophoren, keinerlei pH-Wert-Abhängigkeit und lediglich eine geringe Lösungsmittelabhängigkeit der Fluoreszenzintensität beobachtet werden.²⁰⁹ Sowohl die hohen Extinktionskoeffizienten ($\epsilon > 80000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$),^{174, 210} als auch die schmalen und scharfen Emissionsbanden machen BODIPY-Derivate wertvoll für analytische Verfahren, wie zum Beispiel die HPLC oder Elektrophorese.¹⁷⁴ Auch für die Entwicklung von FRET-basierten Assays sind BODIPY-Derivate geeignet, da die Absorptions- und Emissionsmaxima durch einfache Variationen der Substituentenreste des Chromophors auf die gewünschte Wellenlänge hin verändert werden können und so eine Überlappung der Absorptions- und Emissionsspektren der FRET-Partner vermieden wird.²¹¹ Die hohe Lipophilie dieser Strukturen, die eine eingeschränkte Anwendung in biologischen Testsystemen zu bedingen vermag,²¹² kann allerdings durch Sulfonierung²¹³ oder Pegylierung²¹⁴ entgegengewirkt werden. Hohe Fluoreszenzquantenausbeuten ($\Phi > 0,8$), die zudem lösungsmittelunabhängig sind, und ein geringes Quenchverhalten, das u.a. durch Luftoxidation ausgelöst wird, führen dazu, dass BODIPY-Derivate deutlich photostabiler als Fluorescein- oder Rhodamin-Derivate sind.^{174, 215} Vor allem bei langandauernden Versuchen spielt diese Fluoreszenzklasse eine wichtige Rolle und ist daher aus der modernen Fluoreszenzmikroskopie nicht mehr wegzudenken. Dies spiegelt sich auch in der enormen Anzahl von erschienenen Veröffentlichungen und Patenten wider.²¹⁶⁻²²¹

4.5.6.1 ALLGEMEINE DARSTELLUNG VON BODIPY-DERIVATEN

Bereits 1957 untersuchten Treibs *et al.* die Darstellung von Di- und Tripyrrolmethenen und Porphyrinen. Dabei stellten sie fest, dass das zunächst gebildete unsymmetrische Primärmethen durch den Angriff eines weiteren Pyrrol-Moleküls in ein sogenanntes Tripyrromethen-Derivat umgewandelt wird (s. Abb. 36). Dieses spaltet anschließend eine Pyrroleinheit ab, so dass ein symmetrisches Dipyrromethen entsteht, das Sekundärmethen

genannt wird. Für diesen Vorgang prägen Treibs *et al.* den Begriff „Pyrrol-Austausch-Reaktion“.²²²

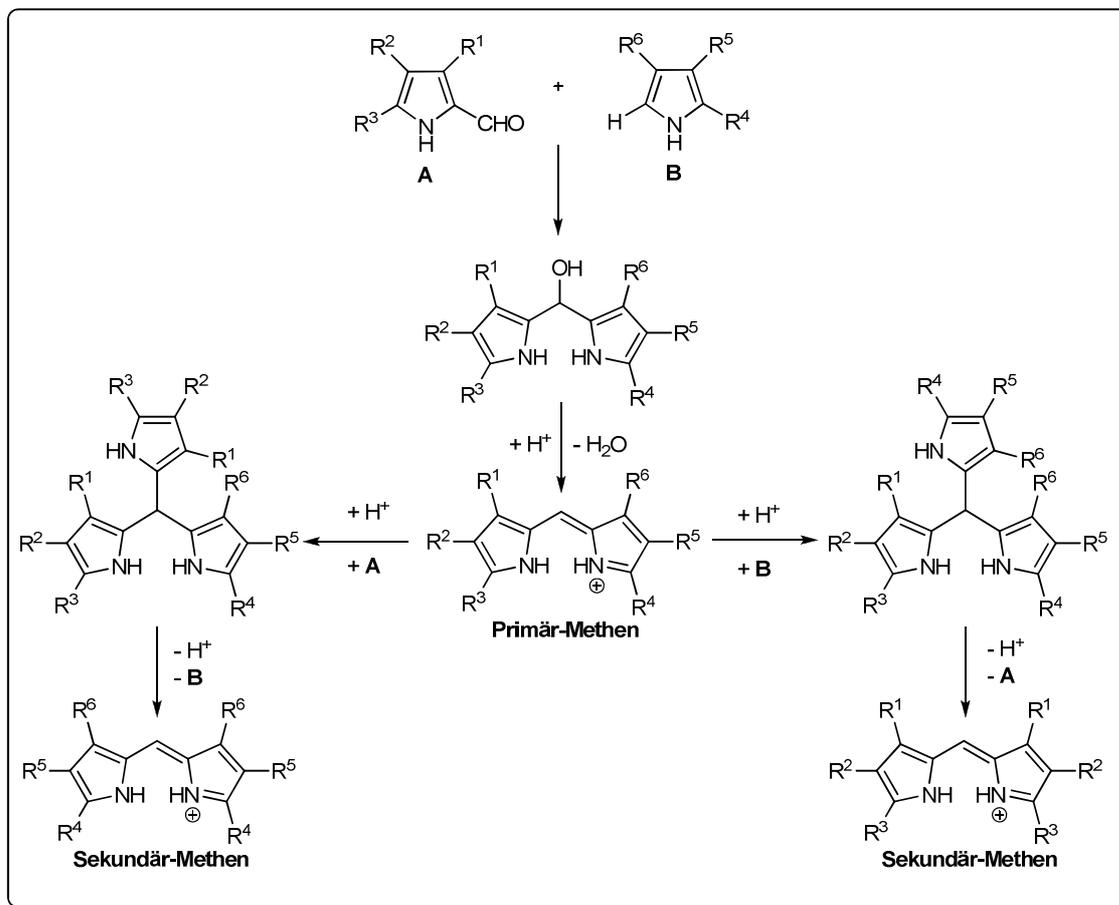


Abb. 36 Pyrrol-Austauschreaktion nach Treibs *et al.*²²²

Treibs *et al.* lieferten als Begründung für das Auftreten dieser Pyrrol-Austauschreaktion die unterschiedliche Basizität der auftretenden Methene. Ein Überschuss an Säure sowie elektronenziehende Substituenten an den Pyrrol-Derivaten, begünstigen die Bildung des Tripyrrromethens, wohingegen Substituenten mit einem +I-Effekt die Bildung des Dipyrrromethens bevorzugen. Bei der Reaktion von Carbonsäurechloriden mit Pyrrolen werden lediglich Dipyrrromethen-Derivate gebildet, so dass keine Austauschreaktion stattfindet.²²²

Wie bereits oben erwähnt, beschrieben Treibs und Kreuzer 1968 zum ersten Mal die Komplexbildung von Bortrifluorid durch Dipyrrromethene und Tripyrrromethene.¹⁹⁶ Dabei bildete sich ein Chelatkomplex aus, der die Elektronenpaarlücke des Bor-Atoms mittels koordinativer Bindung zu einem Stickstoff-Atom schließt.²²³ Treibs und Kreuzer setzten

2,4-Dimethylpyrrol und Acetanhydrid unter Zusatz von Bortrifluorid-diethyletherat um. Sie konnten zwei unterschiedliche Strukturen, deren Lösungen intensive Fluoreszenz aufwiesen, isolieren (s. Abb. 37).

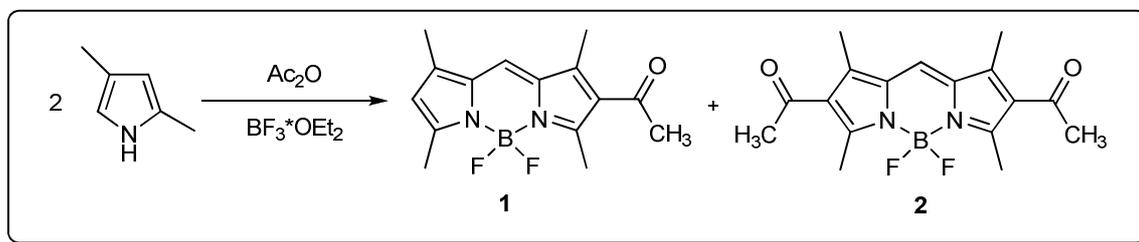


Abb. 37 Darstellung des BODIPY-Grundgerüsts nach Treibs und Kreuzer.

Die Ausbeute war dabei allerdings schlecht und betrug für das Derivat **1** 7% und für das Derivat **2** 9%.¹⁹⁶

Haughland beantragte in den Jahren 1988 und 1994 zwei Patente, in denen er alternative Syntheserouten für die Darstellung von BODIPY-Grundkörpern vorstellte (s. Abb. 38).^{204, 224}

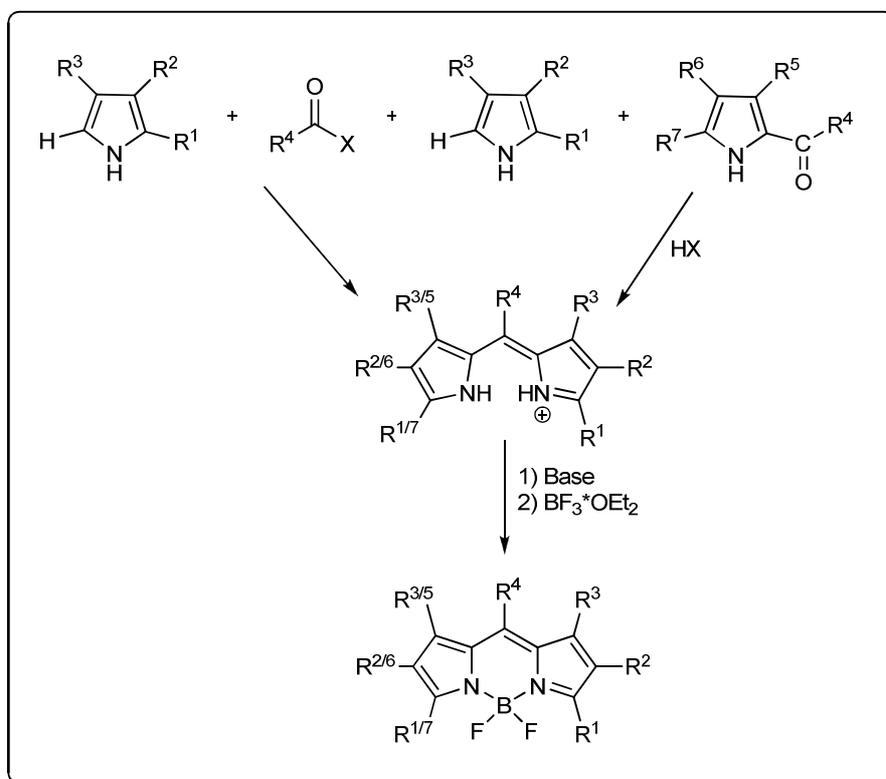


Abb. 38 Darstellung des BODIPY Grundgerüsts nach Haughland.²²⁴

Die eine Route führt durch die Umsetzung eines Pyrrolderivats mit einer Carbonylkomponente, die sowohl einen aliphatischen als auch aromatischen Rest tragen kann, zu symmetrischen BODIPY-Grundgerüsten. Für die Darstellung von unsymmetrischen BODIPY-Derivaten wird ein Pyrrolderivat, das aliphatische oder aromatische Substituenten tragen kann, mit einem entsprechenden Pyrrolaldehyd unter Säurezugabe (HX) umgesetzt.^{210, 224} Wie bereits oben beschrieben kann es hierbei zu einer Pyrrol-Austauschreaktion und damit zur Bildung von Nebenprodukten kommen. Bei beiden Routen bildet sich das entsprechende Dipyrromethen, welches im Anschluss nach Deprotonierung mit Bortrifluorid versetzt wird und so zu dem jeweiligen BODIPY-Derivat führt. Die so erhaltenen Fluorophore werden auch als *F*-BODIPYs bezeichnet.

Die Komplexierung von Dipyrromethenen mit alternativen Metallkationen, wie beispielsweise Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Pt^{2+} , Ni^{3+} , Co^{3+} oder Al^{3+} , führt zur Bildung der entsprechenden Komplexe, die allerdings instabil sind und schnell zerfallen.^{196, 210}

Nach Aufbau des BODIPY-Grundgerüstes können zahlreiche Derivatisierungen vorgenommen werden, um beispielsweise die Absorptions- und Emissionsmaxima zu verschieben oder Substituenten für eine Ligandenkopplung auszutauschen. So konnte beispielsweise der Arbeitskreis von Prof. Ziessel die für BODIPY-Derivate typischen kleinen Stokes-Verschiebungen vergrößern, in dem sie das chromophore System ausweiteten. Dazu substituierten sie die Fluoratome in Position 4 durch aromatische Polyzyklen (s. Abb. 39).²¹⁷

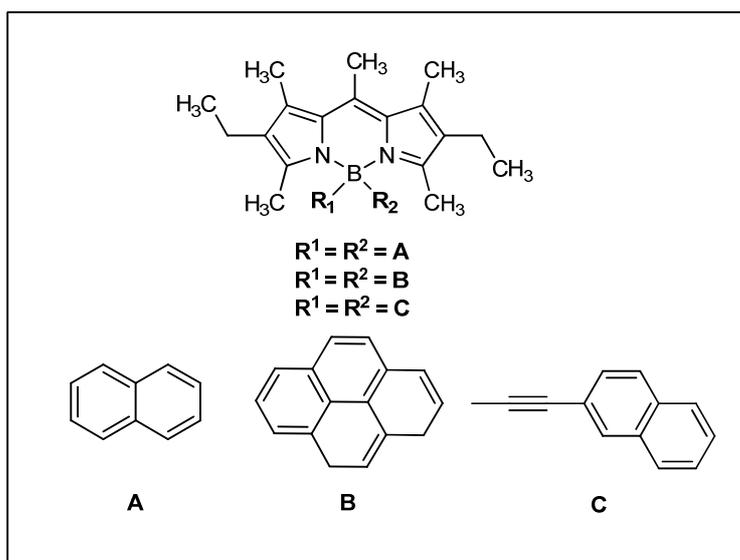


Abb. 39 C- bzw. E-BODIPY Derivate mit vergrößertem Stokes-Shift.²¹⁷

Der Austausch der F-Atome durch Aryl-oder Ethynylaryl-Einheiten führt zu sogenannten C-BODIPYs (*C* = Carbozyklus) bzw. E-BODIPYs (*E* = Ethynyl).^{217, 220}

Die Substitution der Fluoratome in *F*-BODIPYs durch Alkohol oder Phenol führt zu sogenannten *O*-BODIPY Derivaten (s. Abb. 40).²¹⁷

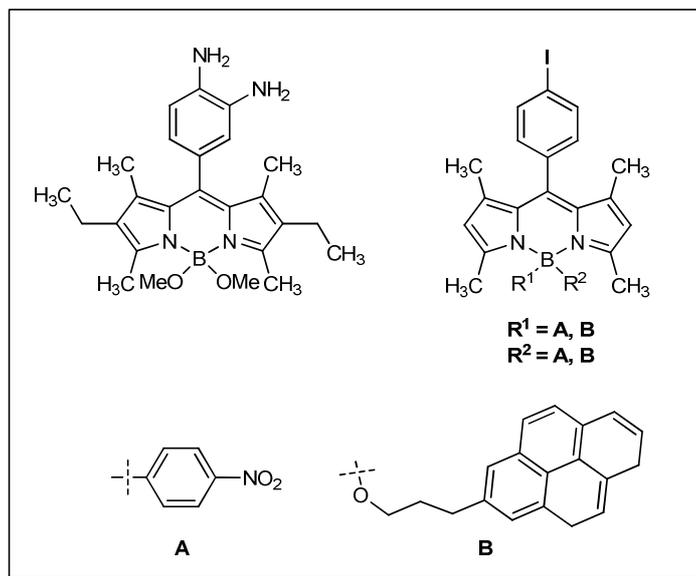


Abb. 40 Beispiele für *O*-BODIPY-Derivate.²¹⁷

5 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Darstellung neuer funktioneller BODIPY-Fluorophore für die Fluoreszenzmarkierung von Liganden oder Proteinen. Diese werden insbesondere bei der Entwicklung neuer, fluoreszenzbasierter Assays und in der Fluoreszenzmikroskopie für die Erlangung neuer Informationen über Rezeptoren, in diesem Fall speziell der Adenosinrezeptoren, benötigt.

Eine Reihe funktionalisierter BODIPY-Derivate wurde bereits in unserem Arbeitskreis entwickelt. Da die Kopplung mit den bislang zur Verfügung stehenden BODIPY-Derivaten an den gewünschten Liganden teilweise nur in schlechten Ausbeuten erfolgte oder die erhaltenen Produkte eine schlechte Wasserlöslichkeit aufwiesen, sollten neue funktionelle Gruppen wie beispielsweise Thiol, Iodid, terminale Alkene oder Sulfonate in den BODIPY-Alkyllinker bzw. in das BODIPY-Grundgerüst eingeführt werden (s. Abb. 41).

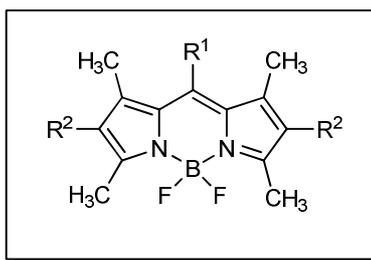


Abb. 41 BODIPY-Grundgerüst mit den zu modifizierenden Resten R^1 und R^2 .

Die dargestellten, verschieden funktionalisierten BODIPY-Derivate sollten anschließend auf ihre spektroskopischen Eigenschaften und exemplarisch auf ihre Stabilität hin untersucht werden.

Ein weiterführendes Projekt befasste sich mit der Entwicklung von fluoreszmarkierten Adenosinrezeptorliganden. Dazu sollten die Adenosinliganden mit den entwickelten BODIPY-Fluorophoren chemisch gekoppelt werden. Die synthetisierten Derivate sollten anschließend pharmakologisch in Radioligandbindungsstudien an A_{1-} , A_{2A-} , A_{2B-} und A_{3-} Adenosinrezeptoren hinsichtlich ihrer Affinität und Selektivität untersucht werden. Außerdem sollte in funktionellen Studien die Wirkweise der dargestellten fluoreszierenden Liganden untersucht werden.

Im Rahmen eines weiteren Projekts sollten neue, hochpotente und selektive A_{2A} -Adenosinrezeptoragonisten entwickelt werden. Aus früheren Studien ist bekannt, dass die meisten potenten und selektiven Adenosinrezeptor-Agonisten auf der Grundstruktur Adenosin basieren, das in Position 2 des Adenins und/oder in Position 5' der Riboseeinheit modifiziert worden sind (s. Abb. 42).

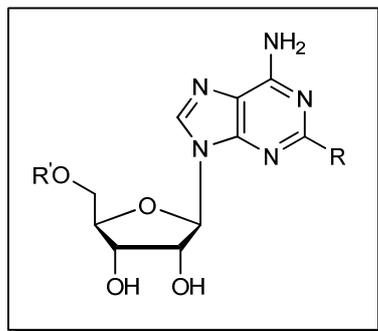


Abb. 42 Leitstruktur für die Entwicklung potenter und selektiver A_{2A} -Adenosinrezeptor Agonisten.

Daher wurde in unserem Arbeitskreis eine Serie von Adenosinderivaten mit Modifikationen in Position 2 und/oder Position 5' des Riboserings von Adenosin hergestellt. Außerdem wurden Verbindungen synthetisiert, die zusätzlich zu diesen Modifikationen auch eine Derivatisierung der 2'- und 3'-OH-Gruppe des Zuckers durch Umsetzung mit Anisaldehyd aufwiesen. Die pharmakologische Charakterisierung der Testsubstanzen sollte im Rahmen dieser Arbeit mittels Radioligandbindungsstudien an den Adenosinrezeptor-Subtypen durchgeführt und die Affinität und Selektivität der Verbindungen bestimmt werden. Exemplarisch sollten darüber hinaus auch funktionelle Studien durchgeführt werden, um Informationen über die intrinsische Aktivität und die Wirkweise der Verbindungen am Rezeptor zu erlangen.

Ein weiteres Teilprojekt befasste sich mit der Substanzklasse der 2-Phenylpurin-6,8-dione. Ziel war die Entwicklung neuer, hochpotenter und selektiver Adenosinrezeptor-Antagonisten, die dabei helfen sollten, den Aufbau und die Funktion der Adenosin-Rezeptoren besser zu verstehen. Dazu wurden in unserem Arbeitskreis von Herrn Dr. Wolfram Frobenius und Herrn Dr. Alexander Bauer Verbindungen mit Modifikationen in N7 und N9 des Phenylringes synthetisiert (s. Abb. 43).

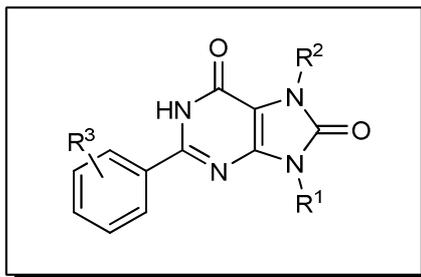


Abb. 43 2-Phenylpurin-6,8-dion-Grundgerüst mit den zu modifizierenden Resten R¹, R² und R³.

Zu einem früheren Zeitpunkt wurde diese Serie bereits in Radioligandbindungsstudien an A₁- und A_{2A}-Adenosinrezeptoren untersucht. In der vorliegenden Arbeit sollte die pharmakologische Charakterisierung durch Untersuchung der Testsubstanzen in Radioligandbindungsstudien vervollständigt werden. Dazu sollten die Affinitäten an humanen A_{2B}- und humanen A₃-Adenosinrezeptoren bestimmt werden und so die Selektivität der Verbindungen ermittelt werden.

6. Darstellung funktionalisierter BODIPY-Derivate

6.1 Bromalkyl-BODIPY-Derivate

Die Synthese des BODIPY-Grundgerüsts kann wie bereits in Kapitel 4.5.2.1 beschrieben erfolgen. Da bei unsymmetrisch substituierten BODIPYs immer die Gefahr einer Pyrrol-Austauschreaktion und damit einer Verringerung der Ausbeute besteht, wurde die Synthese symmetrischer Derivate in diesem Arbeitskreis von Dr. Sven J. Freudenthal etabliert. Dabei werden in ω -Position bromierte Alkylsäurechloride verwendet. Diese sind in unterschiedlicher Kettenlänge kommerziell erhältlich, so dass unterschiedliche Linkerlängen der BODIPY-Derivate sehr leicht zu erhalten sind.

Da die Instabilität unsubstituierter Dipyrrromethene aus früheren Veröffentlichungen bekannt ist,²⁰¹ wurde für die Synthese 2,4-Dimethylpyrrol als Edukt gewählt, so dass ein mit Methylierungen in den Positionen 1, 3, 5 und 7 BODIPY-Grundkörper erhalten wurde. Der Versuch, Derivate ohne dieses Substitutionsmusters herzustellen, war nicht erfolgreich.

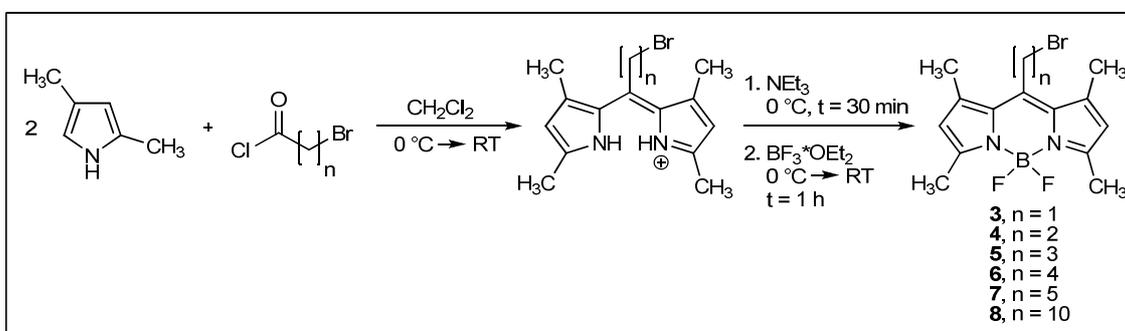


Abb. 44 Synthese der Bromalkyl- BODIPY-Derivate.

Bei der hier verwendeten Darstellungsmethode handelt es sich um eine Eintopfreaktion, wodurch auf die Isolierung des Dipyrrromethens verzichtet werden kann. Bei dieser Reaktion greift 2,4-Dimethylpyrrol mit der aktivierten Position 5 nucleophil das ω -Bromalkansäurechlorid an (s. Abb. 44). Es resultiert intermediär ein Keton-Derivat, das erneut nucleophil von der aktivierten Position 5 eines weiteren 2,4-Dimethylpyrrol-Moleküls angegriffen wird. Durch die Eliminierung von Wasser entsteht das jeweilige Dipyrrromethen, das jedoch nicht isoliert wird. Unter Eiskühlung werden durch die Zugabe von Triethylamin die Stickstoffatome deprotoniert und nach Zugabe von Bortrifluorid-

diethyletherat wird die Komplexierung der Difluorboran-Einheit erzielt. Die erhaltenen Produkte weisen eine intensive Fluoreszenz auf. Allgemein lässt sich feststellen, dass die Reaktionszeit mit zunehmender Kettenlänge des eingesetzten ω -Bromalkansäurechlorids ansteigt. Sowohl von Verbindung **7**²²⁵ als auch von dem Nebenprodukt **9**,²²⁶ das Dr. Sven J. Freudenthal isolierte und charakterisierte, konnte eine Kristallstruktur bestimmt werden.

Die Ausbeuten der so dargestellten Derivate betragen nach säulenchromatographischer Reinigung zwischen 11% und 40%.²²⁷ Dr. Fabian Heisig konnte unter wasserfreien Bedingungen und unter Verwendung eines Druckgefäßes durch eine deutliche Verlängerung der Reaktionszeit die Ausbeute des Derivats **6** von 19% auf 33% erhöhen. Da außerdem bei höheren Temperaturen gearbeitet wurde (120 °C), verwendete er anstelle des Lösungsmittels Dichlormethan das wesentlich höher siedende Toluol. Eine Übertragung auf die anderen Derivate gelang ihm allerdings nicht.²²⁸

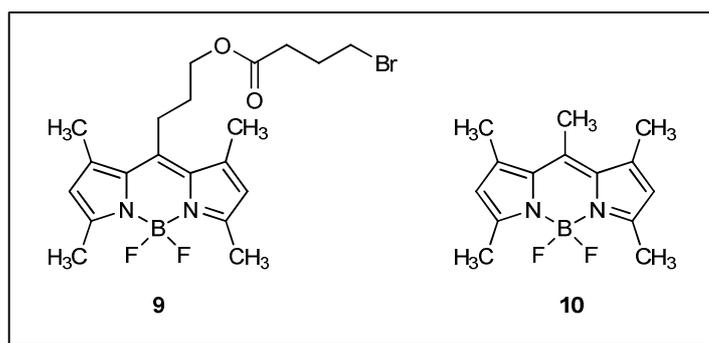


Abb. 45 Nebenprodukte bei der Darstellung der Bromalkyl-BODIPY-Derivate.

Die Reaktion verschob sich nach langen Reaktionszeiten und in Gegenwart von Wasser hin zu dem nachgewiesenen Nebenprodukt **9**. Dabei wurde die Vermutung geäußert, dass entstehendes Reaktionswasser ausreicht, um Verbindung **9** zu erhalten. Dr. Fabian Heisig versuchte diese Nebenreaktion durch Verwendung von wasserfreien Reagenzien zu unterdrücken.²²⁸ Bei der für diese Arbeit nötigen Wiederholung der Synthesen konnte diese Hypothese bestätigt werden. Auch das strikte Arbeiten unter Schutzgasatmosphäre, sowie die Zugabe von Molsieb oder dem Trocknungsmittel Natriumsulfat, führte nicht zu einer vollständigen Unterdrückung der Esterbildung. Auf die Zugabe von Trocknungsmitteln, die zweiwertige Kationen enthalten, beispielsweise Magnesiumsulfat oder Calciumchlorid, wurde aufgrund der möglichen Komplexierung von Seiten des entstehenden Dipyrromethens verzichtet (s. Kapitel 4.5.2.1).

Bei der Darstellung von Verbindung **3** konnte Dr. Fabian Heisig das Nebenprodukt **10** isolieren, das in einer hohen Ausbeute von 30% gebildet wurde. Er stellte fest, dass die Verwendung einer neuen Charge Bortrifluorid-diethyletherat zu einer drastischen Reduktion der Bildung des Nebenproduktes führte. Verbindung **3** konnte dadurch in 40%iger Ausbeute erhalten werden. Das Nebenprodukt **10** konnte mittels Säulenchromatographie abgetrennt werden und trat lediglich mit einer Ausbeute von 1,6 % auf.²²⁸

Da die Vermutung bestand, dass die Bildung von Produkt **10** einem radikalischen Mechanismus zugrunde liegt, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Synthese der Verbindung **3** unter Zugabe von Radikalinhibitoren durchgeführt. Dazu wurde der Reaktion zum einen Iod und zum anderen 4-*tert*-Butylcatechol zugesetzt. In beiden Fällen konnte das Auftreten von Verbindung **10** komplett unterdrückt werden. Außerdem wurde die Zahl der auftretenden weiteren Nebenprodukte, die allerdings nicht isoliert werden konnten, drastisch gesenkt. Die Ausbeute von Verbindung **3** konnte dadurch auf 58% bei der Zugabe von Iod und auf 53% bei der Zugabe von 4-*tert*-Butylcatechol gesteigert werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass bei langer Lagerung des Bortrifluorid-diethyletherats, das durch Diethylether stabilisiert wird, Peroxide gebildet werden, die wiederum radikalische Nebenreaktionen bei der Darstellung von **3** begünstigen.

Es wurden Absorptions- und Emissionsspektren aller dargestellten Fluorophore aufgenommen. Exemplarisch sind in Abb. 46 die Absorptions- und Emissionsspektren der Verbindungen **3** - **8** gezeigt. Die Substanzen **3** - **8** zeigten ein Absorptionsmaximum von 497 bzw. 504 nm.

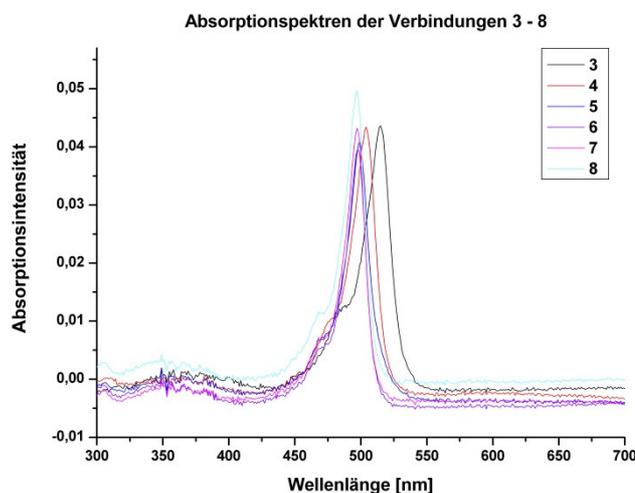


Abb. 46 Absorptionsspektren der Verbindungen **3** – **8**.

Die Emission der Verbindungen lag zwischen 504 und 512 nm (s. Abb. 47). Weiterhin wurden die Fluoreszenzquantenausbeuten in Ethanol bestimmt. Als Referenz diente der Fluorophor Rhodamin 6G. Alle dargestellten fluoreszenzmarkierten Adenosin-Derivate zeigten dabei Quantenausbeuten zwischen 0,77 und 0,85.

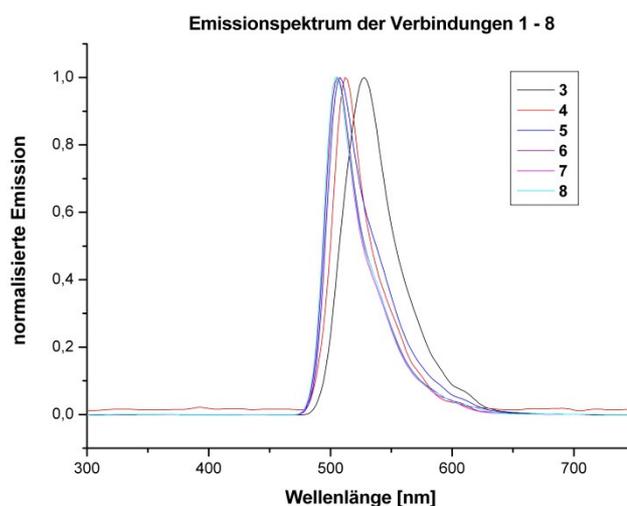


Abb. 47 Emissionsspektren der Verbindungen 3 - 8.

6.1.1 Stabilitätsuntersuchungen

Yang et al. berichteten 2011, dass – entgegen der in der Literatur vorherrschenden Meinung, BODIPY-Derivate seien chemisch äußerst stabil – unter sauren und basischen Bedingungen wie sie bei der Festphasensynthese vorherrschen, Zersetzung beobachtet wird.²²⁹ Daraufhin stellten Yang et al. Stabilitätsuntersuchungen an folgenden BODIPY-Derivaten (s. Abb. 48, Derivate **11-14**) an, in dem sie diese Verbindungen sauren und basischen Bedingungen aussetzten.

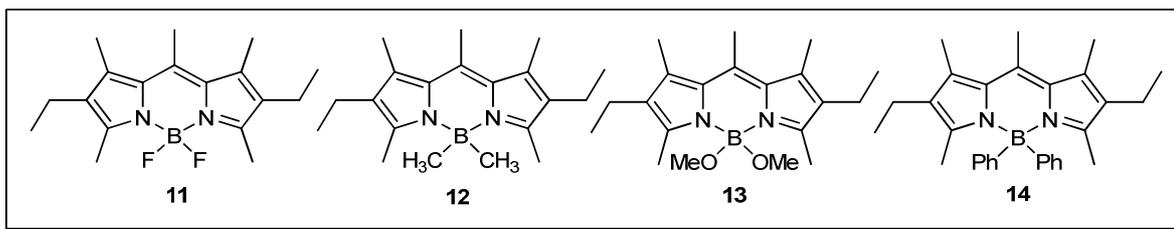


Abb. 48 BODIPY-Derivate der von Yang et al. durchgeführten Stabilitätsuntersuchung.

Unter Zugabe von Dichloressigsäure unterliegt Verbindung **13** einer nucleophilen Substitution und wird innerhalb von 12 Stunden vollständig in das entsprechende Anhydrid **15** umgewandelt (s. Abb. 49).

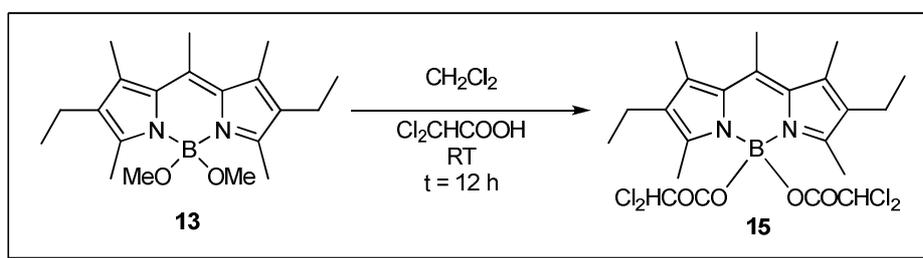


Abb. 49 Zersetzung eines 4,4-Dimethoxy-BODIPY Derivat nach Yang *et al.*.²²⁹

Dabei haben die Autoren einen Einfluss der an dem Bor-Atom gebundenen Substituenten nachweisen können. Bei Verwendung der stärkeren Säure Trichloressigsäure konnte der Substituenteneffekt allerdings nicht beobachtet werden und es trat bei allen Derivaten Zersetzung ein. Unter Zugabe von wässrigem Ammoniak (28%ig) konnte lediglich bei dem 4,4-Dimethoxy-Derivat (**13**) Zersetzung beobachtet werden. Die anderen Verbindungen waren unter basischen Bedingungen stabil.

Um die in der vorliegenden Arbeit dargestellten funktionalisierten BODIPY-Derivate auf ihre Stabilität hin zu untersuchen, wurde Verbindung **5** exemplarisch für Stabilitätsuntersuchungen ausgewählt. Verbindung **5** (s. Abb. 44) wurde dazu 24 Stunden entweder alkalischen, sauren, reduzierenden oder oxidierenden Bedingungen bei Raumtemperatur ausgesetzt. Dazu wurde eine Charge der Referenzsubstanz in sechs verschiedenen Reagiergefäßen jeweils in DCM gelöst und mit 5% Trifluoressigsäure (S1), 5% NaOH (S2), 5% Natriummethanolat (S3), 5% H₂O₂ (S4) oder 5% Pd/C in einer H₂-Atmosphäre (S5) versetzt und 24 Stunden gerührt. Anschließend wurden je 10 µL der Proben mit einem Gradienten aus Wasser : Methanol von 90 : 10 nach 0 : 100 unter Zusatz von 2 mM Ammoniumacetat über eine RP-HPLC chromatographiert und

massenspektroskopisch charakterisiert. Die eluierten Komponenten wurden anhand ihrer UV-Absorption bei 254 nm quantifiziert und mit der zuvor entnommenen Referenzprobe verglichen.

Es ist anzumerken, dass eine Verunreinigung bei allen Messungen - also auch in der Referenz - mit der Masse 392 auftrat. Diese kann auf ein Phasenbluten einer neuen LC-MS Säule zurückgeführt und somit bei der Betrachtung vernachlässigt werden.

Die Referenz wurde nach 12,37 min eluiert ($m/z = 369$ ($[M+H]^+$), $m/z = 367$ ($[M-H]^-$)) und zeigte eine Reinheit von 95% (s. Abb. 50).

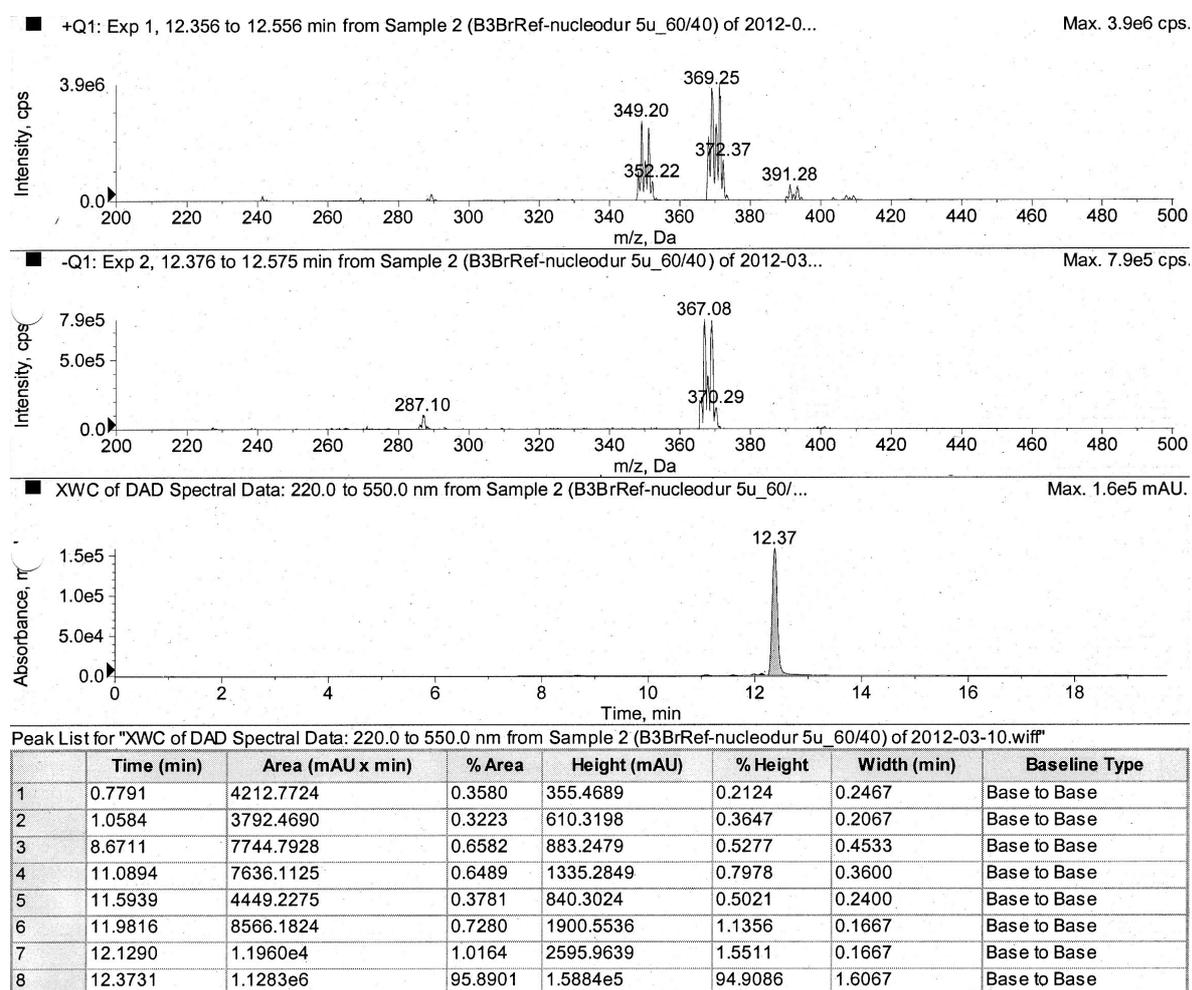


Abb. 50 LC/ESI-MS-Spektren und UV-Absorption (254 nm) der Referenzsubstanz 5.

Durch die Stabilitätsuntersuchung von Verbindung **5** konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit hergestellten BODIPY-Derivate grundsätzlich chemisch stabil sind. Sowohl basische, als auch oxidative und reduktive Bedingungen werden sehr gut toleriert. Es trat keinerlei Zersetzung auf. Jedoch konnte unter Zugabe von 5%iger Trifluoressigsäure die Umwandlung zu vermutlich folgendem Produkt beobachtet werden (s. Abb. 51; Derivat **16**).

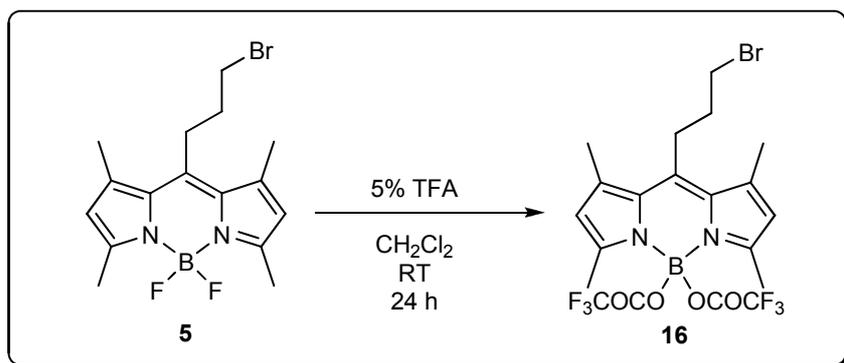
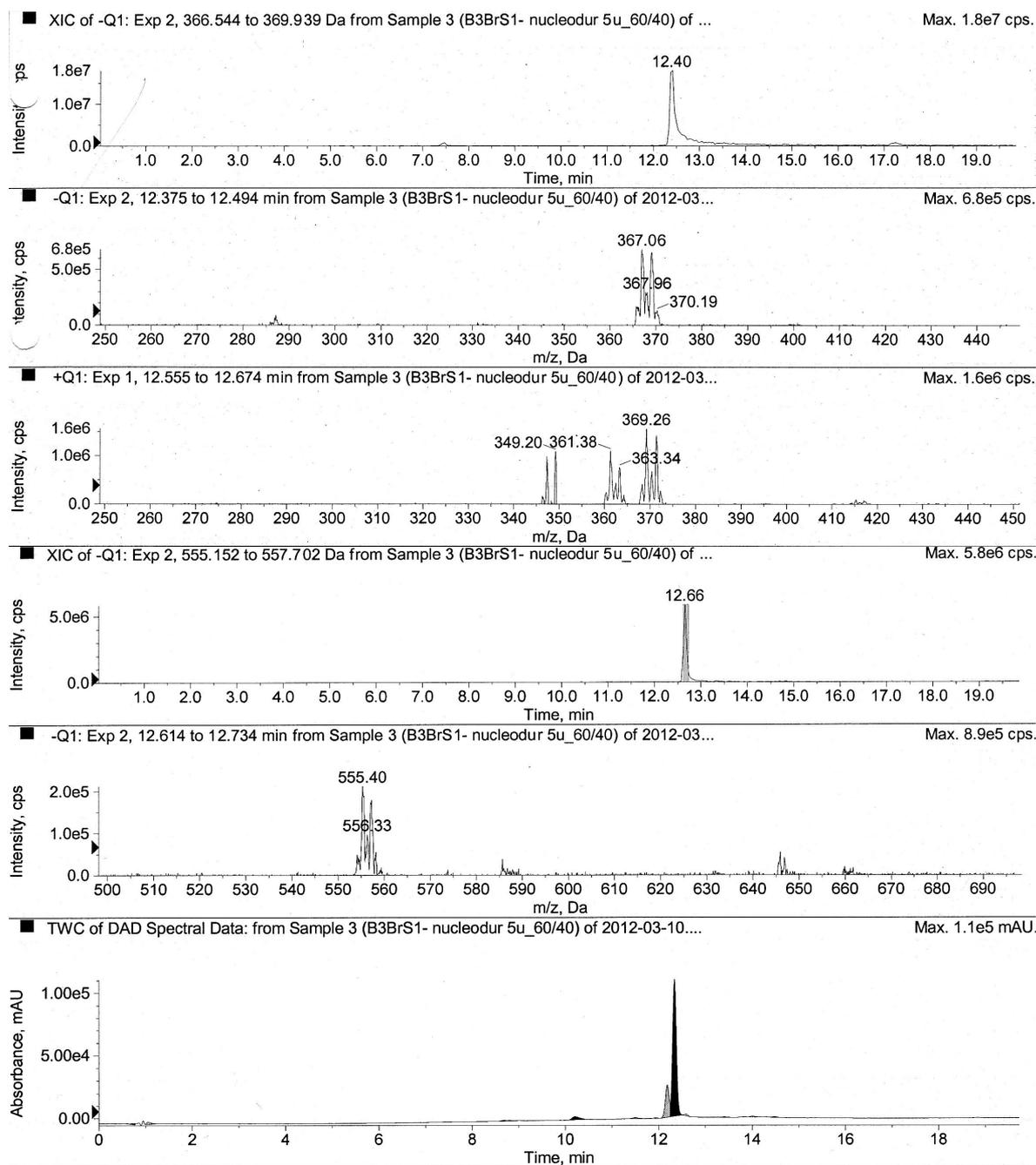


Abb. 51 Zersetzung von Verbindung **5** unter sauren Bedingungen.

6. Darstellung funktionalisierter BODIPY-Derivate



Peak List for "TWC of DAD Spectral Data: from Sample 3 (B3BrS1- nucleodur 5u_60/40) of 2012-03-10.wiff"

	Time (min)	Area (mAU x min)	% Area	Height (mAU)	% Height	Width (min)	Baseline Type
1	0.7316	6251.9614	0.7085	964.5561	0.6556	0.1933	Valley
2	1.0473	1.2386e4	1.4036	1819.1942	1.2365	0.2200	Valley
3	8.6879	5749.8935	0.6516	822.9464	0.5594	0.2133	Valley
4	8.8022	5489.3451	0.6221	658.0148	0.4473	0.2200	Valley
5	10.2027	3.0432e4	3.4486	2668.8490	1.8140	0.4800	Base to Base
6	11.4961	9209.5355	1.0437	1016.0374	0.6906	0.4133	Base to Base
7	11.9334	3068.0630	0.3477	578.9126	0.3935	0.2000	Base to Base
8	12.1816	1.3863e5	15.7098	2.5827e4	17.5547	0.2067	Valley
9	12.3355	6.5059e5	73.7274	1.0933e5	74.3134	0.2733	Valley
10	12.5800	6664.7741	0.7553	1385.4349	0.9417	0.1600	Base to Base
11	13.4026	3858.0593	0.4372	590.8729	0.4016	0.2533	Valley
12	14.0056	5089.1252	0.5767	756.9991	0.5145	0.1933	Valley
13	14.4776	5011.5045	0.5679	702.0474	0.4772	0.2867	Base to Base

Abb. 52 LC/ESI-MS-Spektren und UV-Absorption (254 nm) des Zersetzungsprodukts von **5** (24 h, RT, 5% Trifluoressigsäure).

Durch die Stabilitätsuntersuchungen konnte die Umwandlung zu einem zu Yang et al. vermutlich analogen Anhydrid-Derivat (Verbindung **16**) erstmals massenspektroskopisch beobachtet werden. Dabei wurde die Ausgangsverbindung **5** nach 12,40 min eluiert ($m/z = 369$ ($[M+H]^+$), $m/z = 367$ ($[M-H]^-$)). Das Zersetzungsprodukt **16** wurde nach 12,66 min eluiert ($m/z = 555$ ($[M-H]^-$)). Das von Yang et al. beschriebene Auftreten weiterer Zersetzungsprodukte konnte im Rahmen dieser Stabilitätsuntersuchungen nicht nachgewiesen werden. Allerdings versetzten Yang et al. die Derivate mit einem 50fachen Überschuss an Trichloressigsäure und wählten damit sehr drastische Reaktionsbedingungen.

Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen zeigen deutlich, dass die in der vorliegenden Arbeit dargestellten F-BODIPY-Derivate lediglich unter stark sauren Bedingungen einer Umwandlung zu analogen Derivaten zu Verbindung **16** unterliegen.

6.2 Aminoalkyl-BODIPY-Derivate

Da Liganden oftmals Carboxylgruppen aufweisen, an die ein Fluorophor gekoppelt werden soll, wurden in diesem Arbeitskreis BODIPY-Derivate mit terminaler Aminofunktion hergestellt, so dass diese über eine Amidfunktion verknüpft werden können. Der klassische Syntheseweg, um Alkylbromide in die entsprechenden primären Amine umzuwandeln, ist die Umsetzung mit Ammoniak. Allerdings ist dabei darauf zu achten, dass ein großer Überschuss an Ammoniak zur Verfügung steht, da ansonsten aufgrund der hohen Nucleophilie sekundäre und letztendlich tertiäre Amine erhalten werden. Sterisch anspruchsvolle Substituenten schränken dabei die Zweit- bzw. Drittalkylierung allerdings merklich ein.²³⁰

Dr. Sven J. Freudenthal konnte durch Umsetzung von Verbindung **7** mit wässriger Ammoniaklösung Verbindung **20** beschreiben.²²⁷ Die Synthese der analogen Derivate ließ sich allerdings mit dieser Methode nicht erzielen. Die Gründe dafür waren zum einen die schlechte Löslichkeit der BODIPY-Derivate sowohl in wässriger Ammoniaklösung als auch in zugefügtem Methanol und die nötigen drastischen Reaktionsbedingungen, die zu der Bildung von Nebenprodukten – vor allem dem Methoxy-Derivat – und zu Zersetzungsreaktionen führten. Daher entwickelte Dr. Fabian Heisig eine neue Methode, in der mit

Ammoniak gesättigte organische Lösungsmittel zum Einsatz kamen. Vor allem ammoniakalische Methanol- bzw. Isopropanol-Lösungen erwiesen sich im Einsatz unter Mikrowellenstrahlung als zielführend (s. Abb. 53).

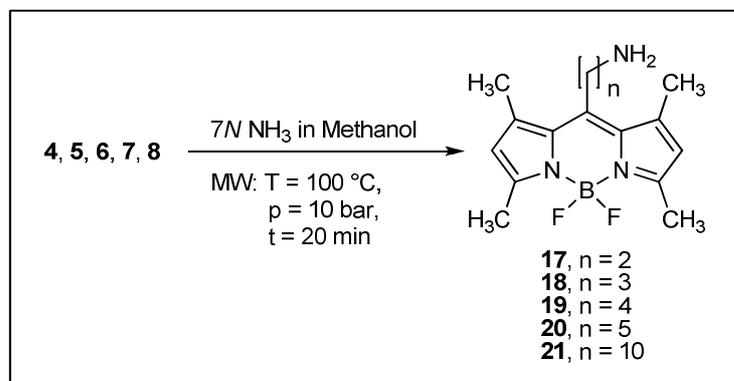


Abb. 53 Synthese der Aminoalkyl- BODIPY-Derivate.

Eine Zweit- bzw. Drittalkylierung trat bei dieser Methode nicht auf. Das sterisch anspruchsvolle BODIPY-Grundgerüst könnte, wie bereits oben erwähnt, dafür ursächlich sein.²²⁸

6.3 Iodalkyl-BODIPY-Derivate

Da in einigen Fällen die Bromidfunktionalisierung für die Kopplung mit einem Ligand mittels einer nucleophilen Substitution nicht reaktiv genug ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit Derivate, die eine Iodid-Funktionalität aufweisen, hergestellt. Diese stellen eine bessere Abgangsgruppe bei nucleophilen Substitutionen dar. Außerdem können die so funktionalisierten Fluorophore mittels Kreuzkupplungen, wie beispielsweise bei der Suzuki- oder Negishi-Kreuzkupplung, in denen mittlerweile auch Alkylhalogenide zum Einsatz kommen können,²³¹ an einen Liganden gebunden werden.

Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst versucht die Iodidfunktionalität bereits beim Aufbau des Grundkörpers durch Einsatz von ω -Iodalkansäurechloriden einzuführen. Diese Methode war allerdings nicht zielführend, was vermutlich daran lag, dass der nucleophile Angriff des 2,4-Dimethylpyrrols nun an der ω -Position unter Eliminierung von Iodid vollzogen wurde und das Dipyrromethen-Intermediat deshalb nicht gebildet werden konnte. Daher wurde eine alternative Syntheseroute gewählt, die sich der

Finkelsteinreaktion bedient. Dazu wurde das jeweilige Bromalkyl-BODIPY-Derivat in Aceton mit einem Überschuss Natriumiodid versetzt (s. Abb. 54). Die Reaktion beruht auf der Löslichkeit von Natriumiodid in Aceton im Gegensatz zu Natriumbromid, welches im Lösungsmittel Aceton ausfällt und somit die Lage des chemischen Gleichgewichtes auf die Seite der Produkte verschiebt.

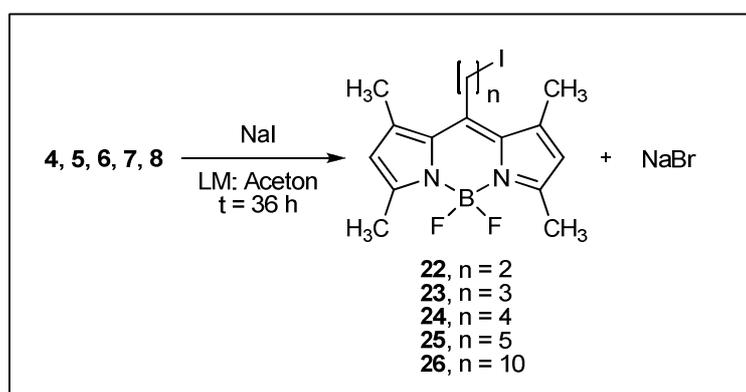


Abb. 54 Synthese der Iodalkyl-BODIPY-Derivate.

Die entsprechenden Iodalkyl-BODIPY-Derivate **22** - **26** konnten in exzellenten Ausbeuten von 97 - 99% nach säulenchromatographischer Aufreinigung erhalten werden.

6.4 Thioalkyl-BODIPY-Derivate

Falls die Kopplung des Fluorophors nicht durch eine nucleophile Substitution oder die erwähnten Kreuzkupplungen erfolgen kann, wurden im Rahmen dieser Arbeit BODIPY-Fluorophore, die eine Thiolfunktionalisierung tragen, hergestellt. Thiole sind, aufgrund ihrer relativ schwachen Schwefel-Wasserstoffbindung, zu einer Vielzahl von chemischen Reaktionen unter vergleichsweise milden Bedingungen und annähernd quantitativen Ausbeuten in der Lage. Unter diesen Reaktionen sind auch hoch effiziente Reaktionen wie beispielsweise die Thiol-En-Reaktionen, wobei hier vor allem die radikalische Thiol-En-Addition, sowohl an elektronenreiche als auch an elektronenarme Alkene, und die Thiol-Michael-Addition an elektronenarme Alkene hervorzuheben.²³² Aufgrund ihrer Vielfältigkeit und Effizienz bei milden Reaktionsbedingungen werden diese auch als Thiol-Klickreaktionen bezeichnet.²³³ Desweiteren kann die Kopplung eines Fluorophors

auch durch die Ausbildung von Disulfidbrücken durch Reaktion mit Cysteinresten des Proteins erfolgen.²³⁴

Dr. Sven J. Freudenthal konnte durch Umsetzung von Verbindung **7** mit Natriumhydrogensulfid unter Zugabe von Natriumiodid durch Rühren unter Rückfluss Verbindung **29** darstellen (s. Abb. 55, Methode A).²²⁷

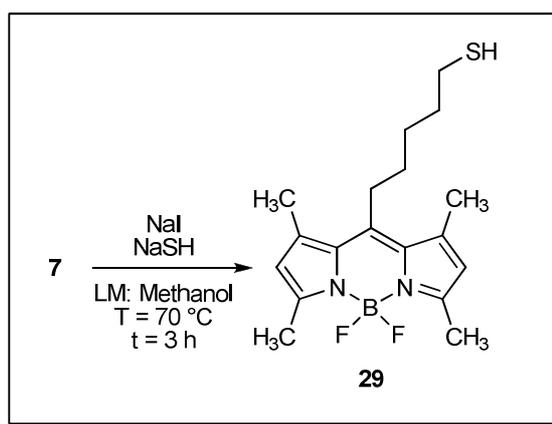


Abb. 55 Synthese des Thioalkyl-BODIPY-Derivate **29** nach Methode A.

Da im Rahmen dieser Arbeit die Synthese der analogen Derivate mit verschiedener Alkylkettenlänge mittels dieser Methode nicht gelang, wurden die Reaktionsbedingungen (Temperatur, Lösungsmittel und Reaktionszeit) vielfältig variiert. Leider war dies nicht zielführend. Die von Dr. Sven J. Freudenthal entwickelte Methode sieht die Zugabe von Kaliumiodid für die Bildung des Iodalkyl-Derivats und somit die Modifizierung der Abgangsgruppe vor, welches dann ohne Isolierung nachfolgend von Hydrogensulfid nucleophil angegriffen werden kann. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit auch versucht, die Reaktion direkt ausgehend von den Iodalkyl-Derivaten durchzuführen. Eine Reduzierung der Nebenprodukte war dabei ein Ziel. Dies war allerdings trotz vielfältiger Reaktionsbedingungen ebenfalls nicht erfolgreich. Daher wurde für die Synthese der Thioalkyl-BODIPY Derivate die Methode von Shepherd et al. verwendet.²³⁵ Die Gruppe entwickelte eine Synthese für 8-(Thiodecyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen.¹⁵¹ Dazu setzten sie Verbindung **7** mit Kaliumthioacetat in Aceton zum analogen Thioester um (s. Abb. 56, Methode B). Da die Reaktion vollständig verläuft, konnte die Gruppe um Shepherd ohne Isolierung den entstandenen Thioester durch Zugabe von Kaliumcarbonat in Ethanol spalten und somit Produkt **29** nach säulenchromatographischer Reinigung in 85%iger Ausbeute über beide Stufen erhalten.

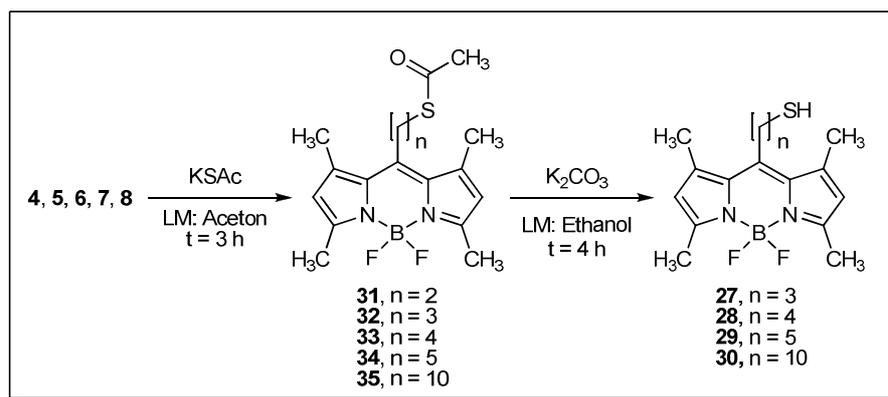


Abb. 56 Synthese der Thioalkyl-BODIPY-Derivate nach Methode B.²³⁵

Bei dieser Reaktion ist unbedingt auf die Durchführung unter Schutzgasatmosphäre zu achten. Außerdem muss das Lösungsmittel entgast werden, da das Vorhandensein von Sauerstoff die Bildung der Disulfid-Derivate begünstigt. Shepherd et al. berichten ebenfalls über diese Beobachtung.

Analog zu dieser Synthese konnten die Thioester Derivate **31** - **35** in guten bis hin zu exzellenten Ausbeuten (78 - 96%) erhalten werden. Für die Charakterisierung der Verbindungen **31** - **35** wurden diese isoliert. Da die Umsetzung zu den Thioestern allerdings vollständig vonstatten geht, kann auf eine Isolierung verzichtet werden und die Esterspaltung ohne vorherige Aufreinigung erfolgen.

Die Verbindungen **27** - **30** konnten bei konsequentem Arbeiten unter Schutzgas und bei Verwendung von entgasten Lösungsmitteln in mittleren bis guten Ausbeuten (21 - 63%) dargestellt werden. Durch die Zugabe von Reduktionsmitteln, wie beispielsweise Natriumdithionit, Natriumsulfit oder Natriumthiosulfat, wurde innerhalb dieser Arbeit untersucht, ob die Bildung der Disulfid-Derivate unterbunden werden kann. Dies konnte allerdings nicht beobachtet werden. In einem Fall gelang die Isolierung und Charakterisierung eines Disulfid-Derivats (s. Abb. 57, Verbindung **36**).

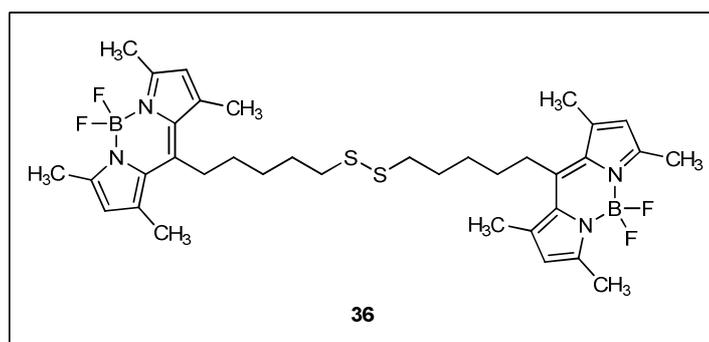
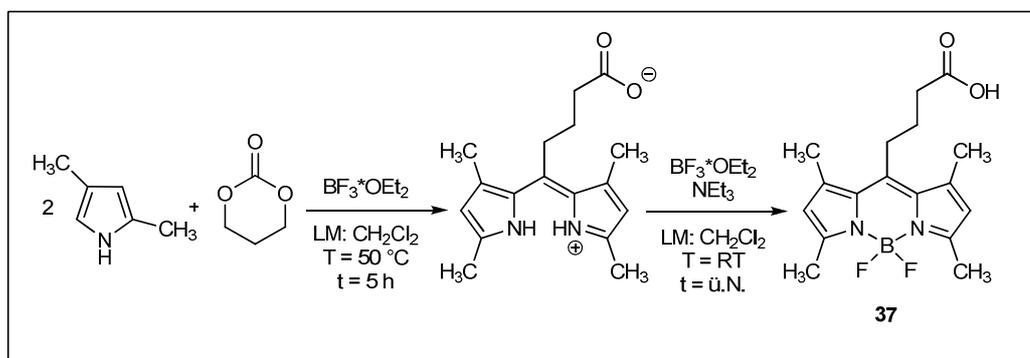


Abb. 57 Nebenprodukt **36**.

6.5 Carbonsäure-BODIPY-Derivat

Bei der Fluoreszenzmarkierung von Liganden, die an der zu markierenden Position eine Aminofunktion tragen, ist die Kopplung über eine Amidbindung das Mittel der Wahl, da sie zum einen durch eine Vielzahl an verschiedenen Methoden und zum anderen in guten bis sehr guten Ausbeuten erfolgen kann. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit ein BODIPY-Derivat, das eine Carboxylfunktionalität trägt, hergestellt. Li et al. beschrieben bereits 2006 eine Methode zur Darstellung von Verbindung **37**.²²¹ Dazu wurde Glutarsäureanhydrid unter Anwesenheit von Bortrifluorid-diethyletherat, das zu Beginn der Reaktion als Lewis-Säure fungiert, mit 2,4-Dimethylpyrrol versetzt (siehe Abb. 58). Der Vorteil der Reaktion besteht darin, dass der nucleophile Angriff des Pyrrols eine Ringöffnung des Glutarsäureanhydrids bewirkt und dabei ein Carboxylat-Ion entsteht. Aufgrund der geringen Reaktivität ist ein weiterer nucleophiler Angriff von 2,4-Dimethylpyrrol nicht möglich. Die Protonierung des Carboxylats erfolgt während der Aufarbeitung.



ü.N. = über Nacht

Abb. 58 Synthese des Carboxylalkyl-BODIPY-Derivats **37** nach Li et al..

Da diese Methode sehr lange Reaktionszeiten benötigt, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, die Reaktionszeit durch Wechsel zu einem höher siedenden Lösungsmittel zu verkürzen. Die Verwendung von Toluol und die Erhöhung der Reaktionstemperatur im ersten Teilschritt auf 115°C führte zu einer Verkürzung der Reaktionszeit auf drei Stunden. Die Reaktionszeit des zweiten Teilschrittes wurde dabei auf 90 Minuten verkürzt. Das Produkt konnte in 31%iger Ausbeute nach säulenchromatographischer Reinigung erhalten werden. Auf diese Weise konnte die Ausbeute im Rahmen dieser Arbeit gegenüber der Literaturausbeute (16%)²²¹ verdoppelt werden.

6.6 Wasserlösliche BODIPY-Derivate

Bei der Fluoreszenzmarkierung von Liganden kommt es häufig vor, dass der zu markierende Ligand stark lipophil ist. Dies kann bei biologischen Testungen, die zumeist in wässrigen Systemen mit lediglich einer sehr geringen Zugabe eines organischen Lösungsmittels durchgeführt werden, Probleme verursachen. Eine Steigerung der Konzentration des organischen Lösungsmittels ist in vielen Fällen aufgrund cytotoxischer Effekte höchst problematisch. Auch die Fluoreszenzmarkierung eines sehr hydrophilen Liganden kann bei Verwendung von lipophilen Fluorophoren bei der Synthese zu Schwierigkeiten führen. Daher entwickelte Dr. Fabian Heisig zwei wasserlösliche BODIPY-Derivate (s. Abb. 60 und Abb. 62, Verbindungen **43** und **44**).²²⁸ Dazu ging er von Verbindung **5** aus und sulfonierte diese in Position 2 und 6 durch Zugabe eines Überschusses Chlorsulfonsäure in Dichlormethan bei - 20 °C. Diese Methode wurde bereits 1985 von Worries et al. für in Position 8 unsubstituierte BODIPY-Derivate beschrieben, wobei diese äquivalente Mengen Chlorsulfonsäure verwendeten, um eine Monosulfonierung zu erzielen (s. Abb. 59, Verbindung **39**).²⁰⁰

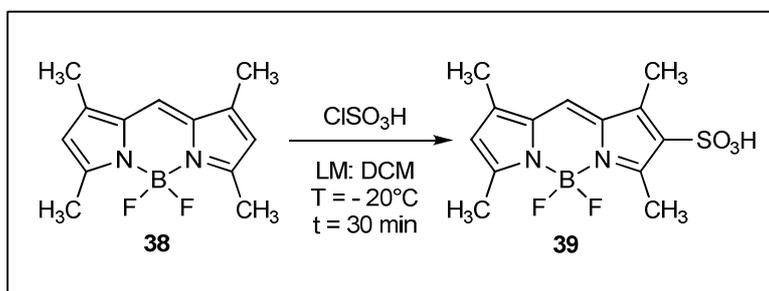


Abb. 59: Monosulfonierung nach Worries et al.¹⁹⁸

Dr. Fabian Heisig arbeitete dazu das Rohprodukt durch Waschen mit gesättigter, wässriger Ammoniumcarbonat-Lösung auf. Nach Lyophilisation und säulenchromatographischer Reinigung konnte er die Verbindung **43** in 86%iger Ausbeute erhalten.

Um Struktur-Wirkungsbeziehungen von den mit dem Fluorophor gekoppelten Liganden aufstellen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere wasserlösliche Derivate mit unterschiedlichen Alkyl-Linker-Längen angefertigt.

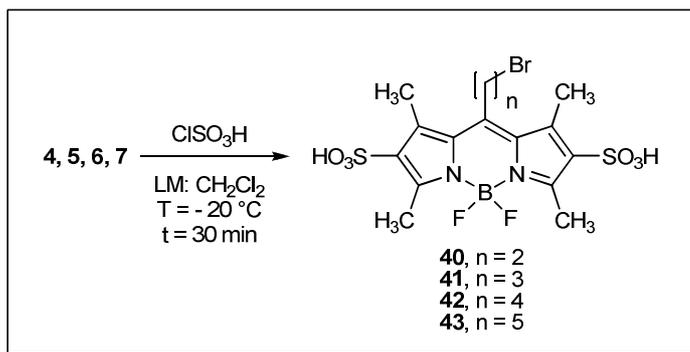
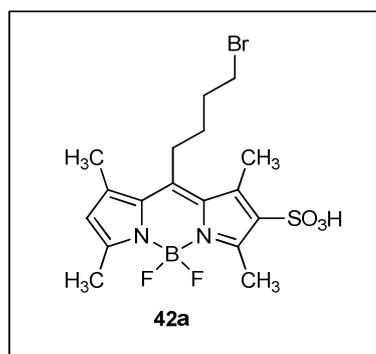
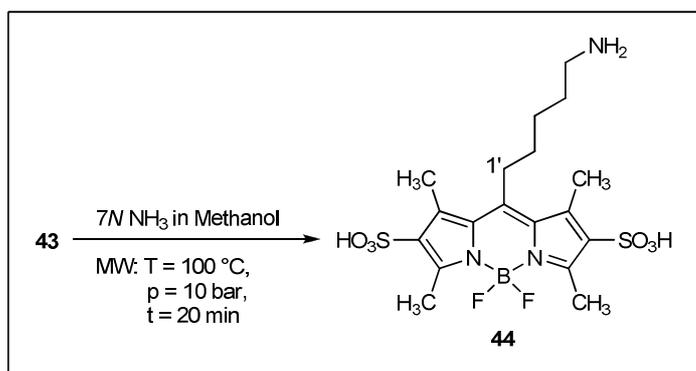


Abb. 60 Synthese der wasserlöslichen Bromalkyl-BODIPY-Derivate.

Die Produkte **40** - **42** konnten auf diese Weise analog dargestellt werden (s. Abb. 60). Außerdem konnte bei der Darstellung von Verbindung **42** das monosulfonierte Derivat **42a** isoliert und charakterisiert werden (s. Abb. 61).

Abb. 61 Nebenprodukt **42a**.

Da, wie bereits in Kapitel 6.2 erwähnt, die Kopplung eines Liganden mit einer Carboxylfunktion über die Bildung eines Amids erfolgen kann, stellte Fabian Heisig Verbindung **44** mit der in Kapitel 6.2 beschriebenen Synthese unter Mikrowellenstrahlung aus Verbindung **43** her (s. Abb. 62).

Abb. 62 Synthese des wasserlöslichen Aminoalkyl-BODIPY-Derivat **44**.

Nach Aufreinigung mittels RP-HPLC stellte er fest, dass Position 1' CH-acide ist, sodass die Verbindung unter alkalischen Bedingungen, wie sie während der Reaktion herrschen, in der nicht-fluoreszierenden, deprotonierten Form vorliegt. Dies konnte mittels NMR nachgewiesen werden.²²⁸ Die Beobachtung wurde bereits von Treibs und Kreuzer beschrieben und beruht auf den Elektronen-ziehenden Substituenten am Pyrrolring, die aufgrund induktiver und mesomerer Effekte einen Elektronenzug auf Position 1' ausüben.¹⁹⁶ Durch Waschen mit gesättigter, wässriger Ammoniumcarbonat-Lösung ist die Umwandlung zu dem fluoreszierenden Produkt **44** möglich.

6.7 Terminales Alken-BODIPY-Derivat

Die Kopplung von Fluorophoren unter Anwendung der Klick-Chemie, wie beispielsweise der Diels-Alder Reaktion oder der Cu(I)-katalysierten Huisgen-Cycloaddition, ist eine sehr elegante Methode für die Fluoreszenzmarkierung von Liganden, da diese unter milden Bedingungen mit wenigen Nebenprodukten und in guten bis sehr guten Ausbeuten ablaufen. Aus diesem Grund wurde ein BODIPY-Derivat, welches ein terminales Alken aufweist, dargestellt.

Esfandiari et al. veröffentlichten 2011 eine Synthese zur Darstellung von Verbindung **46**.²³⁶ Dazu wurde 4-Pentensäurechlorid in Dichlormethan gelöst und die Lösung mit 2,4-Dimethylpyrrol und Phosphoroxychlorid versetzt. Die Lösung wurde unter Reflux 16 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Vakuum abdestilliert und der Rückstand in Hexan gelöst. Die Lösung wurde fünf Stunden bei - 35 °C gelagert und das Lösungsmittel abdekantiert. Der Rückstand wurde anschließend in Toluol gelöst und bei 80 °C mit Triethylamin und Bortrifluoriddiethyletherat versetzt. Nach einstündigem Rühren erfolgte die Aufreinigung durch Waschen mit gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung. Das Produkt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt. Da diese Methode sehr zeitintensiv und im Rahmen dieser Arbeit lediglich zu einer sehr geringen Ausbeute von lediglich 8% (Literatur 27%)²³⁶ führte, wurde die Reaktion optimiert (s. Abb. 63).

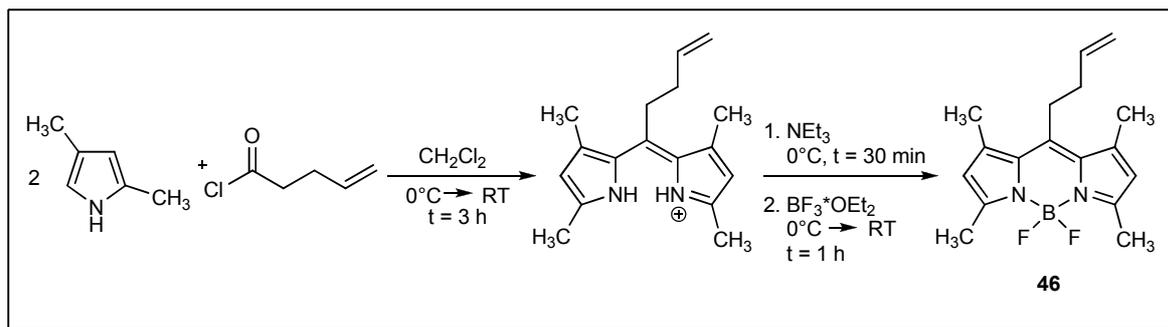


Abb. 63 Darstellung des BODIPY-Derivats 46.

Aufgrund der hohen Reaktivität von Säurechlorid-Derivaten erfolgte die Zugabe des Pyrrols unter Eiskühlung innerhalb von 30 Minuten. Auf die Zugabe von Phosphoroxchlorid wurde vollständig verzichtet. Die Reaktionslösung wurde drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, wobei eine längere Reaktionszeit keinerlei Verbesserung der Ausbeute zur Folge hatte. Die Zugabe von Triethylamin und Bortrifluorid-diethyletherat erfolgte ebenfalls unter Eiskühlung. Nach einstündigem Rühren der Lösung wurde säulenchromatographisch aufgereinigt. Die Synthese wurde damit deutlich vereinfacht und die Reaktionszeit drastisch verkürzt bei gleichzeitiger Steigerung der Ausbeute auf 39%.

6.8 α,β -Dibromierte BODIPY-Derivate

Für die Komplexierung zweiwertiger Kationen werden zweizählige Liganden benötigt. So wird beispielsweise in Cisplatin ein Pt^{2+} -Ion durch zwei Aminogruppen komplexiert (s. Abb. 64).

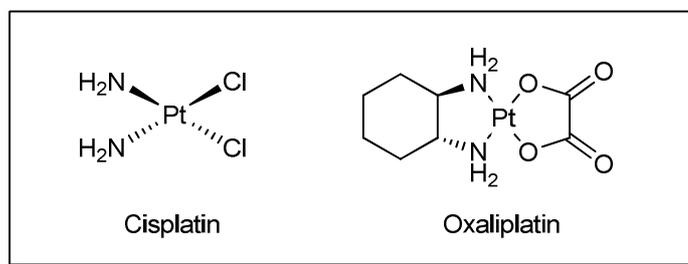


Abb. 64 Cisplatin und Oxaliplatin

Ein weiteres prominentes Beispiel aus dem Bereich der Zytostatika ist das Oxaliplatin, in dem das Pt^{2+} -Ion durch einen 1,2-Diaminocyclohexyl-Liganden (DACH-Ligand) und

einem Oxalat-Ion komplexiert wird. Für die Fluoreszenzmarkierung dieser Verbindungen benötigt man einen Fluorophor, der eine Diaminofunktionalität in α,β -Position aufweist. Dazu sollte im Rahmen dieser Arbeit ein BODIPY-Derivat mit dieser Eigenschaft dargestellt werden (s. Abb. 65, Verbindung **47**).

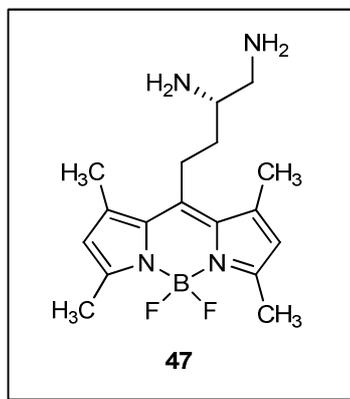


Abb. 65 BODIPY-Derivat mit α,β -Diaminofunktionalität.

Da der Aufbau des BODIPY-Grundkörpers das Vorhandensein eines Säurechlorids oder einer Carbonylverbindung voraussetzt (s. Kapitel 4.5.2.1), wurde versucht Verbindung **47** ausgehend von dem entsprechenden α,β -Dibrom-BODIPY-Derivat (**50**) mittels nucleophiler Substitution durch Ammoniak darzustellen.

Dazu wurde zunächst 4-Pentensäure in Anlehnung an die von Starostin *et al.* entwickelte Methode bromiert (s. Abb. 66).²³⁷

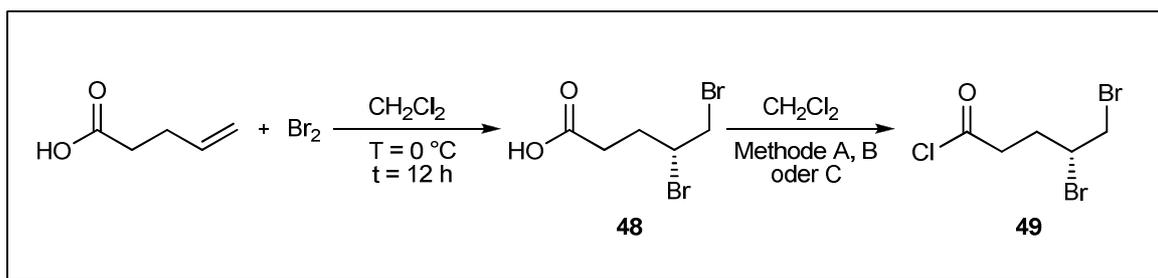


Abb. 66 Synthese des 3,4-Dibrompentansäurechlorids.²³⁷

Die Reaktion verlief quantitativ, so dass auf eine Aufreinigung verzichtet werden konnte. Die Umwandlung der Carbonsäure in das Carbonsäurechlorid konnte durch die Reaktion mit überschüssigem Thionylchlorid in Dichlormethan erzielt werden. Das Reaktionsgemisch wurde zwei Stunden bei 40 °C gerührt. Diese Reaktion erfolgte in

Anlehnung an Hayashi *et al.*²³⁸ Verbindung **49** konnte in 82%iger Ausbeute erhalten werden (Methode A).

Bei dem Versuch die Ausbeute dieser Reaktion zu steigern wurde statt Thionylchlorid Phosphorpentachlorid verwendet (s. Tabelle 4). Die Reaktionslösung wurde ebenfalls zwei Stunden bei 40 °C gerührt (Methode B). Die Ausbeute lag in diesem Fall allerdings nur bei 75%. Daher wurde eine dritte Methode zur Darstellung des Säurechlorids untersucht. Dazu wurde als Chlorierungsreagenz Oxalylchlorid verwendet und die Reaktionslösung eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung fünf Minuten auf 50 °C erwärmt (Methode C). Verbindung **49** konnte in 93%iger Ausbeute erhalten werden. Der Reaktionsverlauf wurde in allen Fällen mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt.

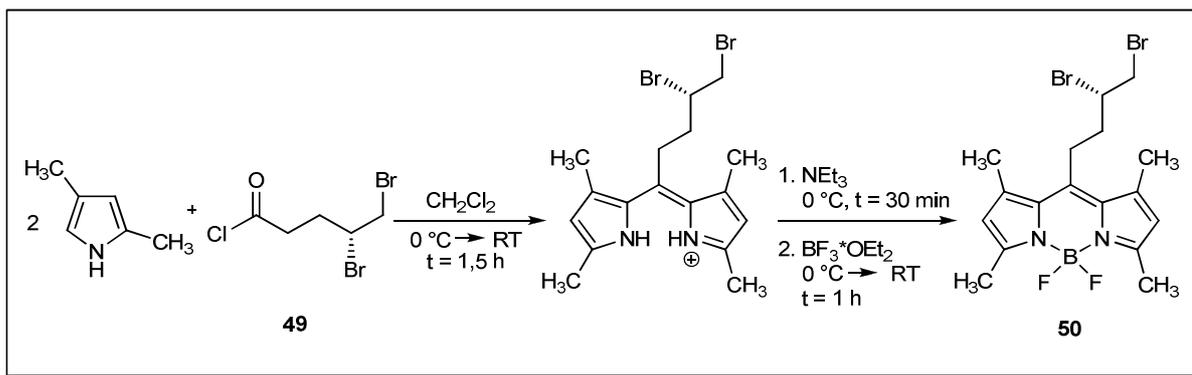
Tabelle 4 Reaktionsbedingungen für die Darstellung von Verbindung **49**.

Methode	Lösungsmittel	Chlorierungsreagenz	Reaktionszeit [h]	Ausbeute [%]
A	CH ₂ Cl ₂	SOCl ₂	2	82
B	CH ₂ Cl ₂	PCl ₅	2	75
C	CH ₂ Cl ₂	(COCl) ₂	1	93

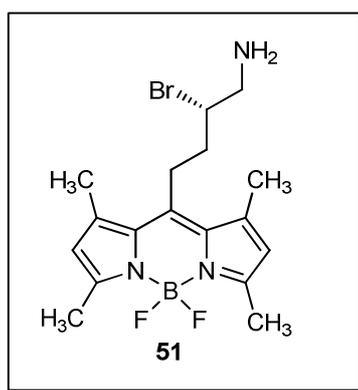
Es zeigte sich, dass durch die Darstellung des Säurechlorids mittels Oxalylchlorid (Methode C) Verbindung **49** in sehr guten Ausbeuten erhalten und die Reaktionszeit im Vergleich zu den anderen Methoden halbiert werden konnte.

Das so dargestellte 3,4-Dibrompentansäurechlorid wurde anschließend in Dichlormethan gelöst und mit 3,4-Dimethylpyrrol bei 0 °C versetzt (s. Abb. 67).

Die Reaktionslösung wurde 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend unter Eiskühlung mit Triethylamin versetzt. Nach 30 minütigem Rühren bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von Bortrifluoriddiethyletherat bei 0 °C. Es wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, bevor das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt werden konnte. Verbindung **50** konnte in 12%iger Ausbeute erhalten werden.

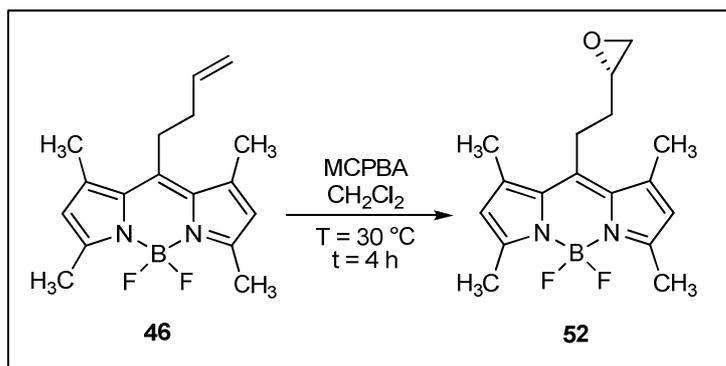
Abb. 67 Synthese des BODIPY-Derivats **50**.

Verbindung **50** wurde daraufhin mit einem großen Überschuss 7*N* methanolischem Ammoniak versetzt und bei 80 °C und 10 bar für 1 Stunde unter Mikrowellenstrahlung gerührt. Dabei entstand nicht wie erwartet Verbindung **47**, sondern das monoaminierte Produkt **51** (s. Abb. 68).

Abb. 68 Nebenprodukt **51**.

Die Bildung des sekundären Amins scheint sterisch gehindert zu sein. Auch drastischere Reaktionsbedingungen wie eine längere Reaktionszeit und erhöhte Temperatur führten nicht zur gewünschten Diaminierung, da Zersetzung eintrat.

Daraufhin wurde ein alternativer Syntheseweg gewählt, um Verbindung **47** darzustellen. Verbindung **46** wurde dazu in DCM gelöst und mit MCPBA bei 30 °C vier Stunden gerührt. Es konnte das entsprechende Epoxid-Derivat **52** in 62%iger Ausbeute erhalten werden (s. Abb. 69).



MCPBA = *meta*-Chlorperbenzoesäure

Abb. 69 Synthese des Epoxid-BODIPY-Derivats.

Die Öffnung des Epoxidrings erfolgte durch Zugabe von LiOH in Wasser bei 30°C für 2 Stunden. Es konnte das entsprechende Diol **53** in 13%iger Ausbeute erhalten werden (s. Abb. 70).

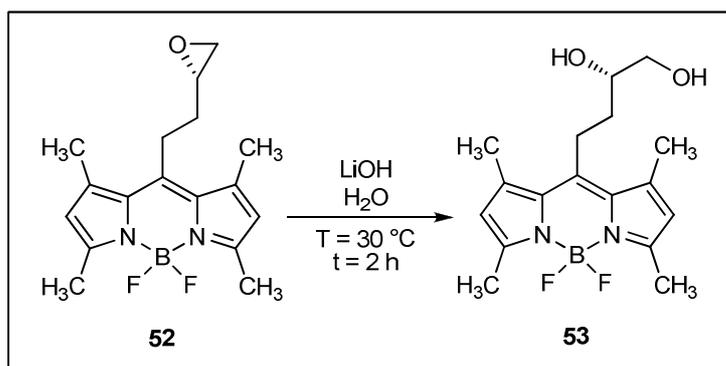


Abb. 70 Synthese des Diol-BODIPY-Derivats **53**.

In einem nächsten Schritt sollte durch die Umsetzung von Verbindung **53** mit Mesylchlorid und Natriumazid Verbindung **54** dargestellt werden (s. Abb. 71), so dass in einem folgenden Schritt durch Reduktion die Zielstruktur **47** erhalten werden kann.

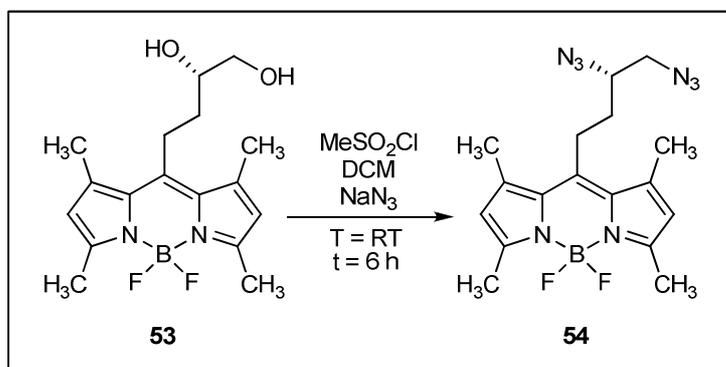


Abb. 71 Synthese des Diazid-BODIPY-Derivats **54**.

Die Synthese des Diazid-BODIPY-Derivats war leider nicht zielführend, da auch hier wieder lediglich die primäre Hydroxylgruppe in die Azidfunktion umgewandelt werden konnte. Auch die Variation des Lösungsmittels und der Reaktionszeit waren nicht zielführend. Somit gelang im Rahmen dieser Arbeit nicht die Generierung eines α , β -Diamino-BODIPY-Derivats. Die sterische Hinderung des sekundären Substituenten führte lediglich stets zu den monosubstituierten Derivaten.

In weiterführenden Studien sollte die Einführung der Diaminfunktionalität bereits bei der BODIPY-Grundkörpergenerierung erfolgen. Dabei ist allerdings zu beachten, dass die Schützung der Diaminofunktionalitäten bei Wahl dieser Strategie zwingend notwendig ist, um komplexe Nebenreaktionen zu vermeiden, die die ohnehin schwierige Aufreinigung der BODIPY-Derivate nicht zusätzlich erschweren und damit die Ausbeute verringern würden. Im Rahmen dieser Arbeit war dies leider nicht mehr möglich.

.

7 Darstellung und Charakterisierung fluoreszenzmarkierter Thioadenosin-Derivate

7.1 Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Adenosin-Derivate mit den in Kapitel 6 vorgestellten BODIPY-Derivaten fluoreszenzmarkiert werden, um Werkzeuge für die Charakterisierung der membranständigen Rezeptoren zu erhalten und neue Einsichten in die Rezeptorvermittelte Endozytose zu bekommen. Des Weiteren können fluoreszenzmarkierte Adenosin-Derivate für die Bestimmung der Affinitäten neuer Liganden durch die Verwendung von fluoreszenz-basierten Assays genutzt werden und damit die zur Zeit vorherrschenden radioaktiv-markierten Liganden ersetzen. Die Vorteile, die mit dem Verzicht von radioaktiv detektierten Versuchen einhergehen, liegen auf der Hand. Sie reichen von der Minimierung des gesundheitlichen Risikos über die Vermeidung radioaktiven Abfalls, der kostenintensiv eingelagert werden muss, bis hin zu verminderten Dokumentationspflichten gegenüber den Behörden. Fluoreszenz-basierte Assays können diese Risiken sowie die Kosten drastisch reduzieren.

Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es allerdings nur wenige affine und gleichzeitig selektive fluoreszenzmarkierte Adenosin-Derivate. So konnte beispielsweise Dr. Fabian Heisig selektive A_1 -Adenosinrezeptor-Agonisten und A_{2B} -Adenosinrezeptor-Antagonisten mit K_i -Werten im unteren nanomolaren Bereich darstellen.²²⁸ Auch die Arbeitsgruppe von S. Hill konnte einen selektiven Adenosinrezeptorliganden entwickeln. Dieser bindet im subnanomolaren Bereich an den A_3 -Rezeptor.²³⁹ Die ebenfalls in diesem Arbeitskreis entwickelten fluoreszierenden A_1 -Rezeptorliganden zeigten zwar gute Affinitäten am Adenosinrezeptor, weisen allerdings keinerlei Selektivität auf.¹⁶⁶

In unserem Arbeitskreis wurden Derivate des 2-Thioadenosin synthetisiert, die gute Affinität und teilweise auch Selektivität zum A_{2A} -Adenosinrezeptor aufweisen (s. Kapitel 8). Da bislang kein fluoreszierender A_{2A} -Adenosinrezeptorligand mit ausreichender Affinität und Selektivität verfügbar ist, wurde 2-Thioadenosin als Grundgerüst für die Fluoreszenzmarkierung gewählt. Fabian Heisig stellte im Rahmen seiner Dissertation Verbindung **56** dar.²²⁸ Diese Verbindung wurde von Andrea Behrenswerth in Radioligandbindungsstudien am rA_{2A} -Adenosinrezeptor getestet und wies an diesem Rezeptor eine Affinität im mikromolaren Bereich auf.²⁴⁰

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden von dieser Substanzklasse weitere Analoga hergestellt und mittels Radioligandbindungsstudien auf deren Affinität und Selektivität an den Adenosinrezeptoren getestet, mit dem Ziel die Affinität zu steigern.

7.2 Synthese fluoreszenzmarkierter Thioadenosin-Derivate

Für die Darstellung der analogen Verbindungen wurde 2-Thioadenosin in DMF gelöst und die Thiol-Funktionalität durch Zugabe von Natriummethanolat deprotoniert. Die Kopplung des Fluorophors erfolgte im Folgenden durch eine nucleophile Substitutionsreaktion (s. Abb. 72).

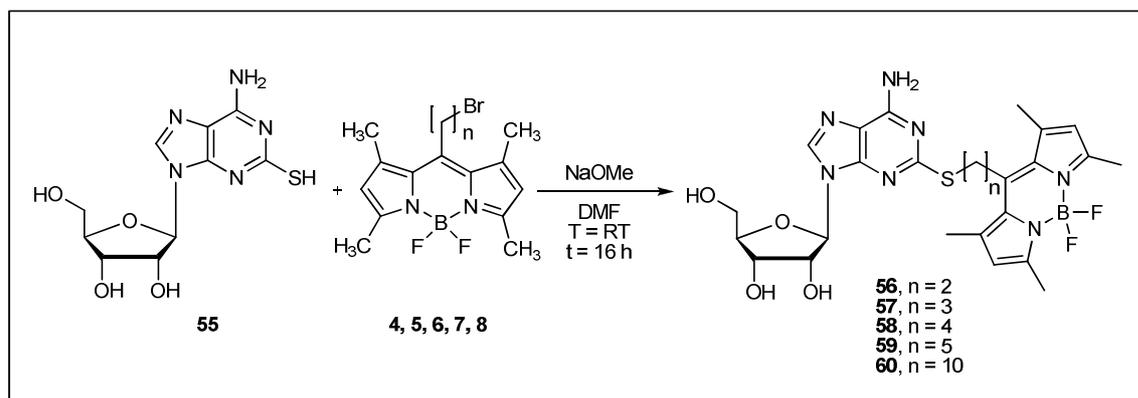


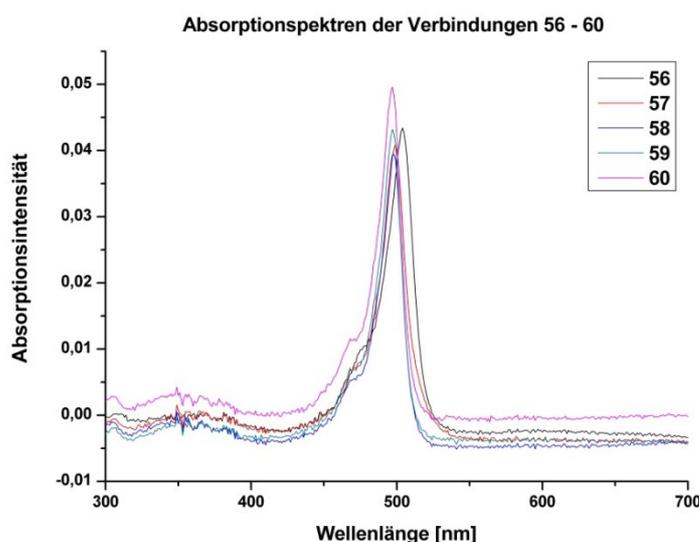
Abb. 72 Synthese der fluoreszierenden Thioadenosin-Derivate.

Die Verbindungen **56** bis **60** konnten nach säulenchromatographischer Reinigung in mittleren bis guten Ausbeuten isoliert werden (s. Tabelle 5).

Tabelle 5 Ausbeuten der Verbindungen **56 - 60**.

Verbindung (SG)	Kettenlänge n	Ausbeute [%]
56 (239)	2	79
57 (237)	3	73
58 (235)	4	63
59 (236)	5	54
60 (240)	10	54

Es wurden Absorptions- und Emissionsspektren der so dargestellten Verbindungen aufgenommen. Die Substanzen zeigten ein Absorptionsmaximum von 497 bzw. 498 nm (s. Abb. 73).

**Abb. 73** Absorptionsspektren der Verbindungen **56 - 60**.

Die Emission der Verbindungen lag zwischen 504 und 512 nm (s. Abb. 74). Die spektroskopischen Eigenschaften bleiben also im Vergleich mit dem ungekoppelten Fluorophor unverändert. Weiterhin wurden die Fluoreszenzquantenausbeuten in Ethanol bestimmt. Als Referenz diente der Fluorophor Rhodamin 6G. Alle dargestellten fluoreszenzmarkierten Adenosin-Derivate zeigten dabei Quantenausbeuten von nahezu 100% und sind daher hervorragend beispielsweise für den Einsatz in der Fluoreszenzmikroskopie geeignet.

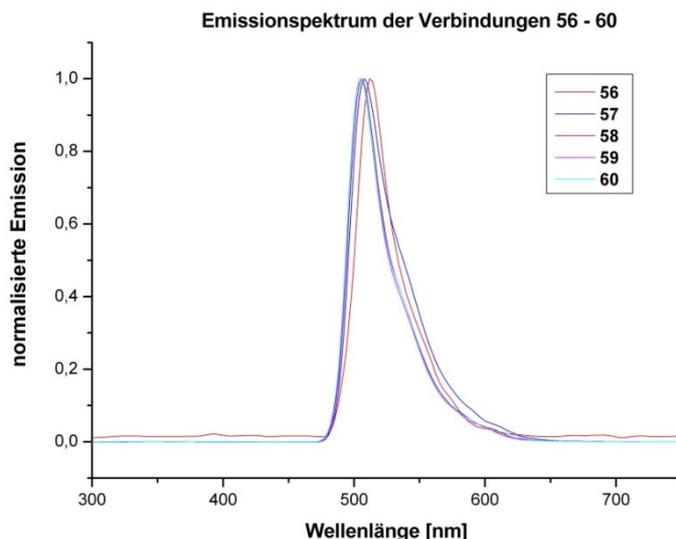
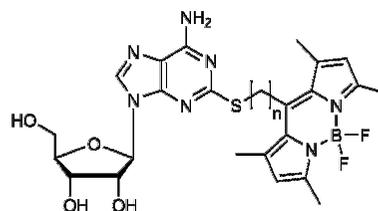


Abb. 74 Emissionsspektren der Verbindungen 56 - 60.

7.3 Pharmakologische Untersuchung der fluoreszenzmarkierten Thioadenosin-Derivate

Die so dargestellten Verbindungen **56** bis **60**, sowie Verbindung **55** wurden im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von Radioligandbindungsstudien auf deren Affinität und Selektivität an Adenosinrezeptoren untersucht (s. Tabelle 6). Dazu wurden die Substanzen an nativen Rattenhirn und an den humanen Rezeptoren getestet, um sowohl Aussagen über die Affinitäten an den unterschiedlichen Subtypen als auch über eventuell vorhandene Speziesunterschiede treffen zu können. Dazu wurden für die A_1 -Bindungsstudien der A_1 -selektive Radioligand [^3H]CCPA und für die A_{2A} -Bindungsstudien [^3H]CGS21680 verwendet. Für die A_{2B} -Bindungsstudien wurde der A_{2B} -selektive Antagonist [^3H]PSB-603 eingesetzt, da bis zum jetzigen Zeitpunkt kein A_{2B} -selektiver Agonist zur Verfügung steht. A_3 -Bindungsstudien wurden einerseits mit dem unselektiven Liganden [^3H]NECA als auch mit dem A_3 -Antagonist [^3H]PSB-11 durchgeführt, um den Effekt einer antagonistischen Radioligandbindung abschätzen zu können. Die A_1 - und A_{2A} -Rezeptoren entstammen Rattencortex bzw. -striatum Membranpräparationen. Die humanen A_1 -, A_{2A} -, A_{2B} - und A_3 -Rezeptoren sowie die Ratten A_3 -Rezeptoren wurden in CHO-Zellen exprimiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6 Affinitäten fluoreszenzmarkierter 2-Thioadenosin-Derivate zu den Adenosin-Rezeptor-Subtypen



Verbindung (SG)	Kettenlänge n	$K_i \pm \text{SEM} [\mu\text{M}]$ bzw. Inhibition in % (Konzentration) (n = 3)				
		A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]CGS21680	A _{2B} human [³ H]PSB603	A ₃ human / Ratte [³ H]NECA	A ₃ human [³ H]PSB-11
56 (239)	2	5.23 ± 2.51 ^a 6.22 ± 0.51	7.88 ± 0.75 ≥ 10 48 ± 1 (10 μM)	> 10 7 ± 1 (10 μM)	0.566 ± 0.166 3.62 ± 1.49 ^a	~ 10 57 ± 4 (10 μM)
57 (237)	3	1.36 ± 0.13 0.304 ± 0.015	2.83 ± 0.85 1.08 ± 0,07	> 10 23 ± 10 (10 μM)	0.707 ± 0.058 2.34 ± 0.36 ^a	0.558 ± 0.071
58 (235)	4	2.23 ± 0.73 0.344 ± 0.067	1.37 ± 0.10 0.879 ± 0.181	> 10 18 ± 4 (10 μM)	0.211 ± 0.023 3.50 ± 4.03 ^a	0.542 ± 0.031
59 (236)	5	3.27 ± 0.97 0.368 ± 0.091	7.58 ± 5.11 0.865 ± 0.133	> 10 7 ± 5 (10 μM)	0.341 ± 0.096 1.95 ± 0.37 ^a	0.223 ± 0.020
60 (240)	10	1.41 ± 0.67 ^a 0.709 ± 0.047	1.44 ± 0.44 2.63 ± 0.30	> 10 - 2 ± 6 (10 μM)	1.06 ± 0.24 0.715 ± 0.053 ^a	~ 10 56 ± 3 (10 μM)

^a n = 2

Die Untersuchungen am A_1 -Rezeptor zeigten, dass ein Speziesunterschied zwischen Ratten- und humanem Rezeptor auszumachen ist. Es konnten mit Ausnahme von Verbindung **56** höhere Affinitäten (nanomolarer Bereich) am Ratten- als am humanen A_1 -Rezeptor (mikromolarer Bereich) beobachtet werden (s. Abb. 75 und Abb. 76). Die höchste Affinität ($1,36 \mu\text{M}$ human bzw. 304 nM Ratte) ließ sich mit einer Linkerlänge von drei Methylen-Einheiten beobachten. Wurde der Linker um eine bzw. zwei Methylen-Einheiten verlängert, führte dies am Rattenrezeptor zu einer sehr geringen Abnahme der Affinität. Am humanen Rezeptor fiel der Affinitätsverlust bei Verlängerung der Linkerlänge deutlicher aus. So konnte bei einer Linkerlänge von fünf Methylen-Einheiten lediglich ein K_i -Wert von $3,27 \mu\text{M}$ beobachtet werden. Eine weitere Verlängerung des Linkers auf zehn Methylen-Einheiten führte am Rattenrezeptor zu einem leichten Affinitätsverlust. Am humanen Rezeptor fiel dieser Verlust geringer aus. Ein kürzerer Linker mit zwei Methylen-Einheiten wurde sowohl vom Ratten- als auch vom humanen Rezeptor weniger gut toleriert, so dass deutlich niedrigere Affinitäten erzielt wurden ($5,23 \mu\text{M}$ human bzw. $6,22 \mu\text{M}$ Ratte). Eine mittlere Linkerlänge scheint beim A_1 -Rezeptor dementsprechend bevorzugt zu werden.

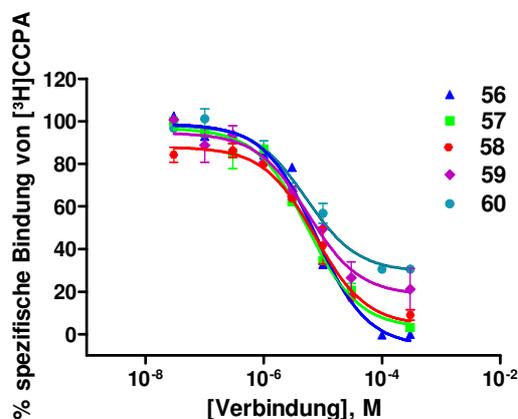


Abb. 75 Kompetitionskurven der Verbindungen **56-60** an A_1 -Adenosinrezeptoren (Rattencortex) gegen 1 nM $[^3\text{H}]\text{CCPA}$. Es wurde ein K_i -Wert für Verbindung **57** von $0,304 \mu\text{M}$, für **58** von $0,344 \mu\text{M}$, für **59** von $0,368 \mu\text{M}$ und für **60** von $0,709 \mu\text{M}$ ermittelt. Die Kurven stammen von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

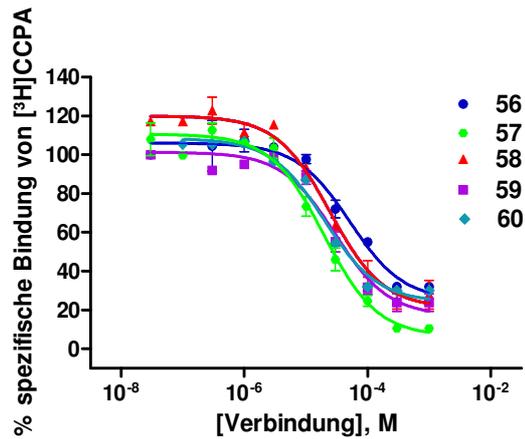


Abb. 76 Kompetitionskurven der Verbindungen **56-60** gegen 1 nM [³H]CCPA an rekombinanten CHO-Zellmembranen, die den humanen A₁-Rezeptor exprimieren. Es wurde ein K_i-Wert für Verbindung **57** von 1,36 μM, für **58** von 2,23 μM, für **59** von 3,27 μM und für **60** von 1,41 μM ermittelt. Die Kurven stammen von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

Am A_{2A}-Rezeptor sind ebenfalls Speziesunterschiede auszumachen (s. Abb. 77 und Abb. 78). So zeigte Verbindung **56** mit kurzem Linker am Rattenrezeptor eine geringe Affinität (48% Inhibition bei 10 μM, K_i-Wert ca. 10 μM) und am humanen Rezeptor eine Affinität von 7,88 μM. Mit steigender Linkerlänge stieg die Affinität an. Verbindungen **58** und **59** wiesen vergleichbar gute Affinitäten am Rattenrezeptor im nanomolaren Bereich auf. Am humanen Rezeptor stellte Verbindung **58** die affinste Verbindung dar. Verbindung **60** mit sehr langem Linker wurde mit einem K_i-Wert von 1,44 μM am humanen und mit 2,63 μM am Rattenrezeptor eher moderat gebunden.

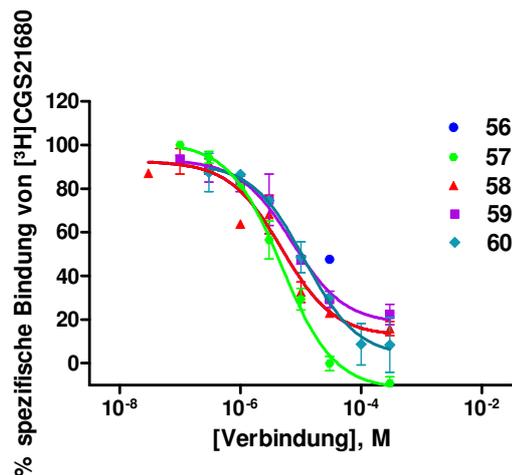


Abb. 77 Kompetitionskurven der Verbindungen **56-60** an A_{2A}-Adenosinrezeptoren (Rattenstriatum) gegen 5 nM [³H]CGS21680. Es wurde ein K_i-Wert für Verbindung **56** von ca. 10 μM, für **57** von 1,08 μM, für **58** von 0,879 μM, für **59** von 0,865 μM und für **60** von 2,63 μM ermittelt. Die Kurven stammen von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

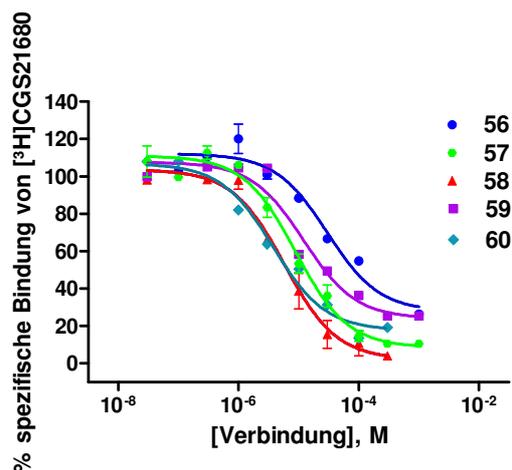


Abb. 78 Kompetitionskurven der Verbindungen **56-60** an rekombinanten CHO-Zellmembranen, die den humanen A_{2A} -Rezeptor exprimieren gegen 5 nM [3H]CGS21680. Es wurde ein K_i -Wert für Verbindung **56** von 7,88 μM , für **57** von 2,83 μM , für **58** von 1,37 μM , für **59** von 7,58 μM und für **60** von 1,44 μM ermittelt. Die Kurven stammen von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

Eine Bindung an A_{2B} -Rezeptoren konnte nicht beobachtet werden. Dies steht in Übereinstimmung mit Berichten von Volpini *et al.*, nach denen für diese Art von Strukturen eine Affinität am A_{2B} -Rezeptor nicht erwartet werden kann.²⁴¹

Für den A_3 -Rezeptor konnte ebenfalls ein Speziesunterschied beobachtet werden. Allerdings war hier bemerkenswert, dass entgegen der Beobachtungen am A_1 - und A_{2A} -Rezeptor eine höhere Affinität für den humanen als zum Rattenrezeptor erzielt wurde. Verbindung **58** wies bei Verwendung des Agonist-Radioliganden [3H]NECA die höchste Affinität mit 211 nM auf. Allerdings konnten bei den anderen Verbindungen Affinitäten in etwa der gleichen Größenordnung beobachtet werden (s. Abb. 79 und Abb. 80). Wurde stattdessen der Antagonisten-Radioligand [3H]PSB-11 für die Konkurrenzexperimente verwendet, so konnte mit Ausnahme von Verbindung **59** eine leicht reduzierte Affinität beobachtet werden. Die Bindungsstudien am Ratten- A_3 -Rezeptor zeigten Affinitäten im unteren mikromolaren Bereich. Es konnte festgestellt werden, dass mit steigender Linkerlänge die Affinität zu diesem Rezeptor zunahm. Verbindung **60**, die den längsten Linker dieser Serie aufweist, zeigte hier die höchste Affinität mit 715 nM. Entgegen der Erwartungen konnten keine deutlichen Unterschiede in der Affinität bei Verwendung eines antagonistischen Radioliganden beobachtet werden.

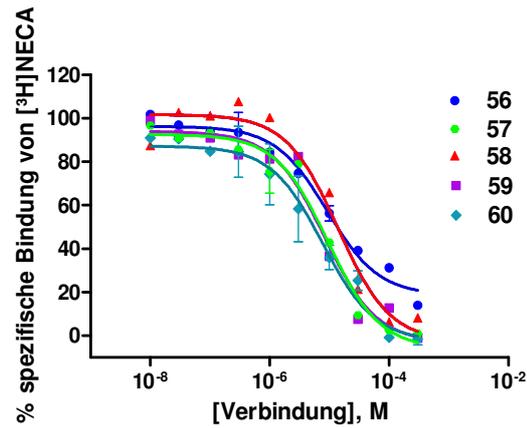


Abb. 79 Kompetitionskurven der Verbindungen **56-60** an rekombinanten CHO-Zellmembranen, die den Ratten A_3 -Rezeptor exprimieren, gegen 10 nM $[^3H]NECA$. Es wurde ein K_i -Wert für Verbindung **56** von 3,62 μM , für **57** von 2,34 μM , für **58** von 3,50 μM , für **59** von 1,95 μM und für **60** von 0,715 μM ermittelt. Die Kurven stammen aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

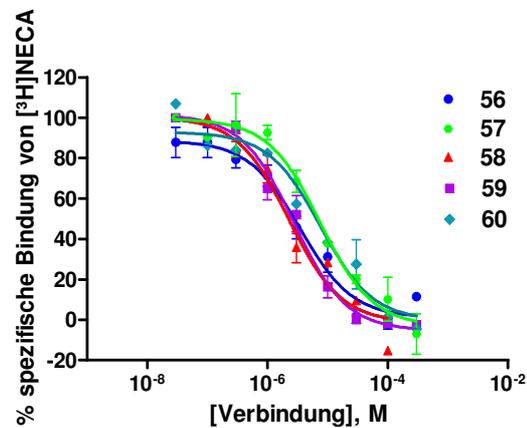


Abb. 80 Kompetitionskurven der Verbindungen **56-60** an rekombinanten CHO-Zellmembranen, die den humanen A_3 -Rezeptor exprimieren, gegen 10 nM $[^3H]NECA$. Es wurde ein K_i -Wert für Verbindung **56** von 0,566 μM , für **57** von 0,707 μM , für **58** von 0,211 μM , für **59** von 0,341 μM und für **60** von 1,06 μM ermittelt. Die Kurven stammen von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

Die Speziesunterschiede der Adenosinrezeptorsubtypen sind durch Gegenüberstellung der pK_i -Werte der untersuchten fluoreszenzmarkierten Derivate in Abb. 81 und Abb. 82 (Graph A, B und C) veranschaulicht.

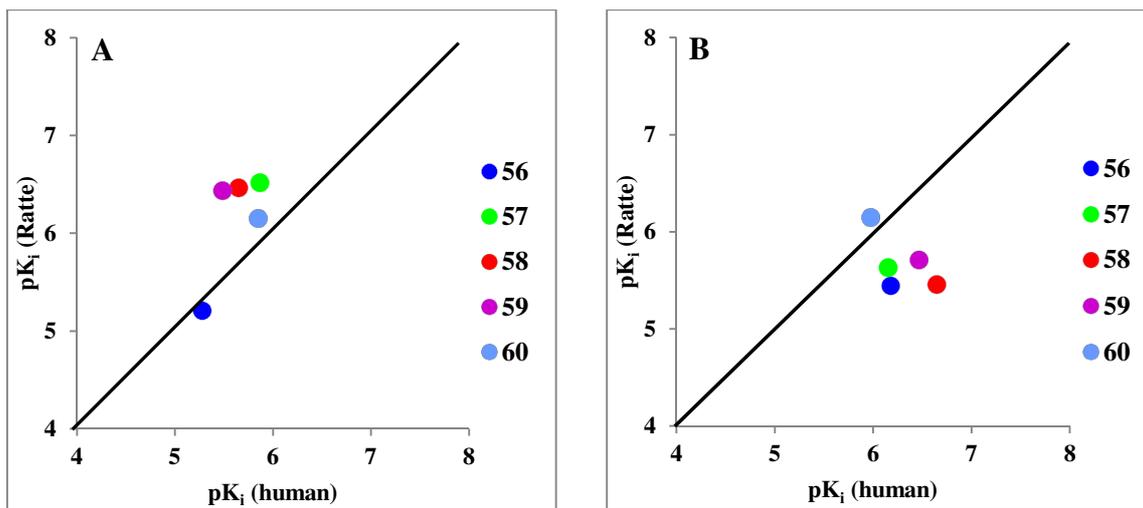


Abb. 81 Vergleich der pK_i-Werte der getesteten fluoreszenzmarkierten 2-Thioadenosin-Derivate an humanen und Ratten-A₁-Adenosinrezeptoren (A) und an humanen und Ratten A_{2A}-Adenosinrezeptoren (B).

Die Tatsache, dass sich in Grafik A fast alle Datenpunkte oberhalb der Diagonalen befinden, zeigt, dass die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten fluoreszenzmarkierten Derivate eine höhere Affinität zum Ratten-A₁-Rezeptor als zum humanen Rezeptor besitzen. Lediglich Verbindung **56** mit dem kürzesten Linker zeigte ähnliche Affinitäten für beide Spezies.

In Grafik B ist festzustellen, dass sich fast alle Datenpunkte unterhalb der Diagonale befinden. Die Verbindungen binden somit stärker an den humanen als an den Ratten-A_{2A}-Rezeptor. Die Ausnahme stellt Verbindung **60** mit dem längsten Linker dar. Die K_i-Werte für beide Spezies sind an beiden Rezeptoren, A₁ und A_{2A}, annähernd identisch. Diese Unterschiede bestätigen frühere Beobachtungen und zeigen, dass die Bestimmung der Affinitäten an unterschiedlichen Spezies bei zukünftigen Untersuchungen unverzichtbar ist.^{242, 243}

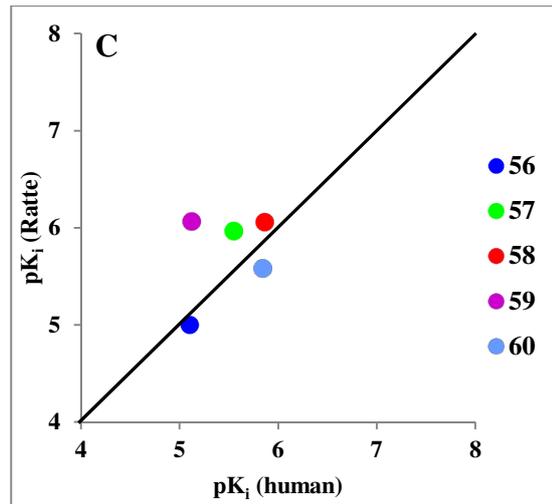


Abb. 82 Vergleich der pK_i-Werte der getesteten fluoreszenzmarkierten 2-Thioadenosin-Derivate am humanen und Ratten-A₃-Adenosinrezeptoren.

In Grafik C (s. Abb. 82) ist erkennbar, dass Verbindung **56** (kürzester Linker) und **60** (längster Linker) in der Nähe der Diagonalen liegen. Verbindung **60** bindet unwesentlich stärker an den humanen als an den Rattenrezeptor. Bei Verbindung **56** sind die Affinitäten zu beiden Spezies vergleichbar. Die Verbindungen **57-59** dagegen befinden sich oberhalb der Diagonale und binden damit stärker an den Rattenrezeptor als an den humanen. Die Speziesunterschiede am A₃-Rezeptor sind damit weniger stark ausgeprägt als am A₁- oder A_{2A}-Adenosinrezeptor.

Da anhand von Bindungsstudien nicht abgelesen werden kann, ob es sich bei den hier hergestellten Verbindungen um Agonisten oder Antagonisten handelt, wurden funktionelle Studien durchgeführt.

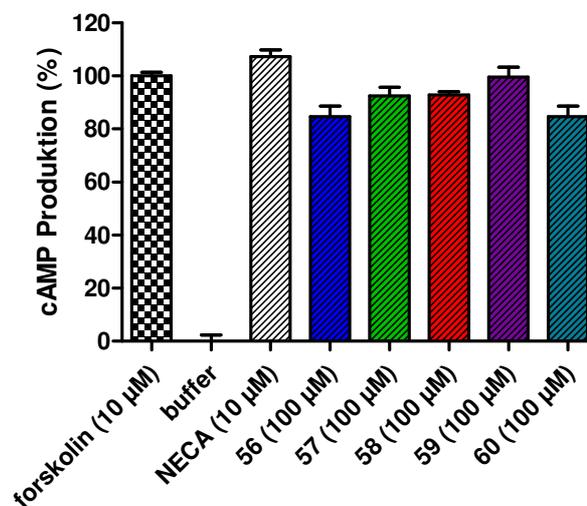


Abb. 83 Durch Testverbindungen **56-60** (100 µM) induzierte cAMP-Akkumulation in CHO-Zellen, die den humanen A_{2A}-Adenosinrezeptor exprimieren, im Vergleich zum Vollagonisten NECA (10 µM ≙ 100 %).

In Abb. 83 sind die für die getesteten 2-Thioadenosin-Derivate **56-60** (finale Konzentration 100 μM) ermittelten prozentualen cAMP-Level im Vergleich zu denen des unselektiven Vollagonisten NECA (finale Konzentration 10 μM) dargestellt. Es stellte sich heraus, dass Zellen, die den humanen A_{2A} -Adenosinrezeptor exprimieren und mit im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten fluoreszierenden 2-Thioadenosin-Derivate behandelt wurden, vergleichbare Mengen an cAMP akkumulierten wie die Kontrollzellen, die mit NECA inkubiert wurden. Die dargestellten Verbindungen stellen also Agonisten am humanen A_{2A} -Rezeptor dar.

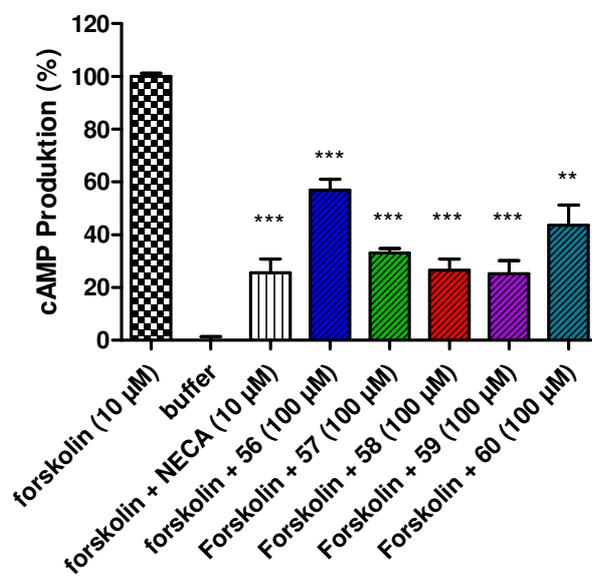


Abb. 84 Durch die Testverbindungen **56-60** (100 μM) induzierte Reduktion der Forskolin-abhängigen cAMP-Akkumulation in CHO-Zellen, die den humanen A_3 -Adenosinrezeptor exprimieren, im Vergleich zum Vollagonisten NECA (10 μM $\hat{=}$ 100 %). Die Daten wurden mittels Student's t-Test analysiert, Graphpad Prism Version 5. Die signifikanten Unterschiede wurden wie folgt angegeben: *** $P < 0,0001$, ** $P < 0,001$. Die Daten stammen von drei unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden.

Außerdem wurde die prozentuale Reduktion der Forskolin-abhängigen cAMP-Akkumulation in CHO-Zellen, die den humanen A_3 -Adenosinrezeptor exprimieren, induziert durch die Verbindungen **56-60** (finale Konzentration 100 μM) im Vergleich zu der des unselektiven Vollagonisten NECA (finale Konzentration 10 μM) ermittelt (s. Abb. 84). Dabei stellte sich heraus, dass Zellen, die mit den Verbindungen **57-59** inkubiert wurden, eine vergleichbare Reduktion an cAMP aufwiesen wie die Kontrollzellen, die mit NECA behandelt wurden. Diese Verbindungen wirken als Agonisten am humanen A_3 -Adenosinrezeptor. Zellen, die mit den Verbindungen **56** und **60** inkubiert wurden, zeigen hingegen eine verringerte Reduktion des cAMP-Niveaus, so dass diese beiden Verbindungen partiell agonistisch an diesem Subtyp wirken.

7.4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten vier fluoreszenzmarkierte Adenosinrezeptorliganden in guten bis sehr guten Ausbeuten synthetisiert werden. Deren Untersuchung mittels Radioligandbindungsstudien ergab, dass die Verbindungen Affinität sowohl am A_1 - und A_{2A} -Rezeptor als auch am A_3 -Rezeptor aufwiesen. Mit dem A_{2B} -Rezeptor zeigten die Testsubstanzen erwartungsgemäß keine Interaktion.

Die beste Affinität zum A_1 -Rezeptor wurde mit Verbindung **57**, die einen dreiatomigen Linker aufweist, erzielt. Am A_{2A} -Rezeptor konnten **58** und **59** als potenteste Verbindungen identifiziert werden (s. Abb. 85). Die K_i -Werte dieser Verbindungen lagen im oberen nanomolaren Bereich. Alle Verbindungen dieser Serie zeigten an beiden Subtypen eine geringere Wirkung am humanen Rezeptor als am Rattenrezeptor.

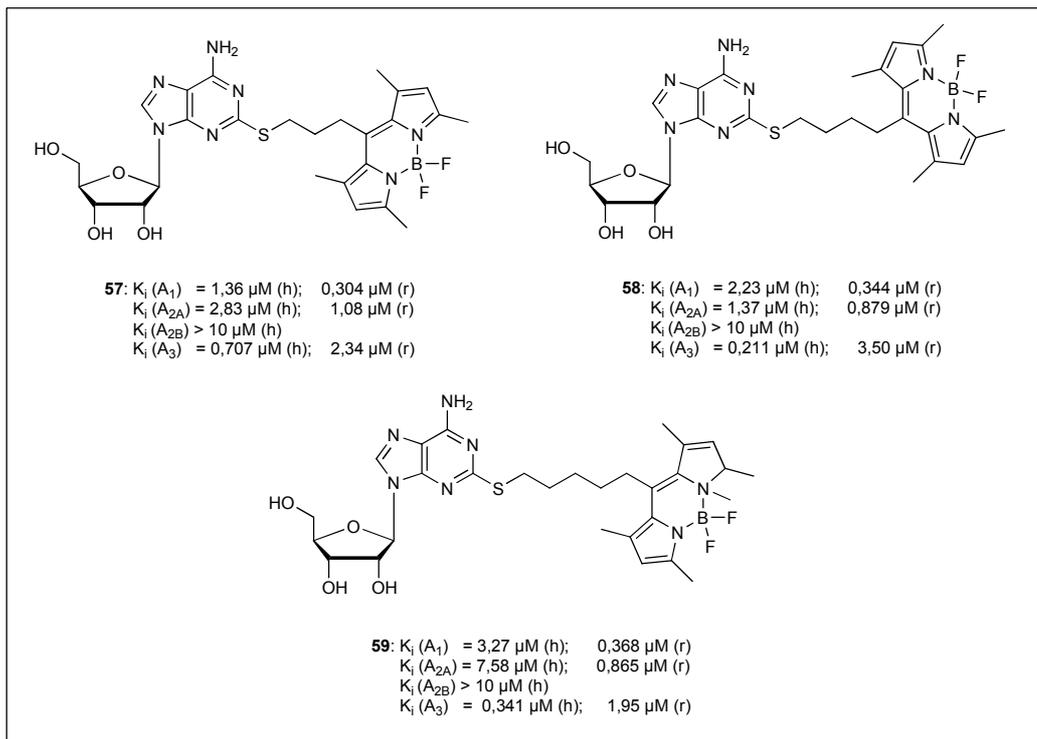


Abb. 85 Fluoreszenzmarkierte 2-Thioadenosin-Derivate als neue pharmakologische Tools für die Charakterisierung von Adenosinrezeptoren.

Verbindung **58** erwies sich am A_3 -Rezeptor als die potenteste Substanz der Serie und es konnte ein K_i -Wert von 211 nM am humanen Rezeptor bestimmt werden. Bemerkenswert

bei den Studien an diesem Rezeptorsubtyp war, dass alle Testsubstanzen affiner an dem humanen als an dem Rattenrezeptor waren. Dies könnte an der geringeren Rezeptor-Homologie zwischen dem humanen und dem Ratten A_3 -Adenosinrezeptor liegen. Die Verbindungen scheinen stärkere Wechselwirkungen mit der humanen Bindungstasche einzugehen und zeigen daher erhöhte Affinität für diesen Rezeptor. Bei den Studien konnte kein signifikanter Unterschied bei der Verwendung des antagonistischen Radioliganden [3 H]PSB-11 anstelle des agonistischen Radioliganden [3 H]NECA beobachtet werden. Eine mögliche Ursache dafür könnte der Bindungsmodus von PSB-11 sein. Möglicherweise bindet PSB-11 nicht ausschließlich an die inaktive Konformation, sondern auch an eine Zwischenkonformation des Rezeptors, so dass die resultierenden Affinitäten der Testverbindungen sich nicht so stark unterscheiden wie erwartet. Da derzeit keine Kristallstruktur des humanen A_3 -Adenosinrezeptor verfügbar ist, kann diese Hypothese allerdings nicht überprüft werden.

Es wurden zusätzlich funktionelle Studien an rekombinierten CHO-Zellen, die den G_s -gekoppelten humanen A_{2A} - und den G_i -gekoppelten A_3 -Adenosinrezeptor stabil exprimierten, durchgeführt. Dazu wurde entweder die cAMP-Akkumulation in den Zellen nach Zugabe der Testsubstanzen oder die Reduktion des Forskolin-abhängigen cAMP-Levels nach Zugabe der Verbindungen bestimmt. Als Kontrolle diente der Vollagonist NECA. Die Zellen, die den humanen A_{2A} -Rezeptor exprimieren und mit den fluoreszierenden Testsubstanzen inkubiert wurden, akkumulierten alle vergleichbare Mengen cAMP verglichen mit den Zellen, die mit NECA inkubiert wurden. Die Testsubstanzen wirken damit agonistisch am humanen A_{2A} -Rezeptor. Die Zellen, die den G_i -gekoppelten humanen A_3 -Adenosinrezeptor exprimieren, und mit den Verbindungen **57 - 59** inkubiert wurden, zeigten eine vergleichbare Reduktion des cAMP-Levels verglichen mit der Kontrollgruppe, die mit dem unselektiven Vollagonisten NECA behandelt wurden. Diese Testverbindungen wirken am hA_3 -Rezeptor als Agonisten. Die Inkubation mit den Verbindungen **56** und **60** führte hingegen lediglich zu einer verringerten Reduktion des cAMP-Levels verglichen mit der Kontrollgruppe, so dass diese beiden Verbindungen partial agonistisch an diesem Subtyp wirken.

Die hier synthetisierten und in radioaktiven Bindungs- und funktionellen Studien pharmakologisch untersuchten Derivate **57 - 59** stellen somit wichtige Werkzeuge für die Entwicklung fluoreszenzbasierter Assays oder für Fragestellungen, die mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden können, dar.

In weiterführenden Studien sollte durch Einbringen von Heteroatomen und durch Substitutionen am Linker versucht werden, einerseits die Affinität und andererseits die Selektivität zugunsten eines Adenosinrezeptor-Subtyps zu steigern, so dass die Derivate auch in nativem Gewebe, in dem verschiedene Adenosinrezeptor-Subtypen vorkommen, angewendet werden können.

8 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG NEUER ADENOSIN-REZEPTORLIGANDEN

8.1. EINLEITUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von Dr. Ali El-Tayeb synthetisierte Verbindungen untersucht, welche die in Abb. 86 dargestellte Struktur aufweisen. Diese Struktur besteht aus dem AdenosinGrundgerüst und besitzt Substituenten in Position 2 und 5'.

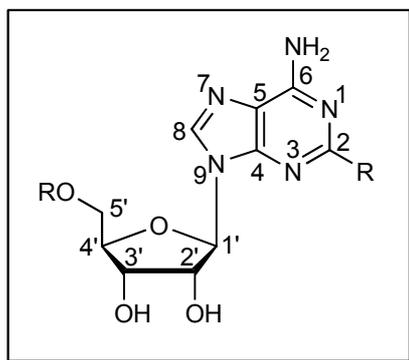


Abb. 86 Leitstruktur für die Entwicklung potenter und selektiver A_{2A} -Adenosinrezeptor-Agonisten.

Die meisten potenten und selektiven Adenosinrezeptor-Agonisten weisen Adenosin als Grundstruktur auf, das in Position 2 des Adenins und/oder in Position 5' der Riboseeinheit mit einem Substituenten modifiziert wurde. Sowohl die Disubstitution von N6 und Position 2, als auch Substitutionen in Position 8 können zu potenten A_{2A} -Agonisten führen. Die Einführung eines *N*-Ethylcarboxamids in Position 5' des Riboserings (wie beispielsweise in NECA) oder die Einführung eines Tetrazolrings sind die häufigsten Modifikationen der Riboseeinheit. Auch die Einführung großer cyclischer Substituenten (sowohl aromatische als auch Cycloalkyl-Reste) oder langer mit elektronenreichen Funktionen (Doppelbindungen, O, NH, S, etc.) versehener Alkylketten, die einen großen cyclischen Substituenten mit dem Adenosingerüst in Position 2 verbinden, können zu potenten und selektiven A_{2A} -Agonisten führen. Als Beispiel sei hier Binodenoson aufgeführt, das derzeit in klinischen Studien untersucht wird.^{1-3, 87, 89, 90, 244-246}

Für die Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen von substituierten Adenosin-Derivaten an Adenosinrezeptoren wurden insgesamt 100 Verbindungen synthetisiert, die sich sowohl in der Art des in Position 2 befindlichen Linkers, als auch durch verschiedene Ringsysteme unterscheiden und/oder auch Substituenten in Position 5' tragen. Es wurden außerdem sieben Derivate dargestellt, die in Position 2' und 3' mittels Anisaldehyd geschützt waren. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Synthese von Adenosin-Derivaten mit hoher Polarität gelegt, da sehr polare Verbindungen in der Regel schlecht resorbiert werden und damit lokal antiinflammatorische Wirkung zeigen könnten ohne systemische Effekte wie beispielsweise Hypotonie auszulösen.

Die Affinität der Verbindungen an A_1 - und A_{2A} -Rezeptoren wurde mittels Radioligandbindungsstudien an nativem Rattenhirn (Cortex- bzw. Striatum-Membranpräparationen) bestimmt.¹ Die A_1 -Bindungsstudien wurden mit dem A_1 -selektiven Agonist-Radioliganden [3 H]CCPA und die A_{2A} -Bindungsstudien mit dem A_{2A} -selektiven Agonist-Radioliganden [3 H]CGS21680 an Rattencortex bzw. -striatum Membranpräparationen durchgeführt. Die affinsten Verbindungen wurden anschließend an den humanen Subtypen unter Verwendung von CHO-Zellmembranpräparationen, die rekombinant Adenosin A_1 - bzw. A_{2A} -Rezeptoren exprimieren, untersucht. Dies ermöglicht einerseits, Aussagen über die Affinität an den menschlichen Adenosinrezeptoren treffen zu können, und andererseits, Hinweise auf Spezies-abhängige Unterschiede zu erlangen. Um eine Aussage über die Selektivität zu erhalten, wurden zusätzlich die Affinitäten am A_3 -Rezeptor bestimmt. Die Affinitäten am A_{2B} -Rezeptorsubtyp wurden nur für die potentesten Verbindungen bestimmt, da Volpini *et al.* und weitere Arbeitsgruppen bereits gezeigt hatten, dass eine Affinität am A_{2B} -Rezeptor für diese Art von Strukturen nicht zu erwarten ist.²⁴¹ Die A_3 -Bindungsstudien wurden mit dem agonistischen Radioliganden [3 H]NECA und die A_{2B} -Bindungsstudien mit dem antagonistischen A_{2B} -selektiven Radioliganden [3 H]PSB-11 (da derzeit kein agonistischer Radioligand zur Verfügung steht) an humanen rekombinanten A_3 - bzw. A_{2B} -Adenosinrezeptoren, die in CHO-Zellen exprimiert wurden, durchgeführt. Exemplarisch wurden für ausgewählte Verbindungen funktionelle Studien in Form von cAMP-Akkumulationsexperimenten an CHO-Zellen, die den humanen A_{2A} -Rezeptor stabil exprimieren, durchgeführt.

¹ Dies erfolgte unter Mitwirkung von Nicole Florin, Dr. Simone Hildenbrand, Dr. Andrea Behrenswerth und Dr. Aliaa Abdelrahman.

8.2 KOMPETITIVE RADIOLIGAND-REZEPTOR-BINDUNGSSTUDIEN AN A₁-, A_{2A}- UND A₃-ADENOSIN-REZEPTOREN: ANALYSE DER STRUKTUR-WIRKUNGSBEZIEHUNGEN

Die Affinitäten der mittels Radioligandbindungsstudien untersuchten Testverbindungen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Ausgehend von der Grundstruktur **55** (s. Abb. 87) mit einer Affinität von 80,3 nM am A₁-Adenosinrezeptor und gleichzeitiger Selektivität gegenüber den anderen Subtypen, synthetisierte Dr. Ali El-Tayeb eine Serie von Verbindungen mit Modifikationen an Position 2 des AdenosinGrundgerüsts.

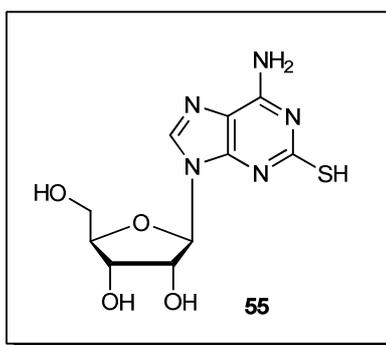
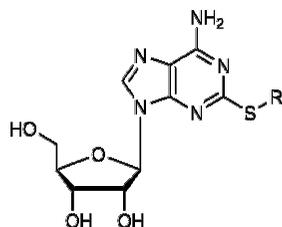


Abb. 87 Strukturformel der Leitstruktur **55**.

Da aus früheren Studien bekannt war, dass eine Substitution an Position 2 zu potenten A_{2A}-Rezeptor-Agonisten führen kann, sollten anhand der synthetisierten Verbindungen durch Radioligandbindungsstudien Struktur-Wirkungsbeziehungen für die Optimierung eines potenten und dabei gleichzeitig selektiven A_{2A}-Rezeptor-Agonisten durchgeführt werden. Dazu wurden sowohl verschiedene Linkerarten und -längen, als auch unterschiedliche cyclische Strukturelemente eingeführt.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Struktur-Wirkungsbeziehungen zeigten, dass eine Substitution in Position 2 nicht automatisch zu hoher Affinität am A_{2A}-Rezeptor führt. Die Art des Substituenten ist entscheidend für die Potenz und Subtyp-Selektivität. Grundsätzlich konnte festgestellt werden, dass erwartungsgemäß Adenosinderivate, die über einen Linker mit einer cyclischen Struktur verbunden sind, zu guten Ergebnissen führten. Dazu wurden zunächst unterschiedlich lange Alkylketten in Position 2 eingeführt,

um so die optimale Linkerlänge zu erhalten. Die Einführung eines kleinen Substituenten wie beispielsweise des S-Thiohydroxylamins in Position 2 (Verbindung **65**) führte zu einer Verringerung der Affinität zum A₁-Rezeptor um das Vierfache verglichen mit der Leitstruktur **55**. Zum A_{2A}-Rezeptor wurde kaum Affinität beobachtet. Das Einbringen eines Thioglycolsäuresubstituenten in Position 2 (Verbindung **66**) führte ebenfalls zu einem Affinitätsabfall am A₁-Rezeptor (um das 25-fache verglichen mit der Leitstruktur **55**). Affinität zum A_{2A}-Rezeptor wurde kaum beobachtet (30% Inhibition bei einer finalen Konzentration von 10 µM). Die Einführung einer Allyl- (**63**) oder Alkynylgruppe (**64**) führte wiederum zu einer bevorzugten Wirkung am A₁-Rezeptor. Die Verbindungen waren dort um das Drei- bis Fünffache aktiver als am A_{2A}-Rezeptor. Die Substitution in Position 2 mit einem Propylthio-Rest (**61**) führte zu einer Verringerung der Affinität zum A₁-Rezeptor um das 16-fache. Am A_{2A}-Rezeptor wies die Verbindung einen K_i-Wert von 1,35 µM auf. Eine weitere Verlängerung der Alkylkette (**62**) führte sowohl am A₁- als auch am A_{2A}-Rezeptor zu Affinitäten im mittleren mikromolaren Bereich. Das Einbringen einer zyklischen Struktur an das Ende des Linkers in Form von Cyclohexan mit unterschiedlichen Alkyllinkerlängen (0 bis 3 Methyleneinheiten) zeigte, dass mit steigender Länge des alkylierten Linkers die Affinität zum A_{2A}-Rezeptor zunahm. Das Optimum lag bei einer Linkerlänge von drei Atomen (Cycloethylthiol-Rest, **69**). Verbindung **70**, die einen Cyclopropylthiol-Rest trägt, zeigte eine schwächere Bindung an den A_{2A}-Rezeptor (K_i = 1,68 µM) als Verbindung **69** (K_i = 372 nM). Verbindung **69** wies somit am A_{2A}-Rezeptor die beste Affinität auf. Ein vieratomiger Linker scheint ungünstig für eine Bindung an den A_{2A}-Rezeptor zu sein. Die Ergebnisse bestätigten die in der Literatur beschriebenen Beobachtungen. Außerdem wurde in der Literatur berichtet, dass viele potente und selektive A_{2A}-Adenosinrezeptor-Agonisten Adenosin-Derivate sind, die Modifikationen durch die Einführung großer Substituenten in Position 2 des AdenosinGrundgerüsts und/oder in Position 5' der Ribose tragen, wie dies beispielsweise in den Verbindungen CGS21680 oder NECA der Fall ist.

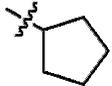
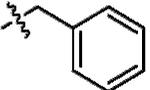
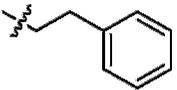
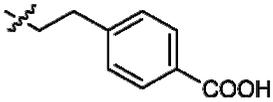
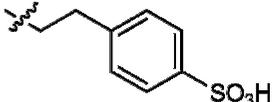
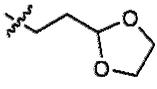
Tabelle 7 Affinitäten verschiedener 2-Thioadenosin-Derivate an humanen und Ratten-Adenosin-Rezeptoren (n=3).

Verbindung (Ali)	R	$K_i \pm \text{SEM}$ [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration) (n = 3)			
		A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]CGS21680	A _{2B} human [³ H]PSB603	A ₃ human [³ H]NECA
55	H	80.3 ± 14	> 1 000 29 ± 4 (1 μM)	> 10 000 21 ± 3 (10 μM)	> 1 000 18 ± 6 (1 μM)
61 (314)		1270 ± 230 ^a	1350 ± 390 ^a	n.d.	n.d.
62 (307)		256 ± 11 ^{c, d}	542 ± 120 ^{c, d}	n.d.	2320 ± 134 ^{b, c, d}
63 (312)		532 ± 25 ^{c, d}	1520 ± 280 ^{c, d}	n.d.	6640 ± 787 ^a
64 (313)		555 ± 73 ^d	2900 ± 500 ^d	n.d.	6990 ± 738 ^d

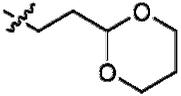
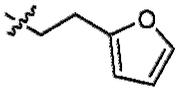
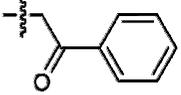
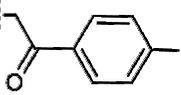
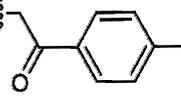
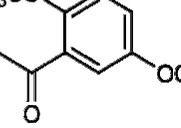
^agetestet durch Nicole Florin; ^b getestet mit dem Radioligand [³H]PSB-11; ^c Löslichkeitsprobleme; ^d getestet durch Andrea Behrenswerth .

		$K_i \pm \text{SEM} [\text{nM}]$ bzw. <i>Inhibition in % (Konzentration) (n = 3)</i>			
Verbindung (Ali)	R	A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]CGS21680	A _{2B} human [³ H]PSB603	A ₃ human [³ H]NECA
65 (345)		$176 \pm 65^{\text{a, d}}$ $312 \pm 55^{\text{a}}$	$2480 \pm 271^{\text{a}}$	n.d.	$5940 \pm 900^{\text{a, c}}$
66 (311)		$1930 \pm 612^{\text{a, e}}$	$> 1\ 000^{\text{c}}$ $0 \pm 1 (1\ \mu\text{M})$ $> 10\ 000^{\text{c}}$ $30 \pm 9 (10\ \mu\text{M})$	n.d.	$> 10\ 000^{\text{c, e}}$ $13 \pm 3 (10\ \mu\text{M})$
67 (303)		$139 \pm 5.0^{\text{c}}$	$2480 \pm 655^{\text{c}}$	n.d.	$> 1\ 000^{\text{c}}$ $48 \pm 8 (10\ \mu\text{M})$
68 (306)		$498 \pm 95^{\text{c}}$	$709 \pm 123^{\text{c}}$	n.d.	$1720 \pm 167^{\text{c}}$
69 (302)		$400 \pm 3.0^{\text{c}}$	$372 \pm 57^{\text{c}}$	n.d.	$3640 \pm 719^{\text{c}}$
70 (326)		$> 10\ 000^{\text{a, c}}$ $24 \pm 1 (10\ \mu\text{M})$	$1680 \pm 381^{\text{a, c}}$	n.d.	$1580 \pm 304^{\text{a, e}}$

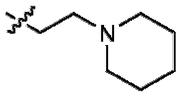
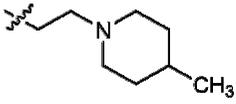
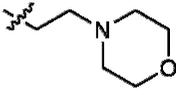
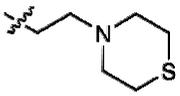
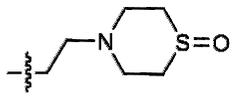
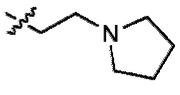
^a getestet durch Nicole Florin; ^b getestet von Dr. Aliaa Abdelrahman; ^c getestet mit dem Radioligand [³H]PSB-11; ^d n = 2; ^e getestet durch Andrea Behrenswerth

		$K_i \pm \text{SEM} [\text{nM}]$ bzw. <i>Inhibition in % (Konzentration)</i> ($n = 3$)			
Verbindung (Ali)	R	A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]CGS21680	A _{2B} human [³ H]PSB603	A ₃ human [³ H]NECA
71 (305)		994 ± 112^c	793 ± 150^c	n.d.	10400 ± 924^c
72 (300)		927 ± 57^c	606 ± 183^c	n.d.	120 ± 15^c
73 (301)		180 ± 14^c	18.5 ± 1.9^c	n.d.	1810 ± 588^c
74 (327)		404 ± 197^d 1010 ± 180^a	$> 10\ 000^b$ $41 \pm 7 (10\ \mu\text{M})$ 152 ± 10^a	$> 10\ 000^a$ $3 \pm 7 (10\ \mu\text{M})$	$> 1\ 000$ $16 \pm 6 (1\ \mu\text{M})$
75 (PSB-0777) ³		541 ± 167^b $> 1\ 000^e$ $12 \pm 6 (1\ \mu\text{M})$	379 ± 57^b 44.4 ± 2.4^c	$> 10\ 000^e$ $1 \pm 3 (10\ \mu\text{M})$	$> 1\ 000$ $18 \pm 6 (1\ \mu\text{M})$
76 (332)		1140 ± 34	1160 ± 28	n.d.	3450 ± 530^c

^agetestet durch Nicole Florin; ^b getestet von Aliaa Abdelrahman; ^c getestet mit dem Radioligand [³H]PSB-11; ^d getestet durch Danielle McCurdy (Erasmusstudentin); ^e getestet durch Andrea Behrenswerth

		$K_i \pm \text{SEM} [\text{nM}]$ bzw. <i>Inhibition in % (Konzentration) (n = 3)</i>			
Verbindung (Ali)	R	A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]CGS21680	A _{2B} human [³ H]PSB603	A ₃ human [³ H]NECA
77 (331)		454 ± 79	1100 ± 30	n.d.	1330 ± 530 ^b
78 (328)		144 ± 37 ^c 227 ± 28 ^a	878 ± 270 30.6 ± 10	> 1 000 - 5 ± 15 (1 μM)	> 1 000 26 ± 4 (1 μM)
79 (354)		30.9 ± 5,6 ^a	183 ± 38 ^a	n.d.	148 ± 62
80 (355)		12.6 ± 2.5 ^a	44.4 ± 16 ^a	n.d.	218 ± 47
81 (330)		22.8 ± 5.5 ^a	43.9 ± 11	n.d.	593 ± 61 ^a
82 (356)		162 ± 14 ^a	1400 ± 280 ^a	n.d.	> 1 000 30 ± 4 (1 μM)

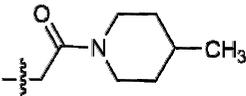
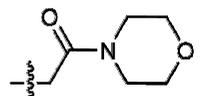
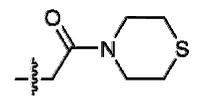
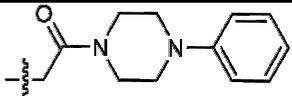
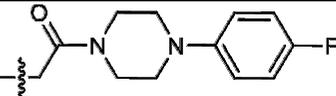
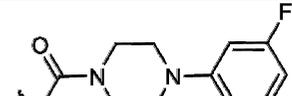
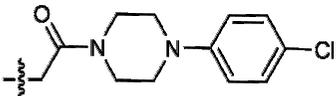
^a getestet durch Nicole Florin; ^b getestet mit dem Radioligand [³H]PSB-11; ^c = getestet durch Danielle McCurdy (Erasmusstudentin).

Verbindung (Ali)	R	$K_i \pm \text{SEM} [\text{nM}]$ bzw. Inhibition in % (Konzentration) ($n = 3$)			
		A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]CGS21680	A _{2B} human [³ H]PSB603	A ₃ human [³ H]NECA
83 (831)		285 ± 14^{a, b}	> 1 000^b 12 ± 11 (1 μM)	n.d.	> 1 000^b 10 ± 7 (1 μM)
84 (811)		760 ± 380^a 41.1 ± 1.7	> 1 000 0 ± 3 (1 μM) > 1 000 34 ± 4 (1 μM)	n.d.	> 1 000 22 ± 1 (1 μM)
85 (832)		310 ± 53^{a, b}	395 ± 26^b	n.d.	> 1 000^b 35 ± 8 (1 μM)
86 (845)		149 ± 12	329 ± 104	n.d.	> 1 000 24 ± 6 (1 μM)
87 (845b)		352 ± 58^c	269 ± 65	n.d.	> 1 000 17 ± 8 (1 μM)
88 (833B)		107 ± 8.0	1450 ± 260	n.d.	> 1 000 42 ± 5 (1 μM)

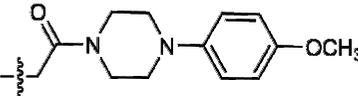
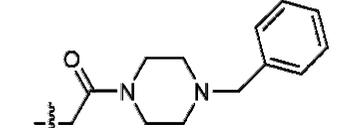
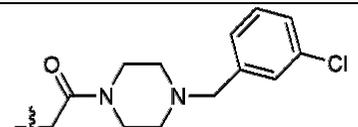
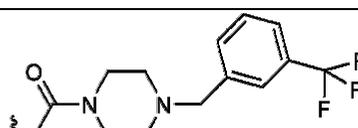
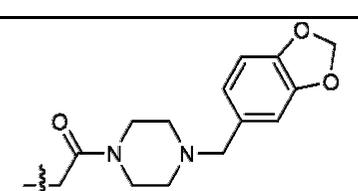
^a getestet von Dr. Simone Hildenbrand; ^b Löslichkeitsprobleme

		$K_i \pm \text{SEM} [\text{nM}]$ bzw. <i>Inhibition in % (Konzentration)</i> ($n = 3$)			
Verbindung (Ali)	R	A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]CGS21680	A _{2B} human [³ H]PSB603	A ₃ human [³ H]NECA
89 (829)		123 ± 14 ^b	93.9 ± 34	n.d.	> 1 000 23 ± 11 (1 μM)
90 (838)		2910 ± 1480 ^a	> 1 000 24 ± 3 (1 μM)	> 1 000 12 ± 3 (1 μM)	> 1 000 21 ± 5 (1 μM)
91 (827)		36.2 ± 11.5	22.6 ± 3.1	n.d.	> 1 000 48 ± 4 (1 μM)
92 (830)		> 1 000 8 ± 4 (1 μM)	> 1 000 3 ± 5 (1 μM)	n.d.	> 1 000 27 ± 7 (1 μM)
93 (826)		191 ± 51 71.1 ± 2.9	93 ± 6.1 9.50 ± 1.2	> 1 000 ^a 13 ± 2 (1 μM)	> 1 000 32 ± 50 (1 μM)
94 (837)		319 ± 39 ^b	1330 ± 130	n.d.	> 1 000 26 ± 2 (1 μM)
95 (836)		> 1 000 12 ± 4 (1 μM)	> 1 000 10 ± 3 (1 μM)	n.d.	> 1 000 27 ± 2 (1 μM)

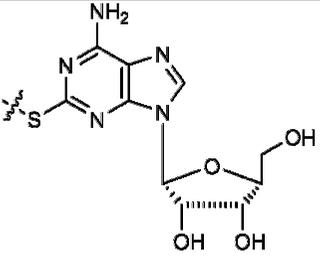
^agetestet durch Nicole Florin; ^c getestet von Dr. Simone Hildenbrand

Verbindung (Ali)	R	$K_i \pm \text{SEM} [\text{nM}]$ bzw. <i>Inhibition in % (Konzentration)</i> ($n = 3$)			
		A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]CGS21680	A _{2B} human [³ H]PSB603	A ₃ human [³ H]NECA
96 (928)		14.4 ± 4.9^a	65.7 ± 10	n.d.	268 ± 62
97 (926)		44.5 ± 4.5^a	> 1 000 43 ± 4 (1 μM)	> 1 000^b 29 ± 1 (1 μM)	> 1 000 25 ± 5 (1 μM)
98 (931)		38.1 ± 6.1^c	504 ± 48^c	> 1 000 8 ± 10 (1 μM)	> 1 000 46 ± 1 (1 μM)
99 (927)		13.4 ± 5.6	60.1 ± 10	n.d.	153 ± 46^a
100 (925)		11.5 ± 4.1^a	60.2 ± 7.2	> 1 000^b 18 ± 5 (1 μM)	57.4 ± 8.3
101 (929)		174 ± 23 39.0 ± 7.1^c	977 ± 110^c	n.d.	275 ± 54
102 (934)		24.5 ± 4.1^c	51.1 ± 5.0^c	n.d.	58.0 ± 7.6^a

^agetestet durch Nicole Florin; ^b n = 2, ^c getestet von Dr. Simone Hildenbrand

Verbindung (Ali)	R	$K_i \pm \text{SEM} [\text{nM}]$ bzw. <i>Inhibition in % (Konzentration)</i> ($n = 3$)			
		A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]CGS21680	A _{2B} human [³ H]PSB603	A ₃ human [³ H]NECA
103 (935)		24.4 ± 4.8^a	130 ± 37^a	n.d.	473 ± 71
104 (938)		46.0 ± 13.2	604 ± 102	$> 1\ 000$ $10 \pm 4 (1\ \mu\text{M})$	$> 1\ 000$ $26 \pm 2 (1\ \mu\text{M})$
105 (937)		122 ± 17 21.3 ± 0.41	713 ± 146	n.d.	$> 1\ 000$ $48 \pm 0.31 (1\ \mu\text{M})$
106 (932)		62.4 ± 6.4^a	647 ± 67	n.d.	$> 1\ 000$ $15 \pm 4 (1\ \mu\text{M})$
107 (930)		40.6 ± 7.3^a	721 ± 121^a	n.d.	$> 1\ 000$ $9 \pm 3 (1\ \mu\text{M})$

^a getestet von Dr. Simone Hildenbrand

		K_i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration) (n = 3)			
Verbindung (Ali)	R	A₁ human/ Ratte [³H]CCPA	A_{2A} human/ Ratte [³H]CGS21680	A_{2B} human [³H]PSB603	A₃ human [³H]NECA
108 (839)		> 1 000^a 24 ± 5 (1 μM)	> 1 000 17 ± 2 (1 μM)	n.d.	839 ± 81

^agetestet durch Nicole Florin

Weiterhin sollte untersucht werden, welche strukturelle Diversität der Substituent am Ende des Linkers aufweisen kann. Dazu wurden unterschiedliche zyklische Strukturen, sowohl Cycloalkylringe als auch Aromaten, über einen dreiatomigen Linker mit dem Adenosinrundgerüst verknüpft und substituiert. Die höchste Affinität wurde mit den aromatischen Ringen Phenyl (Verbindung **73**) und Furan (Verbindung **78**) erzielt (18,5 nM bzw. 30,6 nM am A_{2A} -Rezeptor). Verbindung **73** wies dabei 10-fache Selektivität gegenüber dem A_1 - und 98-fache Selektivität gegenüber dem A_3 -Rezeptor auf. Das Derivat, das mit dem Furanring substituiert wurde, zeigte eine Siebenfach höhere Affinität verglichen mit dem A_1 -Rezeptor. Zum humanen A_3 - und A_{2B} -Rezeptor (hA_3 - und hA_{2B} -Rezeptor) wurde kaum Affinität beobachtet. Für die Untersuchung der Speziesunterschiede zwischen Mensch und Ratte wurde die Verbindung an den humanen A_1 - und A_{2A} -Rezeptor (hA_1 - und hA_{2A} -Rezeptoren) untersucht. Es wurde eine höhere Affinität für den Rattenrezeptor festgestellt. Da die Ergebnisse insgesamt vielversprechend waren, wurden weitere Derivate mit verschiedenen substituierten Phenylringen synthetisiert.

Eine Carboxylgruppe in *para*-Position des Phenylringes (Verbindung **74**) führte dabei am Ratten A_{2A} -Rezeptor (rA_{2A} -Rezeptor) verglichen mit der Verbindung mit dem unsubstituierten Phenylring (**73**) zu einer Verringerung der Affinität (152 nM). Dabei war ein ausgeprägter Speziesunterschied zwischen Ratten- und humanen Rezeptoren zu beobachten (65-fach affiner am Ratten- als am humanen Rezeptor). Die Carboxy-funktionalität in *para*-Position des Phenylringes scheint damit extrem ungünstig für die Bindung an den humanen A_{2A} -Rezeptor zu sein. Der A_1 -Rezeptor zeigte genau das gegenteilige Verhalten im Vergleich der beiden Spezies. Hierbei wurde Verbindung **74** mit einer größeren Affinität an den humanen (404 nM) als an den Rattenrezeptor (1,01 μ M) gebunden. Es konnte keine Bindung an die beiden verbleibenden Subtypen verzeichnet werden. Der Austausch der Carboxy-funktionalität gegen eine Sulfonsäuregruppe (**75**) führte zu einer Steigerung der Affinität am rA_{2A} -Rezeptor mit einem K_i -Wert von 44,4 nM (s. Abb. 88). An dem humanen Rezeptor konnte eine Neunfach schwächere Bindung im mittleren nanomolaren Bereich beobachtet werden. Die Verbindung zeigte zum hA_{2B} -, hA_3 - und am Ratten- A_1 -Rezeptor (rA_1 -Rezeptor) keinerlei Affinität.

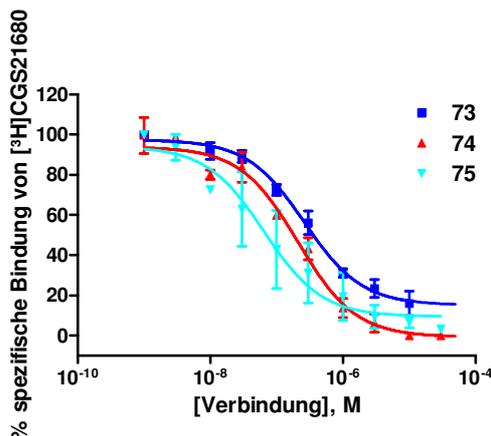


Abb. 88 Kompetitionskurven der Verbindungen **73**, **74** und **75** (**PSB-0777**) an A_{2A} -Adenosinrezeptoren (Rattenstriatum) gegen 5 nM [^3H]CGS21680. Die Kurven stammen von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden. Für Verbindung **73** wurde ein K_i -Wert von 18,5 nM, für Verbindung **74** ein K_i -Wert von 152 nM und für Verbindung **75** ein K_i -Wert von 44,4 nM ermittelt.

Frau Dr. Aliaa Abdelrahman konnte in cAMP-Studien an hA_{2A} -Rezeptoren, exprimiert in CHO-Zellen, zeigen, dass **75** als Vollagonist an A_{2A} -Rezeptoren wirkt. Verbindung **75** (**PSB-0777**) ist damit ein A_{2A} -selektiver Vollagonist. Die Verbindung wurde in weiterführenden *ex-vivo* Experimenten im Arbeitskreis von Prof. Dr. Karen Nieber an entzündeten Ratten-Ileum/Jejunum-Präparationen auf ihre entzündungshemmenden Eigenschaften hin untersucht und stellt eine vielversprechende Verbindung für die lokale Behandlung entzündlich bedingter Darmkrankheiten dar. Aufgrund des niedrigen pK_a -Wertes liegt diese Verbindung unter physiologischen Bedingungen deprotoniert vor und sollte damit nicht vom Körper resorbiert werden, so dass systemische Effekte wie beispielsweise Hypotonie vermieden werden könnten.³

Es wurden weitere Derivate synthetisiert, die eine Carbonylfunktionalität im Linker aufweisen, um herauszufinden, ob Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Bindungstasche und dem Linker ausgebildet werden und damit bessere Affinitäten erzielt werden können. Ein Vergleich von Verbindung **73** mit Verbindung **79** zeigte, dass durch die Einführung der Carbonylfunktion ein Affinitätsanstieg am A_1 -Rezeptor auf einen K_i -Wert von 30,9 nM (Sechsfache Steigerung der Affinität) beobachtet werden konnte. Am A_{2A} -Rezeptor trat der gegenteilige Effekt auf (fast 10-facher Verlust an Affinität). Durch die Einführung eines Chlorsubstituenten in *para*-Position von Verbindung **79** konnte ein K_i -Wert am A_1 -Rezeptor von 12,6 nM erreicht werden (**80**). Die Verbindung war Vierfach aktiver am A_1 -Rezeptor als am A_{2A} -Rezeptor und wurde dort mit einem K_i -Wert von

44,4 nM im unteren nanomolaren Bereich gebunden. Gegenüber dem A₃-Rezeptor wurde eine 17-fache Selektivität bestimmt. Der Austausch von Chlor- gegen einen Fluorsubstituenten führte zu einer leichten Verringerung der Affinität zum A₁-Rezeptor, wobei die Affinität zum A_{2A}-Rezeptor konstant blieb. Die Selektivität sowohl des A₁- als auch des A_{2A}-Rezeptors gegen den A₃-Rezeptor konnte weiter ausgebaut werden. Als ungünstig für die Affinität am A_{2A}-Rezeptor erwies sich die Einführung von Methoxygruppen in 2- und 5-Position. Mit einem K_i-Wert von 1,40 μM hat Verbindung **82** damit stark an Affinität zum A_{2A}-Rezeptor im Vergleich zu analog substituierten Derivaten eingebüßt. Allerdings konnte eine verbesserte Selektivität zugunsten des A₁-Rezeptors erzielt werden (s. Abb. 89).

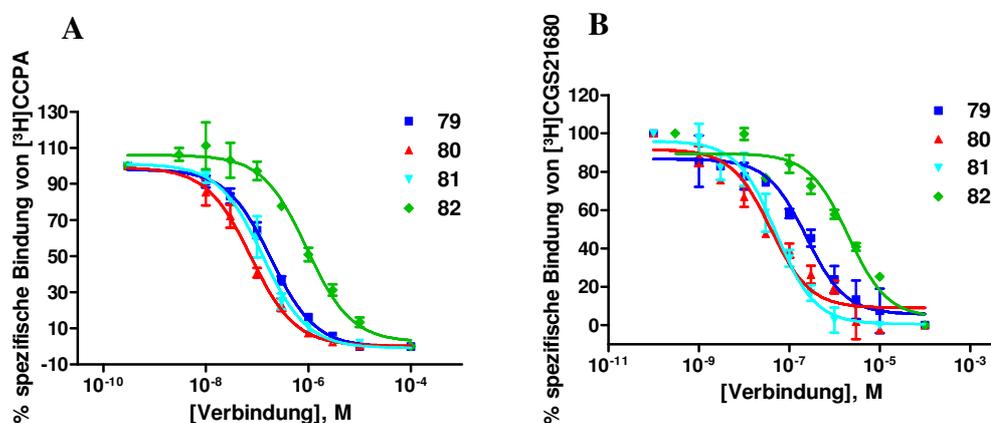


Abb. 89 Kompetitionskurven der Verbindungen **79**, **80**, **81** und **82** (A) an A₁-Adenosinrezeptoren (Rattencortex) gegen 1 nM [³H]CCPA an Rattencortex und (B) an A_{2A}-Adenosinrezeptoren (Rattenstriatum) gegen 5 nM [³H]CGS21680 an Rattenstriatum. Die Kurven stammen von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden. Zum rA₁-Rezeptor konnte ein K_i-Wert für Verbindung **79** von 30,9 nM, für **80** von 12,6 nM, für **81** von 22,8 nM und für Verbindung **82** von 162 nM bestimmt werden. Zum rA_{2A}-Rezeptor konnte ein K_i-Wert für Verbindung **79** von 183 nM, für **80** von 44,4 nM, für **81** von 43,9 nM und für Verbindung **82** von 1400 nM bestimmt werden.

In der Bindungstasche des A₁-Rezeptors scheinen die Derivate damit eine Stabilisierung eventuell über Wasserstoffbrückenbindungen zu erfahren, so dass Verbindungen mit K_i-Werten im unteren nanomolaren Bereich resultieren. Eine Verbesserung der Affinitäten am A_{2A}-Rezeptor konnte nicht festgestellt werden. Die Bindung wurde an diesem Subtyp entweder kaum beeinflusst oder führte zu verringerter Affinität. Leider wurden von den Verbindungen **80-82** keine analogen Verbindungen ohne Carbonylfunktionalität im Linker synthetisiert, so dass die aufgestellt Hypothese nicht eingehender überprüft werden konnte.

Neben den Derivaten, die aromatische Ringsysteme aufwiesen und hohe Affinitäten zeigten, konnten auch mit Verbindung **89**, die einen in Position 4 methylylsulfonylierten

Piperazinring trägt, eine starke Bindung an den A_{2A}-Rezeptor erzielt werden. Es wurde ein K_i-Wert von 93,9 nM am A_{2A}-Rezeptor bestimmt. Allerdings bestand keine Selektivität gegenüber dem A₁-Rezeptor. Der Einbau eines Ethyllinkers zwischen Piperazin und Methylsulfonfunktionalität (**95**) führte zu einem vollständigen Affinitätsverlust an allen Adenosinrezeptorsubtypen. Wurde dagegen die Methylsulfongruppe in Position 4 des Piperazins in Verbindung **89** gegen einen Phenylring (**91**) ausgetauscht, führt dies zu einer geringfügigen Steigerung der Affinität, so dass ein K_i-Wert im unteren nanomolaren Bereich (22,6 nM) am A_{2A}-Rezeptor beobachtet wurde. Durch die Einführung einer Carbonylfunktionalität in den Linker von Verbindung **91** konnte ein K_i-Wert von 13,4 nM am A₁-Rezeptor erzielt werden (Verbindung **99**). Dies ging allerdings zu Lasten der Selektivität gegenüber dem A₃-Rezeptor, die dann lediglich einen Faktor von 11 betrug. Gegenüber dem A_{2A}-Rezeptor konnte eine Fünffach höhere Affinität beobachtet werden.

Die Substitution des Phenylringes in Verbindung **91** in *para*-Position mit einem Chlorsubstituenten (**92**) führte zu einem vollständigen Verlust der Bindung an allen Subtypen. Verbindung **102** mit einer zusätzlichen Carbonyleinheit im Linker zeigte hingegen eine Bindung an A₁-, A_{2A}- und A₃-Rezeptoren im unteren nanomolaren Bereich. Selektivität für einen Subtyp war nicht festzustellen.

Die Verwendung des kleineren Substituenten Fluor anstelle von Chlor in Position 4 in Verbindung **92** führte zu einer hochpotenten Verbindung (**93**), die Achtfach affiner am rA_{2A}-Rezeptor mit einem K_i-Wert von 9,50 nM (s. Abb. 90) gebunden wurde als am rA₁-Rezeptor (71,1 nM). Die beiden anderen Subtypen wurden mit dieser Verbindung nicht adressiert. Es wurden Untersuchungen zu Speziesunterschieden durchgeführt, in denen festgestellt wurde, dass Verbindung **93** 10-fach stärker an den Ratten- als an den humanen A_{2A}-Rezeptor bindet. Für den Ratten A₁-Rezeptor besteht eine Dreifach höhere Affinität als für den humanen A₁-Rezeptor.

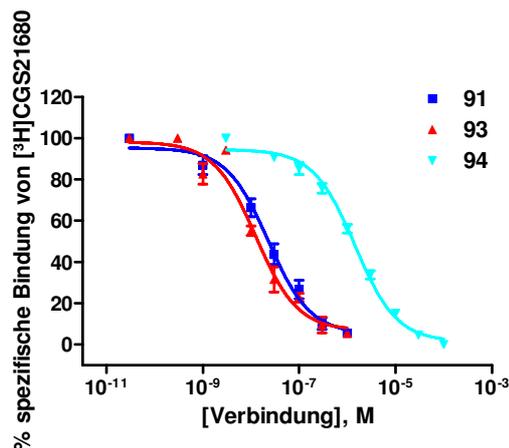


Abb. 90 Kompetitionskurven der Verbindungen **91**, **93** und **94** an A_{2A} -Adenosinrezeptoren (Rattenstriatum) gegen 5 nM $[^3H]$ CGS21680. Die Kurven stammen aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden. Es wurde ein K_i -Wert für Verbindung **91** von 22,6 nM, für **93** von 9,50 nM und für **94** von 1330 nM ermittelt.

Die Einführung einer Carbonylfunktionalität in den Linker von Verbindung **93** führte dazu, dass sowohl Verbindung **99** als auch Verbindung **100** hohe Affinitäten im unteren nanomolaren Bereich am A_1 -, A_{2A} - und A_3 -Rezeptor zeigten. Die analoge Verbindung **101**, in der sich der Fluorsubstituent in *meta*-Position des Phenylringes befindet, zeigte verbesserte A_1 -Selektivität (39-fach gegen A_{2A} und fünffach gegen A_3 -Rezeptor, s. Abb. 91).

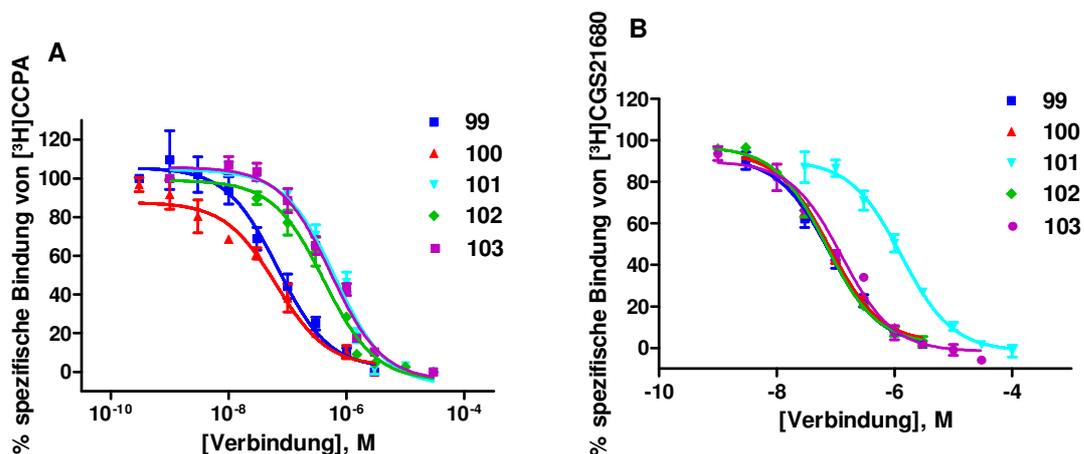


Abb. 91 Kompetitionskurven der Verbindungen **99**, **100**, **101**, **102** und **103** (A) an A_1 -Adenosinrezeptoren (Rattencortex) gegen 1 nM $[^3H]$ CCPA an Rattencortex und (B) an A_{2A} -Adenosinrezeptoren (Rattenstriatum) gegen 5 nM $[^3H]$ CGS21680. Die Kurven stammen aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden. Zum rA_1 -Rezeptor konnte ein K_i -Wert für **99** von 13,4 nM, für **100** von 11,5 nM, für **101** von 39,0 nM, für **102** von 24,5 nM und für **103** von 24,4 nM bestimmt werden. Zum rA_{2A} -Rezeptor wurde ein K_i -Wert für Verbindung **99** von 60,1 nM, für **100** von 60,2 nM, für **101** von 977 nM, für **102** von 51,1 nM und für **103** von 130 nM ermittelt.

Die Vergrößerung des Pharmakophors durch das Einführen einer Methyleneinheit zwischen Piperazin und Phenylring (**104**) führte zu einem enormen Affinitätsverlust am A_{2A} -Rezeptor um den Faktor 10 verglichen mit Verbindung **99**, wobei die Affinität zum A_1 -Rezeptor lediglich um den Faktor 5 sank. Zum A_3 -Rezeptor konnte keine Affinität beobachtet werden. Die Selektivität erhöhte sich damit zugunsten des A_1 -Rezeptors.

Eine Betrachtung der Verbindungen **104-107** zeigt, dass alle Verbindungen, die einen um eine Methyleneinheit verlängerten Substituenten tragen, A_1 -Selektivität aufweisen. Die Affinität zum A_1 -Rezeptor wurde, verglichen mit analogen Verbindungen, die diese Methyleninsertion nicht aufweisen, nicht beeinflusst. Der vergrößerte Pharmakophor scheint damit ungünstig für die Bindungstasche des A_{2A} -Rezeptors zu sein. Fehlende Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Carbonyl-Sauerstoffatom und der Bindungstasche des A_{2A} -Rezeptors könnten für diesen Effekt verantwortlich sein.

Die Dimerisierung von Adenosin über eine Disulfidgruppe (Verbindung **108**), führte zu einem vollständigen Verlust der Affinität am A_1 - und A_{2A} -Rezeptor. Am A_3 -Rezeptor konnte eine Affinität von 839 nM beobachtet werden, so dass diese Verbindung als selektiver A_3 -Rezeptorligand mit allerdings mäßiger Affinität bezeichnet werden kann.

Für diese Unterserie lassen sich die Struktur-Wirkungsbeziehungen folgendermaßen zusammenfassen:

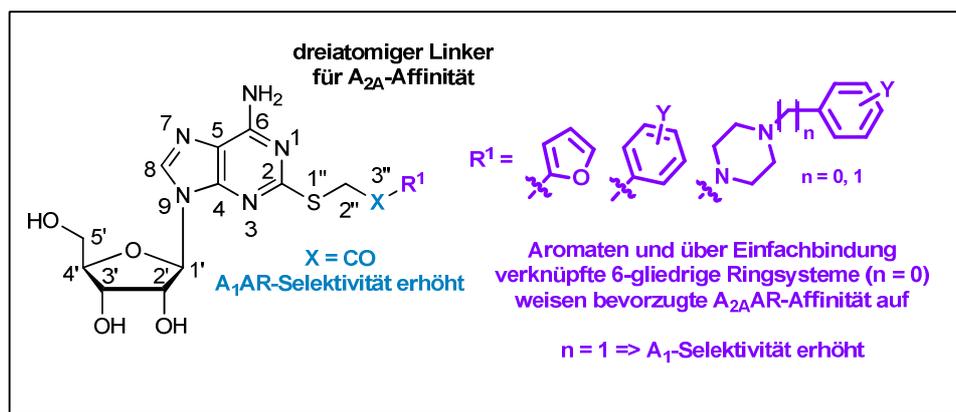
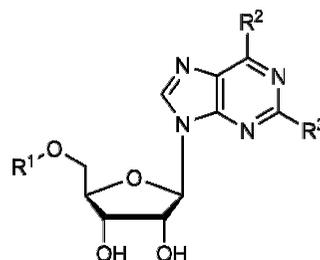
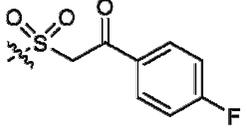
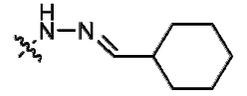
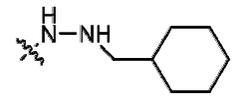
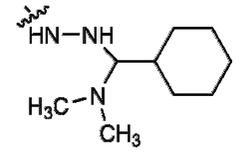
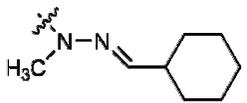


Abb. 92 Strukturwirkungsbeziehungen der Adenosin-Derivate **55-108**.

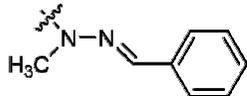
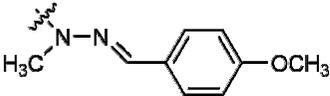
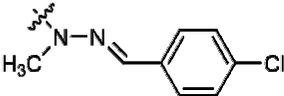
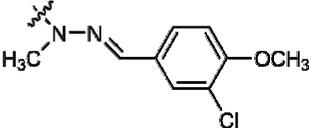
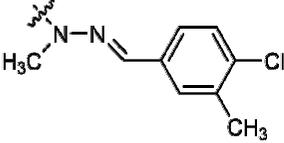
Tabelle 8 Affinitäten verschiedener Adenosin-Derivate an humanen und Ratten-Adenosin-Rezeptoren.

Verbindung (Ali)	R ¹	R ²	R ³	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration) (n = 3)			
				A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]CGS21680	A _{2B} human [³ H]PSB603	A ₃ human [³ H]NECA
109 (357)	H	NH ₂		> 1 000 ^a - 7 ± 6 (1 μM) > 1 000 ^a 2 ± 13 (1 μM)	> 1 000 11 ± 6 (1 μM) 260 ± 49	> 1 000 10 ± 4 (1 μM)	> 1 000 38 ± 4 (1 μM)
110 (803N)	H	NH ₂		> 1 000 ^{a, d} - 4 ± 2 (1 μM)	> 1 000 ^d 21 ± 2 (1 μM)	> 10 000 ^d 1 ± 6 (10 μM)	> 1 000 1 ± 1 (1 μM)
111 (347)	H	NH ₂		545 ± 183 1800 ± 300^c	> 1 000 - 3 ± 3 (1 μM) > 10 000 ^a 53 ± 12 (10 μM)	n.d.	> 10 000 ^{a, b} 35 ± 6 (10 μM)

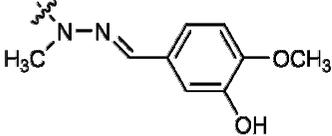
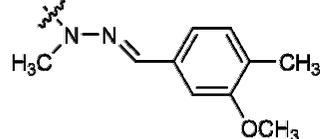
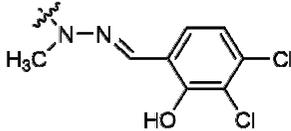
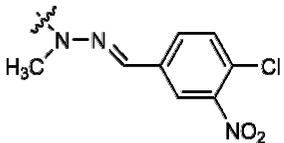
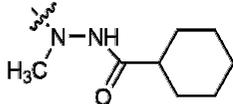
^agetestet durch Nicole Florin; ^b getestet mit dem Radioligand [³H]PSB-11; ^c getestet von Dr. Simone Hildenbrand; ^d Löslichkeitsprobleme

Verbindung (Ali)	R ¹	R ²	R ³	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration) (n = 3)			
				A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]CGS21680	A _{2B} human [³ H]PSB603	A ₃ human [³ H]NECA
112 (808k)	H	NH ₂		> 1 000 - 4 ± 5 (1 μM)	> 1 000 8 ± 1 (1 μM)	n.d.	> 1 000 13 ± 2 (1 μM)
113 (390) ^{1,2}	H	NH ₂		169 ± 13 70.8 ± 3.6 ^a	80.5 ± 34 25.5 ± 3.5 ^a	> 1 000 17 ± 3 (1 μM)	93 ± 5
114 (710)	H	NH ₂		> 1 000 2 ± 5 (1 μM)	> 1 000 36 ± 1 (1 μM)	n.d.	> 1 000 4 ± 1 (1 μM)
115 (710C)	H	NH ₂		181 ± 16 ^{c, b}	173 ± 35 ^b	n.d.	324 ± 55 ^b
116 (751)	H	NH ₂		1760 ± 360 > 1 000 27 ± 4 (1 μM)	> 1 000 11 ± 4 (1 μM) 6.78 ± 0.69	> 1 000 - 19 ± 10 (1 μM)	114 ± 29

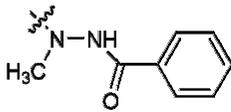
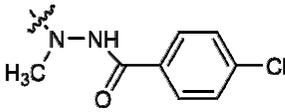
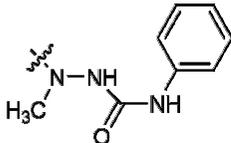
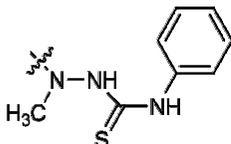
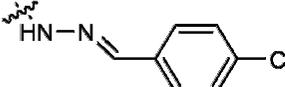
^agetestet durch Nicole Florin; ^b Löslichkeitsprobleme

Verbindung (Ali)	R ¹	R ²	R ³	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration) (n = 3)			
				A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]CGS21680	A _{2B} human [³ H]PSB603	A ₃ human [³ H]NECA
117 (753)	H	NH ₂		> 1 000 20 ± 10 (1 μM)	189 ± 11	> 1 000 - 4 ± 1 (1 μM)	787 ± 221
118 (752)	H	NH ₂		> 1 000 29 ± 8 (1 μM)	> 1 000 4 ± 4 (1 μM) 149 ± 24	n.d.	649 ± 144
119 (756)	H	NH ₂		588 ± 23	247 ± 102	n.d.	337 ± 93
120 (769)	H	NH ₂		343 ± 31 ^e	208 ± 64	n.d.	128 ± 25
121 (766)	H	NH ₂		264 ± 27 ^a	230 ± 47	n.d.	6.01 ± 0.51

^a getestet von Dr. Simone Hildenbrand

Verbindung (Ali)	R ¹	R ²	R ³	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration) (n = 3)			
				A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]CGS21680	A _{2B} human [³ H]PSB603	A ₃ human [³ H]NECA
122 (768)	H	NH ₂		> 1 000 18 ± 1 (1 μM)	> 1 000 46 ± 2 (1 μM)	n.d.	> 1 000 47 ± 8 (1 μM)
123 (765)	H	NH ₂		703 ± 50	640 ± 11	n.d.	225 ± 35
124 (767)	H	NH ₂		76.7 ± 13 ^{a, c}	> 1 000 ^c 51 ± 4 (1 μM)	> 1 000 ^c 3 ± 6 (1 μM)	7.23 ± 2.0 ^c
125 (770)	H	NH ₂		322 ± 71 ^b	401 ± 37 ^b	n.d.	80.9 ± 18.4
126 (771)	H	NH ₂		> 1 000 1 ± 8 (1 μM)	> 1 000 18 ± 4 (1 μM)	n.d.	> 1 000 19 ± 6 (1 μM)

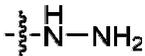
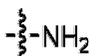
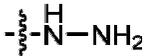
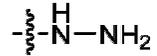
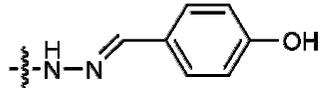
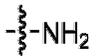
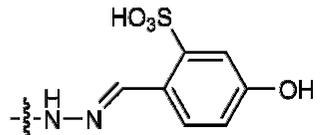
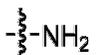
135 ^agetestet durch Nicole Florin; ^b getestet von Dr. Simone Hildenbrand; ^c Löslichkeitsprobleme

Verbindung (Ali)	R ¹	R ²	R ³	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration) (n = 3)			
				A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]CGS21680	A _{2B} human [³ H]PSB603	A ₃ human [³ H]NECA
127 (754)	H	NH ₂		> 1 000 6 ± 2 (1 μM)	> 1 000 11 ± 5 (1 μM)	n.d.	> 1 000 9 ± 7 (1 μM)
128 (759)	H	NH ₂		> 1 000 6 ± 8 (1 μM)	> 1 000 27 ± 5 (1 μM)	n.d.	> 1 000 13 ± 2 (1 μM)
129 (755)	H	NH ₂		> 1 000 3 ± 8 (1 μM)	> 1 000 11 ± 7 (1 μM)	n.d.	> 1 000 23 ± 5 (1 μM)
130 (761)	H	NH ₂		> 1 000 1 ± 11 (1 μM)	> 1 000 16 ± 6 (1 μM)	n.d.	> 1 000 36 ± 7 (1 μM)
131 (386) ¹	H	NH ₂		108 ± 31 ^a	16.1 ± 1.9 ^a	n.d.	72.0 ± 5

^agetestet durch Nicole Florin

Verbindung (Ali)	R ¹	R ²	R ³	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration) (n = 3)			
				A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]CGS21680	A _{2B} human [³ H]PSB603	A ₃ human [³ H]NECA
132 (387) ¹	H	NH ₂		723 ± 280 65.7 ± 12	687 ± 127 12.0 ± 4.1	n.d.	112 ± 47
133 (388) ¹	H	NH ₂		32.1 ± 2.1	53.7 ± 15	n.d.	51.0 ± 18
134 (391) ¹	H	NH ₂		58.0 ± 9.2 ^a	92.1 ± 22	n.d.	131 ± 25
135 (392) ¹	H	NH ₂		263 ± 53 ^a	> 1 000 ^b 45 ± 4 (1 μM) 24.4 ± 7.2 ,	n.d.	88.8 ± 8.6
136 (840)	H	NH ₂		252 ± 47 ^a	78.6 ± 17 ^a	n.d.	266 ± 53 ^a

^agetestet durch Nicole Florin; ^b n = 2

Verbindung (Ali)	R ¹	R ²	R ³	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration) (n = 3)			
				A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]CGS21680	A _{2B} human [³ H]PSB603	A ₃ human [³ H]NECA
137 (904)	SO ₃ H	NH ₂	H	> 1 000 ^a - 11 ± 5 (1 μM)	> 1 000 ^a 3 ± 1 (1 μM)	n.d.	> 1 000 5 ± 7 (1 μM)
138 (912)	SO ₃ H	NH ₂	Cl	> 1 000 ^{a, b} 31 ± 6 (1 μM)	> 1 000 ^a 29 ± 2 (1 μM)	n.d.	n.d.
139 (B-23)	H			> 1 000 5 ± 2 (1 μM)	> 1 000 5 ± 1 (1 μM)	> 1 000 9 ± 4 (1 μM)	n.d.
140 (B-8)	H			≥ 1 000 36 ± 5 (1 μM)	> 1 000 27 ± 5 (1 μM)	> 1 000 6 ± 4 (1 μM)	n.d.
141 (B-13)	H			80.9 ± 16	≥ 1 000 30 ± 7 (1 μM)	≥ 1 000 6 ± 2 (1 μM)	n.d.
142 (904)	H			≥ 1 000 27 ± 9 (1 μM)	≥ 1 000 25 ± 5 (1 μM)	≥ 1 000 16 ± 4 (1 μM)	n.d.

^agetestet durch Nicole Florin; ^b n = 2

Wie bereits in Kapitel 4.1.2.1.2 erwähnt, wurde Binodenoson (**113**) als potenter und selektiver A_{2A} -Agonist identifiziert und wird zur Zeit in klinischen Studien als Diagnostikum für die Radionukliduntersuchungen zur Myokardperfusion untersucht. Um weitergehende Struktur-Wirkungsbeziehungen untersuchen zu können, synthetisierte Dr. Ali El-Tayeb Derivate des Binodenosons bei denen sowohl Modifikationen im Bereich des Linkers als auch des Ringsystems vorgenommen wurden. Diese Derivate und die Leitstruktur Binodenoson wurden in Radioligandbindungsstudien auf deren Affinität und Selektivität hin untersucht. Dabei fiel auf, dass Binodenoson (**113**) in unserem Testsystem erstaunlicherweise eine höhere Affinität zum A_{1-} , A_{2A-} und A_{3-} Rezeptor (70,8 nM am A_{1-} , 25,5 nM am A_{2A-} und 93 nM am A_{3-} Rezeptor) aufwies als in der Literatur beschrieben. Binodenoson wird dort als sehr schwach affin am A_{1-} Rezeptor (48 μ M) und als relativ hochaffin am A_{3-} Rezeptor (930 nM) beschrieben.^{2, 247} Am A_{2B-} Rezeptor konnte lediglich eine sehr geringe Bindung (17% Inhibition bei 1 μ M) beobachtet werden (s. Tabelle 8). Der Wegfall der Doppelbindung im Linker in Verbindung **114** führte wahrscheinlich durch die Zunahme an konformeller Freiheit zu einem vollständigen Affinitätsverlust an allen Subtypen. Die Einführung einer Dimethylaminofunktionalität (Verbindung **115**), ebenfalls unter Aufgabe der Doppelbindung im Linker, führte eventuell aufgrund sterischer Hinderung und damit eingeschränkter konformeller Freiheit zu einer Affinität am A_{1-} , A_{2A-} und A_{3-} Rezeptor im mittleren nanomolaren Bereich. Die Methylierung des Hydrazinyllinkers (Verbindung **116**) an $N^{1''}$ führte zu einer drastischen Steigerung der Affinität am A_{2A-} Rezeptor. Mit 6,78 nM ist **116** die aktivste Verbindung dieser Serie (s. Abb. 93).

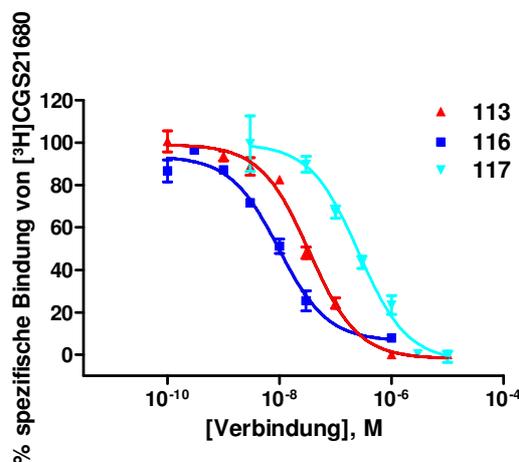


Abb. 93 Kompetitionskurven der Verbindungen **113**, **116** und **117** an A_{2A} -Adenosinrezeptoren (Rattenstriatum) gegen 5 nM $[^3H]$ CGS21680. Die Kurven stammen aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden. Es wurde ein K_i -Wert für Verbindung **113** von 25,5 nM, für **116** von 6,78 nM und für **117** von 189 nM ermittelt.

Die Untersuchung an den anderen Adenosinrezeptorsubtypen ergab, dass Verbindung **116** am A₁- und A_{2B}-Rezeptor keine Affinität aufwies. Im Gegensatz dazu besteht eine 17-fach höhere Bindung zum A₃-Rezeptor. Die Untersuchung hinsichtlich des Speziesunterschieds Mensch/Ratte ergab, dass die Verbindung ausschließlich hochaffin an den rA_{2A}-Rezeptor bindet, wohingegen am hA_{2A}-Rezeptor keine Bindung und am hA₁-Rezeptor eine schwache Bindung beobachtet werden konnte. Verbindung **116** stellt damit einen hochaffinen rattenspezifischen A_{2A}-Adenosinrezeptor Agonisten dar.

Wurde der Cyclohexylring in Verbindung **116** durch einen Phenylring ersetzt (Verbindung **117**) so sank einerseits die Affinität auf 189 nM am A_{2A}-Rezeptor und andererseits konnte ein Verlust an Selektivität gegenüber dem A₃-Rezeptor beobachtet werden (von 17-fach auf 4-fach). Das Einbringen eines Methoxy-Substituenten in Position 4 des Phenylringes (**118**) führte zu keiner wesentlichen Veränderung der Affinität und der Selektivität verglichen mit dem unsubstituierten Phenylring. Der direkte Vergleich mit Verbindung **132** zeigte, dass durch das Einbringen der Methylgruppe an das N^{1''}-Atom des Linkers die Affinität an allen Subtypen zum Teil in beträchtlichem Maße sinkt. Allerdings ist gleichzeitig ein enormer Anstieg der Selektivität zugunsten des A_{2A}-Rezeptors zu verzeichnen.

Eine Zweitsubstitution des Phenylringes in Position 3 mit einem Chlorsubstituenten (**120**) hob die Selektivität zugunsten des A_{2A}-Rezeptors vollständig auf. Die Affinität zum A₃-Rezeptor stieg allerdings. Der Vergleich mit Verbindung **133** zeigte auch in diesem Fall, dass durch Methylierung des N^{1''}-Atoms im Linker ein deutlicher Affinitätsabfall an allen Adenosinrezeptorsubtypen zu beobachten ist. Ein Einfluss auf die Selektivität konnte in diesem Beispiel nicht ausgemacht werden.

Die Einführung eines Hydroxysubstituenten in Position 3 (**122**), erwies sich als ungünstig für alle Subtypen.

Der Austausch des Methoxy- gegen einen Chlorsubstituenten in Position 4 (**119**) führte weitestgehend zu einem Verlust der Selektivität, da sowohl Affinität am A₁-, A_{2A}- und A₃-Rezeptor im mittleren nanomolaren Bereich beobachtet werden konnte. Ein Vergleich mit Verbindung **131**, zeigte, dass erwartungsgemäß die Methylierung des N^{1''}-Atoms im Linker zu einem deutlichen Affinitätsabfall führt.

Die Einführung eines zweiten Chlorsubstituenten in Position 3 des Phenylringes führte, wie bei den analogen Verbindungen **134** und **135**, die ebenfalls keine Methylierung an N¹ aufweisen, zu Affinitäten am A_{2A}-Rezeptor im niedrig nanomolaren Bereich (53,7 nM für

133, 92,1 nM für **134** und 24,4 nM für **135**), und am A_1 -Rezeptor im mittleren nanomolaren Bereich (263 nM). Verbindung **135** ist gegenüber dem A_1 -Rezeptor 11-fach und gegenüber dem A_3 -Rezeptor vierfach A_{2A} -selektiv.

Exemplarisch wurden für die Verbindungen **131**, **132** und **135** funktionelle Studien in Form von cAMP-Akkumulationsexperimenten durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde der Vollagonist NECA unter den gleichen Bedingungen verwendet (s. Abb. 94).

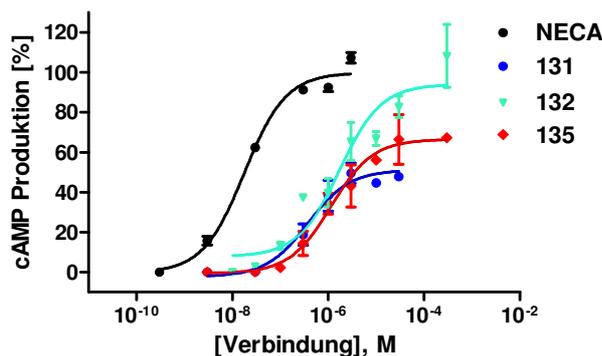


Abb. 94 Kompetitionskurven der Verbindungen **131**, **132**, **135** und NECA in cAMP-Akkumulationsexperimenten in stabil mit dem humanen A_{2A} -Rezeptor-transfizierten CHO-Zellen. Die Kurven stammen aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden. EC_{50} : $0.0179 \pm 0.0013 \mu\text{M}$ (NECA); $0.493 \pm 0.21 \mu\text{M}$ (**131**), $1.36 \pm 0.89 \mu\text{M}$ (**132**), $1.66 \pm 0.59 \mu\text{M}$ (**135**). Der maximale Effekt von NECA wurde gleich 100% gesetzt. Für Verbindung **131** wurde eine intrinsische Aktivität von 48%, für **132** von 83% und für **135** von 67% ermittelt.

Die Verbindungen **131**, **132** und **135** zeigten in den funktionellen cAMP-Akkumulationsexperimenten agonistisches Verhalten mit EC_{50} -Werten von $0,493 \mu\text{M}$ (**131**), $1,36 \mu\text{M}$ (**132**) und $1,66 \mu\text{M}$ (**135**). Die verringerte Wirksamkeit der Testsubstanzen in den cAMP-Experimenten verglichen mit den Radioligand-Bindungsstudien könnte auf bestehende Speziesunterschiede zwischen Ratten und humanen A_{2A} -Adenosinrezeptor zurückzuführen sein. Eine weitere Erklärung stellt die Tatsache dar, dass die ermittelten EC_{50} -Werte aus funktionellen Studien hervorgehen, die im Gegensatz zu Bindungsstudien abhängig sind von der Rezeptorexpression. Die in diesem Fall verwendete Zelllinie zeigte eine relativ geringe A_{2A} -Rezeptordichte. Verbindung **132** zeigte keine signifikanten Unterschiede in der intrinsischen Aktivität verglichen mit dem Vollagonisten NECA. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Verbindung **132** ein Vollagonist am A_{2A} -Adenosinrezeptor ist. Die Verbindungen **131** und **135** zeigten hingegen eine verringerte Efficacy, so dass diese Verbindungen als Partialagonisten angesehen werden müssen.

Die Einführung einer Nitrogruppe als Zweitsubstituent in Position 3 des Phenylringes (**125**) und das Einbringen der Methylfunktionalität an das N^{1''}-Atom führte zu einer bevorzugten Bindung im unteren nanomolaren Bereich an den A₃-Rezeptor (vierfach gegenüber dem A₁- und fünffach gegenüber dem A_{2A}-Rezeptor). Wurde anstelle der Nitrogruppe eine Methylgruppe in Position 3 eingeführt (**121**), so führte dies zu einem deutlichen Affinitätsgewinn am A₃-Rezeptor (6,01 nM). Die Selektivität gegenüber dem A₁- und A_{2A}-Rezeptor konnte auf das 44-fache bzw. 38-fache gesteigert werden. Das Einbringen einer Hydroxylgruppe als dritten Substituenten des Phenylrings in Position 2 (**124**) führte zu einer ähnlich guten Affinität am A₃-Rezeptor (7,23 nM). Die Selektivität gegenüber dem A_{2A}-Rezeptor konnte weiter ausgebaut werden (138-fach). Gegenüber dem A₁-Rezeptor besteht eine 11-fache Selektivität.

Die Einführung einer Carbonylgruppe in den Linker bei gleichzeitiger Methylierung des N^{1''}-Atoms führte bei den Verbindungen **126** - **128** zu einem vollständigem Verlust der Affinität an allen Subtypen. Auch das Einbringen einer Amidstruktur (**129**) und einer Thioamidstruktur (**130**) in den Linker, führt zu einem vollständigen Wirkverlust an allen Subtypen.

Die Verbindungen **138** und **139** tragen in Position 5' des Riboseringes des Adenosins eine Sulfonylgruppe. Der Wirkverlust ist allerdings wahrscheinlich auf die kleinen Substituenten in Position 2 zurückzuführen (H bzw. Cl). Das Einbringen einer Hydrazingruppe in Position 6 und die Aminierung in Position 2 (**139**) bzw. die Einführung einer Hydrazingruppe in Position 2 des Adenosins führte in beiden Fällen zu einem vollständigem Wirkverlust an den Rezeptorsubtypen. Auch hier ist wahrscheinlich der Substituent zu klein.

Bemerkenswert in dieser Serie sind die Verbindungen **141** und **142**. Beide Verbindungen weisen in Position 2 eine Aminogruppe auf. In Position 6 tragen beide Verbindungen ein über ein Hydrazon verknüpftes Phenol. Während aber die Affinität der Verbindung **141** zum A₁-Rezeptor erwartungsgemäß im nanomolaren Bereich (80,9 nM) bei gleichzeitiger Selektivität gegenüber den anderen Subtypen liegt, tritt bei Verbindung **142**, die in Position 2 des Phenols zusätzlich eine Sulfonsäurefunktionalität trägt, ein vollständiger Affinitätsverlust an allen Rezeptoren auf.

Der Einbau einer Sulfonyl-Gruppe in den Linker führte zu einem drastischen Affinitätsverlust im Vergleich zu den analogen Derivaten, die über einen unsubstituierten Alkyllinker verfügen (**109** vs. **69**, **110** vs. **73**, **112** vs. **81**). Allerdings zeigte der direkte Vergleich der analogen Verbindungen **111** der A_{2A}-selektiven Verbindung **75**, dass der

Einbau der Sulfonylgruppe zu einem vollständigen Verlust der Affinität am A_{2A} -Rezeptor führte. Die Affinität am A_1 -Rezeptor blieb davon unberührt, so dass mit Verbindung **111** eine A_1 -selektive Verbindung mit mittlerer nanomolarer Affinität identifiziert wurde.

Die Struktur-Wirkungsbeziehungen dieser Unterserie können damit wie folgt zusammengefasst werden (s. Abb. 95):

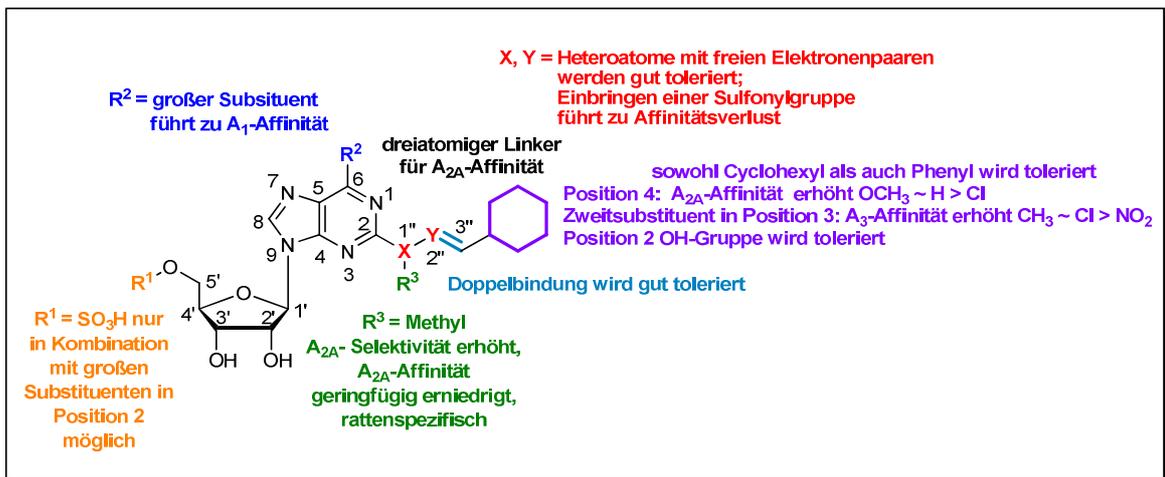
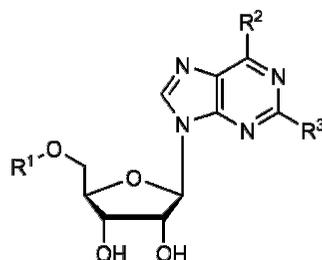
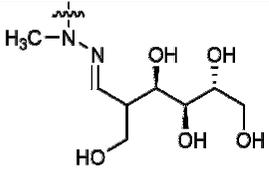
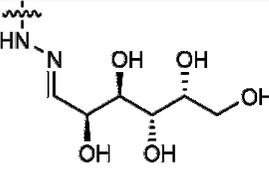
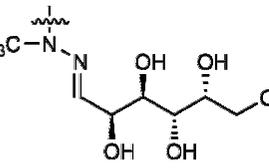
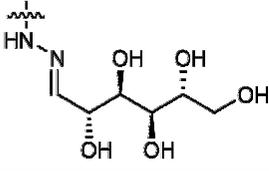
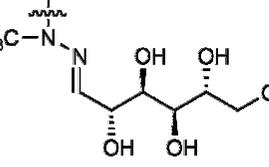


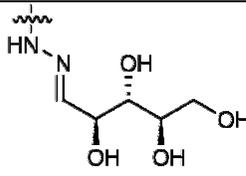
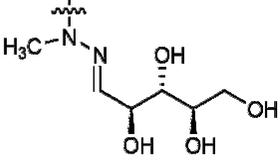
Abb. 95 Strukturwirkungsbeziehungen der Adenosin-Derivate 109-142.

Tabelle 9 Affinitäten verschiedener Adenosin-Derivate an humanen und Ratten-Adenosin-Rezeptoren.



Verbindung (Ali)	R ¹	R ²	R ³	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration) (n = 3)			
				A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]CGS21680	A _{2B} human [³ H]PSB603	A ₃ human [³ H]NECA
143 (641) ¹	H	NH ₂		> 1 000 11 ± 8 (1 μM)	> 1 000 42 ± 1 (1 μM)	> 10 000 10 ± 1 (10 μM)	> 1 000 3 ± 2 (1 μM)
144 (640) ¹	H	NH ₂		> 1 000 2 ± 4 (1 μM)	> 1 000 31 ± 3 (1 μM)	> 10 000 7 ± 5 (10 μM)	> 1 000 19 ± 6 (1 μM)
145 □643) ¹	H	NH ₂		> 1 000 25 ± 2 (1 μM)	> 1 000 34 ± 3 (1 μM)	> 10 000 17 ± 5 (10 μM)	> 1 000 15 ± 5 (1 μM)

Verbindung (Ali)	R ¹	R ²	R ³	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration) (n = 3)			
				A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]CGS21680	A _{2B} human [³ H]PSB603	A ₃ human [³ H]NECA
146 (642) ¹	H	NH ₂		> 1 000 17 ± 4 (1 μM)	> 1 000 25 ± 2 (1 μM)	> 10 000 6 ± 4 (10 μM)	> 1 000 5 ± 2 (1 μM)
147 (645) ¹	H	NH ₂		> 10 000 31 ± 2 (10 μM)	329 ± 109	> 10 000 6 ± 7 (10 μM)	> 10 000 38 ± 4 (10 μM)
148 (644) ¹	H	NH ₂		> 1 000 12 ± 2 (1 μM)	> 1 000 25 ± 1 (1 μM)	> 10 000 17 ± 1 (10 μM)	> 1 000 13 ± 4 (1 μM)
149 (647) ¹	H	NH ₂		> 1 000 34 ± 1 (1 μM)	> 1 000 33 ± 1 (1 μM)	> 10 000 12 ± 5 (10 μM)	> 1 000 16 ± 2 (1 μM)
150 (646) ¹	H	NH ₂		> 1 000 15 ± 4 (1 μM)	> 1 000 2 ± 1 (1 μM)	> 10 000 5 ± 10 (10 μM)	> 1 000 11 ± 3 (1 μM)

Verbindung (Ali)	R ¹	R ²	R ³	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration) (n = 3)			
				A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]CGS21680	A _{2B} human [³ H]PSB603	A ₃ human [³ H]NECA
151 (649) ¹	H	NH ₂		> 1 000 24 ± 2 (1 μM)	> 1 000 33 ± 5 (1 μM)	> 10 000 14 ± 3 (10 μM)	> 1 000 23 ± 11 (1 μM)
152 (648) ¹	H	NH ₂		> 1 000 9 ± 3 (1 μM)	> 1 000 7 ± 1 (1 μM)	> 10 000 9 ± 8 (10 μM)	> 1 000 1 ± 3 (1 μM)

Es bestand die Annahme, dass durch den Einbau von Substituenten mit unterschiedlichen Größen und diversen Stereozentren neue Informationen über die Rezeptor-Ligand-Interaktionen bei Adenosinrezeptoren erhalten werden könnten. Durch die Einführung zahlreicher Hydroxylgruppen wird die Hydrophilie der Verbindungen stark erhöht, sodass hoch polare und schlecht absorbierbare und damit lokal wirkende A_{2A} -Rezeptor Agonisten resultieren könnten, die beispielsweise in der Behandlung von entzündlichen Darmerkrankungen unter Vermeidung einer systemischen Wirkung (hypotensive Effekte) eingesetzt werden könnten. In diesem Zusammenhang wurde eine Serie von Verbindungen von Dr. Ali El-Tayeb dargestellt, in der eine zweite Zuckereinheit in Position 2 des Adenosingerüsts eingebaut wurde, der den Cyclohexylrest von Binodenoson ersetzt, sodass Bis-Zuckernucleosid-Derivate entstanden. Als Zuckereinheiten wurden die Aldosen D-Glucose, D-Galactose, D-Mannose und D-Ribose und die Ketose D-Fructose verwendet. Diese Verbindungen wurden ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit mittels Radioligandbindungsstudien auf ihre Affinität und Selektivität (s. Tabelle 9) und in funktionellen Studien auf ihre Efficacy an Adenosinrezeptoren hin untersucht.

Die K_i -Werte dieser Serie bestätigen frühere Struktur-Wirkungsbeziehungen für agonistische A_{2A} -Adenosinrezeptorliganden. Dabei weisen Adenosin-Derivate, die in Position 2 einen Substituenten tragen, die Tendenz auf, bevorzugt Affinität für den A_{2A} -Rezeptor zu zeigen. Allerdings ist die Höhe der Affinität sehr stark von der Art des Substituenten abhängig. Generell sollte der Substituent eine cyclische Struktur aufweisen oder durch einen dreiatomigen Linker mit Adenosin verbunden sein. Die hier untersuchten Verbindungen wurden über einen Hydrazon-Linker an Adenosin gekoppelt und führten zu Verbindungen, die leicht erhöhte Affinitäten für den A_{2A} -Rezeptor im Vergleich mit den anderen Subtypen aufweisen. Dabei sind allerdings sowohl die Affinitäten als auch die Selektivität bedeutend geringer als die der Leitstruktur Binodenoson (s. Tabelle 8, Verbindung **113**). Die potenteste Verbindung stellte mit einem K_i -Wert von 329 nM Verbindung **147** dar, die in Position 2 einen D-Galactose-Rest trägt (s. Abb. 96).

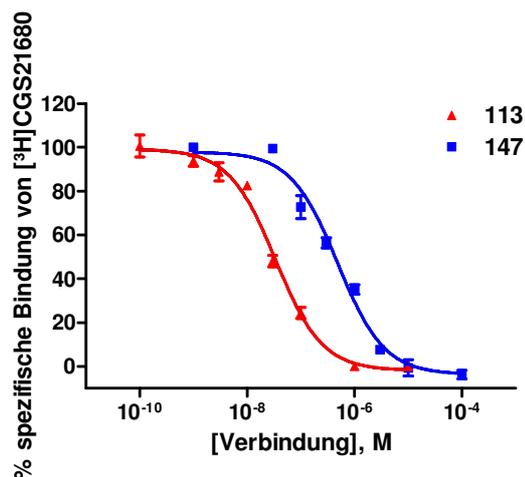


Abb. 96 Kompetitionskurven der Verbindungen **147**, **113** (Binodenoson) an A_{2A} -Adenosinrezeptoren (Rattenstriatum) gegen 5 nM [3H]CGS21680. Die Kurven stammen von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden. Es wurde ein K_i -Wert für Verbindung **113** von 169 nM und für **147** von 329 nM ermittelt.

Verbindung **147** bindet zwar 13-fach schwächer an den A_{2A} -Rezeptor als Binodenoson, besitzt aber dafür eine höhere Selektivität gegenüber den anderen Adenosinrezeptor-Subtypen. Vergleicht man die Inhibitionen der Verbindungen **143** - **152** (s. Tabelle 9) so stellt man fest, dass die Einführung einer Methylgruppe an $N^{1''}$ in den Hydrazon-Linker, die die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zu verhindern scheint, zu schwächeren Affinitäten der Bis-Zuckernucleoside führt. Besonders deutlich wird dies bei der potentesten Verbindung **147**. Das methylierte Derivat **148** weist lediglich eine Inhibition von 25% bei einer finalen Konzentration von 1 μ M am A_{2A} -Rezeptor auf.

Die Verbindungen **143-152** wurden am A_{2B} -Rezeptor unter Verwendung des Radioliganden [3H]PSB-603 getestet. Alle Verbindungen zeigten sehr schwache bis keinerlei Affinität für diesen Subtyp. Die vielversprechendsten Verbindungen **145** und **148** weisen eine Inhibition von 17% bei 10 μ M am niedrig affinen A_{2B} -Rezeptor auf. Die aus diesem Wert abgeschätzten K_i -Werte liegen im mikromolaren Bereich und könnten vergleichbar mit denen von Adenosin am A_{2B} -Rezeptor (15 μ M) sein.² Da derzeit kein agonistischer A_{2B} -Rezeptor Radioligand verfügbar ist, werden die durch Verwendung des antagonistischen Radioliganden [3H]PSB-603 erhaltenen Inhibitionen und die dadurch abgeschätzten K_i -Werte möglicherweise unterschätzt, so dass die Verbindungen **145** und **148** damit vielversprechende Kandidaten als Leitstrukturen für die Entwicklung potenter A_{2B} -Agonisten sein könnten.

Um feststellen zu können, ob die dargestellten Verbindungen als Agonisten oder Antagonisten fungieren und wie hoch ihre Efficacy ist, wurden von der potentesten

Verbindung **147** funktionelle Studien durch Messung der cAMP-Akkumulation in CHO-Zellen, in denen der humane A_{2A} -Rezeptor stabil exprimiert wird, durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde der Vollagonist NECA unter den gleichen Bedingungen untersucht. NECA zeigte in den Konkurrenzexperimenten einen EC_{50} -Wert von $0,0179 \mu\text{M}$ (s. Abb. 97). Der Wert stimmt mit den in der Literatur berichteten Werten überein.³

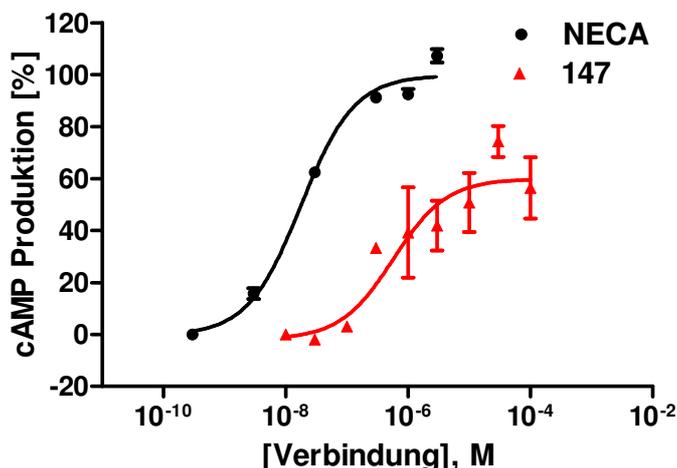


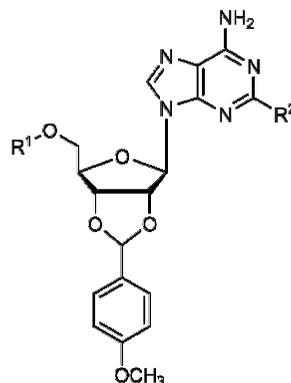
Abb. 97 Konkurrenzkurven von NECA und Verbindung **147** in cAMP-Akkumulationsexperimenten in stabil mit dem humanen A_{2A} -Rezeptor-transfizierten CHO-Zellen. Die Kurven stammen aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden. EC_{50} : $0,0179 \pm 0,0013 \mu\text{M}$ (NECA); $1,44 \pm 1,04 \mu\text{M}$ (**147**). Der maximale Effekt von NECA wurde gleich 100% gesetzt. Für Verbindung **147** wurde eine intrinsische Aktivität von 62% ermittelt.

Die Konkurrenzkurve von Verbindung **147** zeigt, dass die Verbindung als Agonist wirkt. Es wurde ein EC_{50} -Wert von $1,44 \mu\text{M}$ bestimmt (s. Abb. 97). Die im Vergleich zu den Radioligandbindungsexperimenten auftretende geringere Potenz könnte durch auftretende Speziesunterschiede zwischen Ratte und Mensch erklärbar sein. Außerdem stammen die ermittelten EC_{50} -Werte aus funktionellen Studien, die im Gegensatz zu Bindungsstudien abhängig sind von der Rezeptorexpression. Die in diesem Fall verwendete Zelllinie zeigte eine relativ geringe A_{2A} -Rezeptordichte. Da die Efficacy von Verbindung **147** im Vergleich zum Vollagonisten NECA niedriger ist, muss angenommen werden, dass es sich bei dieser Verbindung um einen Partialagonisten am humanen A_{2A} -Adenosinrezeptor handelt.

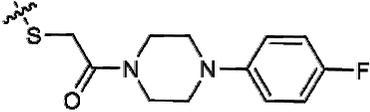
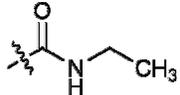
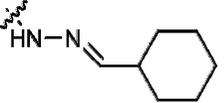
Die im Rahmen dieser Arbeit pharmakologisch untersuchten Bis-Zuckernucleosid-Derivate, zeigen dass mit Verbindung **147** eine Leitstruktur für die Entwicklung potenter, hoch polarer und gleichzeitig selektiver A_{2A} -Rezeptorliganden gefunden wurde, die beispielsweise für die Entwicklung lokal wirksamer antiinflammatorischer Medikamente

dienen könnte. Weiterführende Studien sollten insbesondere das Augenmerk auf die Verbesserung der Affinität am A_{2A} -Rezeptor unter Beibehalt der Selektivität legen. Dies könnte zum Beispiel durch kombinierte Modifikationen an Position 2 und 5' des Adenosin-Grundgerüsts gelingen.

Tabelle 10 Affinitäten verschiedener Adenosin-Derivate an humanen und Ratten-Adenosin-Rezeptoren.



Verbindung (Ali)	R ¹	R ²	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration) (n = 3)			
			A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]CGS21680	A _{2B} human [³ H]PSB603	A ₃ human [³ H]NECA
153 (872)	H		> 1 000 29 ± 1 (1 μM)	205 ± 24	n.d.	> 1 000 33 ± 5 (1 μM)
154 (875)	H		486 ± 180	1560 ± 310	n.d.	> 1 000 32 ± 8 (1 μM)
155 (871)	H		> 1 000 11 ± 3 (1 μM)	> 1 000 13 ± 0 (1 μM)	n.d.	> 1 000 1 ± 3 (1 μM)

Verbindung (Ali)	R ¹	R ²	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration) (n = 3)			
			A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]CGS21680	A _{2B} human [³ H]PSB603	A ₃ human [³ H]NECA
156 (874)	H		> 1 000 15 ± 10 (1 μM)	> 1 000 14 ± 2 (1 μM)	n.d.	> 1 000 19 ± 3 (1 μM)
157 (343)		H	> 1 000 ^a 10 ± 1 (1 μM)	> 1 000 6 ± 2 (1 μM)	n.d.	> 1 000 5 ± 2 (1 μM)
158 (909)	SO ₃ H		> 1 000 ^b 6 ± 7 (1 μM)	> 1 000 7 ± 9 (1 μM)	n.d.	> 1 000 10 ± 4 (1 μM)
159 (910)	SO ₃ H		> 1 000 ^a - 2 ± 6 (1 μM)	482 ± 28 ^a	n.d.	> 1 000 ^a 11 ± 5 (1 μM)

^agetestet durch Nicole Florin; ^b n = 2

In einer weiteren Serie sollte untersucht werden, ob die Derivatisierung der 2'- und 3'-OH-Gruppe der Ribose durch Anisaldehyd eine Bindung an die Adenosinrezeptorsubtypen komplett unterbindet oder ob dieses Strukturelement toleriert wird. Die von Dr. Ali El-Tayeb synthetisierten Derivate **153-159** wurden daraufhin in Radioligandbindungsstudien auf ihre Affinität und Selektivität an Adenosinrezeptoren untersucht (s. Tabelle 10).

Die K_i -Werte der hier untersuchten Serie bestätigen ebenfalls die literaturbekannten Struktur-Wirkungsbeziehungen für den A_{2A} -Adenosinrezeptor. In dieser Serie wurden sowohl Modifikationen des Linkers als auch des cyclischen Strukturelements vorgenommen. Verbindung **153** erwies sich innerhalb dieser Serie als potenteste Verbindung und zeigte einen K_i -Wert von 205 nM am A_{2A} -Rezeptor (s. Abb. 98) bei gleichzeitiger Selektivität gegenüber den anderen Adenosinrezeptorsubtypen. Die Derivatisierung der 2'- und 3'-OH-Gruppe scheint damit nicht grundsätzlich eine Bindung an Adenosinrezeptoren zu verhindern. Vergleicht man Verbindung **153** mit Verbindung **73** (s. Tabelle 7), die keine Schützung der 2'- und 3'-OH-Gruppe aufweist, so stellt man fest, dass die Affinität am A_{2A} -Rezeptor zwar um den Faktor 11 sinkt, allerdings erfolgt gleichzeitig ein enormer Gewinn an Selektivität. Dieser Effekt kann auch bei Verbindung **159** beobachtet werden. Ein Vergleich mit der ungeschützten Verbindung **113** (Binodenoson) zeigt ebenfalls einen Verlust an Affinität am A_{2A} -Rezeptor um den Faktor 18 (s. Abb. 98). Die Selektivität wird auch hier durch die Schützung der Hydroxylgruppen drastisch gesteigert. Inwieweit die Einführung einer Sulfonsäurefunktion in Position 5' in Verbindung **159** Einfluss auf diese Effekte hat, kann mit den hier vorhandenen Daten leider nicht diskutiert werden.

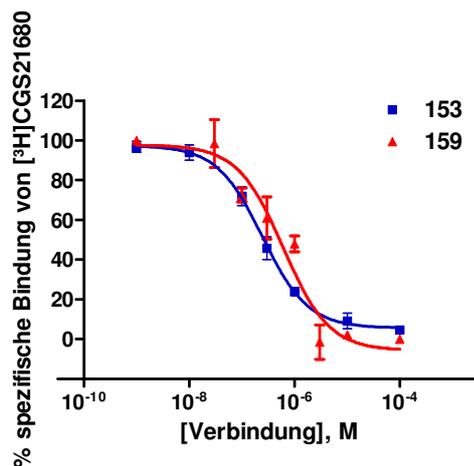


Abb. 98 Kompetitionskurven der Verbindungen **153** und **159** an A_{2A} -Adenosinrezeptoren (Rattenstriatum) gegen 5 nM $[^3H]$ CGS21680. Die Kurven stammen von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden. Es wurde ein K_i -Wert für Verbindung **153** von 205 nM und für Verbindung **159** von 482 nM ermittelt.

Die Substitution des Ethylthio-Linkers durch einen Thioethyl-2-on-Linker und die Einführung eines Fluoridsubstituenten in *para*-Position des Phenylringes, führte zu einem vollständigen Affinitätsverlust an allen Adenosinsubtypen (Verbindung **155**). Eine Vergrößerung des Pharmakophors durch den Einschub von Piperazin zwischen aromatischem Ring und Linker (Verbindung **156**) führte zu sehr geringen Inhibitionswerten an den untersuchten Subtypen (A_1 : 15%, A_{2A} : 14% und A_3 : 19% bei 1 μ M). Durch Austausch des Fluorphenylsubstituenten in Verbindung **155** durch einen Methylpiperidinylrest (Verbindung **154**) konnten Affinitäten im mittleren nanomolaren Bereich am A_1 -Rezeptor und im unteren mikromolaren Bereich am A_{2A} -Rezeptor ermittelt werden. Eine Bindung an den A_3 -Rezeptor konnte nicht beobachtet werden. Eine Verkleinerung des Substituenten in Position 2 durch Einführung einer Hydrazingruppe (Verbindung **158**) beziehungsweise das Fehlen dieses Substituenten (Verbindung **157**) bei gleichzeitiger Sulfonierung der 5'-Position führte zu keinerlei Affinität an allen Adenosinrezeptorsubtypen.

Die Modifikation in Position 2'- und 3'- des Riboseringes ist damit grundsätzlich nicht hinderlich für die Bindung an A_1 - bzw. A_{2A} -Rezeptoren. Die Affinität und die Selektivität gegenüber den anderen Adenosinrezeptorsubtypen scheint dabei allerdings stark von dem Substituenten in Position 2 des AdenosinGrundgerüsts abhängig zu sein. Ein sechsgliedriger Ring, der über einen dreiatomigen Linker verknüpft wird, scheint dabei erwartungsgemäß vorteilhaft zu sein und zu einer bevorzugten Bindung an den A_{2A} -

Rezeptor zu führen. Die Verbindungen **153** und **159** könnten in weiterführenden Untersuchungen Ausgangspunkt für die Entwicklung neuartiger A_{2A} -Rezeptorliganden sein. Die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Affinitäten im mittleren nanomolaren Bereich am A_{2A} -Rezeptor bei gleichzeitiger Selektivität gegenüber den anderen Subtypen stimmen für dieses Vorhaben zuversichtlich. Insbesondere Verbindung **159** könnte aufgrund der in Position 5' substituierten Sulfonsäuregruppe, die die Hydrophilie der Verbindung heraufsetzt, lokal bei entzündlichen Prozessen beispielsweise des Darms, eingesetzt werden. Modifikationen des Cyclohexanringes analog zu denen in Tabelle 8 könnten zu deutlich potenteren Verbindungen unter Beibehaltung oder Erhöhung der Selektivität und Hydrophilie von Verbindung **159** führen.

Somit können die Struktur-Wirkungsbeziehungen dieser Unterserie folgendermaßen in unten stehender Abbildung veranschaulicht werden:

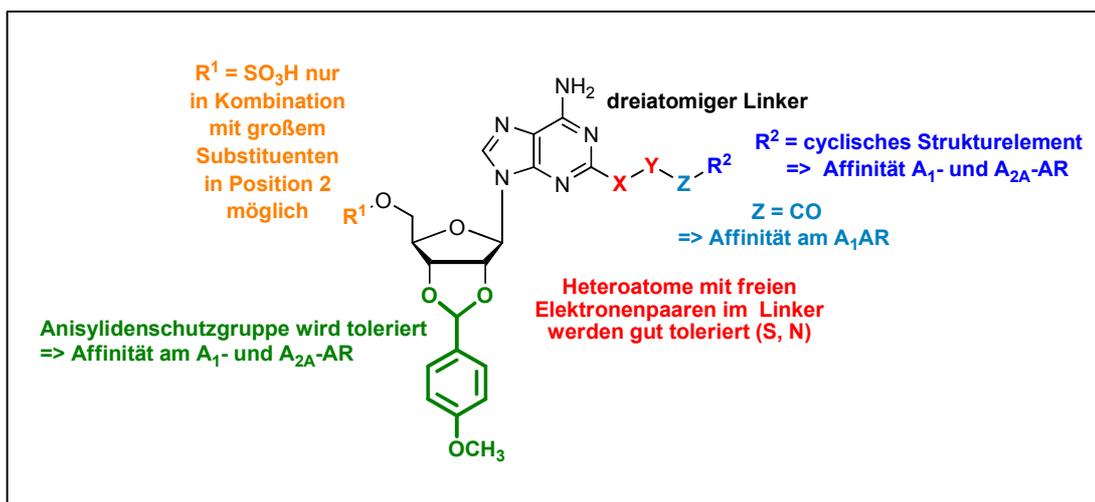


Abb. 99 Strukturwirkungsbeziehungen der Adenosin-Derivate **153-159**.

8.3 Zusammenfassung und Ausblick

Eine Serie von 100 Adenosin-Derivaten, die Substituenten in Position 2 und/oder 5' des AdenosinGrundgerüsts aufweisen, wurden pharmakologisch *in vitro* mittels Radioligandbindungsstudien und funktionellen cAMP-Akkumulationsexperimenten hinsichtlich ihrer Affinität und Selektivität untersucht.

Für die Testung an A₁- und A_{2A}-Rezeptoren wurden Rattenhirn-Membranpräparationen verwendet. Die potentesten Verbindungen wurden zusätzlich an CHO-Membranpräparationen, die den humanen A₁- bzw. den humanen A_{2A}-Rezeptor stabil exprimieren, untersucht. Für Aussagen hinsichtlich der Selektivität der Verbindungen wurden alle Testsubstanzen am humanen A₃-Rezeptor, der ebenfalls rekombinant in CHO-Zellen exprimiert wurde, getestet. Radioligand-Bindungsstudien an humanen A_{2B}-Rezeptoren erfolgten nur für die affinsten Verbindungen, da derzeit kein agonistischer A_{2B}-Rezeptor Radioligand verfügbar ist und die mit dem antagonistischen Radioliganden [³H]PSB-603 ermittelten Inhibitionen und dadurch abgeschätzten K_i-Werte möglicherweise unterschätzt werden. Die erhaltenen Ergebnisse dieser Studien dienten als Ansatzpunkt für Aussagen bezüglich der Selektivität der affinsten Verbindungen.

Funktionelle Untersuchungen anhand der cAMP-Akkumulation in rekombinanten CHO-Zellen, die den humanen A_{2A}-Adenosinrezeptor stabil exprimieren, erfolgten exemplarisch für ausgewählte Verbindungen. Es zeigte sich, dass Verbindung **132** als Vollagonist und die Verbindungen **131**, **135** und **141** als Partialagonisten am A_{2A}-Rezeptor wirken. Die in den funktionellen Experimenten beobachtete verringerte Wirksamkeit verglichen mit der in den Radioligandbindungsstudien bestimmte, kann auf einen Speziesunterschied zwischen humanen und Ratten Adenosinrezeptoren zurückzuführen sein. Eine weitere Erklärung stellt die Tatsache dar, dass die ermittelten EC₅₀-Werte aus funktionellen Studien hervorgehen, die im Gegensatz zu Bindungsstudien abhängig sind von der Rezeptorexpression sind. Die in diesem Fall verwendete Zelllinie zeigte eine relativ geringe A_{2A}-Rezeptordichte.

Mit Hilfe von Radioligandbindungsstudien konnten zahlreiche Verbindungen mit K_i-Werten im mittleren bis unteren nanomolaren Bereich sowohl am A₁- und A_{2A}- als auch am A₃-Rezeptor identifiziert werden. Die hinsichtlich ihrer Affinität und Selektivität

besonders interessanten Verbindungen mit einem Alkylthiolinker sind in Abb. 100 dargestellt.

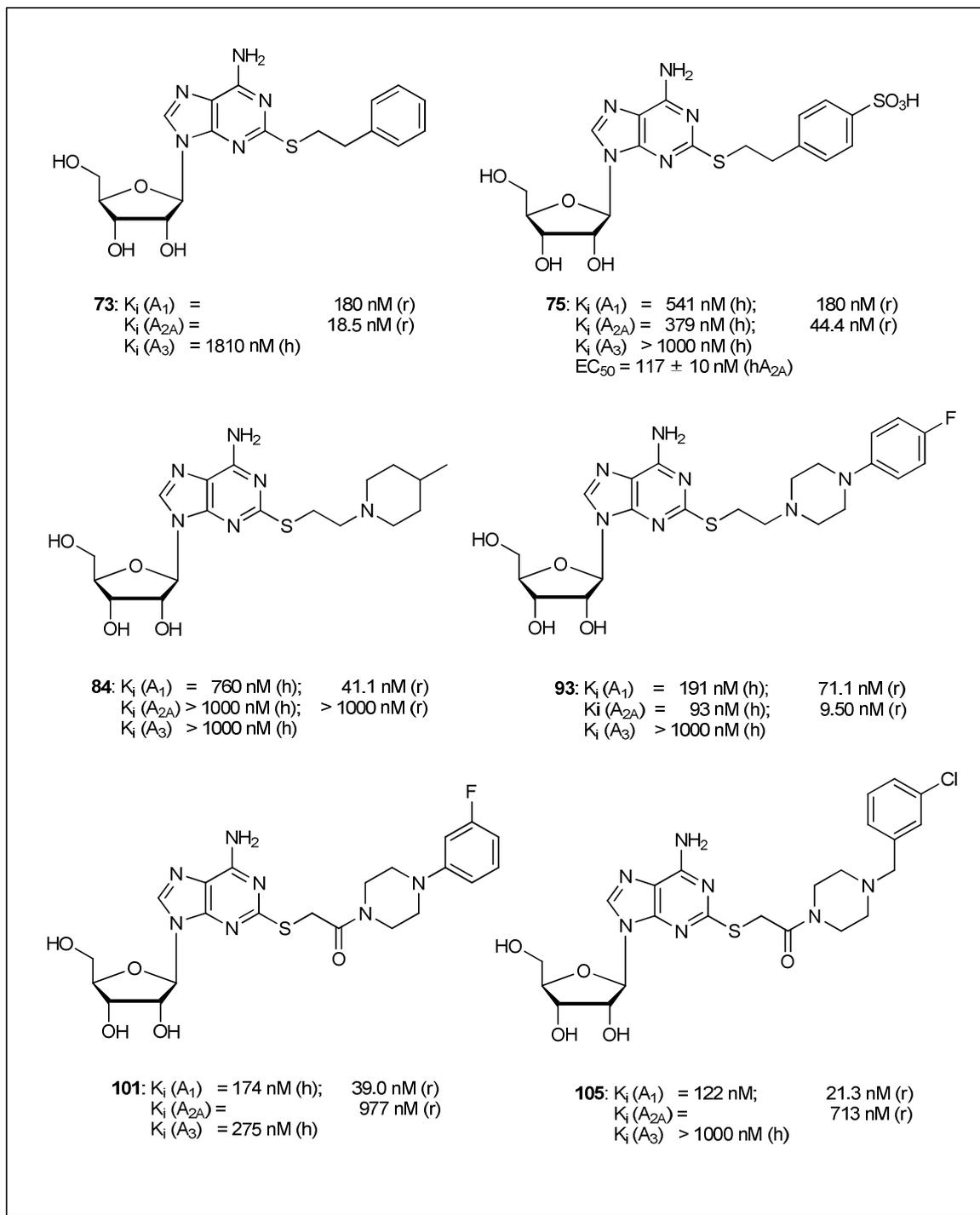


Abb. 100 Adenosinderivate mit Substitution in Position 2 als neue A_1 - bzw. A_{2A} -Adenosinrezeptorliganden.

Die Verbindungen **73**, **75** und **93** erwiesen sich als hochaffine und selektive A_{2A} -Rezeptorliganden. Für Verbindung **75** und **93** wurden Speziesunterschiede zwischen

Ratten- und humanen Adenosinrezeptoren beobachtet. Die Testsubstanz **75** wurde in einer weiterführenden Studie in *ex-vivo* Experimenten auf ihre lokale, antiinflammatorische Wirkung hin untersucht.³

Die Verbindungen **84**, **101** und **105** erwiesen sich in den durchgeführten Radioligandbindungsstudien als A₁-selektive Liganden. Für diese drei Verbindungen konnten ebenfalls Speziesunterschiede zwischen dem Ratten- und humanen Adenosinrezeptor festgestellt werden. Bemerkenswert war, dass durch die Einführung einer Carbonylfunktionalität innerhalb des Linkers und eine Verschiebung des Fluorsubstituenten in die *meta*-Position des Phenylringes die Umwandlung eines potenten A_{2A}-selektiven Liganden zu einem potenten A₁-selektiven Liganden gelang. Beide wiesen jeweils K_i-Werte im unteren nanomolaren Bereich auf (Vergleich Verbindung **93** mit Verbindung **101**). In weiterführenden Studien sollten die Verbindungen **73**, **84**, **93**, **101** und **105** mittels funktionellen Assays eingehender auf ihre pharmakologischen Eigenschaften hin untersucht werden.

Die hinsichtlich ihrer Affinität und Selektivität besonders interessanten Verbindungen, die über einen Hydrazonlinker verfügen sind in Abb. 101 dargestellt.

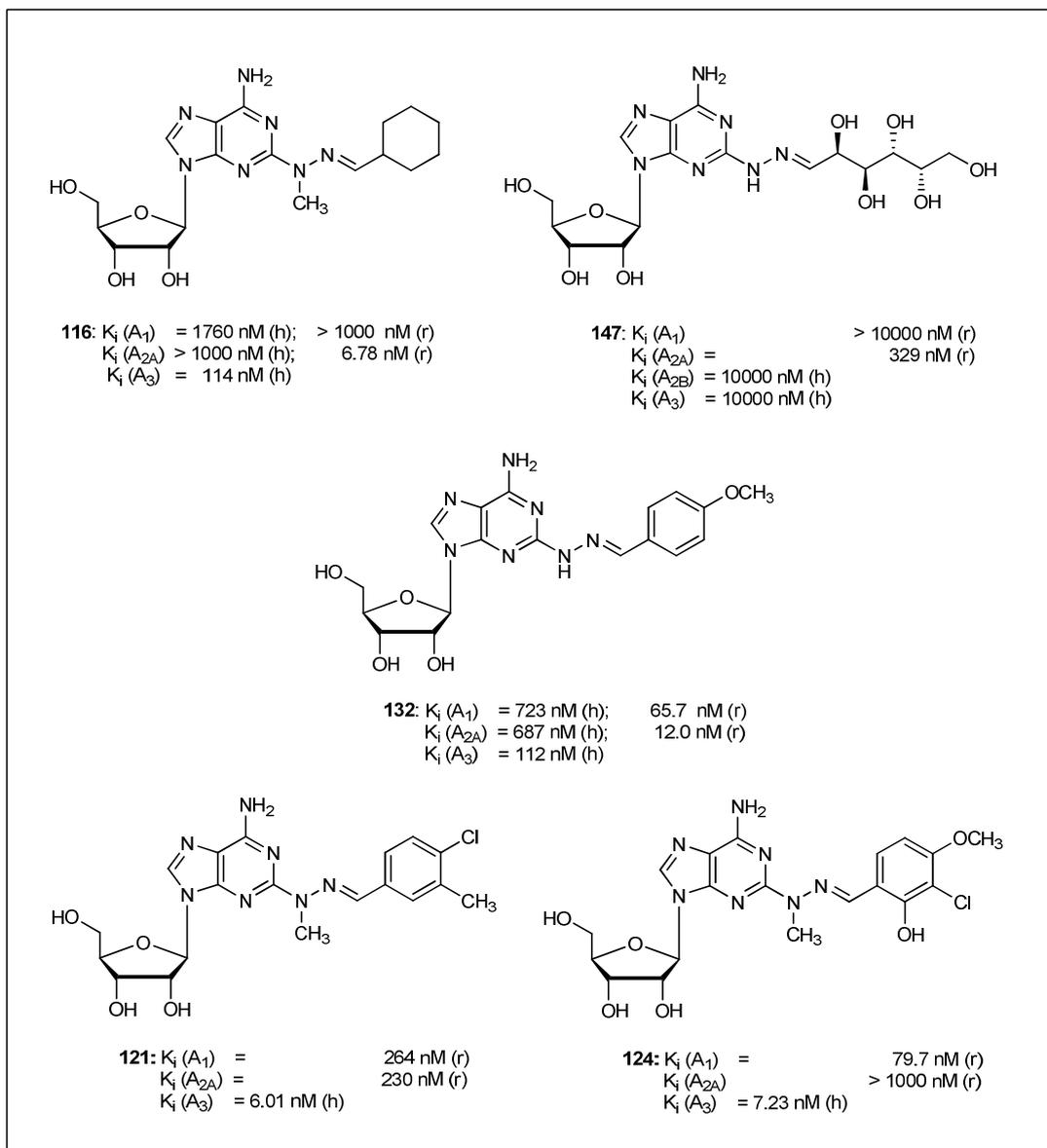


Abb. 101 Adenosinderivate mit Substitution in Position 2 als neue A_{2A} - bzw. A_3 -Adenosinrezeptorliganden.

Die Verbindungen **116**, **132** und **147** stellten sich als hochaffine und selektive A_{2A} -Rezeptorliganden heraus. Für die Testsubstanzen **116** und **132** wurden Speziesunterschiede zwischen Ratten- und humanen Adenosinrezeptoren beobachtet. Besonders interessant war Verbindung **116**, die hochaffin für den A_{2A} -Rezeptor der Ratte, aber nicht für den humanen Rezeptor war. Dies ist insofern bemerkenswert, da diese Verbindung sehr starke strukturelle Ähnlichkeit mit Binodenoson aufweist, das derzeit in klinischen Studien untersucht wird. Die in Verbindung **116** eingeführte Methylgruppe in $N^{1'}$ -Position des Hydrazonlinkers, scheint damit eventuell aufgrund wegfallender Wasserstoffbrückenbindung und/oder sterischer Hinderung kritisch für die Bindung zum

humanen A_{2A} -Rezeptor zu sein. Dies muss in weitergehenden Studien genauer untersucht werden.

Mit den Verbindungen **121** und **124** wurden in den durchgeführten Radioligandbindungsstudien zwei hochpotente A_3 -selektive Adenosinrezeptorliganden mit K_i -Werten im unteren nanomolaren Bereich identifiziert. In weitergehenden Studien sollten diese Substanzen in funktionellen Studien auf ihr agonistisches Verhalten am Rezeptor hin untersucht werden. Falls dies der Fall sein sollte, könnte mit Hilfe dieser Leitstrukturen ein neuer agonistischer A_3 -selektiver Radioligand entwickelt werden, der den unspezifischen Radioliganden NECA ersetzen könnte.

Die Struktur-Wirkungsbeziehungen können damit wie folgt zusammengefasst werden:

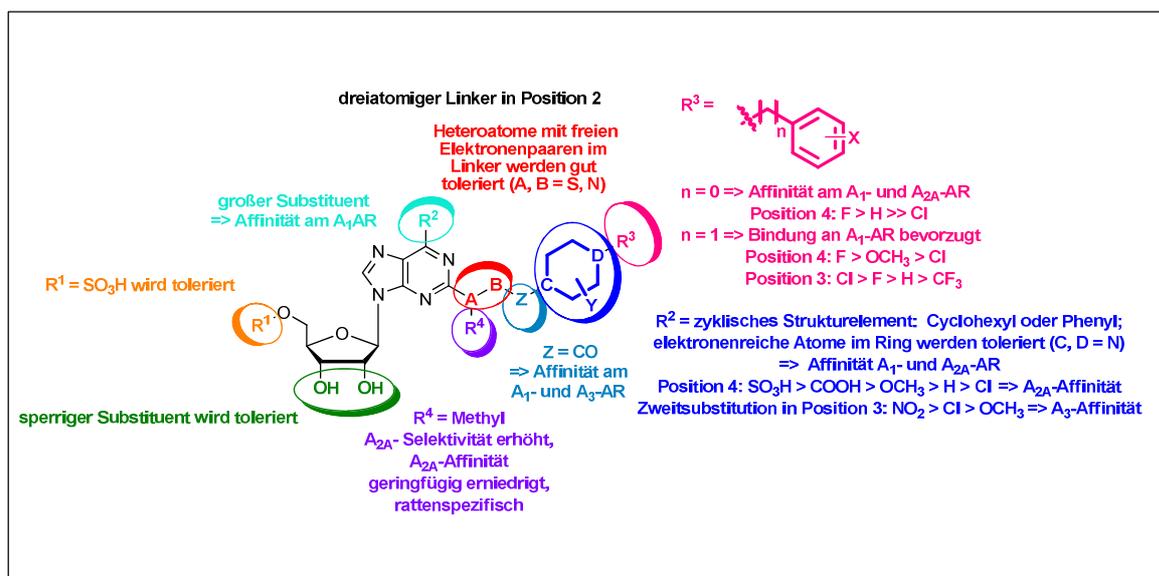


Abb. 102 Zusammenfassende Struktur-Wirkungsbeziehung der Adenosin-Derivate 61 - 159.

9. Charakterisierung von 1*H*-Purin-6,8-dionen und 8*H*-Purin-8-onen als neue Adenosin-Rezeptor-Liganden

9.1 Einleitung

Eine Serie von 1*H*-Purin-6,8-dion- und 8*H*-Purin-8-on-Derivaten wurden in unserem Arbeitskreis von Dr. Wolfram Frobenius und Dr. Alexander Bauer synthetisiert.^{248, 249} Eine Reihe von N7/N9-disubstituierter Verbindungen wurde dabei auf ihre Eigenschaften hin entwickelt und untersucht als potentielle Adenosinrezeptorliganden zu fungieren. Die Grundstruktur ist in Abb. 103 dargestellt.

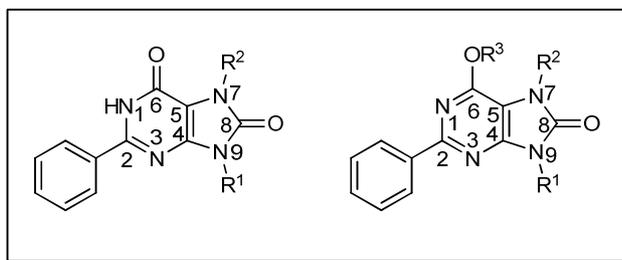


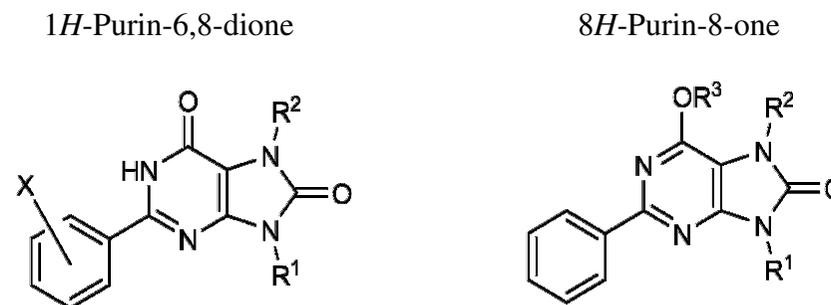
Abb. 103 Grundgerüst der 1*H*-Purin-6,8-dion- und der 8*H*-Purin-8-on-Derivate.

Es erfolgte die Einführung verschiedener Alkyl- bzw. Phenylsubstituenten in den Positionen 2, N7 und N9 der Grundgerüste. Die erhaltenen Testsubstanzen wurden in Radioligandbindungsstudien an nativen Rattencortex- und Rattenstriatum-Membranpräparationen unter Verwendung des A₁-selektiven Radioliganden [³H]CCPA und des A_{2A}-selektiven Radioliganden [³H]MSX-2 von Dr. Andrea Behrenswerth untersucht. Um Aussagen über die Selektivität dieser Verbindungen gegenüber den weiteren Subtypen treffen zu können, wurden die Testsubstanzen im Rahmen dieser Arbeit in Radioligandbindungsstudien an Membranpräparationen von rekombinanten CHO-Zellen, die den humanen A_{2B}- bzw. A₃-Rezeptor stabil exprimieren, untersucht. Dafür wurde einerseits der A_{2B}-selektive Radioligand [³H]PSB-603 und andererseits der A₃-selektive Radioligand [³H]PSB-11 verwendet. Für die potentesten Verbindungen wurden die Speziesunterschiede zwischen humanen und Ratten A₁-, A_{2A}-, A_{2B}- und A₃-Rezeptor untersucht. Dafür erfolgten Radioligandbindungsstudien an Membranpräparationen von CHO-Zellen, die den humanen A₁- oder A_{2A}-Rezeptor bzw. den Ratten A_{2B}- oder A₃-Rezeptor exprimieren.

9.2 KOMPETITIVE RADIOLIGAND-REZEPTOR-BINDUNGSSTUDIEN AN ADENOSIN A_{2B}- UND A₃-REZEPTOREN: ANALYSE DER STRUKTUR-WIRKUNGSBEZIEHUNGEN

Durch die Untersuchung der Testsubstanzen in Radioligandbindungsstudien konnten mehrere hochpotente Substanzen identifiziert werden, die K_i-Werte im unteren nanomolaren bis hin zum subnanomolaren Bereich sowohl am A_{2B}- als auch am A₃-Rezeptor aufwiesen. Nachfolgend sind die Ergebnisse der Radioligandbindungsstudien in Tabelle 11 zusammengefasst.

Ein Vergleich der Verbindungen **160** - **167** zeigte, dass Derivate, die in den Positionen 7 und 9 einen Propylrest tragen, Affinität im nanomolaren Bereich am A₁-Rezeptor besitzen während die Affinität zum A_{2A}-Rezeptor schwächer ausgeprägt war. Daher wurden weitere Verbindungen synthetisiert, die dieses Substitutionsmuster aufwiesen und am Phenylring modifiziert waren. Die Einführung eines Chlorsubstituenten in Position 2 (Verbindung **175**) des Phenylringes führte zu einer Bindung mit A₁- und A_{2B}-Rezeptor-Affinität im mittleren nanomolaren Bereich, wobei keine Selektivität festgestellt werden konnte. Die A_{2A}- und der A₃-Rezeptoren wurden hingegen nicht angesprochen. Erfolgte die Substitution in *meta*-Position (**177**), so ist ein Affinitätsgewinn am A₁- und insbesondere am A₃-Rezeptor zu verzeichnen. Die Affinität am A_{2B}-Rezeptor erhöhte sich hingegen nur schwach. Befand sich der Chlorsubstituent in *para*-Position des Phenylringes (Verbindung **178**), so konnte im Vergleich zu Verbindung **177** ein weiterer Anstieg der Affinität am A₃-Rezeptor beobachtet werden. Es resultierte ein K_i-Wert von 7,94 nM und eine schwache Verbesserung der Affinität am A_{2B}-Rezeptor wurde verzeichnet, wobei sich die Affinität zum A₁-Rezeptor nicht änderte. Insgesamt wurde eine siebenfache Selektivität gegenüber dem A₁- und eine dreifache Selektivität gegenüber dem A_{2B}-Rezeptor beobachtet. Der Austausch von Chlor- gegen einen Fluorsubstituenten in Position 4 des Phenylringes (Verbindung **179**) führte zu einer Verringerung der Bindung sowohl am A₃- als auch am A_{2B}-Rezeptor. Die Affinität zum A₁-Rezeptor wurde dabei nicht beeinflusst. Die Substitution in *para*-Position mit einer Hydroxylgruppe (**182**) führte zu einer höheren Affinität im nanomolaren Bereich an allen Subtypen außer am A_{2A}-Rezeptor, an den die Verbindung im mikromolaren Bereich bindet. Selektivität bezüglich eines Subtypen konnte nicht beobachtet werden.

Tabelle 11 Affinitäten verschiedener 1*H*-Purin-6,8-dione und 8*H*-Purin-8-one an humanen und Ratten-Adenosin-Rezeptoren.

Verbindung (WF)	R ¹	R ²	R ³	X	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration) (n = 3)			
					A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]MSX-2	A _{2B} human [³ H]PSB603	A ₃ human / Ratte [³ H]PSB-11
160 (14)	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	> 10 000 ^{a,c} 28 ± 1 (10 μM)	> 10 000 ^c 35 ± 2 (10 μM)	> 1 000 - 4 ± 6 (1 μM)	> 1 000 4 ± 1 (1 μM)
161 (42)	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	H	4300 ± 70 ^c	> 10 000 ^c 35 ± 2 (10 μM)	> 1 000 11 ± 6 (1 μM)	> 1 000 2 ± 2 (1 μM)
162 (61)	CH ₃	CH ₃	-	H	1000 ± 100 ^{b,e}	> 10 000 ^c 32 ± 3 (10 μM)	> 1 000 20 ± 6 (1 μM)	> 1 000 8 ± 1 (1 μM)

^a n = 2; ^b Radioligand [³H]CCPA; ^c n = 2; ^d Radioligand [³H]MSX-2; ^e getestet von Andrea Behrenswerth

Verbindung (WF)	R ¹	R ²	R ³	X	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration) (n = 3)			
					A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]MSX-2	A _{2B} human / Ratte [³ H]PSB603	A ₃ human / Ratte [³ H]PSB-11
163 (63)	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	-	H	180 ± 20^{b, e}	4300 ± 70^e	50.0 ± 14	41.8 ± 13
164 (88)	C ₃ H ₃	C ₃ H ₃	-	H	640 ± 100^{b, c, e}	2600 ± 300^e	180 ± 47	31.4 ± 3.7
165 (140)	CH ₃	C ₃ H ₇	C ₇ H ₇	H	> 10 000^e <i>34 ± 3 (10 μM)</i>	> 10 000^e <i>21 ± 2 (10 μM)</i>	> 1 000 <i>13 ± 2 (1 μM)</i>	> 1 000 <i>0 ± 3 (1 μM)</i>
166 (142)	CH ₃	C ₃ H ₇	-	H	370 ± 60^{b, e}	8300 ± 1400^{c, e}	342 ± 115	576 ± 272
167 (151)	C ₃ H ₇	H	-	H	> 10 000^e <i>50 ± 2 (10 μM)</i>	> 10 000^e <i>36 ± 2 (10 μM)</i>	> 1 000 <i>6 ± 4 (1 μM)</i>	> 1 000 <i>24 ± 3 (1 μM)</i>
168 (152)	C ₇ H ₇	C ₃ H ₇	-	H	44.7 ± 32 14.0 ± 1.0^e	776 ± 398 400 ± 80.0^e	253 ± 6.0 530 ± 81	0.936 ± 0.321 > 10 000 <i>14 ± 3 (10 μM)</i>
169 (158)	C ₃ H ₇	H	C ₇ H ₇	H	> 10 000^e <i>12 ± 5 (10 μM)</i>	> 10 000^e <i>16 ± 7 (10 μM)</i>	> 1 000 <i>1 ± 3 (1 μM)</i>	> 1 000 <i>2 ± 4 (1 μM)</i>

^a n = 2; ^b Radioligand [³H]CCPA; ^c n = 2; ^d Radioligand [³H]MSX-2

					K_i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration) (n = 3)			
Verbindung (WF)	R¹	R²	R³	X	A ₁ human / Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human / Ratte [³ H]MSX-2	A _{2B} human / Ratte [³ H]PSB603	A ₃ human / Ratte [³ H]PSB-11
170 (162)	C ₃ H ₇	C ₇ H ₇	-	H	110 ± 7.0^e	1300 ± 200^e	> 1 000 34 ± 9 (1 μM)	> 1 000 43 ± 2 (1 μM)
171 (163)	C ₃ H ₇	CH ₃	C ₇ H ₇	H	> 10 000^e 30 ± 5 (10 μM)	> 10 000^e 20 ± 2 (10 μM)	> 1 000 6 ± 3 (1 μM)	> 1 000 - 2 ± 4 (1 μM)
172 (164)	C ₃ H ₇	CH ₃	-	H	310 ± 40^e	4300 ± 1100^e	> 1 000 41 ± 2 (1 μM)	> 1 000 34 ± 4 (1 μM)
173 (167)	C ₄ H ₉	C ₂ H ₅	-	H	130 ± 20^e	1800 ± 500^e	319 ± 30	103 ± 11
174 (199a)	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	-	4-SO ₂ N(CH ₃) ₂	566 ± 115 210 ± 14^e	571 ± 138 300 ± 70^{d,e}	49.7 ± 2.7 156 ± 25	3.61 ± 0.60 > 10 000 9 ± 3 (10 μM)
175 (199b)	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇		2-Cl	240 ± 20^e	4300 ± 1200^e	389 ± 43	> 1 000 32 ± 3 (1 μM)
176 (199c)	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	-	4-CH ₃	195 ± 75.8 60.0 ± 2.0^e	3706 ± 877 870 ± 100^e	389 ± 43	6.24 ± 0.12 > 10 000 7 ± 4 (10 μM)
177 (199d)	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	-	3-Cl	54.0 ± 9.0^e	> 10 000^e 36 ± 6 (10 μM)	156 ± 41	25.4 ± 1.5

^a n = 2; ^b Radioligand [³H]CCPA; ^c n = 2; ^d Radioligand [³H]MSX-2

Verbindung (WF)	R ¹	R ²	R ³	X	K _i ± SEM [nM] bzw. Inhibition in % (Konzentration) (n = 3)			
					A ₁ human/Ratte [³ H]CCPA	A _{2A} human/Ratte [³ H]MSX-2	A _{2B} human/Ratte [³ H]PSB603	A ₃ human/Ratte [³ H]PSB-11
178 (199e)	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	-	4-Cl	53.0 ± 5.0^e	> 1 000^e 46 ± 4 (1 μM)	20.8 ± 5,7	7.94 ± 4.1
179 (199f)	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	-	4-F	61.0 ± 3.0^e	2100 ± 710^e	100 ± 6,7	34.3 ± 11
180 (199g)	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	-	2-OC ₂ H ₅	260 ± 17^e	4500 ± 1000^{d,e}	> 1 000 12 ± 3 (1 μM)	> 1 000 34 ± 1 (1 μM)
181 (199h)	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	-	4-OC ₂ H ₅	56.0 ± 3,0^e	> 1 000^e 49 ± 7 (1 μM)	49.9 ± 4,0	15.2 ± 5.1
182 (200a)	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	-	4-OH	26.0 ± 1,3^e	1000 ± 200^e	27.8 ± 11	16.2 ± 1.3
183 (200b)	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	-	4-SO ₃ Na	2100 ± 230^e	11000 ± 2900^e	> 1 000 27 ± 6 (1 μM)	465 ± 45

^a n = 2; ^b Radioligand [³H]CCPA; ^c n = 2; ^d Radioligand [³H]MSX-2

Durch das Einbringen eines Ethoxysubstituenten in Position 2 des Rings (**180**) konnte ein A_1 -selektiver Ligand mit einem K_i -Wert im mittleren nanomolaren Bereich erhalten werden. Es besteht eine 17-fache Selektivität gegenüber dem A_{2A} -Rezeptor und mindestens eine vierfache Selektivität gegenüber den A_{2B} - und A_3 -Rezeptoren. Wurde der Ethoxysubstituent allerdings in Position 4 eingeführt (**181**), konnte außer am A_{2A} -Rezeptor, an den diese Verbindung nach Abschätzung im mikromolaren Bereich bindet, eine teilweise beachtliche Steigerung der Affinität an allen Subtypen verzeichnet werden, wobei die K_i -Werte im unteren nanomolaren Bereich lagen. Die Selektivität zugunsten des A_3 -Rezeptors war lediglich schwach ausgeprägt. Die Erhöhung der Wasserlöslichkeit durch Einführung eines Sulfatrestes in Position 4 des Phenylrings (Verbindung **183**), führte zu einem A_3 -selektiven Antagonisten mit einem K_i -Wert von 465 nM. Wurde zur Erhöhung der Hydrophilie ein Dimethylsulfonamid-Rest eingebracht (Verbindung **174**), so konnte eine beachtliche Steigerung der Affinität am A_3 -Rezeptor erzielt werden (3,51 nM). Bemerkenswert war, dass keinerlei Bindung zu dem Ratten A_3 -Rezeptor beobachtet werden konnte. Dies kann möglicherweise auf größere Sequenzunterschiede zwischen dem humanen und Rattenrezeptor zurückgeführt werden als dies bei den anderen Adenosinrezeptorsubtypen der Fall ist. Die Verbindung ist um ein 58-faches gegenüber dem A_1 -Rezeptor, um ein 83-faches gegenüber dem A_{2A} -Rezeptor und gegenüber dem A_{2B} -Rezeptor um ein 14-faches selektiv. Die Untersuchung der Speziesabhängigkeit zwischen Ratten und humanem A_1 - und A_{2A} -Adenosinrezeptor ergab, dass die Verbindung in beiden Fällen bevorzugt an den Rattenrezeptor bindet. Ebenso wie der Dimethylsulfonamidsubstituent führt eine Methylgruppe in Position 4 (Verbindung **176**) zu einem hochpotenten A_3 -selektiven Liganden. Die Verbindung ist mit einem K_i -Wert von 6,24 nM ebenso affin am humanen A_3 -Rezeptor wie Verbindung **174** und zeigt ebenfalls keinerlei Affinität für den Ratten A_3 -Rezeptor. Während die Selektivität gegenüber den A_{2A} - und A_{2B} -Rezeptoren deutlich erhöht wurde (140-fach bzw. 62-fach), ging die Selektivität im Vergleich mit Verbindung **174** gegenüber dem A_1 -Rezeptors verloren (von 58-fach auf 10-fach). Nichtsdestotrotz wurde mit Verbindung **176** ein potenter und selektiver A_3 -Rezeptorligand identifiziert (s. Abb. 104).

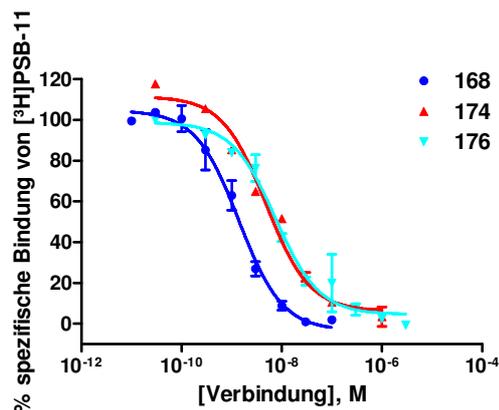


Abb. 104 Kompetitionskurven der Verbindungen **168**, **174** und **176** gegen 1 nM [³H]PSB-11 an rekombinanten CHO-Zellen, die den humanen A₃-Adenosinrezeptor stabil exprimieren. Die Kurven stammen aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten angefertigt wurden. Es konnte ein K_i-Wert für Verbindung **168** von 0,938 ± 0,32 nM, für **174** von 3,61 ± 0,60 nM und für **176** von 6,24 ± 0,12 nM ermittelt.

Die potenteste Verbindung stellte **168** dar. Diese weist in Position 7 einen Propyl- und in Position 9 einen Benzylrest auf. Für diese Verbindung konnte ein K_i-Wert von 0,936 nM am humanen A₃-Rezeptor bestimmt werden. Die Verbindung bindet damit im subnanomolaren Bereich. Auch bei dieser Verbindung konnte keinerlei Affinität zu dem Ratten A₃-Rezeptor beobachtet werden konnte. Es wurde gegenüber dem A₁- eine 15-fache, gegenüber dem A_{2A}- eine 427-fache und gegenüber dem A_{2B}-Rezeptor eine 270-fache Selektivität ermittelt. Die Untersuchung der Speziesunterschiede zwischen Mensch und Ratte ergab sowohl für den A₁- und A_{2A}- als auch für den A_{2B}-Rezeptor eine Präferenz für den Ratten-Adenosinrezeptor. Damit wurde mit Verbindung **168** ein hochpotenter A₃-selektiver Antagonist mit ausgezeichneter Selektivität identifiziert. Bemerkenswert ist der Vergleich mit Verbindung **170** wo die Substituenten in Position 7 und 9 im Vergleich zu Verbindung **168** vertauscht wurden. Dies führte zu einem weitestgehenden Verlust der Aktivität von **170** am A₃- und A_{2B}-Rezeptor und es besteht eine 12-fache A₁- Selektivität gegenüber dem A_{2A}-Rezeptor bei einem K_i-Wert im mittleren nanomolaren Bereich.

9.3 Zusammenfassung und Ausblick

Eine Serie von 24 Verbindungen wurde pharmakologisch *in vitro* mittels Radioligandbindungsstudien hinsichtlich ihrer Affinität und Selektivität untersucht.

Die Testung an dem Ratten-A₁- und A_{2A}-Rezeptor erfolgte bereits zu einem früheren Zeitpunkt. Dazu wurden Rattenhirn-Membranpräparationen verwendet. Die potentesten Verbindungen wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich an CHO-Membranpräparationen, die den humanen A₁- oder A_{2A}-Rezeptor bzw. den Ratten A_{2B}- oder A₃-Rezeptor stabil exprimieren, untersucht, um Informationen über die Speziesunterschiede zwischen Ratten und humanen Adenosinrezeptoren zu erhalten. Für Aussagen hinsichtlich der Selektivität wurden alle Testsubstanzen an humanen A_{2B}- und A₃-Rezeptoren, die ebenfalls in rekombinanten CHO-Zellen exprimiert wurden, getestet.

Mit Hilfe von Radioligandbindungsstudien konnten mehrere Verbindungen mit K_i-Werten im mittleren bis unteren nanomolaren Bereich sowohl am A₁- und A_{2A}- als auch am A_{2B}-Rezeptor identifiziert werden. Für den A₃-Rezeptor wurden mehrere hochpotente Substanzen gefunden, die hinsichtlich ihrer Affinität und Selektivität besonders interessanten Verbindungen sind in Abb. 105 dargestellt.

Die Untersuchung der Verbindungen **174** und **176** ergab, dass diese mit K_i-Werten im unteren nanomolaren Bereich und gleichzeitiger Selektivität gegenüber den anderen Adenosinrezeptorsubtypen hochaffin an den humanen A₃-Rezeptor binden. Die Untersuchung der Speziesabhängigkeit zwischen Mensch und Ratte der Adenosinrezeptorsubtypen ergab, dass bevorzugt eine Bindung mit dem Ratten A₁- und A_{2A}-Rezeptor eingegangen wird. Am A₃-Rezeptor konnte ausschließlich die Bindung des Liganden mit dem humanen Rezeptor beobachtet werden. Letzteres kann möglicherweise auf eine geringere Sequenzhomologie der Rezeptoren im Vergleich mit den anderen Subtypen zurückgeführt werden. Am A_{2B}-Adenosinrezeptor konnte zwar Affinität für den Rattenrezeptor beobachtet werden, allerdings binden die Liganden bevorzugt an den humanen Rezeptor. Dies trifft auch für die potenteste Verbindung **168** dieser Serie zu. Auch diese bindet bevorzugt an die Ratten A₁- und A_{2A}- bzw. an die humanen A_{2B}- und A₃-Rezeptoren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Verbindung **168** in den durchgeführten Radioligandbindungsstudien ein hochpotenter und gegenüber den anderen Subtypen selektiver Antagonist am humanen A₃-Rezeptor identifiziert (K_i = 0,936 nM).

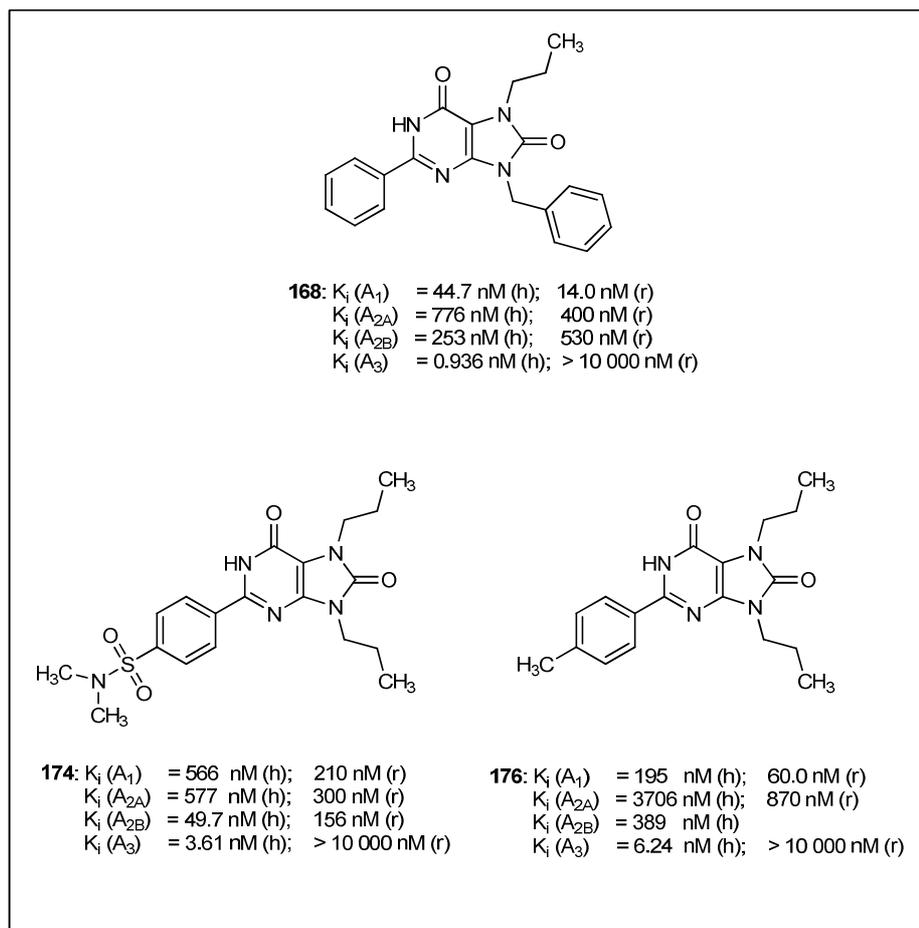


Abb. 105 Strukturen der hochpotenten und selektiven A_3 -Adenosinrezeptorliganden **168**, **174** und **176**.

Obwohl in den letzten Jahren einige potente und selektive A_3 -Antagonisten entwickelt wurden, befindet sich derzeit keine dieser Substanzen in der klinischen Entwicklung. Dabei könnte ein hochpotenter und selektiver A_3 -Antagonist beispielsweise einen therapeutischen Nutzen bei der Behandlung von Schlaganfällen, Glaukom, Entzündungen und während der bei Krebs induzierten Chemotherapie bringen. Auch die Entwicklung von antiasthmatischen, antiallergischen sowie neuroprotektiven Medikamenten auf Grundlage von A_3 -Adenosinrezeptor-Antagonisten könnten vielversprechend sein.²⁵⁰ Daher sollten in weiterführenden Studien die potentesten Verbindungen dieser Serie in funktionellen Studien auf ihr antagonistisches Verhalten am Rezeptor überprüft werden.

Aufgrund der exzellenten Affinität und Selektivität könnte Verbindung **168** dann beispielsweise als pharmakologisches Tool bei Untersuchungen an nativen Geweben genutzt werden, da eine Diskriminierung des A_3 -Rezeptors von den anderen Subtypen gegeben ist.

10. Zusammenfassung und Ausblick

Die Suche nach potenten und gleichzeitig selektiven Verbindungen ist für die Entwicklung neuartiger Arzneimittel ebenso Grundvoraussetzung wie die Validierung neuer krankheitsbezogener Targetstrukturen. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stellen für einen Großteil der zugelassenen Arzneistoffe die Zielstruktur dar und haben somit eine herausragende therapeutische Relevanz. Um detailliertere Informationen über die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor zu erhalten und damit die Suche nach neuartigen Arzneimitteln zu erleichtern, werden neben potenten und selektiven Substanzen auch potente fluoreszenzmarkierte Liganden benötigt, die beispielsweise in der Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden können. Diese fluoeszenzmarkierten Liganden sollten neben hoher Affinität insbesondere auch Photostabilität aufweisen, um bei einem längeren Beobachtungszeitraum nicht auszubleichen. Die Klasse der BODIPY-Derivate erfüllt diesen Anspruch.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher funktionalisierte BODIPY-Derivate entwickelt. Neben den bereits zu einem früheren Zeitpunkt in diesem Arbeitskreis entwickelten Bromalkyl- und Aminoalkyl-Derivaten, wurden BODIPY-Derivate, die über eine Iod-, Carboxyl-, Methoxyester-, terminale Alken-, Thioester- oder Thiol-Funktion verfügen, dargestellt (s. Abb. 106). Desweiteren konnten BODIPY-Derivate mit α,β -Dibromfunktionalisierung, Methoxy- und Dihydroxy-Funktionalität erhalten werden. Alle dargestellten Derivate wiesen exzellente spektroskopische Eigenschaften auf.

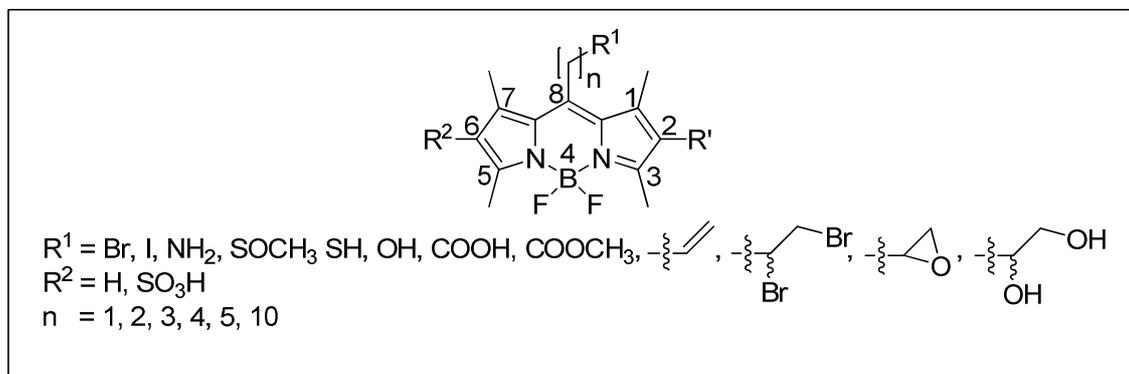


Abb. 106 Die in dieser Arbeit dargestellten funktionalisierten Alkyl-BODIPY-Derivate.

Exemplarisch wurden für ein BODIPY-Derivat (Verbindung **3**) Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die synthetisierten Verbindungen unter basischen, reduktiven und oxidativen Bedingungen sehr stabil sind. Lediglich unter sauren Bedingungen erfolgte eine teilweise Zersetzung des Fluorophors. Ein entstandenes Nebenprodukt konnte anhand von LC-MS Spektren postuliert werden.

In einem weiteren Projekt sollten mit Hilfe der synthetisierten Fluorophore Adenosinrezeptorliganden fluoreszenzmarkiert werden. Es gelang, fünf fluoreszierende Adenosinrezeptorliganden in guten Ausbeuten zu erhalten (s. Abb. 107).

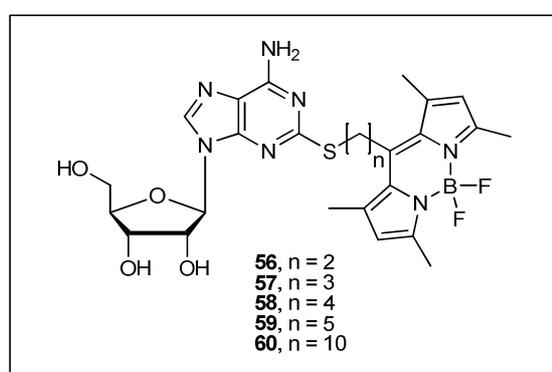


Abb. 107 Fluoreszenzmarkierte-Adenosin-Derivate mit unterschiedlichen Linkerlängen.

Die so dargestellten fluoreszierenden Liganden wurden daraufhin pharmakologisch in Radioligand-Bindungsstudien und in funktionellen Studien hinsichtlich ihrer Affinitäten, Aktivitäten und Selektivitäten untersucht. Die fluoreszierenden Adenosinrezeptorliganden zeigten Affinität zum A_{1-} , A_{2A-} und A_{3-} Rezeptor im mittleren nanomolaren bis hin zum unteren mikromolaren Bereich. Erwartungsgemäß konnte keine Bindung an A_{2B-} Rezeptoren beobachtet werden. Die affinste Verbindung am A_{1-} Rezeptor war mit einem K_i -Wert von 304 nM Verbindung **57** mit einer mittleren Alkylkettenlänge. Kürzere und längere Linker führten zu einer geringeren Affinität an diesem Subtyp. Die Untersuchung der Speziesabhängigkeit zwischen Ratte und Mensch ergab, dass die Testsubstanzen bevorzugt an den Ratten A_{1-} Rezeptor binden. Am A_{2A-} Rezeptor wurde hingegen eine höhere Affinität für den humanen Rezeptor beobachtet. Verbindung **59** zeigte an diesem Rezeptorsubtyp die größte Affinität mit einem K_i -Wert von 865 nM. Eine Verlängerung oder die Verkürzung der Linkerlänge führte wiederum zu einer stark reduzierten Bindung. Am A_{3-} Rezeptor konnte Verbindung **58** als affinste Substanz identifiziert werden. Mit

einem K_i -Wert von 211 nM war **58** damit auch die affinste Verbindung dieser Serie. Bei Verwendung des antagonistischen Radioliganden [^3H]PSB-11 anstelle des agonistischen Radioliganden [^3H]NECA konnte kein signifikanter Unterschied in den Affinitäten der Testverbindungen beobachtet werden. Die Untersuchung der Speziesunterschiede zwischen Ratte und Mensch ergab, dass die Testverbindungen am A_3 -Rezeptor eine bevorzugte Bindung mit dem humanen Rezeptor eingehen. Es wurden zusätzlich funktionelle Studien an rekombinanten CHO-Zellen, die den humanen A_{2A} - bzw. den A_3 -Adenosinrezeptor stabil exprimierten, durchgeführt. Dazu wurde im Falle des A_{2A} -Rezeptors die cAMP-Akkumulation und im Falle des A_3 -Rezeptors die Forskolin-abhängige Reduktion des cAMP-Levels in den Zellen nach Zugabe der Testsubstanzen bestimmt. Als Kontrolle diente der Vollagonist NECA. Es zeigte sich, dass Zellen, die den humanen A_{2A} -Rezeptor exprimierten und mit den fluoreszierenden Testsubstanzen inkubiert wurden, vergleichbare Mengen an cAMP akkumulierten verglichen mit der Positivkontrolle NECA. Die Testsubstanzen wirkten damit als Vollagonisten am humanen A_{2A} -Rezeptor. Zellen, die den humanen A_3 -Rezeptor exprimierten und mit den Testsubstanzen **57-59** inkubiert wurden, zeigten im Vergleich mit dem unselektiven Agonisten NECA eine vergleichbare Reduktion des cAMP-Levels. Diese Substanzen wirkten als Vollagonisten am humanen A_3 -Rezeptor. Die Zellen, die mit den Verbindungen **56** und **60** inkubiert wurden, zeigten hingegen eine verringerte Reduktion des cAMP-Levels, so dass diese beiden Verbindungen partiell agonistisch wirkten.

Die hier synthetisierten und in radioaktiven Bindungs- und funktionellen Studien pharmakologisch untersuchten Derivate stellen somit wichtige Werkzeuge für die Entwicklung fluoreszenzbasierter Assays oder für Fragestellungen, die mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden können, dar. In weiterführenden Studien sollte durch Einbringen von Heteroatomen und durch Substitutionen am Linker versucht werden, einerseits die Affinität und andererseits die Selektivität zugunsten eines Adenosinrezeptor-Subtyps zu steigern, sodass die Derivate auch in nativem Gewebe, in dem verschiedene Adenosinrezeptor-Subtypen vorkommen, angewendet werden können.

Obwohl in den letzten Jahren eine Vielzahl von Adenosin-Rezeptor-Liganden entwickelt wurden, sind derzeit sehr wenige selektive Adenosin-Rezeptor-Liganden auf dem Markt. Ein Grund für den langsamen Fortschritt bei der Entwicklung von Arzneistoffen, die selektiv Adenosin-Rezeptoren adressieren, sind möglicherweise die ungünstigen

pharmakokinetischen Eigenschaften und die geringe Wasserlöslichkeit sowie die damit einhergehende schlechte Bioverfügbarkeit vieler sehr lipophiler Verbindungen.

In einem weiteren Projekt wurde daher in unserem Arbeitskreis von Dr. Ali El-Tayeb eine Serie von Adenosin-Derivaten pharmakologisch untersucht, die Modifikationen in Position 2 und/oder 5' aufwiesen. Als Leitstruktur diente 2-Thioadenosin, das in Position 2 mit großen, über einen Linker verknüpften Substituenten modifiziert wurde. Dabei wurden nicht nur Derivate mit Modifikationen des großen Restes untersucht, sondern auch solche mit Variationen im Linker. Eine Unterserie orientierte sich dabei an der zur Zeit sich in klinischen Studien befindlichen Verbindung Binodenoson, welche als Diagnostikum bei koronaren Herzerkrankungen Einsatz finden soll. Das Hauptpotential von potenten und selektiven A_{2A}-Adenosinrezeptor Agonisten liegt begründet in ihren antiinflammatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften. Weitere mögliche Anwendungsgebiete potenter A_{2A}-Agonisten liegen in der Behandlung von Psychosen und von Chorea Huntington. Die Anwendung ist allerdings wegen hypotensiver Effekte bedingt durch die Aktivierung von A_{2A}-Rezeptoren im Herzen und der Blutgefäße eingeschränkt. Daher wurde in unserem Arbeitskreis mit Verbindung **75 (PSB-0777)** eine hochpolare, nicht-absorbierbare Substanz entwickelt, die lokale, antiinflammatorische Eigenschaften besitzt und beispielsweise bei der Behandlung von chronisch entzündlichen Darmkrankheiten wie Morbus Crohn, Colitis ulcerosa oder dem Reizdarmsyndrom unter Vermeidung systemischer Effekte Einsatz finden könnte. Weiterführende *ex-vivo*-Studien mit dieser Verbindung zeigten in entzündeten Ratten Ileum/Jejunumpräparaten diesbezüglich vielversprechende Ergebnisse.³

Es konnten außerdem mehrere Derivate mit K_i-Werten im ein- bis zweistelligen nanomolaren Bereich am A₁-, A_{2A}- und A₃-Rezeptor identifiziert werden. Die potentesten Verbindungen sind in Abb. 108 dargestellt. Dabei fielen insbesondere die Derivate **116** und **132** auf, die beide eine zyklische Struktur aufweisen, die über einen Hydrazonlinker mit dem AdenosinGrundgerüst verbunden wurde. Beide Verbindungen sind hochaffin und selektiv für den A_{2A}-Rezeptor gegenüber den anderen Subtypen (6,78 nM bzw. 12 nM). Besonders bemerkenswert war dabei Verbindung **116**, die sich lediglich um eine Methylgruppe am N^{1''} des Hydrazonlinkers von Binodenoson unterscheidet. Durch die Einführung dieser Methylgruppe konnte sowohl ein Affinitätsgewinn (6,78 nM) am A_{2A}-Rezeptor, als auch ein enormer Selektivitätsgewinn verglichen mit Binodenoson verzeichnet werden. Die Untersuchung der Speziesunterschiede zwischen dem humanen

und Rattenrezeptoren zeigte, dass Verbindung **116** ausschließlich hochaffin für den Ratten- A_{2A} -Rezeptor ist. Die Verbindung liefert damit wichtige Hinweise auf die Bindungstasche des humanen A_{2A} -Rezeptors, die sich in diesem Bereich anscheinend stark von dem im Rattenrezeptor unterscheidet. Die Identifizierung solcher kritischer Bereiche innerhalb der Bindungstasche gibt wichtige Impulse für die Entwicklung neuer A_{2A} -Rezeptor-Agonisten, die dann auch eine hohe Potenz zum humanen Rezeptor zeigen.

Mit Verbindung **147** wurde erstmals ein mit einem weiteren Zuckermolekül verknüpftes Nucleosid-Derivat identifiziert, das als selektiver A_{2A} -Rezeptor Ligand und mit einem K_i -Wert im mittleren nanomolaren Bereich bindet. In funktionellen Assays konnte gezeigt werden, dass diese Verbindung ein Vollagonist am humanen A_{2A} -Adenosinrezeptor ist.

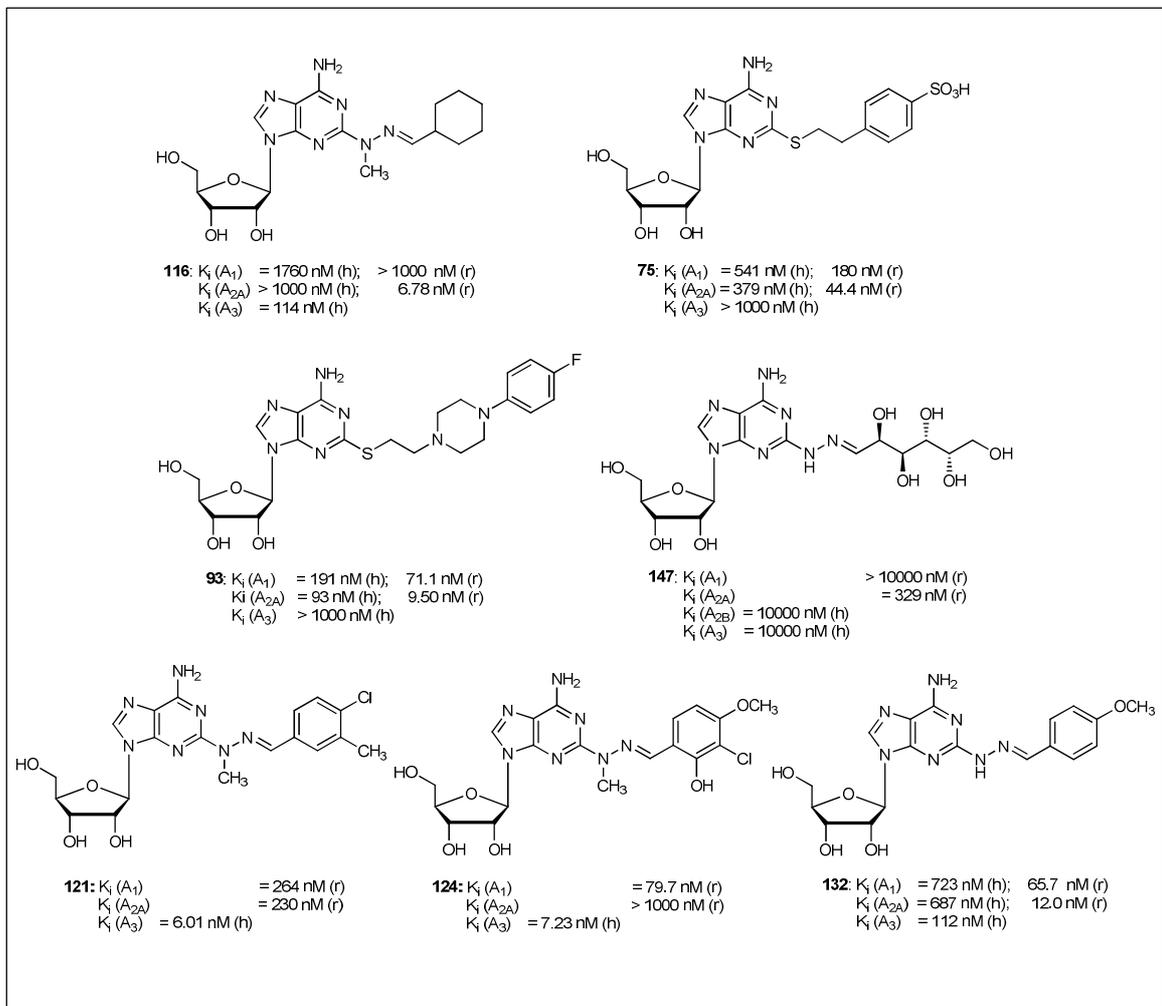


Abb. 108 Potenteste Verbindungen der Serie am A_{2A} - und A_3 -Adenosinrezeptorligand.

Desweiteren wurden mit den Verbindungen **121** und **124** zwei A_3 -Adenosinrezeptorligand-Agonisten identifiziert, die hochpotent und selektiv gegenüber A_1 -, A_{2A} - und A_{2B} -Adenosinrezeptoren waren (K_i -Werte: 6,01 nM bzw. 7,23 nM). Die Verbindungen könnten als Leitstrukturen für die Entwicklung neuer selektiver agonistischer Radioliganden dienen, die den unselektiven Radioliganden NECA ersetzen könnten.

In einem weiteren Projekt wurden Derivate, die auf den Grundstrukturen der *1H*-Purin-6,8-dion und *8H*-Purin-8-on beruhen, in Radioligandbindungsstudien hinsichtlich ihrer Affinität zu A_{2B} - und A_3 -Adenosinrezeptoren untersucht. Die Verbindungen wurden in unserem Arbeitskreis von Dr. Wolfram Frobenius und Dr. Alexander Bauer synthetisiert. Die Testung an Ratten- A_1 - und A_{2A} -Rezeptoren erfolgte bereits zu einem früheren Zeitpunkt. Die potentesten Verbindungen wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich an CHO-Membranpräparationen, die den humanen A_1 - oder A_{2A} -Rezeptor bzw. den Ratten A_{2B} - oder A_3 -Rezeptor stabil exprimieren, untersucht, um Informationen über eventuelle Speziesunterschiede zwischen Ratten- humanen Adenosinrezeptoren zu erhalten.

Es konnten mehrere Verbindungen mit K_i -Werten im mittleren bis unteren nanomolaren Bereich sowohl am A_1 - und A_{2A} - als auch am A_{2B} -Rezeptor identifiziert werden. Für den A_3 -Radioligandrezeptor wurden mehrere hochpotente Substanzen gefunden. Die hinsichtlich ihrer Affinität und Selektivität besonders interessanten Verbindungen sind in Abb. 109 dargestellt.

Die Verbindungen **174** und **176** wurden als hochaffine Antagonisten am humanen A_3 -Rezeptor identifiziert. Zum Ratten A_3 -Rezeptor bestand keinerlei Affinität. Es wurden K_i -Werte im niedrigen nanomolaren Bereich bei gleichzeitig hoher Selektivität gegenüber den anderen Adenosinrezeptorsubtypen bestimmt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit **168** ein hochpotenter und gegenüber den anderen Subtypen selektiver Antagonist am humanen A_3 -Rezeptor identifiziert, der mit einem K_i -Wert von 0,936 nM im subnanomolaren Bereich bindet. Aufgrund der exzellenten Affinität und Selektivität könnte Verbindung **168** als pharmakologisches Tool bei Untersuchungen an nativen Geweben genutzt werden.

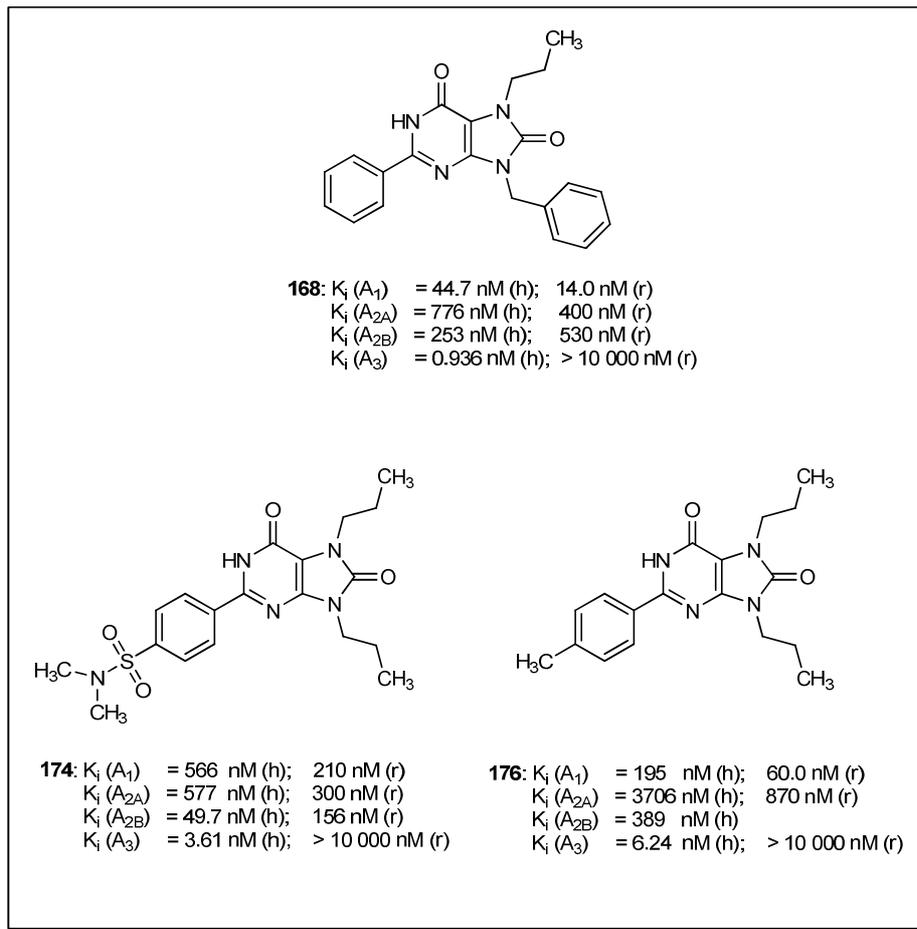


Abb. 109 Hochpotente und selektive A_3 -Adenosinrezeptor Antagonisten.

Obwohl in den letzten Jahren einige potente und selektive A_3 -Antagonisten entwickelt wurden, befindet sich derzeit keine dieser Substanzen in der klinischen Entwicklung. Dabei könnte ein hochpotenter und selektiver A_3 -Antagonist für die Behandlung von Schlaganfällen, Glaukom, entzündlichen Erkrankungen und bei Krebs vielversprechend sein. Mit der Identifizierung von Verbindung **168** als hochaffiner Antagonist am A_3 -Rezeptor mit hervorragender Selektivität ist im Rahmen dieser Arbeit ein vielversprechender Kandidat gefunden worden, der in weiterführenden Studien hinsichtlich der Eignung für klinische Studien untersucht werden muss.

11 EXPERIMENTELLER TEIL

11.1 Chemikalien und Geräte bei der Synthese von fluoreszierenden Purinrezeptorliganden

Allgemeine Angaben

Für die Darstellung und Charakterisierung der beschriebenen Verbindungen sowie für die Testung der Verbindungen wurden die nachfolgenden aufgeführten Chemikalien und Geräte verwendet.

Chemikalien

Die für die Synthesen und Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Arcros Organics (über VWR, Siegburg), Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma-Aldrich (Steinheim), Merck (Filsim) und Novabiochem (Läufelfingen, Schweiz) bezogen und, falls nicht anders angegeben, ohne weitere Aufreinigung verwendet. Davon abweichende Hersteller für die Testung sind im Text unter 10.4 angegeben.

Lösungsmittel

Dichlormethan wurde für Synthese und Säulenchromatographie über Calciumhydrid destilliert. Alle weiteren Lösungsmittel wurden in der vom Hersteller gelieferten Qualität verwendet.

Allgemeine Arbeitsmethoden

Luft- bzw. feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurden unter Stickstoff und in trockenen Reaktionsgefäßen durchgeführt. Dazu wurde eine Schutzgasanlage verwendet. Diese bestand aus einer Hochvakuumpumpe und einem Schutzgasanschluss (Stickstoff). Die Glasapparaturen wurden vor Verwendung mehrmals ausgeheizt und mit Stickstoff

geflutet. Die absolutierten Lösungsmittel und flüssigen Substanzen wurden über Spritzen zugegeben.

Sofern die unten aufgeführten Verbindungen nach einer bekannten Vorschrift aus der Literatur hergestellt wurden, sind sie durch Literaturstelle im Titel gekennzeichnet. Wurden die Verbindungen auf einem anderem Weg dargestellt erfolgt die Kennung lediglich beim Schmelzpunkt. Die mit einem “*” gekennzeichneten NMR-Spektren sind in der Literatur beschrieben.

Dünnschichtchromatographie

Die Reaktionskontrollen wurden mit Hilfe Kieselgel-beschichteter Aluminiumplatten 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt) bzw. mittels RP-Kieselgel-beschichteter Aluminiumplatten RP-18 F_{254s} (Merck, Darmstadt) durchgeführt. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht der Wellenlängen 254 nm und 366 nm.

Säulenchromatographie

Die säulenchromatographische Aufreinigung wurde als Flash-Chromatographie mit einem System der Firma Büchi (Essen), bestehend aus Pumpe C-601, Pumpensteuergerät C-610 und Fraktionssammelgerät C-660 auf Kieselgel 60 mit einer Korngröße von 0,040 mm bis 0,063 mm (Merck, Darmstadt) durchgeführt.

Präparative HPLC

Die Aufreinigung der Endprodukte wurde mittels HPLC durchgeführt. Dafür wurden folgende Geräte verwendet: Pumpe Wellchrome K-1800 (Knauer, GmbH, Berlin), Probenschleife mit 7 mL Fassungsvermögen (Knauer GmbH, Berlin), Spektrophotometer Wellchrome K-2600 (Knauer, GmbH, Berlin), Fraktionssammelventil (Knauer GmbH, Berlin), Eurospher 100-Vorsäule (Abmessungen 30 x 20 mm innerer Durchmesser, gefüllt mit RP-Kieselgel C-18, Korngröße 10 µm (Knauer, GmbH, Berlin)) und Eurospher 100-Trennsäule (Abmessungen 250 x 20 mm innerer Durchmesser, gefüllt mit RP-Kieselgel C-18, Korngröße 10 µm (Knauer, GmbH, Berlin)). Als mobile Phase wurde ein Gradient aus Methanol (HPLC-Grade, Merck, Darmstadt) und deionisiertem Wasser, in einigen Fällen

unter Zusatz von je 0,5 % Triethylamin (99% pur., Grüssing GmbH, Filsum) verwendet. Die Flussrate betrug 20 mL/min.

Mikrowelle

Mikrowellenreaktionen wurden in der Mikrowelle Discover der Firma CEM GmbH (Kamp-Lintfort) mit der fokussiertenTM Mikrowellen-Synthese durchgeführt.

Hydrierapparatur

Katalytische Hydrierungen wurden mit dem Wasserstoffgenerator Hogen[®] GC Hydrogen Generator der Firma Proton Energy Systems (Wallingford, USA) durchgeführt.

Gefriertrocknung

Die schonende Isolierung von Produkten aus wässrigen Lösungsmitteln wurde mit der Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 LSC (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, GmbH, Osterode) durchgeführt.

Schmelzpunktbestimmung

Schmelzpunkte wurden mit Hilfe eines Büchi-B-545 Schmelzpunktmessgerätes aufgenommen und sind unkorrigiert.

NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden mit einem Bruker Avance 500 Spektrometer (¹H: 500 MHz, ¹³C: 125 MHz) aufgenommen. Die verwendeten Lösungsmittel DMSO-d₆, D₂O, CD₃OD und CDCl₃ dienten als interner Standard: ¹H: δ [ppm] DMSO-d₆: 2.49; D₂O: 4.65; CD₃OD: 3.35; CDCl₃: 7.24. ¹³C: δ [ppm] DMSO-d₆: 37.7; D₂O: TMS wurde als interner Standard verwendet; CD₃OD: 49.3; CDCl₃: 77.0. Die chemischen Verschiebungen (δ) sind in ppm und Kopplungskonstanten *J* werden in Hz angegeben. Die Multiplizitäten der ¹H-NMR Signale werden folgendermaßen abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett,

ddd = Dublett von Doppeldoublets, t = Triplett, q = Quartett, qi = Quintett, m = Multiplett, br = breites Singulett. Die Ergebnisse der Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer (DEPT) - Messungen sind in die Auswertung mit eingeflossen. Wenn nicht anders angegeben, wurden die NMR-Spektren bei Raumtemperatur aufgenommen.

HPLC-MS

Die Reinheit und Identität aller Endprodukte und einiger Vorstufen sowie die Stabilitätsuntersuchungen wurden mittels eines an ein API 2000 Massenspektrometer (Elektronensprayionisation, Applied Biosystems, Darmstadt) gekoppelten HPLC-Systems (Agilent 1100) bestimmt. Es wurden 0,5 mg der zu prüfenden Substanz in einem mL Methanol gelöst. Von dieser Lösung wurden 10 μ L in das HPLC-System mit einer Phenomenex Luna C-18-Säule (Korngröße 3 μ m, Abmessungen 50 x 2 mm innerer Durchmesser) injiziert. Der Analyt wurde mit einem Gradienten aus wässriger 2 mM Ammoniumacetat-Lösung und Methanol von 9:1 (v/v) nach 0:10 (v/v) über 15 min bei einer Flussrate von 250 μ L/min eluiert. Die Detektion erfolgte durch die Messung der UV-Absorption, wenn nicht anders angegeben ist, bei einer Wellenlänge von 254 nm.

HR-MS

In Fällen, in denen eine Elementaranalyse nicht möglich war (BODIPY-Fluorophore) wurde ein hochaufgelöstes Massenspektrogramm aufgenommen. Dazu wurde ein Kratos 50 MS (Elektronensprayionisation), welches sich in der Zentralanalytik des chemischen Institutes der Universität Bonn befindet, verwendet.

11.2 CHEMIKALIEN UND GERÄTE BEI DER TESTUNG VON PURINREZEPTORLIGANDEN

11.2.1 GERÄTE UND MATERIALIEN

Analysenwaage	Sartorius CP225D
Autoklaven	Varioklav® Dampfsterilisator, H + P Systec 3850 ELV
Brutschränke	Heraeus, HERAccl® 240 Jouan IG 650
Glasfaserfilter (24er und 48er Harvester)	Whatman®, GF/B, Schleicher und SchüllGF52 (GF/C), Schleicher und Schüll
Glasfaserfilter (96er Harvester)	Uni-Filter®-96, GF/B und GF/C, Perkin Elmer
Harvester	Brandel M24, Gaithersburg, MD, USA Brandel M48, Gaithersburg, MD, USA Brandel 96, Gaithersburg, MD, USA
Heizblock	Thermomixer comfort, Eppendorf
Homogenisator	RW 16 basic, IKA Labortechnik
Laminar-Airflow-Werkbank	NUNC® Safe flow 1.2 NUNC® BIOFLOW
Liquid Scintillation Counter	TRICARB 2900TR, Canberra Packard Topcount®NXT, Packard Instrument Company
LSC-Cocktails	UltimaGold®, Canberra Packard Ready Safe™, Beckman Coulter Microscint-20, Perkin Elmer
Maxi vials	Roth
Mikroskop	Axiovert 25, Zeiss Wllovert30, Wetzlar Axiovert 100, Zeiss
Mikrotiterplatten	Microtest Plate 96, Sarstedt
Assay Block	0,5 ml Costar® Corning Inc.
Mini vials C	Roth
Multipette	Eppendorf Multipette® Plus

pH-Meter	WTW pH Elektrode SenTix 41 WTW pH 197
PE-vials	Polyethylen-Vials, 4 ml und 5 ml, Roth
Pipetten	Eppendorf Research, 2-20 µl Eppendorf Research, 20-200 µl Mettler Toledo Volumate, 100-1000 µl
Pipettenspitzen	Sarstedt
Rührer mit Heizplatte	IKA Labortechnik RCT basic
Safe-Lock Reaktionsgefäße	Eppendorf
Schüttelwasserbad	GFL® 1083
Software	GraphPad Prism®, Version 4.0 CS Chemdraw Ultra, Ultra Version 11.0 Origin 7.0
Trockenschrank	Heraeus T 6120
Ultraschallbad	Bandelin SONOREX RK 52H Bandelin SONOREX RK 110H
Ultraturrax	IKA Labortechnik T25 basic
Ultrazentrifuge (+ Zubehör)	Beckman Coulter SW 55 Ti (Rotor) Beckman Ultra-Clear™ Centrifuge Tubes (13 x 51, 5 ml)
UV/Vis Spectrophotometer	Beckman® DU 530
Vortexer	IKA Labortechnik MS1, Minishaker
Waage	Scaltec SBC 42
Zentrifugen (+ Zubehör)	Beckman Avanti, J-20I Beckman, JA-20 (Rotor) Beckman Centrifuge Tubes (29 x 104 mm, 50 ml)

11.2.2 SUBSTANZEN UND REAGENZIEN

11.2.2.1. KOMMERZIELL ERHÄLTICHE CHEMIKALIEN

ADA	Calbiochem, 116880
2-Propanol p.a.	Merck, 1.00994.0500
2-Propanol tech.	ZVE Universität Bonn
BSA, Albumin Fraktion V	Roth, 8076.2
CADO	Fluka BioChemika, 22997; Sigma, C-5134
cAMP	Sigma, C-164
CGS21680	Sigma, C-141; Tocris, 1063
DMSO	Riedel-de Haën, 70040
DPCPX	Sigma, C-101
EDTA	Sigma, E-5134
Ethanol p.a.	Merck, 1.00983.1000
Ethanol techn.	ZVE Universität Bonn
Forskolin	Fluka BioChemika, 33698
HCl 37%	Applichem, A-0659
hA _{2A} Membranpräparation	Perkin-Elmer
KCl	Applichem, 2939,025
MgCl ₂	Fluka BioChemika, 63068
NaCl	KMF Optichem, 123762
NaOH-	Rotuli Fluka BioChemika, 71689
NECA	Sigma, E-2387
Polyethylenimin-Lösung (50 %)	Sigma, P-3143
Rho20-1724	Sigma, B-8279
R-PIA	Sigma, P-4532
Tris	Roth, AE15.3

11.2.2.2 NICHT-KOMMERZIELL ERHÄLTICHE CHEMIKALIEN

AB-Substanzen	Verbindungen hergestellt von Dr. Alexander Bauer, Arbeitskreis Frau Prof. Dr. Christa E. Müller, Bonn
Ali-Substanzen	Verbindungen hergestellt von Dr. Ali El-Tayeb, Arbeitskreis Frau Prof. Dr. Christa E. Müller, Bonn
FH-Substanzen	Verbindungen hergestellt von Dr. Fabian Heisig, Arbeitskreis Frau Prof. Dr. Christa E. Müller, Bonn
WF-Substanzen	Verbindungen hergestellt von Dr. Wolfram Frobenius, Arbeitskreis Frau Prof. Dr. Christa E. Müller, Bonn

11.2.3. RADIOLIGANDEN

Radioligand	Spezifische Aktivität	Hersteller
[³ H]CCPA	48,6 Ci/mmol (1,80 TBq/mmol)	PerkinElmer Life Sciences, USA
[³ H]cAMP	42,6 Ci/mmol (1,58 TBq/mmol)	PerkinElmer Life Sciences, USA
[³ H]CGS21680	45 Ci/mmol (1,67 TBq/mmol) 47 Ci/mmol (1,74 TBq/mmol) 40,5 Ci/mmol (1,50 TBq/mmol)	PerkinElmer Life Sciences, USA
[³ H]PSB-11*	53 Ci/mmol (1,96 TBq/mmol)	Amersham Biosciences, UK
[³ H]PSB-603*	73 Ci/mmol (2,79 TBq/mmol)	GE Healthcare, UK
³ H]NECA	15,9 Ci/mmol (0,63 TBq/mmol)	Tocris, UK

* Die nicht radioaktiven Vorstufen dieser Radioliganden wurden im Arbeitskreis von Prof. Müller (Uni Bonn) synthetisiert.

Die Trititierung erfolgte extern durch die Firma Quotient BioResearch (Cambridgeshire, UK).

11.2.4. ZELLKULTURBEDARF UND NÄHRMEDIEN

DMEM-F12 Medium 1:1, w Glucose w L-Glutamin	Invitrogen, 31330095
Falcon Tubes	Sarstedt
Fötale Kalbsserum (FCS)	Sigma, F-0804
G418	Merck, 345810
Gewebekulturflaschen, steril	Sarstedt
hA ₁ -/hA ₃ -CHO-Zellen	AK Prof. Dr. Karl-Norbert Klotz, Pharmazeutisches Institut, Würzburg
hA _{2A} -/hA _{2B} - /rA _{2B} -/rA ₃ - CHO-Zellen	AK Prof. Dr. Christa E. Müller
Kryovials, steril	Sarstedt
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	Sigma, P0906 Invitrogen, 15140130
Serologische Einmalpipetten, steril	Sarstedt
Trypsin (2,5 %)	Lonza, 17-160

11.2.5. KULTIVIERTE ZELLINIEN

Zelllinie	Vektor/Expressions-System	Rezeptordichte [fmol/mg Protein]
hA ₁ -CHO-Zellen	pcDNA3-Vektor, stabil transfiziert, positive Klone selektiert mit Neomycin	1001 ± 418⁵⁶ bis 1069 ± 569⁵⁶
hA _{2A} -CHO-Zellen	pcDNA3-Vektor, stabil transfiziert, positive Klone selektiert mit Neomycin	247 ± 104⁵⁶
hA _{2B} -CHO-Zellen	pLXSN-Vektor, stabil transfiziert positive Klone selektiert mit G418 (Gentamycin)	502 ± 57²⁵¹
hA ₃ -CHO-Zellen	pcDNA3-Vektor, stabil transfiziert, positive Klone selektiert mit Neomycin	807 ± 613⁵⁶

11.3 Pufferlösungen

Inkubations- und Waschpuffer (A) (50 mM Tris-Puffer, pH 7,4)

Es werden 6,05 g Tris (50 mM) in 1,0 L deionisiertem Wasser gelöst und mit konzentrierter Salzsäure (37%ig) wird der pH-Wert auf 7.4 eingestellt. Der Puffer wird auf 4°C gekühlt.

Waschpuffer für [³H]PSB603-Bindungsstudien (B)

Es werden 6,05 g Tris (50 mM) in 1,0 L deionisiertem Wasser gelöst. Mittels konzentrierter Salzsäure wird der pH-Wert auf 7.4 eingestellt. Anschließend wird dem Waschpuffer 0,1% BSA hinzugefügt und der Puffer auf 4°C gekühlt.

Inkubationspuffer für Radioligand-Bindungsstudien an CHO-hA₃-Membranpräparationen (C)

Es werden 3,03 g Tris, 0,21 g Na₄EDTA und 0,48 g MgCl₂ in 500 mL deionisiertem Wasser gelöst und mit Hilfe von konzentrierter Salzsäure auf den pH-Wert 8,25 eingestellt.

PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline), pH 7,2

58,4 g NaCl (150 mM), 74,5 g KCl (2,5 mM), 178 g Na₂HPO₄ (7,5 mM) und 136,1 g KH₂PO₄ (1,5 mM) werden in 1,0 L deionisiertem Wasser gelöst und mittels konzentrierter Salzsäure (37%ig) auf den pH-Wert 7.4 eingestellt. Die Lösung wird anschließend autoklaviert.

Trypsin-EDTA-Lösung (steril)

500 ml PBS-Puffer und 0,6 ml EDTA-Lösung werden 20 min bei 120°C autoklaviert. Anschließend werden 10 ml Trypsin (2,5 %), steril und Phenolrot (0,5 %) unter sterilen Bedingungen hinzugefügt und die Lösung bei 4°C gelagert.

HBSS-Puffer (steril)

Es werden 8 g NaCl (13 mM), 4,77 g HEPES (20 mM), 1 g Glucose (5,5 mM), 0,1 g MgSO₄ (0,8 mM), 0,1 g MgCl₂ (1 mM), 0,185 g CaCl₂ (1,25 mM), 0,35 g (4,2 mM), 0,4 g KCl (5,4 mM), 0,06 g KH₂PO₄ (0,44 mM) und 0,048 Na₂HPO₄ (0,34 mM) in 1 L deionisiertem

und autoklaviertem Wasser gelöst und mittels Salzsäure (37%ig) auf den pH-Wert 7,3 eingestellt.

HBSS/ADA-Puffer

Es werden 22 mL HBSS-Puffer mit 9,9 μ L ADA (1U \equiv 1 μ L) versetzt und auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

HBSS/DMSO-Puffer

Es werden 9,5 mL HBSS-Puffer mit 500 μ L DMSO versetzt und auf 37°C erwärmt.

Lyse-Puffer (steril)

1,48 g EDTA (4 mM) und 100 μ L Triton (0,01%) werden in 1 L deionisiertem und autoklaviertem Wasser gelöst und mittels Salzsäure (37%ig) auf den pH-Wert 7,3 eingestellt.

11.4 Verwendete Nährmedien

Grundmedium zur Anzucht:

CHO-hA₁-, hA_{2A}-, hA_{2B}-, rA_{2B}-, rA₃- und hA₃-Zellen

DMEM F-12-Medium supplementiert mit

10 % fötalem Kälberserum

1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (10000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)

0,4 % G418 (50 mg/ml)

Medium für Dishes:

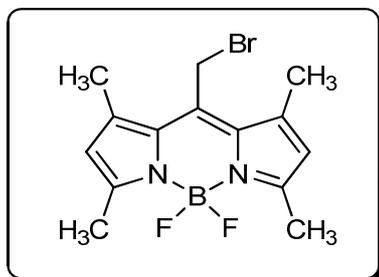
DMEM F-12-Medium supplementiert mit

10 % fötalem Kälberserum

1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (10000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)

11.5 Synthesen

8-Bromomethyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen²²⁷ (A) (3)



Unter Schutzgasatmosphäre werden 1,00 g Bromacetylbromid (5 mmol) in 50 mL trockenem Dichlormethan gelöst und unter Eiskühlung langsam mit 0,95 g 2,4-Dimethylpyrrol (10 mmol) versetzt. Es wird 150 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird bei Eiskühlung 2,80 mL Triethylamin (20 mmol) hinzugefügt und 30 min gerührt. Danach wird mit 2,50 mL Bortrifluoriddiethyletherat (10 mmol) versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 1 : 1 (v/v)). Das Produkt ergibt sich als violetter Feststoff.

Ausbeute: 680 mg (40 %)

8-Bromomethyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (B) (3)

Unter Schutzgasatmosphäre werden 1,00 g Bromacetylbromid (5 mmol) in 50 mL trockenem Dichlormethan gelöst und unter Eiskühlung langsam mit 0,95 g 2,4-Dimethylpyrrol (10 mmol) versetzt. Es wird 150 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird bei Eiskühlung mit 2,80 mL Triethylamin (20 mmol) versetzt und 30 min gerührt. Danach werden 2,54 g Jod (10 mmol) und 2,50 mL Bortrifluoriddiethyletherat (10 mmol) hinzugefügt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird dreimal mit einer 1 molaren Natriumthiosulfat-Lösung gewaschen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter verminderten

Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 1 : 1 (v/v)). Das Produkt ergibt sich als violetter Feststoff.

Ausbeute: 1,41 g (83 %)

8-Brommethyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (C) (3)

Es werden 1,00 g Bromacetyl bromid (5 mmol) in 50 mL trockenem Dichlormethan gelöst und unter Eiskühlung langsam mit 0,95 g 2,4-Dimethylpyrrol (10 mmol) versetzt. Es wird 150 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird bei Eiskühlung mit 2,80 mL Triethylamin (20 mmol) versetzt und 30 min gerührt. Danach werden 1,7 g 4-*tert*-Butylcatechol (10 mmol) und 2,50 mL Bortrifluorid-diethyletherat (10 mmol) hinzugefügt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 1 : 1 (v/v)). Das Produkt ergibt sich als violetter Feststoff.

$C_{14}H_{16}BBrF_2N_2$ (340,0558 $g \cdot mol^{-1}$)

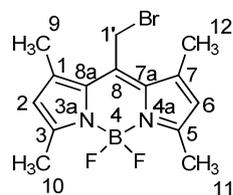
Ausbeute: 1,12 g (67 %)

Aussehen: violetter Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Petrolether, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser

Schmelzpunkt: 221 °C

R_f-Wert: 0,71 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 1 : 1 (v/v)).



1H -NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 2,51 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,52 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 4,65 (s, 2H, 1'-CH₂), 6,06 (s, 2H, 2-CH, 6-CH).

^{13}C -NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 14,7 (+, 2C, CH₃-10, CH₃-11), 15,9 (+, 2C, CH₃-9, CH₃-12), 24,5 (-, CH₂-1'), 122,3 (+, 2C, CH-2, CH-6), 131,0 (2C, C-7a, C-8a), 137,2 (C-8), 140,9 (2C, C-1, C-7), 156,5 (2C,

C-3, C-5).

MS (ESI) (m/z): $[M+H]^+ = 341,3$

$[M+Na]^+ = 363,1$

$[M+K]^+ = 381,3$

HR-MS (ESI): berechnet für $C_{14}H_{16}BBrF_2N_2Na$ $[M+Na]^+$: 363,0453

gefunden: 363,0451

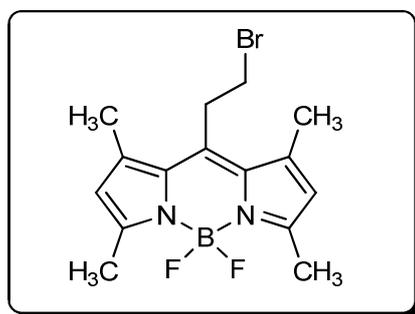
Spektroskopische Daten

Absorption: $\lambda_{max} = 515\text{nm}$

Emission: $\lambda_{max} = 526\text{ nm}$

Fluoreszenzquantenausbeute: $\Phi = 0,95$

8-(2-Bromomethyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen²²⁷ (4)



Unter Schutzgasatmosphäre werden 0,85 g 3-Brompropionylchlorid (5 mmol) in 50 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Unter Eiskühlung werden langsam 0,95 g 2,4-Dimethylpyrrol (10 mmol) zugegeben und es wird 150 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird bei Eiskühlung 2,8 mL Triethylamin (20 mmol) hinzugefügt und 30 min gerührt. Danach wird mit 2,5 mL Bortrifluorid-diethyletherat (10 mmol) versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 1 : 1 (v/v)). Das Produkt ergibt sich als roter Feststoff.

$C_{15}H_{18}BBrF_2N_2$ (354,0714 g·mol⁻¹)

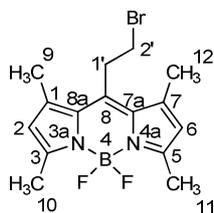
Ausbeute: 200 mg (12 %)

Aussehen: roter Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Petrolether, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser

Schmelzpunkt: 159 °C

R_f-Wert: 0,70 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 1 : 1 (v/v)).



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 2,42 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,50 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 3,45 (s, 4H, 1'-CH₂, 2'-CH₂), 6,07 (s, 2H, 2-CH, 6-CH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 14,9 (+, 2C, CH₃-10, CH₃-11), 16,5 (+, 2C, CH₃-9, CH₃-12), 30,1 (-, CH₂-2'), 31,9 (-, CH₂-1'), 122,6 (+, 2C, CH-2, CH-6), 131,8 (2C, C-7a, C-8a), 140,3 (C-8), 140,9 (2C, C-1, C-7), 155,6 (2C, C-3, C-5).

MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 355,3

[M+Na]⁺ = 377,1

HR-MS (ESI): berechnet für $C_{15}H_{18}BBrF_2N_2Na$ [M+Na]⁺: 377,0609

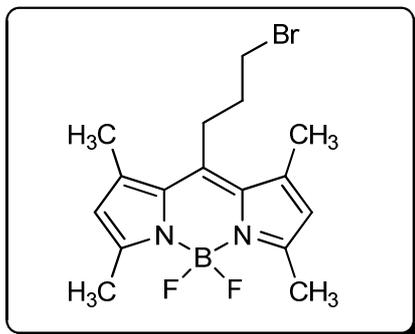
gefunden: 377,0605

Spektroskopische Daten

Absorption: λ_{\max} = 504nm

Emission: λ_{\max} = 512 nm

Fluoreszenzquantenausbeute: Φ = 0,85

8-(3-Brompropyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen²²⁷ (5)

Unter Schutzgasatmosphäre werden 0,93 g 3-Brompropionylchlorid (5 mmol) in 50 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Unter Eiskühlung werden langsam 0,95 g 2,4-Dimethylpyrrol (10 mmol) zugegeben und es wird 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird bei Eiskühlung 2,8 mL Triethylamin (20 mmol) hinzugefügt und 30 min gerührt. Danach wird mit 2,5 mL Bortrifluorid-diethyletherat (10 mmol) versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 1 : 1 (v/v)). Das Produkt ergibt sich als roter Feststoff.

$C_{16}H_{20}BBrF_2N_2$ (368,0871 g·mol⁻¹)

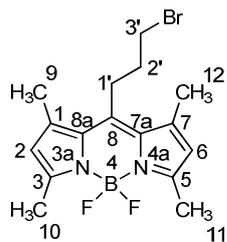
Ausbeute: 553 mg (30 %)

Aussehen: roter Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Petrolether, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser

Schmelzpunkt: 155 °C

R_f-Wert: 0,73 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 1 : 1 (v/v)).



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 2,15$ (m, 2H, 2'- CH_2), 2,43 (s, 6H, 9- CH_3 , 12- CH_3), 2,50 (s, 6H, 10- CH_3 , 11- CH_3), 3,11 (m, 2H, 1'- CH_2), 3,54 (t, 2H, 3'- CH_2), 6,04 (s, 2H, 2- CH , 6- CH). **$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz):** $\delta = 14,5$ (+, 2C, CH_3 -10, CH_3 -11), 16,7 (+, 2C, CH_3 -9, CH_3 -12), 27,2 (-, CH_2 -2'), 32,9 (-, CH_2 -1'), 34,0 (-, CH_2 -3'), 121,9 (+, 2C, CH -2, CH -6), 131,0 (2C, C-7a, C-8a), 140,3 (2C, C-1, C-7), 144,2 (C-8), 154,4 (2C, C-3, C-5).

MS (ESI) (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 369,4$

$[\text{M}+\text{Na}]^+ = 391,1$

$[\text{M}-\text{Br}]^+ = 289,2$

HR-MS (ESI): berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{BBrF}_2\text{N}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 391,0766

gefunden: 391,0764

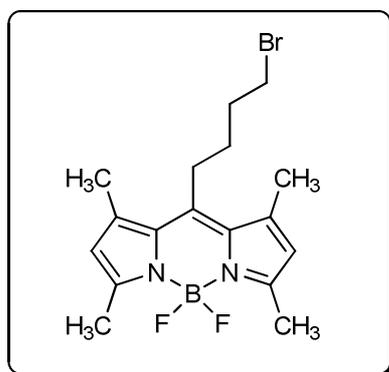
Spektroskopische Daten

Absorption: $\lambda_{\text{max}} = 499$ nm

Emission: $\lambda_{\text{max}} = 508$ nm

Fluoreszenzquantenausbeute: $\Phi = 0,95$

8-(4-Brombutyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen²²⁸ (6)



Unter Schutzgasatmosphäre werden 1,00 g 4-Bromvalerylchlorid, trockenem Toluol in einem Druckgefäß vorgelegt. Anschließend werden 0,95 g 2,4-Dimethylpyrrol (10 mmol), welches zuvor in 10 mL trockenem Toluol gelöst wurde, zugegeben. Die Reaktionslösung

wird 2,5 h bei 90°C und geschlossenem Gefäß gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der Lösung 2,8 mL Triethylamin (20 mmol) zugegeben und weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird mit 2,5 mL Bortrifluoriddiethyletherat (10 mmol) versetzt und 12h bei 80°C und geschlossenem Gefäß gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 2 : 1 (v/v)). Das Produkt ergibt sich als roter Feststoff.

$C_{17}H_{22}BBrF_2N_2$ (382,1027 g·mol⁻¹)

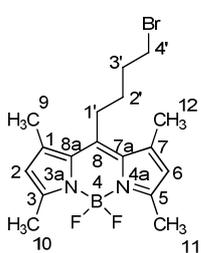
Ausbeute: 665 mg (35 %)

Aussehen: roter Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Petrolether, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser

Schmelzpunkt: 164 °C

R_f-Wert: 0,72 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 2 : 1 (v/v)).



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1,78 (m, 2H, 3'-CH₂), 2,04 (m, 2H, 2'-CH₂), 2,40 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,49 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 2,95 (m, 2H, 1'-CH₂), 3,43 (t, 2H, 4'-CH₂), 6,04 (s, 2H, 2-CH, 6-CH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 14,5 (+, 2C, CH₃-10, CH₃-11), 16,4 (+, 2C, CH₃-9, CH₃-12), 27,5 (-, CH₂-2'), 30,2 (-, CH₂-3'), 32,7 (-, CH₂-1'), 33,1 (-, CH₂-1'), 121,8 (+, 2C, CH-2, CH-6), 131,4 (2C, C-7a, C-8a), 140,2 (2C, C-1, C-7), 145, (C-8), 154,1 (2C, C-3, C-5).

MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 341,3

[M+Na]⁺ = 363,1

[M-Br]⁺ = 303,1

[M-F]⁺ = 363,1

HR-MS (ESI): berechnet für $C_{17}H_{22}BBrF_2N_2Na$ $[M+Na]^+$: 405,0923

gefunden: 405,0922

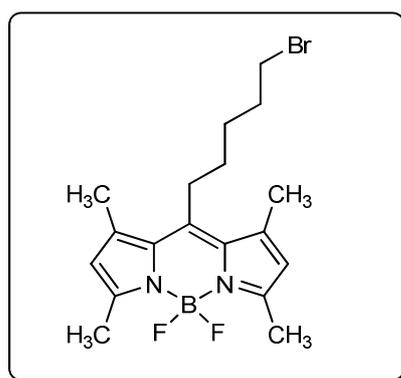
Spektroskopische Daten

Absorption: $\lambda_{\max} = 498 \text{ nm}$

Emission: $\lambda_{\max} = 506 \text{ nm}$

Fluoreszenzquantenausbeute: $\Phi = 0,94$

8-(5-Brompentyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen²²⁸ (7)

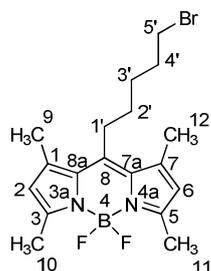


Unter Schutzgasatmosphäre werden 1,06 g 6-Bromhexansäurechlorid (5 mmol) in 50 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Unter Eiskühlung werden langsam 0,95 g 2,4-Dimethylpyrrol (10 mmol) zugegeben und es wird 210 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird bei Eiskühlung 2,8 mL Triethylamin (20 mmol) hinzugefügt und 30 min gerührt. Danach wird mit 2,5 mL Bortrifluoriddiethyletherat (10 mmol) versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 2 : 1 (v/v)). Das Produkt ergibt sich als roter Feststoff.

$C_{18}H_{24}BBrF_2N_2$ (396,1184 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Ausbeute: 650 mg (33 %)

Aussehen:	roter Feststoff
Löslichkeit:	leicht löslich in Dichlormethan, Petrolether, Methanol, Ethanol; schlecht löslich in Wasser
Schmelzpunkt:	131 °C
R_f-Wert:	0,81 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 2 : 1 (v/v)).



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1,61 (m, 4H, 3'-CH₂, 4'-CH₂), 1,91 (m, 2H, 2'-CH₂), 2,40 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,49 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 2,94 (m, 2H, 1'-CH₂), 3,41 (t, 2H, 5'-CH₂), 6,03 (s, 2H, 2-CH, 6-CH). **¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz):** δ = 14,4 (+, 2C, CH₃-10, CH₃-11), 16,3 (+, 2C, CH₃-9, CH₃-12), 28,1 (-, CH₂-1'), 28,5 (-, CH₂-3'), 30,9 (-, CH₂-4'), 32,2 (-, CH₂-2'), 33,5 (-, CH₂-5'), 121,6 (+, 2C, CH-2, CH-6), 131,4 (2C, C-7a, C-8a), 140,2 (2C, C-1, C-7), 145,3 (C-8), 153,9 (2C, C-3, C-5).

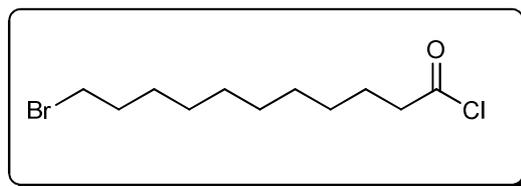
MS (ESI) (m/z):	[M+H] ⁺ = 397,1
	[M+Na] ⁺ = 419,1
	[M-F] ⁺ = 377,1
	[2M+Na] ⁺ = 815,2

HR-MS (ESI): berechnet für C₁₈H₂₄BBrF₂N₂Na [M+Na]⁺: 419,1079

gefunden: 419,1071

Spektroskopische Daten

Absorption:	λ_{\max} = 497 nm
Emission:	λ_{\max} = 506 nm
Fluoreszenzquantenausbeute:	Φ = 0,99

10-Bromundecansäurechlorid²⁵² (184)

Es werden 5,3 g Bromundecansäure (0,02 mol) mit 5,08 g Oxalylchlorid (0,04 mol) versetzt. Nach Abklingen der Reaktion wird der Reaktionsansatz 10 min bei 60 °C gerührt. Das entstandene Säurechlorid wird ohne weitere Aufreinigung umgesetzt.

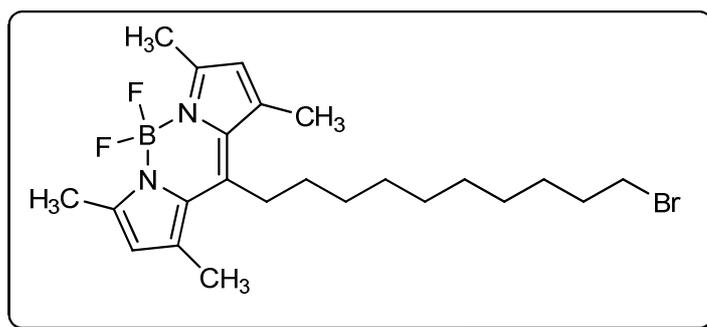
$C_{11}H_{20}BrClO$ (282,0386 g·mol⁻¹)

Ausbeute: 5,53 g (98 %)

Aussehen: gelbe Flüssigkeit

8-(10-Bromdecanyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen²²⁸

(8)



Unter Schutzgasatmosphäre werden 1,42 g 10-Brompundecansäurechlorid (5 mmol) in 50 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Unter Eiskühlung werden langsam 0,95 g 2,4-Dimethylpyrrol (10 mmol) zugegeben und es wird 210 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird bei Eiskühlung 2,8 mL Triethylamin (20 mmol) hinzugefügt und 30 min gerührt. Danach wird mit 2,5 mL Bortrifluorid-diethyletherat (10 mmol) versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter verminderten

Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 2 : 1 (v/v)). Das Produkt ergibt sich als roter Feststoff.

$C_{23}H_{34}BBrF_2N_2$ (466,1966 $g \cdot mol^{-1}$)

Ausbeute: 261 mg (11 %)

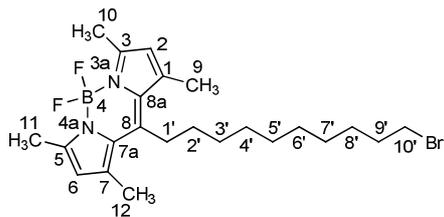
Aussehen: roter Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Petrolether, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser

Schmelzpunkt: 155 °C

R_f-Wert: 0,91 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 2: 1 (v/v)).

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1,31-1,47 (m, 12H, 3'-CH₂, 4'-CH₂, 5'-CH₂, 6'-CH₂, 7'-CH₂, 8'-CH₂), 1,60 (m, 2H, 9'-CH₂), 1,83 (m, 2H, 2'-CH₂), 2,39 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,49 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 2,90 (m, 2H, 1'-CH₂), 3,39 (t, 2H, 10'-CH₂), 6,02 (s, 2H, 2-CH, 6-CH).



¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 14,4 (+, 2C, CH₃-10, CH₃-11), 16,4 (+, 2C, CH₃-9, CH₃-12), 28.1-32.8 (-, 9C, CH₂-1', CH₂-2', CH₂-3', CH₂-4', CH₂-5', CH₂-6', CH₂-7', CH₂-8', CH₂-9'), 33,9 (-, CH₂-10'), 121,5 (+, 2C, CH-2, CH-6), 131,4 (2C, C-7a, C-8a), 140,3 (2C, C-1, C-7), 146,7 (C-8), 153,7 (2C, C-3, C-5).

MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 467,2

[M+Na]⁺ = 489,2

[M-F]⁺ = 449,2

[2M+Na]⁺ = 957,4

HR-MS (ESI): berechnet für $C_{23}H_{34}BBrF_2N_2Na$ [M+Na]⁺ : 489,1863

gefunden: 489,1856

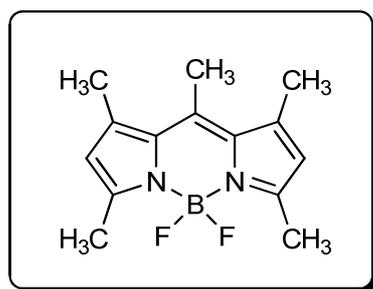
Spektroskopische Daten

Absorption: $\lambda_{\max} = 497 \text{ nm}$

Emission: $\lambda_{\max} = 504 \text{ nm}$

Fluoreszenzquantenausbeute: $\Phi = 0,77$

8-Methyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen²²⁷ (10)



Unter Schutzgasatmosphäre werden 1,00 g Bromacetyl bromid (5 mmol) in 50 mL trockenem Dichlormethan gelöst und unter Eiskühlung langsam mit 0,95 g 2,4-Dimethylpyrrol (10 mmol) versetzt. Es wird 150 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird bei Eiskühlung 2,80 mL Triethylamin (20 mmol) hinzugefügt und 30 min gerührt. Danach wird mit 2,50 mL Bortrifluorid-diethyletherat (10 mmol) versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 1 : 1 (v/v)). Das Produkt ergibt sich als roter Feststoff.

$\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{BF}_2\text{N}_2$ (262,1453 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

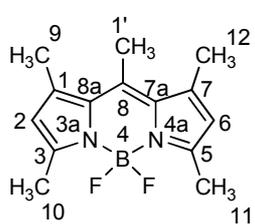
Ausbeute: 113 mg (10 %)

Aussehen: roter Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Petrolether, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser

Schmelzpunkt: 221 °C

R_f-Wert: 0,71 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 1 : 1 (v/v)).



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 2,40 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,52 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 2,56 (s, 3H, 1'-CH₃), 6,05 (s, 2H, 2-CH, 6-CH). **¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz):** δ = 14,7 (+, 2C, CH₃-10, CH₃-11), 15,9 (+, 2C, CH₃-9, CH₃-12), 24,5 (-, CH₂-1'), 122,3 (+, 2C, CH-2, CH-6), 131,0 (2C, C-7a, C-8a), 137,2 (C-8), 140,9 (2C, C-1, C-7), 156,5 (2C, C-3, C-5).

MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 263,2

HR-MS (ESI): berechnet für C₁₄H₁₇BF₂N₂Na [M+Na]⁺: 285,1348

gefunden: 285,1346

Spektroskopische Daten

Absorption: λ_{\max} = 504 nm

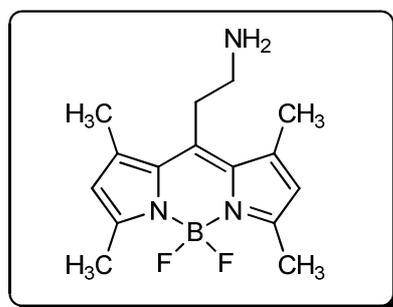
Emission: λ_{\max} = 512 nm

Fluoreszenzquantenausbeute: Φ = 0,93

Allgemeine Versuchsvorschrift für die Synthese der 8-Aminoalkyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen-Derivate²²⁸ (17-21, 44)

Es werden 0,4 mmol des entsprechenden 8-Bromalkyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen-Derivates bzw. 222 mg 8-(5-Brompentyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen-2,6-disulfonat (0,4 mmol) in 8 mL 7*N*-ammoniakalischem Methanol suspendiert. Die Reaktionen werden unter Mikrowellen-Bestrahlung (100 Watt) 20 min bei 100°C und 10 bar gerührt (ausgenommen Verbindung **15**: 100 Watt, 80°C, 10 bar 20 min). Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Reaktionsprodukt in Dichlormethan gelöst. Durch langsames Zutropfen von Petrolether (Siedepunkt zwischen 40 - 60°C). wird das Produkt ausgefällt und mit wenig Wasser und Petrolether. Abschließend wird das Produkt im Exsikkator getrocknet.

8-(2-Aminoethyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen²²⁸ (17)



$C_{15}H_{20}BF_2N_3$ (291,1718 $g \cdot mol^{-1}$)

Ausbeute: 31,4 mg (27 %)

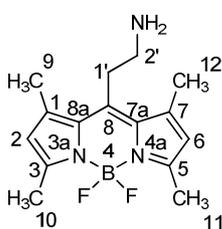
Aussehen: roter Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;

schlecht löslich in Wasser, Petrolether

Schmelzpunkt: 190 °C

R_f-Wert: 0,12 (Laufmittel: Dichlormethan : Methanol = 9 : 1 (v/v)).



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 2,39 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,41 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 2,95 (t, J = 7,5 Hz, 2H, 2'-C), 3,00 (t, 2H, 1'-CH₂), 6,07 (s, 2H, 2-CH, 6-CH). **¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz):** δ = 14,9 (+, 2C, CH₃-10, CH₃-11), 16,5 (+, 2C, CH₃-9, CH₃-12), 30,1 (-, CH₂-2'), 31,9 (-, CH₂-1'), 122,6 (+, 2C, CH-2, CH-6), 131,8 (2C, C-7a, C-8a), 140,3 (8-C), 140,9 (2C, 1-C, 7-C), 155,6 (2C, 3-C, 5-C).

MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 292,2

[M+Na]⁺ = 314,2

[M-F]⁺ = 272,2

HR-MS (EI): berechnet für C₁₅H₂₀BFN₃ [M-F]⁺: 272,1732

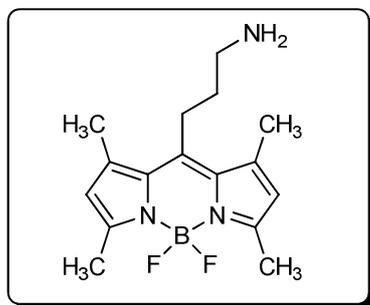
gefunden: 272,1732

Spektroskopische Daten

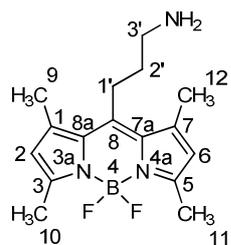
Absorption: λ_{max} = 504nm

Emission: λ_{max} = 509 nm

Fluoreszenzquantenausbeute: Φ = 0,68

8-(3-Brompropyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen²²⁸**(18)**C₁₆H₂₂BF₂N₃ (305,1875 g·mol⁻¹)**Ausbeute:** 87,8 mg (72 %)**Aussehen:** roter Feststoff**Löslichkeit:** leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;

schlecht löslich in Wasser, Petrolether

Schmelzpunkt: 195 °C**R_f-Wert:** 0,12 (Laufmittel: Dichlormethan : Methanol = 9 : 1 (v/v)).

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1,64 (m, 2H, 2'-CH₂), 2,39 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,43 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 2,74 (t, 2H, 3'-CH₂), 2,97 (m, 2H, 1'-CH₂), 6,22 (s, 2H, 2-CH, 6-CH). **¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz):** δ = 14,2 (+, 2C, CH₃-10, CH₃-11), 16,1 (+, 2C, CH₃-9, CH₃-12), 25,7 (-, CH₂-2'), 34,5 (-, CH₂-1'), 41,7 (-, CH₂-3'), 121,8 (+, 2C, CH-2, CH-6), 130,9 (2C, C-7a, C-8a), 141,0 (C-8), 147,2 (2C, C-1, C-7), 153,1 (2C, C-3, C-5).

MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 306,2[M+Na]⁺ = 328,2[M-F]⁺ = 286,2**HR-MS (EI):** berechnet für C₁₆H₁₈BBrFN₂Na [M-F]⁺: 286,1888

gefunden: 286,1888

Spektroskopische Daten

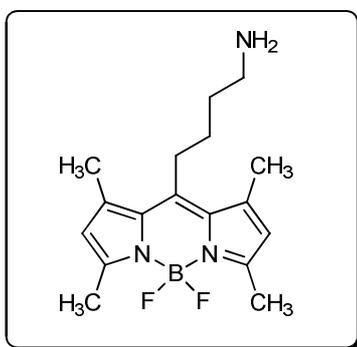
Absorption: $\lambda_{\max} = 497\text{nm}$

Emission: $\lambda_{\max} = 506\text{nm}$

Fluoreszenzquantenausbeute: $\Phi = 0,87$

8-(4-Aminobutyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen²²⁸

(19)



$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{BF}_2\text{N}_3$ (319,2031 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

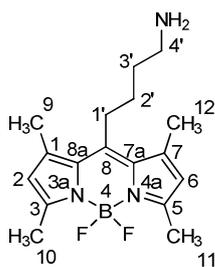
Ausbeute: 71,5 mg (56 %)

Aussehen: roter Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser, Petrolether

Schmelzpunkt: 190 °C

R_f-Wert: 0,11 (Laufmittel: Dichlormethan : Methanol = 9 : 1 (v/v)).



¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): $\delta = 1,63$ (m, 2H, 3'-CH₂), 1,74 (m, 2H, 2'-CH₂), 2,40 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,43 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 2,87 (m, 2H, 4'-CH₂), 2,96 (m, 2H, 1'-CH₂), 6,25 (s, 2H, 2-CH, 6-CH), 7,75 (br, 2 H, NH₂). **¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz):** $\delta = 13,9$ (+, 2C, CH₃-10, CH₃-11), 15,8 (+, 2C, CH₃-9, CH₃-12), 27,2 (-, CH₂-2'), 28,2 (-, CH₂-3'), 38,5 (-, CH₂-1'), 40,0 (-, CH₂-4'), 121,6 (+, 2C, CH-2, CH-6), 130,6 (2C, C-7a, C-8a), 140,8 (C-8), 146,0 (2C, C-1, C-7), 15,1 (2C, C-3, C-5).

MS (ESI) (m/z): $[M+H]^+ = 320,2$

$[M+Na]^+ = 342,2$

$[M-F]^+ = 300,2$

HR-MS (EI): berechnet für $C_{17}H_{24}BFN_3$ $[M-F]^+$: 300,2045

gefunden: 300,2047

Spektroskopische Daten

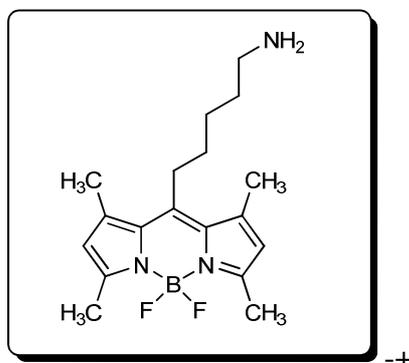
Absorption: $\lambda_{max} = 497\text{nm}$

Emission: $\lambda_{max} = 506\text{ nm}$

Fluoreszenzquantenausbeute: $\Phi = 0,93$

8-(5-Aminopentyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen²²⁸

(20)



$C_{18}H_{24}BF_2N_2$ (333,2188 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Ausbeute: 121 mg (91 %)

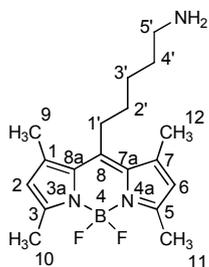
Aussehen: roter Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;

schlecht löslich in Wasser, Petrolether

Schmelzpunkt: 212 °C

R_f-Wert: 0,13 (Laufmittel: Dichlormethan : Methanol = 9 : 1 (v/v)).



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1,64-1,69 (m, 6H, 2'-CH₂, 3'-CH₂, 4'-CH₂), 1,95-1,97 (m, 2H, 1'-CH₂), 2,38 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,49 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 2,95 (m, 2H, 5'-CH₂), 6,03 (s, 2H, 2-CH, 6-CH), 8,09 (br, 2H, NH₂). **¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz):** δ = 14,4 (+, 2C, CH₃-10, CH₃-11), 16,6 (+, 2C, CH₃-9, CH₃-12), 27,02 (-, CH₂-1'), 27,41 (-, CH₂-3'), 27,91 (-, CH₂-4'), 31,17 (-, CH₂-2'), 39,6 (-, CH₂-5'), 121,8 (+, 2C, CH-2, CH-6), 131,4 (2C, C-7a, C-8a), 140,1 (2C, C-1, C-7), 145,3 (C-8), 154,1 (2C, C-3, C-5).

MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 334,2

[M+Na]⁺ = 356,2

[M-F]⁺ = 314,2

HR-MS (EI): berechnet für C₁₈H₂₄BBrFN₂Na [M-F]⁺: 314,2202

gefunden: 314,2194

Spektroskopische Daten

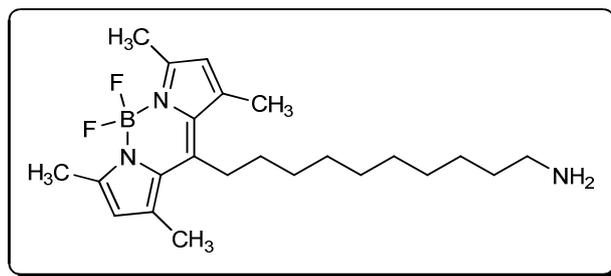
Absorption: λ_{\max} = 497nm

Emission: λ_{\max} = 506 nm

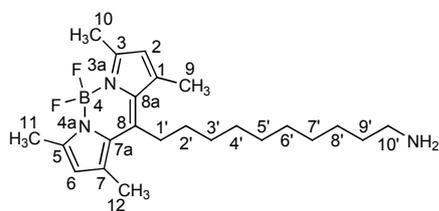
Fluoreszenzquantenausbeute: Φ = 0,92

8-(10-Aminodecanyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen²²⁸

(21)

C₂₃H₃₆BF₂N₃ (403,2970 g·mol⁻¹)**Ausbeute:** 212 mg (11 %)**Aussehen:** roter Feststoff**Löslichkeit:** leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;

schlecht löslich in Wasser, Petrolether

Schmelzpunkt: 155 °C**R_f-Wert:** 0,15 (Laufmittel: Dichlormethan : Methanol = 9 : 1 (v/v)).

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1,38-1,88 (m, 14H, 2'-CH₂, 3'-CH₂, 4'-CH₂, 5'-CH₂, 6'-CH₂, 7'-CH₂, 8'-CH₂, 9'-CH₂), 2,41 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,51 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 2,92 (t, J = 7,197 Hz, 2H, 1'-CH₂), 3,01 (m, 2H, 10'-CH₂), 6,04 (s, 2H, 2-CH, 6-CH), 8,06 (br, 2H, NH₂). **¹³C-NMR (CDCl₃, 125**

MHz): δ = 14,4 (+, 2C, CH₃-10, CH₃-11), 16,4 (+, 2C, CH₃-9, CH₃-12), 26,5-30,4 (-, 9C, CH₂-1', CH₂-2', CH₂-3', CH₂-4', CH₂-5', CH₂-6', CH₂-7', CH₂-8', CH₂-9'), 31,9 (-, 10'-CH₂), 121,6 (+, 2C, CH-2, CH-6), 131,4 (2C, C-7a, C-8a), 140,2 (2C, C-1, C-7), 146,6 (C-8), 153,7 (2C, C-3, C-5).

MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 404,3[M+Na]⁺ = 426,3[M-F]⁺ = 384,3**HR-MS (EI):** berechnet für C₂₃H₃₄BBrFN₂Na [M-F]⁺: 384,2985

gefunden: 384,2990

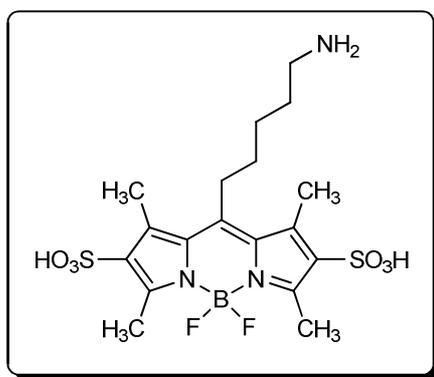
Spektroskopische Daten

Absorption: $\lambda_{\max} = 497\text{nm}$

Emission: $\lambda_{\max} = 504\text{ nm}$

Fluoreszenzquantenausbeute: $\Phi = 0,70$

8-(5-Aminopentyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen-2,6-disulfonat²²⁸ (44)



$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_2$ ($333,2188\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

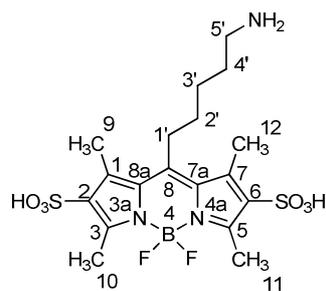
Ausbeute: 121 mg (91 %)

Aussehen: roter Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser, Petrolether

Schmelzpunkt: 212 °C

R_f-Wert: 0,13 (Laufmittel: Dichlormethan : Methanol = 9 : 1 (v/v)).



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1,40 (m, 2H, 3'-CH₂), 1,55 (m, 2H, 4'-CH₂), 2,04 (m, 2H, 1'-CH₂), 2,23 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,25 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 2,67 (m, 2H, 5'-CH₂), 6,03 (s, 2H, 2-CH, 6-CH), 8,09 (br, 2H, NH₂). **¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz):** δ = 14,4 (+, 2C, CH₃-10, CH₃-11), 16,6 (+, 2C, CH₃-9, CH₃-12), 27,02 (-, CH₂-1'), 27,41 (-, CH₂-3'), 27,91 (-, CH₂-4'), 31,17 (-, CH₂-2'), 39,6 (-, CH₂-5'), 121,8 (+2C, CH-2, CH-6), 131,4 (2C, C-7a, C-8a), 140,1 (2C, C-1, C-7), 145,3 (C-8), 154,1 (2C, C-3, C-5).

MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 493,3

Spektroskopische Daten

Absorption: λ_{\max} = 495 nm

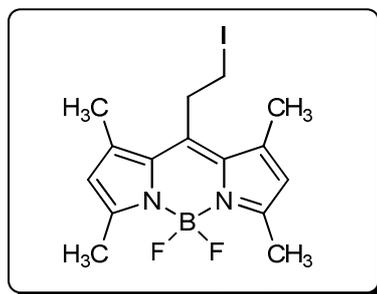
Emission: λ_{\max} = 545 nm

Fluoreszenzquantenausbeute: Φ = 0,62

Allgemeine Versuchsvorschrift für die Synthese der 8-Iodalkyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen-Derivate (22-26)

Es werden 0.4 mmol des entsprechenden 8-Bromalkyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen-Derivate in 12 mL Aceton gelöst und mit 600 mg (4 mmol) Natriumiodid versetzt. Es wird 36 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 1 : 1 (v/v)). Das Produkt wird als orange-roter Feststoff erhalten.

8-(2-Iodethyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (22)



$C_{15}H_{18}BF_2IN_2$ (402,0576 $g \cdot mol^{-1}$)

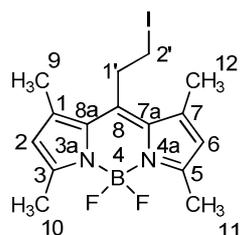
Ausbeute: 159 mg (98 %)

Aussehen: orange-roter Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Petrolether, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser

Schmelzpunkt: 169 °C

R_f-Wert: 0,75 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 1 : 1 (v/v)).



1H -NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 2,42 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,50 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 3,45 (m, 4H, 1'-CH₂, 2'-CH₂), 6,07 (s, 2H, 2-CH, 6-CH). **^{13}C -NMR (CDCl₃, 125 MHz):** δ = 14,9 (+, CH₃-10, CH₃-11), 16,5 (+, CH₃-9, CH₃-12), 30,1 (-, CH₂-2'), 31,9 (-, CH₂-1'), 122,6 (+, CH-2, CH-6), 131,8 (C-7a, C-8a), 140,3 (C-8), 140,9 (C-1, C-7), 155,6 (C-3, C-5).

MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 403,3

[M+Na]⁺ = 425,0

[M-F]⁺ = 383,0

HR-MS (ESI): berechnet für C₁₅H₁₈BF₂IN₂Na [M+Na]⁺: 425,0471

gefunden: 425,0472

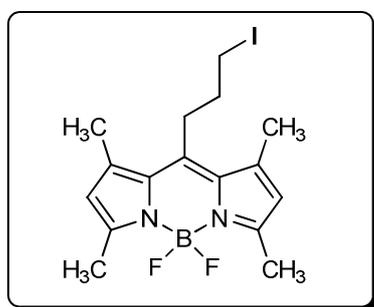
Spektroskopische Daten

Absorption: $\lambda_{\max} = 506 \text{ nm}$

Emission: $\lambda_{\max} = 514 \text{ nm}$

Fluoreszenzquantenausbeute: $\Phi = 0,98$

8-(3-Brompropyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (23)



$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{BF}_2\text{IN}_2$ (416,0732 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Ausbeute: 161 mg (97 %)

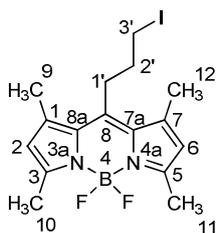
Aussehen: rot-oranger Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Petrolether, Methanol, Ethanol;

schlecht löslich in Wasser,

Schmelzpunkt: 157 °C

R_f-Wert: 0,78 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 1 : 1 (v/v)).



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 2,12$ (m, 2H, 1'- CH_2), 2,45 (s, 6H, 9- CH_3 , 12- CH_3), 2,52 (s, 6H, 10- CH_3 , 11- CH_3), 3,07 (t, 2H, 2'- CH_2), 2,97 (t, $J = 6,62$ 2H, 3'- CH_2), 6,22 (s, 2H, 2- CH , 6- CH). **$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz):** $\delta = 4,65$ (-, C-3'), 14,8 (+, CH_3 -10, CH_3 -11), 16,8 (+, CH_3 -9, CH_3 -12), 29,4 (-, CH_2 -2'), 34,5 (-, CH_2 -1'), 121,8 (+, CH -2, CH -6), 131,5 (C-7a, C-8a), 140,3 (C-7, C-1), 143,9 (C-8), 154,4 (C-3, C-5).

MS (ESI) (m/z): $[M+H]^+ = 417,0$

$[M+Na]^+ = 439,0$

$[M-F]^+ = 396,9$

HR-MS (EI): berechnet für $C_{16}H_{20}BF_2IN_2Na$ $[M+Na]^+$: 439,0627

gefunden: 439,0628

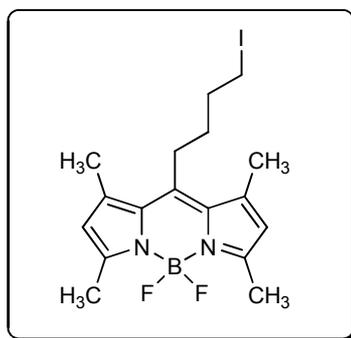
Spektroskopische Daten

Absorption: $\lambda_{max} = 499 \text{ nm}$

Emission: $\lambda_{max} = 508 \text{ nm}$

Fluoreszenzquantenausbeute: $\Phi = 0,95$

8-(4-Aminobutyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (24)



$C_{17}H_{22}BF_2IN_2$ ($319,2031 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Ausbeute: 126 mg (98 %)

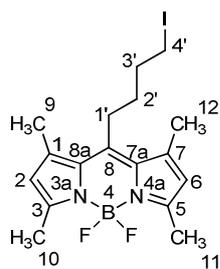
Aussehen: orange-roter Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Petrolether, Methanol, Ethanol;

schlecht löslich in Wasser

Schmelzpunkt: 144 °C

R_f-Wert: 0,72 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 1 : 1 (v/v)).



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1,76 (m, 2H, 2'-CH₂), 2,02 (m, 2H, 3'-CH₂), 2,42 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,52 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 2,98 (t, J = 8.5 Hz, 2H, 1'-CH₂), 3,22 (t, J = 6,9 Hz, 2H, 4'-CH₂), 6,06 (s, 2H, 2-CH, 6-CH). **¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz):** δ = 5,3 (-, C-4'), 14,5 (+, CH₃-10, CH₃-11), 16,5 (+, CH₃-9, CH₃-12), 27,4 (-, CH₂-2'), 35,6 (-, CH₂-3'), 33,9 (-, CH₂-1'), 121,8 (+, CH-2, CH-6), 131,4 (C-7a, C-8a), 140,2 (C-7, C-1), 145,2 (C-8), 154,1 (C-3, C-5).

MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 431,0

[M+Na]⁺ = 453,1

[M-F]⁺ = 411,1

HR-MS (EI): berechnet C₁₇H₂₂BF₂IN₂Na [M-F]⁺: 453,0784

gefunden: 453,0788

Spektroskopische Daten

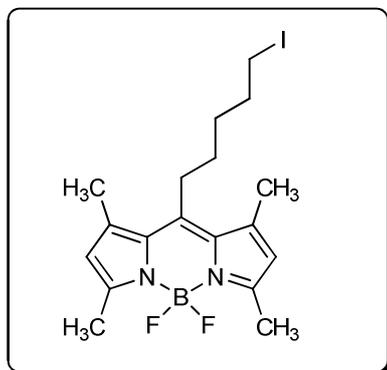
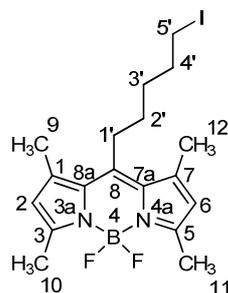
Absorption: λ_{\max} = 498 nm

Emission: λ_{\max} = 506 nm

Fluoreszenzquantenausbeute: Φ = 0,95

8-(5-Aminopentyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen²²⁸

(25)

C₁₈H₂₄BF₂IN₂ (444,1045 g·mol⁻¹)**Ausbeute:** 110 mg (99 %)**Aussehen:** orange-roter Feststoff**Löslichkeit:** leicht löslich in Dichlormethan, Petrolether, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser**Schmelzpunkt:** 144 °C**R_f-Wert:** 0,76 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 1 : 1 (v/v)).

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1,63 (m, 4H, 2'-CH₂, 3'-CH₂), 1,86 (quin, J = 6,9 Hz, 2H, 4'-CH₂), 2,40 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,49 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 2,94 (t, J = 7,9 Hz, 2H, 1'-CH₂), 3,19 (t, J = 6,6 Hz, 2H, 4'-CH₂), 6,04 (s, 2H, 2-CH, 6-CH). **¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz):** δ = 6,5 (-, C-5'), 14,4 (+, CH₃-10, CH₃-11), 16,4 (+, CH₃-9, CH₃-12), 28,2 (-, CH₂-2'), 30,7 (-, CH₂-1'), 30,9 (-, CH₂-3'), 32,8 (-, CH₂-4'), 121,7 (+, CH-2, CH-6), 131,4 (C-7a, C-8a), 140,2 (C-7, C-1), 145,9 (C-8), 153,9 (C-3, C-5).

MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 445,0[M+Na]⁺ = 467,0[M-F]⁺ = 425,0

HR-MS (EI): berechnet für $C_{18}H_{24}BF_2IN_2Na$ $[M+Na]^+$: 467,0941

gefunden: 467,0944

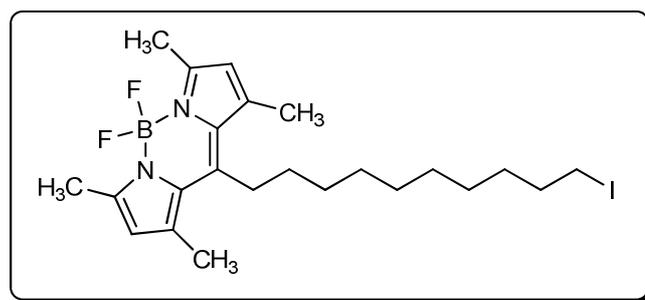
Spektroskopische Daten

Absorption: $\lambda_{\max} = 467\text{nm}$

Emission: $\lambda_{\max} = 506\text{ nm}$

Fluoreszenzquantenausbeute: $\Phi = 0,91$

8-(10-Aminodecanyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (26)



$C_{23}H_{34}BF_2IN_2$ ($514,1828\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

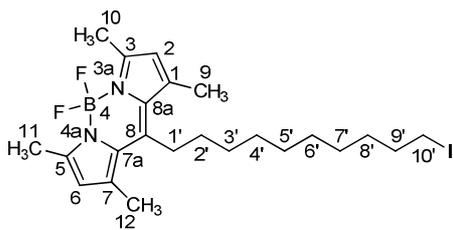
Ausbeute: 107 mg (97 %)

Aussehen: orange-roter Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Petrolether, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser

Schmelzpunkt: 104 °C

R_f-Wert: 0,74 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 1 : 1 (v/v)).



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 1,28-1,40 (m, 10H, 3'- CH_2 , 4'- CH_2 , 5'- CH_2 , 6'- CH_2 , 7'- CH_2 , 8'- CH_2), 1,86 (quin, J = 6,9 Hz, 2H, 4'- CH_2), 2,40 (s, 6H, 9- CH_3 , 12- CH_3), 2,49 (s, 6H, 10- CH_3 , 11- CH_3), 2,94 (t, J = 7,9 Hz, 2H, 1'- CH_2), 3,19 (t, J = 6,6 Hz, 2H, 4'- CH_2), 6,04 (s, 2H, 2- CH , 6- CH). **$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz):** δ = 7,25 (-, C-10'), 14,4 (+, CH_3 -10, CH_3 -11), 16,4 (+, CH_3 -9, CH_3 -12), 28,5-31,9 (-, CH_2 -1', CH_2 -2', CH_2 -3', CH_2 -4', CH_2 -5', CH_2 -6', CH_2 -7', CH_2 -8'), 30,7 (-, CH_2 -1'), 33,5 (-, CH_2 -9'), 121,5 (+, CH -2, CH -6), 131,4 (C-7a, C-8a), 140,3 (C-7, C-1), 146,6 (C-8), 153,7 (C-3, C-5).

MS (ESI) (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 515,3

$[\text{M}+\text{Na}]^+$ = 537,3

$[\text{M}-\text{F}]^+$ = 495,1

HR-MS (EI): berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{BF}_2\text{IN}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 537,1724

gefunden: 537,1727

Spektroskopische Daten

Absorption: λ_{max} = 497 nm

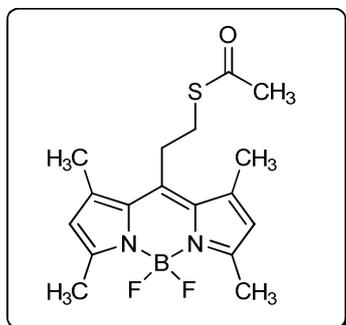
Emission: λ_{max} = 504 nm

Fluoreszenzquantenausbeute: Φ = 0,86

Allgemeine Versuchsvorschrift für die Synthese der 8-{{[S-(Alkyl)ester]ethanthioate}}-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen-Derivate²³⁵ (31-35)

Es werden 1,00 mmol des entsprechenden 8-Bromalkyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen-Derivate in 25 mL Aceton gelöst und mit 137 mg (1,20 mmol) Kaliumthioacetat versetzt. Es wird 3 h unter Reflux gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 2 : 1 (v/v)). Das Produkt wird als oranger Feststoff erhalten.

8-[[S-(2-Ethyl)ester]ethanthioate)]-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (31)



$C_{17}H_{21}BF_2N_2OS$ (350,1436 $g \cdot mol^{-1}$)

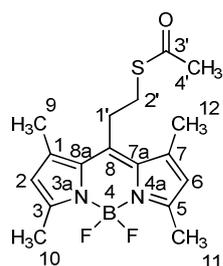
Ausbeute: 337 mg (96 %)

Aussehen: oranger Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser

Schmelzpunkt: 165 °C

R_f-Wert: 0,69 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 2 : 1 (v/v)).



1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ = 2,37 (s, 3H, 4'-COCH₃), 2,47 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,52 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 3,08 (m, 2H, 1'-CH₂), 3,25 (m, 2H, 2'-CH₂), 6,07 (s, 2H, 2-CH, 6-CH). **^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz):** δ = 14,5 (+, 10-CH₃, 11-CH₃), 16,4 (+, 9-CH₃, 12-CH₃), 28,3 (-, 1'-CH₂), 29,7 (-, 2'-CH₂), 122,0 (+, 2-CH, 6-CH), 131,4 (7a-C, 8a-C), 140,7 (8-C), 142,0 (1-C, 7-C), 154,8 (3-C, 5-C), 194,9 (3'-CO).

MS (ESI) (m/z): $[M+Na]^+$ = 373,1

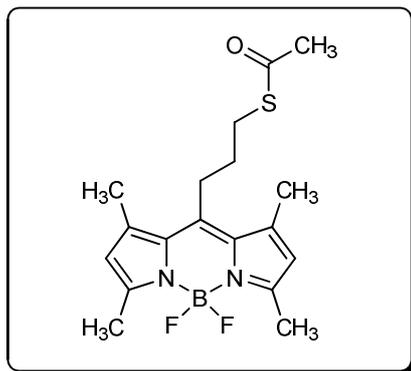
$[M-F]^+$ = 331,1

HR-MS (ESI): berechnet für $C_{17}H_{21}BF_2N_2OS$ $[M+Na]^+$: 373,1331

gefunden: 373,1332

Spektroskopische Daten:	Absorption	$\lambda_{\max} = 498 \text{ nm}$
	Emission	$\lambda_{\max} = 505 \text{ nm}$
Fluoreszenzquantenausbeute:	$\Phi = 0,81$	

8-[[S-(3-Propyl)ester]ethanthioate]-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (32)



$\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{BF}_2\text{N}_2\text{OS}$ (364,1592 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Ausbeute: 339 mg (93 %)

Aussehen: oranger Feststoff

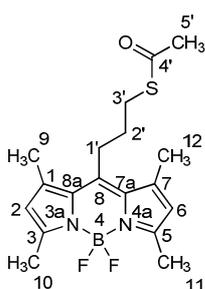
Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;

schlecht löslich in Wasser,

Schmelzpunkt: 155 °C

R_f -Wert: 0,69 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 2 : 1 (v/v)).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 1,89$ (m, 2H, 1'- CH_2), 2,35 (s, 3H, 5'- COCH_3), 2,45 (s, 6H, 9- CH_3 , 12- CH_3), 2,51 (s, 6H, 10- CH_3 , 11- CH_3), 3,02 (m, 4H, 2'- CH_2 , 3'- CH_2), 6,05 (s, 2H, 2- CH , 6- CH). **$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz):** $\delta = 14,4$ (+, CH_3 -10, CH_3 -11), 16,4 (+, CH_3 -9, CH_3 -12), 27,4 (-, CH_2 -1'), 29,0 (-, CH_2 -2'), 30,6 (+, COCH_3 -5'), 31,74 (-, CH_2 -3'), 121,7 (+, CH -2, CH -6), 131,5 (C -7a, C -8a), 140,3 (C -7, C -1), 144,6 (C -8), 154,2 (C -3, C -5), 195,4 (CO).



MS (ESI) (m/z): $[M+H]^+ = 365,3$

$[M+Na]^+ = 387,1$

$[M-F]^+ = 345,2$

HR-MS (EI): berechnet für $C_{16}H_{20}BF_2IN_2Na$ $[M+Na]^+$: 387,1488

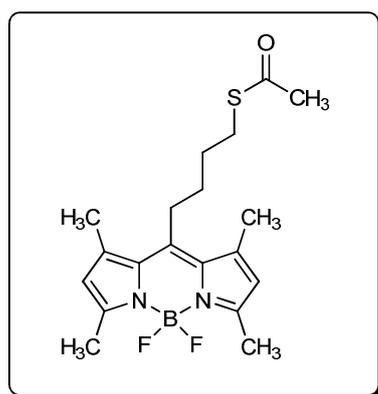
gefunden: 387,1485

Spektroskopische Daten: Absorption $\lambda_{max} = 498 \text{ nm}$

Emission $\lambda_{max} = 506 \text{ nm}$

Fluoreszenzquantenausbeute: $\Phi = 0,79$

8-[[S-(4-Butyl)ester]ethanthioate)]-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (33)



$C_{19}H_{25}BF_2N_2OS$ (378,17491 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Ausbeute: 337 mg (89 %)

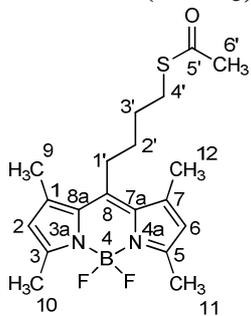
Aussehen: orange-roter Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Petrolether, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser

Schmelzpunkt: 159 °C

R_f-Wert: 0,74 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 2 : 1 (v/v)).

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1,66 - 1,78 (m, 4H, 1'-CH₂, 3'-CH₂), 2,31 (s, 3H, 6'-COCH₃), 2,38 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,49 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 2,91 (m, 4H, 2'-CH₂, 4'-CH₂), 6,03 (s, 2H, 2-CH, 6-CH). **¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz):** δ = 14,4 (+, CH₃-10, CH₃-11), 16,4 (+, CH₃-9, CH₃-12), 27,9 (-, CH₂-1'), 28,7 (-, CH₂-2'), 30,1 (+, COCH₃-6'), 30,6 (-, CH₂-3'), 30,8 (-, CH₂-4'), 121,7 (+, CH-2, CH-6), 131,4 (C-7a, C-8a), 140,2 (C-7, C-1), 145,6 (C-8), 154,0 (C-3, C-5), 195,4 (CO).



MS (ESI) (m/z): [M+Na]⁺ = 401,2

[M-F]⁺ = 359,2

[M-F]⁺ = 417,1,2

HR-MS (ESI): berechnet C₁₉H₂₅BF₂N₂OSNa [M+Na]⁺: 401,1644

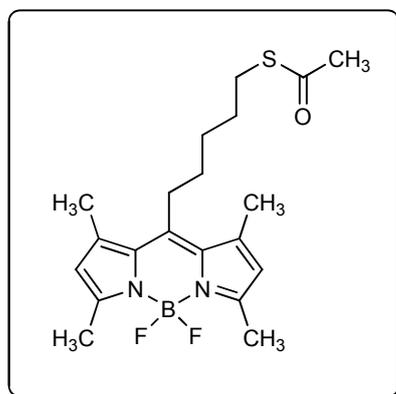
gefunden: 401,1641

Spektroskopische Daten: Absorption λ_{max} = 497 nm

Emission λ_{max} = 506 nm

Fluoreszenzquantenausbeute: Φ = 0,91

8-[[S-(5-Pentyl)ester]ethanthioate]-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (34)



$C_{20}H_{27}BF_2N_2OS$ (392,1905 $g \cdot mol^{-1}$)

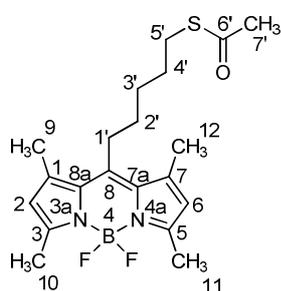
Ausbeute: 306 mg (78 %)

Aussehen: oranger Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser

Schmelzpunkt: 161 °C

R_f-Wert: 0,76 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 2 : 1 (v/v)).



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1,63 (m, 6H, 1'-CH₂, 2'-CH₂, 3'-CH₂), 2,33 (s, 3H, 7'-COCH₃), 2,40 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,51 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 2,88 - 2,95 (m, 4H, 4'-CH₂, 5'-CH₂), 6,05 (s, 2H, 2-CH, 6-CH). **¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz):** δ = 14,4 (+, CH₃-10, CH₃-11), 16,4 (+, CH₃-9, CH₃-12), 28,2 (-, CH₂-1'), 28,8 (-, CH₂-2'), 29,3 (+, COCH₃), 29,4 (-, CH₂-3'), 30,6 (-, CH₂-4'), 31,4 (-, CH₂-5'), 121,6 (+, CH-2, CH-6), 131,4 (C-7a, C-8a), 140,2 (C-7, C-1), 146,0 (C-8), 153,9 (C-3, C-5).

MS (ESI) (m/z): [M+Na]⁺ = 415,2

[M-F]⁺ = 373,2

HR-MS (EI): berechnet für $C_{20}H_{27}BF_2N_2OSNa$ $[M+Na]^+$: 415,1801

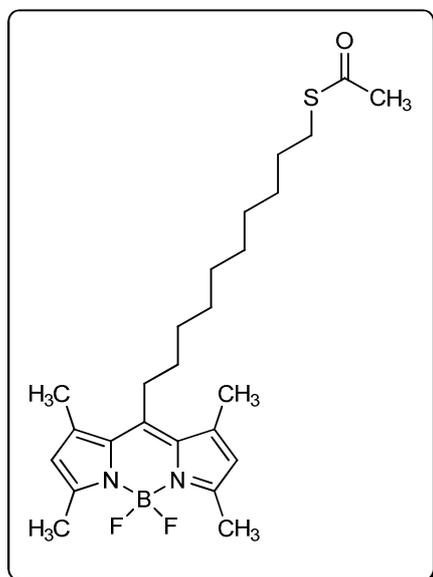
gefunden: 415,1797

Spektroskopische Daten: Absorption $\lambda_{max} = 497$ nm

Emission $\lambda_{max} = 508$ nm

Fluoreszenzquantenausbeute: $\Phi = 0,83$

8-[[S-(10-Decyl)ester]ethanthioate]}-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (35)



$C_{25}H_{37}BF_2N_2OS$ (462,2688 $g \cdot mol^{-1}$)

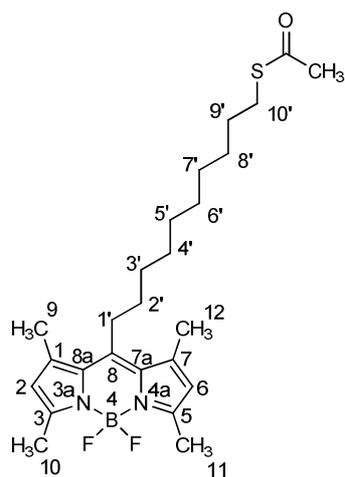
Ausbeute: 406 mg (89 %)

Aussehen: oranger Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser

Schmelzpunkt: 174 °C

R_f-Wert: 0,76 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 2 : 1 (v/v)).



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 1,20\text{-}1,38$ (m, 10H, 1'- CH_2 , 2'- CH_2 , 3'- CH_2 , 4'- CH_2 , 5'- CH_2 , 6'- CH_2 , 7'- CH_2 , 8'- CH_2 , 9'- CH_2 , 10'- CH_2), 2,31 (s, 3H, COCH_3), 2,39 (s, 6H, 9- CH_3 , 12- CH_3), 2,50 (s, 6H, 10- CH_3 , 11- CH_3), 2,87 - 2,91 (m, 4H, 4'- CH_2 , 5'- CH_2), 6,03 (s, 2H, 2- CH , 6- CH). **$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6 , 125 MHz):** $\delta = 14,4$ (+, $\text{CH}_3\text{-}10$, $\text{CH}_3\text{-}11$), 16,4 (+, $\text{CH}_3\text{-}9$, $\text{CH}_3\text{-}12$), 28,4 (-, $\text{CH}_2\text{-}1'$), 28,7 (-, $\text{CH}_2\text{-}2'$), 29,0 (+, COCH_3), 29,1 (-, $\text{CH}_2\text{-}3'$), 29,2 (-, $\text{CH}_2\text{-}4'$), 29,3 (-, $\text{CH}_2\text{-}5'$), 29,4 (-, $\text{CH}_2\text{-}6'$), 30,5 (-, $\text{CH}_2\text{-}7'$), 30,6 (-, $\text{CH}_2\text{-}8'$), 30,8 (-, $\text{CH}_2\text{-}9'$), 31,8 (-, $\text{CH}_2\text{-}10'$), 121,6 (+, $\text{CH-}2$, $\text{CH-}6$), 131,4 ($\text{C-}7\text{a}$, $\text{C-}8\text{a}$), 140,2 ($\text{C-}7$, $\text{C-}1$), 146,0 ($\text{C-}8$), 153,9 ($\text{C-}3$, $\text{C-}5$).

MS (ESI) (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 463,3$
 $[\text{M}-\text{H}]^+ = 461,6$

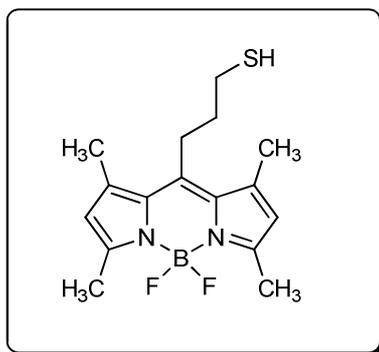
Spektroskopische Daten: Absorption $\lambda_{\text{max}} = 497$ nm
 Emission $\lambda_{\text{max}} = 509$ nm

Fluoreszenzquantenausbeute: $\Phi = 0,82$

Allgemeine Versuchsvorschrift für die Synthese der 8-Thioalkyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen-Derivate²³⁵ (27-30)

Es werden 1 mmol des entsprechenden 8- $\{[\text{S}(\text{Alkyl})\text{ester}]\text{ethanthioate}\}$ -4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen in 30 mL Ethanol gelöst. Die Reaktionslösung wird 20 min mit Stickstoff entgast. Anschließend werden 166 mg Kaliumcarbonat (1,2 mmol) hinzugefügt und die Reaktionslösung 4h bei 30°C gerührt. Danach wird die Reaktionslösung auf gesättigter, wässriger Ammoniumchlorid-Lösung gegeben und mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Lösungsmittel: Dichlormethan : Methanol = 9 : 1 (v/v)). Das Produkt wird als oranger Feststoff erhalten.

8-Thiopropyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (27)



$C_{16}H_{21}BF_2N_2S$ (322,1487 $g \cdot mol^{-1}$)

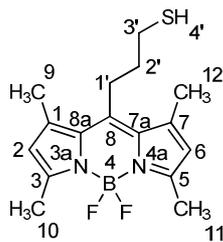
Ausbeute: 80 mg (21 %)

Aussehen: oranger Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser,

Schmelzpunkt: 155 °C

R_f-Wert: 0,69 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 2 : 1 (v/v)).



1H -NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1,88 - 1,94 (m, 2H, 2'-CH₂), 2,42 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,50 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 2,69 (m, 2H, 1'-CH₂), 3,03 - 3,06 (m, 2H, 3'-CH₂), 6,04 (s, 2H, 2-CH, 6-CH). **^{13}C -NMR (CDCl₃, 125 MHz):** δ = 14,7 (+, CH₃-10, CH₃-11), 16,9 (+, CH₃-9, CH₃-12), 25,9 (-, CH₂-2'), 27,4 (-, CH₂-1'), 35,6 (-, CH₂-3'), 121,9 (+, CH-2, CH-6), 131,6 (C-7a, C-8a), 140,5 (C-7, C-1), 145,3 (C-8), 154,4 (C-3, C-5).

MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 323,1

[M+Na]⁺ = 345,1

HR-MS (EI): berechnet für C₁₆H₂₁BF₂N₂SNa [M+Na]⁺: 345,1382

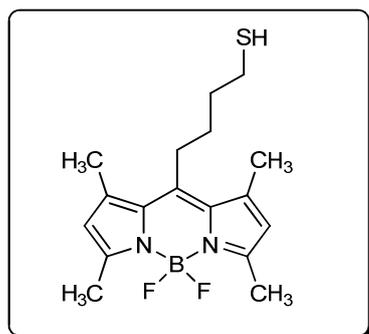
gefunden: 345,1392

Spektroskopische Daten: Absorption $\lambda_{\max} = 498 \text{ nm}$

Emission $\lambda_{\max} = 508 \text{ nm}$

Fluoreszenzquantenausbeute: $\Phi = 0,89$

8-Thiobutyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (28)



$\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{BF}_2\text{N}_2\text{S}$ (336,1643 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

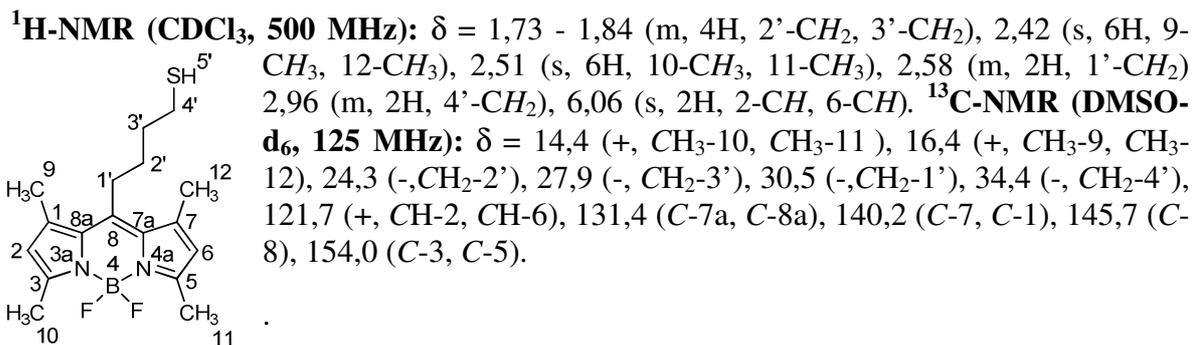
Ausbeute: 145 mg (43 %)

Aussehen: oranger Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser,

Schmelzpunkt: 159 °C

R_f-Wert: 0,67 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 2 : 1 (v/v)).



MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 337,2

[M+Na]⁺ = 359,2

HR-MS (ESI): berechnet C₁₇H₂₃BF₂N₂SNa [M+Na]⁺: 359,1538

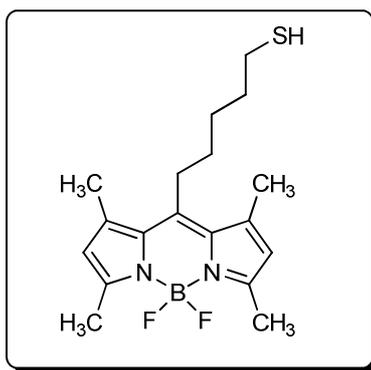
gefunden: 359,1538

Spektroskopische Daten: Absorption λ_{max} = 497 nm

Emission λ_{max} = 506 nm

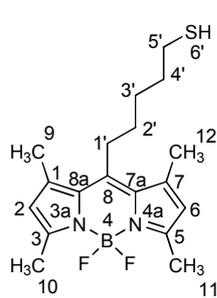
Fluoreszenzquantenausbeute: Φ = 0,94

8-Thiopentyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (29)



C₁₈H₂₅BF₂N₂S (350,1800 g·mol⁻¹)

- Ausbeute:** 221 mg (63 %)
- Aussehen:** oranger Feststoff
- Löslichkeit:** leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser,
- Schmelzpunkt:** 161 °C
- R_f-Wert:** 0,71 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 2 : 1 (v/v)).



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1,56 (br, 1H, SH); 1,61 - 1,71 (m, 4H, 2'-CH₂, 3'-CH₂), 1,76 (m, 2H, 4'-CH₂), 2,40 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,51 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 2,69 (t, J = 6,9 Hz, 2H, 1'-CH₂), 2,95 (m, 2H, 5'-CH₂), 6,05 (s, 2H, 2-CH, 6-CH). **¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz):** δ = 14,4 (+, CH₃-10, CH₃-11), 16,4 (+, CH₃-9, CH₃-12), 28,3 (-, CH₂-2'), 28,8 (-, CH₂-3'), 28,9 (-, 4'-CH₂), 31,5 (-, CH₂-1'), 38,5 (-, CH₂-5'), 121,6 (+, CH-2, CH-6), 131,4 (C-7a, C-8a), 140,2 (C-7, C-1), 146,1 (C-8), 153,9 (C-3, C-5).

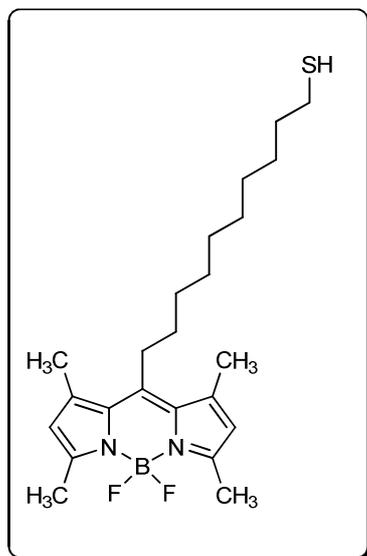
- MS (ESI) (m/z):** [M+H]⁺ = 351,3
- [M+Na]⁺ = 373,2
- [M-F]⁺ = 331,2

HR-MS (EI): berechnet für C₁₈H₂₅BF₂N₂S [M+Na]⁺: 373,1695

gefunden: 373,1688

- Spektroskopische Daten:** Absorption λ_{\max} = 498 nm
- Emission λ_{\max} = 506 nm
- Fluoreszenzquantenausbeute:** Φ = 0,91

8-Thiodecyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (30)



$C_{23}H_{35}BF_2N_2OS$ (420,2582 $g \cdot mol^{-1}$)

Ausbeute: 349 mg (79 %)

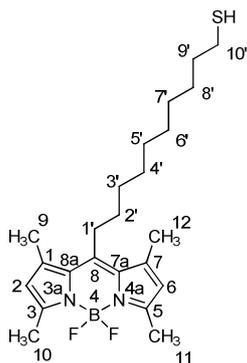
Aussehen: oranger Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser

Schmelzpunkt: 169 °C

R_f-Wert: 0,21 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 2 : 1 (v/v)).

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1,20-1,41 (m, 10H, 1'-CH₂, 2'-CH₂, 3'-CH₂, 4'-CH₂, 5'-CH₂, 6'-CH₂, 7'-CH₂, 8'-CH₂, 9'-CH₂, 10'-CH₂), 2,31 (s, 3H, COCH₃), 2,39 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,50 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 2,87 - 2,91 (m, 4H, 4'-CH₂, 5'-CH₂), 6,03 (s, 2H, 2-CH, 6-CH). **¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz):** δ = 14,4 (+, CH₃-10, CH₃-11), 16,4 (+, CH₃-9, CH₃-12), 28,4 (-, CH₂-1'), 28,7 (-, CH₂-2'), 29,1 (-, CH₂-3'), 29,2 (-, CH₂-4'), 29,3 (-, CH₂-5'), 29,4 (-, CH₂-6'), 30,5 (-, CH₂-7'), 30,6 (-, CH₂-8'), 30,8 (-, CH₂-9'), 31,8 (-, CH₂-10'), 121,6 (+,



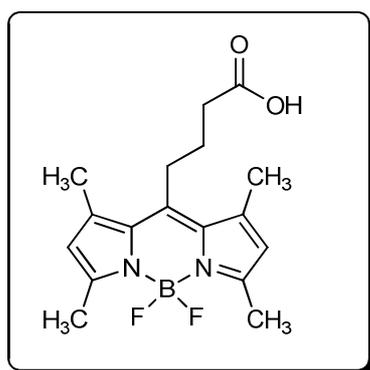
CH-2, CH-6), 131,4 (C-7a, C-8a), 140,2 (C-7, C-1), 146,0 (C-8), 153,9 (C-3, C-5).

MS (ESI) (m/z): $[M+H]^+$ = 463,3
 $[M-H]^+$ = 461,6

Spektroskopische Daten: Absorption λ_{\max} = 497 nm
 Emission λ_{\max} = 509 nm

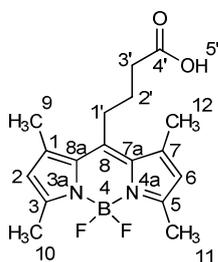
Fluoreszenzquantenausbeute: Φ = 0,82

4-(4,4-Difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen-8-yl)buttersäure²²¹
(37)



Unter Schutzgasatmosphäre werden 136 mg Glutarsäureanhydrid (1,2 mmol) und 110 mg Bortrifluorid-diethyletherat (0,8 mmol) in 20 mL Dichlormethan gelöst. Es wird mit 224 mg 2,4-Dimethylpyrrol (2,4 mmol) versetzt und 5h unter Rückfluss gerührt. Das Reaktionsgemisch wird anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 0,6 g Triethylamin (6 mmol) und 560 mg Bortrifluorid-diethyletherat (4 mmol) versetzt. Es wird weiterhin unter Schutzgasatmosphäre über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Reaktionsgemisch zweimal mit je 20 mL Wasser gewaschen und mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird mit $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan : Ethylacetat = 2 : 1 (v/v)). Das Produkt ergibt sich als dunkelroter Feststoff.

- Ausbeute:** 84 mg (21 %)
- Aussehen:** dunkelroter Feststoff
- Löslichkeit:** leicht löslich in Dimethylformamid, Dichlormethan;
- Schmelzpunkt:** 161-163 °C
- R_f-Wert:** 0,36 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 2 : 1 (v/v)).



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1,93 – 2,02 (m, 2H, 2'-CH), 2,42 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,51 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 2,48 - 2,58 (m, 2H, 1'-CH), 2,98 - 3,05 (m, 2H, 3'-CH), 6,06 (s, 2H, 2-CH, 6-CH). **¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz):** δ = 14,4 (-, CH₂-2'), 14,5 (+, CH₃-10, CH₃-11), 16,3 (+, CH₃-9, CH₃-12), 26,5 (-, CH₂-1'), 27,4 (-, CH₂-3'), 121,9 (+, CH-2, CH-6), 131,5 (C-7a, C-8a), 140,4 (C-7, C-1), 144,7 (C-8), 154,3 (C-3, C-5), 177,9 (COOH).

MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 335,1

[M-H]⁺ = 333,1

[M-F]⁺ = 315,4

Spektroskopische Daten: Absorption λ_{\max} = 498 nm

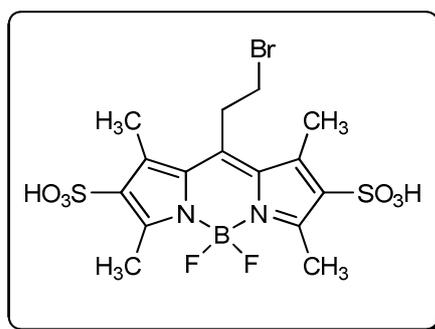
Emission λ_{\max} = 506 nm

Fluoreszenzquantenausbeute: Φ = 0,86

Allgemeine Versuchsvorschrift für die Synthese der 8-Bromoalkyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s- indacen-2,6-disulfonat-Derivate²²⁸ (40-43)

Es werden 0,42 mmol des entsprechenden 8-Aminoalkyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen-Derivats in 4 mL Dichlormethan gelöst und auf - 20°C gekühlt. Danach werden langsam 0,1 g Chlorsulfonsäure (0,84 mmol), die zuvor in 2 mL Dichlormethan gelöst worden ist, zugetropft und für 30 min bei - 20°C gerührt. Anschließend wird dreimal gegen eine gesättigte, wässrige Ammoniumhydrogencarbonat – Lösung ausgeschüttelt. Die wässrigen Phasen werden vereinigt und mittels Lyophilisation wird das Lösungsmittel entfernt. Der Rohprodukt wird in Methanol gelöst und die unlöslichen Rückstände abgefiltert. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan : Methanol = 9 : 2 (v/v) + 2% NEt₃). Das Produkt ergibt sich als orange-brauner Feststoff.

8-(2-Bromomethyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen-2,6- disulfonat²²⁸ (40)



$C_{15}H_{18}BBBrF_2N_2O_6S_2$ (513,9851 g·mol⁻¹)

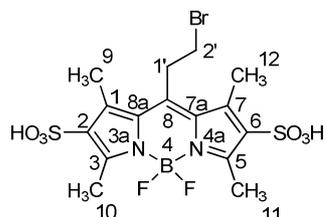
Ausbeute: 65 mg (30 %)

Aussehen: orange-brauner Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol; Wasser

Schmelzpunkt: 198 °C

R_f-Wert: 0,24 (Laufmittel: Dichlormethan : Methanol = 9 : 2 (v/v) + 2% NEt₃).



¹H-NMR (D₂O, 500 MHz): δ = 2,72 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,78 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 3,65 (t, J = 7,9 Hz, 2H, 1'-CH₂), 3,78 (t, J = 7,6 Hz, 2H, 2'-CH₂). **¹³C-NMR (D₂O, 125 MHz):** δ = 16,4 (2C, 10-CH₃, 11-CH₃), 16,8 (2C, 9-CH₃, 12-CH₃), 33,1 (1C, 2'-CH₂), 33,5 (1C, 1'-CH₂), 134,0 (2C, 2-CH, 6-CH), 135,9 (2C, 7a-C, 8a-C), 144,6 (1C, 8-C), 149,7 (2C, 1-C, 7-C), 157,35 (2C, 3-C, 5-C).

MS (ESI) (m/z): [M-H]⁻ = 513,0

[M+Na]⁺ = 537,0

HR-MS (ESI): berechnet für C₁₅H₁₇BBrF₂N₂O₆S₂ [M-H]⁻: 512,9781

gefunden: 512,9767

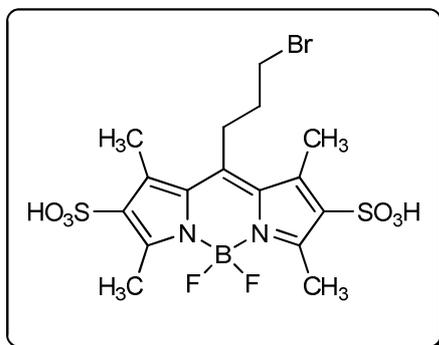
Spektroskopische Daten

Absorption: λ_{max} = 504nm

Emission: λ_{max} = 542 nm

Fluoreszenzquantenausbeute: Φ = 0,65

8-(3-Brompropyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen-2,6-disulfonat²²⁸ (41)



$C_{16}H_{20}BBrF_2N_2O_6S_2$ (528,0007 $g \cdot mol^{-1}$)

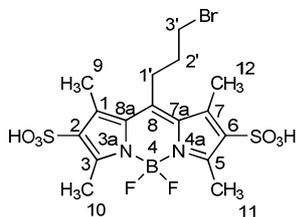
Ausbeute: 83 mg (37 %)

Aussehen: orange-brauner Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol, Wasser;

Schmelzpunkt: 213 °C

R_f-Wert: 0,22 (Laufmittel: Dichlormethan : Methanol = 9 : 2 (v/v) + 2% NEt₃).



¹H-NMR (D₂O, 500 MHz): δ = 2,18 (m, 2H, 2'-CH₂), 2,71 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,77 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 3,29 (m, 2H, 1'-CH₂), 3,70 (t, 2H, 3'-CH₂). **¹³C-NMR (D₂O, 125 MHz):** δ = 11,1 (+, 2C, CH₃-10, CH₃-11), 17,1 (+, 2C, CH₃-9, CH₃-12), 30,2 (-, CH₂-2'), 35,9 (-, CH₂-1'), 36,0 (-, CH₂-3'), 133,8 (+, 2C, CH-2, CH-6), 135,6 (2C, C-7a, C-8a), 144,4 (2C, C-1, C-7), 153,7 (C-8), 156,7 (2C, C-3, C-5).

MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 529,0

[M+Na]⁺ = 551,0

$$[\text{M-SO}_3\text{H}]^+ = 447,1$$

$$[\text{M}-(\text{SO}_3\text{H})_2]^+ = 367,1$$

HR-MS (ESI): berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{BBrF}_2\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$ $[\text{M-H}]^+$: 528,9915

gefunden: 528,9883

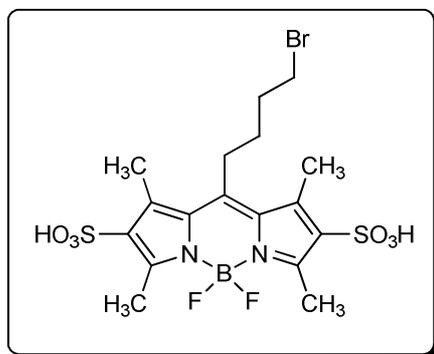
Spektroskopische Daten:

Absorption: $\lambda_{\text{max}} = 506 \text{ nm}$

Emission: $\lambda_{\text{max}} = 538 \text{ nm}$

Fluoreszenzquantenausbeute: $\Phi = 0,68$

8-(4-Brombutyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen-2,6-disulfonat (42)



$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{BBrF}_2\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$ ($542,0164 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

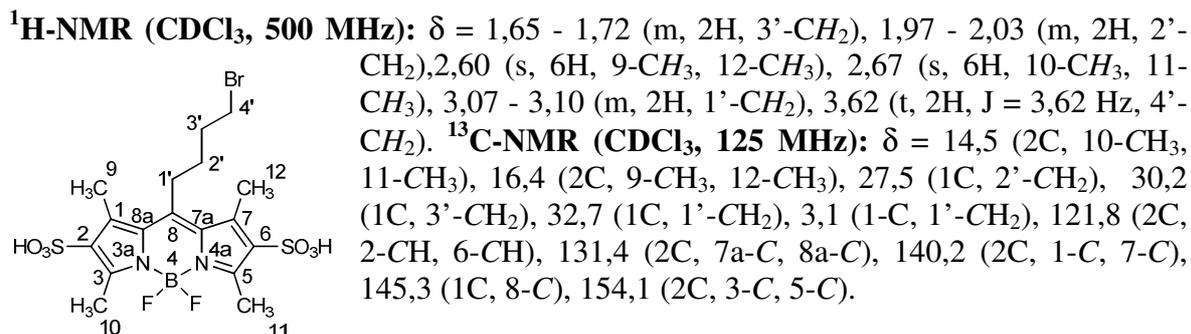
Ausbeute: 71 mg (31 %)

Aussehen: orange-brauner Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol, Wasser;

Schmelzpunkt: 241 °C

R_f-Wert: 0,26 (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9/2 (v/v) + 2% NEt₃).



MS (ESI) (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 543,0

$[\text{M}-\text{SO}_3\text{H}]^-$ = 461,1

$[\text{M}-\text{S}_2\text{O}_6\text{H}_2]^-$ = 381,2

HR-MS (ESI): berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{BF}_2\text{BrN}_2\text{O}_6\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 542,0097

gefunden: 542,0105

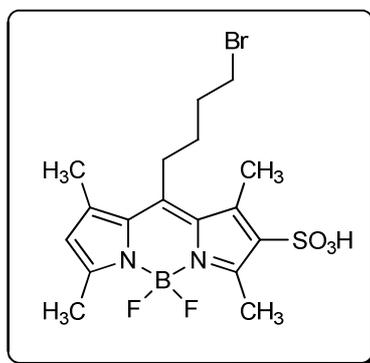
Spektroskopische Daten

Absorption: $\lambda_{\text{max}} = 505$ nm

Emission: $\lambda_{\text{max}} = 540$ nm

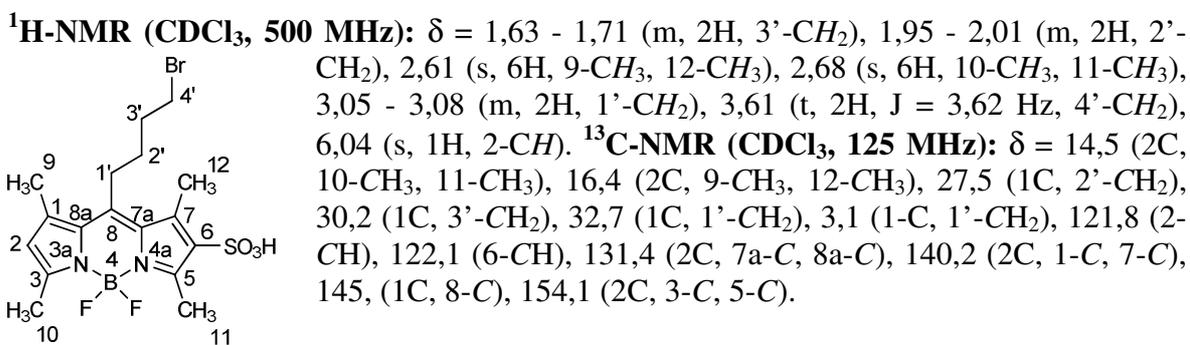
Fluoreszenzquantenausbeute: $\Phi = 0,62$

8-(4-Brombutyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen-2,6-sulfonat (42a)



$\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{BBrF}_2\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ (463,0596 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

- Ausbeute:** 13 mg (6 %)
- Aussehen:** orange-brauner Feststoff
- Löslichkeit:** leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol, Wasser;
- Schmelzpunkt:** 239 °C
- R_f-Wert:** 0,35 (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9/2 (v/v) + 2% NEt₃).



- MS (ESI) (m/z):** [M+H]⁺ = 543,0
- [M-SO₃H]⁻ = 461,1
- [M-S₂O₆H₂]⁻ = 381,2

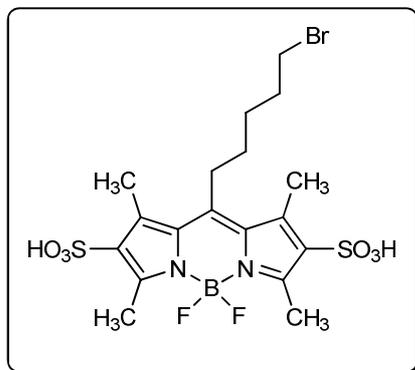
HR-MS (ESI): berechnet für C₁₇H₂₁BBBrF₂N₂O₃S [M-H]⁻ = 461,0515

gefunden: 461,0507

Spektroskopische Daten

- Absorption:** λ_{max} = 504 nm
- Emission:** λ_{max} = 541 nm
- Fluoreszenzquantenausbeute:** Φ = 0,61

8-(5-Brompentyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen-2,6-disulfonat²²⁸ (43)



$C_{18}H_{24}BBrF_2N_2O_6S_2$ (556,0320 $g \cdot mol^{-1}$)

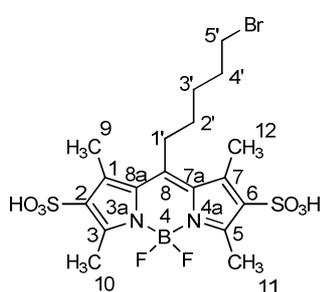
Ausbeute: 141 mg (60 %)

Aussehen: orange-brauner Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol, Wasser;

Schmelzpunkt: 245 °C

R_f-Wert: 0,22 (Laufmittel: Dichlormethan : Methanol = 9 : 2 (v/v) + 2% NEt_3).



¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ = 1,85 (m, 2H, 2'- CH_2), 1,96 (t, J = 6,62 Hz, 2H, 4'- CH_2), 2,27-2,36 (m, 2H, 3'- CH_2), 2,68 (s, 6H, 9- CH_3 , 12- CH_3), 2,74 (s, 6H, 10- CH_3 , 11- CH_3), 3,14 (m, 2H, 1'- CH_2), 3,64 (t, J = 6,62 Hz, 2H, 5'- CH_2). **¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz):** δ = 13,6 (+, 2C, CH_3 -10, CH_3 -11), 13,8 (+, 2C, CH_3 -9, CH_3 -12), 26,8 (-, CH_2 -2'), 29,6 (-, CH_2 -3'), 32,6 (-, CH_2 -1'), 34,6 (-, CH_2 -2'), 121,4 (+, 2C, CH-2, CH-6), 137,6 (2C, C-7a, C-8a), 137,7 (2C, C-1, C-7), 147,9 (C-8), 152,6 (2C, C-3, C-5).

MS (ESI) (m/z): $[M-H]^+$ = 555,0

$[M-SO_3H]^+$ = 475,1

$[M-S_2O_6H_2]^+$ = 395,2

HR-MS (ESI): berechnet für $C_{18}H_{23}BBrF_2N_2Na$ $[M-H]^+$: 555,0240

gefunden: 555,0249

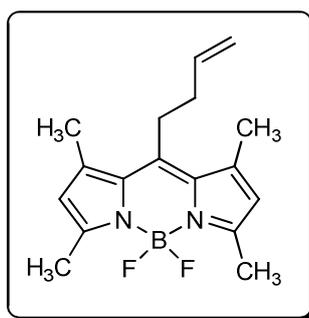
Spektroskopische Daten

Absorption: $\lambda_{max} = 505$ nm

Emission: $\lambda_{max} = 545$ nm

Fluoreszenzquantenausbeute: $\Phi = 0,65$

8-(3-Butenyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (46)



Methode A²³⁶:

Zu 0,83 g 4-Pentensäurechlorid (7,00 mmol) gelöst in 30 mL DCM werden 1,93 g 2,4-Dimethylpyrrol (19,5 mmol) und 0,72 mL Phosphoroxchlorid (19,0 mmol) gegeben. Die Lösung wird unter Reflux über Nacht gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand in Hexan gelöst. Die Lösung wird 5 Stunden bei $-35^{\circ}C$ stehen gelassen. Das Solvent wird abdekantiert und der Rückstand in Toluol aufgenommen. Nach Zugabe von 2,60 mL Triethylamin (18,7 mmol) wird die Lösung 40 Minuten bei $80^{\circ}C$ gerührt. Der Reaktionsansatz wird mit gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan: Petrolether = 2 : 1 (v/v)). Das Produkt ergibt sich als orange-brauner Feststoff.

Ausbeute: 0,169 g (8 %)

Methode B:

Es werden 0,55 mL 4-Pentensäurechlorid (5 mmol) in 50 mL DCM gelöst und bei 0°C innerhalb von 30 Minuten langsam mit 0,95 g 2,4-Dimethylpyrrol (10 mmol), welches zuvor in 5 mL DCM gelöst wurde, versetzt. Die Reaktionslösung wird 3 h bei Raumtemperatur gerührt und danach bei 0°C mit 2,8 mL Triethylamin (20 mmol) und 2,5 mL Bortrifluorid-dietherat (10 mmol) versetzt. Es wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter verminderten Druck abdestilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: DCM : Petrolether = 2 : 1).

Ausbeute: 0,824 g (39 %)

$C_{17}H_{21}BF_2N_2$ (302,1698 g·mol⁻¹)

Aussehen: orange-brauner Feststoff

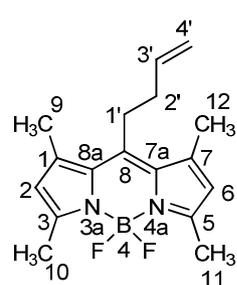
Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;

schlecht löslich in Wasser,

Schmelzpunkt: 197 °C

R_f-Wert: 0,60 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 2 : 1 (v/v)).

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 2,33 - 2,38 (m, 2H, 2'-CH₂), 2,40 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,50 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 3,04 (m, 2H, 1'-CH₂), 5,07 - 5,09 (dq, J = 10,1 Hz, J = 5,1 Hz, 1H, 4'-CH_A), 5,12 - 5,16 (dq, J = 17,0 Hz, J = 9,3 Hz, J = 5,1 Hz, 1H, 4'-CH_B), 5,94 (ddt, J = 16,6 Hz, J = 10,3 Hz, J = 6,3 Hz, 1H, 3'-CH), 6,04 (s, 2H, 2-CH, 6-CH). **¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz):** δ = 14,7 (+, CH₃-9, CH₃-12), 16,6 (+, CH₃-10, CH₃-11), 27,4 (-, CH₂-2'), 35,5 (-, CH₂-1'), 115,9 (-, C-4'), 121,9 (+, CH-2, CH-6), 131,6 (C-7a, C-8a), 136,7 (+, CH-3'), 145,6 (C-7, C-1), 140,6 (C-8), 154,2 (C-3, C-5).



MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 303,2

[M+Na]⁺ = 325,1

[M-F]⁺ = 283,2

HR-MS (EI): berechnet für $C_{17}H_{21}BF_2N_2Na$ $[M+Na]^+$: 325,1661

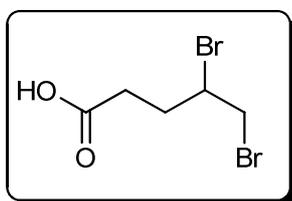
gefunden: 325,1663

Spektroskopische Daten: Absorption $\lambda_{\max} = 499 \text{ nm}$

Emission $\lambda_{\max} = 508 \text{ nm}$

Fluoreszenzquantenausbeute: $\Phi = 0,98$

4,5-Dibrompentansäure²³⁷ (48)



Die Reaktion wurde in Anlehnung an Starostin et al. durchgeführt. An einigen Stellen wurde die Durchführung leicht verändert²³⁷.

Unter Eiskühlung und starkem Rühren werden 1,60 g Brom (10 mmol), die zuvor in 10 mL Dichlormethan gelöst worden sind, langsam zu einer Lösung aus 1,00 g (10 mmol) Pent-4-ensäure getropft, so dass sich die Lösung stets entfärbt. Die Reaktionslösung wird 12h bei 0°C gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit 50 mL Natriumthiosulfatlösung (1 M) gewaschen und mittels Dichlormethan extrahiert. Danach wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Da die Umsetzung quantitativ verläuft, wird das Produkt ohne weitere Aufreinigung in der Folgereaktion eingesetzt. Das Produkt wird als weißer Feststoff erhalten.

$C_5H_8Br_2O_2$ (259,924 $g \cdot mol^{-1}$)

Ausbeute: 2,417 g (93 %)

Aussehen: weißer Feststoff

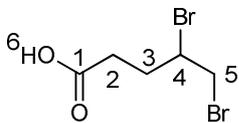
Löslichkeit: leicht löslich in Dimethylformamid, Dichlormethan, Methanol
Ethanol;

schlecht löslich in Wasser.

Schmelzpunkt: 55-57 °C

R_f-Wert: 0,17 (Laufmittel: Cyclohexan : Dichlormethan = 1 : 1 (v/v)).

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1,17 - 2,00 (m, 2H, 3-CH₂), 2,38 - 2,48 (m, 2H, 2-CH₂), 3,63 (t, J = 9,7 Hz, 1H, 5-CH_A), 3,87 (dd, J = 9,7 Hz, J = 9,7 Hz 1H, 5-CH_B), 4,25 (m, 2H, 4-CH₂), 9,68-12,08 (br, 1H, COOH). **¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz):** δ = 26,2 (-, CH₂-2), 30,7 (-, CH₂-3), 33,9 (-, CH₂Br-5), 49,8 (+, CH-4), 172,9 (+, COOH).

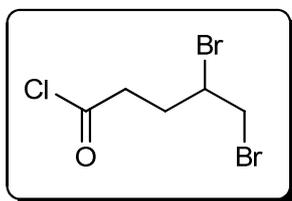


MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 463,0

[M+Na]⁺ = 485,0

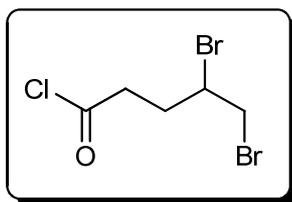
[M-F]⁺ = 441,0

4,5-Dibromopentansäurechlorid *Variante A* (49)



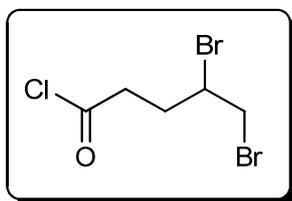
Es werden 2,10 g 4,5-Dibromopentansäure (8 mmol) in 20 mL Dichlormethan gelöst und mit 1,43 g frisch destilliertem Thionylchlorid (12 mmol) und einem Tropfen DMF versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 2h bei 40°C gerührt. Das überschüssige Thionylchlorid wird abdestilliert und das Produkt ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

Ausbeute: 0,867 g (82 %)

4,5-Dibrompentansäurechlorid Variante B (49)

Es werden 982 mg 4,5-Dibrompentansäure (3,8 mmol) in 5 mL Dichlormethan gelöst und mit 1,19 g Phosphorpentachlorid (5,7 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 2,5 h bei 50°C gerührt. Das Rohprodukt wurde mittels Destillation gereinigt. Das Produkt ergibt sich als braune Flüssigkeit.

Ausbeute: 786 mg (75 %)

4,5-Dibrompentansäurechlorid Variante C (49)

Es werden 0,98 g 4,5-Dibrompentansäure (3,8 mmol) in 5 mL DMF gelöst und mit 0,55 g Oxalylchlorid (4,3 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 1h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung kurz auf 40 °C erwärmt, um das restliche Gas auszutreiben. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Die Lösung weist eine dunkel gelbe Farbe auf.

$C_5H_7Br_2OCl$ (275,8552 g·mol⁻¹)

Ausbeute: 1,076 g (93 %)

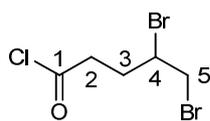
Aussehen: gelb-braune Flüssigkeit

Löslichkeit: leicht löslich in Dimethylformamid, Dichlormethan, Methanol, Ethanol;

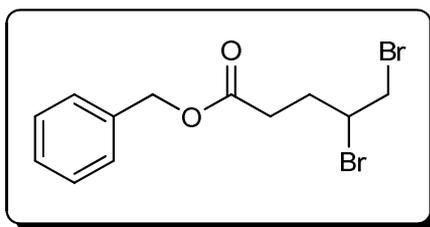
schlecht löslich in Wasser.

R_f-Wert: 0,03 (Laufmittel: Cyclohexan : Dichlormethan = 1 : 1 (v/v)).

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 2,06 - 2,15 (m, 2H, 3-CH₂), 3,19 - 3,26 (m, 2H, 2-CH₂), 3,60 - 3,62 (m, 1H, 5-CH_A), 3,87 (dd, J = 10,7 Hz, J = 4,4 Hz, 1H, 5-CH_B), 4,16 - 4,22 (m, 2H, 4-CH₂). **¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz):** δ = 28,3 (-, CH₂-2), 31,4 (-, CH₂-3), 35,2 (-, CH₂Br -5), 50,5 (+, CH-4), 176,2 (+, COCl).



4,5-Dibromopentansäurebenzylester (185)



Es werden 0,32 g Benzylalkohol (3 mmol) in 10 mL Dichlormethan gelöst und mit 0,47 g *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Die Lösung wird 10 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 0,83 g 4,5-Dibromopentansäurechlorid (3 mmol) versetzt. Es wird 5h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Reaktionslösung dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Das Produkt wird mit Dichlormethan extrahiert und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt fällt als braunes Öl an.

C₁₂H₁₄Br₂O₂ (347,9361 g·mol⁻¹)

Ausbeute: 0,681 g (65 %)

Aussehen: braune Flüssigkeit

Löslichkeit: leicht löslich in Dimethylformamid, Dichlormethan;

schlecht löslich in Wasser.

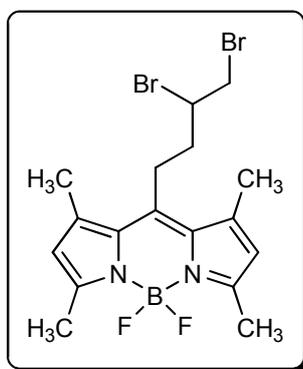
R_f-Wert: 0,45 (Laufmittel: Cyclohexan : Dichlormethan = 1 : 1 (v/v)).

MS (ESI) (m/z): [M+K]⁺ = 386,2

[M-C₂H₃Br₂]⁺ = 187,1

[M-C₄H₇Br₂]⁺ = 212,3

**8-(3,4-Dibromobutyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen
(50)**



Es werden 1,34 g 4,5-Dibromopentanoylchlorid (5 mmol) in 20 mL Dichlormethan gelöst und bei 0°C langsam mit 0,95 g 2,4-Dimethylpyrrol (10 mmol), welches zuvor in 5 mL DCM gelöst wurde, versetzt. Die Reaktionslösung wird 90 min bei Raumtemperatur gerührt und danach bei 0°C mit 2,8 mL Triethylamin (20 mmol) versetzt. Es wird 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden bei 0°C 2,5 mL Bortrifluorid-dietherat (10 mmol) zugefügt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: DCM : Petrolether = 2 : 1). Das Produkt ergibt sich als violetter Feststoff.

C₁₇H₂₁BBr₂F₂N₂ (461,9778 g·mol⁻¹)

Ausbeute: 243 mg (12 %)

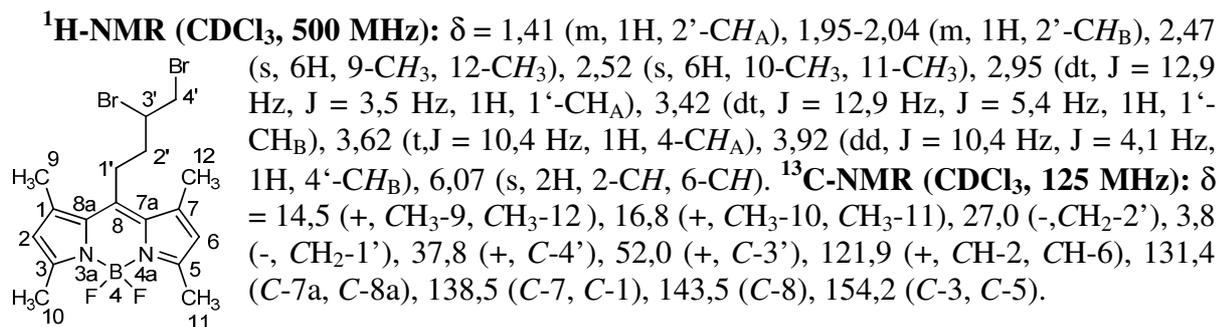
Aussehen: violetter Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;

schlecht löslich in Wasser,

Schmelzpunkt: 193 °C

R_f-Wert: 0,67 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 2 : 1 (v/v)).



MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 462,0

[M+Na]⁺ = 485,0

[M-F]⁺ = 441,0

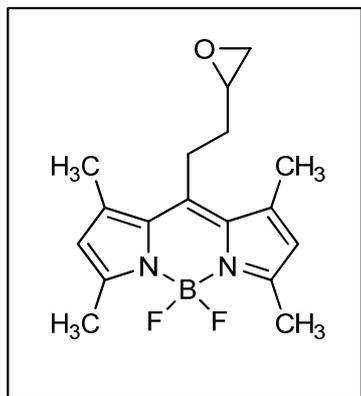
HR-MS (EI): berechnet für C₁₇H₂₁BBr₂F₂N₂Na [M+Na]⁺: 485,0008

gefunden: 485,0011

Spektroskopische Daten: Absorption λ_{max} = 499 nm

Emission λ_{max} = 508 nm

Fluoreszenzquantenausbeute: Φ = 0,92

8-(2-Ethyloxiran)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (52)

Es werden 240 mg 8-(3-Butenyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (**46**) (0,8 mmol) in 20 mL Dichlormethan gelöst und bei 0°C mit 208 mg MCPBA (1,2 mmol) versetzt. Die Reaktionslösung wird 10 min bei 0°C gerührt und danach auf RT erwärmt. Anschließend wird für weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: DCM : Petrolether = 2 : 1). Das Produkt ergibt sich als orange-roter Feststoff.

$C_{17}H_{21}BF_2N_2O$ (318,1715 g·mol⁻¹)

Ausbeute: 132 mg (52 %)

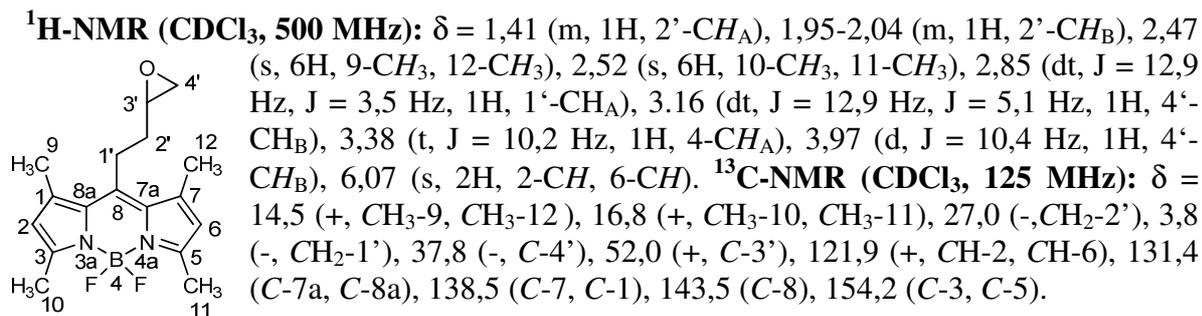
Aussehen: orange-roter Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;

schlecht löslich in Wasser,

Schmelzpunkt: 183 °C

R_f-Wert: 0,67 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 2 : 1 (v/v)).

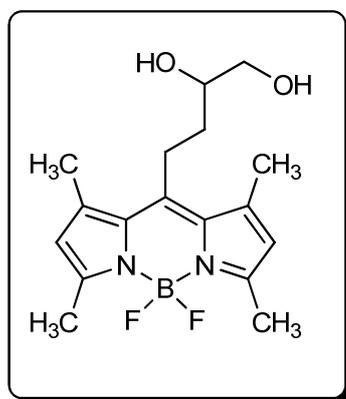


MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 319,3

[M+Na]⁺ = 341,6

[M-F]⁺ = 300,1

**8-(3,4-Dihydroxybutyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen
(53)**

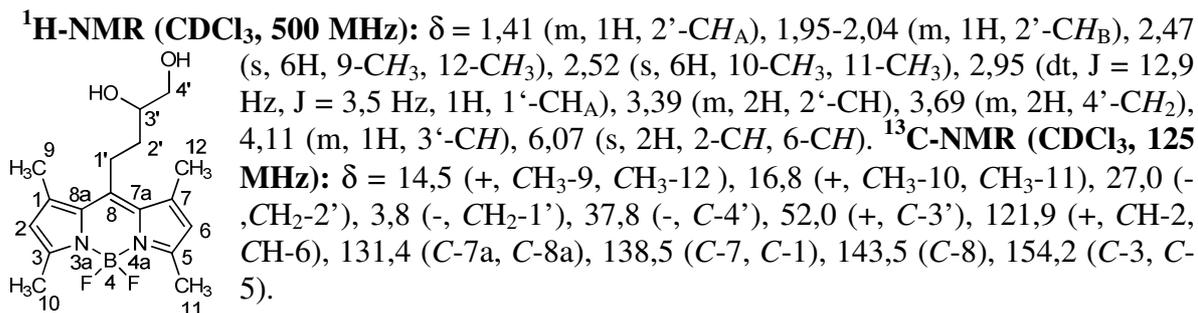


Es werden 90 mg 8-(3-Butenyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (**46**) (0,3 mmol) in 20 mL Wasser suspendiert mit 72 mg LiOH (3 mmol) versetzt. Die Reaktionslösung wird 2 h min bei 30°C gerührt. Das Lösungsmittel wird unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: DCM : Methanol = 9 : 1). Das Produkt ergibt sich als orange-roter Feststoff.

C₁₇H₂₃BF₂N₂O₂ (336,1821 g·mol⁻¹)

Ausbeute: 12 mg (13 %)

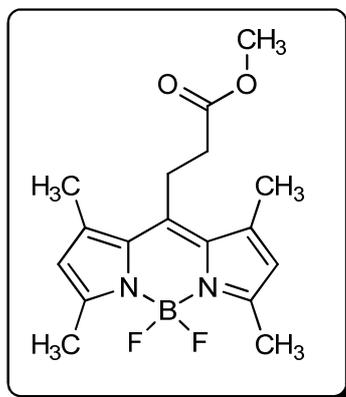
- Aussehen:** orange-roter Feststoff
- Löslichkeit:** leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser,
- Schmelzpunkt:** 213°C
- R_f-Wert:** 0,67 (Laufmittel: Dichlormethan : Methanol = 8 : 2 (v/v)).



MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 337,8

[M+Na]⁺ = 360,3

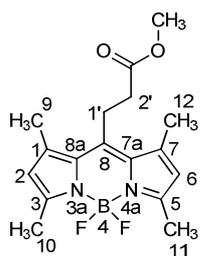
Methyl-3-Ethyl-8-(4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen)ester
(54)



Es werden 0,6 mL 3-Methoxypropionylchlorid (5 mmol) in 20 mL Dichlormethan gelöst und bei 0°C langsam mit 0,95 g 2,4-Dimethylpyrrol (10 mmol), welches zuvor in 5 mL DCM gelöst wurde, versetzt. Die Reaktionslösung wird 90 min bei Raumtemperatur gerührt und danach bei 0°C mit 2,8 mL Triethylamin (20 mmol) versetzt. Es wird 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden bei 0°C 2,5 mL Bortrifluorid-dietherat (10 mmol) zugefügt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: DCM : Petrolether = 2 : 1). Das Produkt ergibt sich als orange-roter Feststoff.

$C_{17}H_{21}BF_2N_2O_2$ (334,1664 g·mol⁻¹)

- Ausbeute:** 179 mg (11 %)
- Aussehen:** orange-roter Feststoff
- Löslichkeit:** leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser,
- Schmelzpunkt:** 192 °C
- R_f-Wert:** 0,59 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 2 : 1 (v/v)).



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ = 3,29 (m, 2H, 1'-CH), 2,43 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,52 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 2,59 (m, 2H, 2'-CH_A), 3,74 (s, 3H, CH₃), 6,07 (s, 2H, 2-CH, 6-CH). **$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz):** δ = 14,6 (+, CH₃-9, CH₃-12), 16,5 (+, CH₃-10, CH₃-11), 23,8 (-, CH₂-1'), 35,3 (-, CH₂-2'), 52,2 (+, CH₃), 122,1 (+, CH-2, CH-6), 131,4 (C-7a, C-8a), 140,6 (C-7, C-1), 143,4 (C-8), 154,9 (C-3, C-5), 172,3 (COOCH₃).

MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 335,3

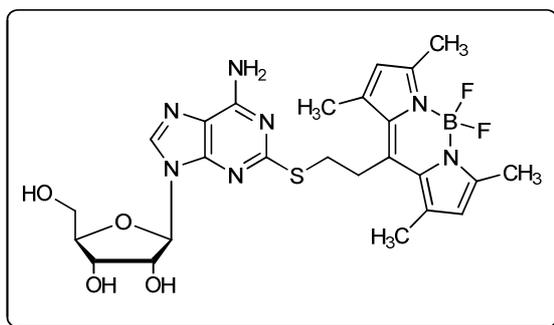
[M-H]⁺ = 334,6

[M-F]⁺ = 316,1

10.3. Allgemeine Versuchsvorschrift für die Synthese der fluoreszenz-markierten 2-Thioadenosin-Derivate (56-60)

Es werden 148 mg 2-Thioadenosin (0,49 mmol) in 5 mL DMF suspendiert und mit 28 mg Natriummethanolat (0,49 mmol) versetzt. Es wird solange gerührt, bis eine klare Lösung entstanden ist. Anschließend werden 0,41 mmol des entsprechenden 8-Bromalkyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen-Derivats hinzugefügt und die Reaktionslösung wird 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (LM: Dichlormethan : Methanol = 9 : 1 (v/v)). Das Produkt ergibt sich als orange-roter Feststoff.

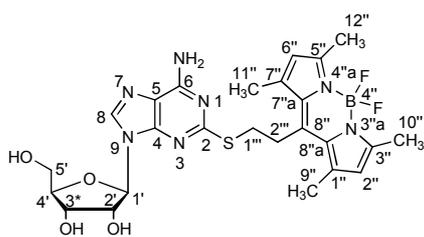
S-[2-(4,4-difluoro-11,3,5,7-tetra-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)ethyl]-2-thioadenosin²²⁸ (56)



$C_{25}H_{30}BF_2N_7O_4S$ (573,2141 $g \cdot mol^{-1}$)

- Ausbeute:** 186 mg (79 %)
- Aussehen:** orange-roter Feststoff
- Löslichkeit:** leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser,
- Schmelzpunkt:** 184 °C

R_f-Wert: 0,29 (Laufmittel: Dichlormethan : Methanol = 9 : 1 (v/v)).



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 2,47 (s, 6H, 9''-CH₃, 12''-CH₃), 2,52 (s, 6H, 10''-CH₃, 11''-CH₃), 3,16 (m, 1H, 5'-CH_A), 3,28 (m, 2H, 2'''-CH₂), 3,44 (m, 1H, 5'-CH_B), 3,73 (m, 2H, 1'''-CH₂), 4,12 (br, 1H, 2'-OH), 4,29 (s, 1H, 4'-CH), 4,36 (d, J = 5,0 Hz, 1H, 3'-CH), 4,93 (m, 1H, 2'-CH), 5,72 (d, J = 7,2 Hz, 1'-CH), 5,78 (br, 2H, NH₂), 5,96 (br, 1H, 3'-OH), 6,07 (s, 2H, 2-CH, 6-CH), 7,12 (br, 1H, 5'-OH), 7,69 (s, 1H, 8-CH). **¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz):** δ = 14,5 (+, CH₃-10, CH₃-11), 16,6 (+, CH₃-9, CH₃-12), 28,5 (-, CH₂-1'''), 32,0 (-, CH₂-1'''), 63,2 (-, CH₂-3'), 72,4 (+, CH₂-2'), 73,3 (+, (CH₂-4')), 87,2 (+, CH₂-1'), 90,9 (+, CH₂-1'), 118,3 (C-5), 121,9 (+, CH-6'', CH-2''), 131,5 (C-7a, C-8a), 139,8 (+, CH-8), 140,8 (C-7, C-1), 142,9 (C-8), 149,5 (+, NCN), 154,6 (+, C-NH₂), 154,9 (C-3''', C-5'''), 164,16 (CS).

MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 574,1

[M+Na]⁺ = 596,1

[M-F]⁺ = 554,1

HR-MS (EI): berechnet für C₂₅H₃₀BF₂N₇O₄SH [M+H]⁺: 574,2218

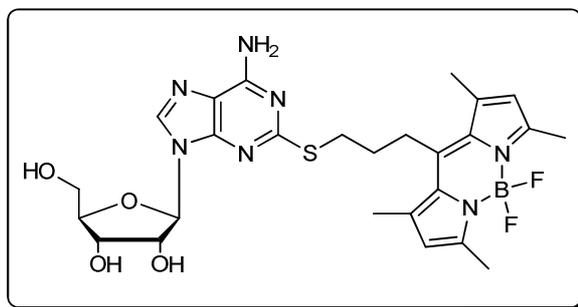
gefunden: 574,2234

Spektroskopische Daten: Absorption λ_{\max} = 497 nm

Emission λ_{\max} = 508 nm

Fluoreszenzquantenausbeute: Φ = 0,94

S-[2-(4,4-difluoro-11,3,5,7-tetra-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)propyl]-2-thioadenosin (57)



$C_{26}H_{32}BF_2N_7O_4S$ (587,2298 $g \cdot mol^{-1}$)

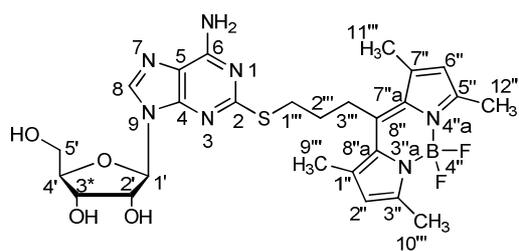
Ausbeute: 181 mg (73 %)

Aussehen: oranger Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser,

Schmelzpunkt: 186 °C

R_f-Wert: 0,29 (Laufmittel: Dichlormethan : Methanol = 9 : 1 (v/v)).



1H -NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1,85 - 2,01 (m, 2H, 2''''-CH₂), 2,41-2,54 (s, 12H, 9-CH₃, 12-CH₃, 10-CH₃, 11-CH₃), 3,11 (m, 2H, 3''''-CH₂), 3,19 - 3,22 (m, 2H, 1''''-CH₂), 3,88 (m, 1H, 5'-CH_A), 4,25 (m, 1H, 5'-CH_B), 4,28 (d, J = 5,0 Hz, 1H, 3'-CH), 4,30 (m, 1H, 2'-CH_A), 4,93 (br, 1H, 3'-OH), 5,15 (br, 1H, 2'-OH), 5,38 (br, 2H, NH₂), 5,69 (m, 1H, 4'-CH), 6,03 (s, 2H, 2-CH,

6-CH), 6,16 (br, 1H, 6'-OH), 6,89 (m, 1H, 1'-CH), 7,61 (s, 1H, 8-CH). **^{13}C -NMR (DMSO-d₆, 125 MHz):** δ = 14,5 (+, CH₃-10, CH₃-11), 16,5 (+, CH₃-9, CH₃-12), 27,4 (-, CH₂-2'''), 30,1 (-, CH₂-3'''), 32,1 (-, CH₂-1'''), 63,5 (-, CH₂-5'), 72,8 (+, CH₂-3'), 73,8 (+, (CH₂-2'), 86,9 (+, CH₂-4'), 90,3 (+, CH₂-1'), 118,9 (C-5), 122,0 (+, CH-6''', CH-2'''), 131,0 (C-7a, C-8a), 139,7 (+, CH-8), 141,0 (C-7, C-1), 145,3 (C-8), 146,1 (NCN), 155,0 (C-NH₂), 157,7 (C-3''', C-5'''), 163,7 (CS).

MS (ESI) (m/z): $[M+H]^+$ = 588,5
 $[M-H]^+$ = 586,7
 $[M-F]^+$ = 586,5
 $[M+Na]^+$ = 610,3

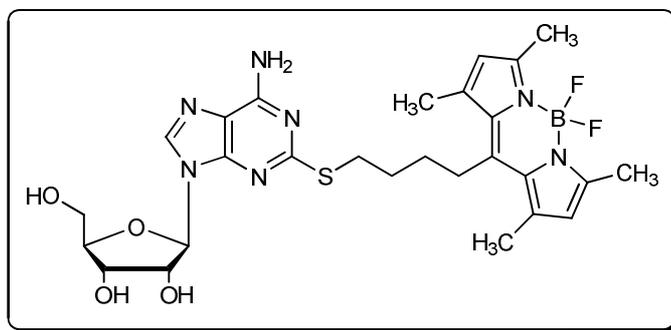
HR-MS (ESI): berechnet $C_{26}H_{32}BF_2N_7O_4SH$ $[M+H]^+$: 588,2386

gefunden: 588,2383

Spektroskopische Daten: Absorption λ_{max} = 498 nm
Emission λ_{max} = 510 nm

Fluoreszenzquantenausbeute: Φ = 0,94

S-[2-(4,4-difluoro-11,3,5,7-tetra-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)butyl]-2-thioadenosin (58)



$C_{27}H_{34}BF_2N_7O_4S$ (601,2354 $g \cdot mol^{-1}$)

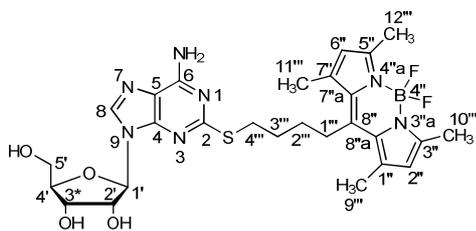
Ausbeute: 154 mg (63 %)

Aussehen: oranger Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser,

Schmelzpunkt: 186-188 °C

R_f-Wert: 0,27 (Laufmittel: Dichlormethan : Methanol = 9 : 1 (v/v)).



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1,70 - 1,89 (m, 6H, 1'''-CH₂, 2'''-CH₂, 3'''-CH₂), 2,37 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,49 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 2,87 (m, 1H, 5'-CH_A), 2,93 (m, 2H, 4''-CH₂), 3,14 (m, 1H, 5'-CH_B), 3,56 (br, 1H, 2'-OH), 3,90 (m, 1H, 4'-CH), 4,25 (s, 1H, 3'-CH), 4,87 (br, 1H, 3'-OH), 5,10 (br, 1H, 6'-OH), 5,75 (d, J = 6,9 Hz, 1'-CH), 5,83 (br, 2H, NH₂), 6,01 (s, 2H, 2-CH, 6-CH), 7,69 (s, 1H, 8-CH). **¹³C-**

NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 14,4 (+, CH₃-10, CH₃-11), 16,4 (+, CH₃-9, CH₃-12), 27,9 (-, CH₂-2'''), 29,9 (-, CH₂-1'''), 30,8 (-, CH₂-4'''), 31,0 (-, CH₂-4'''), 63,0 (-, CH₂-3'), 72,2 (+, CH₂-2'), 73,2 (+, (CH₂-4')), 86,9 (+, CH₂-1'), 90,4 (+, CH₂-1'), 117,9 (C-5), 121,6 (+, CH-6''', CH-2'''), 131,3 (C-7a, C-8a), 139,6 (+, CH-8), 140,5 (C-7, C-1), 146,4 (C-8), 149,6 (+, NCN), 153,8 (+, C-NH₂), 154,7 (C-3''', C-5'''), 165,2 (CS).

MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 602,2

[M+Na]⁺ = 624,2

[M-F]⁺ = 582,2

HR-MS (EI): berechnet für C₂₇H₃₄BF₂N₇O₄SNa [M+Na]⁺: 624,2351

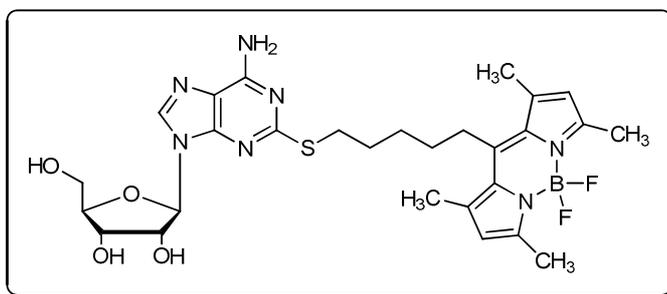
gefunden: 624,2353

Spektroskopische Daten: Absorption λ_{\max} = 497 nm

Emission λ_{\max} = 506 nm

Fluoreszenzquantenausbeute: Φ = 0,94

S-[2-(4,4-difluoro-11,3,5,7-tetra-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)pentyl]-2-thioadenosin (59)



$C_{28}H_{36}BF_2N_7O_4S$ (615,2611 $g \cdot mol^{-1}$)

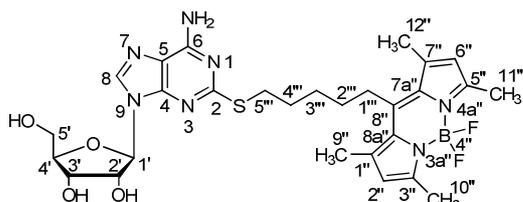
Ausbeute: 135 mg (54 %)

Aussehen: oranger Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser,

Schmelzpunkt: 188 °C

R_f-Wert: 0,27 (Laufmittel: Dichlormethan : Methanol = 9 : 1 (v/v)).



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1,52 - 1,73 (m, 6H, 2'''-CH₂, 3'''-CH₂, 4'''-CH₂), 2,36 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,49 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 2,81 - 2,93 (m, 3H, 5'''-CH_A, 1'''-CH₂), 3,17 (m, 1H, 5'''-CH_B), 3,65-3,73 (m, 3H, 4'-CH, 2'-OH, 3'-OH), 3,86 (d, J = 11,4 Hz, 1H, 5'-CH_A), 4,20 (s, 1H, 3'-CH), 4,28 (m, 1H, 5'-CH_B), 4,91 (m, 1H, 2'-CH), 5,03 (br, 1H, 5'-CH₂-OH), 5,72 (d, J = 6,9 Hz, 1'-CH), 5,77 (br, 2H, NH₂), 6,01 (s, 2H, 2-CH, 6-CH), 7,65 (s, 1H, 8-CH). **¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz):** δ = 14,4 (+, CH₃-10, CH₃-11), 16,4 (+, CH₃-9, CH₃-12), 28,3 (-, CH₂-3'''), 29,1 (-, CH₂-2'''), 29,2 (-, CH₂-4'''), 30,6 (-, CH₂-5'''), 31,4 (-, CH₂-1'''), 63,0 (-, CH₂-5'), 72,2 (+, CH₂-3'), 73,2 (+, (CH₂-2'), 86,9 (+, CH₂-4'), 90,4 (+, CH₂-1'), 117,9 (C-5), 121,6 (+, CH-6''', CH-2'''), 131,3 (C-7a, C-8a), 139,6 (+, CH-8), 140,5 (C-7, C-1), 146,4 (C-8), 149,6 (NCN), 153,8 (C-NH₂), 154,7 (C-3''', C-5'''), 165,2 (CS).

MS (ESI) (m/z): $[M+H]^+$ = 616,2

$[M-H]^+$ = 614,5

$[M-F]^+$ = 596,2

$[M+Na]^+$ = 638,2

HR-MS (EI): berechnet für $C_{28}H_{36}BF_2N_7O_4SH$ $[M+H]^+$: 616,2688

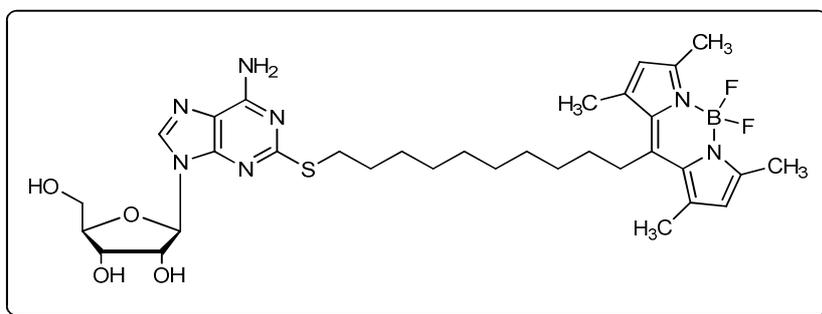
gefunden: 616,2665

Spektroskopische Daten: Absorption λ_{max} = 498 nm

Emission λ_{max} = 504 nm

Fluoreszenzquantenausbeute: Φ = 0,94

S-[2-(4,4-difluoro-11,3,5,7-tetra-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)butyl]-2-thioadenosin (60)



$C_{33}H_{46}BF_2N_7O_4S$ (685,3393 $g \cdot mol^{-1}$)

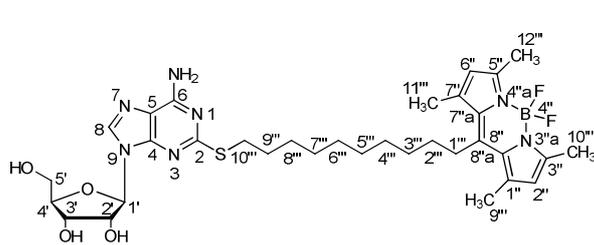
Ausbeute: 180 mg (54 %)

Aussehen: oranger Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan, Methanol, Ethanol;
schlecht löslich in Wasser,

Schmelzpunkt: 191°C

R_f-Wert: 0,31 (Laufmittel: Dichlormethan : Petrolether = 2 : 1 (v/v)).



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1,43 - 1,96 (m, 16H, 2'''-CH₂, 3'''-CH₂, 4'''-CH₂, 5'''-CH₂, 6'''-CH₂, 7'''-CH₂, 8'''-CH₂, 9'''-CH₂), 2,39 (s, 6H, 9-CH₃, 12-CH₃), 2,50 (s, 6H, 10-CH₃, 11-CH₃), 2,91 (m, 4H, 1'''-CH₂, 10'''-CH₂), 3,11 (m, 2H, 5'-CH₂), 3,48 (s, 1H, 4'-CH), 3,91 (m, 1H,

3'-CH), 4,94 (m, 1H, 2'-CH), 5,03 (br, 1H, 3'-CH_B), 5,24 (br, 1H, 6'-CH), 5,75 - 5,86 (m, 3H, 1'-OH, NH₂), 6,03 (s, 2H, 2-CH, 6-CH), 7,69 (s, 1H, 8-CH). **¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz):** δ = 14,4 (+, CH₃-10, CH₃-11), 16,4 (+, CH₃-9, CH₃-12), 28,5 (-, CH₂-8'''), 28,9 (-, CH₂-7'''), 29,0 (-, CH₂-6'''), 29,2 (-, CH₂-5'''), 29,4 (-, CH₂-4'''), 29,4 (-, CH₂-1'''), 29,5 (-, CH₂-3'''), 30,3 (-, CH₂-9'''), 31,4 (-, CH₂-2'''), 31,9 (-, CH₂-10'''), 63,1 (-, CH₂-5'), 72,3 (+, CH₂-3'), 73,4 (+, (CH₂-2')), 87,1 (+, CH₂-4'), 90,5 (+, CH₂-1'), 117,8 (C-5), 121,5 (+, CH-6''', CH-2'''), 131,4 (C-7a, C-8a), 139,5 (+, CH-8), 140,3 (C-7, C-1), 146,7 (C-8), 149,5 (NCN), 153,7 (C-NH₂), 154,7 (C-3''', C-5'''), 165,7 (CS).

MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 686,3

[M+Na]⁺ = 7083

[M-F]⁺ = 666,3

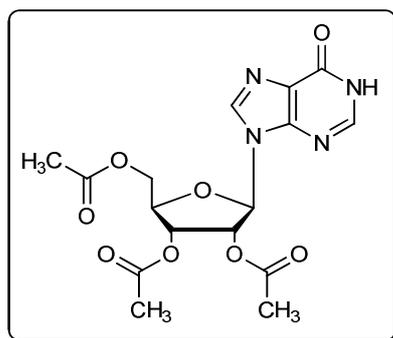
HR-MS (EI): berechnet für C₃₃H₄₆BF₂N₇O₄SH [M+H]⁺: 686,3472

gefunden: 686,3477

Spektroskopische Daten: Absorption λ_{\max} = 498 nm

Emission λ_{\max} = 504 nm

Fluoreszenzquantenausbeute: Φ = 0,99

2', 3', 5'-Tri-O-acetylinosin²⁵³ (184)

Es werden 8,8 g Ethyldimethylamin (0,120 mol) und 14,0 g Benzoylchlorid (0,100 mol) in 100 mL Acetanhydrid vorgelegt und mit 7,97 g Inosin (0,030 mol) und 0,2 g Dimethylaminopyridin (DMAP) versetzt. Die Lösung wird solange bei Raumtemperatur gerührt, bis diese farblos geworden ist. Das überschüssige Acetanhydrid wird mittels Methanol gequenchet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird aus Isopropanol umkristallisiert. Das Produkt fällt als weißer Feststoff an.

$C_{31}H_{24}N_4O_8$ (394,1125 g·mol⁻¹)

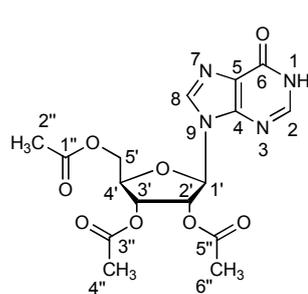
Ausbeute: 15,1 g (87 %)

Aussehen: weißer Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Dichlormethan

Schmelzpunkt: 239-241 °C

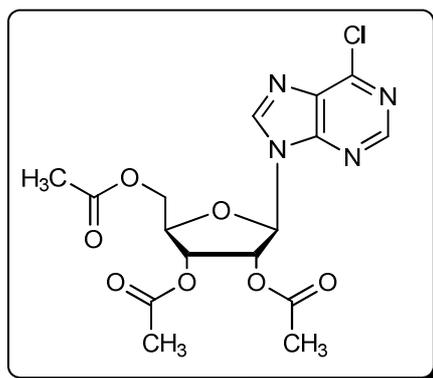
R_f-Wert: 0,21 (Laufmittel: Chloroform : Ethanol = 95 : 5 (v/v)).



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 2,01$ (s, 3H, 4''-COCH₃), 2,03 (s, 3H, 6''-COCH₃), 2,10 (s, 3H, 2''-COCH₃), 4,24 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H, 5'-CH₂), 4,38 (t, $J = 6,9$ Hz, 1H, 4'-CH₂), 5,53 (d, $J = 6,7$ Hz, 1H, 2'-CH), 5,89 (d, $J = 6,7$ Hz, 1H, 3'-CH), 6,17 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H, 1'-CH₂), 8,08 (s, 1H, 2-CH), 8,29 (s, 1H, 8-CH). **$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6 , 125 MHz):** $\delta = 20,3$, 20,5 (+, 2C, COOCH₃-2'', COOCH₃-4''), 20,7 (+, COOCH₃-6''), 62,6 (-, CH₂-5''), 70,5 (-, CH₂-2'), 73,2 (-, CH₂-3'), 80,8 (+, CH-4'), 86,5 (-, CH-1'), 130,9 (C-5), 142,2 (+, CH-8), 143,9 (NCN-4), 160,0 (+, CH-2), 153,5 (CO-6), 169,4 (CO-5''), 169,6 (CO-3''), 170,2 (CO-1''). Die Daten entsprechen den Literaturwerten.²⁵³

MS (ESI) (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 395,2$

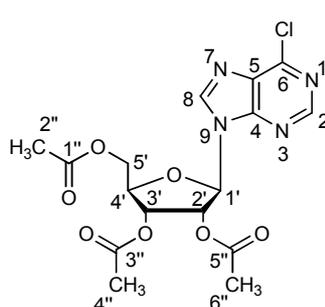
6-Chloro-9-(2', 3', 5'-tri-O-acetyl- β -D-ribofuranosyl)-9H-purine²⁵³ (185)



Es werden 6,00 g 2', 3', 5'-Tri-*O*-acetylinosin (**184**) (15,2 mmol) bei 140°C getrocknet. Anschließend wird das getrocknete Triacetylinosin in eine Lösung aus 20 mL frisch destilliertem Phosphoroxchlorid (15,2 mmol) und 2 mL *N,N*-Dimethylanilin (15,2 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird auf 100°C erwärmt. Danach wird das überschüssige Phosphoroxchlorid abdestilliert und der Rückstand wird in Eiswasser gegeben. Die Suspension wird 1 h unter Eiskühlung gerührt bevor dreimal mittels Dichlormethan extrahiert wird. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit 100 mL 1*N* HCl, wirkung von Nicole Florin, Dr. Simone Hildenbrand, Dr. Andrea Behrenswerth und Dr. Aliaa Abdelrae organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt fällt als gelbes Öl an.

$\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{O}_7$ (412,0786 g·mol⁻¹)

- Ausbeute:** 2,9 g (46 %)
- Aussehen:** gelbes Öl
- Löslichkeit:** leicht löslich in Dichlormethan
- R_f-Wert:** 0,46 (Laufmittel: Chloroform : Ethanol = 95 : 5 (v/v)).



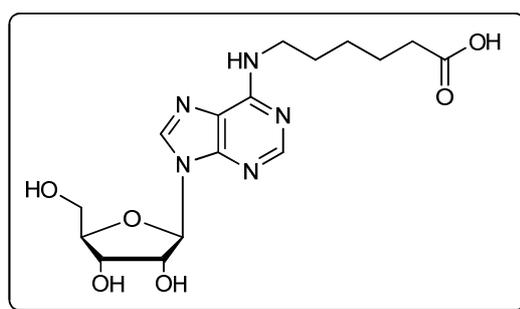
¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1,99 (s, 3H, 4''-COCH₃), 2,03 (s, 3H, 6''-COCH₃), 2,11 (s, 3H, 2''-COCH₃), 4,25 (d, J = 7,3 Hz, 2H, 5'-CH₂), 4,38 (t, J = 6,9 Hz, 1H, 4'-CH₂), 5,65 (d, J = 6,7 Hz, 1H, 2'-CH), 6,01 (d, J = 6,7 Hz, 1H, 3'-CH), 6,36 (d, J = 6,8 Hz, 1H, 1'-CH₂), 8,83 (s, 1H, 2-CH), 8,88 (s, 1H, 8-CH).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ = 20,5, 20,3 (+, 2C, COOCH₃-2'', COOCH₃-4''), 20,5 (+, COOCH₃-6''), 62,6 (-, CH₂-5''), 70,5 (-, CH₂-2'), 72,2 (-, CH₂-3'), 79,8 (+, CH-4'), 86,5 (-, CH-1'), 131,7 (C-5), 146,4 (+, CH-8), 149,9 (NCN-4),

151,5 (+, CH-2), 152,0 (CO-6), 169,4 (CO-5''), 169,6 (CO-3''), 170,2 (CO-1''). Die Daten entsprechen den Literaturwerten²⁵³.

MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 413,2

N-[N⁶-adenosyl]-6-aminohexansäure²²⁸ (186)



Es werden 1,00 g 6-Chloro-9-(2', 3', 5'-tri-O-acetyl- β -D-ribofuranosyl)-9H-purine (**185**) (2,40 mmol) und 1,96 g 6-Aminohexansäure in einem Gemisch aus 5 mL Ethanol und 12,5 mL Wasser gelöst und mit 12,5 mL Triethylamin (90,2 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 3 Tage bei 80 °C gerührt. Im Anschluss wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 5 mL Ethanol gelöst. Durch die Zugabe von 2 mL Diethylether wird ein Niederschlag erhalten, der abfiltriert und

verworfen wird. Das Filtrat wird unter vermindertem Druck eingengt und der Rückstand aus einem Gemisch aus Ethanol : Diethylether : Petrolether = 1 : 1 : 1 (v/v/v) umkristallisiert.

$C_{16}H_{23}N_5O_6$ (381,1648 $g \cdot mol^{-1}$)

Ausbeute: 0,831 g (91 %)

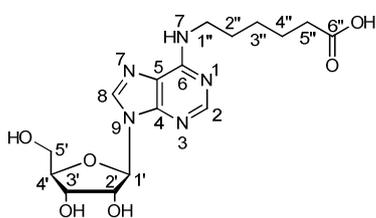
Aussehen: weißer Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Wasser, Methanol, Ethanol;

schwer löslich in Dichlormethan

Schmelzpunkt: 190-193 °C

R_f-Wert: 0,13 (Laufmittel: Chloroform : Ethanol = 95/5 (v/v)).

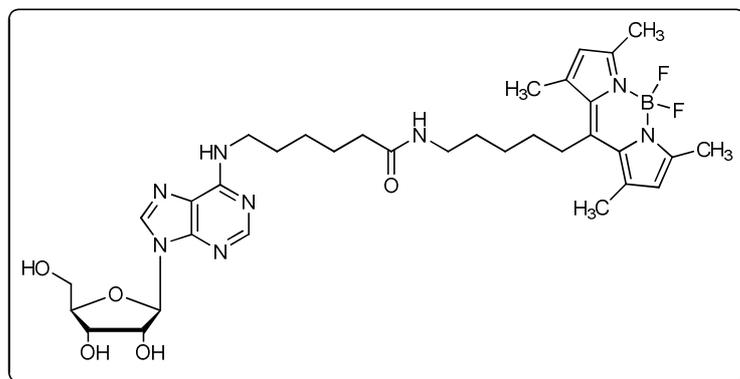


1H -NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1,32 (m, 2H, 3''-CH₂), 1,59 -1,67 (m, 6H, 2''-CH₂, 4''-CH₂, 1''-CH₂), 3,45 (m, 2H, 5''-CH₂), 3,53 - 4,13 (br, 3H, 2'-OH, 3'-OH, 5'-OH), 3,67 (dd, J = 3,5 Hz, 1H, 4'-CH₂), 3,95 (d, J = 3,5 Hz, 1H, 3'-CH), 4,59 (m, 1H, 2'-CH), 5,87 (d, J = 6,0 Hz, 1H, 1'-CH), 7,82 (br, 1H, 7-NH), 8,18 (s, 1H, 2-CH), 8,31 (s, 1H, 8-CH). **^{13}C -NMR (DMSO-d₆, 125 MHz):** δ = 24,5 (-, C-4''), 26,1 (-, C-3''), 29,0 (-, C-2''), 33,9 (-, C-1''), 45,8 (-, C-5''), 61,8 (-, CH₂-5''), 70,8 (+, CH-2'), 73,6 (+, CH₂-3'), 86,0 (+, CH-4'), 88,1 (+, CH-1'), 139,7 (+, CH-8), 152,5 (+, CH-2), 174,6 (COOH-6'). Die Daten entsprechen den Literaturwerten²²⁸.

MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 354,1

[M-H]⁺ = 352,2

6-(9-Ribofuranosyl-9H-purin-6-ylamino)-N-(5-(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)pentyl)hexansäureamid²²⁸ (187)



Unter Schutzgasatmosphäre werden 84,5 mg Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOB) (0,16 mmol), 54,1 mg N-[N⁶-adenosyl]-6-aminohexansäure (**186**) und 21,9 mg 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) (0,16 mmol) in 3 mL trockenem DMF vorgelegt. Es werden 37 µL Diisopropylamin (DIPEA) zugegeben und eine min gerührt. Danach werden 57,4 mg 8-(5-Aminopentyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (**15**) (0,16 mmol), welches zuvor in 2 mL trockenem DMF gelöst worden sind, zugegeben. Es wird 4 Tage unter Lichtausschluss und unter Argonatmosphäre gerührt. Im Anschluss wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch, unter Aufziehen des Rohproduktes auf Silicagel, gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan : Methanol = 9 : 1 (v/v)). Das Produkt ergibt sich als orange-roter Feststoff.

$C_{34}H_{47}BF_2ON_8O_5$ (696,3731 g·mol⁻¹)

Ausbeute: 65,4 mg (59 %)

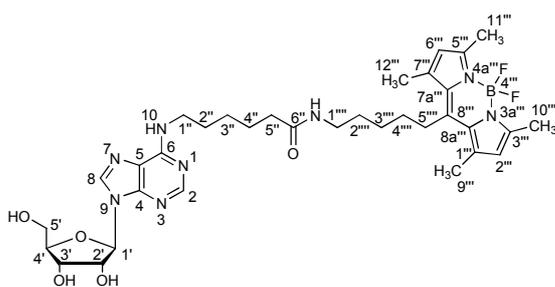
Aussehen: orange-roter Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Methanol, Ethanol;

schwer löslich in Dichlormethan und Diethylether

Schmelzpunkt: 106 °C unter Zersetzung

R_f-Wert: 0,67 (Laufmittel: Dichlormethan : Methanol = 9 : 1 (v/v)).



$^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 500 MHz): $\delta = 144 - 1,52$ (m, 12H, 2''- CH_2 , 3''- CH_2 , 2''''- CH_2 , 3''''- CH_2 , 4''''- CH_2), 1,72 (m, 2H, 5''''- CH_2), 2,09 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H, 5''- CH_2), 2,38 (s, 6H, 9''''- CH'''' - CH_3), 2,39 (s, 6H, 10''''- CH'''' - CH_3), 2,90 (m, 2H, 1''''- CH_2), 3,01 (m, 2H, 1''- CH_2), 3,53 (d, $J = 3,5$ Hz), 5'- CH_2), 3,55 (d, $J = 3,8$ Hz, 3'- CH_2), 3,66 (dd, $J = 3,8$ Hz, 4'- CH), 3,94 (m, 1H, 5'- CH), 4,13 (br, 1H, 3'- OH), 4,66 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H, 2'- CH), 5,87 (d, $J = 3,5$ Hz, 1H, 1'- CH_2), 6,21 (s, 2H, 2''''- CH , 6''''- CH) 7,68 (t, $J = 6,4$, 1H, 6''- CONHR), 7,91 (br, 1H, 10- NH), 8,19 (s, 1H, 2- CH), 8,33 (s, 1H, 8- CH). **$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz):** $\delta = 14,2$ (+, CH_3 -10, CH_3 -11), 16,0 (+, CH_3 -9, CH_3 -12), 25,3 (-, CH_2 -4''), 26,0 (-, CH_2 -3'''), 26,2 (-, CH_2 -3'''), 27,1 (-, CH_2 -4'''''), 27,9 (-, CH_2 -2'''''), 29,0 (-, CH_2 -2''), 31,3 (-, CH_2 -5'''''), 35,6 (-, CH_2 -5''), 38,3 (-, CH_2 -1'''), 46,0 (-, CH_2 -1''), 61,8 (-, CH_2 -5'), 70,8 (+, CH -2'), 73,7 (+, CH -3'), 86,0 (+, CH -4'), 88,1 (+, CH -1'), 117,4 (C -5), 121,8 (+, CH -2''', CH -6'''), 130,9 (C -7a, C -8a), 131,7 (C -5), 139,8 (+, CH -8), 140,9 (C -7, C -1), 146,9 (C -8'''), 150,1 (NCN), 153,1 (C-NH_2), 154,6 (C -3''', C -5'''), 172,01 (6''- CONHR).

MS (ESI) (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 697,8$

$[\text{M}-\text{H}]^+ = 695,5$

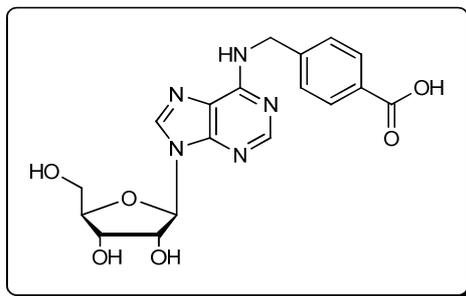
$[\text{M}+\text{Na}]^+ = 719,5$

Spektroskopische Daten: Absorption $\lambda_{\text{max}} = 498$ nm

Emission $\lambda_{\text{max}} = 506$ nm

Fluoreszenzquantenausbeute: $\Phi = 0,94$

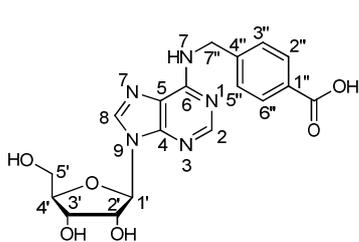
4-[[9-(Ribofuranosyl)-9H-purin-6-ylamino]methyl]benzoesäure²²⁸ (188)



Es werden 1,00 g 6-Chloro-9-(2', 3', 5'-tri-O-acetyl-b-D-ribofuranosyl)-9H-purine (**185**) (2,40 mmol) und 2,26 g 4-(Aminomethyl)benzoesäure (15,0 mmol) in einem Lösungsmittelgemisch, bestehend aus 5 mL Ethanol und 12,5 mL Wasser, gelöst und mit 12,5 mL Triethylamin (90,2 mmol) versetzt. Es wird drei Tage bei 80°C gerührt. Im Anschluss wird das Lösungsmittelgemisch unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 5 mL Ethanol gelöst. Der durch Zutropfen von 2 mL Diethylether anfallende Niederschlag wird abfiltriert und verworfen. Das Filtrat wird eingengt und das Rohprodukt aus einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus Diethylether : Ethanol : Petrolether = 1 : 1 : 1 (v/v/v) umkristallisiert. Das Produkt fällt als weißer Feststoff an.

$C_{18}H_{19}N_5O_6$ (353,1335 g·mol⁻¹)

- Ausbeute:** 493 mg (58 %)
- Aussehen:** weißer Feststoff
- Löslichkeit:** leicht löslich in Wasser, Ethanol, Methanol;
unlöslich in Dichlormethan
- Schmelzpunkt:** 184-186 °C
- R_f-Wert:** 0,23 (Laufmittel: Dichlormethan : Methanol = 2 : 1 (v/v)).



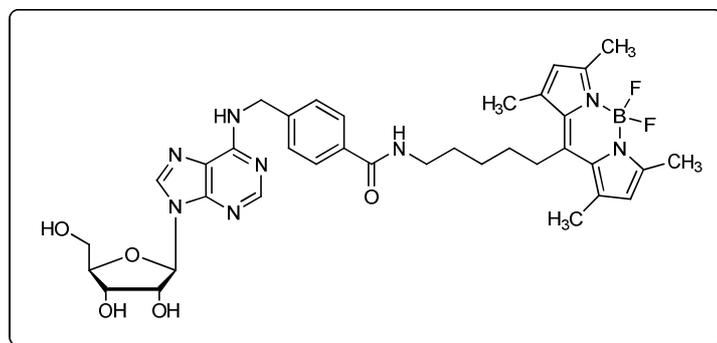
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 500 MHz): $\delta = 3,49$ (br, 1H, 3'-OH), 3,53 (m, 1H, 4'-CH), 3,55 (d, $J = 3,5$ Hz, 3'-CH), 3,67 (dd, $J = 3,5$ Hz, $J = 3,7$ Hz, 1 H, 5'-CH), 3,95 (br, 1H, 2'-OH), 4,15 (br, 1H, 5'-OH), 4,35 (m, 2H, 7''-CH₂), 4,76 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H, 2'-CH₂), 5,89 (d, $J = 6,0$ Hz, 1'-CH), 7,40 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H, 3''-CH, 5''-C''-CH, 6''-CH), 8,18 (s, 1H, 2-CH), 8,37 (s, 1H, 8-CH), 8,47 (br, 1H, 7-NH). **$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d₆, 125 MHz):** $\delta = 45,7$ (-, CH₂-7''), 61,8 (-, CH₂-5'), 70,8 (+, CH-2'), 73,6 (+, CH-3'), 86,0 (+, CH-4'), 88,1 (+, CH-1'), 127,1 (+, 2C, CH-6'', CH-2''), 129,4 (+, 2C, CH-3'', CH-5''), 140,1 (+, CH-8), 144,9 (C-1''), 148,7 (C-4''), 152,5 (+, CH-2), 154,6 (C-6), 167,3 (COOH). Die Daten entsprechen den Literaturwerten²²⁸

$\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_6$ (401,1335 g·mol⁻¹)

MS (ESI) (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 354,3$

$[\text{M}-\text{H}]^+ = 353,1$

4-{[9-(Ribofuranosyl)-9H-purin-6-ylamino]methyl}benzoesäure²²⁸ (189)



Unter Schutzgasatmosphäre werden 115 mg 4-{[9-(Ribofuranosyl)-9H-purin-6-ylamino]methyl}benzoesäure (**188**) (0,16 mmol), 115 mg HCTU (0,28 mmol) und 37,0 mg Hobt (0,28 mmol) in 3 mL trockenem DMF gelöst und nach Zugabe von 2 mL DIPEA wird die Reaktionslösung 1 min gerührt. Anschließend werden 94 mg 8-(5-Aminopentyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-s-indacen (**12**) (0,28 mmol), welches zuvor in 2 mL trockenem DMF gelöst worden ist, langsam hinzugefügt. Es wird 24h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt, wobei das Rohprodukt auf Silicagel

aufgezogen wird (Laufmittel Dichlormethan : Methanol = 9 : 1 (v/v) + 2% NEt₃). Das Produkt fällt als rot-oranger Feststoff an.

C₃₆H₄₃BF₂N₈O₅ (716,3418 g·mol⁻¹)

Ausbeute: 71 mg (62 %)

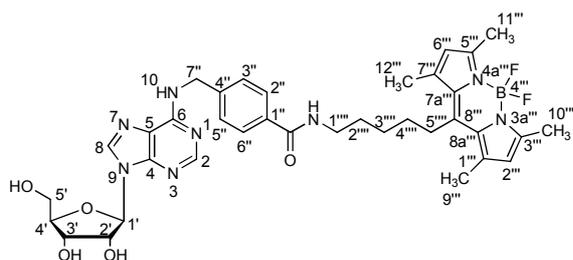
Aussehen: rot-oranger Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in Ethanol, Methanol;

unlöslich in Dichlormethan

Schmelzpunkt: 145 °C unter Zersetzung

R_f-Wert: 0,69 (Laufmittel: Dichlormethan : Methanol = 9 : 1 (v/v) + 2% NEt₃).



¹H-NMR (DMSO, 500 MHz): δ = 1,24 (m, 2H, 3''''-CH₂), 1,49 - 1,60 (m, 6H, 2''''-CH₂, 4''''-CH₂, 5''''-CH₂), 2,36 (s, 12H, 10''''-CH₃, 11''''-CH₃, 9''''-CH₃, 12''''-CH₃), 2,91 (m, 2H, 1''''-CH₂), 3,65 (br, 1H, 2'-OH), 3,95 (br, 1H, 3'-OH), 4,14 (d, J = 4,7 Hz, 1H, 5'-CH_A), 4,30 (t, J = 5,0 Hz, 1H, 4'-CH), 4,60 (d, J = 6,1 Hz, 3'-CH), 4,74 (s, 2H,

7''-CH₂), 5,14 (br, 5'-OH), 5,31 (m, 1H, 5' -CH_B), 5,39 (d, J = 6,3 Hz, 2'-CH), 5,89 (d, J = 6,3 Hz, 1'-CH), 6,20 (s, 2H, 2''''-CH, 6''''-CH), 7,39 (d, J = 6,3 Hz, 2''-CH, 5''-CH), 7,39 (d, J = 6,3 Hz, 2H, 3''-CH, 5''-CH), 8,18 (br, 1H, 10-NH), 8,37 (s, 1H, 2-CH), 8,45 (s, 1H, 8-NH). **¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz):** δ = 14,2 (+, 10''''-CH₃, 11''''-CH₃), 16,8 (+, CH₃-9''''), CH₃-12'''), 27,2 (-, CH₂-4''''), 27,9 (-, CH₂-3''''), 28,9 (-, CH₃-5''''), 42,9 (-, CH₂-1''''), 31,3 (-, CH₂-2'''), 53,8 (-, CH₂-7''), 61,8 (-, CH-2'), 70,8 (+, CH-2'), 73,7 (+, CH-3'), 86,0 (+, CH-4'), 88,1 (+, CH-1'), 121,9 (+, CH-2''', CH-6'''), 126,9 (+, CH-3'', CH-5''), 127,3 (+, CH-2'', CH-6''), 130,8 (C-1''), 133,3 (2C, C-1''', C-7'''), 140,12 (C-8), 141,0 (C-4'), 146,9 (C-3''', C-5'''), 152,4 (+, C-2), 153,2 (C-6), 166,2 (CONHR).

MS (ESI) (m/z): [M+H]⁺ = 717,3

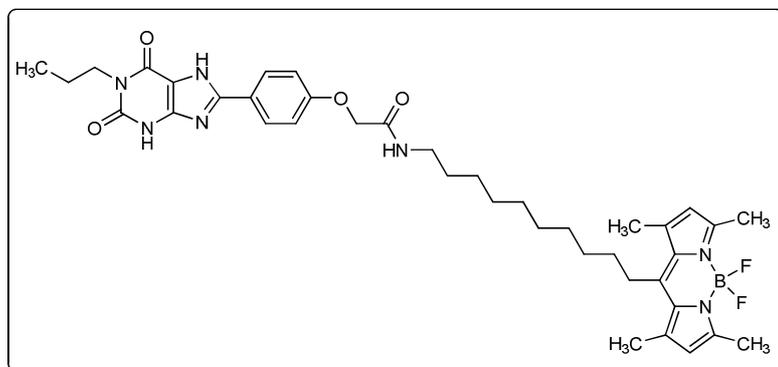
[M-H]⁺ = 715,5

Spektroskopische Daten: Absorption λ_{max} = 498 nm

Emission λ_{max} = 506 nm

Fluoreszenzquantenausbeute: Φ = 0,94

4-(1-Propyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)-N-[10-(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)-decyl]phenoxyessigsäureamid²²⁸ (190)



Es werden 192 mg 1-Propyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (0,56 mmol) in 5 mL DMF gelöst und mit 68 μ L *N*-Morpholin (0,44 mmol) versetzt. Nachdem 5 min bei Raumtemperatur gerührt worden ist, wird das Reaktionsgemisch auf - 30 °C gekühlt und mit 74 μ L Chlorameisensäureisobutylester (0,4 mmol) versetzt. Nach 15 min Rühren bei - 30°C werden 226 mg 8-(10-Aminodecyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen (**21**) hinzugegeben. Es wird 3h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt, wobei das Rohprodukt auf Kieselgel aufgezogen wird. (Laufmittel: Dichlormethan : Methanol = 40 : 1 (v/v)). Das Produkt ergibt sich als oranger Feststoff.

$C_{36}H_{50}BF_2N_7O_4$ (729,3985 $g \cdot mol^{-1}$)

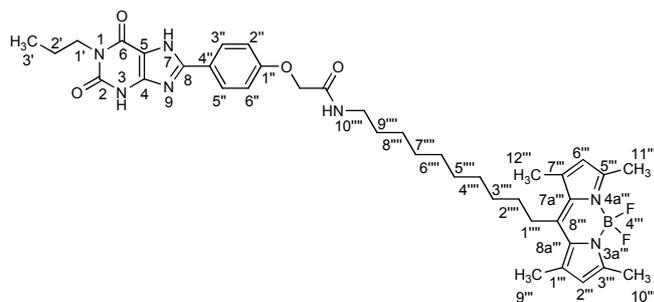
Ausbeute: 36 mg (9%)

Aussehen: oranger Feststoff

Löslichkeit: leicht löslich in DMF, DMSO

Schmelzpunkt: 262 °C unter Zersetzung

R_f-Wert: 0,59 (Laufmittel: Dichlormethan : Methanol = 40 : 1 (v/v)).



¹H-NMR (DMSO, 500 MHz): $\delta =$
 0,91 (t, 3H, 3'-CH₃), 1,19 - 1,56 (m,
 18H, 2'-CH₂, 2''-CH₂, 3''-CH₂, 4''-
 CH₂, 5''-CH₂, 6''-CH₂, 7''-CH₂, 8''-
 CH₂, 9''-CH₂), 2,37 (s, 12H, 9'''-CH₃,
 10'''-CH₃, 11'''-CH₃, 12'''-CH₃),
 2,91 (m, 2H, 1'''-CH₂), 3,20 (t, J = 6,9
 Hz, 10'''-CH₂), 3,78 (t, J = 7,1 Hz,
 2H, 1'-CH₂), 4,53 (s, 2H,

OCH₂CONHR), 6,19 (s, 2H, 2'''-CH, 6'''-CH), 7,05 (m, 2H, 3''-CH, 5''-CH), 8,03 (m,
 3H, 2''-CH, 6''-CH, CONH), 11,79 (br, 1H, 3-NH), 13,43 (br, 1H, 7-NH). **¹³C-NMR
 (DMSO-d₆, 125 MHz):** $\delta =$ 13,8 (+, CH₃-3'), 14,2 (+, CH₃-10''', CH₃-11'''), 15,9 (+,
 CH₃-9''', CH₃-12'''), 19,7 (-, CH₂-2'), 21,0 (-, CH₂-7'''), 26,4 (-, CH₂-9'''), 27,8 (-, CH₂-
 8'''), 28,7 (-, CH₂-6'''), 28,9 (-, CH₂-5'''), 29,0 (-, CH₂-4'''), 29,1 (-, CH₂-3'''), 29,7
 (-, CH₂-2'''), 31,5 (-, CH₂-1'''), 38,5 (-, CH₂-10'''), 41,4 (-, CH₂-1'), 67,2 (-, OCH₂-
 CONHR), 107,38 (C-5), 121,8 (+, CH₂-2''', CH₂-6'''), 130,8 (C-7a''', C-8a'''), 140,9 (C-
 1''', C-7'''), 146,3 (C-8'''), 147,8 (C-4), 150,1 (C-8), 151,1 (C-2), 153,3 (C-5''', C-3'''),
 154,8 (C-6), 167,6 (CH₂CONHR), 115,3 (+, 2C, CH-3'', CH-5''), 122,2 (+, 2C, CH-2'',
 CH-6''), 128,1 (CH-4''), 159,3 (COCH₂).

MS (ESI) (m/z): [M-H]⁻ = 728,7

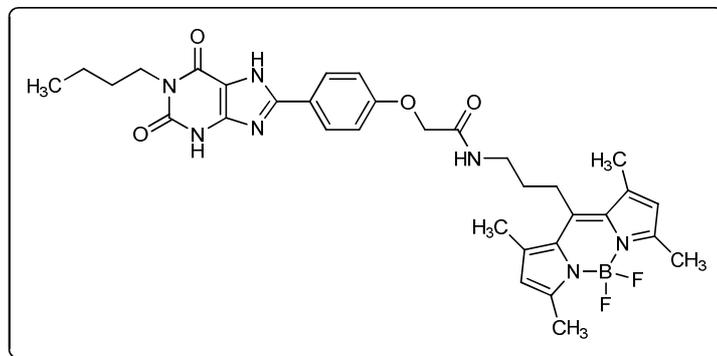
[M-HF]⁻ = 708,8

Spektroskopische Daten: Absorption $\lambda_{\max} = 498$ nm

Emission $\lambda_{\max} = 506$ nm

Fluoreszenzquantenausbeute: $\Phi = 0,94$

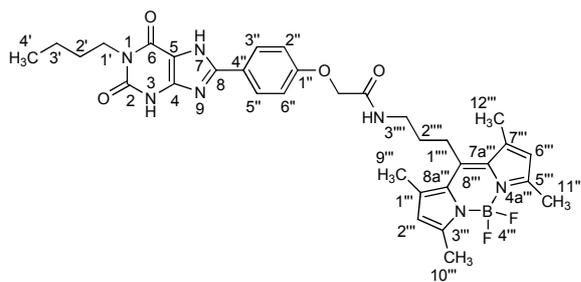
4-(1-Butyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)-N-[3-(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yl)-propyl]phenoxyessigsäureamid²²⁸ (191)



Es werden 100 mg 1-Butyl-purin-2,6-dion-8-phenoxyessigsäure (0,28 mmol) in 5 mL DMF gelöst und mit 35 μ L *N*-Morpholin (0,31 mmol) versetzt. Nachdem 5 min bei Raumtemperatur gerührt worden ist, wird das Reaktionsgemisch auf - 30 °C gekühlt und mit 38 μ L Chlorameisensäureisobutylester (0,28 mmol) versetzt. Nach 15 min Rühren bei - 30°C werden 86,0 mg 8-(3-Aminopropyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen (**10**) hinzugegeben. Es wird 3h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt, wobei das Rohprodukt auf Kieselgel aufgezogen wird. (Laufmittel: Dichlormethan : Methanol = 40 : 1 (v/v)). Das Produkt ergibt sich als oranger Feststoff.

$C_{33}H_{38}BF_2N_7O_4$ (645,3046 $g \cdot mol^{-1}$)

Ausbeute:	51 mg (28%)
Aussehen:	oranger Feststoff
Löslichkeit:	leicht löslich in DMF, DMSO
Schmelzpunkt:	289 °C unter Zersetzung
R_f-Wert:	0,63 (Laufmittel: Dichlormethan : Methanol = 40 : 1 (v/v)).



$^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 500 MHz): $\delta = 0,91$ (t, 3H, 4'- CH_3), 1,20 (m, 2H, 3'- CH_2), 1,25 - 1,74 (m, 4H, 2'- CH_2 , 2''- CH_2), 2,40 (s, 12H, 9'''- CH_3 , 10'''- CH_3 , 11'''- CH_3 , 12'''- CH_3), 2,94 (m, 2H, 3'''- CH_2), 3,32 (m, 1'''- CH_2), 3,84 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, 1'- CH_2), 4,56 (s, 2H, OCH_2CONHR), 6,18 (s, 2H, 2'''- CH , 6'''- CH), 7,07 (m, 2H, 3''- CH ,

5''- CH), 8,04 (m, 3H, 2''- CH , 6''- CH , CONH), 8,32 (br, 1H, CONH), 11,80 (br, 1H, 3-NH), 13,44 (br, 1H, 7-NH). **$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz):** $\delta = 11,2$ (+, CH_3 -4'), 14,2 (+, CH_3 -10''', CH_3 -11'''), 15,9 (+, CH_3 -9''', CH_3 -12'''), 19,7 (-, CH_2 -3'), 25,6 (-, CH_2 -2'''), 29,7 (-, CH_2 -3'''), 31,5 (-, CH_2 -2'), 38,2 (-, CH_2 -1'''), 67,2 (-, OCH_2CONHR), 107,4 (C-5), 121,8 (+, CH_2 -2'', CH_2 -6''), 130,8 (C-7a'', C-8a''), 140,9 (C-1'', C-7'''), 146,3 (C-8'''), 147,8 (C-4), 150,1 (C-8), 151,1 (C-2), 153,3 (C-5''', C-3'''), 154,8 (C-6), 167,6 (CH_2CONHR), 115,3 (+, 2C, CH -3'', CH -5''), 122,2 (+, 2C, CH -2'', CH -6''), 128,1 (CH -4''), 159,3 (COCH_2).

MS (ESI) (m/z): $[\text{M-H}]^- = 644,3$

$[\text{M-HF}]^- = 624,7$

Spektroskopische Daten: Absorption $\lambda_{\text{max}} = 498$ nm

Emission $\lambda_{\text{max}} = 506$ nm

Fluoreszenzquantenausbeute: $\Phi = 0,94$

11.6 Fluoreszenzquantenausbeute

Theoretische Grundlagen

Die Fluoreszenzquantenausbeute ist eine wichtige photophysikalische Eigenschaft von fluoreszierenden Molekülen, da diese ein direktes Maß für die Helligkeit eines Fluorophors darstellt. Die Fluoreszenzquantenausbeute ist definiert als das Verhältnis der Anzahl der emittierten Photonen zu der Anzahl der absorbierten Photonen. Die Entvölkerung des angeregten Zustands kann, wie bereits in Kap. 4.3 erwähnt, zum einen mittels Fluoreszenz zum anderen durch strahlungslose Deaktivierung erfolgen. Dabei gilt für diese Prozesse mit den Geschwindigkeitskonstanten k_F und k_{nr} (nr.: engl. **n**on**r**adiative) folgende Gleichung:

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{nr}} = \frac{k_F}{k_0} \quad (\text{Gleichung 3})$$

Die einfachste Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten ist die Bestimmung relativer Fluoreszenzquantenausbeuten. Dabei wird ein Fluoreszenzstandard mit bekannter Quantenausbeute mit dem zu bestimmenden Fluorophor durch Ermittlung der integralen Fluoreszenzintensität der Probe und des Standards miteinander verglichen²⁵⁴. Da bei hohen Konzentrationen der Fluorophore Filtereffekte und daraus resultierend eine geringe Fluoreszenzintensität auftreten, müssen die Lösungen bei einer optischen Dichte $\leq 0,05$ vermessen werden. Die Fluoreszenzquantenausbeute der zu vermessenden Probe Φ_x ergibt sich nach folgender Formel:

$$\Phi_x = \Phi_r \cdot \frac{I_x}{I_r} \cdot \frac{OD_r}{OD_x} \cdot \frac{n_x^2}{n_r^2} \quad (\text{Gleichung 4}),$$

wobei Φ_r die Quantenausbeute der Referenz, I_x und I_r die integrierten Fluoreszenzintensitäten der Probe und der Referenz, OD_r und OD_x die optischen Dichten der Referenz und der Probe und n_x und n_r die Brechungsindizes der Lösungsmittel sind.

Da die Fluoreszenzintensität abhängig ist von der Art und Beschaffenheit der Küvette, der Anregungswellenlänge, der Intensität des einfallenden Lichts und der optischen Dichte, dürfen diese Parameter bei den Messungen nicht variieren. Wenn nun die gleiche Küvette und dasselbe Lösungsmittel verwendet werden, kann Gleichung 2 folgendermaßen vereinfacht werden:

$$\Phi_x = \Phi_r \cdot \frac{I_x}{I_r} \cdot \frac{OD_r}{OD_x} \quad (\text{Gleichung 5})$$

Die zur Lösung dieser Gleichung benötigten Variablen, können experimentell bestimmt und die Fluoreszenzquantenausbeute dementsprechend relativ zu einem Standard bestimmt werden.

Durchführung

Für die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten wurden Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 0,2 bis 1 cm. Alle Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 25°C und in dem Lösungsmittel Ethanol, das einen spektroskopischen Reinheitsgrad aufwies. Als Referenz wurde der Fluorophor Rhodamin 6G gewählt, der kommerziell erworben wurde. Dessen Anregungs- und Emissionsspektren entsprechen den zu untersuchenden Proben sehr gut und der Fluoreszenzquantenausbeute von Rhodamin 6G beträgt in Ethanol 0,94²⁵⁴.

Die Bestimmung der optischen Dichten erfolgte mit einem Spektralphotometer der Firma Perkin Elmer (Modell UV/VIS Spectrometer lambda 25). Es wurde darauf geachtet, dass die optische Dichte der Proben zwischen 0,048 bis 0,051. Die so charakterisierten Lösungen wurden anschließend mit einem Fluorimeter der Firma Varian (Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer) vermessen. Die Spaltbreite für die Absorption und Emission betrug 5 nm. Die Bestimmung der Flächen unter den korrigierten Spektren erfolgte mit Hilfe des Programmes Origin 7.5.

11.7 Zellkultur

11.7.1 Auftauen von Zellen

Ein Backup der entsprechenden Zelllinie wird möglichst schnell aufgetaut und steril in eine Zellkulturflasche, die bereits zuvor mit vorgewärmtem Medium befüllt wurde, überführt. Die Zellen werden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95%iger Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach einigen Stunden im Brutschrank wird das Medium gewechselt und dann alle 2-4 Tage erneuert bzw. die Zellen bei Bedarf gesplittet.

11.7.2 Zellkultur

Die eukariotischen Zelllinien werden bei 37°C, 5% CO₂ und 95%iger Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Bei ca. 80-90%iger Konfluenz der adhärent wachsenden Zellen wird das Medium entfernt und die Zellen mit ca. 10 ml PBS-Puffer gewaschen. Anschließend werden die Zellen durch die Zugabe von ca. 5 ml Trypsin/EDTA Lösung für eine 175 cm² oder 75 cm² große Flasche nach mehrminütiger Inkubation abgelöst, wozu unter Umständen zusätzlich ein Klopfen gegen die Zellkulturflasche erforderlich ist. Die Reaktion mit Trypsin wird durch die Zugabe von Medium abgestoppt, wobei das Volumen an Medium sich nach dem jeweiligen Splittverhältnis richtet. Die durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzelt Zellsuspension wird je nach Vorhaben und Wachstumsgeschwindigkeit auf Zellkulturflaschen verteilt, in denen bereits auf 37°C vorgewärmtes Medium vorgelegt wurde. Anschließend werden die Zellen erneut unter oben genannten Bedingungen im Brutschrank inkubiert.

Einfrieren von Zellen

Zum Erstellen von Backups werden die Zellen wie bereits in oberen Abschnitt beschrieben durch Zugabe von Trypsin abgelöst. Die entstandene Zellsuspension wird in Falcon-Tubes überführt und bei 1000 g und 4°C für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in einer Lösung aus 90% fötalem Kälberserum (FCS) und 10% sterilem DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension wird in Kryovials zu 1 ml aliquotiert und sofort bei -20°C eingefroren. Nach 2 Tagen werden die Backups in den -80°C-Tiefkühlschrank und nach einigen Tagen für eine längere Aufbewahrung in den Stickstofftank überführt.

Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wird ein *Neubauer-Hämazytometer* verwendet. Dazu werden die beiden Stege der Zählkammer leicht angefeuchtet und das Deckglas mit leichtem Druck an die Oberfläche der Zählkammer angedrückt. Nun werden 10 μL der gut suspendierten Zellsuspension zwischen Deckglas und Zählkammer gegeben. Anschließend erfolgt das Auszählen der 4 Großquadrate (bestehend aus 16 Kleinquadraten), wobei lediglich lebende Zellen gezählt werden. Es wird über alle 4 Großquadrate gemittelt und der erhaltene Wert mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Somit erhält man die Anzahl der Zellen pro mL Zellsuspension.

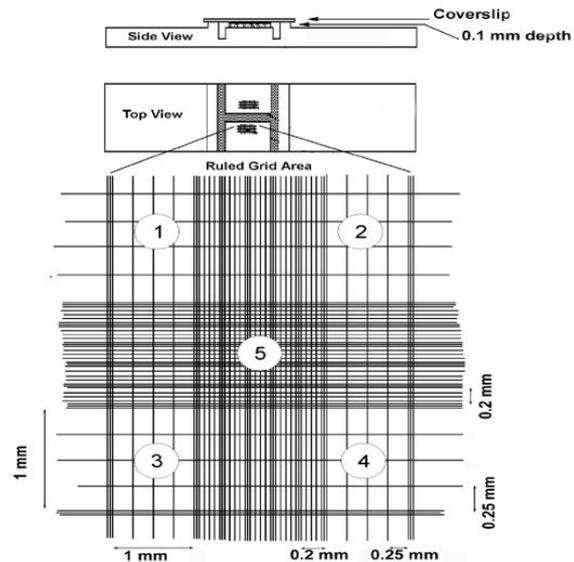


Abb. 110 Neubauer Hämazytometer.²⁵⁵
Volumen pro Quadrat = 0,1 mm^3

Bestimmung der Zellzahl:

$$\text{Zellzahl} \left[\frac{\text{Probensuspension}}{\text{mL}} \right] = (\text{Zellen pro Großquadrat}) \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10^4$$

11.7.3 Membranpräparation von CHO-Zellen⁵⁶

Bei 70-80%iger Konfluenz von 200 Gewebekulturschalen wird zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit je 2 mL PBS-Puffer pro Kulturschale gewaschen. Die Kulturschalen werden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Anschließend werden die Schalen aufgetaut und unter Eiskühlung mit je 1-2 mL Tris-EDTA-Lösung versetzt und die Zellen mit Hilfe eines Gummischabers von den Platten abgelöst. Die Zellsuspension wird unter Eiskühlung gesammelt und anschließend mittels Ultraturrax zweimal 15 sec aufgeschlossen. Die Suspension wird 10 min bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet P1 wird verworfen und der Überstand 60 min bei 37000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet P2 wird in 0,1 mL 50 mM Tris-Inkubationspuffer (pH = 7,4) pro Kulturschale resuspendiert. Nach Homogenisieren mittels Ultraturrax wird das Membranprotein aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei - 80°C gelagert.

11.7.4 Membranpräparation von Rattencortex

Die von der Firma Pel, Freez® (Rogers, Arkansas, USA) bezogenen tiefgefrorenen Rattenhirne werden bis zu ihrer Präparation bei - 80°C gelagert. Die Hirne werden langsam in 100 mL eiskalter Sucrose (0,32 M) auf Eis aufgetaut. Für die Präparation wird eine eisgekühlte Glasplatte verwendet. Die Hirne werden mittels einer Pinzette am Kleinhirn fixiert und das Cortex mit Hilfe eines Skalpell abgeschabt bis die darunterliegende hellere Hirnregion sichtbar wird. Das erhaltene Cortex wird in 100 mL eiskalter Sucrose-Lösung (0,32 M) auf Eis gesammelt. Anschließend wird mit Hilfe des Glaspotters unter Eiskühlung homogenisiert. Es wird 10 min bei 1000 g und 4°C zentrifugiert, so dass die groben Zelltrümmer mit dem P1 Pellet vorsichtig abgetrennt werden können. Der Überstand wird 60 min bei 37 000 g und 4°C zentrifugiert. Der entstehende Überstand wird abdekantiert und verworfen. Das Pellet P2 wird in 200 mL eiskaltem deionisiertem und autoklaviertem Wasser aufgenommen und mittels Ultraturrax 10 s homogenisiert. Danach wird für 60 min bei 37 000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 200 mL 50 mM Tris-Puffer (pH = 7,4) resuspendiert und zur Aufreinigung den gleichen Zentrifugationsbedingungen noch einmal unterworfen. Das entstandene Pellet wird letztlich in Tris-Puffer (2 mL pro Hirn) aufgenommen und mittels

Ultraturrax homogenisiert. Die Suspension wird aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei - 80°C gelagert.

11.7.5 Membranpräparation von Rattenstriatum

Nachdem das Cortex wie im oberen Abschnitt beschrieben entfernt wurde, wird die vordere rechte und linke Großhirnhälfte vorsichtig aufgeklappt bis das Caudatum putamen (Striatum) sichtbar ist. Dieses wird mittels Skalpell herauspräpariert und in 100 mL eiskalten 50 mM Trispuffer (pH = 7,4) gegeben. Für die Bestimmung des Nassgewichtes wird das Gewebe in ein tariertes Sieb überführt und das Gewebe nach Abtropfen gewogen. Das Gewebe wird danach in 160 mL eiskalten 50 mM Trispuffer (pH = 7,4) überführt und mittels Ultraturrax 10 sec homogenisiert. Die Suspension wird 15 min bei 37 000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und verworfen. Das Pellet P1 wird mit eiskaltem 50 mM Tris-Puffer (pH = 7,4) (1 mL pro 100 mg Nassgewicht) aufgenommen und mit Hilfe des Ultraturrax 10 sec homogenisiert. Das Homogenat wird aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei - 80 °C tiefgefroren.

11.8 Proteinbestimmung

11.8.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Theoretische Grundlagen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der von Lowry beschriebenen Methode²⁵⁶ ist ein kolorimetrisches Verfahren für die Konzentrationsbestimmung löslicher und unlöslicher Proteine. Dazu wird zunächst eine Biuretreaktion unter alkalischen Bedingungen durchgeführt. Dabei bildet das Protein nach Zugabe von Cu^{2+} -Ionen in Form des Kupfertartrat-Reagenzes zunächst einen blauen, quadratisch-planaren Komplex. In einer nachgeschalteten Reaktion wird Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert, welches wiederum das Folin-Ciocalteu Reagenz, das unter anderem Natriumwolframat (Na_2WO_4) und Natriummolybdat (Na_2MoO_4) enthält, zu Molybdänblau reduziert. Es resultiert eine intensive Blaufärbung, die für die quantitative Proteinbestimmung genutzt werden kann. Aufgrund der nachgeschalteten Farbreaktion ist die Methode nach Lowry genauer als die Biuret-Methode. Allerdings ist diese Methode auch durch nicht-proteinogenen Substanzen (z. B. EDTA, TritonX-100, Tris, Mercaptoethanol etc.) beeinflussbar und damit störanfällig. Bei Vorliegen solcher Substanzen müssen die Proteine zuvor mittels Zugabe von Trifluoressigsäure gefällt und anschließend in einem wässrigen Lösungsmittel, das keine Störfaktoren enthält, wieder gelöst werden.

Durchführung

Folgende Lösungen werden für die Proteinbestimmung benötigt:

Lösung A:

Na_2CO_3	10 g	0,01 mol	2%
NaOH	2 g	0,05 mol	0,4%
H_2O (MilliQ)			ad 500 mL

Lösung B:

Cu ₂ SO ₄ *5 H ₂ O	0.25 g	1,28 mmol	0,5%
Na-Tartrat	0.5 g	2,58 mmol	1%
H ₂ O (MilliQ)			ad 50 mL

Lösung C:

Setzt sich aus den Lösungen A und B zusammen im Verhältnis 50 : 1 (Lösung A : Lösung B). Die Lösung muss für jede Proteinbestimmung frisch angesetzt werden.

Lösung D:

Folin-Reagenz (F-9252)	18 mL
H ₂ O (MilliQ)	ad 90 mL

Die Lösung wird in Braunglasflaschen und unter Lichtausschluss gelagert werden.

Zunächst wird die zur Bestimmung der Proteinkonzentration notwendige Kalibriergerade angefertigt. Dazu wird eine Verdünnungsreihe des Standardproteins Rinderserumalbumin (BSA) in Konzentrationen zwischen 50 und 500 µg/mL hergestellt. Die Verdünnungen werden aus der BSA-Stammlösung (1 mg/mL; gelöst in MilliQ-Wasser) und 50 mM Tris-Inkubationspuffer (pH = 7,4) nach unten aufgeführtem Schema hergestellt.

c_{final} (Protein) [µg/mL]	BSA_{Stammlösung} [µL]	Tris-Inkubationspuffer [µL]
50	10	190
100	20	180
200	40	160
300	60	140
400	80	120
500	100	100

Die Verdünnung muss so gewählt werden, dass die jeweiligen Proteinkonzentrationen und damit die Absorption in der gleichen Größenordnung liegen, da die Bestimmung unter Zuhilfenahme des Lambert-Beer'schen Gesetz erfolgt. Dieser lineare Zusammenhang

besteht allerdings nur bei hinreichend verdünnten Lösungen, so dass die Extinktion der Proben den Wert 0,8 nicht überschreiten darf. Über diesen Zusammenhang kann letztendlich die Proteinkonzentration bestimmt werden. Der Sollwert für die optische Dichte beträgt 0.66 bei $\lambda = 280$ nm (Quarzküvette).

Es werden zwei verschiedene Verdünnungen (1 : 10 und 1 : 20) des zu bestimmenden Proteins sowie ein Nullwert hergestellt. Die Bestimmung erfolgt in Duplikaten.

Die Verdünnungen des zu bestimmenden Proteins, die der Kalibriergeraden sowie der Nullwert, werden mit je 1000 μ L der Lösung C versetzt und sofort gevortext. Nach 20 minütiger Inkubation werden je 100 μ L Lösung D hinzugegeben und ebenfalls sofort gevortext. Nach 30 min Inkubation werden die Proben in Küvetten überführt und im Spektralphotometer bei $\lambda = 500$ nm gegen den Nullwert vermessen. Die Messung sollte innerhalb von 30 min beendet sein.

11.8.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach der von Bradford beschriebenen Methode²⁵⁷ ist ebenfalls eine kolorimetrische Methode, wobei diese deutlich störungsempfindlicher ist als die von Lowry.

Für die Herstellung des Bradford-Reagenzes werden 20 mg Coomassie Blue G 250 in 25 mL Ethanol (96%ig) gelöst und mit 50 mL ortho-Phosphorsäure (85%ig) hinzugefügt. Es wird auf 500 mL mit MilliQ-Wasser aufgefüllt und anschließend mittels Faltenfilter filtriert. Die Lösung wird in einer Braunglasflasche bei 4°C gelagert. Vor Verwendung des Reagenzes wird die benötigte Lösung steril filtriert.

Zu Beginn der Proteinbestimmung muss auch bei dieser Methode eine Kalibriergerade angefertigt werden. Dazu wird eine BSA-Stammlösung (1 mg/mL; gelöst in MilliQ-Wasser) angefertigt und bei 280 nm in einer Quarzküvette im Spektralphotometer vermessen. Der Sollwert für die optische Dichte beträgt wie bereits oben erwähnt 0.66 bei $\lambda = 280$ nm (Quarzküvette). Aufgrund des bestehenden linearen Zusammenhanges zwischen der OD bei 280 nm und der Proteinkonzentration in Lösung kann mit Hilfe der bestimmten OD die tatsächliche Konzentration der Stammlösung bestimmt werden. Diese Stammlösung wird im Folgenden im Verhältnis 1 : 10 verdünnt (Lösung 1) und eine Verdünnungsreihe nach nachfolgendem Schema in Duplikaten angefertigt.

c_{final} (Protein) [µg/mL]	BSA_{Lösung 1} [µL]	Tris-Inkubationspuffer [µL]
0 ^a	0	100
10 ^a	10	90
20 ^a	20	80
40 ^a	40	60
60 ^a	60	40
80 ^a	80	20
100 ^a	100	0

^a Die finale BSA-Konzentration ergibt sich aus der zuvor bestimmten Konzentration der BSA-Stammlösung muss dementsprechend einbezogen werden.

Es werden zwei verschiedene Verdünnungen (1 : 10 und 1 : 20) des zu bestimmenden Proteins sowie ein Nullwert hergestellt. Die Bestimmung erfolgt in Duplikaten.

Die Verdünnungen des zu bestimmenden Proteins, die der Kalibriergeraden sowie der Nullwert, werden mit je 1 mL des Bradford-Reagenzes versetzt und gevortext. Die Proben

werden in Küvetten überführt und bei 595 nm im Spektralphotometer innerhalb von 2-60 min vermessen.

11.9 Radioligand-Bindungsstudien an Adenosin-Rezeptoren

Verdünnungsschemata

Von den zu testenden Substanzen werden Stammlösungen mit den Konzentrationen 10 mM, 1 mM und 0,1 mM hergestellt. Es werden 5 bis 7 Konzentrationen, die einen Konzentrationsbereich von drei Zehnerpotenzen umfassen, von den zu testenden Verbindungen hergestellt und in Bindungsexperimenten am jeweiligen Adenosinrezeptor getestet. Die DMSO-Konzentration beträgt dabei 2,5%. Höhere DMSO-Konzentrationen sollten aufgrund der Beeinflussung der Bindung vermieden werden. Um immer die gleiche DMSO-Konzentration sicherzustellen, wird eine Vorverdünnung (c_{40}) angefertigt, die durch den Eintrag in den Assay im Verhältnis 1 : 40 auf die gewünschte Konzentration (c_{final}) verdünnt wird.

c_{40} [μM]	c_{final} [μM]	$c_{\text{Stocklösung}}$ [mM]	$V_{\text{Stocklösung}}$ [μL]	V_{DMSO} [μL]
4000	100	10	80	120
1200	30	10	30	220
400	10	10	10	240
120	3	1	30	220
40	1	1	10	240
12	0,3	0,1	30	220
4	0,1	0,1	10	240

Für eine Verdünnungsreihe wird die jeweils benötigte höchste Konzentration angefertigt und dann entweder 75 μL der vorigen Verdünnung in 150 μL DMSO für die 1x Verdünnungen oder 75 μL der vorherigen Verdünnung in 175 μL DMSO für die 3x-Verdünnungen gegeben.

Es resultieren Inhibitionskurven, die mit Hilfe des Computerprogrammes Prism 4.0 ausgewertet werden, so dass letztendlich ein K_i -Wert für die Testsubstanz bestimmt werden kann.

Kompetitionsexperimente

Die nach oben beschriebenen Schema verdünnten Testsubstanzen, sowie diejenigen für die Bestimmung der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung, werden bei humanen Rezeptoren in Triplets oder bei murinen Rezeptoren in Dubletts in PE-vials (24- bzw. 48-Rack) bzw. in eine 96er-well plate pipettiert. Anschließend werden der Inkubationspuffer und der in Tris-Puffer verdünnte Radioligand hinzugegeben. Um endogenes, d.h. durch die Membranpräparation erzeugtes Adenosin abzubauen, wird die Proteinsuspension mit ADA 10 - 15 min inkubiert. Das Protein wird danach hinzugefügt, so dass in jedem vial bzw. well zwischen 30 -50 µg Protein vorliegt. Das Kompetitionsexperiment startet durch Zugabe der Proteinsuspension. Der Inkubationsansatz wird gevortext und bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Inkubationszeit von dem jeweils benutzten Radioliganden abhängig ist. Anschließend wird der am Rezeptor gebundene Radioligand von freiem Radioligand mit Hilfe eines Harvesters getrennt. Dabei wird ein GF/B-Filter verwendet, der das Protein mit dem gebundenen Radioliganden zurückhält. Zur Verringerung der unspezifischen Bindung wird dreimal mit eiskaltem Tris-Puffer gewaschen. Die Filter werden bei Verwendung des 24er- und 48er-Harvesters ausgestanzt, in Szintillationsvials überführt und mit je 2,5 mL Szintillationscocktail (Ready Safe™, Beckman Coulter) versetzt. Nach Vorinkubation von 6 - 9 Stunden werden die Proben im LSC-Counter vermessen. Bei Verwendung des 96er-Harvesters werden beim Abtrennen des freien Radioliganden statt GF/B-Filters, 96er-Filterplatten verwendet. Auch hier wird zur Verringerung der unspezifischen Bindung dreimal mit eiskaltem Tris-Puffer gewaschen. Anschließend werden die Filterplatten von unten mit einer Klebefolie versehen. In jedes well werden dann 50 µL Szintillationscocktail (Microscint-20, Perkin Elmer) pipettiert und die Platte abschließend auch von oben mittels Klebefolie versiegelt. Es wird 10h vorinkubiert und anschließend im Topcount®NXT (Packard Instrument Company) gemessen. Es werden jeweils drei unabhängige Experimente in Dubletts bzw. Triplets angefertigt.

Die Auswertung der Experimente erfolgt mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism Version 4.0. Dabei werden die erhaltenen Werte für die unspezifische Bindung von der Gesamtbindung subtrahiert, so dass die spezifische Bindung resultiert. Es kann aus der erhaltenen sigmoidalen Inhibitionskurve der IC_{50} - bzw. der K_i -Wert ermittelt werden²⁵⁸.

RADIOLIGAND-REZEPTOR BINDUNGSSTUDIEN MIT [³H]CCPA AN RATTENCORTEX ODER CHO-hA₁-MEMBRANPRÄPARATIONEN FÜR AGONISTISCHE LIGANDEN

Pipettierschema für den 24er- bzw. 48er-Harvester:

Wasch-/ Inkubationspuffer (A)	190 µL
Testsubstanz oder DMSO (Gesamtbindung) oder CADO (unspezifische Bindung)*	10 µL
Radioligand [³ H]CCPA**	100 µL
Proteinsuspension: Membranpräparation***	100 µL
<hr/>	
Gesamtvolumen	400 µL

Pipettierschema für den 96er-Harvester:

Wasch-/ Inkubationspuffer (A)	45 µL
Testsubstanz oder DMSO oder CADO*	5 µL
Radioligand [³ H]CCPA**	50 µL
Protein: Membranpräparation***	100 µL
<hr/>	
Gesamtvolumen	200 µL

*Endkonzentration 10 nM; rA₁ K_i = 6,7 nM²⁵⁹; hA₁ K_i = 9,3 nM²⁶⁰

**Endkonzentration 1 nM; K_D (Ratte) = 0,2 nM; K_D (human) = 0,61 nM

*** Rattencortexsuspension bzw. Membranpräparation CHO-hA₁ (30 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer, pH = 7,4; vorinkubiert mit 2U ADA/mg Protein

Die Inkubationszeit beträgt 90 Minuten.

RADIOLIGAND-REZEPTOR BINDUNGSSTUDIEN MIT [³H]CGS21680 AN RATTENSTRIATUM ODER HEK293-hA_{2A}-MEMBRANPRÄPARATIONEN FÜR AGONISTISCHE LIGANDEN

Pipettierschema für den 24er- bzw. 48er-Harvester:

Wasch-/ Inkubationspuffer (A)	190 µL
Testsubstanz oder DMSO (Gesamtbindung) oder NECA (unspezifische Bindung)	10 µL
Radioligand [³ H]CGS21680	100 µL
Proteinsuspension: Membranpräparation**	100 µL

Gesamtvolumen 400 µL

*Endkonzentration 50 µM; rA₁ K_i = 9,7 nM⁵⁶; hA₁ K_i = 20 nM²⁵⁹

**Endkonzentration 5 nM; K_D (Ratte) = 15,5 nM; K_D (human) = 26,76 nM

** Rattenstriatumsuspension (30 µg/vial) bzw. Membranpräparation von HEK293-hA_{2A} (Product number RBHA2AM400UA, Membrane Target Systems™, Perkin Elmer) in 50 mM Tris-Puffer, pH = 7,4; vorinkubiert mit 2U ADA/mg Protein

Die Inkubationszeit beträgt 60 Minuten.

RADIOLIGAND-REZEPTOR BINDUNGSSTUDIEN MIT [³H]PSB-603 AN CHO-rA_{2B}- ODER CHO-hA_{2B} MEMBRANPRÄPARATIONEN

Pipettierschema für den 24er- bzw. 48er-Harvester:

Wasch-/ Inkubationspuffer (A)	775 µL
Testsubstanz oder DMSO (Gesamtbindung) oder DPCPX (unspezifische Bindung)*	25 µL
Radioligand [³ H]PSB-603**	100 µL
Proteinsuspension: Membranpräparation***	100 µL

Gesamtvolumen 1000 µL

*Endkonzentration 10 µM; hA_{2B} K_i = 51 nM²⁶¹

**Endkonzentration 0,3 nM; K_D (human) = 0,41 nM

*** Membranpräparation CHO-hA_{2B} (30 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer, pH = 7,4; vorinkubiert mit 2U ADA/mg Protein

Nach dem Absaugen wird der Waschpuffer B zum Waschen verwendet.

Die Inkubationszeit beträgt 75 Minuten.

RADIOLIGAND-REZEPTOR BINDUNGSSTUDIEN MIT [³H]NECA AN CHO-rA₃- ODER hA₃-MEMBRANPRÄPARATIONEN FÜR AGONISTISCHE LIGANDEN

Pipettierschema für den 24er- bzw. 48er-Harvester:

Inkubationspuffer (C)	190 µL
Testsubstanz oder DMSO (Gesamtbindung) oder R-PIA (unspezifische Bindung)*	10 µL
Radioligand [³ H]NECA **	100 µL
Proteinsuspension: Membranpräparation***	100 µL

Gesamtvolumen 400 µL

* Endkonzentration 100 µM; hA₃ K_i = 16 nM⁵⁶

**Endkonzentration 10 nM; K_D (human) = 6,2 nM; K_D (Ratte) = 48 nM

*** Membranpräparation CHO-hA₃ (30 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer, pH = 7,4; vorinkubiert mit 2U ADA/mg Protein

Zum Waschen wird der Waschpuffer A verwendet.

Die Inkubationszeit beträgt 3 Stunden.

RADIOLIGAND-REZEPTOR BINDUNGSSTUDIEN MIT [³H]PSB-11 AN CHO-hA₃-MEMBRANPRÄPARATIONEN FÜR ANTAGONISTISCHE LIGANDEN

Pipettierschema für den 24er- bzw. 48er-Harvester:

Wasch-/ Inkubationspuffer (A)	190 µL
Testsubstanz oder DMSO (Gesamtbindung) oder R-PIA (unspezifische Bindung)*	10 µL
Radioligand [³ H]NECA **	100 µL
Proteinsuspension: Membranpräparation***	100 µL

Gesamtvolumen 400 µL

* Endkonzentration 100 µM; hA₃ K_i = 16 nM⁵⁶

**Endkonzentration 1 nM; K_D (human) = 6,2 nM; K_D (Ratte) = 48 nM

*** Membranpräparation CHO-hA_{2B} (30 µg/vial) in 50 mM Tris-Puffer, pH = 7,4; vorinkubiert mit 2U ADA/mg Protein

Zum Waschen wird der Waschpuffer A verwendet.

Die Inkubationszeit beträgt 45 Minuten.

11.10 Funktionelle Studien an Adenosin-Rezeptoren

Bestimmung der cAMP-Akkumulation in lebenden Zellen

hA₁, hA_{2A} und hA₃

Das Medium einer zu 75 % konfluenten, großen Zellkulturflasche wird zunächst entfernt und die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 5 mL Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und nach Zugabe von 5 mL Medium in ein Standfalcon überführt. Nach Bestimmung der Zellzahl (s. Kapitel 11.6) und entsprechende Verdünnung der Zellsuspension auf 200 000 Zellen pro well einer 24 well-plate werden die Zellen über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wird das Medium entfernt und die Zellen mit 500 µL HBSS/ADA-Puffer (37°C) gewaschen. Nach Zugabe von 300 µL HBSS/ADA-Puffer werden die Zellen 2 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wird der Phosphodiesterasehemmer Ro20-1724 hinzugefügt und 10 min bei der Testung an hA₁- und hA₃-CHO Zellen und 15 min bei hA_{2A}-CHO-Zellen bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe der negativ und positiv Kontrollen, wird auch die Testsubstanz zugefügt und 5 min bei der Testung an hA₁- und hA₃-CHO Zellen und 15 min bei hA_{2A}-CHO-Zellen bei 37 °C inkubiert. Danach wird bei der Testung an hA₁- und hA₃-CHO Zellen, außer in die HBSS-Kontrolle, Forskolin zugegeben und erneut 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wird mittels Pumpe abgesaugt und die Zellen mit je 500 µL 90°C warmen Lysepuffer pro well versetzt. Nach Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur werden die Platten auf Eis gestellt und bei -20°C gelagert. Anschließend werden die Zellen auf Eis aufgetaut und mittels einer Pipette werden die Zellen auf dem Plattenboden abgekratzt und homogenisiert. Im Anschluss daran werden der cAMP-Standard, die Zellsuspension bzw. der Lysepuffer für die Gesamtbindung bzw. die Hintergrundbindung in Dubletts in PE-vials pipettiert. Anschließend wird der in Tris-Puffer verdünnte Radioligand ([³H]-cAMP) hinzugefügt. Durch Zugabe von cAMP-Bindeprotein (75 µg pro vial) in alle vials, außer in diejenigen zur Bestimmung der Hintergrundbindung, wird das Kompetitionsexperiment gestartet. Der Inkubationsansatz wird gevortext und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wird der am Rezeptor gebundene Radioligand von freiem Radioligand mit Hilfe eines Harvesters getrennt. Dabei wird ein GF/B-Filter verwendet, der das Protein mit dem gebundenen Radioliganden zurückhält. Zur Verringerung der unspezifischen Bindung wird dreimal mit eiskaltem Tris-Puffer gewaschen. Die Filter werden ausgestanzt, in Szintillationsvials überführt und mit je 2,5 mL Szintillationscocktail (Ready Safe™, Beckman Coulter)

versetzt. Nach Vorinkubation von 6 - 9 Stunden werden die Proben im LSC-Counter vermessen.

Die Auswertung der Experimente erfolgt mit Hilfe der Programme Excel (Version 2010) und GraphPad Prism (Version 4.0). Dabei wird zunächst eine Standardkurve erstellt und die erhaltenen cAMP Konzentrationen in der Zelle ermittelt. Die erhaltenen Werte werden mit denen der negativ Kontrolle und der positiven Kontrolle ins Verhältnis gesetzt, so dass Inhibitionskurven erhalten werden, aus denen der IC_{50} - bzw. der K_i -Wert ermittelt werden kann.²⁵⁸

12. LITERATUR

1. Lander et. al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **2001**, *409*, 860-921.
2. Venter, J. C. et al. The sequence of the human genome. *Science* **2001**, *291*, 1304-51.
3. Abacasis, G.R., et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* **2012**, *491*, 56-65.
4. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Ruth, P., Schäfer-Korting, M. *Mutschler Arzneimittelwirkungen-Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 8. Auflage ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, 2008.
5. Ji, T. H.; Grossmann, M.; Ji, I. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 17299-302.
6. International Human Genome Sequencing Consortium, I. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **2004**, *431*, 931-45.
7. Magalhaes, A. C.; Dunn, H.; Ferguson, S. S. Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *Br J Pharmacol* **2012**, *165*, 1717-36.
8. Wang, D.; Li, Y.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Shi, G. High throughput screening (HTS) in identification new ligands and drugable targets of G protein-coupled receptors (GPCRs). *Comb Chem High Throughput Screen* **2012**, *15*, 232-41.
9. Libert, F.; Vassart, G.; Parmentier, M. Current developments in G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol* **1991**, *3*, 218-23.
10. Ellis, C., The Nature Reviews Drug Discovery GPCR Questionnaire Participants. The state of GPCR research in 2004. *Nat Rev Drug Discov* **2004**, *3*, 575, 577-626.
11. Jacoby, E.; Bouhelal, R.; Gerspacher, M.; Seuwen, K. The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 761-82.
12. Okada, T.; Le Trong, I.; Fox, B. A.; Behnke, C. A.; Stenkamp, R. E.; Palczewski, K. X-Ray diffraction analysis of three-dimensional crystals of bovine rhodopsin obtained from mixed micelles. *J Struct Biol* **2000**, *130*, 73-80.
13. Shoichet, B. K.; Kobilka, B. K. Structure-based drug screening for G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **2012**, *33*, 268-72.
14. Warne, T.; Serrano-Vega, M. J.; Baker, J. G.; Moukhametzianov, R.; Edwards, P. C.; Henderson, R.; Leslie, A. G.; Tate, C. G.; Schertler, G. F. Structure of a β 1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **2008**, *454*, 486-91.
15. Rasmussen, S. G.; Choi, H. J.; Fung, J. J.; Pardon, E.; Casarosa, P.; Chae, P. S.; Devree, B. T.; Rosenbaum, D. M.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Schnapp, A.; Konetzki, I.; Sunahara, R. K.; Gellman, S. H.; Pautsch, A.; Steyaert, J.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K. Structure of a nanobody-stabilized active state of the β 2 adrenoceptor. *Nature* **2011**, *469*, 175-80.
16. Rasmussen, S. G.; DeVree, B. T.; Zou, Y.; Kruse, A. C.; Chung, K. Y.; Kobilka, T. S.; Thian, F. S.; Chae, P. S.; Pardon, E.; Calinski, D.; Mathiesen, J. M.; Shah, S. T.; Lyons, J. A.; Caffrey, M.; Gellman, S. H.; Steyaert, J.; Skiniotis, G.; Weis, W. I.; Sunahara, R. K.; Kobilka, B. K. Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **2011**, *477*, 549-55.
17. Chien, E. Y.; Liu, W.; Zhao, Q.; Katritch, V.; Han, G. W.; Hanson, M. A.; Shi, L.; Newman, A. H.; Javitch, J. A.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. Structure of the human

- dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science* **2010**, 330, 1091-5.
18. Shimamura, T.; Shiroishi, M.; Weyand, S.; Tsujimoto, H.; Winter, G.; Katritch, V.; Abagyan, R.; Cherezov, V.; Liu, W.; Han, G. W.; Kobayashi, T.; Stevens, R. C.; Iwata, S. Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature* **2011**, 475, 65-70.
 19. Haga, K.; Kruse, A. C.; Asada, H.; Yurugi-Kobayashi, T.; Shiroishi, M.; Zhang, C.; Weis, W. I.; Okada, T.; Kobilka, B. K.; Haga, T.; Kobayashi, T. Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* **2012**, 482, 547-51.
 20. Jaakola, V. P.; Griffith, M. T.; Hanson, M. A.; Cherezov, V.; Chien, E. Y.; Lane, J. R.; Ijzerman, A. P.; Stevens, R. C. The 2.6 angstrom crystal structure of a human A_{2A} adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* **2008**, 322, 1211-7.
 21. Attwood, T. K.; Findlay, J. B. Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng* **1994**, 7, 195-203.
 22. Kolakowski, L. F., Jr. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* **1994**, 2, 1-7.
 23. Davies, M. N.; Gloriam, D. E.; Secker, A.; Freitas, A. A.; Timmis, J.; Flower, D. R. Present perspectives on the automated classification of the G-protein coupled receptors (GPCRs) at the protein sequence level. *Curr Top Med Chem* **2011**, 11, 1994-2009.
 24. Fredriksson, R.; Lagerstrom, M. C.; Lundin, L. G.; Schioth, H. B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **2003**, 63, 1256-72.
 25. Stacey, M.; Lin, H. H.; Gordon, S.; McKnight, A. J. LNB-TM7, a group of seven-transmembrane proteins related to family-B G-protein-coupled receptors. *Trends Biochem Sci* **2000**, 25, 284-9.
 26. Steinhilber, D., Schubert-Zsilavecz, M., Roth, H. J. *Medizinische Chemie*. 2. Auflage ed.; Deutscher Apotheker Verlag: Stuttgart, 2010.
 27. Birnbaumer, L. Expansion of signal transduction by G proteins. The second 15 years or so: from 3 to 16 α subunits plus $\beta\gamma$ dimers. *Biochim Biophys Acta* **2007**, 1768, 772-93.
 28. Milligan, G.; Kostenis, E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* **2006**, 147 Suppl 1, S46-55.
 29. Suzuki, N.; Hajicek, N.; Kozasa, T. Regulation and physiological functions of G_{12/13}-mediated signaling pathways. *Neurosignals* **2009**, 17, 55-70.
 30. Riobo, N. A.; Manning, D. R. Receptors coupled to heterotrimeric G proteins of the G₁₂ family. *Trends Pharmacol Sci* **2005**, 26, 146-54.
 31. Luttrell, L. M. 'Location, location, location': activation and targeting of MAP kinases by G protein-coupled receptors. *J Mol Endocrinol* **2003**, 30, 117-26.
 32. Lefkowitz, R. J. Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* **2004**, 25, 413-22.
 33. Ma, L.; Pei, G. Beta-arrestin signaling and regulation of transcription. *J Cell Sci* **2007**, 120, 213-8.
 34. Lefkowitz, R. J. Seven transmembrane receptors: something old, something new. *Acta Physiol (Oxf)* **2007**, 190, 9-19.
 35. McDonald, P. H.; Chow, C. W.; Miller, W. E.; Laporte, S. A.; Field, M. E.; Lin, F. T.; Davis, R. J.; Lefkowitz, R. J. Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* **2000**, 290, 1574-7.

36. Luttrell, L. M.; Roudabush, F. L.; Choy, E. W.; Miller, W. E.; Field, M. E.; Pierce, K. L.; Lefkowitz, R. J. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 2449-54.
37. Sun, Y.; Cheng, Z.; Ma, L.; Pei, G. Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 49212-9.
38. Khakh, B. S.; Burnstock, G.; Kennedy, C.; King, B. F.; North, R. A.; Seguela, P.; Voigt, M.; Humphrey, P. P. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* **2001**, *53*, 107-18.
39. Abbracchio, M. P.; Burnstock, G.; Boeynaems, J. M.; Barnard, E. A.; Boyer, J. L.; Kennedy, C.; Knight, G. E.; Fumagalli, M.; Gachet, C.; Jacobson, K. A.; Weisman, G. A. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* **2006**, *58*, 281-341.
40. Fredholm, B. B.; AP, I. J.; Jacobson, K. A.; Klotz, K. N.; Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* **2001**, *53*, 527-52.
41. Bender, E.; Buist, A.; Jurzak, M.; Langlois, X.; Baggerman, G.; Verhasselt, P.; Ercken, M.; Guo, H. Q.; Wintmolders, C.; Van den Wyngaert, I.; Van Oers, I.; Schoofs, L.; Luyten, W. Characterization of an orphan G protein-coupled receptor localized in the dorsal root ganglia reveals adenine as a signaling molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 8573-8.
42. Gorzalka, S.; Vittori, S.; Volpini, R.; Cristalli, G.; von Kugelgen, I.; Müller, C. E. Evidence for the functional expression and pharmacological characterization of adenine receptors in native cells and tissues. *Mol Pharmacol* **2005**, *67*, 955-64.
43. von Kugelgen, I.; Schiedel, A. C.; Hoffmann, K.; Alsdorf, B. B.; Abdelrahman, A.; Müller, C. E. Cloning and functional expression of a novel G_i protein-coupled receptor for adenine from mouse brain. *Mol Pharmacol* **2008**, *73*, 469-77.
44. Drury, A. N.; Szent-Gyorgyi, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* **1929**, *68*, 213-37.
45. Burnstock, G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* **1972**, *24*, 509-81.
46. Burnstock, G. *A basis for distinguishing two types of purinergic receptor, in Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A multidisciplinary Approach.* (Bolis, L.; Straub, R. W. (eds.)). Raven Press: New York, 1978; p 107-118.
47. Abbracchio, M. P.; Burnstock, G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* **1994**, *64*, 445-75.
48. Burnstock, G.; Kennedy, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* **1985**, *16*, 433-40.
49. Müller, C. E. P2-pyrimidinergic receptors and their ligands. *Curr Pharm Des* **2002**, *8*, 2353-69.
50. Brunschweiler, A.; Müller, C. E. P2 receptors activated by uracil nucleotides--an update. *Curr Med Chem* **2006**, *13*, 289-312.
51. Burnstock, G.; Knight, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* **2004**, *240*, 31-304.
52. Auchampach, J. A.; Jin, X.; Wan, T. C.; Caughey, G. H.; Linden, J. Canine mast cell adenosine receptors: cloning and expression of the A₃ receptor and evidence that degranulation is mediated by the A_{2B} receptor. *Mol Pharmacol* **1997**, *52*, 846-60.

53. Gao, Z.; Chen, T.; Weber, M. J.; Linden, J. A_{2B} adenosine and P2Y₂ receptors stimulate mitogen-activated protein kinase in human embryonic kidney-293 cells. cross-talk between cyclic AMP and protein kinase c pathways. *J Biol Chem* **1999**, 274, 5972-80.
54. Linden, J.; Thai, T.; Figler, H.; Jin, X.; Robeva, A. S. Characterization of human A_{2B} adenosine receptors: radioligand binding, western blotting, and coupling to G(q) in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells. *Mol Pharmacol* **1999**, 56, 705-13.
55. Palmer, T. M.; Gettys, T. W.; Stiles, G. L. Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A₃ adenosine receptor. *J Biol Chem* **1995**, 270, 16895-902.
56. Klotz, K. N.; Hessling, J.; Hegler, J.; Owman, C.; Kull, B.; Fredholm, B. B.; Lohse, M. J. Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes - characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **1998**, 357, 1-9.
57. Baraldi, P. G.; Tabrizi, M. A.; Fruttarolo, F.; Romagnoli, R.; Preti, D. Recent improvements in the development of A_{2B} adenosine receptor agonists. *Purinergic Signal* **2009**, 5, 3-19.
58. Rosentreter, U. R., H.; Bauser, M. Substituted 2-thio-3,5-dicyano-4-aryl-6-aminopyridines and the use thereof. WO Patent 2001025210, 2001.
59. Klotz, K. N.; Camaioni, E.; Volpini, R.; Kachler, S.; Vittori, S.; Cristalli, G. 2-Substituted N-ethylcarboxamidoadenosine derivatives as high-affinity agonists at human A₃ adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **1999**, 360, 103-8.
60. van Muijlwijk-Koezen, J. E.; Timmerman, H.; Vollinga, R. C.; Frijtag von Drabbe Kunzel, J.; de Groote, M.; Visser, S.; AP, I. J. Thiazole and thiadiazole analogues as a novel class of adenosine receptor antagonists. *J Med Chem* **2001**, 44, 749-62.
61. Bilkei-Gorzo, A.; Abo-Salem, O. M.; Hayallah, A. M.; Michel, K.; Müller, C. E.; Zimmer, A. Adenosine receptor subtype-selective antagonists in inflammation and hyperalgesia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **2008**, 377, 65-76.
62. Weyler, S.; Fulle, F.; Diekmann, M.; Schumacher, B.; Hinz, S.; Klotz, K. N.; Müller, C. E. Improving potency, selectivity, and water solubility of adenosine A₁ receptor antagonists: xanthines modified at position 3 and related pyrimido[1,2,3-cd]purinediones. *ChemMedChem* **2006**, 1, 891-902.
63. Ongini, E.; Dionisotti, S.; Gessi, S.; Irenius, E.; Fredholm, B. B. Comparison of CGS 15943, ZM 241385 and SCH 58261 as antagonists at human adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **1999**, 359, 7-10.
64. Sauer, R.; Maurinsh, J.; Reith, U.; Fulle, F.; Klotz, K. N.; Müller, C. E. Water-soluble phosphate prodrugs of 1-propargyl-8-styrylxanthine derivatives, A_{2A}-selective adenosine receptor antagonists. *J Med Chem* **2000**, 43, 440-8.
65. Castelhana, A. L. M., B.; Steinig, A. G. Preparation of pyrrolopyrimidine A_{2B} selective antagonist compounds, method of synthesis and therapeutic use. WO Patent 2003053361, **2003**.
66. Baraldi, P. G.; Tabrizi, M. A.; Preti, D.; Bovero, A.; Romagnoli, R.; Fruttarolo, F.; Zaid, N. A.; Moorman, A. R.; Varani, K.; Gessi, S.; Merighi, S.; Borea, P. A. Design, synthesis, and biological evaluation of new 8-heterocyclic xanthine derivatives as highly potent and selective human A_{2B} adenosine receptor antagonists. *J Med Chem* **2004**, 47, 1434-47.
67. Yan, L.; Bertarelli, D. C.; Hayallah, A. M.; Meyer, H.; Klotz, K. N.; Müller, C. E. A new synthesis of sulfonamides by aminolysis of p-nitrophenylsulfonates yielding

- potent and selective adenosine A_{2B} receptor antagonists. *J Med Chem* **2006**, 49, 4384-91.
68. Borrmann, T.; Hinz, S.; Bertarelli, D. C.; Li, W.; Florin, N. C.; Scheiff, A. B.; Müller, C. E. 1-alkyl-8-(piperazine-1-sulfonyl)phenylxanthines: development and characterization of adenosine A_{2B} receptor antagonists and a new radioligand with subnanomolar affinity and subtype specificity. *J Med Chem* **2009**, 52, 3994-4006.
69. Ozola, V.; Thorand, M.; Diekmann, M.; Qurishi, R.; Schumacher, B.; Jacobson, K. A.; Müller, C. E. 2-Phenylimidazo[2,1-i]purin-5-ones: structure-activity relationships and characterization of potent and selective inverse agonists at human A₃ adenosine receptors. *Bioorg Med Chem* **2003**, 11, 347-56.
70. Müller, C. E. A₃ adenosine receptor antagonists. *Mini Rev Med Chem* **2001**, 1, 417-27.
71. Ralevic, V.; Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* **1998**, 50, 413-92.
72. Tatemoto, K.; Hosoya, M.; Habata, Y.; Fujii, R.; Kakegawa, T.; Zou, M. X.; Kawamata, Y.; Fukusumi, S.; Hinuma, S.; Kitada, C.; Kurokawa, T.; Onda, H.; Fujino, M. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **1998**, 251, 471-6.
73. Nikodijevic, O.; Sarges, R.; Daly, J. W.; Jacobson, K. A. Behavioral effects of A₁- and A₂-selective adenosine agonists and antagonists: evidence for synergism and antagonism. *J Pharmacol Exp Ther* **1991**, 259, 286-94.
74. Jain, N.; Kemp, N.; Adeyemo, O.; Buchanan, P.; Stone, T. W. Anxiolytic activity of adenosine receptor activation in mice. *Br J Pharmacol* **1995**, 116, 2127-33.
75. Malhotra, J.; Gupta, Y. K. Effect of adenosine receptor modulation on pentylenetetrazole-induced seizures in rats. *Br J Pharmacol* **1997**, 120, 282-8.
76. Olsson, R. A.; Pearson, J. D. Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev* **1990**, 70, 761-845.
77. Elzein, E.; Zablocki, J. A₁ adenosine receptor agonists and their potential therapeutic applications. *Expert Opin Investig Drugs* **2008**, 17, 1901-10.
78. The Study of GW493838, an Adenosine A₁ Agonist, in Peripheral Neuropathic Pain. (<http://clinicaltrials.gov>; Identifier: NCT00376454).
79. Agmon, Y.; Dinour, D.; Brezis, M. Disparate effects of adenosine A₁- and A₂-receptor agonists on intrarenal blood flow. *Am J Physiol* **1993**, 265, F802-6.
80. Barrett, R. J.; Droppleman, D. A. Interactions of adenosine A₁ receptor-mediated renal vasoconstriction with endogenous nitric oxide and ANG II. *Am J Physiol* **1993**, 265, F651-9.
81. Munger, K. A.; Jackson, E. K. Effects of selective A₁ receptor blockade on glomerular hemodynamics: involvement of renin-angiotensin system. *Am J Physiol* **1994**, 267, F783-90.
82. Mizumoto, H.; Karasawa, A.; Kubo, K. Diuretic and renal protective effects of 8-(noradamantan-3-yl)-1,3-dipropylxanthine (KW-3902), a novel adenosine A₁-receptor antagonist, via pertussis toxin insensitive mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* **1993**, 266, 200-6.
83. van Buren, M.; Bijlsma, J. A.; Boer, P.; van Rijn, H. J.; Koomans, H. A. Natriuretic and hypotensive effect of adenosine-1 blockade in essential hypertension. *Hypertension* **1993**, 22, 728-34.
84. Vallon, V.; Osswald, H. Adenosine receptors and the kidney. *Handb Exp Pharmacol* **2009**, 443-70.

85. Conti, A.; Monopoli, A.; Gamba, M.; Borea, P. A.; Ongini, E. Effects of selective A₁ and A₂ adenosine receptor agonists on cardiovascular tissues. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **1993**, 348, 108-12.
86. Szentmiklosi, A. J.; Ujfalusi, A.; Cseppento, A.; Nosztray, K.; Kovacs, P.; Szabo, J. Z. Adenosine receptors mediate both contractile and relaxant effects of adenosine in main pulmonary artery of guinea pigs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **1995**, 351, 417-25.
87. Akkari, R.; Burbiel, J. C.; Hockemeyer, J.; Muller, C. E. Recent progress in the development of adenosine receptor ligands as antiinflammatory drugs. *Curr Top Med Chem* **2006**, 6, 1375-99.
87. El-Tayeb, A., Gollos, S., 2-Hydrazinyladenosine Derivatives: Synthesis and structure-activity relationships as A_{2A} adenosine receptor ligands, *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, 21, 436-447.
88. Ledent, C.; Vaugeois, J. M.; Schiffmann, S. N.; Pedrazzini, T.; El Yacoubi, M.; Vanderhaeghen, J. J.; Costentin, J.; Heath, J. K.; Vassart, G.; Parmentier, M. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A_{2a} receptor. *Nature* **1997**, 388, 674-8.
89. El-Tayeb, A.; Iqbal, J.; Behrenswerth, A.; Romio, M.; Schneider, M.; Zimmermann, H.; Schrader, J.; Müller, C. E. Nucleoside-5'-monophosphates as prodrugs of adenosine A_{2A} receptor agonists activated by ecto-5'-nucleotidase. *J Med Chem* **2009**, 52, 7669-77.
89. El-Tayeb, A.; Michael, S.; Abdelrahman, A.; Behrenswerth, A.; Gollos, S.; Nieber, K.; Müller, C. E. Development of Polar Adenosine A_{2A} Receptor Agonists for Inflammatory Bowel Disease: Synergism with A_{2B} Antagonists. *Medicinal Chemistry Letters*, **2011**, 2, 890-895.
90. Flogel, U.; Burghoff, S.; van Lent, P. L.; Temme, S.; Galbarz, L.; Ding, Z.; El-Tayeb, A.; Huels, S.; Bonner, F.; Borg, N.; Jacoby, C.; Müller, C. E.; van den Berg, W. B.; Schrader, J. Selective activation of adenosine A_{2A} receptors on immune cells by a CD73-dependent prodrug suppresses joint inflammation in experimental rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* **2012**, 4, 146ra108.
91. http://www.presseportal.de/pm/82962/1754828/rapidscan_pharma_solutions/rss (letzter Zugriff: 16.10.2013).
92. Al Jaroudi, W.; Iskandrian, A. E. Regadenoson: a new myocardial stress agent. *J Am Coll Cardiol* **2009**, 54, 1123-30.
93. Efficacy and Safety Study of Binodenoson in Assessing Cardiac Ischemia (VISION-305) (<http://clinicaltrials.gov>; Identifier: NCT00944970).
94. <http://www.healthimaging.com/topics/molecular-imaging/fda-panel-rejects-kings-cardiac-spect-agent> (16.10.2013).
95. A Comparison Study of Apadenoson and Adenosine to Treadmill Exercise Stress. (<http://clinicaltrials.gov>; Identifier: NCT00380198).
96. Efficacy and Tolerability of Novel A_{2A} Agonist in Treatment of Diabetic Neuropathic Pain. (<http://clinicaltrials.gov>; Identifier: NCT00452777).
97. Fink, J. S.; Weaver, D. R.; Rivkees, S. A.; Peterfreund, R. A.; Pollack, A. E.; Adler, E. M.; Reppert, S. M. Molecular cloning of the rat A₂ adenosine receptor: selective co-expression with D₂ dopamine receptors in rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res* **1992**, 14, 186-95.
98. Ferre, S.; Quiroz, C.; Orru, M.; Guitart, X.; Navarro, G.; Cortes, A.; Casado, V.; Canela, E. I.; Lluís, C.; Franco, R. Adenosine A_{2A} Receptors and A_{2A} Receptor Heteromers as Key Players in Striatal Function. *Front Neuroanat* **2011**, 5, 36.

99. Ferre, S.; Fuxe, K.; von Euler, G.; Johansson, B.; Fredholm, B. B. Adenosine-dopamine interactions in the brain. *Neuroscience* **1992**, *51*, 501-12.
100. Ferre, S.; Fredholm, B. B.; Morelli, M.; Popoli, P.; Fuxe, K. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci* **1997**, *20*, 482-7.
101. Richardson, P. J.; Kase, H.; Jenner, P. G. Adenosine A_{2A} receptor antagonists as new agents for the treatment of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci* **1997**, *18*, 338-44.
102. Hauser, R. A.; Shulman, L. M.; Trugman, J. M.; Roberts, J. W.; Mori, A.; Ballerini, R.; Sussman, N. M. Study of istradefylline in patients with Parkinson's disease on levodopa with motor fluctuations. *Mov Disord* **2008**, *23*, 2177-85.
103. LeWitt, P. A.; Guttman, M.; Tetrud, J. W.; Tuite, P. J.; Mori, A.; Chaikin, P.; Sussman, N. M. Adenosine A_{2A} receptor antagonist istradefylline (KW-6002) reduces "off" time in Parkinson's disease: a double-blind, randomized, multicenter clinical trial (6002-US-005). *Ann Neurol* **2008**, *63*, 295-302 (veröffentlichtes erratum erschien: *Neurology*, 2008, *71*, 953).
104. Hauser, R. A.; Cantillon, M.; Pourcher, E.; Micheli, F.; Mok, V.; Onofrij, M.; Huyck, S.; Wolski, K. Preladenant in patients with Parkinson's disease and motor fluctuations: a phase 2, double-blind, randomised trial. *Lancet Neurol* **2011**, *10*, 221-9.
105. Hodgson, R. A.; Bedard, P. J.; Varty, G. B.; Kazdoba, T. M.; Di Paolo, T.; Grzelak, M. E.; Pond, A. J.; Hadjtahar, A.; Belanger, N.; Gregoire, L.; Dare, A.; Neustadt, B. R.; Stamford, A. W.; Hunter, J. C. Preladenant, a selective A_{2A} receptor antagonist, is active in primate models of movement disorders. *Exp Neurol* **2010**, *225*, 384-90.
106. Kalhan, A.; Gharibi, B.; Vazquez, M.; Jasani, B.; Neal, J.; Kidd, M.; Modlin, I. M.; Pfragner, R.; Rees, D. A.; Ham, J. Adenosine A_{2A} and A_{2B} receptor expression in neuroendocrine tumours: potential targets for therapy. *Purinergic Signal* **2012**, *8*, 265-74.
107. Xu, F.; Wu, H.; Katritch, V.; Han, G. W.; Jacobson, K. A.; Gao, Z. G.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. Structure of an agonist-bound human A_{2A} adenosine receptor. *Science* **2011**, *332*, 322-7.
108. Cristalli, G., Müller, CE, Volpini, R. Recent developments in Adenosine A_{2A} receptor ligands. *Handb Exp Pharmacol.* **2009**, *59*, 60-98.
109. Lebon, G.; Warne, T.; Edwards, P. C.; Bennett, K.; Langmead, C. J.; Leslie, A. G.; Tate, C. G. Agonist-bound adenosine A_{2A} receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature* **2011**, *474*, 521-5.
110. Dore, A. S.; Robertson, N.; Errey, J. C.; Ng, I.; Hollenstein, K.; Tehan, B.; Hurrell, E.; Bennett, K.; Congreve, M.; Magnani, F.; Tate, C. G.; Weir, M.; Marshall, F. H. Structure of the adenosine A_{2A} receptor in complex with ZM241385 and the xanthines XAC and caffeine. *Structure* **2011**, *19*, 1283-93.
111. Hino, T.; Arakawa, T.; Iwanari, H.; Yurugi-Kobayashi, T.; Ikeda-Suno, C.; Nakada-Nakura, Y.; Kusano-Arai, O.; Weyand, S.; Shimamura, T.; Nomura, N.; Cameron, A. D.; Kobayashi, T.; Hamakubo, T.; Iwata, S.; Murata, T. G-protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody. *Nature* **2012**, *482*, 237-40.
112. Congreve, M.; Andrews, S. P.; Dore, A. S.; Hollenstein, K.; Hurrell, E.; Langmead, C. J.; Mason, J. S.; Ng, I. W.; Tehan, B.; Zhukov, A.; Weir, M.; Marshall, F. H. Discovery of 1,2,4-triazine derivatives as adenosine A_{2A} antagonists using structure based drug design. *J Med Chem* **2012**, *55*, 1898-903.

113. Feoktistov, I.; Biaggioni, I. Adenosine A_{2B} receptors. *Pharmacol Rev* **1997**, *49*, 381-402.
114. Feoktistov, I.; Goldstein, A. E.; Biaggioni, I. Role of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinase in adenosine A_{2B} receptor-mediated interleukin-8 production in human mast cells. *Mol Pharmacol* **1999**, *55*, 726-34.
115. Wilson, C. N. Adenosine receptors and asthma in humans. *Br J Pharmacol* **2008**, *155*, 475-86.
116. Feoktistov, I.; Biaggioni, I. Adenosine A_{2B} receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells. An enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma. *J Clin Invest* **1995**, *96*, 1979-86.
117. Ryzhov, S.; Goldstein, A. E.; Matafonov, A.; Zeng, D.; Biaggioni, I.; Feoktistov, I. Adenosine-activated mast cells induce IgE synthesis by B lymphocytes: an A_{2B}-mediated process involving Th2 cytokines IL-4 and IL-13 with implications for asthma. *J Immunol* **2004**, *172*, 7726-33.
118. Zhong, H.; Belardinelli, L.; Maa, T.; Feoktistov, I.; Biaggioni, I.; Zeng, D. A_{2B} adenosine receptors increase cytokine release by bronchial smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2004**, *30*, 118-25.
119. Zhong, H.; Wu, Y.; Belardinelli, L.; Zeng, D. A_{2B} adenosine receptors induce IL-19 from bronchial epithelial cells, resulting in TNF-alpha increase. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2006**, *35*, 587-92.
120. Zhong, H.; Belardinelli, L.; Maa, T.; Zeng, D. Synergy between A_{2B} adenosine receptors and hypoxia in activating human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2005**, *32*, 2-8.
121. Linden, J. New insights into the regulation of inflammation by adenosine. *J Clin Invest* **2006**, *116*, 1835-7.
122. Strohmeier, G. R.; Reppert, S. M.; Lencer, W. I.; Madara, J. L. The A_{2B}-adenosine receptor mediates cAMP responses to adenosine receptor agonists in human intestinal epithelia. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 2387-94.
123. Sitaraman, S. V.; Merlin, D.; Wang, L.; Wong, M.; Gewirtz, A. T.; Si-Tahar, M.; Madara, J. L. Neutrophil-epithelial crosstalk at the intestinal luminal surface mediated by reciprocal secretion of adenosine and IL-6. *J Clin Invest* **2001**, *107*, 861-9.
124. Kolachala, V. L.; Vijay-Kumar, M.; Dalmasso, G.; Yang, D.; Linden, J.; Wang, L.; Gewirtz, A.; Ravid, K.; Merlin, D.; Sitaraman, S. V. A_{2B} adenosine receptor gene deletion attenuates murine colitis. *Gastroenterology* **2008**, *135*, 861-70.
125. Kolachala, V.; Ruble, B.; Vijay-Kumar, M.; Wang, L.; Mwangi, S.; Figler, H.; Figler, R.; Srinivasan, S.; Gewirtz, A.; Linden, J.; Merlin, D.; Sitaraman, S. Blockade of adenosine A_{2B} receptors ameliorates murine colitis. *Br J Pharmacol* **2008**, *155*, 127-37.
126. Ryzhov, S.; Novitskiy, S. V.; Zaynagetdinov, R.; Goldstein, A. E.; Carbone, D. P.; Biaggioni, I.; Dikov, M. M.; Feoktistov, I. Host A_{2B} adenosine receptors promote carcinoma growth. *Neoplasia* **2008**, *10*, 987-95.
127. Osbahr, A. J., 3rd; Nemeroff, C. B.; Luttinger, D.; Mason, G. A.; Prange, A. J., Jr. Neurotensin-induced antinociception in mice: antagonism by thyrotropin-releasing hormone. *J Pharmacol Exp Ther* **1981**, *217*, 645-51.
128. Abo-Salem, O. M.; Hayallah, A. M.; Bilkei-Gorzo, A.; Filipek, B.; Zimmer, A.; Müller, C. E. Antinociceptive effects of novel A_{2B} adenosine receptor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* **2004**, *308*, 358-66.

129. Fiebich, B. L.; Biber, K.; Gyufko, K.; Berger, M.; Bauer, J.; van Calcar, D. Adenosine A_{2B} receptors mediate an increase in interleukin (IL)-6 mRNA and IL-6 protein synthesis in human astroglioma cells. *J Neurochem* **1996**, *66*, 1426-31.
130. Trincavelli, M. L.; Marroni, M.; Tuscano, D.; Ceruti, S.; Mazzola, A.; Mitro, N.; Abbracchio, M. P.; Martini, C. Regulation of A_{2B} adenosine receptor functioning by tumour necrosis factor α in human astroglial cells. *J Neurochem* **2004**, *91*, 1180-90.
131. Figler, R. A.; Wang, G.; Srinivasan, S.; Jung, D. Y.; Zhang, Z.; Pankow, J. S.; Ravid, K.; Fredholm, B.; Hedrick, C. C.; Rich, S. S.; Kim, J. K.; LaNoue, K. F.; Linden, J. Links between insulin resistance, adenosine A_{2B} receptors, and inflammatory markers in mice and humans. *Diabetes* **2011**, *60*, 669-79.
132. Burnstock, G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* **2007**, *64*, 1471-83.
133. Baraldi, P. G.; Preti, D.; Borea, P. A.; Varani, K. Medicinal chemistry of A₃ adenosine receptor modulators: pharmacological activities and therapeutic implications. *J Med Chem* **2012**, *55*, 5676-703.
134. Gessi, S.; Merighi, S.; Fazzi, D.; Stefanelli, A.; Varani, K.; Borea, P. A. Adenosine receptor targeting in health and disease. *Expert Opin Investig Drugs* **2011**, *20*, 1591-609.
135. Merighi, S.; Benini, A.; Mirandola, P.; Gessi, S.; Varani, K.; Leung, E.; MacLennan, S.; Baraldi, P. G.; Borea, P. A. Modulation of the Akt/Ras/Raf/MEK/ERK pathway by A₃ adenosine receptor. *Purinergic Signal* **2006**, *2*, 627-32.
136. Safety and Efficacy Study of CF101 to Treat Psoriasis. (<http://clinicaltrials.gov>; Identifier: NCT00428974).
137. Trial of CF101 to Treat Patients With Dry Eye Disease (<http://clinicaltrials.gov>; Identifier: NCT01235234).
138. Safety and Efficacy of Daily CF101 Administered Orally in Subjects With Elevated Intraocular Pressure. (<http://clinicaltrials.gov>; Identifier: NCT01033422).
139. A Study of the Efficacy and Safety of CF101 to Patients With Osteoarthritis of the Knee. (<http://clinicaltrials.gov>; Identifier: NCT00837291).
140. Oral CF101 Tablets Treatment in Patients With Rheumatoid Arthritis. (<http://clinicaltrials.gov>; Identifier: NCT01034306).
141. A Phase 1/2 Study of CF102 in Patients With Chronic Hepatitis C Genotype 1. (<http://clinicaltrials.gov>; Identifier: NCT00790673).
142. A Phase 1-2 Study of CF102 in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma. (<http://clinicaltrials.gov>; Identifier: NCT00790218).
143. Kim, S. J.; Min, H. Y.; Chung, H. J.; Park, E. J.; Hong, J. Y.; Kang, Y. J.; Shin, D. H.; Jeong, L. S.; Lee, S. K. Inhibition of cell proliferation through cell cycle arrest and apoptosis by thio-CI-IB-MECA, a novel A₃ adenosine receptor agonist, in human lung cancer cells. *Cancer Lett* **2008**, *264*, 309-15.
144. Kim, H.; Kang, J. W.; Lee, S.; Choi, W. J.; Jeong, L. S.; Yang, Y.; Hong, J. T.; Yoon do, Y. A₃ adenosine receptor antagonist, truncated Thio-CI-IB-MECA, induces apoptosis in T24 human bladder cancer cells. *Anticancer Res* **2010**, *30*, 2823-30.
145. Aghaei, M.; Panjehpour, M.; Karami-Tehrani, F.; Salami, S. Molecular mechanisms of A₃ adenosine receptor-induced G1 cell cycle arrest and apoptosis in androgen-dependent and independent prostate cancer cell lines: involvement of intrinsic pathway. *J Cancer Res Clin Oncol* **2011**, *137*, 1511-23.

146. Morello, S.; Sorrentino, R.; Porta, A.; Forte, G.; Popolo, A.; Petrella, A.; Pinto, A. Cl-IB-MECA enhances TRAIL-induced apoptosis via the modulation of NF- κ B signalling pathway in thyroid cancer cells. *J Cell Physiol* **2009**, *221*, 378-86.
147. Mlejnek, P.; Dolezel, P.; Kosztyu, P. P-glycoprotein mediates resistance to A₃ adenosine receptor agonist 2-chloro-N6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-N-methyluronamide in human leukemia cells. *J Cell Physiol* **2012**, *227*, 676-85.
148. Bar-Yehuda, S.; Stemmer, S. M.; Madi, L.; Castel, D.; Ochaion, A.; Cohen, S.; Barer, F.; Zabutti, A.; Perez-Liz, G.; Del Valle, L.; Fishman, P. The A₃ adenosine receptor agonist CF102 induces apoptosis of hepatocellular carcinoma via de-regulation of the Wnt and NF- κ B signal transduction pathways. *Int J Oncol* **2008**, *33*, 287-95.
149. Varani, K.; Maniero, S.; Vincenzi, F.; Targa, M.; Stefanelli, A.; Maniscalco, P.; Martini, F.; Tognon, M.; Borea, P. A. A₃ receptors are overexpressed in pleura from patients with mesothelioma and reduce cell growth via Akt/nuclear factor- κ B pathway. *Am J Respir Crit Care Med* **2011**, *183*, 522-30.
150. Liu, G. S.; Richards, S. C.; Olsson, R. A.; Mullane, K.; Walsh, R. S.; Downey, J. M. Evidence that the adenosine A₃ receptor may mediate the protection afforded by preconditioning in the isolated rabbit heart. *Cardiovasc Res* **1994**, *28*, 1057-61.
151. Armstrong, S.; Ganote, C. E. Adenosine receptor specificity in preconditioning of isolated rabbit cardiomyocytes: evidence of A₃ receptor involvement. *Cardiovasc Res* **1994**, *28*, 1049-56.
152. Auchampach, J. A.; Rizvi, A.; Qiu, Y.; Tang, X. L.; Maldonado, C.; Teschner, S.; Bolli, R. Selective activation of A₃ adenosine receptors with N6-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-N-methyluronamide protects against myocardial stunning and infarction without hemodynamic changes in conscious rabbits. *Circ Res* **1997**, *80*, 800-9.
153. Stambaugh, K.; Jacobson, K. A.; Jiang, J. L.; Liang, B. T. A novel cardioprotective function of adenosine A₁ and A₃ receptors during prolonged simulated ischemia. *Am J Physiol* **1997**, *273*, H501-5.
154. Patrick, G., L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. 3 ed.; Oxford University Press: New York, 2005.
155. Atkins, P. W. *Physikalische Chemie*. Second ed.; VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim, **1996**.
156. Wedler, G. *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*. 4 ed.; Wiley VCH: Weinheim, **1997**.
157. Kasha, M. Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discussions of the Faraday Society* **1950**, *9*, 14-19.
158. Widengren, J.; Rigler, R. Mechanisms of photobleaching investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Bioimaging* **1996**, *4*, 149-157.
159. Ehrlich, P. Address in pathology on chemotherapeutics: Scientific principles, methods, and results. *The Lancet* **1913**, *182*, 445-451.
160. Schreiber, S. L. Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry. *Bioorg Med Chem* **1998**, *6*, 1127-52.
161. Lipinski, C.; Lombardo, F.; Dominy, B.; Feeney, P. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, 3-25.
162. Eldridge, G. R.; Vervoort, H. C.; Lee, C. M.; Cremin, P. A.; Williams, C. T.; Hart, S. M.; Goering, M. G.; O'Neil-Johnson, M.; Zeng, L. High-throughput method for the production and analysis of large natural product libraries for drug discovery. *Anal Chem* **2002**, *74*, 3963-71.

163. Middleton, R. J.; Kellam, B. Fluorophore-tagged GPCR ligands. *Curr Opin Chem Biol* **2005**, *9*, 517-25.
164. Tahtaoui, C.; Parrot, I.; Klotz, P.; Guillier, F.; Galzi, J. L.; Hibert, M.; Ilien, B. Fluorescent pirenzepine derivatives as potential bitopic ligands of the human M1 muscarinic receptor. *J Med Chem* **2004**, *47*, 4300-15.
165. Briddon, S. J.; Middleton, R. J.; Yates, A. S.; George, M. W.; Kellam, B.; Hill, S. J. Application of fluorescence correlation spectroscopy to the measurement of agonist binding to a G-protein coupled receptor at the single cell level. *Faraday Discuss* **2004**, *126*, 197-207; discussion 245-54.
166. Briddon, S. J.; Middleton, R. J.; Cordeaux, Y.; Flavin, F. M.; Weinstein, J. A.; George, M. W.; Kellam, B.; Hill, S. J. Quantitative analysis of the formation and diffusion of A₁-adenosine receptor-antagonist complexes in single living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 4673-8.
167. Middleton, R. J.; Briddon, S. J.; Cordeaux, Y.; Yates, A. S.; Dale, C. L.; George, M. W.; Baker, J. G.; Hill, S. J.; Kellam, B. New fluorescent adenosine A₁-receptor agonists that allow quantification of ligand-receptor interactions in microdomains of single living cells. *J Med Chem* **2007**, *50*, 782-93.
168. Wombacher, R.; Cornish, V. W. Chemical tags: applications in live cell fluorescence imaging. *J Biophotonics* **2011**, *4*, 391-402.
169. Bally, O. Process of making green dyes. US 617627. 1899.
170. Sun, W.-C.; Gee, K. R.; Klaubert, D. H.; Haugland, R. P. Synthesis of Fluorinated Fluoresceins. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6469-6475.
171. Neckers, D. C. Rose bengal. *Journal of Photochemistry and Photobiology* **1989**, *47*, 1-29.
172. Adamczyk, M.; Grote, J. Efficient synthesis of rhodamine conjugates through the 2'-position. *Bioorg Med Chem Lett* **2000**, *10*, 1539-41.
173. Mottram, L. F.; Boonyarattanakalin, S.; Kovel, R. E.; Peterson, B. R. The Pennsylvania Green Fluorophore: a hybrid of Oregon Green and Tokyo Green for the construction of hydrophobic and pH-insensitive molecular probes. *Org Lett* **2006**, *8*, 581-4.
174. Haugland, R. P., Spence MTZ, Johnson ID, Basey A. *The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technology*. 10 ed.; Molecular Probes: **2005**.
175. Ravdin, P.; Axelrod, D. Fluorescent tetramethyl rhodamine derivatives of alpha-bungarotoxin: preparation, separation, and characterization. *Anal Biochem* **1977**, *80*, 585-92.
176. Lutzmann, H. Cis-trans-Umlagerung der o-Oxyzimtsäure-glucoside, über das Glucosid der o-Hydrocumarsäure und das Vorkommen des Cumarins in der Tonkabohne. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1940**, *73*, 632-343.
177. Ahmed, S. A., Gergely, J. S., Infante, D. Energy transfer organic dye mixture lasers. *J. Chem. Phys.* **1974**, *61*, 1584-1585.
178. Rangaswami, S., Seshadri, T. R. . . A note on certain constitutional factors controlling visible fluorescence in compounds of the benzo-pyrone group. *Proc. Ind. Acad. Sci., 12A*, **1940**, 375.
179. Wheelock, C. E. The fluorescence of some coumarins. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 1348-1352.
180. Reynolds, G. A.; Drexhage, K. H. New coumarin dyes with rigidized structure for flashlamp-pumped dye lasers. *Optics Communications* **1975**, *13*, 222-225.

181. Hammond, P. R., Fletcher, A. N., Henry, R.A., Atkins, R. L. Search for Efficient, Near UV Lasing Dyes. I. Substituent Effects on Bicyclic Dyes. *Appl. Phys.* **1975**, 8, 311-314.
182. Mujumdar, R. B.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J.; Waggoner, A. S. Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjug Chem* **1993**, 4, 105-11.
183. Panchuk-Voloshina, N.; Haugland, R. P.; Bishop-Stewart, J.; Bhalgat, M. K.; Millard, P. J.; Mao, F.; Leung, W. Y. Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J Histochem Cytochem* **1999**, 47, 1179-88.
184. Gao, X.; Cui, Y.; Levenson, R. M.; Chung, L. W.; Nie, S. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol* **2004**, 22, 969-76.
185. Frigerio, C.; Ribeiro, D. S.; Rodrigues, S. S.; Abreu, V. L.; Barbosa, J. A.; Prior, J. A.; Marques, K. L.; Santos, J. L. Application of quantum dots as analytical tools in automated chemical analysis: a review. *Anal Chim Acta* **2012**, 735, 9-22.
186. Bottrill, M.; Green, M. Some aspects of quantum dot toxicity. *Chem Commun (Camb)* **2011**, 47, 7039-50.
187. Beyersmann, D.; Hechtenberg, S. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **1997**, 144, 247-61.
188. Anas, A.; Akita, H.; Harashima, H.; Itoh, T.; Ishikawa, M.; Biju, V. Photosensitized breakage and damage of DNA by CdSe-ZnS quantum dots. *J Phys Chem B* **2008**, 112, 10005-11.
189. Stohs, S. J.; Bagchi, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* **1995**, 18, 321-36.
190. Prakash, A. S.; Rao, K. S.; Dameron, C. T. Cadmium inhibits BPDE alkylation of DNA in the major groove but not in the minor groove. *Biochem Biophys Res Commun* **1998**, 244, 198-203.
191. Hossain, Z.; Huq, F. Studies on the interaction between Cd(2+) ions and DNA. *J Inorg Biochem* **2002**, 90, 85-96.
192. Kloepfer, J. A.; Mielke, R. E.; Wong, M. S.; Neelson, K. H.; Stucky, G.; Nadeau, J. L. Quantum dots as strain- and metabolism-specific microbiological labels. *Appl Environ Microbiol* **2003**, 69, 4205-13.
193. Samia, A. C.; Chen, X.; Burda, C. Semiconductor quantum dots for photodynamic therapy. *J Am Chem Soc* **2003**, 125, 15736-7.
194. Samia, A. C.; Dayal, S.; Burda, C. Quantum dot-based energy transfer: perspectives and potential for applications in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* **2006**, 82, 617-25.
195. Daltrozzo, E., Hohlneicher, G., Scheibe, G. CH-acidity and tautomerism of 2-quinolylmethane derivatives. *Berichte der Bunsen-Gesellschaft* **1965**, 69, 190-196.
196. Treibs, A.; Kreuzer, F.-H. Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen. *Liebigs Ann.* **1968**, 718, 208-223.
197. Vos, d. W. E.; Pardoën, J. A.; Van, K. J. A.; Lugtenburg, J. Pyrromethene-boron difluoride complexes (4,4'-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenes). Synthesis and luminescence properties. *J. Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1977**, 96, 306-309.
198. Worries, H. J.; Koek, J. H.; Lodder, G.; Lugtenburg, J.; Fokkens, R.; Driessen, O.; Mohn, G. R. A novel water-soluble fluorescent probe: synthesis, luminescence and biological properties of the sodium salt of the 4-sulfonato-3,3',5,5'-tetramethyl-2,2'-pyrromethene-1,1'-BF₂ complex. *J. Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1985**, 104, 288-291.

199. Falk, H.; Hofer, O.; Lehner, H. Beiträge zur Chemie der Pyrrolpigmente, 1. Mitt.: Der induzierte Circular dichroismus einiger Pyrromethenderivate in cholesterischer Mesophase. *Monatsh. Chem.* **1974**, 105, 169-178.
200. Worries, H. J.; Koek, J. H.; Lodder, G.; Lugtenburg, J.; Fokkens, R.; Driessen, O.; Mohn, G. R. A novel water-soluble fluorescent probe: Synthesis, luminescence and biological properties of the sodium salt of the 4-sulfonato-3,3',5,5'-tetramethyl-2,2'-pyrromethen-1,1'-BF₂ complex. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1985**, 104, 288 - 291.
201. de Wael, E. V.; Pardoën, J. A.; van Koeveringe, J. A.; Lugtenburg, J. Pyrromethene-BF₂ complexes (4,4'-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenes). Synthesis and luminescence properties. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1977**, 96, 306-309.
202. Registered trademark of Molecular Probes. <http://probes.invitrogen.com>
203. Monsma, F. J., Jr.; Barton, A. C.; Kang, H. C.; Brassard, D. L.; Haugland, R. P.; Sibley, D. R. Characterization of novel fluorescent ligands with high affinity for D1 and D2 dopaminergic receptors. *J Neurochem* **1989**, 52, 1641-4.
204. Haugland, R. P., Kang, H.C. Chemically reactive dipyrrometheneboron difluoride dyes US 4.774.339. **1988**.
205. Dumont, Y.; Gaudreau, P.; Mazzuferi, M.; Langlois, D.; Chabot, J. G.; Fournier, A.; Simonato, M.; Quirion, R. BODIPY-conjugated neuropeptide Y ligands: new fluorescent tools to tag Y1, Y2, Y4 and Y5 receptor subtypes. *Br J Pharmacol* **2005**, 146, 1069-81.
206. Ilien, B.; Franchet, C.; Bernard, P.; Morisset, S.; Weill, C. O.; Bourguignon, J. J.; Hibert, M.; Galzi, J. L. Fluorescence resonance energy transfer to probe human M1 muscarinic receptor structure and drug binding properties. *J Neurochem* **2003**, 85, 768-78.
207. Alquicer, G.; Sedlak, D.; Byun, Y.; Pavlicek, J.; Stathis, M.; Rojas, C.; Slusher, B.; Pomper, M. G.; Bartunek, P.; Barinka, C. Development of a high-throughput fluorescence polarization assay to identify novel ligands of glutamate carboxypeptidase II. *J Biomol Screen* **2012**, 17, 1030-40.
208. Jiang, X. J.; Wong, C. L.; Lo, P. C.; Ng, D. K. A highly selective and sensitive BODIPY-based colourimetric and turn-on fluorescent sensor for Hg²⁺ ions. *Dalton Trans* **2011**, 41, 1801-7.
209. Karolin, J.; Johansson, L. B. A.; Strandberg, L.; Ny, T. Fluorescence and Absorption Spectroscopic Properties of Dipyrrometheneboron Difluoride (BODIPY) Derivatives in Liquids, Lipid Membranes, and Proteins. *J Am Chem Soc* **1994**, 116, 7801-7806.
210. Wagner, R. W., Lindsey, J. S. Boron-dipyrromethene dyes for incorporation in synthetic multi-pigment light harvesting arrays. *Pure Appl. Chem.* **1996**, 68, 1373-1380.
211. Yang, J. J.; Kularatne, S. A.; Chen, X.; Low, P. S.; Wang, E. Characterization of in vivo disulfide-reduction mediated drug release in mouse kidneys. *Mol Pharm* **2012**, 9, 310-7.
212. Chen, J.; Burghart, A.; Derecskei-Kovacs, A.; Burgess, K. 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY) dyes modified for extended conjugation and restricted bond rotations. *J Org Chem* **2000**, 65, 2900-6.
213. Niu, S. L.; Massif, C.; Ulrich, G.; Renard, P. Y.; Romieu, A.; Ziessel, R. Water-Soluble Red-Emitting Distyryl-Borondipyrromethene (BODIPY) Dyes for Biolabeling. *Chemistry* **2012**, 18, 7229-42.

214. Zhu, S.; Zhang, J.; Vegesna, G.; Luo, F. T.; Green, S. A.; Liu, H. Highly water-soluble neutral BODIPY dyes with controllable fluorescence quantum yields. *Org Lett* **2011**, 13, 438-41.
215. Prieto, J. B., Arbeloa, F. L., Martínèz, V.M. Arbeloa, I. L. Theoretical study of the ground and excited electronic states of pyrromethene 546 laser dye and related compounds. *Chem. Phys.* **2004**, 296, 13-22.
216. Ulrich, G.; Ziessel, R.; Haefele, A. A general synthetic route to 3,5-substituted boron dipyrromethenes: applications and properties. *J Org Chem* **2012**, 77, 4298-311.
217. Ziessel, R.; Ulrich, G.; Harriman, A. The chemistry of Bodipy: A new El Dorado for fluorescence tools. *New J. Chem.* **2007**, 31, 496-501.
218. Wagenknecht, H. A. Fluorescent DNA base modifications and substitutes: multiple fluorophore labeling and the DETEQ concept. *Ann N Y Acad Sci* **2008**, 1130, 122-30.
219. Ulrich, G.; Ziessel, R.; Harriman, A. The chemistry of fluorescent bodipy dyes: versatility unsurpassed. *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**, 47, 1184-201.
220. Loudet, A.; Burgess, K. BODIPY dyes and their derivatives: syntheses and spectroscopic properties. *Chem Rev* **2007**, 107, 4891-932.
221. Li, Z.; Mintzer, E.; Bittman, R. First synthesis of free cholesterol-BODIPY conjugates. *J Org Chem* **2006**, 71, 1718-21.
222. Treibs, A.; Herrmann, E.; Meissner, E.; Kuhn, A. Pyrrol-Austausch-Reaktionen zur Konstitution der Dipyrromethene und Porphyrine. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1957**, 602, 153-83.
223. Holmquist, H. E.; Benson, R. E. 2-Bora- and 2-Thia-1,3-diazaazulenes. *J. Chem. Soc.* **1962**, 84, 4720-4722.
224. Haugland, R. P. Fluorescent fatty acids derived from dipyrrometheneboron difluoride dyes US 5.338.854. **1994**.
225. Euler, H.; Kirfel, A.; Freudenthal, S. J.; Muller, C. E. Crystal structure of 8-(5-bromopentyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene, C₁₈H₂₄BBrF₂N₂. *Z. Kristallogr. NCS* **2002**, 217, 543-545.
226. Euler, H.; Kirfel, A.; Freudenthal, S. J.; Muller, C. E. Crystal structure of 4-bromobutyric acid 3-((4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen)-8-yl)propyl ester, C₂₀H₂₆BBrF₂N₂O₂. *Z. Kristallogr. NCS* **2002**, 217, 541-542.
227. Freudenthal, S. J. Synthese funktionalisierter BODIPY-Derivate und Markierung von Purinrezeptor-Liganden. Dissertation, Universität Bonn, Bonn, **2002**.
228. Heisig, F. Synthese neuer, funktionalisierter BODIPY-Fluorophore zur Fluoreszenzmarkierung von Membranrezeptor-Liganden. Dissertation, Bonn, Bonn, **2007**.
229. Yang, L.; Simionescu, R.; Lough, A.; Yan, H. Some observations relating to the stability of the BODIPY fluorophore under acidic and basic conditions. *Dyes and Pigments* **2011**, 91, 264-267.
230. Becker, G. O., Berger, G., Domschke, G. *Organikum*. 22. ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2004**.
231. Frisch, A. C.; Beller, M. Katalysatoren machen's möglich: Selektive C-C-Kupplungen mit nichtaktivierten Alkylhalogeniden. *Angewandte Chemie* **2005**, 117, 680-695.
232. Dondoni, A. The emergence of thiol-ene coupling as a click process for materials and bioorganic chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**, 47, 8995-7.

233. Hoyle, C. E.; Bowman, C. N. Thiol-ene click chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl* **2010**, 49, 1540-73.
234. Goncalves, M. S. Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes. *Chem Rev* **2009**, 109, 190-212.
235. Shepherd, J. L.; Kell, A.; Chung, E.; Sinclair, C. W.; Workentin, M. S.; Bizzotto, D. Selective reductive desorption of a SAM-coated gold electrode revealed using fluorescence microscopy. *J Am Chem Soc* **2004**, 126, 8329-35.
236. Esfandiari, N. M.; Wang, Y.; Bass, J. Y.; Blum, S. A. Deconvoluting subensemble chemical reaction kinetics of platinum-sulfur ligand exchange detected with single-molecule fluorescence microscopy. *Inorg Chem* **2011**, 50, 9201-3.
237. Starostin, E. K.; Ignatenko, A. V.; Lapitskaya, M. A.; Pivnitsky, K. K.; Nikishin, G. I. Synthesis of ω - and ($\omega - 1$)-acetylenic acids from five-, six-, or seven-membered cycloalkanones. *Russian Chemical Bulletin* **2001**, 50, 833-837.
238. Hayashi, T.; Kawakami, Y.; Konno, K.; Takayama, H. A novel approach to functionalised polycyclic systems; intramolecular Diels-Alder reactions of 2-acylated derivatives of 4H,6H-thieno[3,4-c]furan 5,5-dioxide. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1993**, 2387-2388.
239. Vernall, A. J.; Stoddart, L. A.; Briddon, S. J.; Hill, S. J.; Kellam, B. Highly potent and selective fluorescent antagonists of the human adenosine A₃ receptor based on the 1,2,4-triazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one scaffold. *J Med Chem* **2011**, 55, 1771-82.
240. Behrenswerth, A. Adenosin-Rezeptoren und neurodegenerative Erkrankungen: Untersuchung des Einflusses von Cholesterol und Evaluierung neuer funktionalisierter Liganden als pharmakologische Werkzeuge. Universität Bonn, Bonn, **2008**.
241. Volpini, R. C., S.; Lambertucci, C.; Portino, F. R.; Taffi, S.; Vittori, S.; Zablocki, J. A.; Klotz, K. N. Adenosine receptor agonists: synthesis and binding affinity of 2-(aryl)alkylthioadenosine derivatives. *ARKIVOC* **2004**, 5, 301-311.
242. Mihara, T.; Mihara, K.; Yarimizu, J.; Mitani, Y.; Matsuda, R.; Yamamoto, H.; Aoki, S.; Akahane, A.; Iwashita, A.; Matsuoka, N. Pharmacological characterization of a novel, potent adenosine A₁ and A_{2A} receptor dual antagonist, 5-[5-amino-3-(4-fluorophenyl)pyrazin-2-yl]-1-isopropylpyridine-2(1H)-one (ASP5854), in models of Parkinson's disease and cognition. *J Pharmacol Exp Ther* **2007**, 323, 708-19.
243. Gao, Z. G.; Blaustein, J. B.; Gross, A. S.; Melman, N.; Jacobson, K. A. N6-Substituted adenosine derivatives: selectivity, efficacy, and species differences at A₃ adenosine receptors. *Biochem Pharmacol* **2003**, 65, 1675-84.
244. Müller, C. E.; Jacobson, K. A. Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. *Biochim Biophys Acta* **2011**, 1808, 1290-308.
245. Zhao, G.; Linke, A.; Xu, X.; Ochoa, M.; Belloni, F.; Belardinelli, L.; Hintze, T. H. Comparative profile of vasodilation by CVT-3146, a novel A_{2A} receptor agonist, and adenosine in conscious dogs. *J Pharmacol Exp Ther* **2003**, 307, 182-9.
246. Cunha, R. A.; Ferre, S.; Vaugeois, J. M.; Chen, J. F. Potential therapeutic interest of adenosine A_{2A} receptors in psychiatric disorders. *Curr Pharm Des* **2008**, 14, 1512-24.
247. Jacobson, K. A.; Gao, Z. G. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, 5, 247-64.
248. Frobenius, W. 2-Arylpurin-6,8-dione und verwandte Verbindungen. Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg, **2000**.

249. Bauer, A. A. Synthese und Struktur-Wirkungsbeziehungen neuer 2-Phenylpurine und Struktur analoger Verbindungen als Adenosinerezeptor-Antagonisten. Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn, **2004**.
250. Baraldi, P. G.; Saponaro, G.; Aghazadeh Tabrizi, M.; Baraldi, S.; Romagnoli, R.; Moorman, A. R.; Varani, K.; Borea, P. A.; Preti, D. Pyrrolo- and pyrazolo-[3,4-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidines as adenosine receptor antagonists. *Bioorg Med Chem* **2012**, 20, 1046-59.
251. Hinz, S. Bedeutung ausgewählter Aminosäuren für die Ligand-Bindung und Aktivierung des humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptors. Universität Bonn, Bonn, **2007**.
252. Buckle, F. J.; Pattison, F. L. M.; Saunders, B. C. 314. Toxic fluorine compounds containing the C-F link. Part VI. small ω -Fluorocarboxylic acids and derivatives. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1949**, 1471-1479.
253. Buck, I. M., Reese, C. B. An unambiguous synthesis of adenylosuccinic acid and its constituent nucleoside. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1990**, 2937-2942.
254. Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Third ed.; Springer Science and Business Media: New York, 2010.
255. Heidcamp, W. H. Cell Biology Laboratory Manual. <http://homepages.gac.edu/~cellab/chpts/chpt1/ex1-6.html>
256. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **1951**, 193, 265-75.
257. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976**, 72, 248-54.
258. Cheng, Y.; Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **1973**, 22, 3099-108.
259. Daly, J. W.; Padgett, W. L.; Secunda, S. I.; Thompson, R. D.; Olsson, R. A. Structure-activity relationships for 2-substituted adenosines at A₁ and A₂ adenosine receptors. *Pharmacology* **1993**, 46, 91-100.
260. Siddiqi, S. M.; Jacobson, K. A.; Esker, J. L.; Olah, M. E.; Ji, X. D.; Melman, N.; Tiwari, K. N.; Secrist, J. A., 3rd; Schneller, S. W.; Cristalli, G.; et al. Search for new purine- and ribose-modified adenosine analogues as selective agonists and antagonists at adenosine receptors. *J Med Chem* **1995**, 38, 1174-88.
261. Bulicz, J.; Bertarelli, D. C.; Baumert, D.; Fulle, F.; Müller, C. E.; Heber, D. Synthesis and pharmacology of pyrido[2,3-d]pyrimidinediones bearing polar substituents as adenosine receptor antagonists. *Bioorg Med Chem* **2006**, 14, 2837-49.

13. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt und so zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich meiner wissenschaftlichen Betreuerin Frau Prof. Dr. Christa E. Müller für die interessanten und vielseitigen Projekte, die ich im Rahmen meiner Promotion bearbeiten durfte. Besonders möchte ich dir für das entgegengebrachte Vertrauen in mich und meine Arbeit danken. Durch die richtige Mischung aus sehr guter Projektkoordination, konstruktiven Diskussionen und der Gewährung großer Freiräume bei der Gestaltung der Forschungsarbeit hast du maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Des Weiteren möchte ich dir für deine Unterstützung bei Publikationen und der Möglichkeit bei zahlreichen Kongressen meine Arbeit präsentieren zu können danken.

Frau Priv.-Doz. Dr. Anke Schiedel danke ich nicht nur für die Übernahme des Korreferats, sondern auch für ihre Unterstützung im Isolabor und zahlreichen hilfreichen Fachgesprächen.

Ebenfalls möchte ich mich bei den Mitgliedern der Prüfungskommission bedanken, Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde und Herrn Prof. Dr. Sigurd Höger.

Dem Graduiertenkolleg 804 danke ich für die finanzielle Förderung und die Kostenübernahme bei Kongressen. Allen Mitgliedern des Graduiertenkollegs, allen voran Dr. Sven J. Freudenthal, danke ich für die gut organisierten Workshops und Symposien sowie für die zahlreichen Stammtisch-Treffen.

Herrn Prof. Dr. Michael Gütschow und Herrn Dr. Markus Hubert sowie allen AssistentInnen des 3. Semesters danke ich für die sehr gute und oftmals sehr spaßige Zusammenarbeit bei der Studentenbetreuung.

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Mitarbeiter und Freunde im Institut beigetragen. Zunächst möchte ich Dr. Andreas Brunschweiger, Dr. Thomas Bormann, Dr. Ali El-Tayeb, Dr. Simone Hildenbrand, Mario Funke, Dr. Fabian Heisig und Dr. Volker Bickert für die zahlreichen chemischen Diskussionen und die hervorragende Zusammenarbeit in den Syntheselaboren danken.

Marion Schneider, Sabine Terhart-Krabbe und Annette Reiner danke ich für ihr großes Engagement bei der Durchführung der Analytik, der Aufmunterung, wenn das Spektrum mal wieder nicht ganz so aussah wie erwartet und für die Gleichberechtigung auch von Proben, die kein „Schild“ mit „höchster Priorität“ trugen.

Herrn Wolfgang Bosse danke ich für seine schnelle Hilfe bei diversen elektronischen „Notfällen“. Ohne dich hätte ich mehrere Nervenzusammenbrüche bekommen.

Ein ganz herzlicher Dank geht auch an Frau Nicole Florin, die mir bei der Einarbeitung ins Isotopenlabor immer hilfreich zur Seite stand und mir durch ihre herzliche und lustige Art so manchen dristen Laboralltag verschönert hat.

Ein ganz großer Dank geht auch an Dr. Meryem Köse, Priv. Doz. Dr. Anke Schiedel und Dr. Sonja Hinz für ihre stete Hilfe bei Problemen bei der Testung, Zellkultur oder der Mikroskopie.

Desweiteren habe ich mit so vielen netten und hilfsbereiten Leuten aus unserem Arbeitskreis in all den verschiedenen Laboren auf dem dritten, vierten und fünften Stock zusammengearbeitet (Doktoranden, Postdocs, TAs, Masteranden, Diplomanden, Praktikanten). In Anbetracht der großen Anzahl möchte ich hier keine Namen nennen, aber ich hoffe, dass du - lieber aufmerksame Leser der Danksagung - dich an dieser Stelle angesprochen fühlst: Vielen herzlichen Dank für die überaus herzliche Aufnahme in das pharmazeutische Institut und für die tolle Atmosphäre, die gute Zusammenarbeit, die fachlichen und weniger fachlichen Gespräche, das gemeinsame Fluchen und Jubeln und für eine tolle Zeit im Labor!

Auch außerhalb des Arbeitskreises möchte ich mich bei verschiedenen Leuten, die mit Laborausrüstung, Chemikalien oder Fachwissen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken: Prof. Dr. Sauer, Dr. Ralf Brune, Dr. Philipp Ottersbach, Dr. Stefan Dosa, Matthias Mertens, Dr. Maxim Fritzer, Janina Schmitz, Matthias Christlieb, Dr. Lars Möllmann, Kerstin Steggemann, Dr. Katja Sterz und Dr. Anya Kalayda.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich ganz herzlich Dr. Simone Hildenbrand, Dr. Jana Moldenhauer und Mario Funke.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Kollegen und Freunde:

Meinen Bürokollegen Simone, Amelie, Mario, Andreas, Thomas, Frank, Heiko, Ali, Federica, Marion, Christiane, Meryem, Claudia, Svenja, Sang-Yong und Wessam und meinen „Nachbarbüro-Kollegen“ Dominik, Diana, Marianne, Volker, Viktor, Alex und Bernt. Vielen Dank für die zahlreichen lustigen Abende (am Rhein, auf dem Balkon, Spieleabende oder Auswärts) und die tollen Wochenendunternehmungen (Heidepark, Dresden, Luxemburg, Münster, Cabriobus,...). Vielen Dank auch für die Begleitung zu Konzerten, Comediens und ins Fußballstadion. Danke, für Eure Freundschaft, Euer offenes Ohr und eine unvergessliche Zeit!

Ein ganz besonderer Dank geht auch an meine lieben FreundInnen aus dem Studium und der Schulzeit: Anna, Cathrin, Chris, Frank, Frederike, Jana, Markus, Martin, Matthias, Michi, Sonja, Sandra, und Sebastian (falls ich jemanden an dieser Stelle vergessen haben sollte, hoffe ich das derjenige es mir verzeihe oder diese Arbeit niemals in die Hände bekommt). Ich danke Euch ganz herzlich für Eure Unterstützung, Aufmunterung, das viele gemeinsame Lachen und die vielen Gespräche über Gott und die Welt, zahlreiche gemeinsame Feiern, das traditionelle Weihnachtswichteln, Spiele- und Kochrunden und

Ausflüge. Auch wenn wir uns mittlerweile leider nicht mehr ganz so häufig sehen, ist es schön zu sehen und gut zu wissen, dass man jederzeit freudig erwartet wird und sich einige Dinge scheinbar nie ändern.

Danken möchte ich außerdem meinen Eltern und meiner Oma. Ihr habt mich aus der Ferne in leichten und schweren Momenten immer unterstützt und mich mit unendlichem Verständnis und Ermutigung die letzten Jahre begleitet. Euch habe ich alles zu verdanken, was ich bis heute erreicht habe.

„Leider lässt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.“

(Johann Wolfgang von Goethe, 1749-1832)

Publikationsverzeichnis

El-Tayeb, A.; Michael, S.; Abdelrahman, A.; Behrenswerth, A.; Gollos, S.; Nieber, K.; Müller, C. E. Development of Polar Adenosine A_{2A} Receptor Agonists for Inflammatory Bowel Disease: Synergism with A_{2B} Antagonists. *Medicinal Chemistry Letters*, **2011**, 2, 890-895.

El-Tayeb, A., Gollos, S., 2-Hydrazinyladenosine Derivatives: Synthesis and structure-activity relationships as A_{2A} adenosine receptor ligands, *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, 21, 436-447.

Gollos, S., Heisig, F., Freudenthal, El-Tayeb, A., S.J., Iqbal, J., Müller, C. E., Synthesis of BODIPY derivatives substituted with various bioconjugatable linker groups: A construction kit for fluorescent labeling of receptor ligands, *Journal of Fluorescence*, **2013**, in press.

Kongressbeiträge

Gollos, S.; Heisig, F.; Freudenthal, S. J.; Iqbal, J.; Brune, R.; Sauer, M.; Müller, C. E. A simple route to new, functionalized BODIPY derivatives. DPhG Jahrestagung **2008**, Bonn (Poster).

Gollos, S.; Heisig, F.; Freudenthal, S. J.; Behrenswerth, A.; Iqbal, J.; Brune, R.; Sauer, M.; Müller, C. E. New fluorescent-labeled adenosine receptor ligands. 3rd Joint Italian-German purine club meeting "Purinergic receptors: New frontiers for novel therapies. Camerino, Italy **2009** (Poster). Abstract published in *Purinergic Signalling* 2009.

Gollos, S.; Heisig, F.; Behrenswerth, A.; Müller, C. E. Novel fluorescent biological tools for studying adenosine receptors. Purines **2010**, 10th International symposium on adenosine and adenine nucleotides in biomedicine, Tarragona, Spanien (Poster). Abstract published in *Purinergic Signalling* 2010.

Gollos, S.; Heisig, F.; Freudenthal, S. J.; Behrenswerth, A.; Müller, C. E. Synthesis of novel fluorescent-labeled ligands for studying adenosine receptors. 21st International Symposium on medicinal chemistry **2010**, Brüssel (Poster Preis).

El-Tayeb, A.; Michael, S.; Abdelrahman, A.; Behrenswerth, A.; Gollos, S.; Nieber, K.; Müller, C. E. Development of PSB-0777: A highly polar, not perorally absorbable A_{2A}-selective agonist with potential for the treatment of inflammatory bowel diseases. 4th Joint Italian-German purine club meeting" International Conference on purinergic drugs and targets", **2011**, Bonn (Poster).

Gollos, S.; El-Tayeb, A.; Heisig, F.; Freudenthal, S. J.; Müller, C. E., Synthesis of new fluorescent molecular sensors for studying adenosine receptors. 4th Joint Italian-German purine club meeting” International Conference on purinergic drugs and targets”, **2011**, Bonn (Poster). Abstract published in *Purinergic Signalling* 2011.

El-Tayeb; Gollos, S.; Abdelrahman, A.; Heisig, F.; Harrach, S.; Behrenswerth, A., Müller, C. E., Synthesis of new fluorescent BODIPY-labeled nucleosides and nucleotides as molecular sensors for studying purine receptors, 22nd International Symposium on medicinal chemistry **2012**, Berlin (Poster).

Wissenschaftliche Preise

Posterpreis des 21st International Symposium on Medicinal Chemistry (ISMC-EFMC, **2010** Brüssel)

Gollos, S.; Heisig, F.; Freudenthal, S. J.; Behrenswerth, A.; Müller, C. E., Synthesis of novel fluorescent-labeled ligands for studying adenosine receptors.



Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ort, Datum

Unterschrift