

Multivalente Peptid-Dextrankonjugate
als zellgängige Inhibitoren für das pre-
mRNA Splicingprotein FBP21 und die
West-Nil-Virus Protease NS2B-NS3

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

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

vorgelegt von

CHRISTINA FISCHER

aus Göttingen

Berlin 2019

Die Promotionsarbeit wurde im Zeitraum von März 2014 bis Februar 2019 am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg Rademann angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Jörg Rademann

Zweitgutachter: Prof. Dr. Christian Freund

Tag der Disputation: 13-Sep-2019

Erklärung

Hiermit versichere ich, Christina Fischer, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine weiteren als die hier aufgeführten Hilfsmittel verwendet habe.

Christina Fischer

Für meine Lieblingmenschen

Danksagung

Ich danke ganz herzlich Prof. Dr. Jörg Rademann für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Betreuung während meiner Zeit im Arbeitskreis und die langjährige finanzielle Unterstützung.

Prof. Dr. Christian Freund danke ich für die Projektzusammenarbeit und die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

I'd like to thank Miriam Bertazzon for our shared collaboration on the FBP21 project. Even though it was really hard at times, we finally steered the project in the right direction. Thank you for your invaluable help and open ear in times of trouble. I know you'll finish soon as well. Best of luck for your future!

Weiterhin möchte ich Lisa Redl, Stephanie Kallis, Dr. Christoph Nitsche und Dr. Christoph Arkona für die gute Zusammenarbeit bei den West-Nil Virus Inhibitoren danken.

Mike Jaegle, Barbara Schroeder und insbesondere Alexandra Gruber möchte ich ganz herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

Meinen herzlichen Dank an Cathleen Schlesener für die Hilfe und vielen Ratschläge bei den GPC-Messungen.

Purba Kashyap und Prof. Dr. Helge Ewers möchte ich für ihre Hilfe bei den anfänglichen Mikroskopieuntersuchungen und die Benutzung des Konfokalmikroskops danken.

Vielen Dank an Joanna Blaskiewicz für die gemeinsame Zeit während der Schreibphase und deine vielen Ratschläge in den letzten Monaten.

Mein herzlicher Dank gilt Silke Bergemann für ihre Hilfe in der Zellkultur und bei großen und kleinen Problemen persönlicher Natur. Ich werde unsere gemeinsamen Gespräche sehr vermissen.

Vielen Dank an Eleonore Christmann-Oesterreich für die Messung der HRMS-Spektren, Elementaranalysen und die unterhaltsamen HPLC-Vormittage.

Vielen Dank an Dr. Christoph Arkona für die Hilfe bei den verschiedensten Problemen. Deine unterhaltsame Art und unsere Gespräche werden mir lange in Erinnerung bleiben.

Meinen Praktikanten Lauryna Daukšaitė, Sandra Uhlemann und Carolin Köhler danke ich für ihr Interesse und die gute Zusammenarbeit.

Mein großer Dank geht an den SFB765 „Multivalenz als chemisches Organisations- und Wirkprinzip“, ohne dessen jahrelange finanzielle Förderung und Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Ich möchte insbesondere meinen Kollegen Mike Jaegle, Sebastian Köhling, Xinning Wang und Damian Klemczak für die schöne Zeit und angenehme Atmosphäre im Labor 357/358 danken.

Dear Ee Lin, thank you for being such a great friend. I'm glad that you came to Germany for your Ph.D. and we got to spend this awesome time together. You lightened up the working-group and are sorely missed here.

Mein herzlicher Dank geht an Mike und Franzi für die schöne gemeinsame Zeit. Ihr wart über lange Zeit meine Arbeits-Ersatzfamilie und ich vermisse euch hier sehr. Unsere gemeinsamen Opernbesuche und Sushi-Abende, sowohl die Irlandreise werden mir lange in Erinnerung bleiben. Ich hab euch lieb.

Vielen lieben Dank an Anette, Babaha, Miham, Doschi und Sven. Durch euch sind die letzten anderthalb Jahre hier unvergesslich geworden. Ich bin froh, dass ich länger als erwartet im Arbeitskreis geblieben bin und somit die Chance hatte euch alle kennen zu lernen.

Natürlich möchte ich auch meinen lieben Kollegen Eric Nawrotzky, Lisa Redl, Matteo Accorsi, Carolin Tauber, Yuwen Jia, Marc Röger, Sabrina Lechnitz, Markus Tiemann, Enaam Masri, Umer Bin Abdul Aziz, Péter Varga, Felix Müller, Isabel Fernández-Bachiller, Thomas Rudolf und Regina Allner für die vielen unterhaltsamen Gespräche, gemeinsamen Grill- und Spieleabende und die schöne Zeit danken.

Vielen Dank an Christina Haake, du hast die Anfangszeit meiner Promotion live vom Küchentisch aus miterlebt und mir abends immer mit Rat und einem offenem Ohr beigestanden. Unsere gemeinsame WG-Zeit und daraus entstandene Freundschaft bedeutet mir viel.

Liebe Lea, vielen Dank für deine Freundschaft in den letzten sechs Jahren. Du warst meine erste wirkliche Freundin in Berlin und hast mich oft vom stressigen Laboralltag abgelenkt. Unsere gemeinsamen Laufabenteuer, Kanutrips und Besuche im Swera sind für mich unvergesslich. Obwohl wir oft beide viel zu tun haben, bist du doch stets für mich da. Ich hab dich lieb.

Vielen lieben Dank an meine Clausthal-Mädels Carina, Tabea und Maria. Eure Freundschaft bedeutet mir sehr viel. Vielen Dank, dass ihr immer für mich da seid und ein offenes Ohr für jegliche Probleme habt. Ich bin froh, dass unsere gemeinsamen Wochenenden immer noch genauso schön sind, wie damals als wir alle in Clausthal wohnten. Ich hab euch lieb.

Liebe Kathi, vielen Dank, dass du immer an mich geglaubt hast und mich unterstützt hast. Du warst in den letzten 31 Jahren immer für mich da und hast auf mich aufgepasst. Egal wie weit wir voneinander entfernt sind, ich weiß, dass ich immer auf dich zählen kann. Du bist die beste große Schwester der Welt. Ich hab dich lieb.

Mein aufrichtiger Dank gilt meinem Vater Alfredo. Durch deine Unterstützung und deinen unerschütterlichen Glauben in mich hast du mir ermöglicht, mein Leben so zu gestalten, wie ich es mir vorgestellt habe. Du hast mir gezeigt, dass es möglich ist von einer besseren Zukunft zu träumen und diese auch zu erreichen, wenn man an sich glaubt und an ihr arbeitet. Ich hab dich lieb.

Mein besonderer Dank gilt Marcus Bodeck. Du hast mich durch die Höhen und Tiefen der letzten anderthalb Jahre getragen. Durch deine Kraft und deine Zuversicht habe ich den Mut gefunden, mich durch die letzten schweren Monate zu kämpfen. Besonders die letzten Monate waren nicht immer leicht mit mir, aber du hast mich trotzdem immer unterstützt und mich wieder aufgebaut. Die Familie, die du mir gegeben hast, ist zum Mittelpunkt meines Lebens geworden und ich würde euch für nichts auf der Welt eintauschen wollen. Ich liebe dich.

Vielen Dank an Antonius und Victoria. Ihr seid der Sonnenschein in meinem Leben. Ich hab euch lieb.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung.....	VI
Danksagung.....	X
Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Konjugatbeladungs-Inhaltsverzeichnis.....	X
Zusammenfassung	XII
Abstract	XIV
1. Allgemeiner Teil.....	1
1.1. Einleitung	2
1.2. Multivalenz	3
1.2.1. Bindungsaffinitäten in multivalenten Systemen.....	6
1.2.2. Thermodynamik von multivalenten Systemen	7
1.2.3. ITC als Messmethode in multivalenten Systemen.....	9
1.3. Verwendung von Polymerkonjugaten.....	12
1.3.1. Kupplungsstrategien für Polymerkonjugate.....	15
1.4. FBP21 und der Einfluss der Tandem-WW-Domänen auf das Splicing.....	18
1.5. Zelluläre Aufnahme von Makromolekülen	22
1.5.1. Zellpenetrierende Peptide	28
1.5.2. Kernlokalisationssequenzen	31
1.6. West-Nil-Virus und die NS2B-NS3 Protease.....	34
2. Zielsetzung	41
2.1. Inhibitoren der Tandem-WW-Domänen des FBP21	41
2.2. Inhibitoren für die West-Nil-Virus Protease NS2B-NS3	43
3. Ergebnisse und Diskussion: Inhibitoren der Tandem WW-Domänen des FBP21.....	45
3.1. Peptid-Dextran Konjugate.....	46
3.1.1. Modifizierung und Analytik des Dextrangrundgerüsts	46

3.1.2. Synthese der verwendeten Peptide und Fluorophore	52
3.1.3. Synthese der Peptid-Dextran Konjugate mittels Maleinimid-Thiol Reaktion..	57
3.2. Analytik der Peptid-Dextran Konjugate	59
3.2.1. Bestimmung der Konjugatbeladung mittels ¹ H-NMR-Spektroskopie	60
3.2.2. Bestimmung der Konjugatbeladung mittels Absorptionsspektroskopie	61
3.3. Methodvalidierung mittels Gelpermeationschromatographie	70
3.4. Messung der Bindungsaffinitäten mittels ITC	75
3.5. Zytotoxizitätsbestimmungen.....	84
3.6. Untersuchung der zellulären Aufnahme der Konjugate	95
3.7. <i>In vitro</i> Splicing-Assay	101
3.8. Bestimmung der Interaktionspartner mittels Pulldown-Assay.....	106
4. Ergebnisse und Diskussion: Inhibitoren der West-Nil-Virus Protease NS2B-NS3 ..	113
4.1. Synthese von WNV NS2B-NS3 Protease Inhibitoren	114
4.2. Zellbasierte Aktivitätsbestimmung der flaviviralen Inhibitoren	125
5. Resümee und Ausblick für zukünftige Arbeiten	135
6. Experimententeil.....	143
6.1. Chemikalien.....	144
6.2. Analytische Methoden und Geräte	144
6.3. Präparative Methoden und Geräte.....	148
6.4. Biophysikalische Methoden.....	149
6.5. Zellbiologische Methoden	150
6.6. Synthetisierte Verbindungen.....	153
6.7. Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)	166
7. Literaturverzeichnis	179
8. Veröffentlichungen	190
8.1. Publikationen	190
8.2. Konferenzen und Postervorträge	190

9. Lebenslauf.....	191
10. Anhang.....	193
10.1. Beladungsbestimmung mittels Absorptionsspektroskopie	193
10.2. ITC-Daten.....	202
10.3. Resazurin-Assay: Negativkontrolle.....	214
10.4. Zellviabilitäten	215
10.5. Pulldown-Assay: Die 30 häufigsten Bindungspartner	222
10.6. Inhibition WNV (Plaque-Assay, MOI 0,1).....	225
10.7. Inhibition DENV (Plaque-Assay, 25 – 6,25 μ M)	226
10.8. Inhibition DENV (Plaque-Assay, 10 – 0,1 μ M)	227
10.9. NMR-Spektren.....	229

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström (Einheit)
Ac ₂ O	Acetanhydrid
AlMe ₃	Trimethylaluminium
Al ₂ O ₃	Aluminiumoxid
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
ATP	Adenosintriphosphat
β	Verstärkungsfaktor
Bid-BH3	Apoptotisches Peptid
BLI	Bio-Layer-Interferometrie
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc ₂ O	Boc-Anhydrid
Brr2	RNA-Helikase (<i>engl. bad response to refrigeration 2</i>)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>engl. complementary DNA</i>)
CED	Carboxyethyl-dextran
CHCl ₃	Chloroform
CPP	Zellpenetrierende Peptide (<i>engl. cell-penetrating peptides</i>)
DCM	Dichlormethan
ΔG	Freie Enthalpie
ΔH	Bindungsenthalpie
ΔS	Bindungsentropie
DENV	Dengue-Virus
DIAD	Azodicarbonsäurediisopropylester
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl. deoxyribonucleic acid</i>)
DP	Leistungsänderung (<i>engl. differential power</i>)
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDT	1,2-Ethandithiol
EtOAc	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
EIPA	5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amilorid
<i>et al.</i>	und andere (<i>lat. et alii</i> (Maskulinum) bzw. <i>et aliae</i> (Femininum))
FBP21	Formin-bindendes Protein 21
FCS	Fetales Kälberserum (<i>engl. fetal cow serum</i>)
<i>FG-Nups</i>	Phenylalanin-Glycin Nukleopore
FLAG-Tag	Peptidsequenz (DYKDDDDK)
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
GAG	Glykosaminoglykane
GCMA	<i>trans</i> -(4-Guanidinium)cyclohexylmethanamid
g/mol	Gramm pro Mol (Einheit)
GPC	Gelpermeationschromatographie
HCl	Salzsäure
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen (<i>engl. human embryonic kidney cells</i>)
HeLa	Humane Zervixkarzinomzellen entnommen von Henrietta Lacks
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hex	Hexan
HIV	Humaner Immundefizienz-Virus
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
hPG	Hochverzweigtes Polyglycerin
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie (<i>engl. high resolution MS</i>)
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
ITC	isothermale Titrationskalorimetrie

IVS-Negativ	Peptidsequenz, Negativkontrolle <i>in vitro</i> Splicing-Assay (WSPSADVPD)
f	Kopplungskonstante
K_A	Assoziationskonstante
kb	Kilobasen (Einheit)
K_D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton (Einheit)
k.In.	Kurze Inkubationszeit (10 min)
kJ/mol	Kilojoule pro mol (Einheit)
LC/MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
LDL	Lipoprotein niederer Dichte (<i>engl. low-density lipoprotein</i>)
m	Masse bzw. Einwaage
mBBP	(<i>engl. mammalian branch point binding protein</i>)
M β CD	Methyl- β -cyclodextrin
μ cal/s	Mikrokalorie pro Sekunde (Einheit)
MDa	Megadalton (Einheit)
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MID	Maleinimidextran
μ m	Mikrometer (Einheit)
μ M	Mikromolar (Einheit)
mM	Millimolar (Einheit)
MOI	Multiplizität der Infektion
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPLC	Mitteldruckflüssigchromatographie (<i>engl. middle pressure liquid chromat.</i>)
mRNA	Boten-RNA bzw. Ribonukleinsäure (<i>engl. messenger ribonucleic acid</i>)
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
MWCO	Molekulargewicht-Ausschlussgröße (<i>engl. molecular weight cut-off</i>)
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat

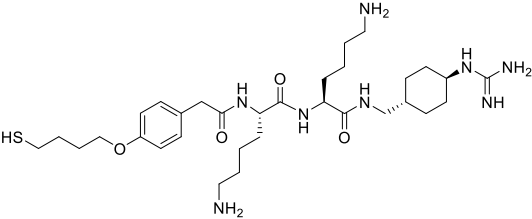
NaOH	Natronlauge bzw. Natriumhydroxid
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
NCL	Native Chemische Ligation
NEt ₃	Triethylamin
NF-κB	(<i>engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>)
NLS	Kernlokalisationsignal (<i>engl. nuclear localization signal</i>)
nM	Nanomolar (Einheit)
NMR	Kernresonanzspektroskopie (<i>engl. nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)
P2VP	Poly(2-vinylpyridin)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>engl. phosphate buffered saline</i>)
PDI	Polydispersität
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
pHPMA	Poly(<i>N</i> -(2-Hydroxypropyl)methacrylamid)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PPI	Protein-Protein Interaktion
ppm	<i>parts per million</i> (Einheit)
Prp40	pre-mRNA Prozessierungsprotein 40 (<i>engl. pre-mRNA processing protein 40</i>)
PRS	Prolin-reiche Sequenzen
PTHrP	Nebenschilddrüsenhormon-verwandtes Protein (<i>engl. parathyroid hormone-related protein</i>)
quant.	Quantitative Ausbeute
QTOF	(<i>engl. quadrupole time-of-flight mass spectrometer</i>)
Ran	Ras-ähnliches nukleäres Protein (<i>engl. Ras-related nuclear protein</i>)
RhB Pip	Rhodamin B-Piperazinamid
RI	Brechungsindex (<i>engl. refractive index</i>)
RP-HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<i>engl. reverse phase - high pressure liquid chromatography</i>)
RPM	Umdrehungen pro Minute (<i>engl. rotations per minute</i>)
SC35	Splicingfaktor
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)

SF1	Splicingfaktor 1
SH3	Sarkoma Homologie 3 (<i>engl. Src-homology 3</i>)
SmB/SmB'	(<i>engl. Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B'</i>)
snRNP	kleines nukleäres Ribonukleoprotein (<i>engl. small nuclear ribonucleoprotein</i>)
SPR	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (<i>engl. surface plasmon resonance spectroscopy</i>)
Src	Sarkoma
SV40	Affenvirus 40 (<i>engl. Simian virus 40</i>)
TAT	Transaktivator der Transkription (<i>engl. trans-activator of transcription</i>)
TBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium tetrafluorborat
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TFA	Trifluoressigsäure (<i>engl. Trifluoroacetic acid</i>)
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TMSBr	Trimethylsilylbromid
U1C	Splicingfaktor
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>engl. vascular endothelial growth factor</i>)
WNV	West-Nil-Virus
YFV	Gelbfieber-Virus (<i>engl. yellow fever virus</i>)
ZIKV	Zika-Virus

Konjugatbeladungs-Inhaltsverzeichnis

Die in dieser Arbeit verwendeten Konjugate mitsamt ihrer Beladung und Molmasse werden hier übersichtshalber angegeben. Diese Tabelle dient als Referenzmittel und ist der vorliegenden Arbeit auch zusätzlich als herausnehmbare Beilage zugefügt.

<u>KONJUGAT</u>	<u>KOMPONENTE 1</u>	<u>KOMPONENTE 2</u>	<u>M [g/mol]</u>
<u>K11</u>		0,11 Thiol-RhB Pip	12 500
<u>K2</u>		1,1 NLS-TAT	15 800
<u>K3</u>		1,0 TAT-NLS	15 500
Hochaffines Peptid <u>9</u> (W ₂)	WPPPPRVPR- WPPPPRVPR		2285,8
<u>K12</u>	2,3 W ₂	0,2 Thiol-RhB Pip	16 400
<u>K17</u>	4,0 W ₂		21 100
<u>K4</u>	4,5 W ₂	1,9 NLS-TAT	28 600
<u>K5</u>	4,8 W ₂	1,5 TAT-NLS	28 200
<u>K6</u>	5,2 W ₂	0,03 NLS-TAT	24 300
<u>K7</u>	5,2 W ₂	0,31 TAT-NLS	25 300
<u>K13</u>	5,9 W ₂		25 100
<u>K1</u>	6,1 W ₂	0,44 TAT-NLS	27 700
<u>K8</u>	6,3 W ₂	2,2 NLS-TAT	33 600
<u>K9</u>	7,2 W ₂	0,4 NLS-TAT	30 100
<u>K10</u>	9,9 W ₂	1,8 TAT-NLS	40 500
Affines Peptid <u>8</u> (W)	WPPPPRVPR		1100,3
<u>K14</u>	3,9 W		16 500
<u>K15</u>	4,6 W		17 200
<u>K16</u>	10 W		25 800
<u>K18</u>	2,2 W		14 900

<u>KONJUGAT</u>	<u>KOMPONENTE 1</u>	<u>KOMPONENTE 2</u>	<u>M [g/mol]</u>
<u>K19</u>	4,8 W		18 000
<u>K20</u>	6,6 W		20 100
<u>K21</u>	7,1 W		20 700
<u>K22</u>	2,0 W ₂		16 900
<u>K23</u>	3,2 W ₂		19 600
<u>K24</u>	5,9 W ₂		25 800
IVS-Negativ <u>22</u>	WSPSADVPD		972,0
<u>K25</u>	7,0 IVS-Negativ		19 000
FLAG-Tag <u>23</u>		DYKDDDDK	1012,0
<u>K26</u>		1,2 FLAG-Tag	14 100
<u>K27</u>	3,9 WSPSADVPD	2,0 FLAG-Tag	19 100
<u>K28</u>	3,5 W ₂	1,6 FLAG-Tag	22 500
<u>K29</u>	4,0 W	2,3 FLAG-Tag	20 100
Peptidomimetikum <u>27*</u>			648,9
<u>K30</u>		0,5 Thiol-RhB Pip 2,6 TAT	15 800
<u>K31</u>	2,0 <u>27</u>	0,5 Thiol-RhB Pip 2,6 TAT	17 800
<u>K32</u>	4,0 <u>27</u>	0,5 Thiol-RhB Pip 2,6 TAT	19 100
<u>K33</u>	3,6 <u>27</u>	0,5 Thiol-RhB Pip	15 100
<u>K34</u>	6,0 <u>27</u>	0,4 Thiol-RhB Pip	16 600
<u>K35</u>		0,3 Thiol-RhB Pip 1,9 TAT	13 200

* wurde von Lisa Redl (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Rademann) zur Verfügung gestellt.

Zusammenfassung

Multivalente Peptid-Polymerkonjugate bieten ein bislang weitgehend ungenutztes Potential als Inhibitoren für Protein-Protein Interaktionen. Hierbei sind insbesondere ihre proteolytische Beständigkeit und die mögliche Zellpermeabilität von Interesse. Des Weiteren können durch eine multivalente Präsentation Affinitätssteigerung gegenüber ihren Zielstrukturen im Vergleich zu ihren monovalenten Pendants erreicht werden. Somit könnten potentiell potente Inhibitoren entwickelt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Dextrankonjugate als multivalente, zellgängige Inhibitoren der Tandem-WW-Domäne des pre-mRNA Splicingproteins FBP21 und der West-Nil-Virus Protease NS2B-NS3 eingesetzt.

Hierbei sollte besonders die funktionelle Untersuchung der multivalenten Inhibitoren *in vitro* und *in vivo* im Fokus dieser Arbeit stehen. Als inhibitorische Funktionspeptide dienten zwei Prolin-reiche Sequenzen, das affine Peptid WPPPPRVPR (W) und die hochaffine Sequenz WPPPPRVPRWPPPPRVPR (W_2), die bereits als monovalente Peptide eine gute Bindungsaffinität zum FBP21 aufwiesen. Die Beladung der synthetisierten Konjugate konnten mittels eigens entwickelter Analysemethodik in einer Kombination aus NMR- und Absorptionsspektroskopie bestimmt werden. Die so ermittelten Molmassen ließen sich mittels Gelpermeationschromatographie verifizieren.

Weiterführend wurden die Bindungsaffinitäten der Konjugate zum FBP21 anhand isothermaler Titrationskalorimetrie ermittelt. Hierbei zeigten Konjugate, die das hochaffine Peptid trugen im Vergleich mit der affinen W-Sequenz eine stärkere Bindungsaffinität bei geringerer Beladungszahl. Somit wurden die hochaffinen W_2 -Konjugate für die weiteren biochemischen Untersuchungen eingesetzt, welche in Zusammenarbeit mit Miriam Bertazzon durchgeführt wurden.

Da das FBP21 im Zellkern lokalisiert ist, sollte die nukleare Aufnahme der Konjugate induziert werden, um eine Inhibition des FBP21 bewirken zu können. Hierfür wurde eine Kombination aus zellpenetrierendem Peptid und Kernlokalisationssequenz untersucht. Die endosomale Freisetzung der Konjugate in das Zytosol und anschließende Aufnahme in den Zellkern wurde durch die gewählte Kombination der zellpenetrierenden Peptide in Verbindung mit dem hochaffinen Funktionspeptid erreicht. Hierbei war jedoch die Beladung der Dextrane mit den jeweiligen Peptidspezies nicht beliebig wählbar, da bei hohen

Beladungszahlen eine Zytotoxizität der Konstrukte, hervorgerufen durch die biologische Aktivität des Inhibitors, auftrat.

Nachdem die Zellaufnahme bestätigt werden konnte, wurde die Splicingaktivität der hochaffinen Peptid-Dextrankonjugate anhand eines *in vitro* Splicing-Assays bestimmt. Die multivalente Präsentation der Funktionspeptide schien hierbei ausschlaggebend für den inhibitorischen Effekt der Konjugate zu sein. Abschließend sollte anhand eines Pull-down-Assays die Interaktion der Konjugate mit dem FBP21 bestätigt und potentielle weitere Interaktionspartner aufgefunden gemacht werden. Es konnte hierbei eine deutliche Interaktion des Funktionspeptid-tragenden Konjugats mit dem FBP21 gegenüber der Negativkontrolle gesehen werden. Weiterhin wurde auch die Interaktion einer Vielzahl an weiteren Proteinen mit den Konjugaten detektiert, welche zu einem großen Anteil aus dem Splicingzyklus oder nahverwandten Prozessen wie der Transkription stammen. Somit sind die verwendeten Peptid-Dextrankonjugate als PPI-Inhibitoren für das pre-mRNA Splicing einsetzbar.

Für die Entwicklung zellgängiger, flaviviraler Inhibitoren wurden Dextrankonjugate synthetisiert, die das potente, literaturbekannte Peptidomimetikum Phenacyl-Lys-Lys-GCMA verwendeten.^[1] Das Peptidomimetikum wies hierbei selbst nur bei erhöhten Konzentration eine Zellpermeabilität auf. Um eine Zellgängigkeit der Konjugate zu gewährleisten, wurden somit zusätzlich zellpenetrierende Peptide (TAT) an die Dextrane gekuppelt. Die Untersuchung der Aktivitäten der Inhibitoren erfolgte in Zusammenarbeit mit Lisa Redl, Dr. Christoph Arkona, Dr. Christoph Nitsche und Stephanie Kallis. Hierbei zeigte sich, dass die TAT-tragenden Konjugate generell eine bessere Aktivität gegenüber den Flaviviren West-Nil-, Dengue- und Zika-Virus *in vitro* und *in vivo* aufwiesen als Konjugate, die nur das Peptidomimetikum trugen. Dieses ist dadurch begründet, dass das TAT-Peptid selbst als Substrat für die NS2B-NS3 Protease wirken kann und somit diese inhibiert. Die Verwendung der Peptidomimetika in Kombination mit dem TAT zeigte hierbei einen multivalenten Effekt der Inhibition.

Abstract

Multivalent peptide-polymer conjugates offer a largely untapped potential as inhibitors of protein-protein interactions. Especially their stability towards proteolysis and a potential of increased cell permeability are of interest. Furthermore, they exhibit strongly increased binding affinities towards their target structures in comparison to their monovalent entities. Thus, more potent inhibitors could be obtained.

In the following work, dextran conjugates have been used as multivalent, cell-penetrating inhibitors for the tandem-WW-domains of the pre-mRNA splicing protein FBP21 and the West Nile virus protease NS2B-NS3.

In this context, the dextran conjugates were investigated in depth on their functional properties in *in vitro* and *in vivo* experiments. Two proline-rich sequences, the peptide WPPPPRVPR (W) and the high-affinity sequence WPPPPRVPRWPPPPRVPR (W₂), were used as inhibitory peptides due to their good binding activities towards FBP21 as monovalent peptides. The loading of the synthesized conjugates could be determined using a specially developed analysis methodology, which combined the use of NMR and absorption spectroscopy. Calculated molecular masses could be confirmed using gel permeation chromatography.

Afterwards, the binding affinities of the conjugates were determined with isothermal titration calorimetry. Conjugates bearing the high-affinity W₂-peptide showed a higher binding affinity at a lower peptide loading on the dextran than the W-sequence. Consequently, the W₂-conjugates were used for the following biochemical investigations which were done in cooperation with Miriam Bertazzon.

Since FBP21 is localized in the cell nucleus, the nuclear uptake of the conjugates needed to be induced to enable the inhibition of FBP21. Therefore, a combination of a cell-penetrating peptide and a nuclear localization sequence were investigated. The endosomal release of the conjugates into the cytosol and following uptake into the cell nucleus was successful for a combination of the cell-penetrating peptide system and the functional W₂-peptide. Due to high cytotoxicity at high peptide loading, the number of peptides coupled to the dextrans was not freely selectable and has to be taken into consideration. This cytotoxicity was most likely due to the biological activity of the inhibitors and therefore indicated a good potency for the system.

After confirmation of the cellular uptake, the splicing activity of the W₂-conjugates were investigated using an *in vitro* splicing assay. The multivalent presentation of the functional peptides seemed to be crucial for the inhibitory effect of the conjugates. Finally, the interaction of the conjugates with FBP21 and the possible interaction with other proteins was investigated with a pulldown assay. The interaction of the W₂-bearing conjugate with FBP21 could be seen clearly in comparison with the negative control. Furthermore, a multitude of other peptides from the cell lysate bound to the conjugate. Most of the bound proteins were splicing proteins or interaction partners from closely related processes (e.g. transcription). Therefore, the synthesized conjugates can be used as PPI-inhibitors of pre-mRNA splicing.

Additionally, dextran conjugates were synthesized as cell-permeable, flavivirale inhibitors. In this case the potent peptidomimetic Phenacyl-Lys-Lys-GCMA was used as the inhibitory component. The peptidomimetic itself only showed cellular uptake at high concentrations. Therefore, to insure cellular uptake of the conjugates, the cell-penetrating peptide TAT was additionally coupled onto the dextran backbone. Activity investigations of the synthesized inhibitors were done in cooperation with Lisa Redl, Dr. Christoph Arkona, Dr. Chrisoph Nitsche and Stephanie Kallis. The TAT-bearing conjugates generally showed a higher activity *in vitro* and *in vivo* towards the flaviviruses West-Nile, Dengue and Zika compared to purely peptidomimetic conjugates. This enhanced activity is due to the fact that TAT itself can act as a substrate for the NS2B-NS3 protease and therefore inhibit the virus. A combination of both peptidomimetic and TAT leads to an increase cooperative effect of the inhibition.

1. Allgemeiner Teil

1.1. Einleitung

Protein-Protein Interaktionen (PPI) spielen in der Regulation von biologischen Prozessen eine herausragende Rolle, beispielsweise bei der Signaltransduktion oder von intrazellulären Transportprozessen. Somit ist es nicht verwunderlich, dass PPIs auch bei der Entstehung von Krankheiten beteiligt sind.^[2] Die Entwicklung von potenten Inhibitoren für PPIs ist demnach von großem Interesse, um die biologischen Prozesse verstehen und Wirkstoffe für Krankheiten entwickeln zu können. Durch ihre großen und flachen Bindungsflächen stellen PPIs jedoch eine große Herausforderung bei der Suche möglicher Inhibitoren dar. Niedermolekulare Verbindungen, sogenannte *small molecules*, welche den Hauptanteil der weltweit zugelassenen Wirkstoffe einnehmen, können durch geringe Affinitäten nur bedingt eingesetzt werden.^[3] Die Verwendung von Peptiden, die als Mimetika der PPIs wirken können, scheinen hingegen eine gute Wahl zu sein.^[4] Durch ihre Anpassungsfähigkeit und Vielseitigkeit können sie potentiell die notwendigen Affinitäten zu den Zielstrukturen erreichen. Allerdings besitzen Peptide eine schlechte orale Bioverfügbarkeit, zumeist geringe Zellgängigkeit und unterliegen einem raschen proteolytischen Abbau im Organismus.^[5-6] Die Untersuchung der Wirkungsweise der Inhibitoren *in vivo* und die Validierung der intrazellulären Zielstrukturen stellt sich somit als schwierig heraus.

Als möglicher Lösungsansatz werden zunehmend Polymerkonjugate eingesetzt, um die erwähnten Defizite der Peptide zu überkommen.

So konnten Ruttekolk *et al.* bei der Verwendung von Poly(*N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid) (pHPMA) als Grundgerüst für Peptid-Polymerkonjugate eine Verringerung der Proteolysegeschwindigkeit gegenüber ungebundenen Peptiden feststellen. Jedoch konnte die zelluläre Aufnahme der Konjugate nur mittels Elektroporation erreicht werden.^[7]

Des Weiteren konnten Richter *et al.* eine Aktivitätssteigerung durch die multivalente Präsentation von Bid-BH3 Peptiden auf einem Dextrangrundgerüst erzielen und somit die apoptotische Wirkung der Peptide auf Jurkat-Zellen stark erhöhen.^[8]

Generell ist die Anpassung der einzelnen Polymerkonjugate an ihre gewünschte Funktion ein notwendiger und zeitaufwendiger Schritt. Somit wäre die Entwicklung eines leicht zugänglichen Konjugatsystems, welches die Defizite der peptidischen PPI-Inhibition überkommen könnte, von besonderer Bedeutung.

1.2. Multivalenz

Im Allgemeinen bezeichnet die Multivalenz ein System bestehend aus mehreren Interaktionspartnern, die über mehrere, nichtkovalente Bindungen miteinander wechselwirken. Hierbei spricht man von multivalenten Rezeptoren, die mehrere äquivalente Bindungsstellen besitzen, an die multivalente Liganden binden können. Man grenzt hierbei zwei Fälle voneinander ab; homomultivalente Systeme, die identische Bindungsstellen aufweisen und heteromultivalente Systeme, deren Bindungsstellen sich unterscheiden (**Abbildung 1**).^[9]

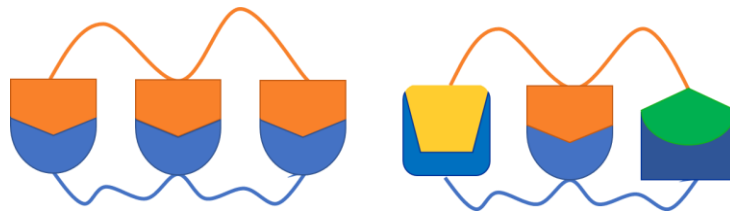


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines homomultivalenten Systems (links) und eines heteromultivalenten Systems (rechts).

In der Natur beruhen viele intermolekulare Wechselwirkungen zwischen zwei Bindungspartnern auf dem Prinzip der Multivalenz. Dieses kann im Mikromaßstab beobachtet werden, beispielsweise bei der Interaktion von zwei Proteinen in biologischen Systemen^[10-11] oder der Interaktion von Bakterien mit der Zellmembran.^[12-13] Aber auch im Makromaßstab kann man die Auswirkungen der Multivalenz zum Beispiel anhand eines Geckos sehen, der entgegen der Schwerkraft an Wänden hochläuft. Hierfür sind van der Waals und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den lamellenartigen Füßen des Geckos und der Wandoberfläche verantwortlich. Die lamellenartigen Füße sind hierbei mit einer Vielzahl feinsten Härchen besetzt, die die eigentliche Interaktionsfläche darstellen.^[14-15]

Der Multivalenzbegriff, auch Chelatkooperativität genannt, befasst sich mit der Anzahl an der Interaktion beteiligten Bindungsstellen. Durch die multivalente Interaktion von Bindungspartnern kann eine Änderung der Affinität des Systems auftreten. Man spricht von (positiver oder negativer) kooperativer Multivalenz oder einem multivalenten Effekt. Gibt es jedoch keine Affinitätsänderung durch den multivalenten Charakter eines Systems, spricht man von nicht-kooperativer Multivalenz.^[16]

Streng genommen liegt nur ein multivalentes System vor, wenn bei der Interaktion zwischen zwei multivalenten Bindungspartnern zuerst eine intermolekulare und anschließend mindestens eine intramolekulare Wechselwirkung stattfindet (**Abbildung 2**).^[16] Die multivalenten Bindungspartner müssen zuerst eine räumliche Nähe aufbauen, damit sie miteinander intermolekular interagieren können. Sobald der erste Ligand an den Rezeptor bindet, erhöht sich die effektive lokale Konzentration von Liganden in Rezeptornähe. Hierdurch wird die nun intramolekulare Bindung innerhalb des Rezeptor-Ligand-Komplexes von weiteren Liganden wahrscheinlicher und gegebenenfalls kann eine vollständige Bindung beider Interaktionspartner stattfinden.^[17]

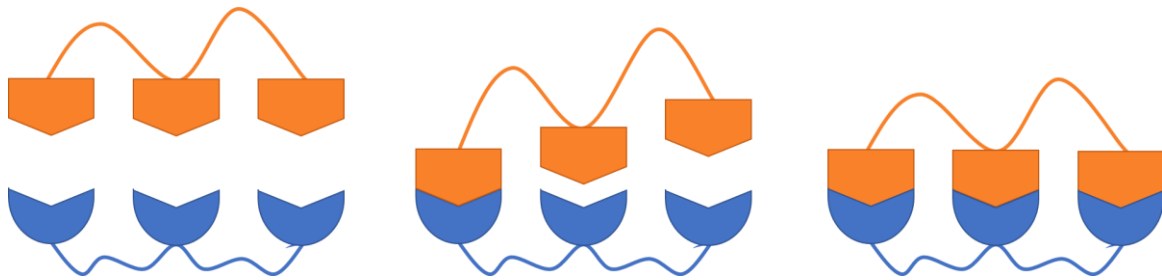


Abbildung 2: Schematische Darstellung des multivalenten Bindungsvorgangs. Links: Ein multivalenter Ligand und ein multivalenter Rezeptor liegen vor. Mitte: Ein Ligand hat an den Rezeptor gebunden, nun liegt eine erhöhte effektive lokale Konzentration des Liganden vor, die Bindung für weitere Liganden wird dadurch wahrscheinlicher. Rechts: Der multivalente Ligand liegt vollständig an den Rezeptor gebunden vor.

Um die Bindung der weiteren Liganden zu ermöglichen, muss allerdings eine geeignete Geometrie der Bindungsstellen untereinander gegeben sein. Hierbei ist insbesondere die Konformation und Flexibilität des Spacers von Interesse.^[18-19] Der Spacer verbindet die Bindungsstellen miteinander und kann somit einen großen Einfluss auf das Bindungsverhalten ausüben (**Abbildung 3**).^[20] Durch die genaue Anpassung der Längenverhältnisse zwischen den einzelnen Bindungsstellen können, insbesondere bei starren multivalenten Systemen, passgenaue Rezeptor-Ligand Komplexe erhalten werden. Damit einhergehend werden starke Erhöhungen der Bindungsaffinitäten beobachtet.^[21] Die Verwendung starrer Spacer ist jedoch nicht immer ratsam, da dadurch auch eine Interaktion mit den Bindungsstellen des Rezeptors durch falsche räumliche Anordnung verhindert werden kann.^[22] Weiterhin kann es vorteilhaft sein die Liganden synthetisch an *Backbone* Strukturen (beispielsweise Dendrimere,^[23-24] Kohlenhydrate^[25] und andere Polymere^[26-27]) zu immobilisieren (siehe auch Kapitel 1.3). Hierbei muss jedoch auf die Geometrie des Rezeptors geachtet werden, da sonst im Zweifelsfall ein effektives Binden verhindert werden kann.

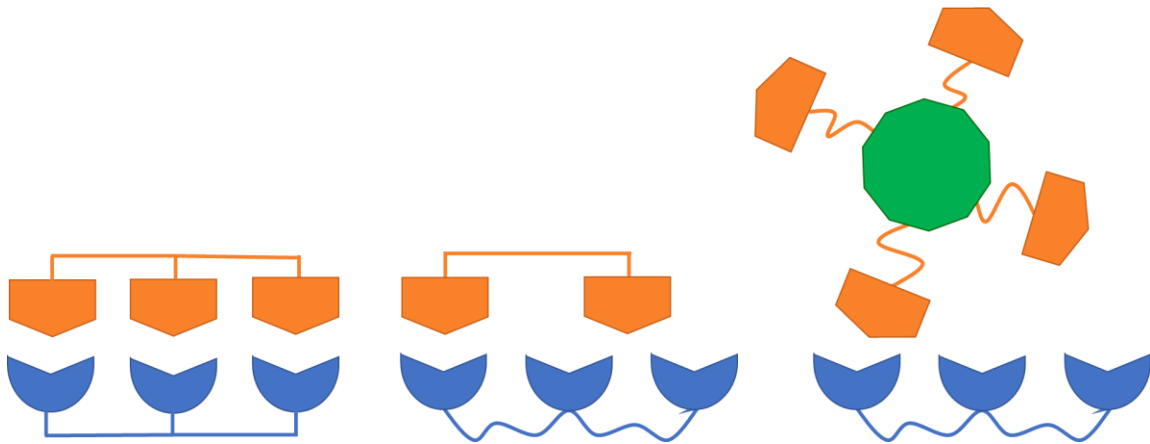


Abbildung 3: Schematische Darstellung verschiedener Bindungsverhältnisse multivalenter Systeme. Passgenaues Rezeptor-Ligand Systemen mit starren Spacern (links), bei flexiblen Rezeptoren mit starrem Liganden (Mitte) und globulären Ligandenstrukturen (rechts) wird mitunter durch die räumliche Anordnung das Binden aller Liganden an den Rezeptor verhindert.

Die Wirksamkeit multivalenter Liganden als Inhibitoren für biologische Prozesse, wie Wirt-Erreger Interaktionen oder Protein-Protein Interaktionen, kann anhand folgender Beispiele verdeutlicht werden. Haag und Mitarbeiter untersuchten beispielsweise die Interaktion von Influenza-A-Viren via Hämagglutinin mit Sialinsäure-tragenden Glykoproteinen der Zellmembran und konnten so verschiedene multivalente Inhibitoren entwickeln. Hierbei zeigte beispielsweise die Verwendung von multivalenten Peptid-Nanopartikeln eine Affinitätssteigerung um einen Faktor von etwa 130 gegenüber dem monovalenten Peptid.^[13] Durch Anpassung der Inhibitorarchitektur konnten weiterhin lineare Sialinsäure-tragende Polyglycerine als effektive Inhibitoren *in vivo* entwickelt werden, welche im Vergleich mit dendritischen Pendants eine starke Affinitätssteigerung aufwiesen.^[28]

Weiterhin konnten Barnard *et al.* durch Verwendung von multivalenten Helix-Mimetika bestehend aus aromatischen Oligoamiden die Interaktion des Transkriptionsfaktors p53 mit der Ubiquitin Ligase *hDM2* inhibieren. Dieses ist ein wichtiger Regulator für die Genomstabilität und weist in Krebszellen häufig eine Fehlregulation auf. Der multivalente Inhibitor konnte hierbei eine Affinitätssteigerung im Vergleich zum monovalenten Inhibitor aufweisen.^[3]

1.2.1. Bindungsaffinitäten in multivalenten Systemen

Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, ist Multivalenz durch die Anzahl der Bindungen eines Systems gekennzeichnet und nicht direkt durch die Stärke dieser Bindungen bzw. der Affinität der Bindungspartner zueinander. Dennoch ist es sinnvoll, den Begriff der Bindungsaffinität in Bezug auf multivalente Systeme genauer zu untersuchen, da oft in diesen Systemen ein kooperativer Effekt und somit eine kooperative Multivalenz auftritt. Generell ist die Bindungsaffinität ein Maß für die Stärke einer Bindung zwischen zwei Interaktionspartnern (bspw. Protein-Protein, Enzym-Substrat, Protein-Ligand) und ist für ein System aus zwei Bindungspartnern (A und B) nach Gleichung (1) definiert.^[29]



Hierbei sind $[A]$, $[B]$ und $[AB]$ die Konzentrationen der Bindungspartner A und B, sowie die des entstehenden Komplexes AB. Wenn die Affinität der Interaktionspartner zueinander steigt, nimmt somit auch die Affinitätskonstante K_A zu. Es hat sich jedoch eingebürgert als Maß für die Bindungsaffinität die Dissoziationskonstante K_D zu verwenden, welches der reziproke Wert der Affinitätskonstante ist (Gleichung (2)).^[29]

$$K_D = \frac{1}{K_A} \quad (2)$$

Für ein multivalentes System ist die Beschreibung der Bindungsaffinitäten etwas komplizierter, da die Bindungspartner unterschiedlich viele Bindungsstellen aufweisen können, die aber nicht unbedingt alle zur Interaktion beitragen müssen.

Krishnamurthy *et al.* unterscheiden zwischen der Bindungsaffinität eines monovalenten Systems ($K_D^{Affinität}$), welches durch die Dissoziationskonstante beschrieben wird und der Bindungsavidität.^[30] Die Avidität ($K_D^{Avidität}$) wird hierbei als die Affinität eines multivalenten Ligand-Rezeptor Komplexes bestehend aus N Interaktionsstellen, die komplett miteinander interagieren, definiert (Gleichung (3)).

$$K_D^{Avidität} = K_{D,N} \quad (3)$$

Laut Kitov *et al.* sollte jedoch bei der Beschreibung der Bindungsavidität eines multivalenten Systems mit in Betracht gezogen werden, dass nicht alle Bindungsstellen in multivalenten Systemen gleichzeitig an der Bindung der Interaktionspartner beteiligt sein müssen.^[31] Stattdessen sei eine Vielzahl verschiedener Interaktionen denkbar und

gegebenenfalls sogar wahrscheinlicher, bei denen keine komplette Besetzung der Bindungsplätze vorliegt. Somit sollte die Bindungsavidität die verschiedenen Bindungsmodi mit einbeziehen und daher als Summe dieser Modi angesehen werden (Gleichung (4)).

$$K_D^{Avidität} \equiv \sum_{N=1}^{N_{max}} K_N = \left(\frac{1}{K_{D,N}} + \frac{1}{K_{D,N-1}} + \dots + \frac{1}{K_{D,1}} \right) \quad (4)$$

Um das Maß des multivalenten Effekts der Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand quantifizieren zu können, führten Mammen *et al.* den sogenannten Verstärkungsfaktor β ein, der das Verhältnis aus Affinität zu Avidität beschreibt (Gleichung (5)).^[32]

$$\beta = \frac{K_D^{Affinität}}{K_D^{Avidität}} \quad (5)$$

Wird ein Wert erhalten, der größer 1 ist, liegt eine Verstärkung der Bindungsaffinität des multivalenten gegenüber des monovalenten Systems vor und somit kooperative Multivalenz. Bei Werten kleiner 1 liegt hingegen eine nicht-kooperative Multivalenz vor.

1.2.2. Thermodynamik von multivalenten Systemen

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Beschreibung von multivalenten Systemen ist die Betrachtung der thermodynamischen Zustandsgrößen. Hierbei sind insbesondere die Gibbs Energie (ΔG), die Enthalpie (ΔH) und die Entropie (ΔS) von besonderer Bedeutung, welche in folgendem Zusammenhang zueinander stehen (Gleichung (6)):^[33]

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (6)$$

Die Entropie wiederum setzt sich aus den Beiträgen der Rotations-, Solvatations- und Translationsentropie zusammen (Gleichung (7)).^[33-34]

$$\Delta S_{mono} = \Delta S_{trans} + \Delta S_{rot} + \Delta S_{sol} \quad (7)$$

Für ein multivalentes System verkomplizieren sich diese beiden Gleichungen stark, da die verschiedenen Bindungszustände mit einbezogen werden müssen. Weiterhin muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass ein Entropieverlust des Systems vorliegen kann, der durch die beschränkte Beweglichkeit des Spacers im Ligand-Rezeptor Komplex hervorgerufen werden kann. Außerdem kann der Spacer energetisch (un-)günstig mit der Rezeptoroberfläche interagieren. Somit ergibt sich für ein multivalentes System durch Einbeziehen dieser Faktoren aus Gleichung (8) Folgendes:^[30]

$$\begin{aligned} \Delta G_N^0(i) = & i\Delta H_{Affinität}^0 - iT\Delta S_{Affinität}^0 + (i-1)T\Delta S_{Trans+Rota}^0 + (i-1)\Delta H_{Spacer}^0 \\ & - (i-1)T\Delta S_{Konf}^0 + (i-1)\Delta G_{Koop}^0 - RT \ln \left(\frac{\Omega_i}{\Omega_0} \right) \end{aligned} \quad (8)$$

Hierbei bezeichnet i immer die Anzahl der gebundenen Liganden im Ligand-Rezeptor System, welche in den Termen für die Enthalpie und Entropie ($\Delta H^0_{Affinität}$ und $\Delta S^0_{Affinität}$) berücksichtigt werden. Bei unabhängig voneinander arbeitenden Liganden berechnet sich die freie Enthalpie ΔG^0 nur aus diesen beiden Termen. Wohingegen bei kooperativer Multivalenz auch die nachfolgenden Terme von großer Bedeutung sind.^[30]

Der Term $(i-1)T\Delta S^0_{Trans+Rota}$ beschreibt die translatorischen und rotatorischen Beiträge der Entropie des multivalenten Systems. Diese sollten durch Verknüpfen der einzelnen Liganden miteinander in etwa den gleichen Betrag aufweisen, wie ein einzelner Ligand und somit den größten Vorteil der Multivalenz ausmachen. Aufgrund der Enthalpie-Entropie-Kompensation wird dieser Vorteil in realen Systemen allerdings geschmälert. Da multivalente Bindungen zumeist eine stärkere Bindung der Liganden an den Rezeptor (und somit eine stark erhöhte Enthalpie) bedingen, wird dadurch auch die Flexibilität des Systems stark verringert. Durch die starrereren Bindungsverhältnisse und somit höhere Ordnung des Systems wird die Entropie des multivalenten Systems verringert. Somit wird der Multivalenzeffekt gemindert.^[30, 35-36]

Um auch Interaktionen zwischen dem Spacer, der die einzelnen Liganden miteinander verbindet, und der Rezeptoroberfläche einzuschließen, muss der Term $(i-1)\Delta H^0_{Spacer}$ berücksichtigt werden. Hiermit werden nicht nur vorteilhafte, sondern auch unvorteilhafte enthalpische Interaktionen einbezogen. Der Term $-(i-1)T\Delta S^0_{Konf}$ beschreibt den Entropieverlust aufgrund von Konformationsänderungen des Spacers. Der Einfluss dieses Entropieverlusts auf die freie Enthalpie wird hierbei jedoch kontrovers betrachtet. Krishnamurthy *et al.* berichteten, dass bei flexiblen Spacern dieser Entropieverlust beim Binden an den Rezeptor aufgrund ihrer inhärenten Flexibilität viel größer sei als bei starren Spacern. Somit solle, um ein gut bindendes, multivalentes System zu erreichen, auf sehr flexible Spacer verzichtet werden.^[30] Laut Kane *et al.* habe dieser Entropieverlust jedoch nur eine geringe Auswirkung auf ΔG , sodass auch flexible Spacer zweifelsfrei verwendet werden könnten.^[20] Dies ist besonders von Interesse, da sich flexible Spacer mitunter besser an die Bindungsverhältnisse im Rezeptor anpassen können.

Der Term ΔG^0_{Koop} beschreibt den Kooperativitätseffekt zwischen Bindungsstellen. Letzterer hat bei vielen multivalenten Systemen einen kleinen Wert (um Null) und zeigt somit,

dass die Bindungsstellen nahezu unabhängig interagieren. Abschließend beschreibt der Term $RT \ln \left(\frac{\Omega_i}{\Omega_0} \right)$ die sogenannte Aviditätsentropie, welche die Variation der Besetzung der einzelnen Bindungsstellen beinhaltet (**Abbildung 4**).^[30]

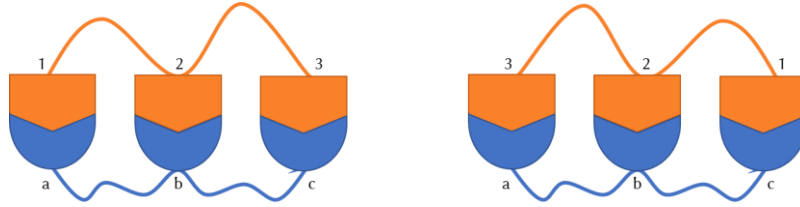


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aviditätsentropie. Der Ligand 1 kann sowohl an den rechten (a) als auch den linken (c) äußeren Rezeptor binden und somit eine Variation der Besetzungszustände ergeben.

Abschließend lässt sich sagen, dass die freie Enthalpie eines multivalenten Systems stark von den verschiedenen Enthalpie- und Entropiebeiträgen beeinflusst wird. So kann es durchaus vorkommen, dass durch das multivalente Binden eines Ligand-Rezeptor-Systems große Enthalpiemengen frei werden, welche aber durch die starke Verringerung der Flexibilität des Systems und somit der Entropie wieder kompensiert werden. Auf diese Weise kann es vorkommen, dass die freie Enthalpie des gesamten Systems nur geringe Änderungen zu der des monovalenten Systems aufweist, obwohl die inneren Gegebenheiten des Systems sich vollkommen unterscheiden.^[37-38]

1.2.3. Isothermale Titrationskalorimetrie als Messmethode in multivalenten Systemen

Die in Kapitel 1.2.1 und 1.2.2 besprochenen thermodynamischen Zustandsgrößen und Bindungsaffinitäten können auf verschiedenste Weise gemessen werden. Hierzu gehören beispielsweise für die Bindungsaffinitätsbestimmung die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR),^[39-40] Bio-Layer-Interferometrie (BLI),^[41] NMR-Titrationsmessungen^[42] sowie chemische und optische Assays^[43] (unter anderem Fluoreszenzpolarisations-Assay^[34, 44], Radioliganden-Bindungsassay^[45] und Lumineszenz Ligand-Rezeptor Bindungsassay^[46]). Für die gleichzeitige Bestimmung von K_D -Werten und thermodynamischen Parametern ist es jedoch ratsam die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) zu verwenden, da diese Methode gegenüber anderen viele Vorteile aufweist. So kann man beispielsweise die zu untersuchenden Rezeptor-Liganden-Systeme in ihrer natürlichen

Umgebung (Puffer, ungelabelt, nicht immobilisiert) untersuchen. Weiterhin kann in einem sehr großen Temperaturbereich gearbeitet werden. Die verwendeten Liganden/ Rezeptoren können in ihrer Größe stark variieren, sodass sowohl kleine Moleküle als auch Proteine im MDa-Bereich vermessen werden können. Des Weiteren können Systeme mit unterschiedlichster Bindungsaffinität (vom nM- bis in den mM-Bereich) vermessen werden. Dieses macht ITC für eine Vielzahl von Systemen anwendbar.^[34, 47]

Die Messmethode der ITC beruht darauf, dass bei Interaktionen von Rezeptor-Ligand Paaren Reaktionswärme verbraucht wird (endotherme Reaktionen) oder frei wird (exotherme Reaktionen). Die Messzelle befindet sich zusammen mit einer Referenzzelle in einem adiabatischen Mantel, welcher dafür sorgt, dass die beiden Zellen durch Heizung bei konstanter Leistung auf einer konstanten Temperatur gehalten werden (**Abbildung 5**).

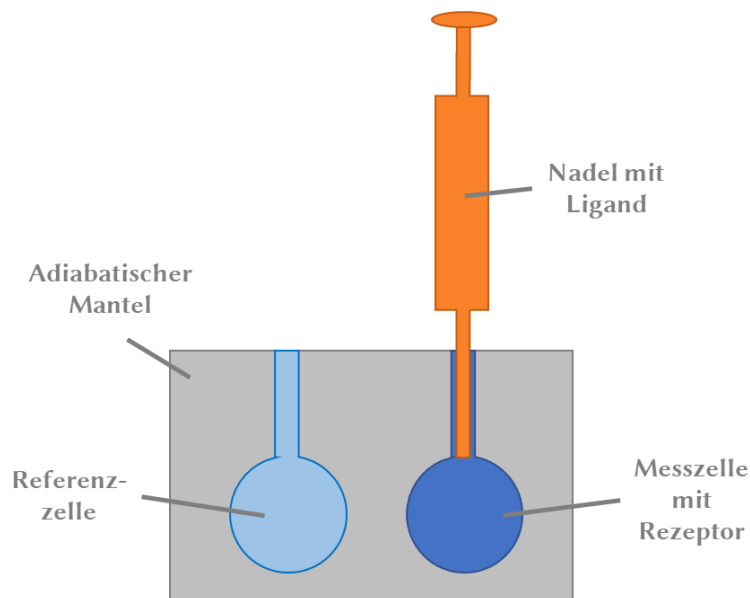


Abbildung 5: Schematischer Aufbau der isothermalen Titrationskalorimetrie. Die Referenzzelle (hellblau) und die Messzelle (dunkelblau) sind von einem adiabatischen Mantel (grau) umgeben. Durch die Nadel (orange) wird Ligand in die mit Rezeptormolekülen gefüllte Messzelle titriert. Die Änderung der Temperatur der Messzelle durch Rezeptor-Liganden Interaktion wird im Vergleich zur Referenzzelle detektiert und angeglichen.

Wird nun über eine Nadel ein Ligand in die Messzelle injiziert, in der bereits der Rezeptor (bspw. Proteine, Enzyme, Makromoleküle) vorgelegt ist, kommt es zu einer Interaktion der beiden Spezies. Diese Interaktion führt daraufhin meist zu einer exothermen Reaktion, sodass Reaktionswärme an die Umgebung abgegeben wird. Durch den Rückkopplungsmechanismus zwischen den beiden Zellen erkennt das System die erhöhte Temperatur in der Messzelle und passt die Leistung für die Beheizung der Zelle an. Hierdurch wird in kürzester Zeit dafür gesorgt, dass die Temperatur der Messzelle mit der der Referenzzelle

wieder übereinstimmt. Die Änderung der Leistung (DP) wird als Messsignal aufgenommen (**Abbildung 6**).^[48]

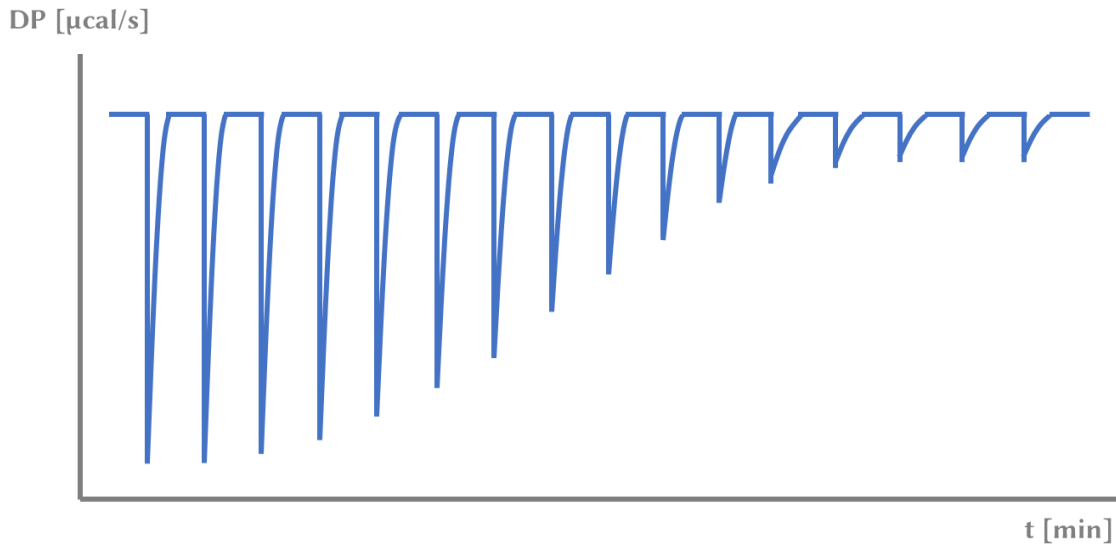


Abbildung 6: Schematische Darstellung des ITC-Messsignals. Die Leistungsänderung DP ist im zeitlichen Verlauf aufgetragen. Bei jeder Injektion des Liganden entsteht ein Peak, der auf die freigesetzte bzw. verbrauchte Wärmemenge der Interaktionspartner zurückzuführen ist. Das Messgerät detektiert die veränderte Temperatur der Messzelle gegenüber der Referenzzelle und passt die Leistung des Geräts so an, dass die Zellen wieder auf die gleiche Temperatur geheizt bzw. gekühlt werden.

Durch Integration der einzelnen Peaks des Messsignals und anschließendes Auftragen gegen das molare Verhältnis von Liganden zu Protein, kann die Bindungsisotherme erhalten werden (**Abbildung 7**). Aus der Steigung der Bindungsisothermen kann daraufhin die Affinität K_A erhalten werden, welche mit Hilfe von Gleichung (2) die Dissoziationskonstante K_D ergibt. Die Stöchiometrie der Reaktion ist das molare Verhältnis am Wendepunkt der Bindungsisothermen und kann somit direkt aus dem Diagramm abgelesen werden. Sie gibt an, in welchem Bindungsverhältnis die Liganden und Rezeptoren im gebildeten Komplex zueinander stehen. Bei einer Stöchiometrie von 1 interagiert somit ein Ligand- mit einem Rezeptormolekül. Weiterhin kann die Bindungsenthalpie ΔH des Systems anhand des Diagramms berechnet werden. Sie ist die Differenz der Enthalpie des End- und Anfangszustands.^[49] Mithilfe der Affinität K_A und der Bindungsenthalpie ΔH kann weiterhin die Freie Enthalpie des Systems ΔG und die Bindungsentropie ΔS bestimmt werden (Gleichung (9)).^[34]

$$\Delta G = -RT \ln K_A = \Delta H - T\Delta S \quad (9)$$

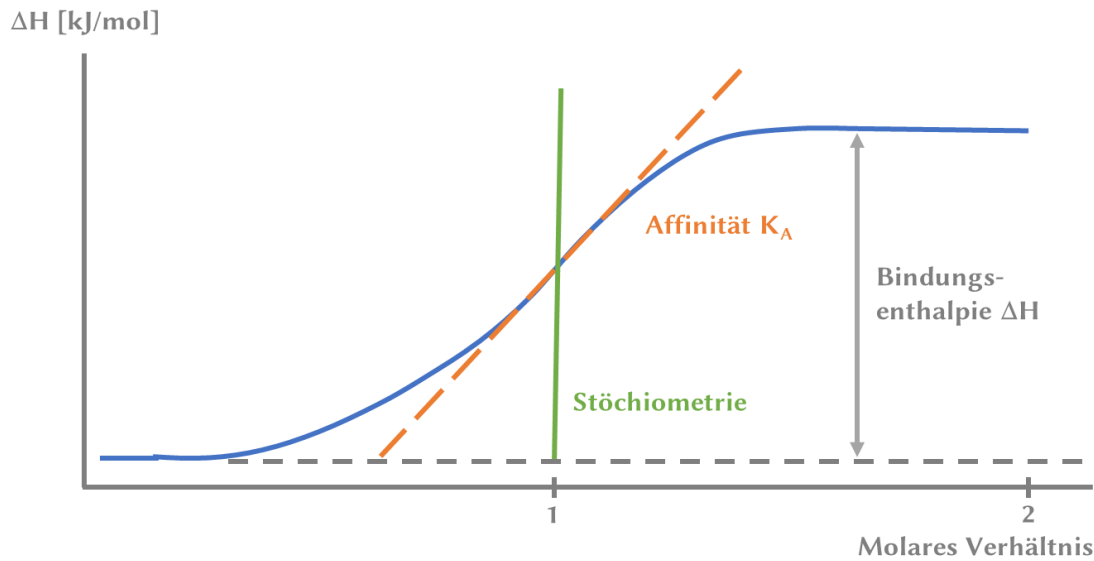


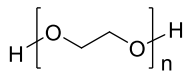
Abbildung 7: Schematische Darstellung der ITC-Bindungsisotherme. Durch Integration der Peakflächen des Messsignals kann die ITC-Bindungsisotherme (blau) erhalten werden. Mit ihrer Hilfe kann man die Affinität der Liganden zum Rezeptor (orange), die Stöchiometrie der Reaktion (grün) und die Bindungsenthalpie (grau) bestimmen.

Somit erhält man durch ein einzelnes Experiment eine Vielzahl an Parametern, die den Zustand des Systems beschreiben und kann dadurch den (multivalenten) Bindungsmechanismus der Interaktion besser verstehen.

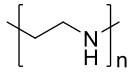
1.3. Verwendung von Polymerkonjugaten

Multivalente Liganden können in verschiedenen strukturellen Konformationen vorliegen (Kapitel 1.2, **Abbildung 3**). Hierbei kommen unter anderem lineare, dendritische als auch kammartige Strukturen vor. Um solche Strukturen zu erreichen, können sogenannte Polymerkonjugate eingesetzt werden, welche die Liganden auf einem Polymergrundgerüst immobilisieren. Als Trägermaterialien können verschiedenste Substanzen verwendet werden. Hierbei sind besonders synthetische Polymere wie Polyethylenglycol (PEG)^[50-51], Polyethylenimin (PEI)^[52] und pHPMA^[53] beliebt, aber auch biokompatible Materialien wie Dextrane^[54-55], Chitosane^[56] und Hyaluronsäurederivate^[57-58] finden häufig Anwendung. Zudem gibt es ein weites Feld an Dendrimerderivaten^[59-60], die aus den verschiedensten Grundbausteinen, wie beispielsweise Polyglycerin (PG)^[61] hergestellt werden können (**Abbildung 8**).

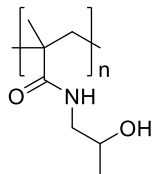
synthetische Polymere



PEG

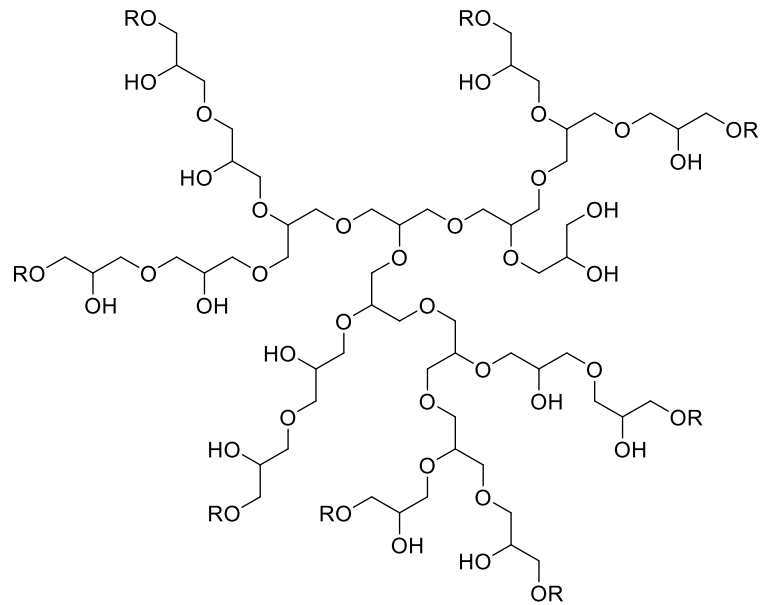


PEI



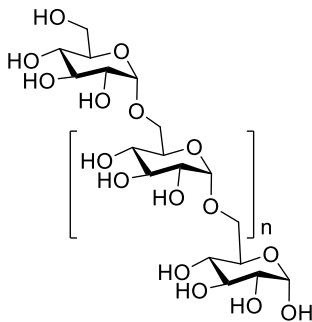
pHPMA

Dendrimere

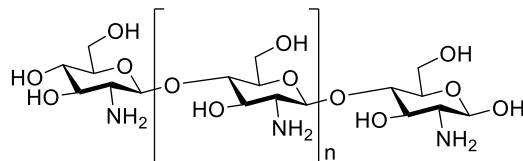


hPG

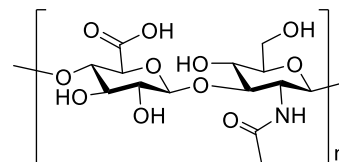
Biopolymere



Dextran



Chitosan



Hyaluronsäure

Abbildung 8: Verschiedene Trägermaterialien für Konjugate. Diese lassen sich in unterschiedliche Gruppen (bspw. synthetische Polymere, Dendrimere und Biopolymere) aufteilen.

Die verschiedenen Trägermaterialien weisen beispielsweise unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich Funktionalisierbarkeit, Flexibilität, Löslichkeit oder auch Biokompatibilität auf. Daher ist bei der Wahl des Trägermaterials immer auch die Funktion des gewünschten Endprodukts zu berücksichtigen.

Durch ihren modularen Aufbau lassen sich Polymerkonjugate zudem gleichzeitig mit verschiedenen Cargos koppeln. Hierbei ist insbesondere die simultane Verwendung von

Funktionspeptiden und Transportpeptiden, sogenannten zellpenetrierenden Peptiden (siehe auch Kapitel 1.5.1), von Interesse. Die zellpenetrierenden Peptid-Polymerkonjugate können beispielsweise für die Aufnahme von sonst nicht zellgängigen Polymeren,^[62] Peptiden^[8] und Prodrugs^[63] sorgen. Koschek *et al.* konnten außerdem zeigen, dass bei der Verwendung von zellpenetrierenden Peptid-Polymerkonjugaten sowohl die Gesamtoberflächenladung, als auch die Verteilung der Ladung von Bedeutung für die zelluläre Aufnahme der Konjugate ist.^[64]

Weiterhin können Polymerkonjugate durch die mögliche multivalente Präsentation mit intrazellulären Zielproteinen spezifisch interagieren und so eine Steigerung der gewünschten Effekte hervorrufen. So konnten Ruttekolk *et al.* zeigen, dass an pHPMA-gebundene BH3-Peptide eine höhere proteolytische Beständigkeit aufweisen, als ihre ungebundenen Pendanten. Somit ist eine längere Aufenthalts- und Wirkzeit der Peptid-Polymerkonjugate intrazellulär erreichbar.^[7] Darüber hinaus konnten Richter *et al.* anhand von Dextranderivaten zeigen, dass die multivalentere Präsentation von Bid-BH3 Peptiden im Gegensatz zu monomer verwendetem Peptid eine gewünschte starke Steigerung der Apoptose in Jurkat-Zellen erreichen konnten.^[8]

Darüber hinaus konnten Koschek *et al.* zeigen, dass die Wahl des Trägermaterials für die Synthese von Peptid-Polymerkonjugaten von besonderer Bedeutung ist. Die Untersuchung von drei verschiedenen, biokompatiblen Trägermaterialien (pHPMA, hPG und Dextran), die als Liganden für die Tandem-WW-Domänen des Proteins FBP21 (siehe auch Kapitel 1.4) fungieren sollten, zeigte in ITC-Experimenten entscheidende Unterschiede in der Bindung zur Zielstruktur. So zeigte sich, dass auf Grund der starken Flexibilität des Grundgerüsts das pHPMA nicht als Trägermaterial geeignet war. Beim dendritischen hPG konnten, bedingt durch seine globuläre Struktur, nicht alle auf dem Grundgerüst befindlichen Liganden an der Bindung zum FBP21 teilnehmen. Stattdessen neigten hPG- und pHPMA-Konjugate aufgrund ihrer jeweiligen Struktur zur Aggregatbildung, während das Dextran bivalente, lösliche Komplexe mit dem FBP21 bildete. Somit wurde das Dextran mit seinem relativ rigiden Grundgerüst als am besten geeignete Trägermaterial identifiziert.^[26]

Aufbauend auf den Vorarbeiten von Richter und Koschek wurden Dextrane aufgrund ihrer guten Biokompatibilität, ihres linearen Aufbaus und guten Bindungseigenschaften als geeignetes Trägermaterial für die in dieser Arbeit verwendeten Peptid-Polymerkonjugate ausgewählt.

1.3.1. Kupplungsstrategien für Polymerkonjugate

Es gibt synthetisch gesehen viele verschiedene Wege, auf denen die in Kapitel 1.3 beschriebenen Konjugate hergestellt werden können.^[65] Generell gibt es drei verschiedene Strategiewege, die zur Kupplung von Polymeren mit Proteinen oder Peptiden führen können: die *grafting from*, *grafting to* und *grafting through* Strategien (**Abbildung 9**).^[66]

Bei der häufig verwendeten *grafting to* Strategie wird das entsprechende Peptid (bzw. Polymer, Prodrug) an das bereits fertig synthetisierte Polymer gekuppelt. Hierbei kommen oft heterofunktionalisierte Spacer zum Einsatz, mit denen das Polymer zuvor funktionalisiert wurde, um eine Reaktivitätssteigerung bei der Reaktion mit den Liganden zu erreichen. Bei der *grafting from* Strategie werden die entsprechenden Polymere durch Polymerkettenwachstum auf der Peptid- bzw. Proteinoberfläche gebildet. Die Peptide bzw. Proteine wirken hierbei als Makroinitiatoren der Propagationsreaktion. Es ist allerdings bei der *grafting from* Strategie genauso möglich eine Peptidsequenz Schritt für Schritt auf der Polymeroberfläche zu synthetisieren. Diese Methode ähnelt der Festphasenpeptidsynthese, wobei die Polymeroberfläche als Ersatz für das dort verwendete Polymerharz verwendet wird. Schließlich kann bei der *grafting through* Strategie das Polymer aus Monomeren synthetisiert werden, die bereits Peptidsequenzen in den Seitenketten tragen. Hierbei werden zumeist kammartige Polymere hoher funktionaler Dichte erhalten.^[66-67]

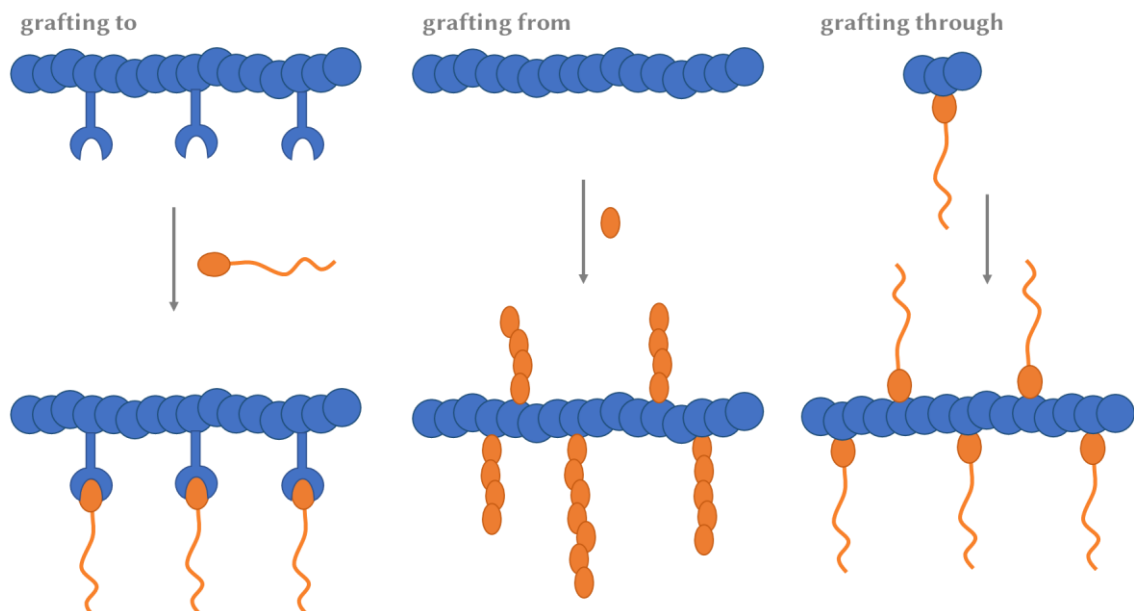
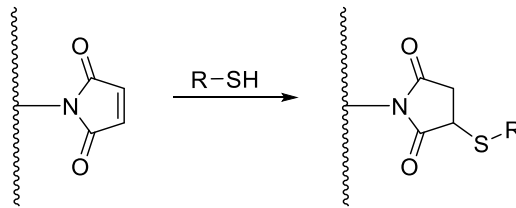


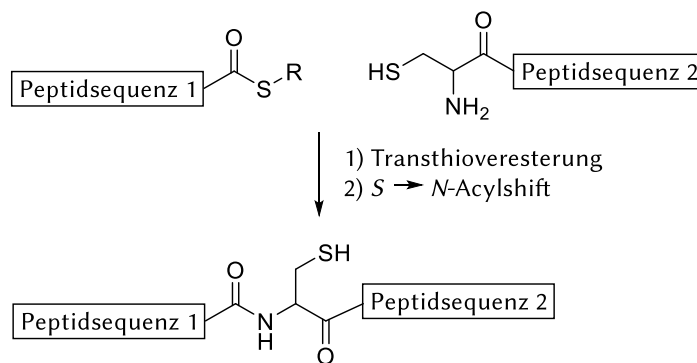
Abbildung 9: Schematische Darstellung der verschiedenen Synthesestrategien bei der Konjugatsynthese. Beim *grafting to* wird an das bestehende Polymer (blau) über Linker das Peptid/Protein (orange) gekuppelt. Beim *grafting from* wird auf der Polymeroberfläche die Peptidsequenz schrittweise synthetisiert und beim *grafting through* werden Peptid-tragende Monomere zum Polymer polymerisiert.

Zu den am meisten verwendeten Methoden in der *grafting to* Strategie zählen die Maleimid-Thiol Reaktion,^[68-69] Native Chemische Ligation (NCL)^[7, 70] und Click-Reaktionen^[71-73] (**Abbildung 10**), da diese sehr spezifisch und effizient ablaufen. Durch ihre Vielseitigkeit wurden alle drei Reaktionstypen bereits für die Synthese einer Vielzahl verschiedener Polymerkonjugate eingesetzt. So ist es beispielsweise möglich modulare Konjugate herzustellen, die auch mehrere verschiedene Peptide auf dem Polymergrundgerüst tragen^[70] beziehungsweise multiple Anzahlen eines Peptids zu koppeln, um multivalente Konjugate zu erzeugen.^[74]

Maleimid-Thiol Reaktion



Native Chemische Ligation



Click-Reaktion

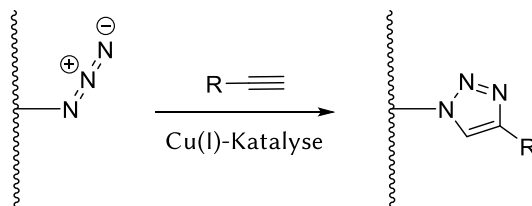


Abbildung 10: Am häufigsten verwendete Reaktionsarten bei der *grafting to* Strategie. Bei der Maleimid-Thiol Reaktion reagieren Thiole spezifisch mit an Polymeren immobilisierten Maleimiden. Die Native Chemische Ligation verläuft in zwei Schritten. Zuerst findet eine Transthioveresterung zwischen einem C-terminal Thioester-tragenden Peptid und einem N-terminal Cystein-tragenden Peptid statt. Anschließend erfolgt ein $S \rightarrow N$ -Acylshift, bei dem die labile Thioesterbindung durch eine stabile Amidbindung ersetzt wird. Bei der Kupfer(I)-katalysierten Click-Reaktion entstehen aus Polymer-gebundenen Aziden und Alkinen spezifisch 1,4-Triazole.

Die Click-Reaktion sorgt dafür, dass die Polymere und Peptide kovalent über Triazole miteinander verbunden werden. Hierbei entstehen bei Verwendung eines Kupfer(I)-Katalysators spezifisch 1,4-Triazole bei Raumtemperatur. Wird auf diese Katalyse verzichtet, kann bei erhöhter Temperatur ein Gemisch aus 1,4- und 1,5-Triazolen erhalten werden.^[71] Um auf Metallkatalysatoren verzichten zu können und trotzdem einheitliche Produkte zu erhalten, wurden schließlich auch andere Kupplungsmethoden entwickelt. Hierbei spielen die Thiol-basierten Methoden, zu welchen beispielsweise auch die Native Chemische Ligation und die Maleinimid-Thiol Reaktion gehören, eine besondere Rolle.^[75]

Bei der NCL reagiert ein C-terminal Thioester-tragendes Peptid bzw. ein Thioester-tragendes Polymer mit einem N-terminal Cystein-tragendem zweiten Peptid unter Abspaltung des entsprechenden Thioesters. Der anschließend erfolgende $N \rightarrow S$ -Acylshift sorgt für eine Umlagerung vom labilen Thioester zur stabilen Amidbindung.^[76]

Die Maleinimid-Thiol Reaktion hingegen verwendet freie Thiole, die unter Anlagerung an die Doppelbindung des Maleinimids ein kovalentes Konjugat bilden. Die Reaktion ist pH-Wert abhängig, da bei pH-Werten > 8 auch in der Thiolverbindung enthaltene primäre Amine nukleophil am Maleinimid angreifen können. Dieses ist besonders bei Thiol-haltigen Peptiden der Fall.^[77] Weiterhin sorgt ein zu geringer pH-Wert für einen Rückgang in der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Maleinimid und Thiol, da hier das Thiol protoniert vorliegt und somit selbst weniger nukleophil ist.^[68, 78] Unter basischen Bedingungen reagieren Thiole bereitwillig zu Disulfiden und stehen somit nicht mehr für die Reaktion mit Maleinimiden zur Verfügung. Die entstandenen Disulfide lassen sich mit Reduktionsmitteln wie Dithiothreitol (DTT) oder Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) wieder zu Thiolen reduzieren, doch hier kann eine Nebenreaktion mit dem Maleinimid nicht ausgeschlossen werden.^[79] Trotz all dieser Einschränkungen werden Maleinimid-Thiol Reaktionen häufig zur Synthese von Konjugaten verwendet, da sie ohne den Zusatz von weiteren Reagenzien (bspw. Katalysatoren) in wässrigen Systemen reagieren und somit insbesondere für die Synthese von Biokonjugaten gut geeignet sind.^[75] Dieses liegt an der Reaktivität des Maleinimids, welches durch seine aktivierenden Carbonylgruppen und die Ringspannung besonders schnell mit Thiolen reagieren kann. Unter Beachtung der entsprechenden pH-Werte reagieren Maleinimide nahezu ausschließlich mit den vorliegenden Thiolen und sind in diesem Fall äußerst selektiv.^[80]

Im Zuge dieser Arbeit wurde aufgrund der genannten Vorteile auf Maleinimid-Thiol Reaktionen zurückgegriffen, um multivalente Konjugate aus Maleinimiddextranen und verschiedenen Thiol-haltigen Peptiden zu synthetisieren.

1.4. Formin-bindendes Protein 21 (FBP21) und der Einfluss der Tandem-WW-Domänen auf das pre-mRNA Splicing

Formin-bindende Proteine, auch FBPs genannt, sind eine Gruppe von Proteinen, die 1996 erstmals von Chan *et al.* beschrieben wurden.^[81] Um die Funktion der Formine in Zusammenhang mit ihrer Funktion bei der Ausbildung von Bein- und Nierenfunktionen in Mäusen besser verstehen und mögliche Interaktionspartner finden zu können, führten Chan *et al.* einen Protein-Protein Interaktionsassay mit murinen Embryonenzellen durch. Hierbei verwendeten sie im Formin enthaltene Prolin-reiche Sequenzen (PRS), die bereits gewisse Bindungsaffinitäten für *Src-homology 3* (SH3) Domänen gezeigt hatten.^[82] Neben einer Klasse Formin-bindender Proteine, die solche SH3-Domänen aufwiesen, konnte eine neue Klasse FBPs entdeckt werden, die als gemeinsame Homologieregion sogenannte WW-Domänen beinhaltet. Auch das in dieser Arbeit verwendete FBP21 wurde hierbei erstmals entdeckt.^[81]

Weiterführende Untersuchungen dieser neuen Klasse an FBPs zeigte, dass das Motiv der WW-Domänen stark konserviert auftrat, wobei ein zentraler aromatischer Block aus 3 Tyrosinen vorhanden war (W-YYY-W).^[83] Weiterhin konnten auch einige FBPs mit mehreren WW-Domänen entdeckt werden, wie beispielsweise FBP11 und FBP21. Die Tandem-WW-Domänen dieser beiden Proteine wiesen eine erstaunliche Ähnlichkeit zu dem in Hefe vorkommenden Splicingfaktor Prp40 auf (**Abbildung 11**), der beim pre-mRNA Splicing in Hefe eine wichtige Rolle spielt.^[81, 84]

FBP11, #1	W T E H K S P D G R T Y Y Y - N T E T K Q S T W E K P
FBP11, #2	W K E Y K S D S G K P Y Y Y - N S Q T K E S R W A K P
FBP21, #1	W V E G V T A D G H C Y Y Y - D L I T G A S Q W E K P
FBP21, #2	W V E G L S E D G Y T Y Y Y - N T E T G E S K W E K P
Sc.Prp40, #1	W K E A K D A S G R I Y Y Y - N T L T K K S T W E K P
Sc.Prp40, #2	W K A A K T A D G K V Y Y Y - N P T T R E T S W T I P

Abbildung 11: Vergleich der Aminosäuresequenzen der WW-Domänen von FBP11, FBP21 und Sc.Prp40. Abgesehen von den bindungsrelevanten Aminosäuren Tryptophan (W, blau), Prolin (P, grün) und Tyrosin (Y, orange) können auch weitere Aminosäureübereinstimmungen in den Sequenzen erkannt werden.

Die Genexpression von eukaryontischen Zellen beinhaltet mehrere Schritte: Transkription, mRNA Prozessierung und anschließender Export aus dem Zellkern. Ein wichtiger Schritt in dieser Folge ist das pre-mRNA Splicing, bei welchem in einem zwei-stufigen Mechanismus die nicht-codierenden Introns aus der pre-mRNA entfernt werden (**Abbildung 12**).^[85] Die daraus resultierende mRNA beinhaltet nur noch codierende Exons. Diese mRNA kann anschließend aus dem Nucleus transportiert und in den Ribosomen des Zytoplasmas in die entsprechenden funktionellen Proteine und Polypeptide übersetzt werden.^[86]

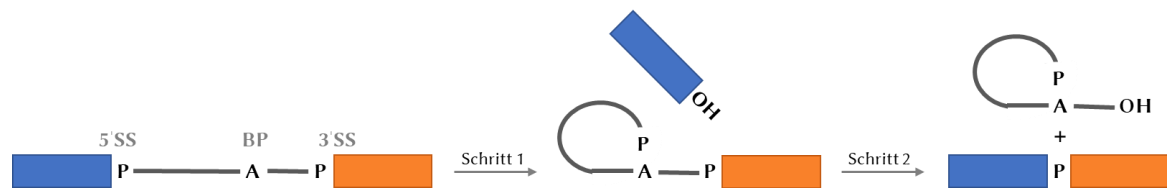


Abbildung 12: Schematische Darstellung des pre-mRNA Splicings. Die pre-mRNA wird in zwei Schritten von den nicht-codierenden Introns (graue Linie) befreit. Hierbei wird das Intron ausgehen von der 5'- Spleißstelle mit dem Alanin am branch point ligiert. Das N-terminale Exon (blau) wird freigegeben, damit es im zweiten Schritt an der 3'-Spleißstelle mit dem C-terminalen Exon (orange) ligiert werden kann. Das Intron wird ausgestoßen (Abbildung nach Will et al.).^[85]

Das Splicing an sich findet im sogenannten Spliceosom statt, einem hochdynamischen Komplex aus fünf kleinen nukleären Ribonukleinsäuren (snRNPs) und mindestens 150 spliceosomalen Proteinen, die in einem konzertierten Mechanismus zusammenarbeiten (**Abbildung 13**). Zuerst bildet sich durch Anlagerung der verschiedenen snRNPs (U1-U6) an die pre-mRNA, ausgehend von der 5'-Spleißstelle hin zur 3'-Spleißstelle, in mehreren Schritten das katalytisch aktive Spliceosom direkt auf der pre-mRNA. Anschließend wird diese katalytische Aktivität genutzt, um die Introns aus der pre-mRNA zu entfernen. Schließlich zerfällt das Spliceosom wieder in seine einzelnen snRNP-Bestandteile und kann erneut den Splicingzyklus durchschreiten.^[86]

Durch die Einflussnahme verschiedener Splicingfaktoren können alternative Spleißstellen vom Spliceosom erkannt werden. Es erfolgt ein alternatives Splicing und somit entsteht eine isoforme mRNA.^[87] Mittels alternativem Splicing können daher aus einem Gen mitunter hunderte verschiedene Proteine entstehen. Somit ist dieser Prozess für die Vielfalt des eukaryontischen Proteoms verantwortlich.^[87-88]

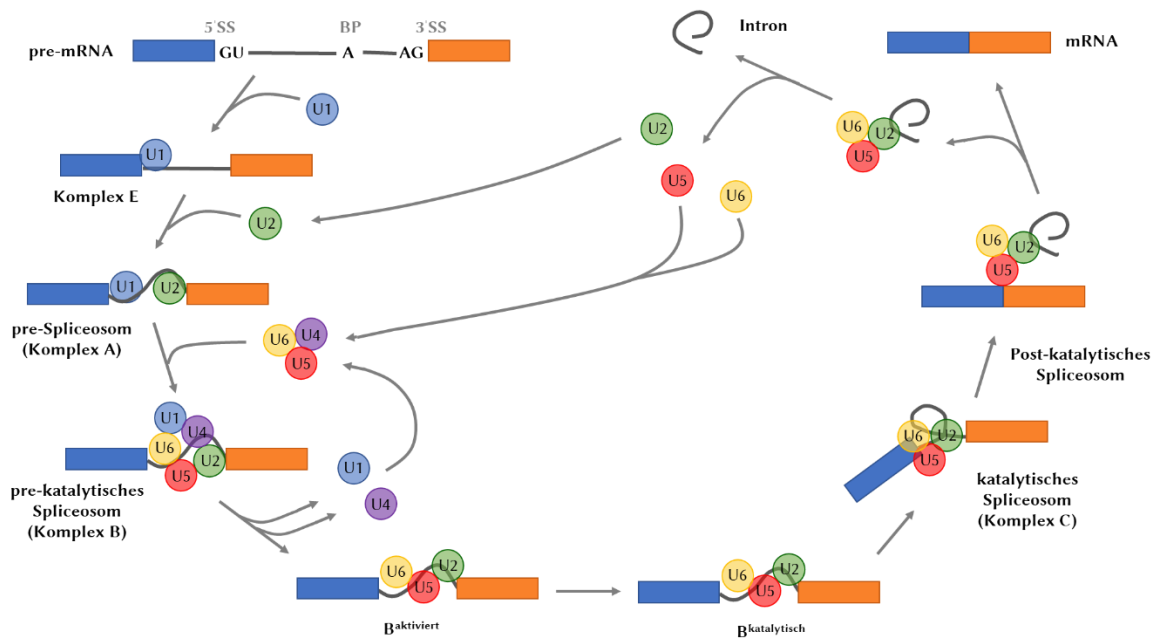


Abbildung 13: Vereinfachter Mechanismus des pre-mRNA Splicings. Hierbei werden durch die Zusammenarbeit von snRNPs (U1-U6) und Splicingfaktoren in einem hochdynamischen Mechanismus über neun Schritte das Spliceosom auf der pre-mRNA aufgebaut und anschließend die nicht-codierenden Introns aus der pre-mRNA entfernt (Abbildung nach Will et al.).^[85]

Bei diesem hochkomplexen Prozess des (alternativen) Splicings kommt es mitunter auch zu Fehlern in der Form von Mutationen und Fehlspllicing, sodass daraus Krankheiten (Karzinome und Erbkrankheiten wie bspw. Hutchinson-Gilford-Syndrom) für den Organismus entstehen können.^[89-90] Es ist daher von besonderer Bedeutung den Mechanismus des Splicings zu verstehen und gegebenenfalls durch Einflussnahme auf den selbigen Krankheiten zu therapieren.^[91] Erste Schritte in diese Richtung wurden bereits von Woolard *et al.* in Bezug auf FBP21 unternommen. Sie konnten zeigen, dass der Naturstoff Borrelidin an die Tandem-WW-Domänen des FBP21 bindet und somit das Isoformenverhältnis des *vascular endothelial growth factors* (VEGF) beeinflusst. Dieser ist ein Signalmolekül, das für die Stimulation von Blutgefäßen verantwortlich ist.^[92]

Ausgehend von der Annahme, dass die strukturelle Ähnlichkeit der beiden FBPs mit Prp40 auch eine funktionelle Übereinstimmung mit sich ziehen könnte, untersuchten Bedford *et al.* 1998 die Interaktionen von FBP21 mit cDNA Expressions-Bibliotheken.^[83] Hierbei konnten direkte Interaktionen mit den Splicingfaktoren U1C (beinhaltet im U1 snRNP), SF1/mBBP und den snRNP Proteinen SmB und SmB' *in vitro* festgestellt werden. Für die Bindung der WW-Domänen des FBP21 an diese Splicingfaktoren konnte die Peptidsequenz PGM, die in allen vier Proteinen enthalten ist, ermittelt werden. Weiterhin ist FBP21

im spliceosomalen Komplex A vorhanden und colokalisiert mit dem essenziellen Splicingfaktor SC35 in den *nuclear speckles*, welche unter anderem als Lagerort für Splicingfaktoren fungieren.^[83, 93] Diese Beobachtung ließ die Vermutung aufkeimen, dass FBP21 selbst eine aktive Rolle im Splicingprozess spielen könnte. Erst kürzlich konnten Arbeiten von Henning *et al.* diese Hypothese stützen, indem sie zeigten, dass FBP21 regulierend auf die spliceosomale RNA-Helikase Brr2 eingreift. Hierbei reduziert FBP21 die Geschwindigkeit, mit der Brr2 im pre-katalytischen Spliceosom den U4/U6 snRNP-Komplex entflechtet und das U4 snRNP freisetzt (siehe **Abbildung 13**). Dies stellt einen essenziellen Schritt für die Bildung des aktiven Spliceosoms und somit des gesamten Splicingprozesses dar.^[94] Diese Interaktion des FBP21 findet nicht unter Verwendung der Tandem-WW-Domänen statt, sondern bedient sich stattdessen der C-terminalen Region des Proteins. Dennoch ist diese Interaktion auch für die weitere Untersuchung der Tandem-WW-Domänen und ihrer Interaktion im Splicingzyklus von Interesse. Dies liegt insbesondere daran, dass die beiden Proteinregionen *in vivo* nicht isoliert betrachtet werden können, sondern auch komplexe Region-übergreifende Interaktionsmechanismen vorliegen können.

Aufbauend auf den *in vitro* Ergebnissen von Bedford *et al.* wurden von Huang *et al.* *in vivo* Splicingexperimente durchgeführt, die zeigten, dass die Anwesenheit der Tandem-WW-Domänen im Gegensatz zur Verwendung von Mutanten eine um etwa 200 % erhöhte Splicingaktivität aufweisen. Somit sind die Tandem-WW Domänen des FBP21 für das pre-mRNA Splicing von großer Bedeutung.^[95]

Weiterhin gelang Huang *et al.* 2009 die Bestimmung der Struktur der Tandem-WW-Domänen von FBP21 in Lösung mittels NMR-Spektroskopie (**Abbildung 14**, links).^[95] Demnach hat FBP21 zwei Typ III WW-Domänen, die eine Sequenzidentität von 53 % aufweisen. Die beiden WW-Domänen sind mit einem flexiblen zwölf Aminosäure-langen Linker miteinander verbunden. Diese Linkerflexibilität, gepaart mit elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den beiden WW-Domänen, verhindert das Ausbilden einer starren, übergeordneten Struktur des gesamten Proteins.^[95-96] Die einzelnen WW-Domänen wiederum zeigen eine typische WW-Domänen Faltung, die aus einer drei-strängigen antiparallelen β -Faltblattstruktur besteht (**Abbildung 14**, rechts). Hierbei sind die einzelnen Seiten der Faltblätter für unterschiedliche Aufgaben zuständig. Während die eine Seite die Konformation der Domäne stabilisiert, bietet die andere Seite eine Bindungsoberfläche für die Prolin-reichen Sequenzen.^[95, 97]

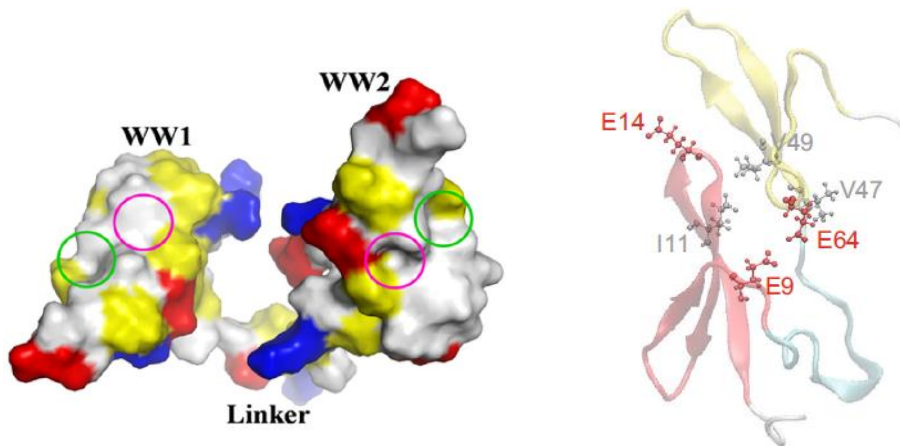


Abbildung 14: Links: Struktur der molekularen Oberfläche der Tandem-WW-Domänen, blaue Flächen = positive Ladung, rote Flächen = negative Ladung, graue Flächen = neutrale Gegenden und gelbe Flächen = hydrophobe Rückstände (Abbildung entnommen aus Huang et al.).^[95] **Rechts:** Bändermodell der Tandem-WW-Domänen mit ausgewählten Aminosäuren, die die Interaktion der Domänen zueinander beeinflussen, grau = hydrophobe Wechselwirkungen (stabilisierend), rot = elektrostatische Wechselwirkungen (destabilisierend), (Abbildung entnommen aus Zhang et al.).^[96]

Obwohl die Tandem-WW-Domänen des FBP21 in die Klasse III eingeteilt werden (Bindung an das Motiv PPR), konnte auch eine Bindung an Peptidmotive der Klasse II (PPLP), sowie an das Motiv PPPP nachgewiesen werden.^[95] Generell lässt sich sagen, dass die Bindungsaffinitäten von monovalenten Liganden an die WW-Domänen des FBP21 eher gering sind und Bindungsaffinitäten im mM-Bereich aufweisen.^[26, 95] Bei der Verwendung von multivalent-bindenden Liganden konnte allerdings eine erhebliche Steigerung der Bindungsaffinität (unterer μM -Bereich) festgestellt werden.^[26, 95, 98-99] Hierbei konnte außerdem eine Interaktion der beiden WW-Domänen und somit eine Bindung des Liganden an beide Domänen beobachtet werden. Dies ist aufgrund der Flexibilität des Linkers zwischen den beiden WW-Domänen möglich.^[98]

Um weitere Untersuchungen bezüglich der Funktion und gegebenenfalls Regulation von FBP21 durchführen zu können, ist es demnach auch für die vorliegende Arbeit ratsam ein multivalentes System zu verwenden, dass durch Interaktion mit beiden WW-Domänen voraussichtlich erhöhte Bindungsaffinitäten aufweisen könnte.

1.5. Zelluläre Aufnahme von Makromolekülen

Die Aufnahme von extrazellulären Substanzen wird durch die Zellmembran gehindert, welche die äußerste Begrenzung der Zelle darstellt. Sie besteht aus einer Lipiddoppelschicht, die größtenteils aus amphiphilen Phospholipiden besteht (**Abbildung 15**). Durch

Selbstorganisation befinden sich die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten im Inneren der Membran, während die hydrophilen Phosphatgruppen nach außen gerichtet sind. Sie kommen somit mit dem extrazellulären Fluid und dem Zytoplasma in Berührung.

Der Transport direkt durch die Membran ist für kleine, neutrale Moleküle mittels Entropie-gesteuerter, passiver Diffusion möglich. Andere kleine Moleküle und Ionen, die auf Grund ihrer Ladung oder Polarität nicht durch direkte Diffusion in die Zelle gelangen, können mittels Transports durch Ionenkanäle und Transportproteine aufgenommen werden.^[100]

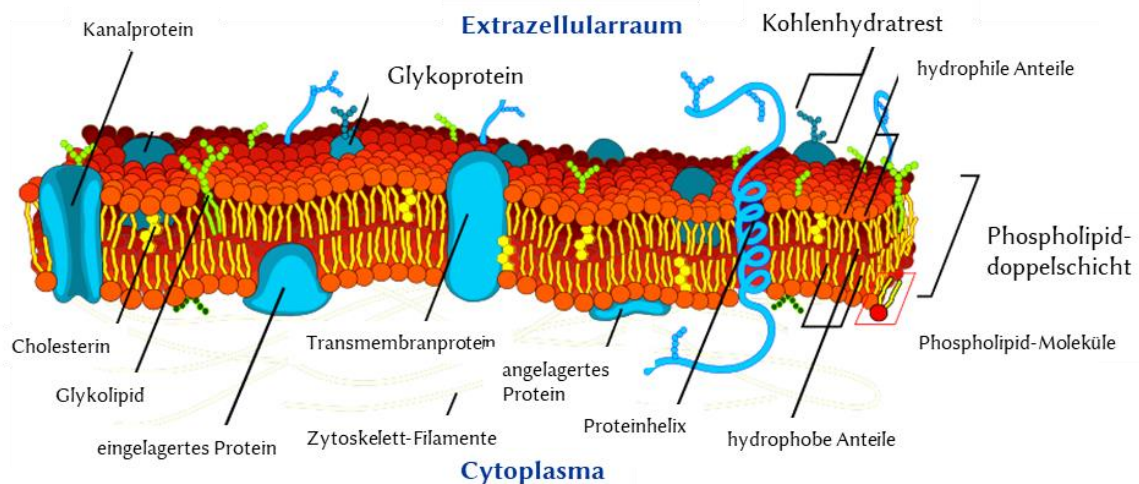


Abbildung 15: Schematische Darstellung einer Zellmembran. Das extrazelluläre Fluid wird vom Eintritt in das Innere der Zelle durch die Lipiddoppelschicht abgehalten. Diese besteht zu einem Großteil aus Phospholipiden, auf deren Oberfläche sich teilweise Glykoproteine befinden. Der Transport von Molekülen kann entweder direkt durch die Zellmembran erfolgen oder durch eine Vielzahl von Kanalproteinen und Transmembranproteinen ermöglicht werden (Abbildung übernommen von M. Ruiz Villarreal).^[101]

Für Makromoleküle sind diese beiden Wege wiederum aufgrund ihrer Größe versperrt. Jedoch können auch sie in die Zelle aufgenommen werden. Der dafür verantwortliche Prozess ist die Endozytose, welches ein Überbegriff für mehrere Mechanismen ist. Man unterscheidet zwischen zwei Übergruppen, der Phagozytose und der Pinozytose.^[100]

Die phagozytotische Aufnahme ist größtenteils spezifischen Zellen, den Phagozyten (bspw. Makrophagen und dendritischen Zellen), vorbehalten. Sie dient dem Organismus als Abwehr gegen Bakterien und Viren, aber auch anderen Fremdkörpern ($\geq 0,5 \mu\text{m}$) oder apoptotischen Zellen. Diese werden bereits im Blutkreislauf auf ihrer Oberfläche mit Antikörpern markiert, sodass sie von den Phagozyten durch spezifische Rezeptor-Ligand Interaktionen erkannt werden können (**Abbildung 16**).^[102] Hierbei können viele verschiedene Antikörper und Marker zum Einsatz kommen, welche spezifisch auf die einzelne

Phagozytenart zugeschnitten sind. Nach der Erkennung des Fremdkörpers durch die Phagozyte, wird dieser an deren Oberfläche gebunden und durch Ausbildung eines ihn umschließenden Phagosoms internalisiert. Im Zellinneren wird der Fremdkörper anschließend enzymatisch zersetzt und schließlich mittels Exozytose aus der Zelle ausgestoßen.^[103]

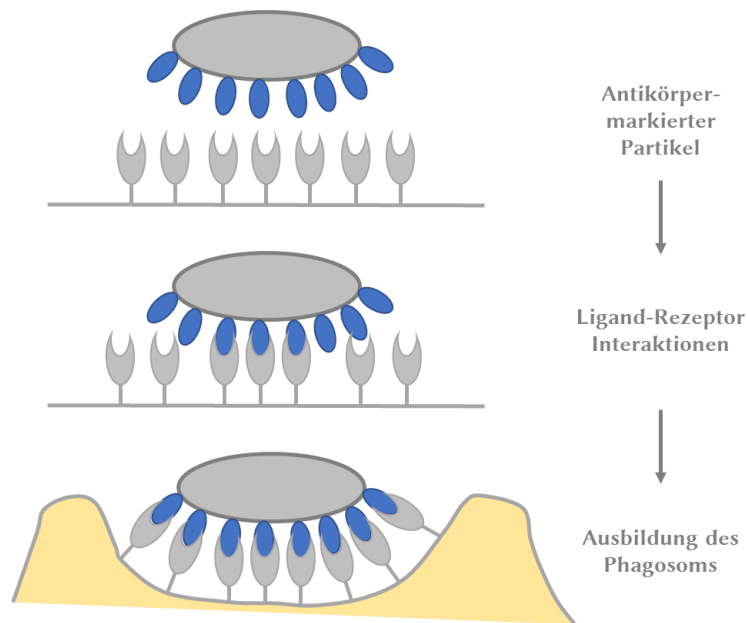


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Phagozytose. An der Oberfläche Antikörper-markierte Partikel werden in Nähe der Zellmembran von spezifischen Rezeptoren erkannt und gebunden. Die Ausbildung des Phagosoms ist Actin-gesteuert und erfolgt um den gebundenen Partikel herum (Abbildung nach ^[104]).

Die Pinozytose, welche in allen Zellen stattfindet, sorgt für deren Versorgung mit Flüssigkeiten, gelösten Substanzen und Membranbestandteilen (bspw. *low-density Lipoprotein* (LDL)). Sie wird in drei Mechanismen unterteilt, die unabhängig voneinander agieren. Diese sind die Clathrin-vermittelte Endozytose, die Caveolae/Lipid raft-vermittelte Endozytose und die Makropinozytose.^[100]

Die Clathrin-vermittelte Endozytose ist der häufigste Aufnahmeweg, wobei etwa 95 % der am Anfang des Aufnahmeprozesses entstehenden Vesikel aus sogenannten *Clathrin-coated pits* entstehen.^[105] Dies sind Vertiefungen in der Zellmembran, die mit Clathrin beschichtet sind. Diese Art der Aufnahme ist sehr vielseitig, da viele verschiedene Adapterproteine Clathrin mit den aufzunehmenden Substanzen (bspw. LDL, Transferrin, verschiedene Wachstumsfaktoren und Antikörper, aber auch das in dieser Arbeit untersuchte West-Nil-Virus) verbinden können.^[106] Nachdem die Substanzen an der Zelloberfläche an ihre entsprechenden Rezeptoren gebunden haben, wird das Clathrin aus dem Zytoplasma der

Zelle rekrutiert und an die entsprechenden Adapterproteine gebunden (**Abbildung 17**).^[107] Hierdurch entstehen an der Zelloberfläche die *Clathrin-coated pits*, welche sich weiter vertiefen und schließlich Vesikel bilden. Diese beschichteten Vesikel werden, genau wie bei der Caveolae/Lipid raft-vermittelten Endozytose, durch Dynamin von der Zellwand abgeschnürt und treten in das Zytoplasma ein. Dort lösen sich das Clathrin und die Adapterproteine von der Oberfläche des Vesikels ab und gehen erneut in das Zytoplasma über. Das nackte Vesikel verschmilzt schließlich mit den im Zytoplasma vorliegenden Endosomen und setzt so die aufgenommenen Substanzen frei. Die Größe der Vesikel ist stark abhängig von der Zellart und der Substanzart, die aufgenommen werden soll. So sind beispielsweise Vesikel in Pflanzen- und Hefezellen kleiner (um 35-60 nm) als solche in menschlichen Zellen (bis zu 200 nm).^[107]

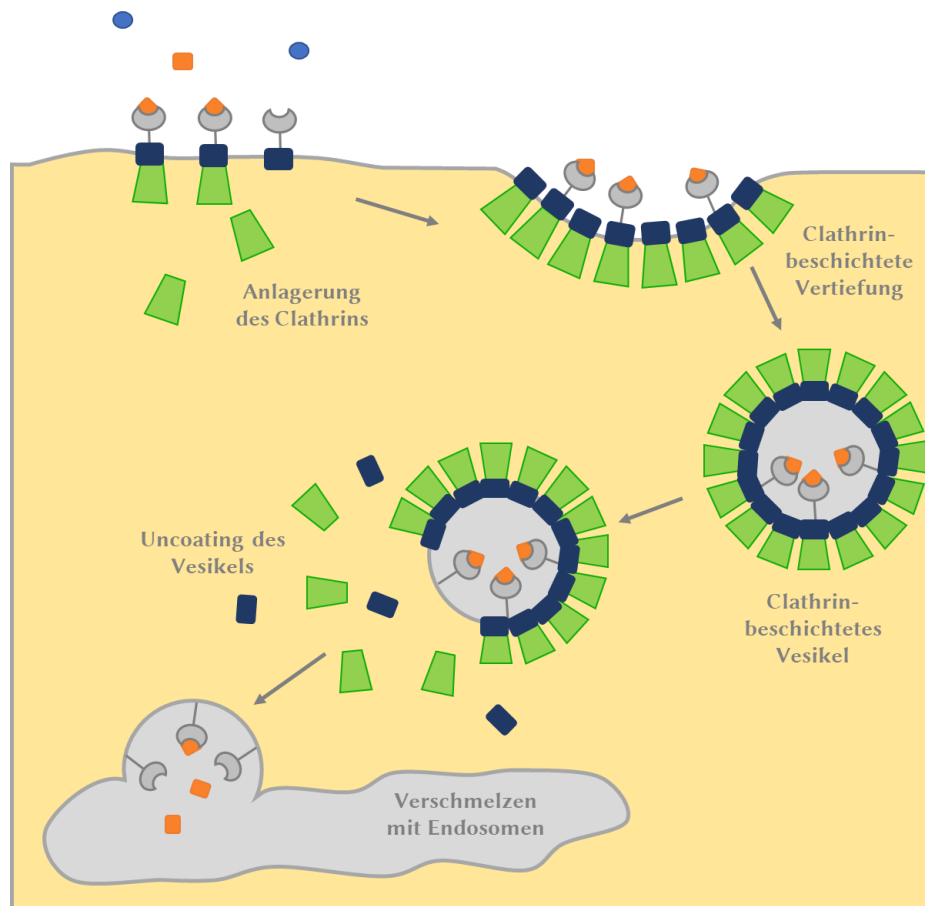


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Clathrin-vermittelten Endozytose. Das aufzunehmende Cargo wird an der Zelloberfläche an Rezeptoren gebunden, welche mit Adapterproteinen verbunden sind. Diese binden an zytosomales Clathrin, welches daraufhin Clathrin-coated pits ausbildet. Diese Vertiefungen bilden schließlich Vesikel, die sich von der Zellmembran abschnüren und in das Zytoplasma aufgenommen werden. Clathrin und die Adapterproteine lösen sich anschließend von der Oberfläche der Vesikel. Das nackte Vesikel verschmilzt mit Endosomen (Abbildung nach ^[108]).

Die Caveolae/Lipid raft-vermittelte Endozytose ist genau wie die Clathrin-vermittelte Endozytose eine Rezeptor-vermittelte Aufnahmeart. Im Gegensatz zu dieser sind jedoch die genauen Bestimmungen bei der Wahl der Liganden bis jetzt noch nicht ausreichend geklärt.^[109-110] Es ist jedoch bekannt, dass bei der Caveolae-vermittelten Endozytose die aufzunehmenden Substanzen an spezifische Rezeptoren auf der Membranoberfläche binden. Diese Rezeptoren befinden sich in Cholesterol- und Sphingolipid-reichen Vertiefungen (etwa 50 nm) der Zellmembran, welche durch die Anwesenheit von Caveolin-1 stabilisiert werden (**Abbildung 18**). Durch diese Stabilisierung ist die Aufnahme der Caveolae sehr langsam. Die Interaktion von spezifischen Liganden (Folsäure^[111], Albumin^[112], alkalischer Phosphatase^[110]), aber auch verschiedenen Viren (SV40 Virus^[113], HIV^[114], Echovirus 1^[115]) an den entsprechenden Rezeptoren kann jedoch eine rasche Aufnahme der Caveolae induzieren. Die Reifung der Caveolae erfolgt durch Phosphorylierung des Caveolin-1 mittels Src-Kinase, sodass die Caveolae sich von der Zellmembran lösen und internalisiert werden können. Die Abschnürung von der Zellmembran wird durch Dynamin vermittelt. Im weiteren Verlauf können die Caveolae entweder mit Endosomen verschmelzen und so die aufgenommenen Substanzen an die zytosomalen Organelle abgeben oder sogenannte Caveosomen bilden, welche Cluster von Caveolae darstellen.^[109, 116]

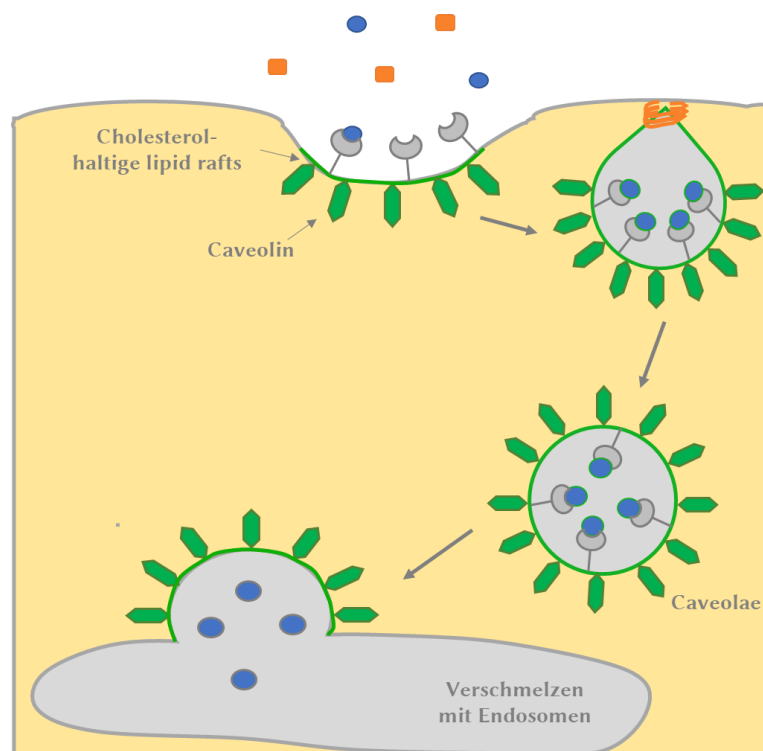


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Caveolae-vermittelten Endozytose. Die aufzunehmenden Substanzen können mittels Rezeptoren in Cholesterol-reichen Vertiefungen (sogenannte Lipid rafts) gebunden werden. Diese werden durch Caveoline stabilisiert, welche nach Reifung von der Membran abgeschnürt und schließlich in die Zelle aufgenommen werden. Die Caveolae können dort mit Endosomen verschmelzen und das Cargo frei geben (Abbildung nach ^[117]).

An der Makropinozytose sind keine Rezeptor-Ligand Interaktionen beteiligt, sodass sie als unspezifische Aufnahme von extrazellulärem Fluid und darin gelösten Substanzen gilt. Stattdessen wird die Makropinozytose durch Stimulierung mittels Wachstumsfaktoren ausgelöst. Der Actin-vermittelte Prozess sorgt für die Einstülpung der Zellmembran und die anschließende Abschnürung von relativ großen Vesikeln, sogenannten Makropinosomen ($\geq 0,2 \mu\text{m}$), in das Zellinnere (**Abbildung 19**). Im Inneren der Zelle reifen die Makropinosomen und verschmelzen schließlich je nach Zellart entweder mit den vorhandenen Lysosomen oder Endosomen im Zytoplasma. Die Makropinozytose ist beispielsweise für das Immunsystem von großer Bedeutung, da Antigen-präsentierende Zellen mit ihrer Hilfe Antigene in ihrer direkten Umgebung erkennen und eine entsprechende Immunantwort liefern können.^[118]

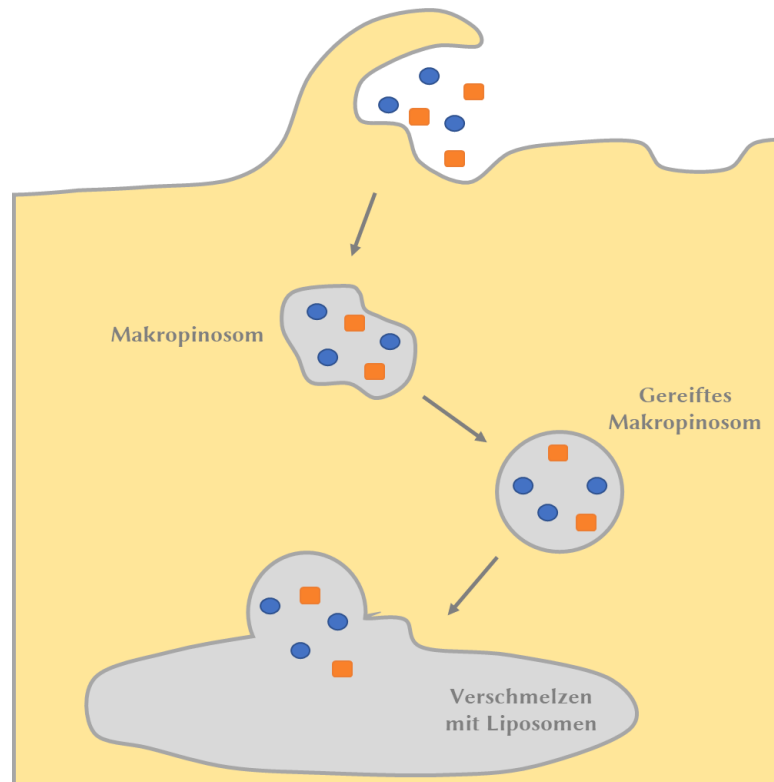


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Makropinozytose. Durch Einstülpung der Zellmembran werden gelöste Substanzen mittels Makropinosomen aus dem extrazellulären Fluid in die Zelle aufgenommen. Diese reifen und verschmelzen schließlich mit Liposomen. Die aufgenommenen Substanzen werden dort freigesetzt (Abbildung nach ^[119]).

Die Aufnahme von Makromolekülen in die Zelle ist somit von verschiedenen Faktoren abhängig und kann auf vielseitige Art beeinflusst werden. Bei der Aufnahme von sehr großen oder geladenen Makromolekülen können spezielle Peptidsequenzen, sogenannte zellpenetrierende Peptide (CPP) helfen (siehe Kapitel 1.5.1).

1.5.1. Zellpenetrierende Peptide

Im extrazellulären Fluid vorliegende Substanzen können über verschiedene Mechanismen in Zellen aufgenommen werden (Kapitel 1.5). Jedoch muss hierbei beachtet werden, dass zu große oder stark geladene Moleküle mitunter nicht ohne weitere Hilfe aufgenommen werden können. Um dennoch eine Aufnahme zu ermöglichen, kommen in solchen Fällen oft zellpenetrierende Peptide zum Einsatz. Diese zumeist 8-30 Aminosäuren-langen Peptidsequenzen können durch kovalente Bindung oder nicht-kovalente Interaktion mit dem Cargo eine Aufnahme bewirken.^[120-121]

Die Aufnahme dieser CPP in die Zelle wird von vielen Faktoren beeinflusst, nicht zuletzt auch von der Art der verwendeten Zellen. Dies liegt auch daran, dass die Zellmembranen von unterschiedlichen Zelltypen verschiedene Lipidzusammensetzungen und Dichten aufweisen. Hierdurch wird bei der Aufnahme der CPP teilweise auf unterschiedliche Aufnahmemechanismen zurückgegriffen bzw. die Verwendung höherer Konzentrationen kann notwendig sein, um den gleichen Mechanismus zu erreichen.^[122]

Zellpenetrierende Peptide können auf verschiedene Weisen klassifiziert werden. Dies geschieht beispielsweise nach ihrer Herkunft (von Proteinen abgeleitet, nach Struktur-Aktivitäts-Beziehungen konzipiert, chimäre Kombinationspeptide) oder nach ihrer Aminosäurezusammensetzung (kationisch, hydrophob, amphiphil). In **Tabelle 1** können einige der am häufigsten verwendeten CPPs und ihre Klassifizierungen eingesehen werden.^[123]

Tabelle 1: Überblick über einige häufig verwendete CPPs und ihre Klassifikationen

<u>PEPTID</u>	<u>SEQUENZ</u>	<u>KLASSE</u>	<u>HERKUNFT</u>
Penetratin ^[124]	RQKIWFQNRMM-KWKK	Kationisch	Antennapedia Transkriptionsfaktor (43–58) von <i>Drosophila melanogaster</i>
Polyarginine ^[125]	R ₈ -R ₁₂	Kationisch	Struktur-Aktivitäts-Beziehung
TAT ^[126]	GRKKRRQRRR	Kationisch	HIV-1 TAT-Protein (48-57)
Transportan ^[127]	GWTLNSAGYLL-GKINKALAALAKKIL	Amphipatisch	Kombination Mastoparan und Galanine
C105Y ^[128]	CSIPPEVKFNKPF-VYLI	Hydrophob	Synthetisches Peptid, basierend α 1-Antitrypsin

Die meisten bisher bekannten zellpenetrierenden Peptide gehören zur Gruppe der kationischen oder amphipathischen CPPs. Zur Gruppe der hydrophoben CPPs gehören hingegen nur etwa 15 % der bekannten zellpenetrierenden Peptide.^[123] Dieses liegt jedoch mitunter auch daran, dass hydrophobe CPP zeitlich erst später entdeckt wurden als ihre kationischen und amphipathischen Pendanten.

Im Weiteren soll auf die Gruppe der kationischen zellpenetrierenden Peptide eingegangen werden, da Vertreter dieser Gruppe im Verlauf dieser Arbeit verwendet wurden. Hierzu gehören beispielsweise das TAT-Peptid, welches aus dem HIV-1 TAT Protein abgeleitet wurde.^[126] Weiterhin zählen auch die synthetisch hergestellten Polyarginine zu dieser Gruppe. Es konnte in Untersuchungen festgestellt werden, dass für eine effiziente Aufnahme von kationischen CPP in die Zelle mindestens acht positive Ladungen vorliegen sollten. Dieses trifft auch auf die Polyarginine zu, bei denen das Oktaarginin (R₈) die kürzeste, effiziente zellpenetrierende Peptidsequenz darstellt.^[129]

Kationische CPP sind stark von der Konzentration abhängig, sodass bei geringen Konzentrationen ($\leq 2 \mu\text{M}$) die zellpenetrierenden Peptide oft direkt durch die Zellmembran aufgenommen werden können. Dieser recht ineffektive Aufnahmeweg, die sogenannte Translokation, erfolgt durch Interaktion der kationischen CPPs mit den Phospholipiden der Membranoberfläche.^[130-131]

Bei höheren Konzentrationen ($\geq 2 \mu\text{M}$) hingegen, werden die selben zellpenetrierenden Peptide meist über einen endozytotischen Aufnahmemechanismus internalisiert. Der erste Schritt bei dieser zellulären Aufnahme für kationische CPPs ist die elektrostatische Interaktion mit negativ-geladenen Glykosaminoglykanen (GAGs), die sich auf der Membranoberfläche befinden. Die Interaktion mit den CPPs sorgt für eine verstärkte Lokalisierung bzw. Aggregation der GAGs an dieser Stelle.^[131-132] Anschließend erfolgt der eigentliche endozytotische Aufnahmeprozess, welcher von der Art des Cargos, der Zelle und des entsprechenden CPPs abhängig ist.

Bei Konzentrationen über $10 \mu\text{M}$ kommt es wiederum zu einem Endozytose-unabhängigen Aufnahmemechanismus, der Transduktion. Der genaue Mechanismus der Transduktion ist noch nicht geklärt, jedoch gilt es als wahrscheinlich, dass die Arginin-reichen CPPs an die sogenannten Nukleationszonen (bestimmte Abschnitte auf der Zellmembran) angelagert werden. Wird ein bestimmter Schwellenwert für das Peptid erreicht, bilden sich Zellbläschen, die die Aufnahme in das Zytoplasma ermöglichen.^[133] Diese Bläschen sind jedoch nicht mit den bei der Endozytose verwendeten Vesikeln zu verwechseln. Die Effizienz dieses rasanten Aufnahmewegs wird bei Inhibition der endozytotischen Interna-

lisierung (bspw. mit Chlorpromazin für Clathrin-vermittelte Endozytose, EIPA für die Makropinozytose oder M β CD für die Caveolae/Lipid raft-vermittelte Endozytose) noch weiter verstärkt, da der Schwellenwert der angelagerten Peptide schneller erreicht werden kann.^[133-134] Die Transduktion ist von mehreren Faktoren, wie beispielsweise der Anwesenheit von Heparinsulfat abhängig. Da bei der direkten Aufnahme mittels Translokation allerdings diese Heparinsulfat-Abhängigkeit nicht besteht, wird davon ausgegangen, dass eventuell ein *crosslinking* des Heparinsulfats mit den Peptiden bei der Transduktion stattfindet, welches diesen Unterschied erklären könnte. Dies könnte die Anlagerung an die Membran und Ausbildung der Bläschen beeinflussen.^[135] Weiterhin spielt die Zusammensetzung der Lipidbestandteile der Membran eine bis jetzt noch unbekannte, aber dennoch wichtige Rolle bei der Transduktion, sodass diese Zelltyp-abhängig ist.^[136]

Abschließend muss bei der Verwendung von CPPs bedacht werden, dass sie ein gewisses Potential zur Zytotoxizität aufweisen. Dieses liegt hauptsächlich daran, dass (insbesondere amphipathische) CPP mit der Zellmembran interagieren und somit Membranstörungen hervorrufen können.^[137-138] Untersuchungen zur Zytotoxizität verschiedener CPPs zeigten eine gewisse Zelltyp-Abhängigkeit, welches wiederum auf die unterschiedliche Beschaffenheit der Zellmembranen zurückzuführen ist. Darüber hinaus hat die verwendete Konzentration der CPPs und die Verwendungsdauer einen großen Einfluss auf die Zytotoxizität der CPPs.^[139-140] Weiterhin ist die Zytotoxizität von CPPs stark Cargo-abhängig. Wie in mehreren Studien gezeigt werden konnte, führt die Konjugation mit anderen Peptiden oder auch Fluorophoren oft zu einer Erhöhung der Zytotoxizität der entsprechenden CPPs.^[140-143] Beispielsweise konnten Jones *et al.* zeigen, dass die Konjugation von Polyarginin (R₁₁) mit dem Peptid NBD eine Reduktion des EC₅₀-Wertes von 76 μ M auf 10 μ M mit sich brachte. Die CPPs TAT und Antennapedia waren von so einer Konjugation jedoch nur in geringerem Maße negativ beeinflusst. Die generelle Zytotoxizität von TAT lag bei der Untersuchung Fluorophor-gelabelter Peptide in verschiedenen Zelllinien weit unterhalb derer von Polyarginin, Antennapedia und Transportan.^[141]

1.5.2. Kernlokalisationssequenzen

Der Transport in das Zellzytosol ist, wie bereits in Kapitel 1.5 und 1.5.1 erwähnt, auf verschiedene Arten möglich. Je nachdem, welchen Zweck ein aufgenommenes Cargo erfüllen soll, kann es jedoch notwendig sein, dass dieses in den Zellkern überführt wird. Das in dieser Arbeit verwendete Protein FBP21 liegt in den *nuclear speckles* im Nukleus vor, sodass es für *in vivo* Studien notwendig ist, die verwendeten Inhibitoren ebenfalls in den Nukleus zu transportieren. Der Nukleus ist allerdings von einer Doppelmembran, der Kernhülle, umgeben (**Abbildung 20**).

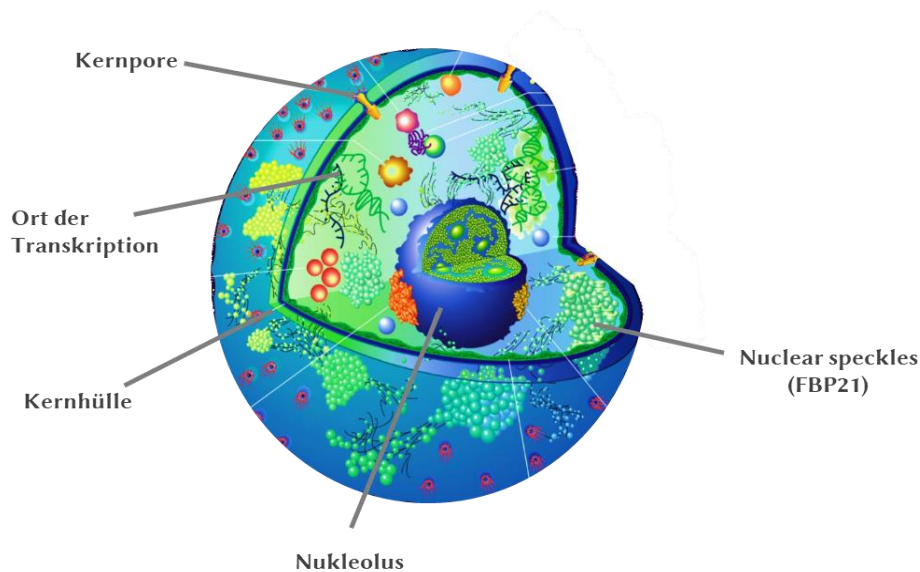


Abbildung 20: Schematische Darstellung des Nukleus mit seinen wichtigsten Bestandteilen. FBP21 ist in den Nuclear speckles lokalisiert. Der Nukleus ist durch die Kernhülle vom Zytosol abgetrennt. Moleküle können über die Kernporen aufgenommen werden bzw. den Nukleus verlassen (Abbildung übernommen aus Spector et al.).^[144]

Hierdurch ist dieser vor dem Eindringen unerwünschter Stoffe geschützt und kann die Aufnahme der gewünschten Stoffe steuern. Die Aufnahme erfolgt über Poren in der Kernhülle, die wiederum durch filamentartige Phenylalanin-Glycin Nukleoporine, sogenannte *FG-Nups*, geschützt werden (**Abbildung 21**). Der Kernporenkomplex besteht aus etwa 50-100 verschiedenen Proteinen, sodass die Aufnahme in den Nukleus ein hochdynamischer und komplexer Prozess ist.^[145]

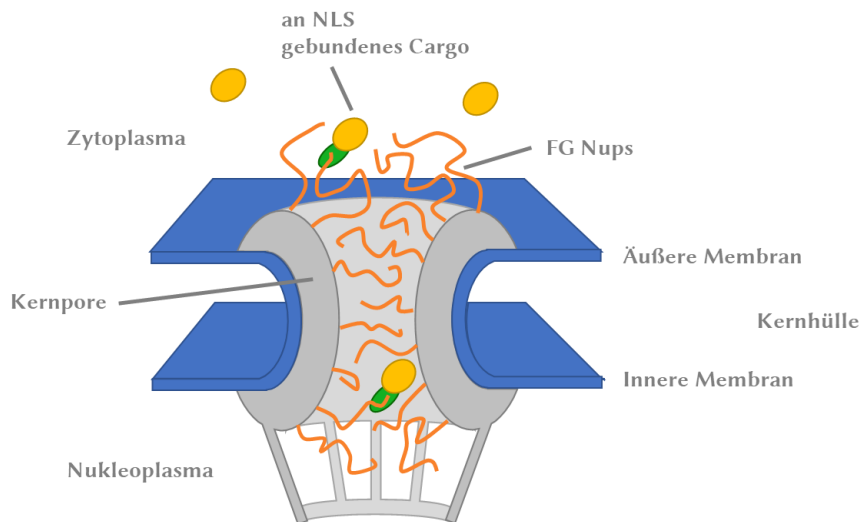


Abbildung 21: Schematische Darstellung einer Kernpore. Die Aufnahme in den Nucleus ist durch die Kernhülle räumlich begrenzt, sodass das Cargo nur durch die Kernporen in den Kern aufgenommen werden kann. Die Kernporen werden von den FG-Nups geschützt, die an Kernlokalisierungssignale (NLS) binden können und nach Bildung des Transportfaktors das Cargo in den Nucleus befördern. Nicht an NLS gebundene Makromoleküle werden mitunter nicht aufgenommen (Abbildung nach Strambio-De-Castillia et al.).^[145]

Die FG-Nups sind durchlässig für kleine Moleküle, Metaboliten und Ionen, allerdings werden Makromoleküle und Proteine (≥ 40 kDa) von ihnen abgehalten die Kernpore zu passieren. Um vom Zytoplasma in das Nukleoplasma (oder umgedreht vom Nucleus in das Zytosol) zu gelangen, müssen Makromoleküle an sogenannte Kernlokalisierungssignale (NLS) gebunden sein. Diese NLS wiederum binden an Importin α , welches als Adapterprotein selbst nur eine vermittelnde Rolle besitzt. Das Importin α bindet seinerseits an Importin β und bildet somit den eigentlichen für den Transport verantwortlichen Transportfaktor (**Abbildung 22**).^[146]

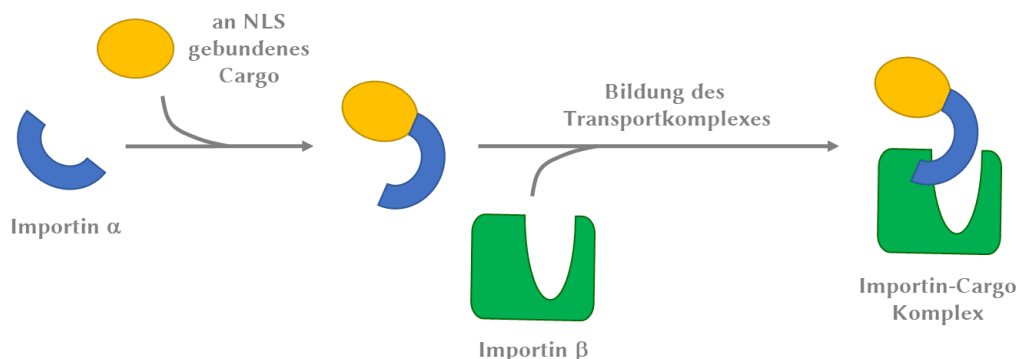


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Bildung des Importin-Cargo Komplexes. Importin α bindet an das NLS und diese Untereinheit bindet wiederum an Importin β (Abbildung nach Kabachinski et al.).^[146]

Die Struktur des Importin β besteht aus mehreren antiparallelen α -Helices, die die Ausbildung einer hydrophoben Tasche begünstigen. An diese können die Phenylalanin-Glycin Motive der *FG-Nups* binden, sodass der Transportfaktor durch die Poren geleitet werden kann.^[147] Die *FG-Nups* bestehen aus durchschnittlich 5-50 FG Motiven, welche durch ihre multivalent vorliegenden Bindungsstellen eine hohe Selektivität für die Transportfaktoren aufweisen, obwohl die einzelnen Bindungen mitunter nur K_D -Werte im mM-Bereich aufweisen. Durch diese Selektivität erfolgt ein schneller und effizienter Transport durch die Kernpore.^[148]

Die Bewegungsrichtung des Transports wird hierbei nicht durch die Pore selbst gesteuert, sondern hängt von einem Gleichgewicht des nukleär vorliegenden RanGTPs ab. In den Nukleus eintretende Importin-Cargo Komplexe werden durch RanGTP in ihre Einzelteile zerlegt, indem RanGTP selbst an Importin β bindet (**Abbildung 23**). Der RanGTP-Importin β Komplex wird anschließend durch die Kernpore in das Zytosol geschleust, wo er ebenfalls zerfällt. Das Importin β kann einen neuen Zyklus durchlaufen, während das Guanosintriphosphat unter Abspaltung eines Phosphatrests zu Guanosindiphosphat hydrolysiert wird. Da ein großer Überschuss an RanGTP im Nukleus vorliegt, wird weiter Importin β mitsamt des Cargos internalisiert, um das Gleichgewicht auszugleichen.^[146, 149]

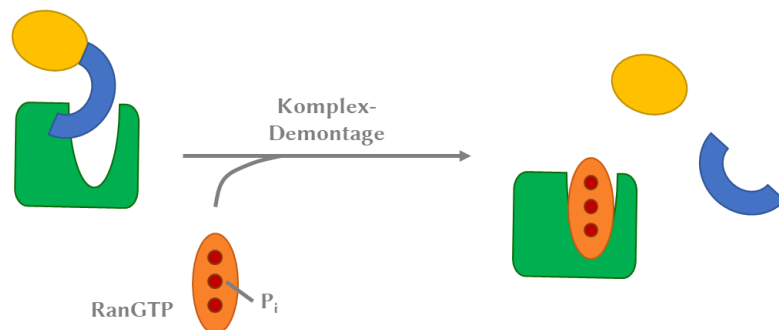


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Demontage des Transportkomplexes nach dem Transport durch die Kernpore. RanGTP bindet an Importin β , welches daraufhin den Importin α - Cargo Komplex freigibt. Dieser zerfällt in seine Bestandteile und das Cargo wird im Inneren des Nukleus freigesetzt (Abbildung nach Kabachinski et al.).^[146]

Wichtige Kernlokalisationssequenzen sind in **Tabelle 2** zu sehen. In ihrer Charakterisierung unterscheidet man zwischen klassischen und nicht-klassischen NLS. Diese Unterscheidung bezieht sich auf ihre Interaktionspartner bei der Bildung des Transportfaktors. Klassische NLS verwenden den oben beschriebenen Importin α/β Aufnahmeweg,^[150] während nicht-klassische NLS mitunter selbst an Importin β binden oder einen anderen Aufnahmemechanismus bevorzugen.^[151]

Weiterhin unterscheidet man zwischen einteiligen und zweiteiligen NLS, wobei bei Letzteren die Kernlokalisationssequenz durch einen etwa zehn Aminosäuren langen Linker getrennt voneinander vorliegt.

Tabelle 2: Häufig verwendete Kernlokalisierungssignale, ihre Sequenz, Charakteristika und Interaktionspartner bei der Aufnahme in den Nukleus.

<u>SEQUENZ</u>	<u>HERKUNFT</u>	<u>INTERAKTIONSPARTNER</u>	<u>CHARAKTERISIERUNG</u>
PKKKRKV ^[152]	SV40 großes T-Antigen	Importin α und β	einteilige, klassische NLS
KRPAATKKAGQA-KKKK ^[150]	Nukleoplasmin	Importin α und β	zweiteilige, klassische NLS
VQRKRQKLMP ^[153]	NF- κ b	Importin α 3 und α 1	Einteilige, nichtklassische NLS
RYLQTETNKVETYKE-QPLKTPGKKKKGKP ^[151]	PTHrP	Importin β	Nichtklassische NLS

Abschließend lässt sich sagen, dass die Verwendung von Kernlokalisierungssignalen als Transportvehikel für Makromoleküle gut geeignet ist, um diese in den Nukleus zu transportieren. Jedoch sollte hierbei beachtet werden, dass die meisten NLS nur schlechte zellpenetrierende Eigenschaften besitzen, sodass für die zelluläre Aufnahme mitunter ein anderer Mechanismus verwendet werden muss.^[134]

1.6. West-Nil-Virus und die NS2B-NS3 Protease

Das West-Nil-Virus (WNV) ist ein Virus der Gattung der Flaviviren aus der Familie der *Flaviviridae*. Die Gattung der Flaviviren beinhaltet insgesamt 53 Virusspezies und wird nach Art des Vektors, der die Viren von Wirt zu Wirt überträgt, in drei Gruppen aufgeteilt.

1. Durch Zecken übertragene Viren
2. Durch Stechmücken übertragene Viren
3. Flaviviren mit unbekanntem Vektor

Das West-Nil-Virus zählt zur zweiten Gruppe, zu welcher beispielsweise auch das Dengue-Virus (DENV), das Zika-Virus (ZIKV) und das Gelbfiebervirus (YFV) gehören. Die Übertragung des WNV erfolgt überwiegend durch afrikanische Stechmücken der Arten

Culex, *Aedes* und *Mansonia*. Die Verbreitung über Menschen oder andere Säugetiere ist wiederum weniger gegeben, da diese als Fehlwirte gelten. Dieses liegt an der niedriggradigen Virämie, also dem Vorhandensein von Viren im Blutkreislauf, bei Infektion von Säugetieren durch Stechmücken. Als wahrscheinlichere Übertragungsmöglichkeit des WNV gelten eher Organ-, Zell- oder Gewebetransplantationen, sowie Bluttransfusionen von infizierten Menschen. Weiterhin ist eine Übertragung während der Schwangerschaft auf das ungeborene Kind möglich.^[154]

Das West-Nil-Virus ist der Auslöser des West-Nil-Fiebers, einer Zoonose, die bei den meisten Infektionsfällen klinisch unauffällig verläuft. In 20 % der Fälle jedoch, löst sie eine fiebrige, Grippe-ähnliche Erkrankung aus, die aufgrund fehlender antiviraler Wirkstoffe nur symptomatisch behandelt werden kann. Besonders bei alten oder immunsuprimierten Menschen kann das West-Nil-Virus zu schwerwiegenden neuronalen Erkrankungen, wie Meningitis oder Enzephalitis führen (etwa 1 % der Fälle). Diese Erkrankungen werden unter dem Begriff *West Nile neurodegenerative diseases* zusammengefasst und weisen eine Letalität von 15 – 40 % auf.^[154]

Das Endemiegebiet des West-Nil-Virus liegt in den Tropen, jedoch kommt es dank Verbreitung beispielsweise durch Zugvögel mittlerweile weltweit vor. So konnte das West-Nil-Virus seit Anfang der 2000er auch vermehrt in Europa und Nordamerika identifiziert werden, wo es zumeist in den warmen Sommermonaten auftritt. Gerade in Europa war hier bislang eine Lokalisierung im südöstlichen Mittelmeerraum zu sehen (**Abbildung 24**). Allerdings konnte im Jahr 2018 ein rasanter Anstieg der gemeldeten, autochthonen WNV-Infektionsfälle gesehen werden, wobei sich die betroffenen Gebiete auch weiter nördlich als bisher bekannt erstreckten. So wurden im Jahr 2018 auch die ersten infizierten Tiere in Deutschland gemeldet. Vermutlich liegt die weitere Verbreitung des WNV Richtung Nordeuropa an den klimabedingten, steigenden Temperaturen in den Sommermonaten.^[154-155]

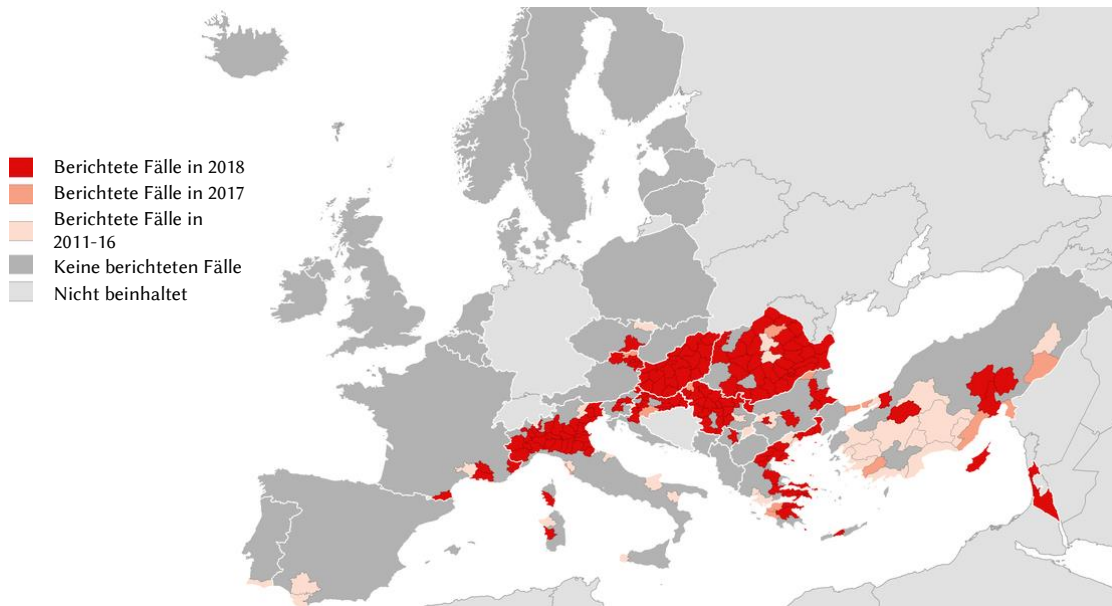


Abbildung 24: Verbreitung der West-Nil-Virus Infektion in Menschen nach betroffenen Gebieten in der EU/EEA und EU Nachbarländern (2011-2018). Die WNV Infektionen konzentrierten sich vor allem auf den südosteuropäischen Raum.^[155]

Die Zahl der gemeldeten, autochthonen Infektionsfälle stieg im Jahr 2018 in den EU/EEA-Staaten, sowie den EU-Erweiterungsländern auf 2083 registrierte Fälle an (**Abbildung 25**). Dieses ist ein starker Anstieg im Vergleich zu den vorherigen sieben Jahren, in denen insgesamt nur eine Anzahl von 1832 WNV-Infektionen gemeldet wurde. Weiterhin wurden Fälle von West-Nil-Virus Infektionen von Juni bis Dezember 2018 gemeldet, während in vergangenen Jahren zumeist eine Infektionszeit von Juli bis einschließlich Oktober gegeben war.^[155]

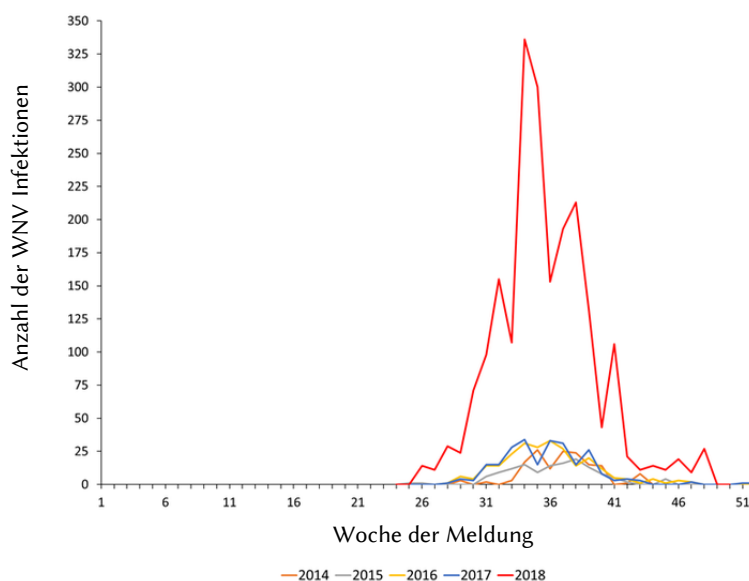


Abbildung 25: Anzahl der gemeldeten WNV Infektionen in EU/EEA und EU-Erweiterungsländern nach Woche der Meldung (2014-2018). Im Jahr 2018 hat die Anzahl der gemeldeten, autochthonen Infektionen ($n=2083$) im Vergleich zu den vorherigen Jahren ($n_{insg.} = 1832$) stark zugenommen.^[156]

Betrachtet man die Ausbreitung in den einzelnen EU/EEA- und EU-Erweiterungsländer, so sieht man, dass die Anzahl der gemeldeten Fälle in Griechenland und Serbien besonders hoch ist (**Abbildung 26**). Obwohl in Italien die absolute Zahl der Fälle höher ist, kam doch unter Einbeziehung der Gesamtbevölkerung nur etwa ein Kranker auf 100 000 Einwohner. In Griechenland waren es hier jedoch einer von 36 000 und in Serbien sogar ein Infizierter pro 17 000 Einwohner. Die Sterberate der an WNV-infizierten Menschen lag 2018 europaweit bei 8,7 %. Dieses entspricht etwa den Werten aus den vergangenen Jahren.^[155]

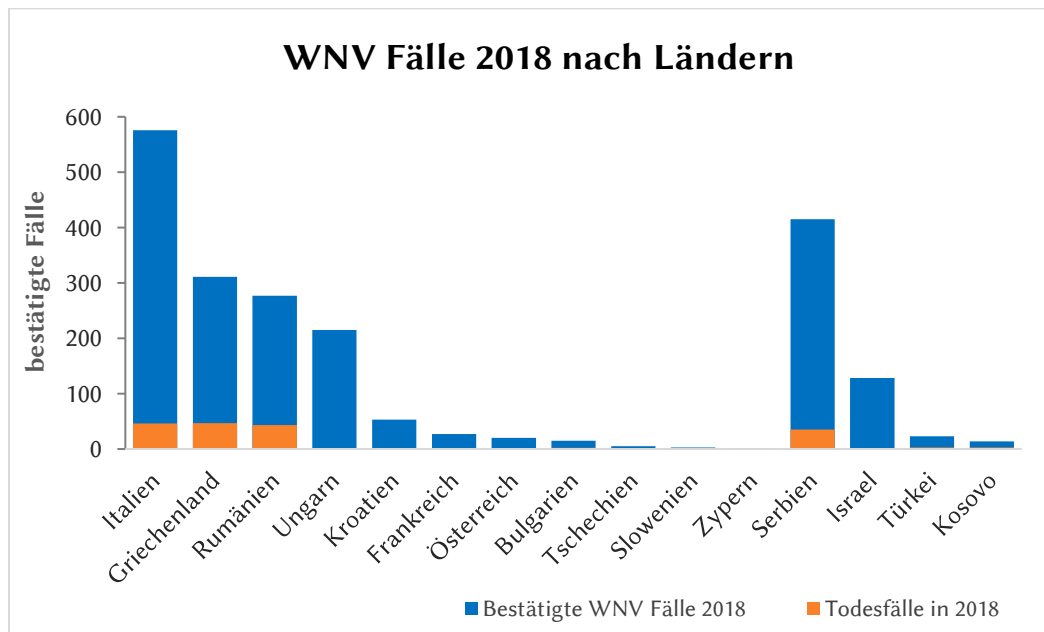


Abbildung 26: Gemeldete, autochthone WNV Fälle 2018 aufgeschlüsselt nach Ländern. Die meisten Fälle in EU-Staaten wurden in Italien, Griechenland und Rumänien gemeldet. In EU-Erweiterungsländern wurden die meisten Fälle in Serbien gemeldet (Daten entnommen aus ECDC Bericht^[156]).

Insgesamt ist somit die Verbreitung des West-Nil-Virus in der europäischen Bevölkerung noch sehr gering, allerdings sollte die tendenzielle Entwicklung aus den vergangenen Jahren, insbesondere in Anbetracht fehlender antiviraler Wirkstoffe, nicht aus den Augen gelassen werden.

Auf der Suche nach einem Wirkstoff für das West-Nil-Virus ist es von besonderer Bedeutung, den Aufbau und die virale Replikation des Virus zu verstehen. Das West-Nil-Virus ist ein relativ kleines, behülltes ss(+)-RNA-Virus von etwa 11 kb Länge.^[157] Flaviviren werden mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose in Wirtszellen aufgenommen (siehe auch Kapitel 1.5), wo die codierende Region des Genoms in das entsprechende Polyprotein übersetzt wird.^[158] Dieses Polyprotein besteht aus drei Strukturproteinen (Capsid (C), pre-Membran (pr)/Membran (M), sowie der Virushülle (*engl. envelope*, E)) und sieben

Nichtstrukturproteinen (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B und NS5) (**Abbildung 27**). Die Strukturproteine bilden hierbei das Viruspartikel, während die Nichtstrukturproteine für die virale Replikation sorgen.^[159]

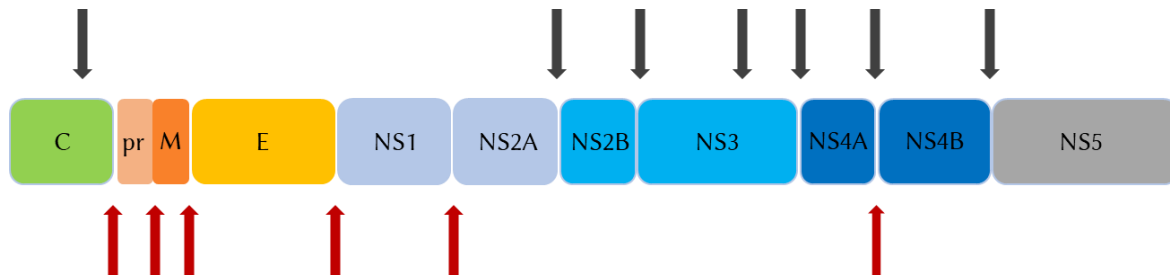


Abbildung 27: Das Genom des West-Nil-Virus ist aus drei Strukturproteinen und sieben Nichtstrukturproteinen aufgebaut. Das Polyprotein wird an den angegebenen Stellen von der NS2B-NS3 Protease (grau) und wirtseigenen Proteasen (rot) in die entsprechenden Proteine gespalten. Diese sorgen dann in der Wirtszelle für die Replikation des Virus (Abbildung nach Chappell et al.).^[160]

Das Polyprotein wird im weiteren Verlauf durch wirtseigene Proteasen und die virale, Trypsin-artige Serin-Protease NS3 in Kombination mit dem Kofaktor NS2B in die einzelnen Proteine gespalten. Hierbei erkennt die NS2B-NS3 Protease spezifisch dibasische Sequenzmotive (zumeist Lys-Arg, Arg-Arg oder Gln-Arg), an denen es C-terminal spaltet (**Abbildung 28**).^[161]

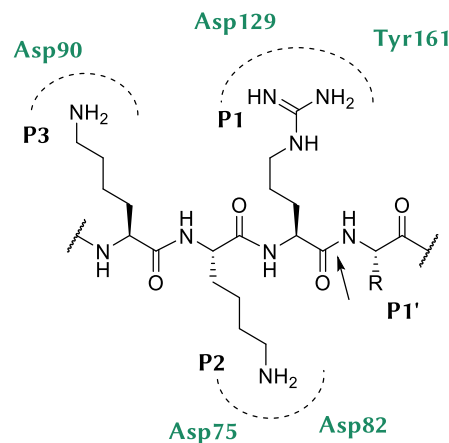


Abbildung 28: Schematische Darstellung eines Substrates und seiner Bindungsstellen mit der WNV NS2B-NS3 Protease (gestrichelte Linien). Die Protease erkennt dibasische Motive und spaltet in P1-Position C-terminal (Pfeil) zu diesen (Abbildung nach Lim et al.).^[162]

Hierbei spielt die sogenannte katalytische Triade des NS3-Proteins zwischen Ser135, His51 und Asp75 eine entscheidende Rolle (**Abbildung 29**).^[163-164] Das Substrat wird in P1-Position nukleophil durch Ser135 am Carbonylkohlenstoff angegriffen. Durch die Einwirkung von His51 als Base wird hierbei die Nukleophilie des Serins verstärkt. Die entstehende negative Ladung am tetraedrischen Intermediat wird durch das Oxyanionenloch

des Gly153 stabilisiert. Durch Abspaltung eines primären Amins wird das tetraedrische Intermediat in einen Ester überführt. Dieser wird hydrolytisch durch Wasser angegriffen, dessen Nucleophilie durch das Einwirken von His51 erhöht wird. Schließlich wird das Substrat als C-terminale Carbonsäure freigesetzt und der Zyklus kann mit einem neuen Substrat durchlaufen werden.^[164-165]

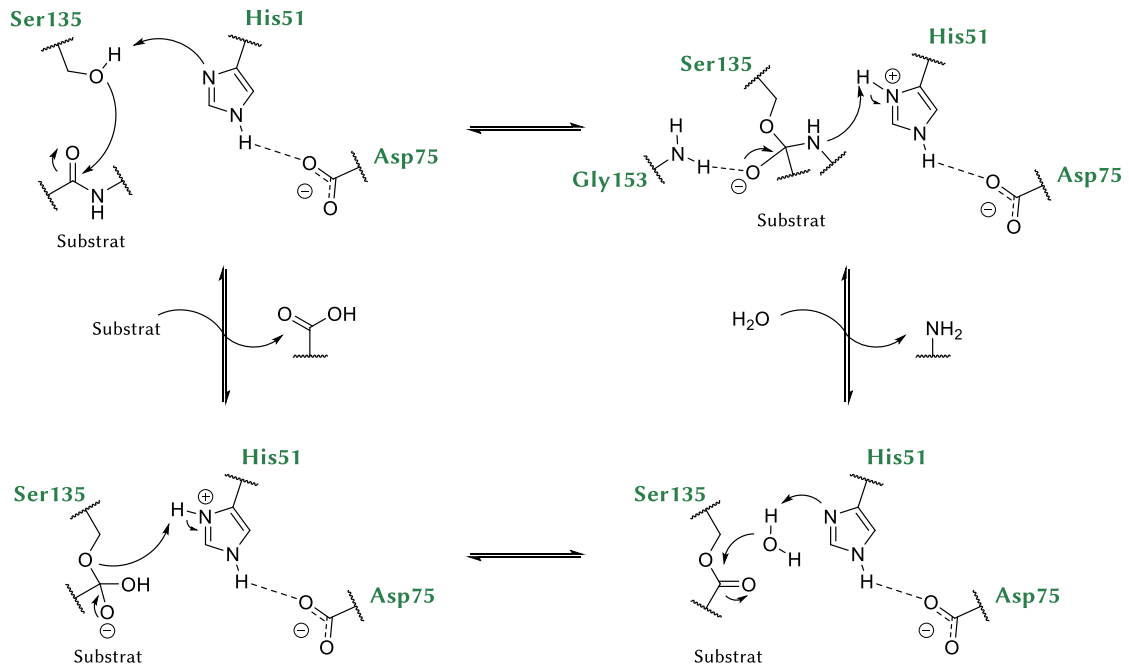


Abbildung 29: Schematische Darstellung der katalytischen Triade der NS2B-NS3 Protease der Flaviviren. Das zu spaltende Substrat wird von Ser135 nukleophil am P1-Carbonylkohlenstoff angegriffen. Hierbei wird die Nucleophilie des Serins durch His51, welches als Base wirkt, erhöht. Die entstehende negative Ladung am Substrat wird durch das Oxyanionenloch am Gly153 stabilisiert. Unter Abspaltung eines primären Amins und Anlagerung von Wasser wird schließlich das Substrat als C-terminale Carbonsäure freigesetzt (Abbildung nach da Silva-Júnior).^[165]

Es konnte von Chambers *et al.* gezeigt werden, dass die proteolytische Aktivität der NS2B-NS3 Protease für die Verbreitung des Virus essentiell ist.^[166] Somit scheint die Inhibition dieser Protease ein geeignetes Target für die Entwicklung eines antiviralen Wirkstoffs zu sein. Durch die hohe Sequenzkonservierung innerhalb der Flaviviren könnte ein WNV-Wirkstoff gegebenenfalls auch gegen andere Viren des Genus wirksam sein.

Die Synthese von NS2B-NS3 Inhibitoren erwies sich bis jetzt jedoch als schwierig, da das Enzym eine flache und hydrophobe katalytische Tasche aufweist. Aus diesem Grund wurde vorwiegend auf peptidomimetische Inhibitoren zurückgegriffen, die das Substrat imitieren und somit in Konkurrenz mit diesem treten würden. Die bislang potentesten Inhibitoren wurden von der Steinmetzer Gruppe synthetisiert. Diese weisen in P1-Position decarboxylierte Argininmimetika und in P4-Position eine Dichlor-substituierten

Phenylacetylgruppe auf (**Abbildung 30**).^[1] Hierbei ergab die P1-Modifizierung mit einem Cyclohexylguanidinium-Substituenten einen K_i -Wert von 1,2 μM . Die P4-Modifizierung brachte sogar eine noch stärkere Substrataffinität mit sich, sodass ein K_i -Wert von 450 nM erhalten wurde. Bei Kombination der beiden Modifizierungen gelang es Hammamy *et al.* einen K_i -Wert von 120 nM zu erreichen. Eine antivirale Inhibition *in vivo* konnte bislang jedoch nicht nachgewiesen werden. Es ist naheliegend, dass eine mögliche geringe Zellpermeabilität der Peptidomimetika hierbei ausschlaggebend ist.

Die Substanzen bieten eine geeignete Basis für weitere Ansätze zur Wirkstoffentwicklung und sollen daher im weiteren Verlauf der Arbeit, unter Einbeziehen der Dextrankonjugate, untersucht werden.

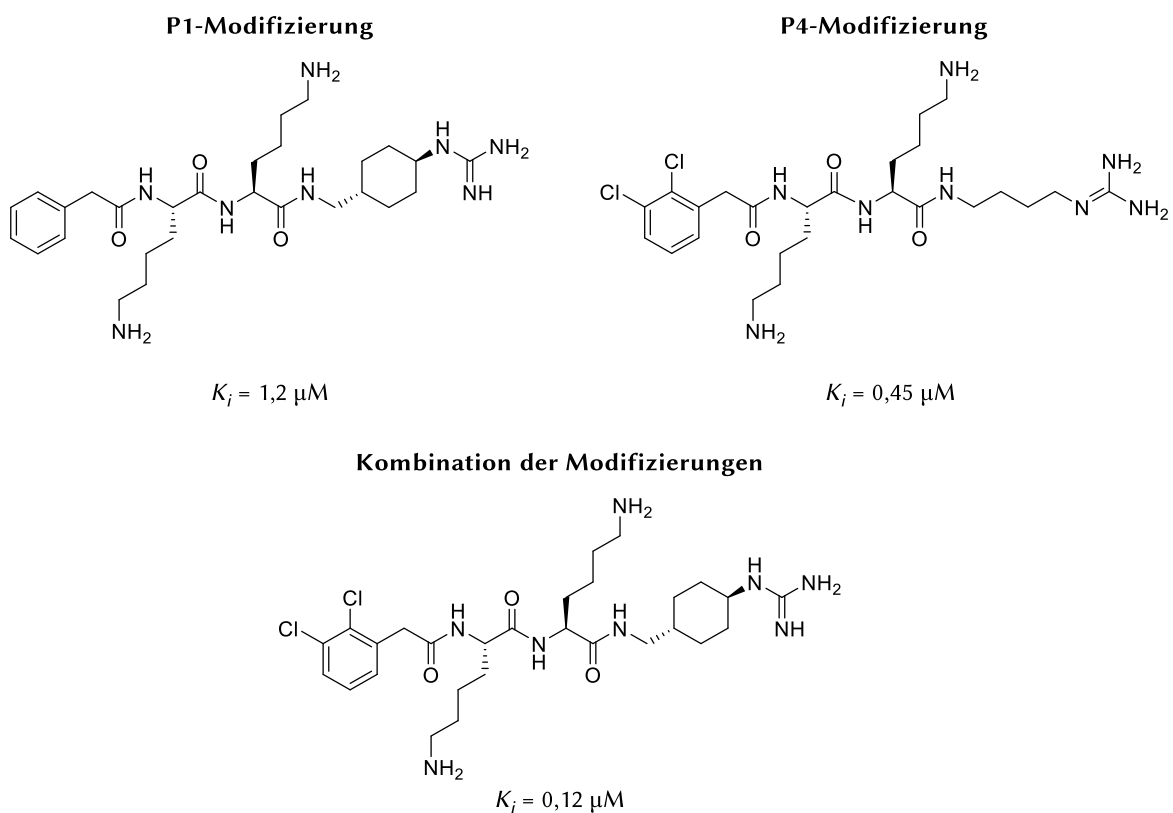


Abbildung 30: Vielversprechende Modifikationen in P1- und P4-Position ergeben potente Inhibitoren für die NS2B-NS3 Protease.

2. Zielsetzung

Peptide können oft aufgrund ihrer geringen Zellpermeabilität und ihrer Proteolyseempfindlichkeit nicht als intrazelluläre Inhibitoren eingesetzt werden. Jedoch weisen sie durch ihrer Vielseitigkeit ein großes Potential als Inhibitoren für Protein-Protein Interaktionen auf. Ziel dieser Arbeit war die Synthese und funktionelle Untersuchung von peptidischen PPI-Inhibitoren, die biokompatible Dextrane als Grundgerüste verwenden sollten. Hierbei sollten Dextrankonjugate als Instrumente eingesetzt werden, um aktive Peptide in Zellen transportieren zu können und sie dort zu untersuchen. Die geringe Zellpermeabilität der Peptide sollte durch Konjugation mit zellpenetrierenden Peptiden gesteigert werden. Weiterhin sollte eine mögliche Affinitätssteigerung durch multivalente Präsentation der Inhibitoren auf dem Dextran untersucht werden. Nach Etablierung der Konjugatsysteme sollte ihr inhibitorischen Effekt *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

Bei den in dieser Arbeit ausgewählten Zielstrukturen handelt es sich um die Tandem-WW-Domänen des mRNA-Splicingproteins FBP21 und die West-Nil-Virus Protease NS2B-NS3.

2.1. Inhibitoren der Tandem-WW-Domänen des FBP21

Der Prozess des mRNA-Splicings ist ein integraler Teil der Genexpression des Menschen. Sie ist ein Abschnitt der Prozessierung der mRNA und bereitet diese für die Translation in die entsprechenden Proteine bei der Proteinbiosynthese vor. Dieser hochkomplexe Prozess wird von hunderten Proteinen gesteuert, katalysiert und beeinflusst. Er ist in seiner Gänze noch nicht komplett verstanden. Eines dieser beteiligten, jedoch bislang nur wenig erforschten Proteine ist das FBP21, welches zwei Interaktionsdomänen, sogenannte Tandem-WW-Domänen aufweist. Diese Domänen interagieren insbesondere mit Prolin-reichen Sequenzen und scheinen für die Interaktion verschiedener Splicingfaktoren im pre-katalytischen Komplex (Komplex B des Splicingzykluses) verantwortlich zu sein. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Tandem-WW-Domänen des FBP21 auf das alternative Splicing Einfluss nehmen. Die genauen Interaktionsmechanismen des FB21 im Splicingzyklus sind allerdings noch nicht hinreichend untersucht. Um weiterführende

Untersuchungen zur Rolle des FBP21 im Splicingzyklus durchführen zu können, ist es somit von Bedeutung einen potenten Inhibitor für die Tandem-WW-Domänen des FBP21 zu synthetisieren. Dieser könnte somit für die Eliminierung des FBP21 aus dem Splicingzyklus sorgen und somit einen Rückschluss auf dessen Aufgaben liefern.

Die Adressierung intrazellulärer Zielstrukturen ist aufgrund der Vielzahl an möglichen Interaktionspartnern besonders problematisch. Dieses Problem wird insofern noch verstärkt, dass das FBP21 ein zu großen Teilen intrinsisch ungeordnetes Protein ist und nur die Tandem-WW-Domänen übergeordnete β -Faltblattstrukturen aufweisen. Die Interaktion der Tandem-WW-Domänen mit Prolin-reichen Sequenzen ist bekannt und somit sollten diese als potentielle Inhibitoren untersucht werden. In der Literatur sind dennoch bislang nur wenige Inhibitoren der Tandem-WW-Domänen des FBP21 bekannt, wobei einige multivalente Systeme zum Einsatz kommen. Koschek *et al.* untersuchten in Vorarbeiten die Bindungsaffinitäten mehrerer Peptid-Polymer Konjugate, die mit der Prolin-reichen Sequenz CGPPPRGPPPR ($K_D > 1$ mM) gekuppelt waren. Hierbei wurde bei der Verwendung von pHPMA und hyperverzweigtem Polyglycerol (hPG) als Polymergrundgerüst eine Aggregatbildung gesehen. Die K_D -Werte lagen hier bei unterschiedlicher Peptidbeladung im Bereich zwischen 3,3 – 7,0 μ M. Bei Verwendung von Dextrankonjugaten konnte die Bindungsaffinität noch weiter gesteigert werden ($1,2 \pm 0,7$ μ M). Hierfür wurden sechs Funktionspeptide bei einer Beladungsdichte von 10 % auf das Dextrangrundgerüst gekuppelt. Die Dextrankonjugate waren im Vergleich zu den pHPMA- und hPG-Konjugaten gut löslich und konnten dank ihrer linearen Konformation bivalent mit dem FBP21 interagieren.^[26] Weiterhin zeigten Henning *et al.* am Beispiel eines hPG-Konjugats erstmals die Effektivität des affinen Peptids WPPPPRVPR als Inhibitor für die Tandem-WW-Domänen des FBP21. Dieses wies in ungebundener Form einen K_D -Wert von 155 ± 18 μ M für die WW1-Domäne und einen K_D -Wert von $87,0 \pm 3,4$ μ M für WW2 auf. Die Verwendung von multivalenten hPG-Konjugaten lieferte eine Verbesserung der Bindungsaffinität auf $17,6 \pm 0,02$ μ M.^[99]

In dieser Arbeit sollten, aufbauend auf den Ergebnissen von Koschek und Henning, Peptid-Dextrankonjugate synthetisiert werden, welche die Prolin-reiche Sequenz WPPPPRVPR als Funktionspeptid verwenden. Ausgehend von der besseren Bindungsaffinität des Peptids und des vielversprechenden Bindungsverhaltens der Dextrankonjugate, sollten möglichst potente Peptid-Dextrankonjugate synthetisiert werden. Hierfür sollte der Einfluss unterschiedlicher homomultivalenter Beladung auf die Bindungsaffinitäten der Konjugate zu den Tandem-WW-Domänen des FBP21 *in vitro* untersucht werden.

Da in der zuvor erwähnten Literatur nur das Bindungsverhalten der Konjugate untersucht wurde, sollte in der vorliegenden Arbeit weiterführend auch die Funktionalität gegenüber FBP21 *in vitro* und *in vivo* bestimmt werden. Hierfür sollte durch Zuhilfenahme eines zellpenetrierenden Peptids die Zellgängigkeit der Konjugate induziert und mikroskopisch untersucht werden. Da FBP21 in den *nuclear speckles* im Zellkern vorliegt, sollte zusätzlich durch Verwendung einer Kernlokalisationssequenz die nukleare Aufnahme ermöglicht werden, um eine potentielle Inhibition *in vivo* zu ermöglichen. Zusätzlich sollte die Funktionalität der FBP21-Inhibitoren anhand eines *in vitro* Splicingassays untersucht und im Vergleich mit einer modifizierten, nicht-bindenden Peptidsequenz evaluiert werden.

Wie bereits erwähnt, können intrazelluläre Inhibitoren mit einer Vielzahl an Zielstrukturen interagieren. Somit sollten abschließend potentielle Interaktionspartner der Konjugate mit Hilfe eines Pulldown-Assays bestimmt und die Interaktion der Konjugate mit FBP21 in Konkurrenz mit anderen Proteinen untersucht werden.

Die durchgeführten Arbeiten wurden in Kooperation mit Miriam Bertazzon (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christian Freund, Freie Universität Berlin) durchgeführt und ihr Anteil an der Bearbeitung wurde in den einzelnen Kapiteln entsprechend gekennzeichnet.

2.2. Inhibitoren für die West-Nil-Virus Protease NS2B-NS3

Als weitere Zielstruktur für die Inhibierung mittels multivalenter Peptid-Dextran Konjugate wurde die West-Nil-Virus (WNV) Protease NS2B-NS3 ausgewählt. WNV ist ein durch Stechmücken übertragener Flavivirus, der, obwohl in Afrika beheimatet, mittlerweile auf der ganzen Welt vorkommt. Die Entwicklung antiviraler Wirkstoffe gestaltete sich bislang schwierig. Jedoch konnten in den letzten Jahren einige peptidomimetische Inhibitoren entwickelt werden, die ein großes Potential aufweisen. Eine der vielversprechendsten Klassen von Inhibitoren stammt dabei von Hammamy *et al.*. Deren verwendete *trans*-(4-Guanidinium)cyclohexylmethylamid (GCMA)-Argininmimetika erreichten bislang K_i -Werte zwischen 0,12 – 1,2 μM .^[1] Eine Inhibition *in vivo* konnte bislang jedoch nicht nachgewiesen werden. Dieses könnte durch eine möglicherweise geringe Zellpermeabilität der Peptidomimetika verschuldet sein.

In dieser Arbeit sollte die Frage der Zellgängigkeit der GCMA-tragenden Peptidomimetika geklärt und die antivirale Inhibition gegenüber dem West-Nil-Virus und den

strukturverwandten Dengue- und Zika-Viren *in vivo* untersucht werden. Hierfür sollten Dextranskonjugate der Peptidomimetika synthetisiert werden, die unter Verwendung eines zellpenetrierenden Peptids die Aufnahme in Zellen begünstigen sollten. Weiterhin sollte bestimmt werden, ob eine multivalente Präsentation der Peptidomimetika eine Affinitätssteigerung der Inhibitoren zur WNV Protease hervorrufen können. Dieses sollte durch Bestimmung der IC_{50} - und K_i -Werte anhand von kompetitiven Aktivitätsassays mit Fluorophor-haltigen Substraten untersucht werden.

Die durchgeführten Arbeiten wurden in Kooperation mit Lisa Redl und Dr. Christoph Arkona (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Rademann, Freie Universität Berlin), sowie Stephanie Kallis (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Bartenschlager, Universität Heidelberg) und Dr. Christoph Nitsche (Australian National University, Canberra) umgesetzt. Ihr Anteil an der Bearbeitung wurde in den einzelnen Kapiteln entsprechend gekennzeichnet.

3. Ergebnisse und Diskussion: Inhibitoren der Tandem WW-Domänen des FBP21

3.1. Peptid-Dextran Konjugate

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Inhibierung und funktionelle Untersuchung der gewählten Zielstrukturen, der Tandem-WW-Domänen des FBP21 und der West-Nil-Virus Protease NS2B-NS3, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durchgeführt werden sollte. Hierfür wurden 35 multivalente Peptid-Dextran Konjugate **1** synthetisiert (**Abbildung 31**) und mittels unterschiedlicher Spektroskopie- und Chromatographieverfahren analysiert (Kapitel 3.1.1- 3.3.). Die genauen Spezifikationen der entsprechenden Konjugate können dem Konjugatbeladungs-Inhaltsverzeichnis (Seite X) entnommen werden.

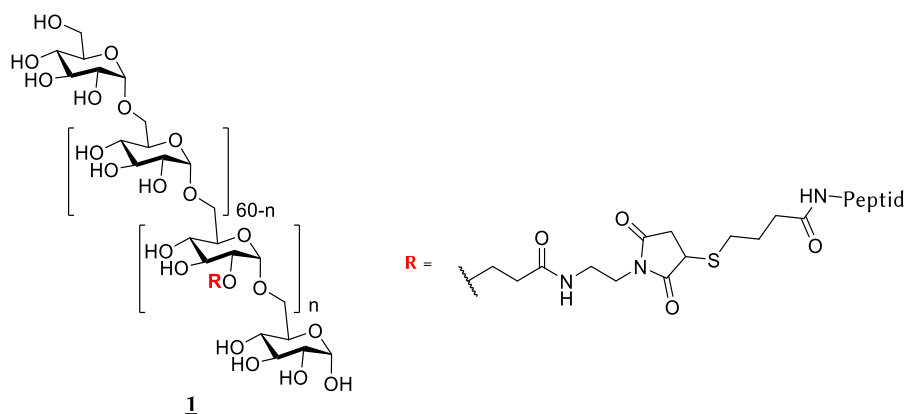


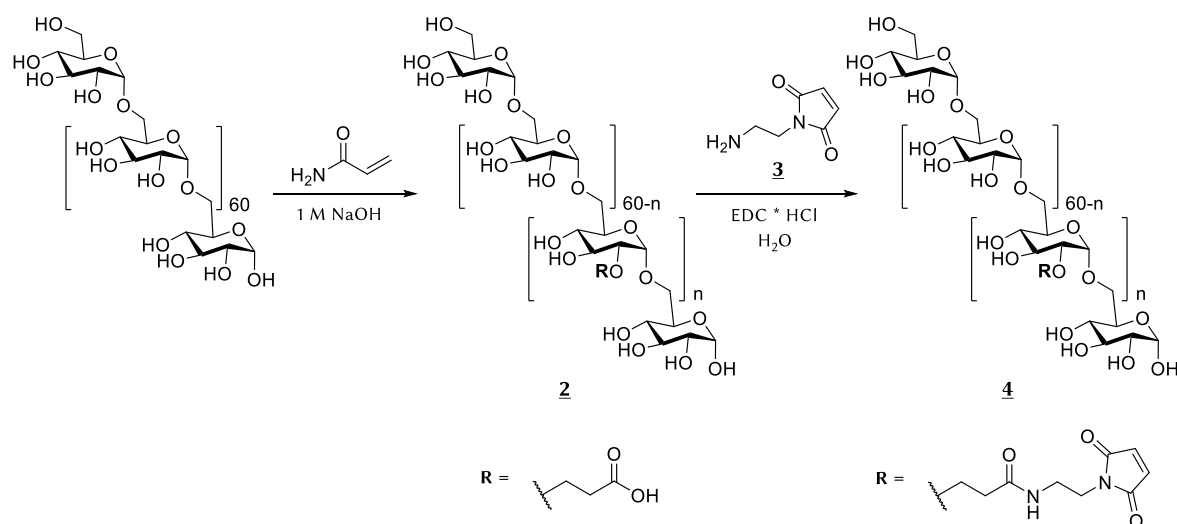
Abbildung 31: Schematische Darstellung eines Peptid-Dextran Konjugats **1**. Durch Verwendung verschiedener Peptidspezies können vielseitige Produkte entstehen.

Bei der modularen Synthese der Konjugate wurde darauf geachtet, dass die zum Teil hochkomplexen Produkte durch Verwendung unkomplizierter Synthesestrategien in guten Ausbeuten erhalten werden konnten. Somit wurde eine Vielzahl von Konjugaten mit unterschiedlichen Beladungen an Funktions- und zellpenetrierenden Peptiden erhalten. Diese konnten anschließend in *in vitro* Studien und zellbasierten Assays auf ihre Funktionalität untersucht werden (Kapitel 1.1 – 4.2.).

3.1.1. Modifizierung und Analytik des Dextrangrundgerüsts

Als Startmaterial der Konjugationen sollte das Maleinimiddextran **4** verwendet werden, dessen Synthese bereits von Martin Richter (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Rademann, FMP Berlin) etabliert und in dieser Arbeit teilweise angepasst wurde.^[167] Das Maleinimiddextran **4** kann in zwei Stufen aus käuflich erworbenem Dextran (MW 9000 – 11000 g/mol), welches aus *Leuconostoc mesenteroides* gewonnen wird, hergestellt werden

(siehe **Schema 1**). Dextrane bestehen aus Glukoseuntereinheiten, die laut Hersteller zu etwa 95% über α -D-1,6-glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Kettenverzweigungen in α -1,3 Position kommen im Vergleich selten vor und sind in der Regel nur wenige Glukoseeinheiten lang.^[168] Diese Verzweigungen konnten allerdings in dem hier verwendeten Dextran NMR-spektroskopisch nicht detektiert werden. Somit wird davon ausgegangen, dass es sich hierbei um ein ausschließlich lineares Dextran handelt.



Schema 1: Zweistufige Synthese des Maleinimidextrans **4** aus käuflich erworbenem Dextran (MW 9000-11000 g/mol). Der Substituierungsgrad des Maleinimidextrans **4** wird hierbei durch die verwendete Konzentration des Acrylamids bei der Synthese des Carboxyethyl dextrans **2** bestimmt.

Zu Beginn der Synthese erfolgte eine Addition des Alkoholats des Dextrans an das elektrophile β -C-Atom des Acrylamids. Hierbei wurde selektiv in C2-Position der Glukosebausteine alkyliert. Die anschließende basische Hydrolyse der Amidfunktion lieferte das Carboxyethyl dextran **2** in guten Ausbeuten. Dieses konnte schließlich durch EDC-vermittelte Kupplung mit *N*-(2-Aminoethyl)maleinimid **3** zum Maleinimidextrans **4** umgesetzt werden. Durch Dialyse mittels Salzsäure wurden die Carbonsäuren in ihrer protonierten Form erhalten. Der Funktionalisierungsgrad des Carboxyethyl dextrans **2** und somit auch des Maleinimidextrans **4** ist von der Konzentration des verwendeten Acrylamids im ersten Reaktionsschritt abhängig (siehe Kapitel 6.7, **Tabelle 24**).^[167]

Dieser Funktionalisierungsgrad kann für das Carboxyethyl dextran **2** sowohl mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, als auch mittels Titration analysiert werden. Im Allgemeinen lieferten beide Methoden eine gute Übereinstimmung. Bei der Bestimmung mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie wurde, wie bereits von Martin Richter beschrieben, das Signal bei 4,96 - 5,13 ppm als Integrationsstandard verwendet (**Abbildung 32**).^[8] Dieses gehört zu

den anomeren Protonen der Glukoseeinheiten des Dextrans und kann bei einer durchschnittlichen Molekularmasse von 10 000 g/mol und einer Molekularmasse von 162,14 g/mol pro Wiederholungseinheit des Glukosebausteins nach Gleichung (10) auf 62 Protonen integriert werden.

$$N_{\text{Glukoseeinheiten}} = \frac{M_{\text{Dextran}}}{M_{\text{Glukosebaustein}}} = \frac{10\,000 \text{ g/mol}}{162,14 \text{ g/mol}} \approx 62 \quad (10)$$

Das Signal bei 4,96 ppm bezieht sich hierbei auf eine unsubstituierte Glukoseeinheit, während das Signal bei 5,13 ppm durch eine in C2-Position substituierte Glukoseeinheit hervorgerufen wird. Durch Integration des Signals bei 2,67 ppm kann im Anschluss der Substitutionsgrad des Dextrans erhalten werden, da dieses die Protonen der Methylengruppe (C2') in direkter Nachbarschaft zur Carboxylfunktion darstellt. Das Signal der zweiten Methylengruppe (C3') liegt unter den Zuckersignalen und kann somit nicht quantitativ ausgewertet werden.^[167]

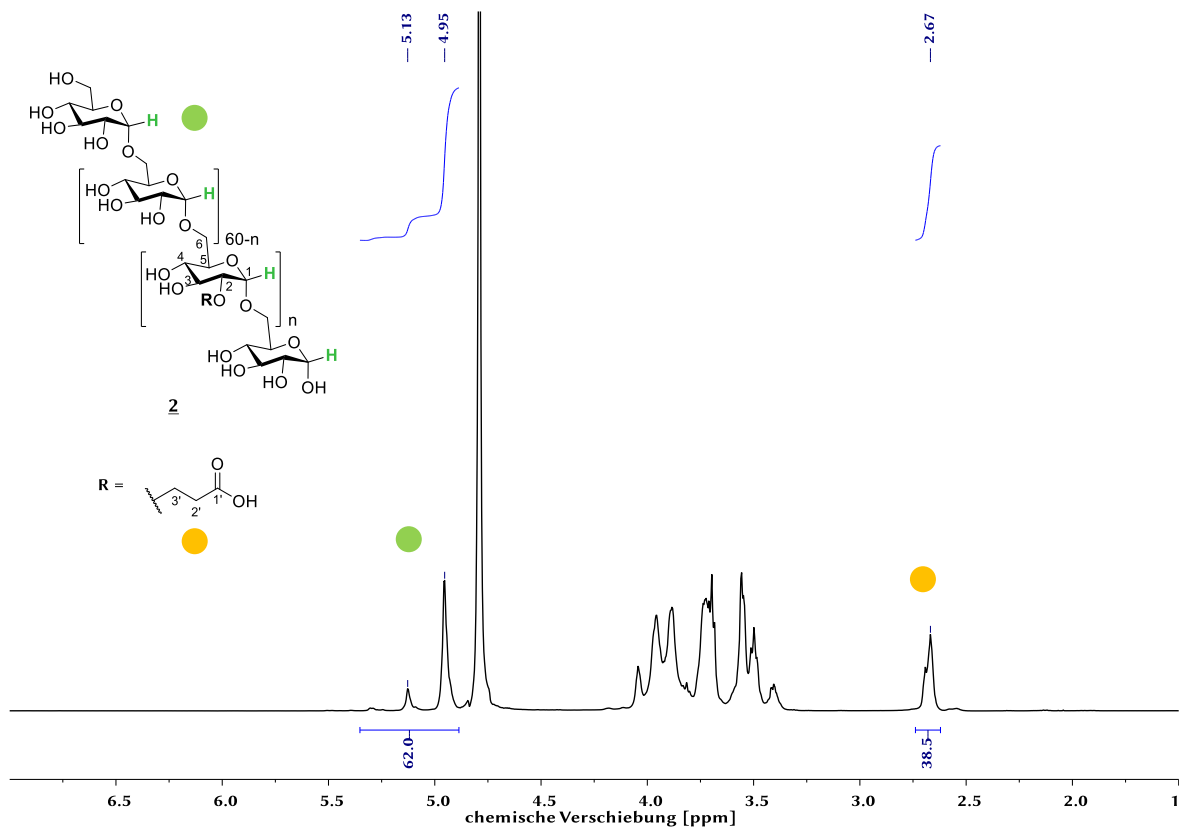


Abbildung 32: ^1H -NMR Spektrum von Carboxyethyl dextran **CED1** (**2**) (700 MHz, D_2O). Durch Benutzen des Signals bei 5,13 – 4,96 ppm (grün) als Integrationshilfe kann die Beladung des Dextrans mit Carboxyethylsubstituenten (Signal bei 2,67 ppm, gelb) bestimmt werden. Es wurden 19,3 Carboxyethylsubstituenten pro Dextran gekuppelt.

Für die Bestimmung des Substitutionsgrades mittels Titration wurde das Carboxyethyl-dextran (CED) in Wasser gelöst und gegen 0,1 M Natronlauge titriert. Als Indikator wurde hierbei Phenolphthalein verwendet. Das Verhältnis von Carboxyethyl-substituierten zu unsubstituierten Glukoseeinheiten kann nach Gleichung (11) erhalten werden. Durch Multiplizieren mit der Gesamtanzahl der Glukoseeinheiten (siehe Gleichung (12)) kann die Anzahl der CE-substituierten Glukoseeinheiten pro Dextran erhalten werden.^[167] Die Ergebnisse der Titration stimmten im Allgemeinen sehr gut mit denen aus der NMR-Spektroskopie überein (siehe Kapitel 6.7, **Tabelle 23**). Im hier angegebenen Beispiel konnte mittels Titration eine Beladung von 19,0 Carboxyethylsubstituenten errechnet werden, während die ¹H-NMR-Spektroskopie einen Wert von 19,3 Substituenten lieferte.

$$R_{CE: unsub.G.} = \frac{n(NaOH) \cdot M(unsubst. Glukose)}{m(CED) - [n(NaOH) \cdot \Delta M(CE)]} \quad (11)$$

$$N(CE) = 62 \cdot R_{CE: unsub.G.} \quad (12)$$

mit: $R_{CE: unsub.G.}$: Verhältnis subst. zu unsubst. Glukosebausteinen
 $n(NaOH)$: Stoffmenge der verbrauchten Natronlauge [mol]
 $M(unsubst. Glukose)$: Molmasse der unsubstituierten Glukose –
 einheit [g/mol]
 $m(CED)$: Einwaage Carboxyethyl-dextran [g]
 $\Delta M(CED)$: Differenz der Molmasse zwischen unsubst. und subst.
 Glukoseeinheit [58,03 g/mol]
 $N(CE)$: Anzahl Carboxyethyl – subst. Glukosebausteine

Analog zur Auswertung des Carboxyethyl-dextrans **2** konnte das Maleinimiddextran **4** mittels ¹H-NMR-Spektroskopie analysiert werden (**Abbildung 33**). Hierbei können die Signale für das olefinische Maleinimid bei 6,91 ppm klar erkannt werden. Das zuvor ausgewertete Signal für die Methylengruppe in C2'-Position (2,50 ppm) ist nun geringfügig Hochfeld-verschoben und überlagert sich leicht mit dem Signal der noch verbleibenden unsubstituierten Carboxyethylfunktion (2,59 ppm), sodass nicht exakt die gleichen Integrale bei beiden Signalen (6,91 und 2,50 ppm) erhalten werden. Für die weitere Auswertung wurde daher auf das Maleinimid-signal zurückgegriffen, welches zuverlässige Werte lieferte. Im Fall des vorliegenden Maleinimiddextrans **4** erfolgte die Kupplung nicht vollständig, sodass 11,9 Maleinimidsubstituenten und etwa 7,9 unsubstituierte Carboxyethyl-

funktionen vorlagen. Für die weiterführende Konjugatreaktion ist dieses nicht ausschlaggebend, da die hierbei verwendete Maleinimid-Thiol Reaktion sehr spezifisch verläuft. Eine vollständige Kupplung kann durch den Einsatz zusätzlicher Äquivalente *N*-(2-Aminoethyl)maleinimid **3** erhalten werden.

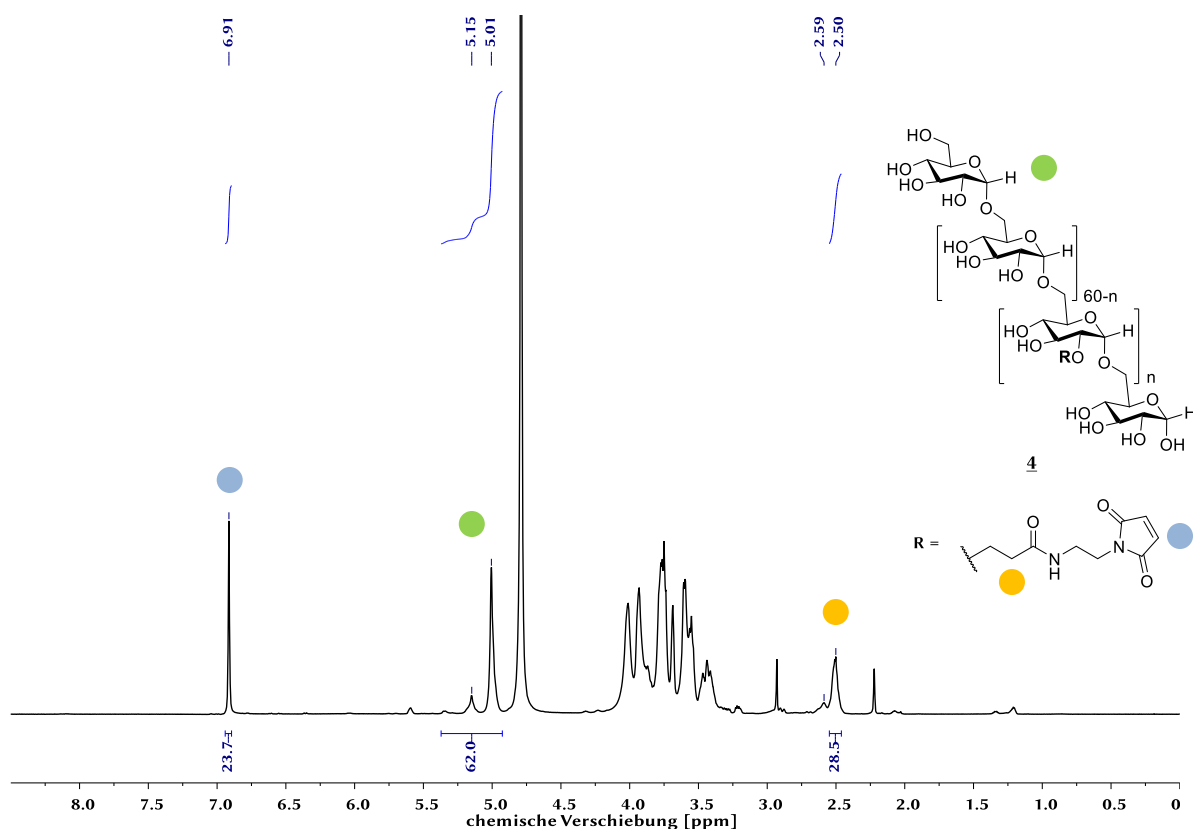
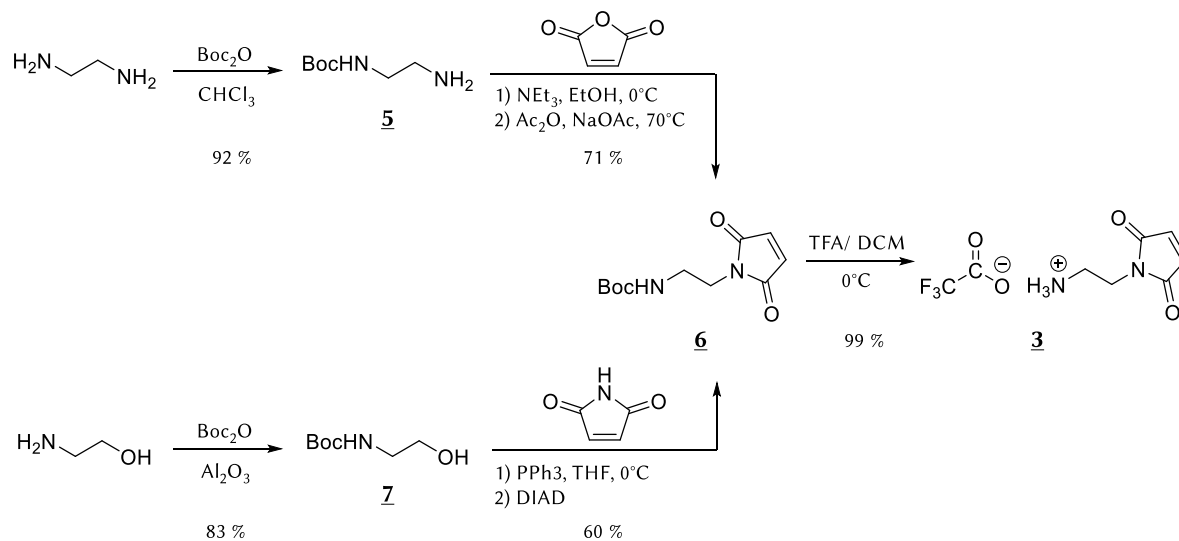


Abbildung 33: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Maleinimiddextran **MID1** (**4**) (700 MHz, D_2O). Zum Auswerten der Beladung wurde das Maleinimidsignal (blau) bei 6,91 ppm verwendet. Das vorliegende Dextran weist 11,9 Maleinimide pro Dextran auf.

Der Maleinimidbaustein **3**, welcher für die Synthese des Maleinimiddextrans **4** benötigt wird, wurde auf zwei verschiedenen Synthesewegen hergestellt (**Schema 2**). Hierbei wurde zum einen einfach *N*-Boc-geschütztes Ethylendiamin **5** in einer nukleophilen Substitution mit Maleinsäureanhydrid zum Boc-geschützten (2-Aminoethyl)maleinimid **6** umgesetzt.^[167] In diesem Fall erfolgte der nukleophile Angriff des Ethylenamins unter Ringöffnung am Maleinimid. Der Ringschluss wurde anschließend durch Erhitzen unter Rückfluss in Acetanhydrid vollbracht. Die Aufarbeitung des Rohproduktes erfolgte durch ausgiebiges Entfernen des Acetanhydrids mittels wässriger Extraktion und anschließender Neutralisation mit NaHCO_3 -Lösung. Dennoch konnte das Produkt **3** nur als ölige Substanz erhalten werden, welches die Vermutung nahelegt, dass noch Acetanhydrid-

Rückstände im Produkt enthalten waren. Das Produkt konnte in zwei Schritten mit einer Gesamtausbeute von 65 % hergestellt werden.

Zum anderen wurde *N*-Boc-geschütztes Ethanolamin **7** mit Maleinimid in einer Mitsunobu-Reaktion zum Boc-geschützten (2-Aminoethyl)maleinimid **6** umgesetzt. Dieser zweite Syntheseweg bot den Vorteil kürzerer Reaktionszeiten und einer unkomplizierten Aufarbeitung. Hierfür wurde zunächst Ethanolamin mit Di-*tert*-Butyldicarbonat auf Aluminiumoxid zum *N*-Boc-geschützten Ethanolamin **7** umgesetzt.^[169] Dieses wurde nach Filtration und anschließendem Ausschütteln mit 10 %-iger Zitronensäure in 83 % Ausbeute erhalten. Weiterführend wurde das Ethanolamin **7** unter Verwendung von Maleinimid, Triphenylphosphan und DIAD zum *N*-Boc-(2-Aminoethyl)maleinimid **6** unter allgemeinen Mitsunobu-Bedingungen umgesetzt.^[170] Die Ausbeute betrug hierbei 60 %. Das Produkt wurde hier, im Gegensatz zur ersten Syntheseroute, als farbloser Feststoff erhalten. Die zweite Syntheseroute wurde trotz ihrer geringeren Gesamtausbeute (50 % anstatt 65 %) aufgrund ihrer kurzen Reaktionszeiten und einfachen Reaktionshandhabung präferiert. Die abschließende Boc-Entschützung verlief quantitativ und lieferte das *N*-(2-Aminoethyl)maleinimid **3** als wasserlösliches TFA-Salz.



Schema 2: Synthese des *N*-Boc-(2-Aminoethyl)maleinimids **6** auf zwei verschiedenen Synthesewegen ausgehend von Ethylendiamin (65 % Gesamtausbeute)^[167] oder Ethanolamin (50 % Gesamtausbeute)^[169-170]. Anschließend Boc-Entschützung liefert das Produkt **3** als wasserlösliches TFA-Salz.

3.1.2. Synthese der verwendeten Peptide und Fluorophore

Durch ihren modulare Aufbau sind die Dextrankonjugate sehr vielseitig und können sowohl für die geplanten *in vitro*, als auch *in vivo* Studien zur Untersuchung der Tandem-WW-Domänen des FBP21 eingesetzt werden (Kapitel 2.1).

In Vorarbeiten von Koschek *et al.* wurde das Prolin-reiche Peptid CGPPPRGPPPR ($K_D > 1000 \mu\text{M}$) als Funktionspeptid zur Inhibition der Tandem-WW-Domänen verwendet. Bei der Verwendung von Dextrankonjugaten konnte der K_D -Wert auf $1,2 \pm 0,7 \mu\text{M}$ verbessert werden.^[26] Unser Kooperationspartner (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Christian Freund) konnte im Phage Display mit verschiedensten Prolin-reichen Sequenzen eine neue affine Peptidsequenz (WPPPPRVPR, **8**) als vielversprechenden Interaktionspartner für die Tandem-WW-Domänen des FBP21 identifizieren.^[99] In dieser Arbeit sollten sowohl die affine W-Sequenz **8** ($K_{D,W1} = 155 \pm 18 \mu\text{M}$, $K_{D,W2} = 87,0 \pm 3,4 \mu\text{M}$) als auch die potentiell hochaffine W_2 -Sequenz **9**, bestehend aus zwei hintereinander geschalteten affinen W-Sequenzen, untersucht werden (**Abbildung 34**). Die hochaffine Sequenz **9** ist hierbei besonders von Interesse, da die beiden WW-Domänen des FBP21 nur durch einen zwölf Aminosäuren-langen, flexiblen Linker miteinander verbunden sind. Hierbei besteht die Möglichkeit, dass die hochaffine Sequenz mit beiden Domänen gleichzeitig interagiert.

Affine Sequenz **8** (W) W P P P P R V P R - N H₂

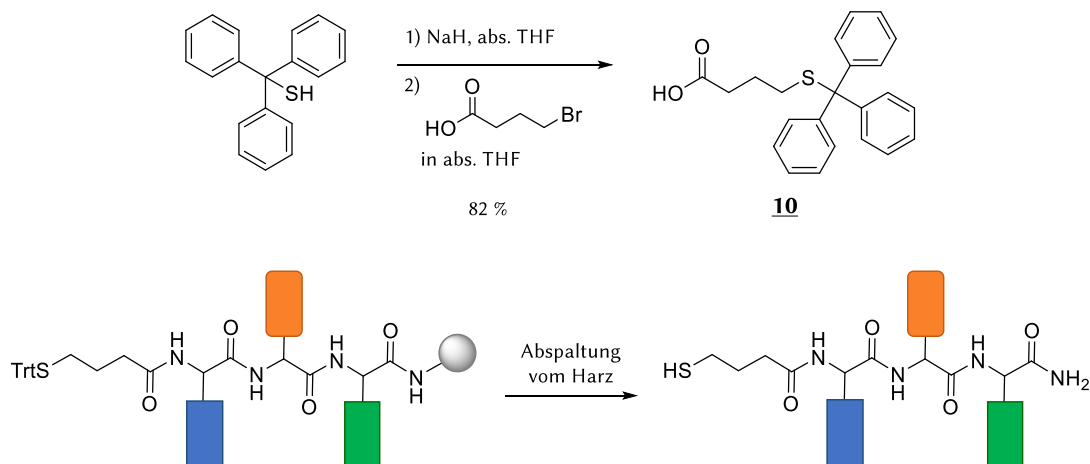
Hochaffine Sequenz **9** (W_2) W P P P P R V P R W P P P P R V P R - N H₂

Abbildung 34: Peptidsequenzen der im Phage Display gefundenen, guten Interaktionspartner für die Tandem-WW-Domänen von FBP21. Es wurden die affine Sequenz WPPPPRVPR **8** (W) und die potentiell hochaffine Sequenz **9** (W_2) verwendet.

Die Synthese der benötigten Peptide erfolgte mittels Festphasenpeptidsynthese auf RinkAmid und TentaGel Harzen (siehe Kapitel 6.7), wobei diese meist in guten Ausbeuten erhalten wurden. Die N-terminal Fmoc-geschützten Aminosäuren wurden mittels HOBT und DIC aktiviert und an die wachsende Peptidsequenz gekuppelt.

Weiterhin wurde der Thiollinker **10**, welcher für die Kupplung an das Maleinimiddextran benötigt wird, aus Tritylmercaptan hergestellt. Dieses wurde durch Deprotonierung mit Natriumhydrid und anschließender nukleophiler Substitution an 4-Brombuttersäure zum Produkt **10** umgesetzt (**Schema 3**). Die Tritylschutzgruppe ist hierbei notwendig, um eine Reaktion des Thiols während der Kupplung an das Peptid zu verhindern. Bei der Säure-

vermittelten Abspaltung des Peptids von der Festphase wurde schließlich auch die Tritylgruppe abgespalten und das Peptid mit ungeschütztem N-terminalen Thiol erhalten.



Schema 3: Synthese des Thiollinkers **10** aus Tritylmercaptan und 4-Brombuttersäure mittels nukleophiler Substitution. Das Produkt **10** konnte in 82 % Ausbeute erhalten werden. Die Tritylschutzgruppe wird bei der Säure-vermittelten Abspaltung des Peptids vom Harz ebenfalls abgespalten.

Im späteren Verlauf der Arbeit sollte die Aufnahme der Konjugate in die Zelle untersucht werden. Da die Konjugate Inhibitoren für die Tandem-WW-Domänen des FBP21 darstellen, sollten diese auch an den Aufenthaltsort des FBP21 gelangen können. Wie bereits in Kapitel 1.4 beschrieben, konnte FBP21 von Bedford *et al.* mit dem Splicingfaktor SC35 in den *nuclear speckles* colokalisiert werden.^[83] Somit müssen die Konjugate, um eine Interaktion mit dem FBP21 eingehen zu können, ebenfalls in den Zellkern eindringen. Die verwendeten Dextrane sind Biopolymere und werden endosomal aufgenommen. Der Grad der Aufnahme und zytosolischen Freisetzung ist hierbei von der Beladung und Größe der Konjugate abhängig.^[171-173] Die Verwendung von zellpenetrierenden Peptiden sollte hierbei die Aufnahmeeffizienz der Konjugate erhöhen und zusätzlich die zytosomale Freisetzung unterstützen.

In dieser Arbeit wurde eine Kombination aus zellpenetrierendem Peptid und nuklearer Lokalisationssequenz gewählt, die nicht nur die zelluläre Aufnahme, sondern auch die Aufnahme in den Zellkern fördern sollte. Die Wahl des zellpenetrierenden Peptids fiel auf das TAT **11**, da sich dieses durch seine geringe Zytotoxizität auszeichnet (siehe auch 1.5.1).^[141] Weiterhin wurde die einteilige, klassische Kernlokalisationssequenz des SV40 großen T-Antigens infolge seiner kurzen Sequenz und häufigen Anwendung in der Literatur gewählt (siehe Kapitel 1.5.2, **Tabelle 2**).^[152, 174] Die Kernlokalisationssequenz wird im weiteren Verlauf der Arbeit als NLS **12** abgekürzt (**Abbildung 35**).

TAT (**11**) G R K K R R Q R R R - N H ₂

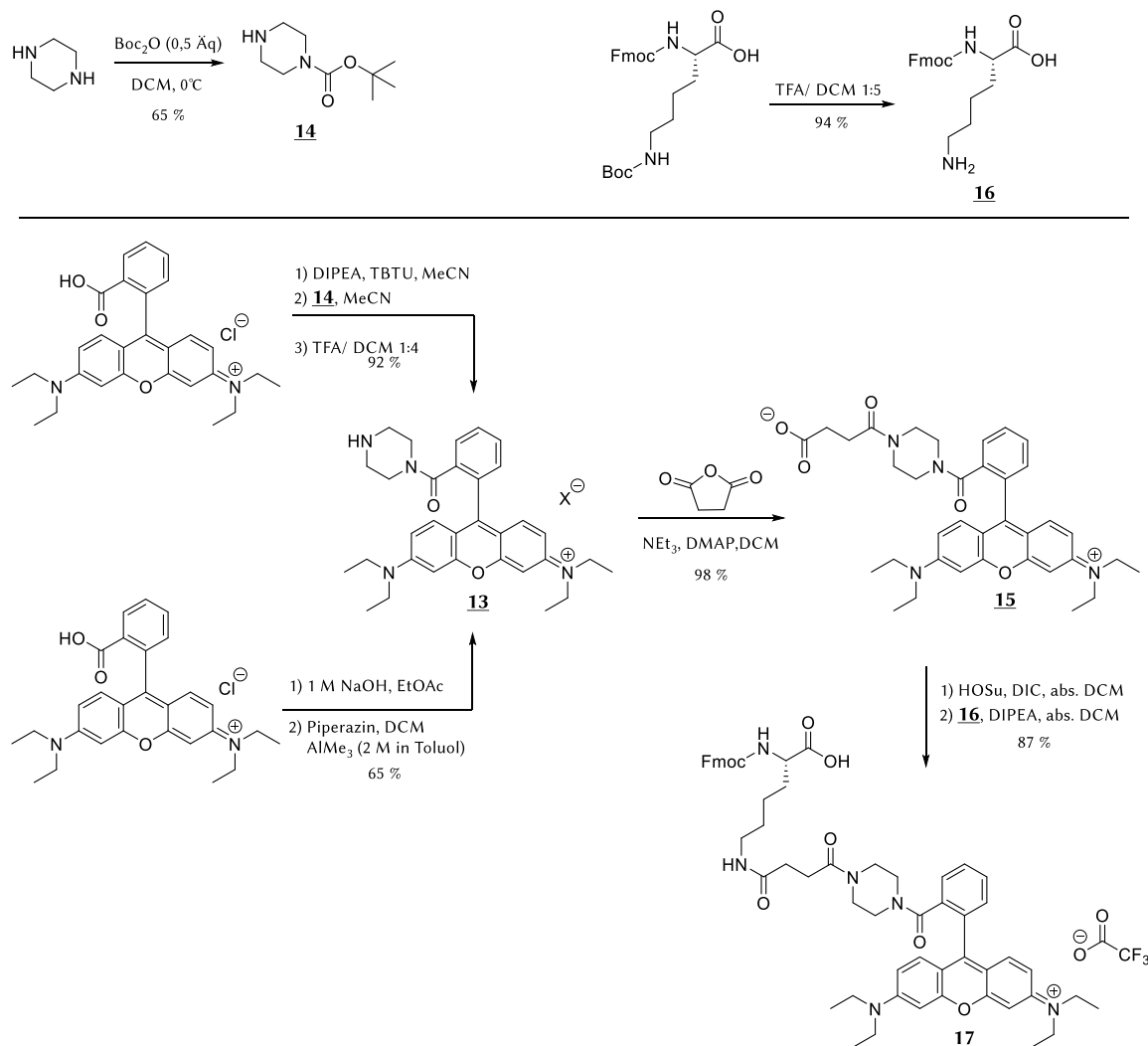
NLS (**12**) P K K K R K V - N H ₂

Abbildung 35: Aminosäuresequenzen des zellpenetrierenden Peptids TAT **11** und der Kernlokalisationssequenz NLS **12**.

Die zellpenetrierenden Peptide sollten zusätzlich in der Seitenkette einen Fluorophor tragen, um die Konjugate während der Mikroskopie sichtbar zu machen (siehe auch Kapitel 3.2.2 und 3.6). Hierbei fiel die Wahl auf das photostabile Rhodamin B-Piperazinamid **13**, welches vermehrt auch in Zellstudien eingesetzt wird. Da für die Synthese der zellgängigen Konjugate größere Mengen an Fluorophor benötigt wurden, ist das Rhodamin B-Piperazinamid **13** aufgrund seiner kostengünstigen Synthese eine gute Alternative zu teuren Standardfluorophoren wie TAMRA.^[175-177]

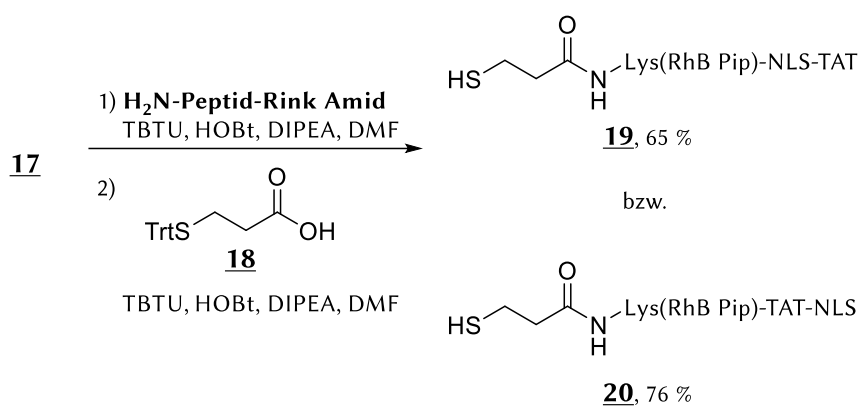
Der entsprechende Fluorophor-haltige Lysinbaustein **17** (Lys(RhB Pip)) wurde in fünf Schritten aus Rhodamin B mit einer Gesamtausbeute von 48 % hergestellt (**Schema 4**). Hierfür wurde zuerst das Rhodamin B-Piperazinamid **13** auf zwei unterschiedlichen Wegen synthetisiert. Zum einen wurde Rhodamin B, welches als Chlorid-Salz vorlag, mittels Natronlauge in Ethylacetat in die Rhodamin B-Base überführt. Zwischenzeitlich wurde Piperazin unter Verwendung der Lewis-Säure AlMe₃ aktiviert und anschließend zur Rhodamin B-Base gegeben. Das Produkt **13** wurde infolge saurer Aufarbeitung als Chloridsalz in 65 % Ausbeute erhalten.^[177] Aufgrund des hohen Zeitaufwands wurde schließlich ein zweiter Reaktionsweg in Anlehnung an die Synthese von Gobbo *et al.* gewählt.^[178] Bei diesem wurde Rhodamin B mit TBTU und DIPEA in Acetonitril aktiviert und anschließend mit zuvor einfach Boc-geschütztem Piperazin **14** umgesetzt. Die Verwendung von Standardkupplungsreagenzien, wie HOBt und DIC, lieferte im Vergleich nur geringe Ausbeuten. Die abschließende Boc-Entschützung mit TFA in DCM lieferte das Rhodamin B-Piperazinamid **13** als TFA-Salz in 92 % Ausbeute.

Weiterführend wurde das Rhodamin B-Piperazinamid **13** mit Bernsteinsäureanhydrid quantitativ zum Bernsteinsäure Rhodamin B-Piperazinamid **15** umgesetzt.^[177] Die Synthese des Fluorophor-haltigen Lysinbausteins **17** erfolgte im Anschluss durch *in situ* Aktivierung mittels NHS-Ester des Rhodamin B-Derivates **15** und abschließender Umsetzung mit dem zuvor Boc-entschützten Fmoc-Lys-OH **16**. Die in der Seitenkette Fluorophor-substituierte Aminosäure **17** wurde nach Aufreinigung mittels HPLC als TFA-Salz in 87 % Ausbeute erhalten.



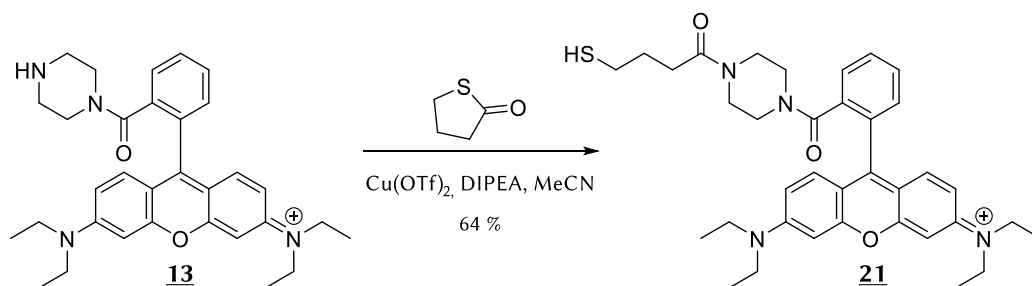
Schema 4: Syntheseweg des Fmoc-Lys(RhB Pip)-OH Bausteins **17**. Hierfür wurde zuerst das Rhodamin B auf zwei verschiedenen Wegen zum Rhodamin B-Piperazinamid **13** umgesetzt. Die Boc-Schützung des Piperazinbausteins **14** erfolgte im Voraus. Das Rhodamin B-Piperazinamid **13** wurde im Anschluss zum Bernsteinsäurederivat **15** umgesetzt. Abschließend erfolgte die Kupplung des Bausteins **15** an die zuvor entschützte Seitenkette des Fmoc-Lysins **16**. Die Gesamtausbeute der Reaktionskaskade betrug 48 %.

Weiterführend konnte das Fmoc-Lys(RhB Pip)-OH **17** in der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt werden. Die Aktivierung der Aminosäure erfolgte hierbei mit einem Gemisch aus TBTU, HOBt und DIPEA. Im Anschluss an die Kupplung der Fluorophor-haltigen Aminosäure **17** erfolgte die Reaktion mit dem zuvor synthetisierten Thiollinker **10**, um eine Immobilisierung auf dem Dextran zu ermöglichen. Die zellpenetrierenden Peptide Lys(RhB Pip)-NLS-TAT **19** und Lys(RhB Pip)-TAT-NLS **20** wurden in einer Ausbeute von 65 % bzw. 76 % erhalten.



Schema 5: Der Einbau des zuvor hergestellten Fmoc-Lys(RhB Pip)-OH Bausteins **17** in die Peptidsequenz erfolgte in guten Ausbeuten. Die Thiollinker-haltigen Peptide **19** und **20** wurden in 65 % bzw. 76 % Ausbeute erhalten.

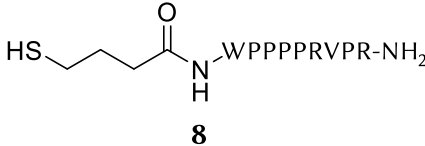
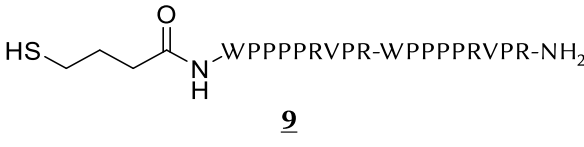
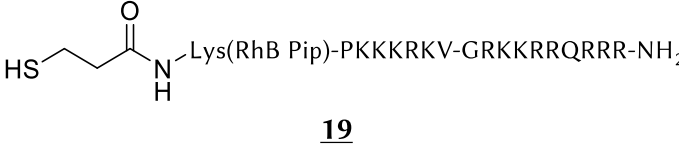
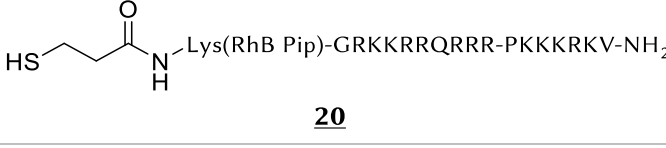
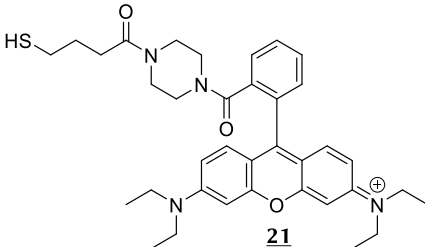
Des Weiteren wurden als Referenzsubstanzen einige Konjugate synthetisiert, die keine zellpenetrierenden Peptide trugen. Stattdessen wurde der Fluorophor direkt über einen 4-Mercaptobutyl-Baustein an das Dextran gebunden. Die Synthese des entsprechenden Fluorophors **21** wurde ausgehend von Rhodamin B-Piperazinamid **13** durchgeführt. Hierbei wurde unter Ringöffnung γ -Thiobutyrolakton an das Rhodamin B-Piperazinamid **13** gekuppelt. Die Reaktion wurde durch die Lewis-Säure Kupfer(II)-triflat katalysiert und ergab das gewünschte Produkt **21** in 64 % Ausbeute.



Schema 6: Synthese des Thiollinker-haltigen Fluorophors **21** aus Rhodamin B-Piperazinamid **13**. Das Produkt wurde in 64 % Ausbeute erhalten.

In **Tabelle 3** sind die hergestellten Peptide und Fluorophore für die Konjugatsynthese zusammengfasst.

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete, synthetisierte Peptide und Fluorophore für die Konjugatsynthese.

<u>NAME</u>	<u>SEQUENZ</u>	<u>AUSBEUTE</u> [%]
Affines Peptid (W)	 8	69 %
Hochaffines Peptid (W ₂)	 9	79 %
Lys(RhB Pip)-NLS-TAT	 19	65 % (31 % gesamt)
Lys(RhB Pip)-TAT-NLS	 20	76 % (36 % gesamt)
Thiol-RhB Pip	 21	64 % (42 % gesamt)

3.1.3. Synthese der Peptid-Dextran Konjugate mittels Maleinimid-Thiol Reaktion

Schließlich konnte nach Erhalt des Maleinimiddextrans **4** die eigentliche Konjugatreaktion stattfinden, bei der die zuvor synthetisierten, *N*-terminal Thiol-haltigen Peptide (siehe **Tabelle 3**) an die Maleinimide gekuppelt werden sollten. Wie schon in Kapitel 1.3.1 erwähnt, werden Maleinimid-Thiol Reaktionen bevorzugt unter leicht sauren bis neutralen Bedingungen durchgeführt. Hierbei liegen aliphatische Thiole protoniert vor, was zu einer geringeren Nukleophilie im Vergleich zu unprotonierten Thiolaten führt.^[78] Auf die Verwendung von basischeren pH-Werten sollte allerdings trotz einer Erhöhung der Nukleophilie verzichtet werden, da es hier vermehrt zur Bildung von Disulfiden kommen kann.

Generell konnten die verschiedenen Peptide gleichzeitig in einer einstufigen Synthese auf das Dextrangrundgerüst gekuppelt werden (siehe Kapitel 6.7, **Tabelle 26**). Um eine Hervorkehrbarkeit der Produktzusammensetzung zu erhalten, wurden die Konzentration des Maleinimiddextrans **4**, das Lösungsmittelvolumen und die Reaktionszeit bei der Konjugatsynthese konstant gehalten. Für den Erhalt unterschiedlicher Peptidbeladungen wurde somit lediglich die Konzentration der Peptide angepasst. Es wurden generell zwischen 2 – 4 Äquivalente des Peptids pro gewünschtem Peptid auf dem Konjugat eingesetzt. Hierbei stieg die benötigte Menge an Peptid mit zunehmender Beladungszahl. Die Fluorophorhaltigen Peptide Lys(RhB Pip)-NLS-TAT **19** und Lys(RhB Pip)-TAT-NLS **20** wurden generell in geringeren Mengen eingesetzt, da eine geringere Beladung (etwa ≤ 2 Peptide pro Dextran) gewünscht war. Bei Verwendungen hoher Konzentrationen des Funktionspeptids musste auch die Konzentration des Fluorophorhaltigen Peptids entsprechend erhöht werden. Dieses liegt daran, dass die beiden Peptidspezies in Konkurrenz um die Bindungsplätze des Maleinimiddextrans **4** stehen.

3.2. Analytik der Peptid-Dextran Konjugate

Auf Grund ihrer Größe und Vielseitigkeit sind Peptid-Dextran Konjugate **1** mitunter nur schwer zu analysieren. Eine komplette Analytik per NMR-Spektroskopie war nicht möglich, da das Dextrangrundgerüst selbst zu viele sich überlagernde Signale aufweist. Hierdurch war nur eine abschnittsweise Analytik mittels ^1H -NMR-Spektroskopie machbar, die wiederum zur Bestimmung der Peptidbeladung beitrug (siehe auch Kapitel 3.2.1). Bei der Verwendung von Fluorophorhaltigen Peptiden für die Konjugatsynthese konnte zudem auf die Absorptionsspektroskopie zurückgegriffen werden. So konnte mit einer eigens entwickelten Analysemethodik die parallele Bestimmung der Beladung des Funktionspeptids und des zellpenetrierenden Peptids ermöglicht werden (siehe Kapitel 3.2.2). Des Weiteren wurde die Gelpermeationschromatographie zur Bestimmung der Molmassenmittellwerte M_w und M_n verwendet (siehe Kapitel 3.3).

3.2.1. Bestimmung der Konjugatbeladung mittels ^1H -NMR-Spektroskopie

Für die Beladungsbestimmung bei einer homomultivalenten Peptidbeladung konnte die Analyse des Produktes mittels ^1H -NMR-Spektroskopie durchgeführt werden. Bei der Kupplung des affinen **8** bzw. hochaffinen **9** Funktionspeptides (WPPPPRVPR-NH₂ und WPPPPRVPRWPPPPRVPR-NH₂, siehe Kapitel 3.1.2) an Maleinimiddextran **4** können, je nach Konzentration des verwendeten Peptids, unterschiedliche Beladungen des Konjugats vorliegen. Im Vergleich mit den Spektren des Maleinimiddextrans **4** und des hochaffinen Peptids **9**, kann man im Konjugatspektrum gut die verschiedenen Gruppen zuordnen und daher zur Auswertung verwenden (**Abbildung 36**). Das Konjugatspektrum wies auf den ersten Blick drei Bereiche auf: den Aromatenbereich (> 7,00 ppm), den Dextranbereich (3,50 – 5,50 ppm) und den Alkylbereich (< 2,50 ppm) in dem die verschiedenen Seitenketten der Aminosäuren anzutreffen sind.

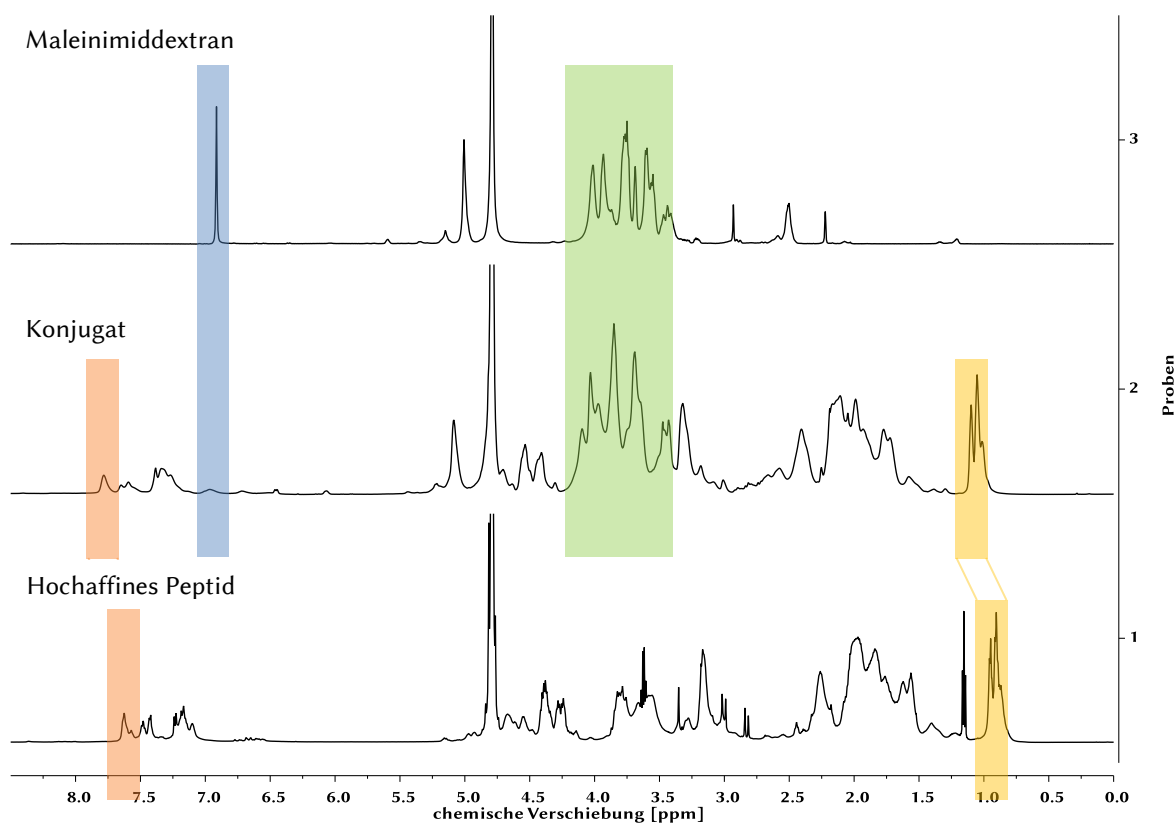


Abbildung 36: Vergleichende NMR-Spektren von Maleinimiddextran **4** (oben), dem Peptid-Dextran-Konjugat **1** (Mitte) und dem hochaffinen Peptid **9** (unten). Das Dextran Grundgerüst (grün) ist in den ersten beiden Spektren klar zwischen 3,50 - 4,20 ppm erkennbar. Die Valin- (gelb) und Tryptophan-signale (rot) sind sowohl im Konjugat- als auch im Peptidspektrum klar zu erkennen. Anhand des Tryptophansignals kann die Konjugatbeladung bestimmt werden. Das Signal des Maleinimids (blau) verschwindet bei der Kupplung zum Großteil, sodass auch hier eine positive Kupplung zu sehen ist.

Beim Vergleich des Dextranbereichs (grün) mit dem Spektrum des hochaffinen Peptids **9** war eine Überlagerung einer Vielzahl an Signalen durch das Dextrangrundgerüst zu sehen. Die überlagerten Signale sollten vorwiegend zu Arginin- und Prolin-Alkylsubstituenten gehören, die in direkter Nachbarschaft zu Aminofunktionen liegen und somit Tieffeldverschoben sind. Die weiteren Arginin- und Prolinsignale konnten zwischen 1,50 – 2,50 ppm gesehen werden. Durch ihre gegenseitige Überlagerung konnten sie jedoch nicht zur quantitativen Auswertung verwendet werden. Das Valinsignal (gelb) lag isoliert bei 0,90 - 0,95 ppm vor. Allerdings wies es bei etwa 0,87 ppm eine Schulter auf, sodass das Integral dieses Signals nicht verlässlich ausgewertet werden konnte.

Somit blieb für die Auswertung der Beladung das Tryptophansignal (rot) bei 7,62 ppm. Dieses integriert für ein Proton des Indolrings des Tryptophans und somit musste bei der Kupplung des hochaffinen Peptids **9** der Wert für das erhaltene Integral halbiert werden, da hier zwei Tryptophane pro Sequenz vorliegen.

Weiterhin konnte die erfolgreiche Kupplung des Peptids an das Maleinimiddextran **4** auch durch das Verschwinden des Maleinimidsignals (blau) bei 6,91 ppm gesehen werden. Im vorliegenden Beispiel konnte ein kleines Signal an dieser Stelle noch detektiert werden, welches durch nicht vollständig gekuppelte Maleinimide zustande kam. Für eine weitere Verwendung des Konjugats ist dieses jedoch nicht ausschlaggebend. Eine vollständige Kupplung der Maleinimide könnte durch eine Konzentrationserhöhung der verwendeten Peptide bei der Konjugatsynthese erreicht werden.

3.2.2. Bestimmung der Konjugatbeladung mittels Absorptionsspektroskopie

Bei der Kupplung mehrere Peptidspezies erschwerte sich die Auswertung im Gegensatz zum Beispiel in Kapitel 3.2.1 noch einmal, da sich die Signale der einzelnen Peptide gegenseitig überlagerten. So zum Beispiel auch bei der Verwendung der zellpenetrierenden Peptide, welche für die zelluläre Aufnahme der Dextrankonjugate sorgen sollten (Kapitel 3.6). Diese Sequenzen bestehen größtenteils aus den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, die Signale im Bereich zwischen 1,5 – 4,0 ppm aufweisen.

In früheren Arbeiten wurde auf die Verwendung der Aminosäureanalyse zurückgegriffen, um die Analyse der Konjugate zu ermöglichen.^[62, 179] Da dieses jedoch nicht ‚in-house‘

stattfinden konnte, sondern auf kommerzielle Hilfe zurückgegriffen werden müsste, wurde aus Zeit- und Kostengründen nach einer anderen Lösung gesucht.

Schließlich wurden die zellpenetrierenden Peptide *N*-terminal mit einem in der Seitenkette Fluorophor-gelabelten Lysin gekuppelt (siehe Kapitel 3.1.2). Dieses sorgt sowohl dafür, dass die Dextranskonjugate später mittels Konfokalmikroskopie sichtbar gemacht werden können, als auch dafür, dass die Anzahl der auf dem Dextran gekuppelten Peptide mittels Absorptionsspektroskopie bestimmt werden können. Wie schon in Kapitel 3.1.2 erwähnt, wurde eine Kombination aus zellpenetrierendem Peptid TAT **11** und Kernlokalisationssequenz NLS **12** verwendet. Hierbei wurden zwei Peptidsequenzen verwendet, das Lys(RhB Pip)NLS-TAT **19** und das Lys(RhB Pip)TAT-NLS **20**, um zu untersuchen, ob die Reihenfolge der Peptide in der Sequenz einen Einfluss auf die zelluläre und nukleäre Aufnahme hat. Die Kupplung an das Dextran erfolgte über einen 3-Mercaptopropyl-Liniker, der an das *N*-terminale Ende des Peptids gekuppelt war (**Abbildung 37**).

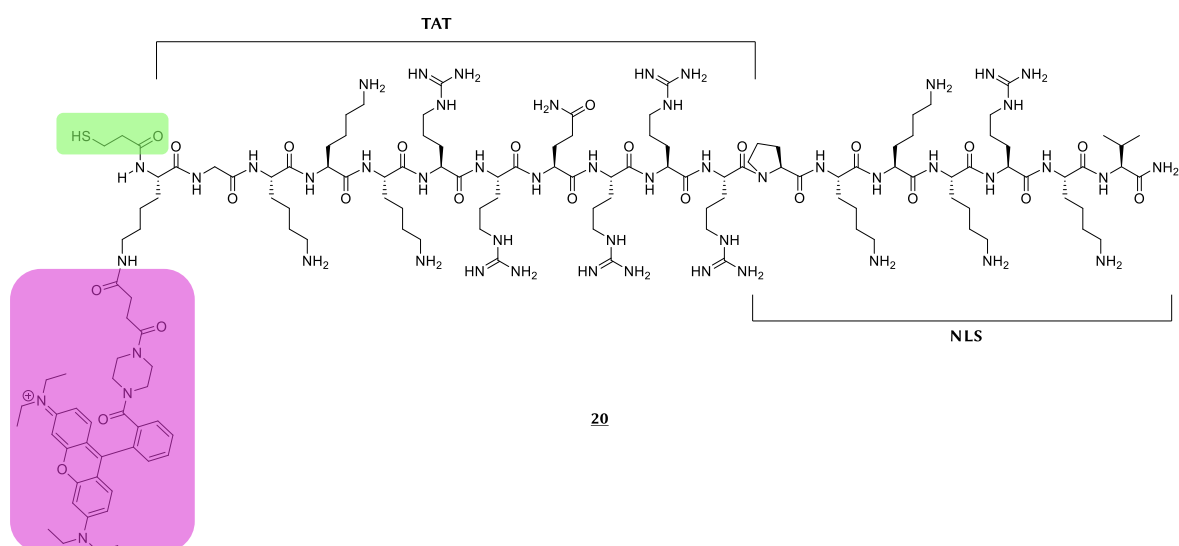


Abbildung 37: Kombination eines zellpenetrierenden Peptids (TAT) mit einer Kernlokalisationssequenz (NLS). Das Peptid ist *N*-terminal mit einem Lys(Bernsteinsäure Rhodamin B-Piperazinamid)-Baustein (lila) markiert. Die Kupplung an das Dextran erfolgte über den Thiol-haltigen Linker (grün).

Bei einigen Referenzkonjugaten wurde statt des Lys(RhB Pip)-Bausteins **17** ein anderer Rhodamin B-Piperazinamid Baustein **21** eingesetzt, der über einen 4-Mercaptobutyl-Liniker direkt an das Maleinimid binden konnte (**Abbildung 38**). Dieser Baustein wird weiterführend als Thiol-RhB Pip **21** bezeichnet.

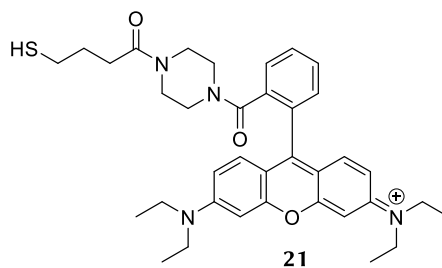


Abbildung 38: Thiol-haltiger Fluorophor **21**, welcher in der Synthese einiger Referenzkonjugate verwendet wurde.

Um die Konjugatanalyse mittels Absorptionsspektroskopie durchführen zu können, mussten zuerst die Absorptionsmaxima und dazugehörigen Extinktionskoeffizienten für alle beteiligten Stoffe in Abhängigkeit der Wellenlänge λ ermittelt werden. Das Absorptionsspektrum für Lys(RhB Pip)-TAT-NLS **20** ist in **Abbildung 39** angegeben, alle weiteren Spektren befinden sich in Anhang 10.1.

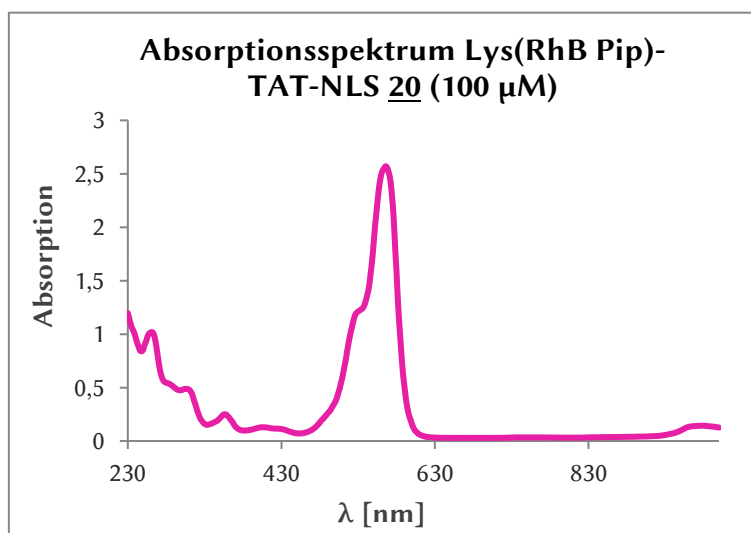


Abbildung 39: Absorptionsspektrum des Peptids Lys(RhB Pip)-TAT-NLS **20**. Das Absorptionsmaximum bei 566 nm wurde zur Auswertung verwendet.

Die aufgetragene Absorption ist über das Lambert-Beersche Gesetz (13) folgendermaßen definiert:^[180]

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (13)$$

mit: A_{λ} : Absorption des Stoffes in Abhängigkeit der Wellenlänge λ

ε_{λ} : molarer Extinktionskoeffizient in Abhängigkeit der

Wellenlänge $\lambda \left[\frac{\text{m}^2}{\text{mol}} \right]$

c : Stoffmengenkonzentration der absorbierenden Substanz $\left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right]$

d : Schichtdicke des durchstrahlten Körpers [cm]

Durch Vermessen von Konzentrationsreihen und Auftragen der erhaltenen Werte als Kalibriergerade (siehe **Abbildung 40** und Anhang 10.1) konnte der Extinktionskoeffizient für alle Substanzen bei den relevanten Wellenlängen bestimmt werden (Gleichung (14)).

$$\varepsilon_{\lambda} = \frac{\text{Geradensteigung}}{d} \quad (14)$$

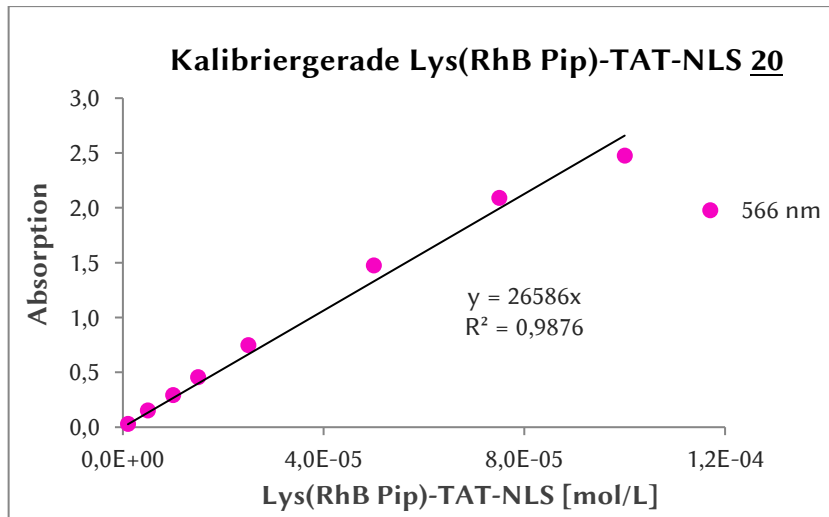


Abbildung 40: Kalibriergerade für Lys(RhB Pip)-TAT-NLS **20** bei 566 nm. Aus der erhaltenen Steigung konnte der Extinktionskoeffizient ($37980 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ermittelt werden.

Beim Vergleich der Absorptionsspektren der einzelnen Substanzen ist zu erkennen, dass sich die Spektren besonders im Bereich unterhalb von 400 nm stark überlagern (**Abbildung 41**). Dieses führt dazu, dass sich die Absorption bei einer Wellenlänge aus mehreren Einzelbeiträgen zusammensetzt. Bei der späteren Berechnung der Peptidbeladung müssen somit die Anteile der einzelnen Substanzen an einem Signal mit eingerechnet werden.

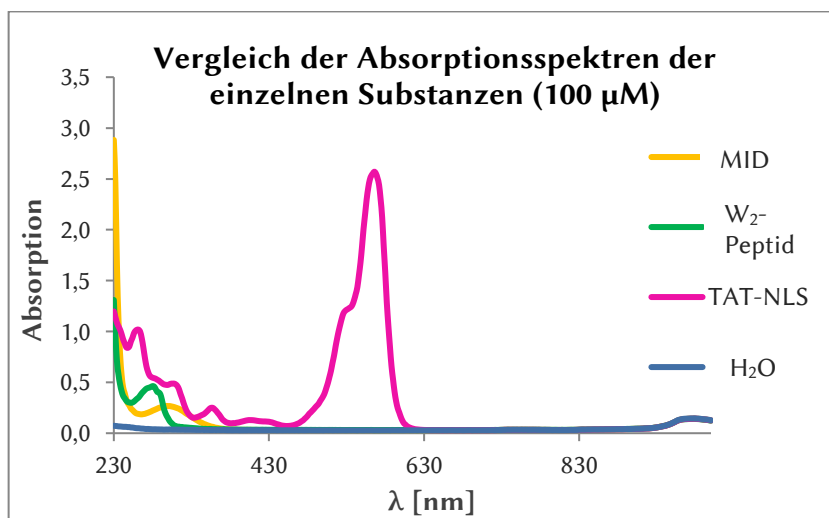


Abbildung 41: Vergleich der Absorptionsspektren des Maleinimiddextrans **MID1**, hochaffinen Peptids **9**, Lys(RhB Pip)-TAT-NLS **20** und Wasser. Die Spektren überlagern sich besonders im Bereich unterhalb von 400 nm.

Für die Berechnung der Beladung eines Dextrans mit zwei verschiedenen Peptidspezies wurde nach folgender Methodik vorgegangen, die in Zusammenarbeit mit Marcus Bodeck (Institut für Physik, Technische Universität Berlin) entwickelt wurde. Zuerst wurde die zu untersuchende Substanz genau eingewogen und in Wasser gelöst. Anschließend wurde das Absorptionsspektrum aufgenommen (beispielhaft ist das Konjugat **K1** in **Abbildung 42** angegeben).

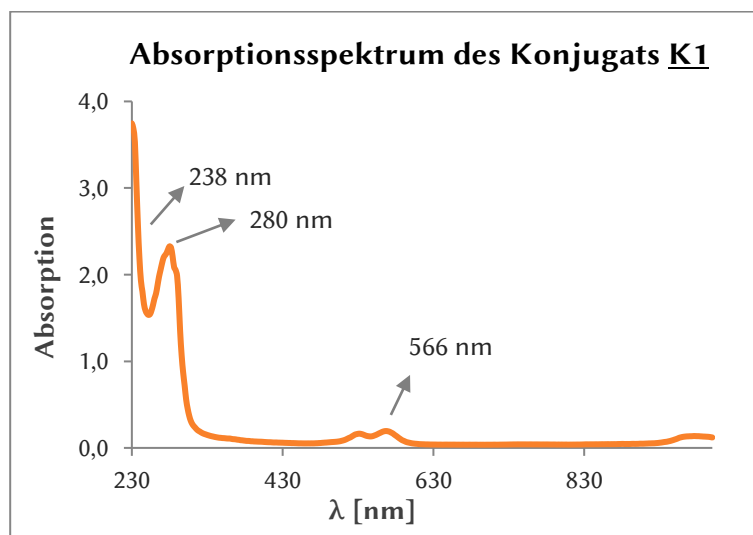


Abbildung 42: Absorptionsspektrum des Konjugats **K1**. Es liegen lokale bzw. globale Absorptionsmaxima bei 280 nm (hochaffines Peptid **9**) und 566 nm (Lys(RhB Pip)-TAT-NLS **20**) vor. Für das Maleinimiddextran **4** wurde die Absorption bei 238 nm ausgewählt.

Um nun die Beladungsberechnung für die einzelnen Spezies anhand des aufgenommenen Spektrums zu ermöglichen, mussten zuerst die Extinktionskoeffizienten aller verwendeter Stoffe bei den für die Berechnung wichtigen Wellenlängen ermittelt werden. (siehe **Tabelle 4**). Das lokale Absorptionsmaximum bei 566 nm korreliert mit dem Signal für das Fluorophor-haltige Peptid Lys(RhB Pip) **19** bzw. **20** und für den Thiol-haltigen Fluorophor (Thiol-RhB Pip **21**). Es wurde für die Berechnung verwendet, da an dieser Stelle keine anderen Konjugatbestandteile das Signal störten. Weiterhin korreliert das Signal bei 280 nm mit dem lokalen Absorptionsmaximum des hochaffinen Peptids **9**.

Für die Berechnung wurde außerdem eine weitere Wellenlänge benötigt, zu dessen Absorption das Maleinimiddextran **4** beiträgt. Da das Absorptionsmaximum des Maleinimiddextrans **4** außerhalb des messbaren Bereichs liegt, wurde hierfür die Absorption bei 238 nm vergleichsweise gewählt.

Table 4: Die errechneten Extinktionskoeffizienten bei den entsprechenden Absorptionsmaxima wurden für die Beladungsbestimmung benötigt. Hierbei waren nicht nur die Extinktionskoeffizienten der eigenen Maxima (in Klammern angegeben) von Bedeutung, sondern auch die Extinktionskoeffizienten bei den Maxima der anderen Substanzen.

<u>VERBINDUNG</u>	<u>λ [nm]</u>	<u>ϵ_{λ} [L · mol⁻¹ · cm⁻¹]</u>
Maleinimidextran <u>4</u>	238 nm (gewählt)	13 649
Hochaffines Peptid <u>9</u>	238 nm	5 844
	280 nm (lokales Maximum)	5 482
Lys(RhB Pip)-NLS-TAT <u>19</u>	238 nm	25 621
	566 nm (globales Maximum)	39 631
Lys(RhB Pip)-TAT-NLS <u>20</u>	238 nm	12 215
	566 nm (globales Maximum)	37 980
Thiol-RhB Pip <u>21</u>	238 nm	13 322
	570 nm (globales Maximum)	21 007

Anhand der erhaltenen Extinktionskoeffizienten und ausgehend vom aufgenommenen Spektrum konnte die Konzentration des Fluorophor-haltigen Peptids Lys(RhB Pip)-TAT-NLS 20 mit Hilfe von Gleichung (13) bei 566 nm bestimmt werden (siehe Gleichung (15)). In diesem Bereich des Spektrums lagen keine Überlagerungen durch andere Konjugatbestandteile vor. Die verwendeten Absorptionswerte wurden immer in ihrer korrigierten Form verwendet. Das heißt, dass die Grundabsorption des Lösungsmittels und der Mikrotiterplatte von den erhaltenen Absorptionswerten abgezogen wurden, bevor diese für Berechnungen verwendet wurden.

$$\begin{aligned}
 c_{\text{Lys(RhB Pip)-TAT-NLS}} &= \frac{A_{566 \text{ nm, korr.}}}{(\epsilon_{566 \text{ nm, Lys(RhB Pip)-TAT-NLS}} \cdot d)} \quad (15) \\
 &= \frac{0,751}{(37\,980 \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \cdot 0,7 \text{ cm})} = 2,8 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}}
 \end{aligned}$$

mit: $A_{566 \text{ nm, korr.}}$: Mittelwert der korrigierten Absorption bei 566 nm

Somit betrug die Konzentration des Fluorophor-haltigen Peptids 20 in der vorhandenen Lösung (3,55 mg Substanz gelöst in 2000 μL Wasser) $2,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$.

Weiterführend wurde die Konzentration beziehungsweise die Beladung des Dextrans mit hochaffinem Peptid **9** anhand des ^1H -NMR-Spektrum bestimmt, da das Absorptionssignal des lokalen Maximums (280 nm) des hochaffinen Peptids **9** anteilig durch das Maleinimid-dextran **4** und das Lys(RhB Pip)-TAT-NLS Peptid **20** beeinflusst wurde. Dieses ist im NMR-Spektrum nicht der Fall. Hierfür wurde, wie bereits in Kapitel 3.2.1 beschrieben, vorgegangen. Für das ausgewählte Konjugat **K7** ergab sich eine Beladung von 6,1 hochaffinen Peptiden **9** pro Dextran (**Abbildung 43**).

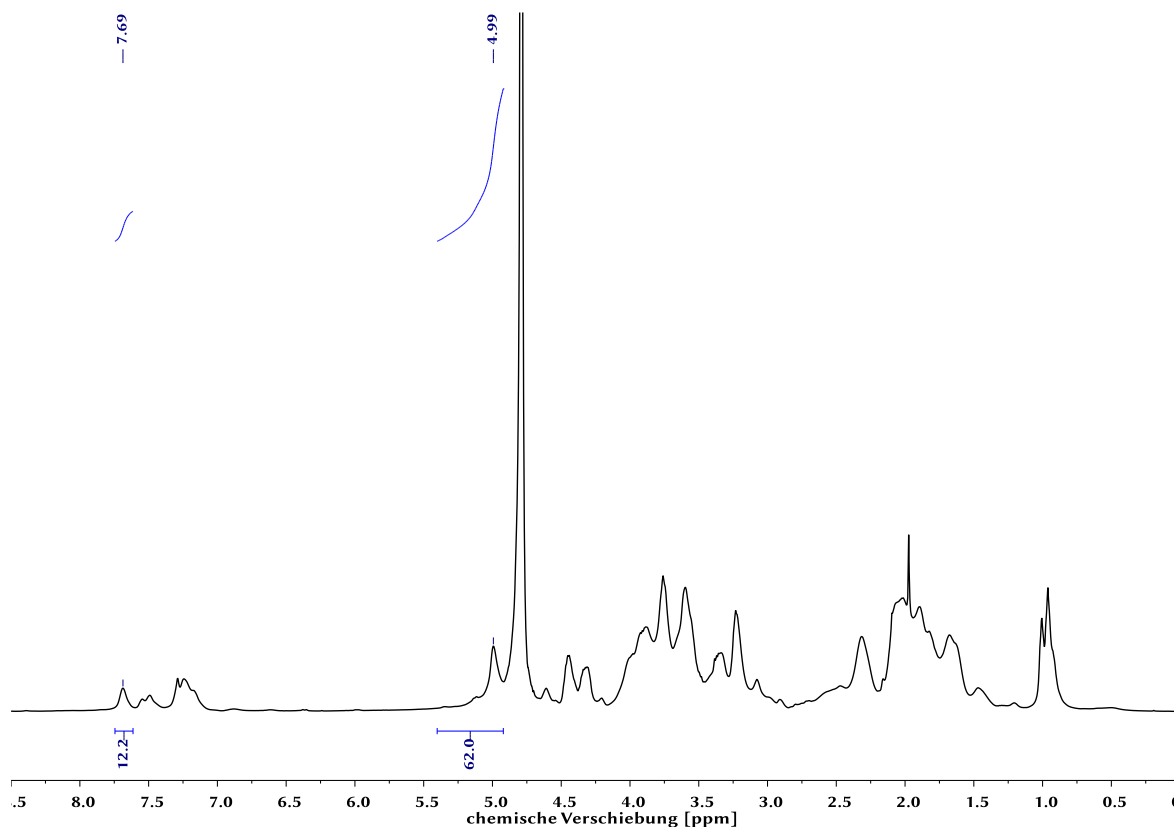


Abbildung 43: ^1H -NMR-Spektrum des Konjugats **K1** (700 MHz, D_2O). Das Konjugat ist mit 6,1 hochaffinen Peptiden **9** beladen (siehe Signal bei 7,69 ppm). Die Beladung durch das Fluorophor-haltige Peptid **20** konnte auf diesem Wege nicht bestimmt werden.

Um nun weiterführend auch die Beladung und nicht nur die Konzentration des Fluorophor-haltigen Peptids **20** zu erhalten, musste zuerst der Einfluss der beiden Peptide auf die Absorption bei 238 nm bestimmt werden. Dadurch kann die Konzentration des Maleinimiddextrans **4** in der Probe erhalten werden. Dieses ist von essenzieller Bedeutung, da auf diesem Weg die Molmasse des Konjugats errechnet werden kann.

Generell setzt sich die Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge additiv aus den Absorptionsträgern der einzelnen Bestandteile des Moleküls zusammen. Hierdurch gilt Gleichung (16):^[181]

$$A_{238 \text{ nm, ges.}} = A_{238 \text{ nm, Lys(RhB Pip)-TAT-NLS}} + A_{238 \text{ nm, hochaffines Peptid}} \quad (16)$$

$$+ A_{238 \text{ nm, MID}}$$

Unter Verwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes (13) lässt sich Gleichung (16) folgendermaßen umformen:

$$A_{238 \text{ nm, ges.}} - A_{238 \text{ nm, Lys(RhB Pip)-TAT-NLS}} \quad (17)$$

$$= \epsilon_{238 \text{ nm, hochaffines Peptid}} \cdot c_{\text{hochaffines Peptid}} \cdot d + \epsilon_{238 \text{ nm, MID}} \cdot c_{\text{MID}} \cdot d$$

Mit der Annahme, dass die Konzentration des hochaffinen Peptids **9** bei der Auswertung mittels ¹H-NMR-Spektroskopie nur durch den Beladungsfaktor von der Konzentration des Maleinimiddextrans **4** abweicht, gilt Gleichung (18):

$$c_{\text{hochaffines Peptid}} = L_{\text{hochaffines Peptid}} \cdot c_{\text{MAD}} \quad (18)$$

mit: $L_{\text{hochaffines Peptid}}$: Beladung des hochaffinen Peptids pro Dextran (NMR)

Durch Einsetzen von Gleichung (18) in Gleichung (17) und anschließendes Ausklammern, ergibt sich Gleichung (19). Diese kann schließlich zur Berechnung der Maleinimiddextran-konzentration verwendet werden.

$$c_{\text{MID}} = \frac{A_{238 \text{ nm, ges.}} - A_{238 \text{ nm, Lys(RhB Pip)-TAT-NLS}}}{d \cdot (\epsilon_{238 \text{ nm, hochaffines Peptid}} \cdot L_{\text{hochaffines Peptid}} + \epsilon_{238 \text{ nm, MID}})} \quad (19)$$

$$= \frac{2,470 - 0,241}{0,7 \text{ cm} \cdot \left((5844 \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \cdot 6,1) + 13649 \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right)} = 6,46 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

Somit wird für die Konzentration des Maleinimiddextrans **4** ein Wert von $6,46 \cdot 10^{-5}$ mol/L in der vermessenen Lösung des Konjugats **K1** erhalten. Daraus ließ sich schließlich unter Einbeziehen des Volumens (2000 µL) die Stoffmenge der einzelnen Bestandteile errechnen.

$$n_{\text{MID}} = c_{\text{MID}} \cdot V \quad (20)$$

$$= 6,46 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 0,002 \text{ L} = 1,29 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$$

Es ergaben sich auf diese Weise Stoffmengen von $1,29 \cdot 10^{-7}$ mol/L für das Maleinimiddextran **4**, $7,88 \cdot 10^{-7}$ mol/L für das hochaffine Peptid **9** und $5,65 \cdot 10^{-8}$ mol/L für das Fluorophor-haltige Peptid **20**. Weiterführend ließ sich aus den errechneten Stoffmengen die Masse der jeweiligen Bestandteile und somit die Gesamtmasse des Produktes errechnen (siehe Gleichung (21))

$$\begin{aligned}
 m_{MID} &= M_{MID} \cdot n_{MID} & (21) \\
 &= 12\,500 \frac{g}{mol} \cdot 1,29 \cdot 10^{-7} mol = 1,61 \cdot 10^{-3} g
 \end{aligned}$$

Für das Maleinimiddextran **4** ließ sich somit ein Massenanteil von 1,61 mg, für das hochaffine Peptid **9** ein Anteil von 1,80 mg und für das Fluorophor-haltige Peptid **20** ein Anteil von 0,173 mg an der Gesamtmasse (3,58 mg) errechnen. Dieser Wert liegt recht nah an der zu Beginn eingewogenen Substanzmenge (3,55 mg), sodass die Auswertung akzeptable Ergebnisse lieferte.

Über die Gesamtmasse konnte schließlich die Molmasse des Produkts errechnet werden. Diese ergab sich aus Gleichung (22) unter Verwendung der Stoffmenge des Maleinimiddextrans **4**:

$$\begin{aligned}
 M_{ges.} &= \frac{m_{ges}}{n_{MID}} & (22) \\
 &= \frac{3,58 \cdot 10^{-3} g}{1,29 \cdot 10^{-7} mol} = 27\,742 \frac{g}{mol}
 \end{aligned}$$

Die Beladung mit Fluorophor-haltigem Peptid **20** ergab sich abschließend aus dem Stoffmengenverhältnis des Lys(RhB Pip)-TAT-NLS Peptids **20** zum Maleinimiddextran **4** (siehe Gleichung (23)).

$$\begin{aligned}
 L_{Lys(RhB\ Pip)-TAT-NLS} &= \frac{n_{Lys(RhB\ Pip)-TAT-NLS}}{n_{MID}} & (23) \\
 &= \frac{5,65 \cdot 10^{-8} mol}{1,29 \cdot 10^{-7} mol} = 0,44
 \end{aligned}$$

mit: $L_{Lys(RhB\ Pip)-TAT-NLS}$: *Beladung des Fluorophor-haltigen Peptids pro Dextran*

Im vorliegenden Konjugat **K1** waren somit 0,44 Lys(RhB Pip)-TAT-NLS **20** Moleküle pro Dextran gekuppelt.

Auf diesem Weg konnte die Beladung und die Molmasse von 13 Konjugaten bestimmt werden (siehe **Tabelle 5** und **Tabelle 6**), die weiterführend biochemisch untersucht werden sollten.

Tabelle 5: Auswertung der Beladung der Konjugate. Die erhaltenen Beladungen für das hochaffine Peptid **9** und die Lys(RhB Pip)-Peptide **19** bzw. **20** wurden angegeben. Weiterhin ist die errechnete Molmasse der Konjugate aufgeführt.

<u>KONJUGAT</u>	<u>HOCHAFFINES PEPTID (9)</u>	<u>Lys(RhB Pip)-TAT-NLS (20)</u>	<u>Lys(RhB Pip)-NLS-TAT (19)</u>	<u>M [g/mol]</u>
K2			1,10	15 800
K3		1,00		15 500
K4	4,5		1,90	28 600
K5	4,8	1,50		28 200
K6	5,2		0,03	24 300
K7	5,2	0,30		25 300
K1	6,1	0,44		27 700
K8	6,3		2,20	33 600
K9	7,2		0,40	30 100
K10	9,9	1,80		40 500

Tabelle 6: Beladungsbestimmung für die Thiol-RhB Pip-enthaltenden Konjugate. Die Beladungen der Peptide, sowie die errechnete Molmasse sind hier angegeben.

<u>KONJUGAT</u>	<u>HOCHAFFINES PEPTID (9)</u>	<u>THIOL-RhB Pip (21)</u>	<u>M [g/mol]</u>
K11		0,11	12 500
K12	2,3	0,20	16 400
K13	5,9	0,40	25 100

3.3. Methodvalidierung mittels Gelpermeationschromatographie

Zur Validierung der in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Methodik, sollten die Molmassen der Konjugate weiterhin mithilfe der Gelpermeationschromatographie (GPC) vermessen werden. Die GPC ist ein Trennverfahren, bei dem Makromoleküle beziehungsweise Polymere nach ihrem hydrodynamischen Volumen V_h aufgetrennt werden. Dieses

hydrodynamische Volumen beschreibt das Volumen der Moleküle mitsamt ihrer Solvathülle, welche durch Wechselwirkungen des Lösungsmittels der mobilen Phase mit dem Makromolekül entsteht. Die Größe des hydrodynamischen Volumens ist stark vom Lösungsmittel, dem Verzweigungsgrad der Substanz und ihrer chemischen Struktur abhängig. Somit kann es vorkommen, dass Substanzen unterschiedlicher Molmasse das gleiche hydrodynamische Volumen aufweisen (**Abbildung 44**).^[182-183]

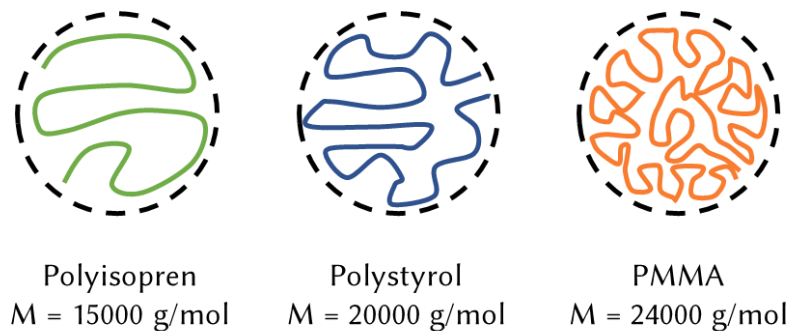


Abbildung 44: Vergleich dreier verschiedener Polymere in THF. Das hydrodynamische Volumen der Polymere ist gleich, obwohl die Molmassen sich stark unterscheiden (Abbildung nach PSS Polymer Standard Service).^[183]

Die Makromoleküle werden bei der Messung über eine Trennsäule geleitet, deren stationäre Phase aus einem porösen Material besteht. Moleküle mit einem kleinen hydrodynamischen Volumen können in die Poren des Materials diffundieren und haben somit eine höhere Verweildauer auf der Säule. Im Gegensatz dazu können Makromoleküle mit großem hydrodynamischen Volumen nicht in die Poren eindringen und werden somit schneller eluiert (**Abbildung 45**).^[184]

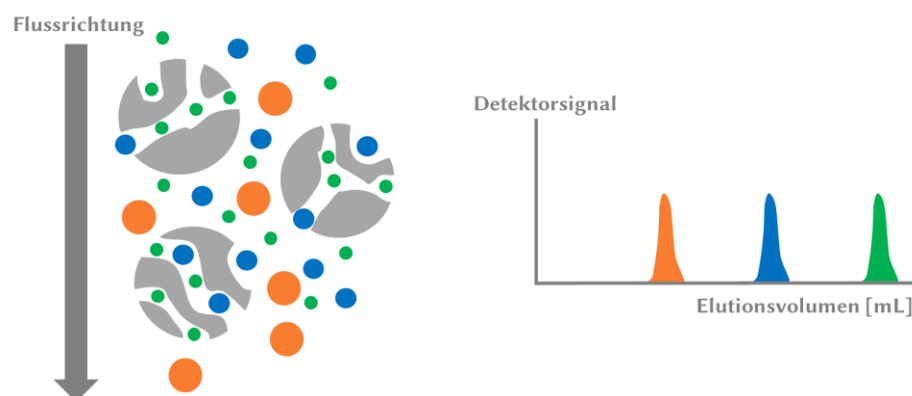


Abbildung 45: Schematische Darstellung des GPC-Trennverfahrens. Moleküle mit großem hydrodynamischen Volumen (orange) können nicht in die Poren der stationären Phase eindringen und werden daher schnell eluiert. Moleküle mit kleinerem hydrodynamischen Volumen (blau und grün) können in die Poren diffundieren und benötigen somit länger, um eluiert zu werden (links). Sie werden somit erst bei größeren Elutionsvolumina detektiert (rechts, Abbildung nach P. F. W. Simon ^[184]).

Die GPC ist eine Relativmethode und beruht somit auf dem Vergleich des Elutionsverhaltens der gemessenen Substanzen mit einer Standardsubstanz. Da die Konjugate ein Dextrangrundgerüst aufweisen, wäre es ideal als Standard ebenfalls Dextrane zu verwenden. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch vorwiegend Konjugate mit basischen Seitenketten vermessen, sodass auf eine Kationensäule zurückgegriffen wurde. Dieses ist notwendig, da GPC-Trennsäulen für neutrale Materialien in wässrigen Systemen oft aus Poly-hydroxymethacrylat-Copolymeren bestehen. Hierbei würde eine ionische Interaktion mit basischen Substanzen und somit eine Veränderung der Elutionszeiten hervorgerufen werden.^[183, 185] Die stationäre Phase der Kationensäule besteht hingegen aus einem NH-funktionalisierten Acrylat-Copolymer.^[183] Hierdurch wird die Interaktion der protonierten Aminfunktionen der Konjugate mit dem Säulenmaterial unterdrückt, da durch das ebenfalls protonierte Säulenmaterial eine Ladungsabstoßung auftritt. Ungeladene Substanzen wie beispielsweise Dextrane werden auf Kationensäulen vergleichsweise später eluiert, da keine Ladungsabstoßung mit der stationären Phase vorliegt.^[186] Somit könnten die geladenen Konjugate eventuell nur schwer mit den ungeladenen Dextranreferenzen zu vergleichen sein. Aus diesem Grund wurde zusätzlich Poly(2-vinylpyridin) (P2VP, **Abbildung 46**) als kationische Referenzsubstanz verwendet.^[186] Hierbei ergibt sich jedoch das Problem, dass das hydrodynamische Volumen der Referenz von dem der Konjugate aufgrund ihrer strukturellen Unterschiede abweichen könnte.

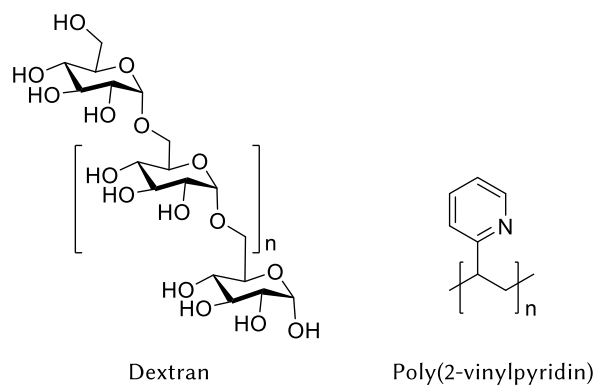


Abbildung 46: Verwendete Referenzsubstanzen für die GPC-Messungen. Dextran wird generell für Messungen auf neutralen Säulen verwendet, während P2VP als Standard für Kationensäulen eingesetzt wird.

Durch den Vergleich der Elutionsvolumina der Referenzen mit denen der Konjugate erhält man schließlich die Molmassenmittelwerte M_n und M_w , sowie den Polydispersitätsindex (PDI). Die Molmassenverteilung kann je nach Gewichtung unterschiedliche Mittelwerte ergeben. Das Zahlenmittel der Molmasse M_n gibt an, welche Molmasse in einer angegebenen Verteilung am häufigsten vorkommt. Er ist nach Gleichung (24) definiert als:^[187]

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^n n_i M_i}{\sum_{i=1}^n n_i} \quad (24)$$

Im Gegensatz dazu wird das Massenmittel der Molmasse M_w nach dem relativen Massenanteil der Probe gewichtet. Somit wird ein Makromolekül mit größerer Molmasse stärker gewichtet als ein Molekül mit geringerer molarer Masse. Der M_w ist nach Gleichung (25) folgendermaßen definiert: ^[187]

$$M_w = \frac{\sum_{i=1}^n n_i M_i^2}{\sum_{i=1}^n n_i M_i} \quad (25)$$

Abschließend lässt sich der Polydispersitätsindex (PDI) als das Verhältnis aus Massenmittel zu Zahlenmittel definieren (Gleichung (26)). Er besitzt stets einen Wert ≥ 1 . Es gilt, je näher der PDI an 1 liegt, desto kleiner ist die Molmassenverteilung der Probe. Er zeigt somit den Homogenitätsgrad eines Polymers an. ^[187]

$$PDI = \frac{M_w}{M_n} \geq 1 \quad (26)$$

Bei der Vermessung des käuflich erworbenen Dextrans, welches als Startmaterial für die Dextranmodifizierung diente, konnten anhand des Dextranstandards gute Werte für die Molmassenmittelwerte und den PDI erhalten werden (siehe **Tabelle 7**). Besonders der M_w , welcher einen Wert von 10 300 g/mol aufwies, passte besonders gut mit den Angaben des Herstellers (9 000-11 000 g/mol) überein. Bei Verwendung des P2VP-Standards wurde wiederum ein viel zu kleiner M_w (20,5 g/mol) erhalten. Dieses liegt vermutlich daran, dass das Dextran keine Ladungsabstoßung durch das Material der stationären Phase erfährt und somit eine längere Verweildauer auf der Trennsäule aufweist als die kationische Referenzsubstanz. Es wird somit eine viel kleinere Molmasse suggeriert, als das Dextran in Wirklichkeit besitzt.

Ähnliches konnte auch bei den vermessenen Konjugaten gesehen werden. Bei Verwendung des Dextranstandards wurden für die Konjugate viel zu hohe Molmassenmittelwerte (100 000 – 300 000 g/mol) ermittelt. Um solche Molmassen zu erhalten, müssten die Konjugate an nahezu jeder Glukoseeinheit mit Peptiden substituiert vorliegen.

Bei Verwendung des P2VP-Standards wurden Molmassenmittelwerte zwischen 13 700 - 31 000 g/mol erhalten. Diese Molmassen sind hierbei mit Vorsicht zu betrachten, da das hydrodynamische Volumen des P2VPs nicht mit dem der Dextrankonjugate übereinstimmen muss. Dennoch liegen die Molmassenmittelwerte etwa im selben Bereich, wie die in Kapitel 3.2.2 berechneten Molmassen. Die Abweichungen des M_w zu den per Absorption berechneten Molmassen (ΔM) sind ebenfalls in **Tabelle 7** angegeben. Hierbei ist zu sehen,

dass zwei Drittel der vermessenen Substanzen eine Abweichung unter 15 % aufwiesen. Die übrigen Substanzen besaßen Abweichungen zwischen 17 – 25 %. Als einziger großer Unterschied fiel das hochbeladene Konjugat **K10** auf, welches eine Abweichung von knapp 40 % aufwies. In diesem Fall könnte die hohe Beladung (9,9 hochaffine Peptide **9** und 1,8 Lys(RhB Pip)TAT-NLS Peptide **20**) auch ein Grund für die hohe Abweichung sein, da sie höchstwahrscheinlich das hydrodynamische Volumen des Konjugats stark beeinflusst.

Alles in allem konnte aber eine gewisse Tendenz bei den Konjugaten gesehen werden, die die in Kapitel 3.2.2 verwendete Analysemethodik bestärkt.

Abschließend zeigte ein Blick auf die hier erhaltenen PDIs eine recht breite Verteilung der Molmassen. Dieses ist jedoch nicht unerwartet, da bereits das Startmaterial einen PDI von 1,76 aufwies und die Reaktionen rein statistisch verlaufen. Für die weiterführenden biochemischen Untersuchungen ist dieses jedoch nicht problematisch.

Tabelle 7: Die gemessenen Molmassenmittelwerte M_n , M_w und der Polydispersitätsindex (PDI) der Konjugate angegeben nach steigender Beladung mit hochaffinem Peptid **9**. Die Werte wurden anhand eines P2VP-Polymerstandards bestimmt. Die Molmassenmittelwerte des ungeladenen Dextrans* wurden anhand des Dextranstandards bestimmt. Die Abweichung vom M_w zu den in Kapitel 3.2.2 bestimmten Molmassen ist in Prozent angegeben.

KONJUGAT	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	PDI	ΔM [%]
Dextran (Sigma)*	5 800	10 300	1,76	2,4
K2	7 200	13 700	1,91	14
K3	6 800	13 700	2,02	12
K12	4 400	15 800	3,61	3,7
K4	13 600	28 600	1,59	0,2
K5	12 800	21 400	1,67	24
K6	11 100	21 500	1,94	12
K7	9 800	21 100	2,14	17
K13	9 200	24 200	2,62	3,4
K1	13 100	22 900	1,74	18
K8	14 600	31 000	2,12	1,0
K9	11 900	22 800	1,91	25
K10	14 000	24 300	1,73	40

3.4. Messung der Bindungsaffinitäten mittels isothermaler Titrationskalorimetrie

Die Dissoziationskonstante K_D ist ein Maß für die Affinität zweier Substanzen zueinander. Sie beschreibt wie groß die Neigung zweier Moleküle ist, Bindungen miteinander einzugehen. Bei multivalenten Systemen kann die Bindungsaffinität im Vergleich zu einer monovalenten Bindung der beiden Interaktionspartner stark ansteigen. Dieses wird besonders oft bei biochemischen Protein-Ligand Interaktionen beobachtet, bei denen eine Vielzahl an Wechselwirkungen zwischen den Bindungspartnern zur Bindungsaffinität beitragen.^[9, 13, 188]

Um die Bindungsaffinität der Peptid-Dextran Konjugate zu den Tandem-WW-Domänen des FBP21 zu evaluieren, wurden Bindungsstudien mittels isothermaler Titrationskalorimetrie durchgeführt. Hierfür wurden verschiedene Konjugate verwendet, die zum Teil auch für die Anwendung in der Mikroskopie bestimmt waren (**Tabelle 8**). Die Substanzen in **Tabelle 9** sind als Referenzsubstanzen angedacht, um den Einfluss des Dextrangrundgerüsts und der zellpenetrierenden Peptide auf die Bindungsaffinitäten zu untersuchen.

Tabelle 8: Peptide und Konjugate, die in den ITC-Messungen eingesetzt wurden. Die Konjugate sind mit aufsteigender Beladung des jeweiligen Funktionspeptids geordnet. Manche Konjugate tragen zusätzlich zellpenetrierende Peptide (Lys(RhB Pip)-NLS-TAT **19** oder Lys(RhB Pip)-TAT-NLS **20**) oder Fluorophore (Thiol-RhB Pip **21**).

<u>SUBSTANZ</u>	<u>FUNKTIONSPeptID</u>	<u>ZUSÄTZLICHE BELADUNG</u>
Affines Peptid 8 (W)	WPPPPRVPR	
K14	3,9 W	
K15	4,6 W	
K16	10 W	
Hochaffines Peptid 9 (W ₂)	WPPPPRVPRWPPPPRVPR	
K12	2,3 W ₂	0,2 Thiol-RhB Pip
K17	4,0 W ₂	
K4	4,5 W ₂	1,9 NLS-TAT
K5	4,8 W ₂	1,5 TAT-NLS
K6	5,2 W ₂	0,03 NLS-TAT

<u>K7</u>	5,2 W ₂	0,31 TAT-NLS
<u>K13</u>	5,9 W ₂	0,4 Thiol-RhB Pip
<u>K1</u>	6,1 W ₂	0,44 TAT-NLS
<u>K8</u>	6,3 W ₂	2,2 NLS-TAT
<u>K9</u>	7,2 W ₂	0,4 NLS-TAT
<u>K10</u>	9,9 W ₂	1,8 TAT-NLS

Table 9: Zusätzliche im ITC vermessene Substanzen (Startmaterialien, Konjugate mit zellpenetrierenden Peptiden)

<u>SUBSTANZ</u>	<u>CHARAKTERISTIKA</u>
<u>MID1</u>	Maleinimiddextran
<u>K2</u>	1,1 NLS-TAT
<u>K3</u>	1,0 TAT-NLS

Das für die Bindungsstudien verwendete Protein wurde von Miriam Bertazon (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christian Freund, Freie Universität Berlin) exprimiert und aufgereinigt. Für die ITC-Experimente wurde hierbei nicht das Protein in voller Länge (376 Aminosäuren), sondern lediglich die Sequenz der Tandem-WW-Domänen eingesetzt (88 Aminosäuren). Diese Sequenz (**Abbildung 47**) ist maßgeblich für die Interaktion mit den Prolin-reichen Sequenzen der verwendeten Funktionspeptide verantwortlich (siehe auch Kapitel 1.4).^[81, 83]

G A M A K K R K K D P S K G R **W** V E G I T S E G Y H

FBP21 **Y** **Y** **Y** D L I S G A S Q **W** E K **P** E G F Q G D L K K T A

Sequenz V K T V **W** V E G L S E D G F T **Y** **Y** **Y** N T E T G E S R

W E K **P** D D F I P H

Abbildung 47: Aminosäuresequenz des im ITC verwendeten FBP21. Es wurde nicht das Protein in seiner vollen Länge verwendet, sondern nur die Sequenz der Tandem-WW-Domänen. Die für die Bindung wichtigen Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin und Prolin) wurden farbig markiert.

Für ITC-Experimente ist es wichtig, dass die verwendeten Liganden und Rezeptoren unter möglichst identischen Bedingungen eingesetzt werden. Dieses bezieht sich insbesondere auf das verwendete Lösungsmittel und den pH-Wert der Lösung. Selbst bei einer geringen Abweichung in der Pufferkonzentration oder im pH-Wert kann es zu Mischungseffekten

kommen, die sich durch Wärmeänderung auf das Systems auswirken.^[189] Hierdurch können die erhaltenen K_D -Werte und thermodynamischen Zustandsgrößen mit großen Fehlern behaftet sein. Um dies zu verhindern, ist es wichtig, dass das verwendete Lösungsmittel für beide Substanzen (Konjugat und FBP21) geeignet ist. Um weiterhin Mischungseffekte auszuschließen, wurden als Negativkontrollen jeweils Titrationen der Konjugate in Puffer, Puffer in Protein, sowie Puffer in Puffer durchgeführt.

Generell wurde für die Messungen, wie bereits in Kapitel 1.2.3 beschrieben, der Rezeptor (hier das FBP21) in der Messzelle vorgelegt. Der Ligand (hier das Konjugat) wurde schrittweise über die Nadel hinzu titriert. Durch die Interaktion der Bindungspartner wurde Wärme freigesetzt, welche durch das Gerät kompensiert wurde. Das entsprechende Signal wird gegen die Zeit aufgetragen und man erhält die charakteristischen ITC-Diagramme. In **Abbildung 48** ist beispielhaft das ITC-Spektrum für das affine W-Peptid **8** angegeben, welches gegen die Tandem-WW-Domänen von FBP21 titriert wurde.

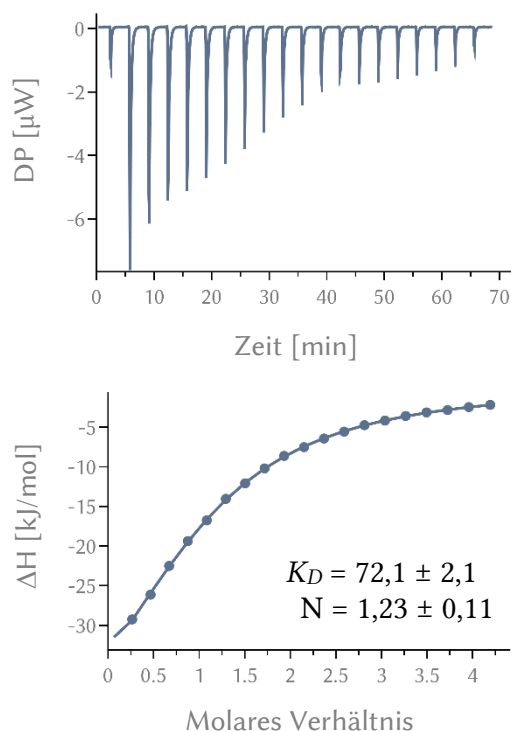


Abbildung 48: ITC-Spektrum des affinen Peptids **8** (2,0 mM) titriert gegen FBP21 (100 µM). Es erfolgte eine exotherme Wärmeänderung, die durch das Gerät ausgeglichen wurde.

Anhand des molaren Verhältnisses und der Form der Bindungsisotherme lässt sich bereits abschätzen, wie stark die Interaktion zwischen dem hier verwendeten affinen W-Peptid **8** und dem FBP21 ist. Da das W-Peptid **8** etwa in einer 20-fach höheren Konzentration als das Protein vorlag, die Bindungsisotherme aber nur einen flachen Anstieg aufwies, lässt

sich hier auf eine eher geringe Bindungsaffinität schließen. Es wurde ein Wert von $72,1 \pm 2,1 \mu\text{M}$ erhalten. Die genauen Werte und Fehlergrenzen aller Bindungsaffinitäten und thermodynamischen Zustandsgrößen können im Anhang 10.2 der **Tabelle A. 1** entnommen werden. Im weiteren Verlauf dieses Kapitels soll weiterführend anhand von Graphen auf die Messdaten eingegangen werden.

Bei der genaueren Betrachtung aller vermessenen Substanzen, zeigte sich, dass die in **Tabelle 9** angegebenen Substanzen keinerlei Bindungsaffinität zum FBP21 aufwiesen (siehe auch Anhang **Abbildung A. 40** – **Abbildung A. 42**). Bei den Verbindungen handelt es sich um das Maleinimidextran **MID1** und jeweils ein Konjugat mit zellpenetrierendem Peptid Lys(RhB Pip)-NLS-TAT **K2** bzw. Lys(RhB Pip)-TAT-NLS **K3**.

Die in **Tabelle 8** angegebenen, gemischt-substituierten Konjugate bestehen aus einer Kombination eines der Funktionspeptide, sowie eines zellpenetrierenden Peptids oder des Fluorophors Thiol-Fluoro **21**. Da weder das Dextrangrundgerüst, noch die zellpenetrierenden Peptide Bindungsaffinitäten zum FBP21 aufwiesen, müssen die für diese Konjugate erhaltenen K_D -Werte von den Funktionspeptiden hervorgerufen werden.

Weiterführend sind die Bindungsaffinitäten der Funktionspeptid-tragenden Konjugate in **Abbildung 49** und **Abbildung 50** aufgetragen. In diesen kann die steigende Bindungsaffinität mit zunehmender Beladung an Funktionspeptiden gesehen werden. Bei Konjugaten mit gleicher Funktionspeptid-Beladung, aber unterschiedlicher Beladung mit zellpenetrierendem Peptid (bspw. **K4** zu **K5** oder **K1** zu **K8**), konnte kein signifikanter Unterschied im K_D -Wert beobachtet werden. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die zellpenetrierenden Peptide keine Bindungsaffinität zu den Tandem-WW-Domänen des FBP21 aufweisen. Weiterhin wurde zwischen Konjugaten mit affinen und hochaffinen Funktionspeptiden unterschieden. Das affine Peptid **8** (WPPPPRVPR) wies einen K_D -Wert von $72,1 \pm 2,1 \mu\text{M}$ auf. Durch Kupplung von etwa vier Peptiden auf Dextrane konnte der K_D -Werte bereits auf $11,9 \pm 2,0 \mu\text{M}$ (**K14**) gesenkt werden. Eine weitere Steigerung der Affinität bei höheren Beladungen war ebenfalls zu sehen ($K_{D, 10 \text{ W-Peptide}} = 1,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$, **K16**). Im direkten Vergleich hierzu steht das hochaffine W_2 -Peptid **9**, welches bereits ohne Dextranbindung einen K_D -Wert von $6,80 \pm 0,43 \mu\text{M}$ aufwies (**Abbildung 50**). Auch hier war eine Zunahme der Bindungsaffinität mit steigender Beladung der Konjugate zu sehen, jedoch war diese weniger stark ausgeprägt. Ab einer Beladung von etwa vier hochaffinen Peptiden (**K17**) wurden K_D -Werte von etwa $2 \mu\text{M}$ erreicht. Die weitere Steigerung der Beladung veränderte den K_D -Wert in geringerem Maße. So wurde beispielsweise bei $6,1$ hochaffinen

Peptiden (**K1**) ein K_D -Wert von $0,88 \pm 0,08 \mu\text{M}$ erhalten, bei 9,9 hochaffinen Peptiden (**K10**) ein K_D -Wert von $0,75 \pm 0,09 \mu\text{M}$.

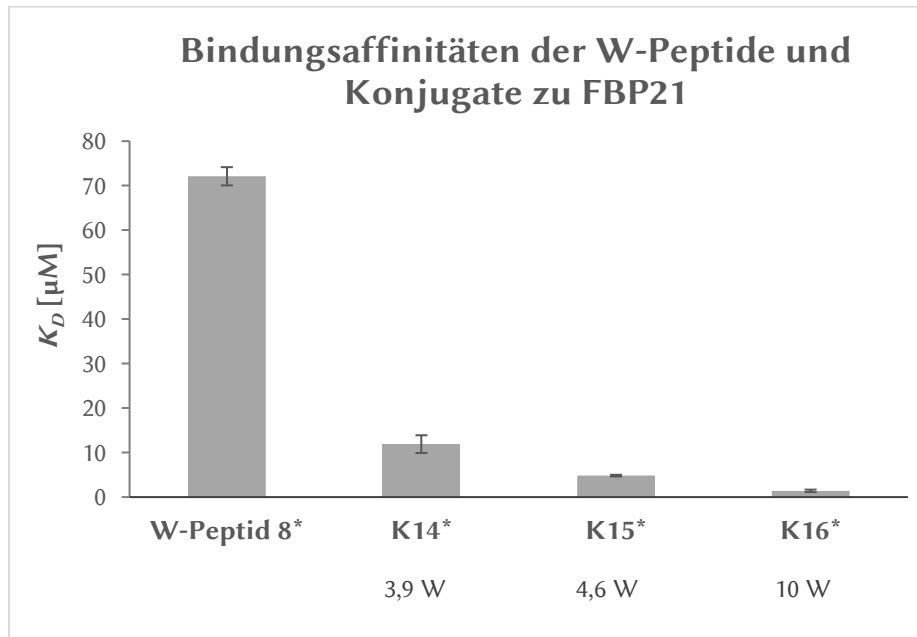


Abbildung 49: Bindungsaffinitäten des affinen W-Peptids **8** und entsprechenden Konjugate **K14** - **K16** bestimmt mittels ITC. Die K_D -Werte sinken mit steigender Beladung. Verbindungen, die mit einem Stern * markiert wurden, wurden mittels ITC200 (Malvern) vermessen.

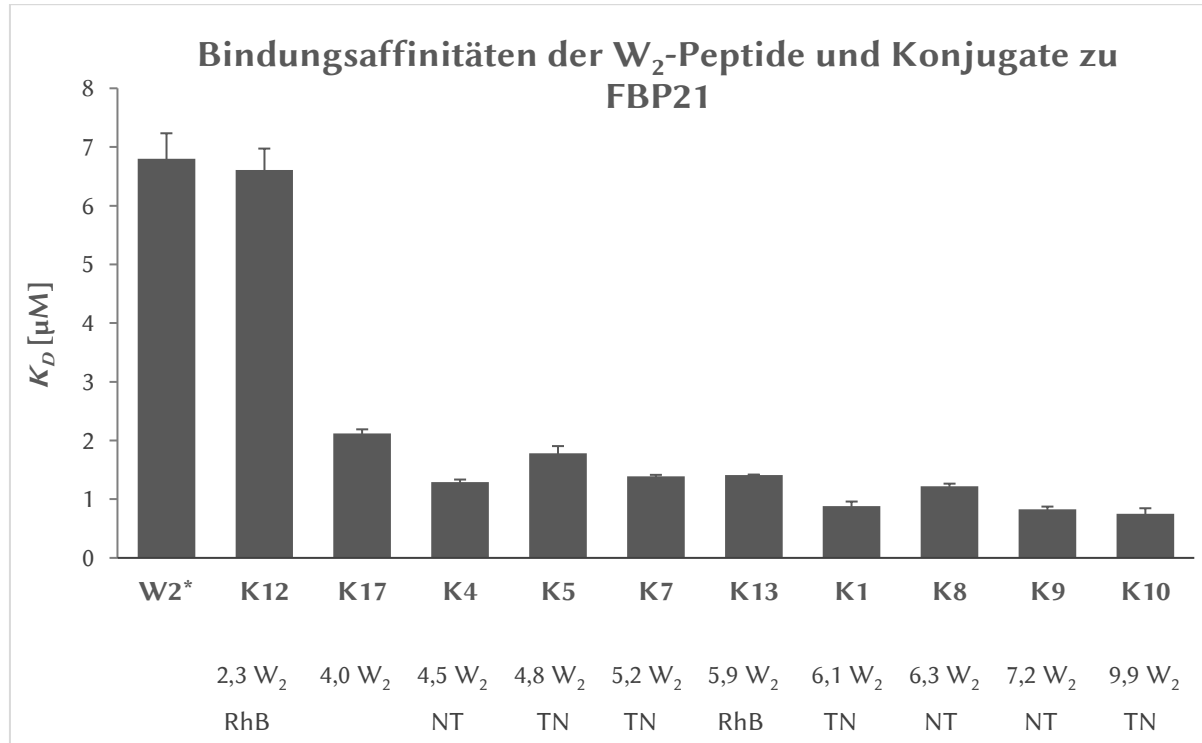


Abbildung 50: Bindungsaffinitäten des hochaffinen W₂-Peptids **9** und der entsprechenden Konjugate bestimmt mittels ITC. Die K_D -Werte sinken mit steigender Beladung. Die Beladung an Fluorophor (RhB) und den zellpenetrierenden Peptiden Lys(RhB Pip)-NLS-TAT (NT), sowie Lys(RhB Pip)-TAT-NLS (TN) ist **Tabelle 8** zu entnehmen. Verbindungen, die mit einem Stern * markiert wurden, wurden

mittels ITC200 (Malvern) vermessen. Alle anderen Verbindungen wurden mit dem PEAQ-ITC (Malvern) vermessen.

Zur einfacheren Übersicht wurden hier die Differenzen der K_D -Werte der Konjugate zum affinen bzw. hochaffinen Peptid in Prozent berechnet (Gleichung (27)). Diese stellen die Aktivitätssteigerung der Konjugate gegenüber dem jeweiligen Funktionspeptid dar.

$$\Delta K_D = 100 \% - \left(\frac{100 \% \cdot K_{D,Konjugat}}{K_{D,Peptid}} \right) \quad (27)$$

Die erhaltenen Werte wurden zusammen mit der Bindungsstöchiometrie (N) in **Tabelle 10** angegeben. Die Konjugate sind hierbei mit steigender Beladung des jeweiligen Funktionspeptids angeordnet. Bei den Konjugaten, die das affine W-Peptid **8** tragen, fiel die Differenz mit steigender Peptidanzahl größer aus als bei den hochaffinen W_2 -Peptid-Konjugaten. Somit ist der kooperative Effekt dieser multivalenten Systeme stärker ausgeprägt. Bei den W_2 -Peptid-Konjugaten wurden ΔK_D -Werte zwischen 55 – 90 % erreicht, was in etwa einer Verdoppelung bis Verzehnfachung der Bindungsaffinitäten entspricht.

Bei Betrachtung der Bindungsstöchiometrien des Systems konnte gesehen werden, dass dieser mit steigender Beladungszahl des jeweiligen Funktionspeptids abnimmt. Durch Verwendung des Kehrwerts der Bindungsstöchiometrie konnte die Anzahl der bindenden Proteine pro Peptid bzw. pro Konjugat erhalten werden.

Das affine W-Peptid **8** bindet widererwartend nicht im Verhältnis 1:1 zum FBP21, sondern zeigt eine Stöchiometrie von 1,23. Dieses entspricht im Mittel 0,8 gebundenen Proteinen pro W-Peptid. Eine Abweichung von den erwarteten Werten kann dadurch erklärt werden, dass das Protein eine geringere bzw. das Peptid eine höhere Konzentration als angenommen aufwies. Die erhaltenen Bindungsstöchiometrien wurden für die weitere Betrachtung normiert.

Es konnte weiterführend gesehen werden, dass das hochaffine Peptid **9** mit etwa 1,6 Proteinen interagiert. Somit kam beim affinen Peptid **8** eine 1:1 Bindung zwischen Peptid und Protein vor, wobei das Peptid an eine der beiden Bindungsstellen des Proteins binden kann. Das hochaffine Peptid **9** schien eine etwas höhere Stöchiometrie aufzuweisen. Bei einem Wert von 1,6 Proteinen pro Peptid ist die Möglichkeit gegeben, dass das hochaffine Peptid **9** beide Bindungsstellen gleichzeitig bindet bzw. ein hochaffines Peptid jeweils eine Bindungsstelle von zwei Proteinen bindet. Weiterhin ist es möglich, dass eine einfache Bindung einer Bindungsstelle des Proteins zu einer Bindungsstelle des Peptids vorlag. In

Lösung können alle drei Bindungszustände parallel zueinander vorliegen, sodass sich der oben genannte Wert ergeben konnte.

Betrachtet man nun die Konjugate, so konnte auch hier gesehen werden, dass mit steigender Beladungszahl mehr Proteine gebunden werden konnten. Bei einer Beladung mit etwa vier affinen W-Peptiden (**K14**) werden im Mittel 3,0 Proteine pro Konjugat gebunden. Während bei einer Beladung mit zehn affinen Peptiden (**K16**) 6,7 Proteine mit dem Konjugat interagieren konnten. Hierbei ist es möglich, dass Proteine an einer oder beiden Bindungsstellen mit dem Konjugat wechselwirken, da dieses ausreichend Interaktionspartner zur Verfügung stellt. Bei den Konjugaten, die das hochaffine W₂-Peptid **9** tragen, war ein ähnliches Verhalten zu beobachten. Auch hier kam es bei einer Beladung mit 9,9 hochaffinen Peptiden (**K10**) zu einer Interaktion mit 6,7 Proteinen. Obwohl ein hochaffines Peptid potentiell mit beiden Bindungsstellen des Proteins wechselwirken könnte, konnte eine erhöhte Proteinbindung im Vergleich zum Konjugat **K16** nicht festgestellt werden. Es scheint somit eine Sättigung erreicht zu werden. Dies könnte daran liegen, dass aus sterischen Gründen keine weiteren Proteine mit dem Konjugat interagieren können. Somit wären nicht alle vorhandenen Peptide an der Bindung beteiligt.

Wie allerdings schon in Kapitel 1.2 beschrieben, binden multivalente Systeme nicht zwangsläufig mit allen beteiligten Rezeptoren bzw. Liganden gleichzeitig. Vielmehr kommt es zu einem Gleichgewicht zwischen Eingehen und Lösen der Interaktionen. Ein Wechsel der Bindungspartner ist somit durchaus denkbar. Diese Variation der Besetzungszustände geht beispielsweise auch in die Entropie eines multivalenten Systems mit ein und wird dort als Aviditätsentropie bezeichnet (siehe Gleichung (8), Kapitel 1.2.2).^[30] Es ist somit vorstellbar, dass die K_D -Werterhöhung der Konjugate bei steigender Beladung auch durch die erhöhte *Rebinding*-Wahrscheinlichkeit des Systems begründet ist. Durch die erhöhte lokale Konzentration an Liganden würde das Protein somit zunehmend stärker an das Konjugat gebunden werden. Durch die Möglichkeit der zweifachen Interaktion des hochaffinen Peptids **9** mit dem FBP21 ist dieser Effekt bei den W₂-Konjugaten im Gegensatz zu den W-Konjugaten verstärkt. Der Vergleich der W₂-Peptid-Konjugate zu den W-Konjugaten gleicher Beladungsanzahl (**K14** zu **K17** oder **K16** zu **K10**) zeigte die erwartete erhöhte Bindungsaffinität der W₂-Konjugate zum FBP21.

Tabelle 10: Gemessene Bindungsaffinitäten und die daraus errechneten ΔK_D -Werte. Zusätzlich sind die (normierten) Bindungsstöcheometrien N und die Anzahl der pro Peptid bzw. Konjugat gebundenen Proteine angegeben. Verbindungen, die mit einem Stern * markiert wurden, wurden mittels ITC200 (Malvern) vermessen.

PROBE	K_D [μM]	ΔK_D [%]	N	$N_{\text{NORM.}}$	BINDENDE PROTEINE PRO SUBSTANZ	
					unnorm.	norm.
Affines Peptid 8 *	72,1		1,23	1,00	0,8	1,0
K14 *	11,9	84	0,40	0,33	2,5	3,0
K15 *	4,82	93	0,33	0,27	3,0	3,7
K16 *	1,40	98	0,19	0,15	5,3	6,7
Hochaffines Peptid 9 *	6,80		0,79	0,64	1,3	1,6
K12	6,61	3,0	0,87	0,71	1,1	1,4
K17	2,12	69	0,37	0,30	2,7	3,3
K4	1,29	81	0,34	0,28	3,0	3,6
K5	1,78	74	0,27	0,22	3,7	4,5
K7	1,39	80	0,31	0,25	3,2	4,0
K13	1,41	79	0,33	0,27	3,0	3,7
K1	0,88	87	0,27	0,22	3,8	4,5
K8	1,22	82	0,23	0,19	4,3	5,3
K9	0,83	88	0,23	0,19	4,3	5,3
K10	0,75	89	0,19	0,15	5,3	6,7

Bei der genaueren Betrachtung der thermodynamischen Zustandsgrößen (**Abbildung 51**) konnte eine starke Zunahme der Bindungsenthalpie und eine Abnahme der Bindungsentropie mit steigender Konjugatbeladung beobachtet werden. Während die ungebundenen Funktionspeptide (**8** und **9**) nur geringe Bindungsenthalpien und Bindungsentropien besaßen ($\Delta H_{\text{W}} = -55,5 \pm 0,4$ kJ/mol, $-\text{T}\Delta S_{\text{W}} = 31,9 \pm 0,5$ kJ/mol und $\Delta H_{\text{W}_2} = -76,0 \pm 0,9$ kJ/mol, $-\text{T}\Delta S_{\text{W}_2} = 46,5 \pm 0,4$ kJ/mol), stiegen bei den Konjugaten die Bindungsenthalpien auf Werte zwischen -129 bis -280 kJ/mol an. Für die hochbeladenen Konjugate mit 10 affinen W-Peptiden (**K16**) und 9,9 hochaffinen W_2 -Peptiden (**K10**) wurden sogar Bindungsenthalpien von -397 und -359 kJ/mol erhalten.

Die Bindungsentropien nahmen für die Konjugate stark negative Werte an. Dies kann mit der stärkeren Interaktion der Konjugate mit dem FBP21 im Gegensatz zu den ungebundenen Peptiden begründet werden. Das entsprechende Konjugat wird durch diese stärkere Interaktion wahrscheinlich in eine rigidere Konformation gezwungen und verliert somit an Flexibilität. Durch die starke Enthalpiezunahme durch Addition der einzelnen Bindungsevents und die gleichzeitige Entropieabnahme des Systems liegt, wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, eine Enthalpie-Entropie-Kompensation vor.^[35]

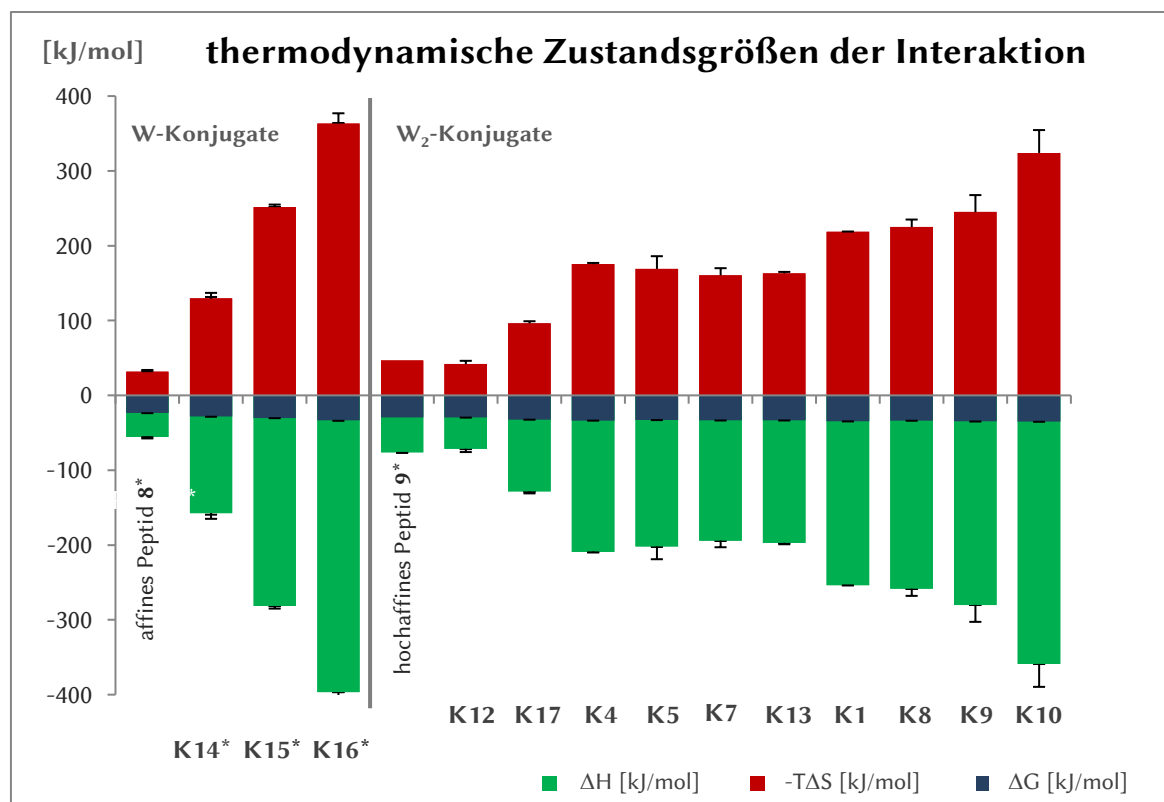


Abbildung 51: Thermodynamische Zustandsgrößen der Funktionspeptide und -tragenden Konjugate. Die Beladung mit Funktionspeptiden nimmt jeweils von links nach rechts zu. Verbindungen, die mit einem Stern * markiert wurden, wurden mittels ITC200 (Malvern) vermessen. Die starke Abnahme der Bindungsentropien mit zunehmender Konjugatbeladung kompensierten die ansteigenden Bindungsenthalpien.

Abschließend lieferte der Vergleich der in dieser Arbeit synthetisierten Substanzen mit der Literatur eine gute Einschätzung der Qualität unserer Inhibitoren. Wie schon in Kapitel 2.1 beschrieben, wurden einige multivalente Inhibitoren für die Tandem-WW-Domänen des FBP21 von Koschek und Henning *et al.* entwickelt und in Bindungsstudien eingesetzt. Der Vergleich von drei Polymergrundgerüsten zeigte eine Aggregatbildung der pHMA- und hPG-Konjugate und somit eine Präferenz für die Peptid-Dextrankonjugate. Bei Verwendung des Funktionspeptids CGPPPRGPPPR ($K_{D,Peptid} > 1$ mM) konnten K_D -

Werte für die Konjugate von $1,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$ erhalten werden.^[26] Die hPG-Konjugate von Henning *et al.*, die das affine W-Peptid **8** ($K_{D,Peptid} > 155 \mu\text{M}$) trugen, erreichten hingegen nur K_D -Werte von $17,6 \pm 0,02 \mu\text{M}$. Dieses bestätigte weiterhin die Wahl des Dextrans als Grundgerüst.^[99] Durch die Kombination dieser beiden Systeme konnten die zuvor erreichten Bindungsaffinitäten nochmals verstärkt werden. Bei Verwendung des affinen Peptids **8** (WPPPPRVPR) und des hochaffinen Peptids **9** (WPPPPRVPRWPPPPRVPR) konnten mit zunehmender Konjugatbeladung steigende Bindungsaffinitäten bis zu $1,40 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ($K_{D,W-Konjugat}$) und $0,75 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ($K_{D,W2-Konjugat}$) gesehen werden. Die hier synthetisierten Inhibitoren sind somit die potentesten, existierenden, multivalenten Inhibitoren der Tandem-WW-Domänen des FBP21.

Weiterhin zeigte die zusätzliche Verwendung von zellpenetrierenden Peptiden keinen Einfluss auf die Bindungsaffinitäten zum FBP21. Somit konnten die synthetisierten Konjugate im weiteren Verlauf der Arbeit ohne Bedenken für die konfokalmikroskopischen Untersuchungen eingesetzt werden (Kapitel 3.6). Die Untersuchung der zellulären Aufnahme der Konjugate und die Evaluierung der Funktionalität mittels *in vitro* Splicing- und Pulldown-Assays (Kapitel 3.7 und 3.8) sind hierbei von bedeutendem Interesse, da bislang ausschließlich Bindungsstudien der multivalenten FBP21-Inhibitoren literaturbekannt sind.

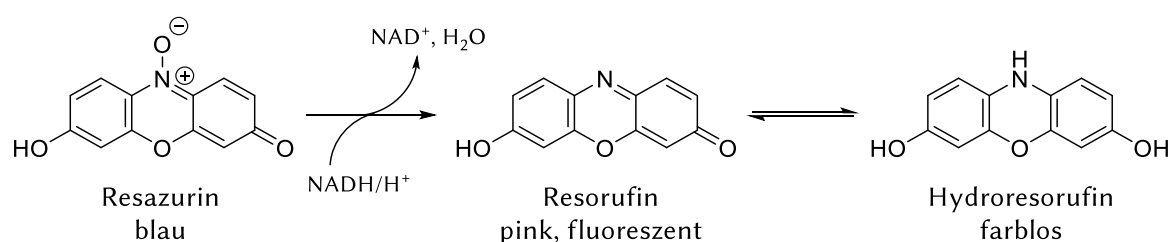
3.5. Zytotoxizitätsbestimmungen

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte die zelluläre Aufnahme und Verteilung der Konjugate *in vivo* bestimmt werden. Hierfür sollten jedoch zuerst Zytotoxizitätsbestimmungen durchgeführt werden, um den Einfluss der Konjugate auf die Zellen zu bestimmen. Weiterhin sollte der verwendbare Konzentrationsbereich der Konjugate für die mikroskopischen Aufnahmen ermittelt werden. Dieses ist insbesondere für die zellpenetrierenden Peptide von Bedeutung, da in der Literatur viele verschiedene Angaben zu Zytotoxizitäten zu finden sind und diese somit nicht leichtthin abgeschätzt werden können.^[139-140, 142]

Zur Bestimmung der Zytotoxizität beziehungsweise der Zellviabilität gibt es mehrere standardisierte Assayverfahren, die für verschiedene Systeme unterschiedlich gut geeignet sind. Hierbei unterscheidet man zwischen Assays, die bestimmen, ob Zellen leben und sich proliferieren oder ob Zellen unter Einfluss von Substanzen sterben.^[190]

Für die Bestimmung der Zellviabilität haben sich einige Verfahren besonders etabliert. Zu diesen zählen die in dieser Arbeit verwendeten Resazurin- und ATP/Luciferase-Assays, welche die metabolische Aktivität von Zellen messen.

Der Resazurin-Assay beruht auf der Reduktion des zellgängigen Farbstoffes Resazurin durch zelleigenes NADH/H^+ zum fluoreszenten Resorufin (**Schema 8**). Die entstehende Fluoreszenz kann als Maß für die Zellviabilität genommen werden, da diese Reduktion nur bei lebenden Zellen stattfinden kann. Es kann wiederum keine Aussage über die Proliferation der behandelten Zellen gemacht werden, da der Resazurin-Assay nicht zwischen zu Beginn des Assays ausgesäten und durch Proliferation neu entstandenen Zellen unterscheiden kann.^[191]



Schema 8: Resazurin-Reduktion durch NADH/H^+ zum fluoreszenten Resorufin. Eine zweite, reversible Reduktion zum farblosen Hydroresorufin ist ebenfalls möglich.

Die Beladung der für die Zellassays verwendeten Konjugate können im Konjugatbeladungs-Inhaltsverzeichnis (Seite X) nachgeschlagen werden. Es handelt sich hierbei um die Konjugate, die bereits in Kapitel 3.2.2 (**Tabelle 5**) mittels Absorptionsspektroskopie analysiert wurden. Weiterhin wurde zur zusätzlichen Untersuchung des zytotoxischen Effekts der Rhodamin B-Derivate der Fluorophor **15** (Bernsteinsäure Rhodamin B-Piperazinamid, **Abbildung 52**) verwendet. Da dieser Fluorophor an die zellpenetrierenden Peptide gekuppelt ist, sollte ein möglicher zytotoxischer Effekt durch diesen Baustein untersucht werden.

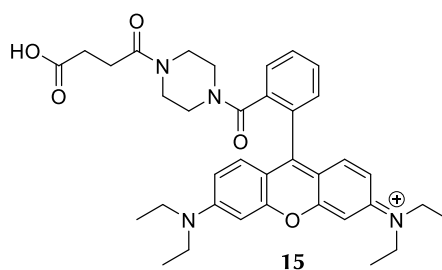


Abbildung 52: Bernsteinsäure Rhodamin B-Piperazinamid **15** wurde zur Untersuchung des zytotoxischen Effekts der Fluorophore auf Zellen verwendet.

Für den Resazurin-Assay wurden HEK293-Zellen ausgewählt und mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Die Umsetzung des Resazurins zu Resorufin ist Zelltyp- und Zellkonzentration-abhängig, da sie von der Metabolismusrate der Zellen abhängt.^[192] Der Einfluss der Substanzen auf das Resazurin wurde in Abwesenheit der Zellen untersucht und zeigte mit Ausnahme des reaktiven Maleinimidextrans **4** nur vernachlässigbare Werte (Anhang 10.3). Somit konnte der Resazurin-Assay ohne weiter Bedenken durchgeführt werden.

Die Umsetzung des Resazurins (570 nm) zu Resorufin (600 nm) wurde mittels Absorptionsmessungen verfolgt. Hierfür wurde die Absorption der Zelllösung zu verschiedenen Zeitpunkten bei 600 nm gemessen bis eine Wertekonstanz erreicht wurde. Die Umsetzung des Resazurins zu Resorufin erfolgte selbst bei unbehandelten Zellen (Positivkontrolle) erst im Laufe von 24 h – 72 h zu einem signifikanten, messbaren Anteil. Somit mussten für den Assay entsprechend lange Inkubationszeiten gewählt werden. Es konnte beobachtet werden, dass im Laufe der Inkubationszeit die Farbe der Lösungen in einigen Proben langsam von blau nach pink wechselte (**Abbildung 53**). Dieses deutet auf eine erfolgreiche Reduktion des Resazurins hin und somit auf eine metabolische Aktivität der vorliegenden lebenden Zellen. Die verbleibenden blauen Lösungen zeigten eine Zelltoxizität auf, da hier die metabolische Aktivität der Zelle und somit die Reduktion des Resazurins ganz oder teilweise gehindert wurde.

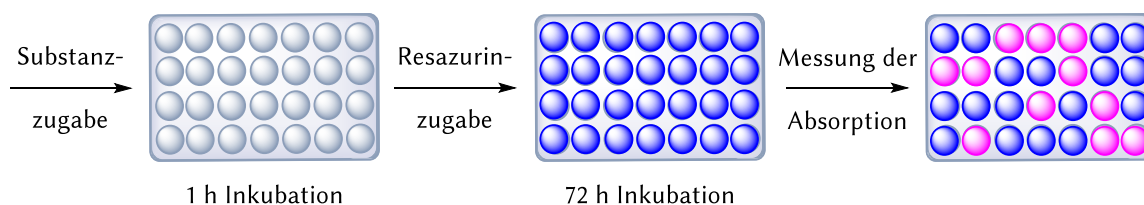


Abbildung 53: Schematische Darstellung der Assaydurchführung. Zuerst wurden die Zellen in 96-Wellplatten ausgesät und nach abgeschlossener Inkubationszeit (1 h) mit den entsprechenden Substanzen versetzt. Nach Zugabe des blauen Farbstoffs Resazurin, wurden die Zellen erneut inkubiert. Im Laufe der Zeit konnte bei manchen Wells eine pinke Verfärbung festgestellt werden. Die entsprechenden Wells enthielten lebende Zellen, während die verbleibenden blauen Wells eine Zelltoxizität der zugegebenen Substanzen anzeigten. Die Zellviabilitäten wurden durch Messung der Absorption (600 nm) und Vergleich mit der Positivkontrolle bestimmt.

Aufgrund ihrer Bestimmung für die Konfokalmikroskopie, trugen die zu untersuchenden Konjugate selbst Rhodamin B-Derivate, die als Fluorophore in der Mikroskopie wirken sollten (siehe auch Kapitel 3.2.2 und 3.6). Diese Derivate haben eine ungefähre Anregungswellenlänge von 566 nm und eine Emissionswellenlänge von 590 nm.^[177]

Da Resorufin selbst einen Anregungswellenlängenbereich von 530 – 560 nm und eine Emissionswellenlänge von 590 nm aufweist, kann es somit leicht zur Fluoreszenzlöschung zwischen diesen beiden Substanzen kommen. Eingestrahlte Energie könnte somit ganz oder teilweise auf den zweiten Fluorophor übertragen werden, wodurch es bei der emittierten Fluoreszenz zu einem unbestimmten Fehler in der gemessenen Intensität kommen würde.

Um dieses zu vermeiden, wurde als analytische Messmethode auf die Absorption zurückgegriffen, da diese von einem Löschungseffekt nicht betroffen ist. Da die Absorption des Resazurins und Resorufins bei 570 und 600 nm gemessen wird, musste zusätzlich für die Auswertung eine Negativkontrolle der Fluorophor-haltigen Substanzen ohne Resazurininlösung aufgenommen werden. Diese wurde von den erhaltenen Absorptionswerten abgezogen, da sich die Gesamtabsorption additiv aus den beiden Anteilen zusammensetzt (Gleichung (28)).^[181]

$$A_{ges} = A_{Resazurin} + A_{RhB\ Pip} \quad (28)$$

Die erhaltenen Zellviabilitäten nach 72 h Inkubationszeit ab Resazurinzugabe sind in **Abbildung 54** und **Tabelle A. 2** im Anhang 10.4 zu sehen. Die erhaltenen Absorptionen wurden in Triplikaten gemessen und der Mittelwert unter Einbeziehen von Gleichung (28) korrigiert. Aus den so erhaltenen, korrigierten Absorptionswerten wurden die Zellviabilitäten in Prozent berechnet. Als Positivkontrolle wurde die Absorption von Inhibitor-unbehandelten Zellen, denen Resazurin hinzugesetzt wurde, verwendet. Ihre Absorption wurde als 100 % Zellviabilität angesehen.

Es ließ sich erkennen, dass die Langzeit-Zellviabilität der Zellen bei höheren Konzentrationen bei fast allen untersuchten Substanzen gering ausfielen. Die geringste Zytotoxizität bei 50 µM ließ sich beim verwendeten Fluorophor **15** (68 % Zellviabilität) und dem Malein-imiddextran **4** (**MID1**) (63 % Zellviabilität) verzeichnen. Weiterhin wiesen die Konjugate **K2** und **K3**, welche nur ein zellpenetrierendes Peptid und keine hochaffinen Peptide trugen, bei allen Konzentrationen eine Zellviabilität von etwa 30 % auf. Die restlichen Konjugate zeigten alle starke Zytotoxizität bei Konzentrationen ≥ 10 µM.

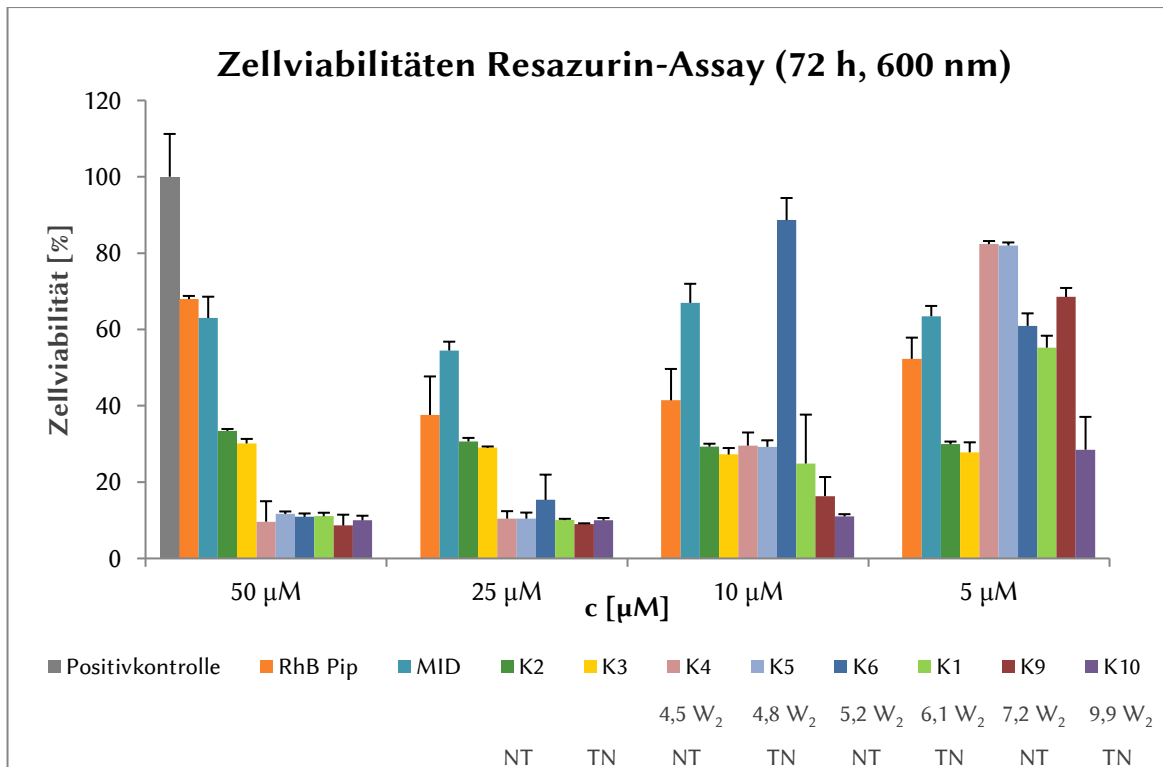


Abbildung 54: Zellviabilitäten bestimmt aus den Absorptionswerten gemessen nach 72 h. Als Positivkontrolle (100 %) wurde die Absorption der Inhibitor-unbehandelten Zellen + Resazurin verwendet. Die zu untersuchenden Substanzen wurden in verschiedenen Konzentrationen (50 µM, 25 µM, 10 µM und 5 µM) vermessen. Die Beladung der zellpenetrierenden Peptide Lys(RhB Pip)-NLS-TAT (NT), sowie Lys(RhB Pip)-TAT-NLS (TN) ist dem Konjugatbeladungs-Inhaltsverzeichnis (Seite X) zu entnehmen.

Bei einer Konzentration von 5 µM wiesen die meisten vermessenen Konjugate eine Zellviabilität um die 60 % auf (**Abbildung 55**). Als Ausnahme konnten hier die Konjugate **K4** und **K5** verzeichnet werden, welche eine Zellviabilität von etwa 80 % zeigten. Sie besitzen eine geringere Beladung mit hochaffinem Peptid **9** (4,5 und 4,8 Peptide pro Dextran). Im Vergleich war das hochbeladene Konjugat **K10** (9,9 Peptide pro Dextran) stark zytotoxisch mit einer Zellviabilität von 28 %. Es ist besonders bemerkenswert, dass die Zytotoxizität mit der Anzahl der gekuppelten hochaffinen Peptide **9** zu steigen schien. Der Einfluss der zellpenetrierenden Peptide schien hingegen geringer zu sein. Dieses kann man an der hohen Zellviabilität der Konjugate **K4** und **K5** sehen, die mit 1,5 bzw. 1,9 zellpenetrierenden Peptiden (Lys(RhB Pip)TAT-NLS **20** und Lys(RhB Pip)NLS-TAT **19**) beladen sind. Wie bereits oben beschrieben, wiesen sie aber nur eine geringe Beladung mit hochaffinem Peptid **9** auf. Das vergleichsweise zytotoxischere Konjugat **K1** besitzt nur 0,44 zellpenetrierende Peptide, aber dafür 6,1 hochaffine Peptide. Ein möglicher Grund für die hohe Zytotoxizität wäre die biologische Aktivität der Funktionspeptide, welche durch die Inhibition des

mRNA-Splicingproteins FBP21 Einfluss auf die Zellproliferation und die metabolische Aktivität der Zellen nehmen könnte.

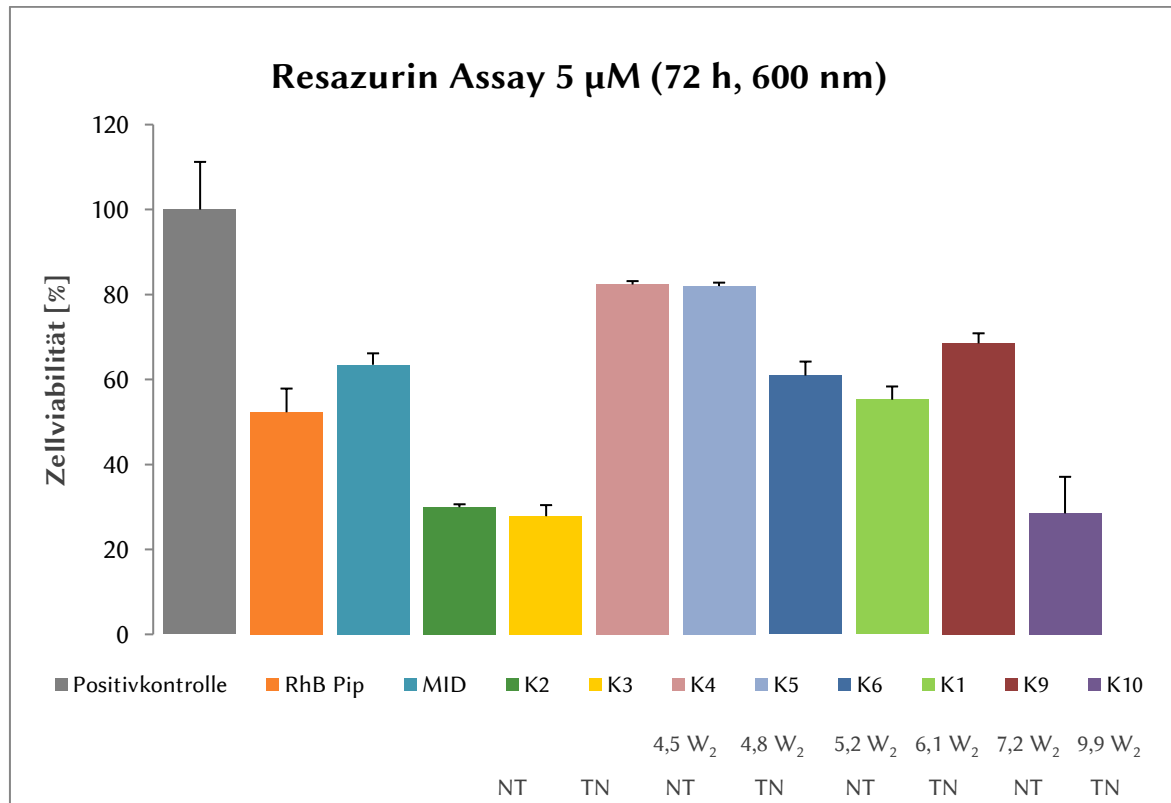
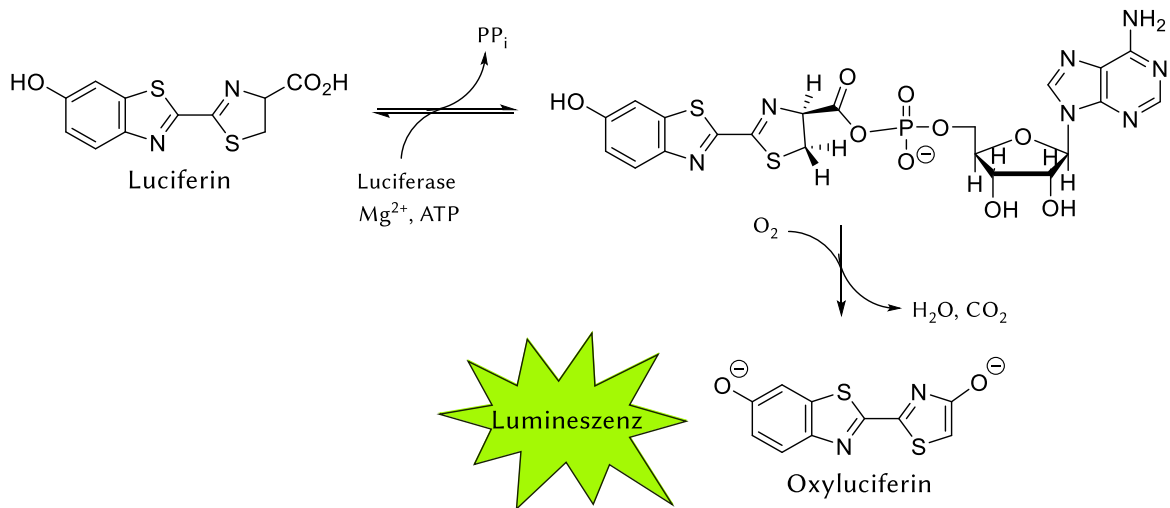


Abbildung 55: Auftragung der Zellviabilität der untersuchten Substanzen (5 µM). Die Zellviabilität lag bei den meisten Verbindungen um die 60 %. Das hochbeladene Konjugat **K10** und das Konjugate **K2** und **K3** wiesen eine sehr geringe Zellviabilität von etwa 30 % auf. Weiterhin waren die niedrigbeladenen Konjugate **K4** und **K5** kaum zytotoxisch.

Der durchgeführte Resazurin-Assay gibt aufgrund seiner langen Entwicklungsdauer nur eine Aussage über Langzeit-Zytotoxizitäten. Bei den geplanten Mikroskopieaufnahmen werden wiederum nur Inkubationszeiten von 1-2 Stunden verwendet, somit ist die Bestimmung der Zytotoxizitäten in diesem Zeitraum auch von Bedeutung. Um die langen Reaktionszeiten des Resazurin-Assays zu umgehen und somit die Zytotoxizität der verwendeten Substanzen bei kürzeren Inkubationszeiten zu untersuchen, wurde auf einen ATP/Luciferase-Assay zurückgegriffen. Dieser Assay beruht auf der enzymatisch katalysierten Reaktion des Luciferins zum Oxyluciferin. Als Enzym dient hier die Luciferase des Leuchtkäfers *Lampyridae*, welche unter Einsatz von zelleigenem ATP das Luciferin in das gemischte Anhydrid Luciferin-AMP umwandelt. Die anschließende Oxidation durch Luft-sauerstoff und folgende Decarboxylierung liefern das Oxyluciferin im energetisch ange-regten Zustand. Durch Emittierung von Licht geht das Molekül in den Grundzustand über. Dieses kann als Lumineszenz detektiert werden (**Schema 9**).^[193-194]



Schema 9: Reaktionsmechanismus des ATP/Luciferin-Assays. Das Luciferin wird mithilfe der Luciferase des Leuchtkäfers in das Luciferin-Adenylat überführt. Dieses wird durch Oxidation des Luftsauerstoffs und anschließende Decarboxylierung in das energetisch angeregte Oxyluciferin überführt. Unter Emittierung von Licht geht dieses in den Grundzustand über (Abbildung nach Naumov et al.).^[195]

Die in dieser Arbeit verwendete Assaylösung (CellTiter-Glo® 2.0) der Firma Promega enthält Luciferin, eine Temperatur-stabile Luciferase, die für die Luciferase benötigten Magnesiumsalze und eine für die Zellyse benötigte Substanz. Neben ihrer Funktion als Enzym in der Luciferinreaktion, inhibiert die verwendete Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase endogen vorkommende Enzyme wie die ATPase. Hierdurch wird ein Abbau des zelleigenen ATPs vor seiner Verwendung im Assay verhindert. Das Lumineszenzsignal erreicht hierdurch eine Halbwertszeit von drei Stunden.^[196]

Für den Assay wurden HeLa-Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert (**Abbildung 56**). Diese Inkubation bei Raumtemperatur war hierbei nötig, da die Luciferase nicht Temperatur-stabil oberhalb 30°C ist. Nach Zugabe des Assaykits wurde die Zellyse durch Rotation auf einem Horizontalschüttler beschleunigt. Nach anschließender 40 min Inkubation bei Raumtemperatur zur Stabilisierung des Lumineszenzsignals wurde dieses schließlich vermessen. Die insgesamt Inkubationszeit der Substanzen betrug somit etwa 90 min.

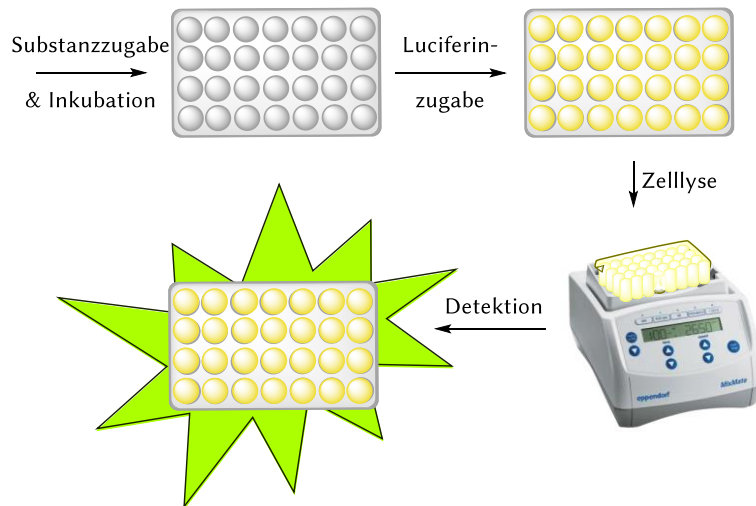


Abbildung 56: Schematische Darstellung der ATP/Luciferase-Assaydurchführung. Die Zellen wurden über Nacht ausgesät und anschließend mit Substanzen versetzt. Nach 45 min Inkubationszeit wurde das Luciferin-Assaykit hinzugegeben und die Zellyse eingeleitet. Die Detektion erfolgte nach einer zusätzlichen Inkubationszeit, bei der sich das Lumineszenzsignal stabilisierte.

Die Lumineszenz der Inhibitor-unbehandelten, nur mit Assaykit versehenen Zellen wurde als Positivkontrolle angenommen und diente im Vergleich als 100 % Zellviabilität. Die Zellviabilitäten der affinen **8** und hochaffinen **9** Funktionspeptide, sowie von sieben Konjugaten ohne zellpenetrierende Peptide wurde in **Abbildung 57** aufgetragen. Die Beladungen der hier verwendeten Konjugate wurden mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt und sind nachfolgend in **Tabelle 11** angegeben.

Tabelle 11: Beladung der Konjugate mit W_1 - und W_2 -Funktionspeptid.

<u>KONJUGAT</u>	<u>AFFINES PEPTID (W)</u>	<u>HOCHAFFINES PEPTID (W₂)</u>	<u>MOLMASSE [g/mol]</u>
<u>K18</u>	2,2		14 900
<u>K19</u>	4,8		18 000
<u>K20</u>	6,6		20 100
<u>K21</u>	7,1		20 700
<u>K22</u>		2,0	16 900
<u>K23</u>		3,2	19 600
<u>K24</u>		5,9	25 800

Die Zellviabilitäten der beiden Funktionspeptide und der Konjugate, die das affine Peptid **8** tragen, waren sehr gut. Sie lagen generell bei allen verwendeten Konzentrationen

(25 μM , 5 μM , 1 μM , 0,5 μM) um 100 %. Die Konjugate, die das hochaffine W_2 -Peptid **9** gekuppelt haben, wiesen mit zunehmender Anzahl Peptide eine erhöhte Zelltoxizität auf. Das Konjugat **K22**, welches 2 Peptide trägt, wies keine Zytotoxizität auf. Bei den anderen beiden Konjugaten (**K23** und **K24**) war bei Konzentrationen $\geq 5 \mu\text{M}$ eine Zellviabilität zwischen 20 – 40 %, sowie 40 – 80 % zu sehen. Die genauen Zellviabilitäten aller Verbindungen können im Anhang (Kapitel 10.4) in **Tabelle A. 3** eingesehen werden.

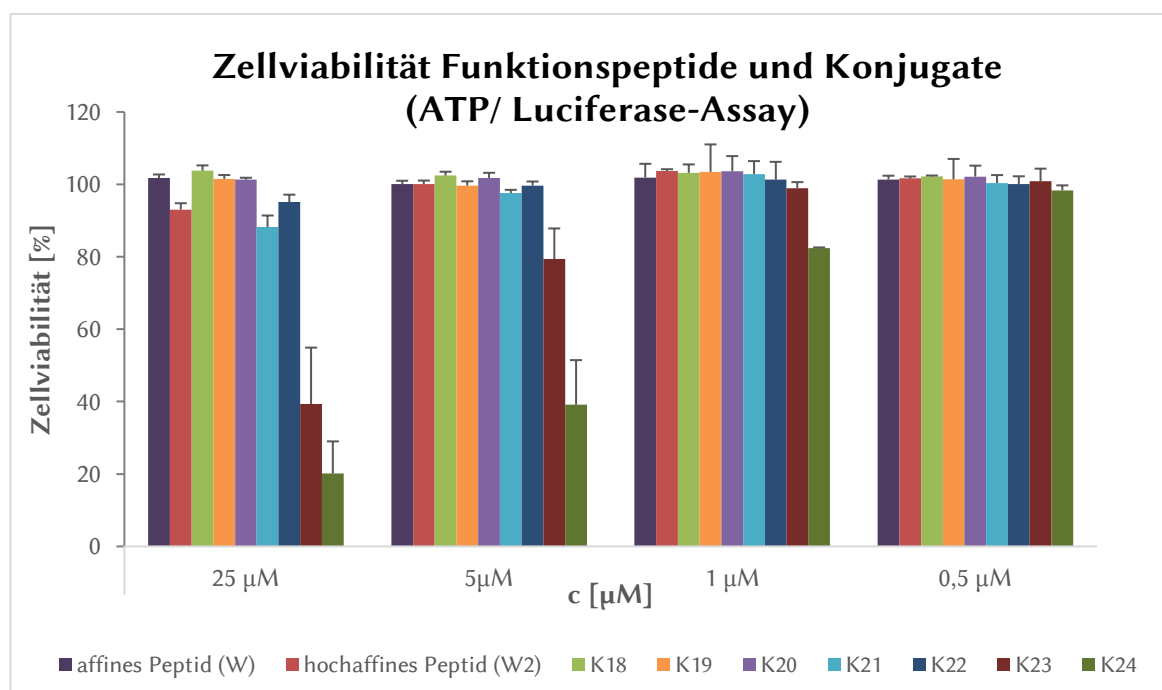


Abbildung 57: Zellviabilität der Funktionspeptide und verschiedener, nur Funktionspeptide-tragender Konjugate. Generell sind die Zellviabilitäten sehr gut.

Weiterhin wurden die Zellviabilitäten der potentiell zellgängigen Konjugate, die zusätzlich auch zellpenetrierende Peptide trugen, anhand des ATP/Luciferase-Assays bestimmt. Die Substanzen wurden in 25 μM und 5 μM Konzentration (**Abbildung 58**), sowie 1 μM und 0,5 μM (**Abbildung 59**) verwendet. Die Beladungen der Konjugate können im Konjugatbeladungs-Inhaltsverzeichnis (Seite X) nachgeschlagen werden.

Die Zytotoxizitäten der Konjugate auf HeLa-Zellen war bei den hohen Konzentrationen unterschiedlich stark ausgeprägt. Bei Konzentrationen von 25 μM wies nur das Maleinimidextran **MID1** eine Zellviabilität von etwa 100 % auf. Die beiden Konjugate **K2** und **K3**, die jeweils nur ein zellpenetrierendes Peptid tragen, besaßen eine mittlere Zellviabilität (24 – 43 %). Im Vergleich hierzu wies Konjugat **K11**, welches nur ein Fluorophor trägt, eine höhere Zellviabilität (75 %) auf. Somit sollte vom Dextran-gebundenen Fluorophor eine nur geringe Zytotoxizität ausgehen. Der ausschlaggebende Anteil der Zytotoxizität

der Konjugate **K2** und **K3** muss somit von der zellpenetrierenden Sequenz ausgehen. Die Konjugate (**K4** – **K10**), die sowohl zellpenetrierende Peptide als auch hochaffine Peptide **9** tragen, besaßen eine hohe Zytotoxizität bei 25 μM .

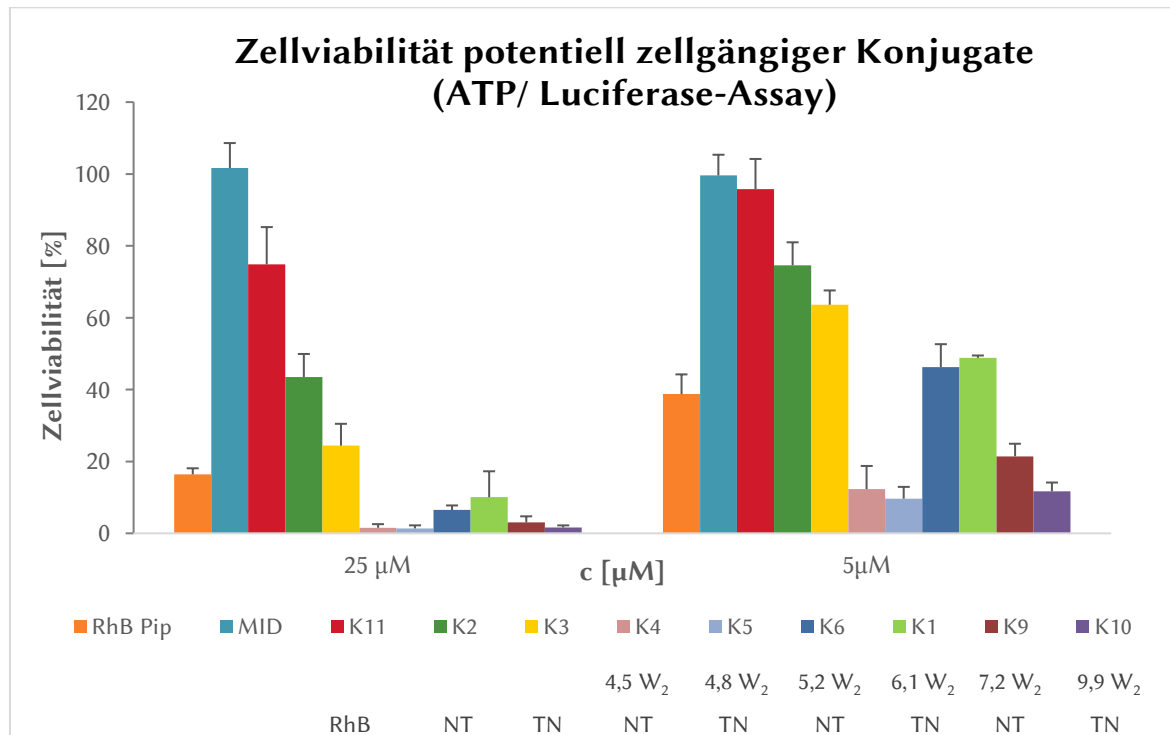


Abbildung 58: Zellviabilitäten der potentiell zellgängigen Konjugate (5 μM und 25 μM) geordnet von links nach rechts nach steigender Beladung mit hochaffinem Funktionspeptid **9**. Die Beladung an Fluorophor (RhB) und den zellpenetrierenden Peptiden Lys(RhB Pip)-NLS-TAT (NT), sowie Lys(RhB Pip)-TAT-NLS (TN) ist dem Konjugatbeladungs-Inhaltsverzeichnis (Seite X) zu entnehmen. Die Zellviabilitäten bei hohen Konzentrationen waren für die Funktionspeptid-tragenden Konjugate gering.

Bei Konzentrationen von 1 μM und 0,5 μM wiesen alle untersuchten Konjugate eine Zellviabilität $\geq 70\%$ auf. In diesem Fall waren die Konjugate, die eine hohe Anzahl an zellpenetrierenden Peptiden tragen (**K4**, **K5** und **K10**), zytotoxischer. Die Anzahl der Funktionspeptide scheint in diesem Konzentrationsbereich eine untergeordnete Rolle zu spielen. Dieses ist an der vergleichsweise hohen Zellviabilität der Konjugate **K6**, **K9** und **K1** zu sehen. Sie alle tragen eine höhere Anzahl an hochaffinen und eine geringere Anzahl an zellpenetrierenden Peptiden als **K4** und **K5**. Trotzdem ist ihre Zytotoxizität geringer.

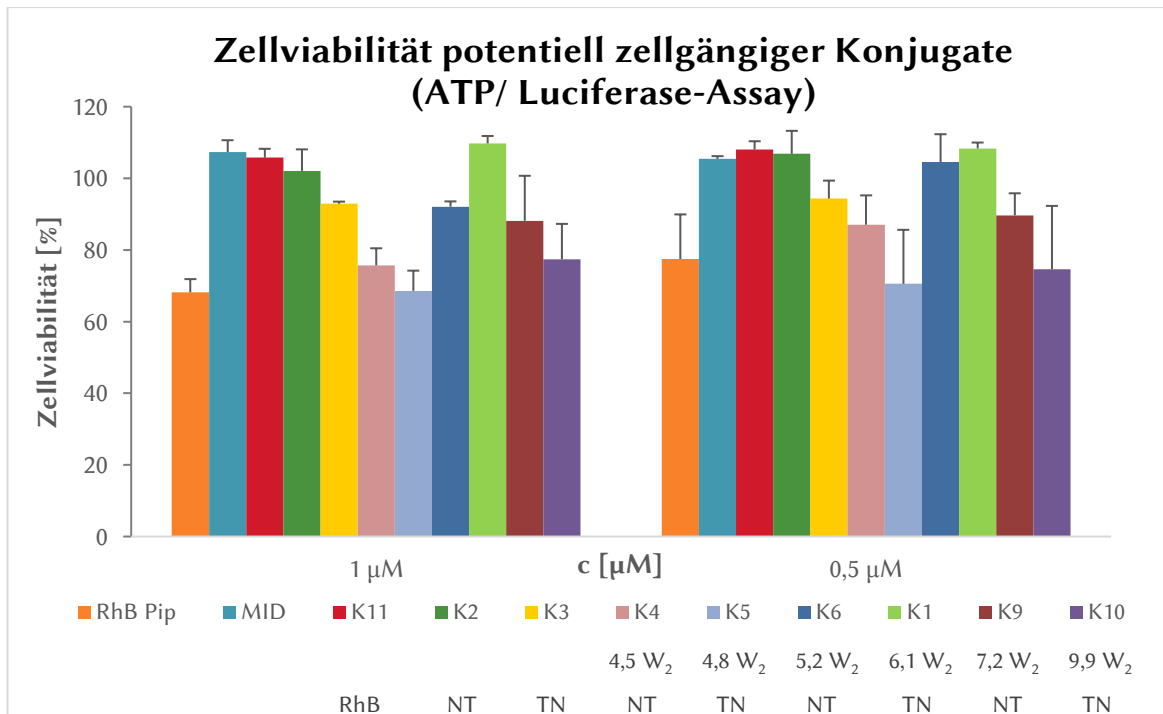


Abbildung 59: Zellviabilitäten der potentiell zellgängigen Konjugate (0,5 µM und 1 µM) geordnet von links nach rechts nach steigender Beladung mit hochaffinem Funktionspeptid. Die Beladung an Fluorophor (RhB) und den zellpenetrierenden Peptiden Lys(RhB Pip)-NLS-TAT (NT), sowie Lys(RhB Pip)-TAT-NLS (TN) ist dem Konjugatbeladungs-Inhaltsverzeichnis (Seite X) zu entnehmen. Die Zellviabilitäten bei niedrigen Konzentrationen sind generell hoch.

Der im Resazurin-Assay gesehene zytotoxische Langzeiteffekt, welcher hauptsächlich von den Funktionspeptiden abhängig war, konnte bei geringen Inkubationszeiten im ATP/Luciferase-Assay nur bei hohen Konzentrationen (25 µM) gesehen werden. Bei geringen Konzentrationen scheint die Zytotoxizität hauptsächlich von den zellpenetrierenden Peptiden auszugehen. Dieses bestätigt die Vermutung, dass die Zytotoxizität in den Langzeitstudien durch eine biologische Aktivität hervorgerufen wird und potentiell die Zellproliferation beeinflusst. Bei einer Inkubationszeit von 90 min würde dieser Effekt keine Rolle spielen.

Für die weiterführenden mikroskopischen Untersuchungen wurden HeLa-Zellen verwendet, da diese sich in der Zellkultur besser kultivieren ließen. HEK293-Zellen neigen im Gegensatz zu HeLa-Zellen zu starker Aggregation, sodass sie mikroskopisch schlechter zu untersuchen sind. Weiterhin wurden die Konjugate mit hochaffinen W₂-Peptiden **9** ausgewählt, da sie im Allgemeinen höhere Zytotoxizitäten aufwiesen als die affinen W-Peptide **8**. Im Anbetracht ihrer stärkeren Bindungsaffinitäten (Kapitel 1.1) kann dieses auf eine größere biologische Aktivität hinweisen. Um allerdings den zytotoxischen Effekt auf die Zellen während der Mikroskopie möglichst gering zu halten, wurden Konzentrationen zwischen 10 µM – 1 µM, sowie Inkubationszeiten von 90 min ausgewählt.

3.6. Untersuchung der zellulären Aufnahme der Konjugate mittels Konfokalmikroskopie

Nachdem die Zytotoxizitäten der Konjugate bestimmt wurden, konnten diese im Anschluss in den entsprechenden Konzentrationen in zellbasierten, konfokalmikroskopischen Untersuchungen eingesetzt werden. Die Untersuchung des Aufnahmeverhaltens der synthetisierten Konjugate ist von besonderer Bedeutung, um zu sehen, ob eine Interaktion der Konjugate mit dem FBP21 *in vivo* möglich ist. Das FBP21 befindet sich in den *nuclear speckles* im Zellkern, sodass eine nukleare Aufnahme der Konjugate unabdingbar für eine Interaktion mit diesem ist. Aufgrund ihrer Größe können Dextrane die Zellmembran nicht ohne weiteres durchqueren, sondern werden meist endosomal aufgenommen. Hierbei kann es je nach Ladung und Größe des Dextrans vorkommen, dass dieses nicht aus den Endosomen freigesetzt wird.^[171-173] Die Verwendung eines zellpenetrierenden Peptids sollte somit bei den synthetisierten Konjugaten für eine effiziente Aufnahme und zytosolische Freisetzung der Konjugate sorgen. Hierfür wurde aufgrund seiner geringen Zytotoxizität das zellpenetrierende Peptid TAT ausgewählt.^[141] Um im Anschluss die Aufnahme in den Zellkern zu ermöglichen, wurde weiterhin eine Kernlokalisationssequenz (NLS) verwendet (siehe Kapitel 3.1.2). Die gewählte Kernlokalisationssequenz (SV40 großes T-Antigen) folgt einem Importin α/β Aufnahmeweg in den Zellkern.^[152] Das heißt, dass die NLS mit Importin α und β interagieren und weiterführend durch Binden an die *FG-Nups* die Kernpore überwinden kann (siehe Kapitel 1.5.2).^[146] Auf diese Weise könnte das Konjugate in den Zellkern transportiert werden.

Bei den synthetisierten Konjugaten ist es vorstellbar, dass durch ihre vielfache Beladung eine sterische Hinderung und somit erschwerte Interaktion des NLS mit den Transportfaktoren vorliegt. Um dieses auszuschließen, wurden zwei verschiedene Kombinationen aus zellpenetrierendem Peptid und Kernlokalisationssequenz gewählt, das NLS-TAT und das TAT-NLS. Beide Peptide sind über einen *N*-terminalen Thiollinker mit dem Maleimiddextran **4** verbunden (**Abbildung 60**). Das zellpenetrierende Peptid TAT **11** wird mittels Makropinozytose in die Zelle aufgenommen, sodass keine direkte Interaktion seinerseits mit Rezeptoren auf der Zellmembran notwendig ist.^[197] Somit wäre es denkbar, dass eine eventuelle sterische Hinderung das TAT-Peptid weniger stark beeinflussen würde.

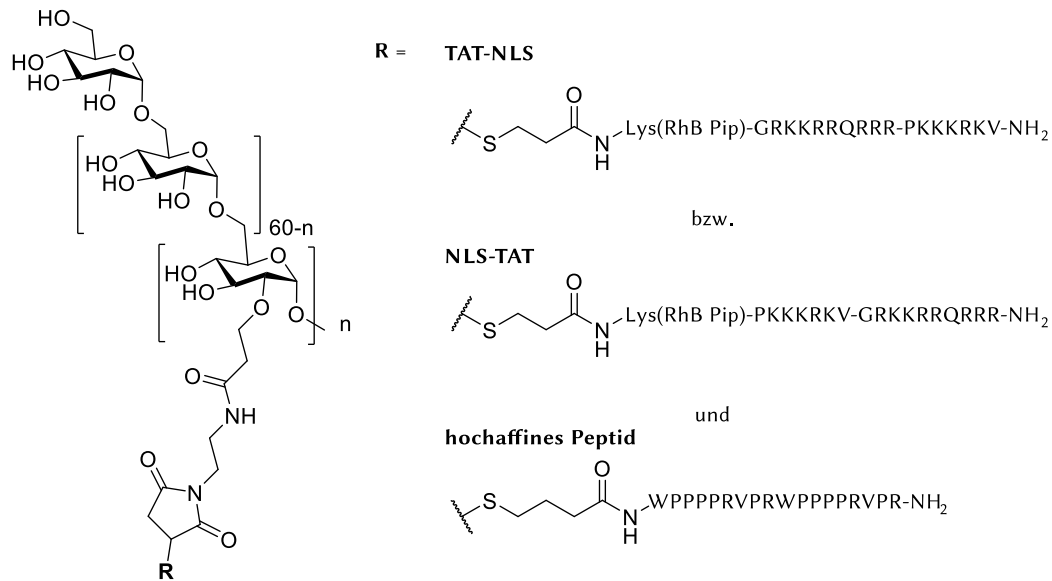


Abbildung 60: Aufbau der für die Mikroskopie verwendeten Konjugate. Es wurde entweder das zellpenetrierende Peptid TAT-NLS **20** oder NLS-TAT **19** eingesetzt. Zusätzlich wurden hochaffine W₂-Peptide **9** auf das Dextrangrundgerüst gekuppelt.

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie angefertigt. Hierfür wurden die benötigten HeLa-Zellen zuvor von Miriam Bertazon (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Christian Freund, Freie Universität Berlin) mit den zu untersuchenden Substanzen für 90 min inkubiert. Es wurden Konzentrationen von 1 μM , 5 μM , 7,5 μM und 10 μM verwendet. Nach anschließendem mehrmaligen Waschen und Mediumwechsel wurden die mikroskopischen Untersuchungen gemeinschaftlich durchgeführt. Da die meisten Substanzen bei den höheren Konzentrationen (5 μM – 10 μM) zytotoxisch waren und eine hohe Zellsterblichkeit in den mikroskopischen Aufnahmen gesehen wurde, wurden alle Proben zusätzlich bei einer Substanzkonzentrationen von 5 μM und einer verkürzten Inkubationszeit (k.In.) von 10 min inkubiert. Die Verringerung der Inkubationszeit sollte hierbei den biologischen Einfluss der Konjugate auf die Zellen zeitlich verringern und somit potentiell die Zytotoxizität der Konjugate senken. Diese Proben wurden ebenfalls mikroskopisch untersucht.

Die Untersuchung der Konjugate, die ausschließlich zellpenetrierende Peptide trugen, zeigte, dass diese generell endosomal in die Zellen aufgenommen wurden (**Abbildung 61**). Das Konjugat **K2** (1,1 NLS-TAT) zeigte bei einer Konzentration von 1 μM nach der endosomalen Aufnahme keine zytosolische Freisetzung der Konjugate. Dieses kann an der punktförmigen Verteilung der fluoreszenten Konjugate in den Mikroskopieaufnahmen gesehen werden. Die Zellsterblichkeit bei der Verwendung der höheren Konzentration war allgemein hoch, sodass die Zellen bei Konzentration von 5 μM mit einer verkürzten

Inkubationszeit von 10 min inkubiert wurden. Dieses zeigte keine Veränderung zu der geringeren Konzentration. Der Vergleich mit dem Konjugat **K3** (1,0 TAT-NLS) zeigte ebenfalls nur geringe Unterschiede. Generell schien hier eine stärkere Anreicherung der Konjugate in der Zellmembran und dem angrenzenden Zytosol stattzufinden (Vergleich der Aufnahmen jeweils bei 5 μ M und 10 min Inkubationszeit), allerdings schien hiervon die endosomale Freisetzung in das Zytosol nicht betroffen zu sein. Für das Konjugat **K3** konnte kein signifikanter Unterschied für die verschiedenen Inkubationszeiten detektiert werden. Somit scheint entweder die Anzahl der zellpenetrierenden Peptide auf den Konjugaten nicht für eine Freisetzung ins Zytosol auszureichen oder die gewählte Kombination der Konjugate ist hierfür nicht geeignet.

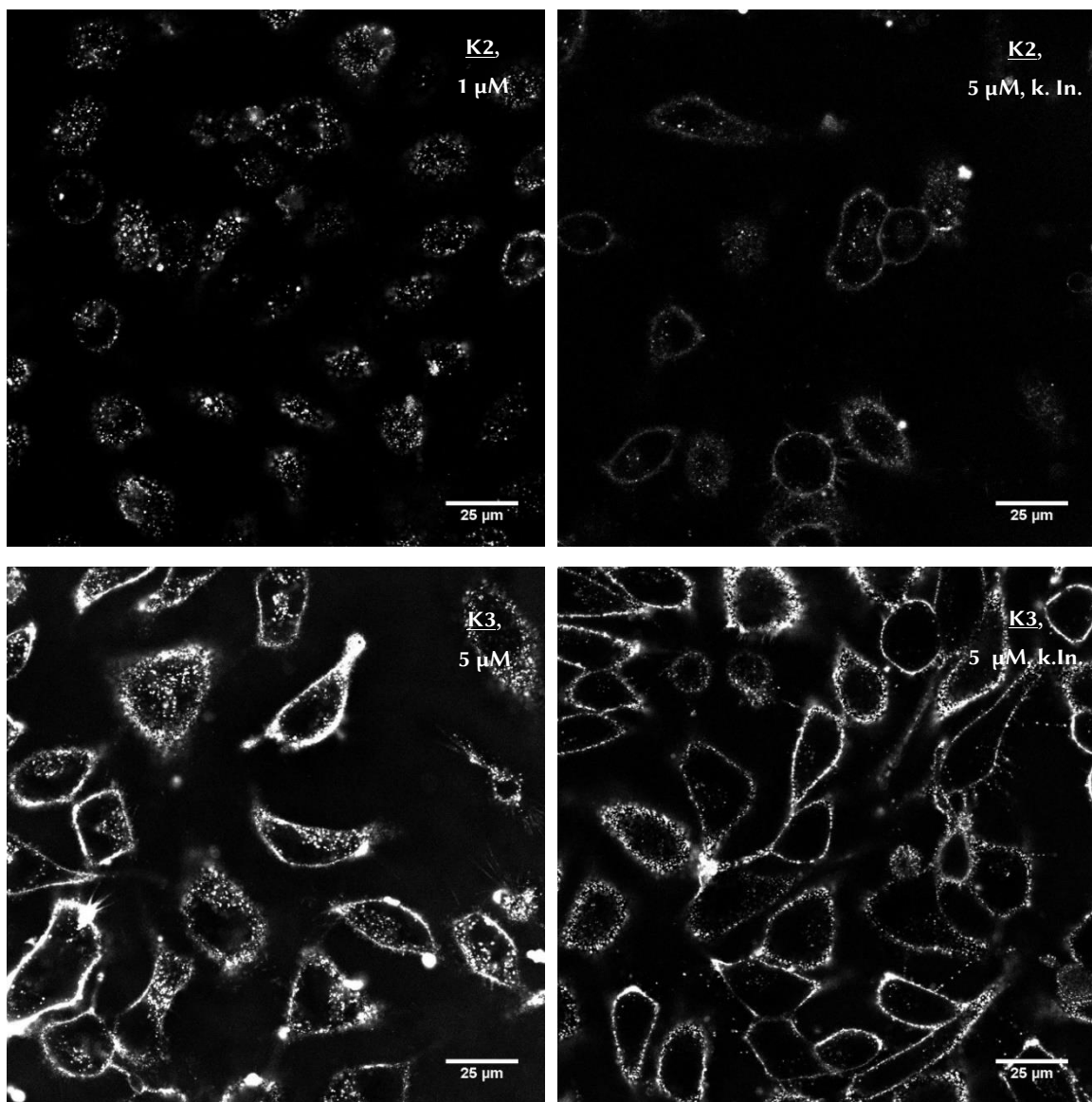


Abbildung 61: HeLa-Zellen, **K2** 1 μ M, 1,0 Laserleistung (links oben); HeLa-Zellen, **K2** 5 μ M, 10 min Inkubation (k.In.) (rechts oben); HeLa-Zellen, **K3** 5 μ M, 0,2 Laserleistung (links unten); HeLa-Zellen, **K3** 5 μ M, 10 min Inkubation (rechts unten). Die Konjugate werden teilweise endosomal aufgenommen, allerdings werden sie nicht im Zytosol freigesetzt.

Die Konjugate, welche eine Kombination aus zellpenetrierendem Peptid und hochaffinem W₂-Funktionspeptid trugen, zeigten einige Unterschiede in der zellulären Aufnahme. So zeigte Konjugat **K9** (7,2 hochaffine Peptide, 0,4 NLS-TAT) bei einer Konzentration von 1 µM eine zelluläre Aufnahme mittels Endosomen, wobei die meisten Konjugate keine Freisetzung in das Zytosol erlangten (**Abbildung 62**). Bei höheren Konzentrationen konnten aufgrund von Zytotoxizitäten keine mikroskopischen Untersuchungen durchgeführt werden. Das vergleichbare Konjugat **K1** (6,1 hochaffine Peptide, 0,44 TAT-NLS) zeigte bei den längeren Inkubationszeiten ebenfalls nur geringe Zellviabilitäten, sodass nur die Messung bei einer Inkubationszeit von 10 min ausgewertet werden konnte. Hier konnte gesehen werden, dass das Konjugat diffus über das Zytosol verteilt vorlag. Die endosomale Freisetzung war somit erfolgreich. Dieses steht im Kontrast zu den zuvor untersuchten Konjugaten ohne Funktionspeptide (**K2** und **K3**), die bei erhöhten Konzentrationen und Beladungen keine zytosolische Freisetzung erreichten. Diese könnte durch eine Kombination aus hochaffinem Peptid **9** und zellpenetrierendem Peptid **20** begünstigt sein. Eine Aufnahme in den Zellkern konnte beim Konjugat **K1** gesehen werden. Die Konjugate schienen hierbei in kleinen innernuklearen Bereichen lokalisiert zu sein. Dieses könnten eventuell die *nuclear speckles* sein, allerdings konnte eine Bestätigung dieser Annahme bislang nicht erhalten werden. Die hierfür benötigte Colokalisation mit entsprechenden Markern (bspw. GFP-markiertes FBP21) erwies sich als äußerst schwierig, da die Zellen schon vor der Inkubation mit den Konjugaten eine hohe Sterblichkeitsrate aufwiesen.

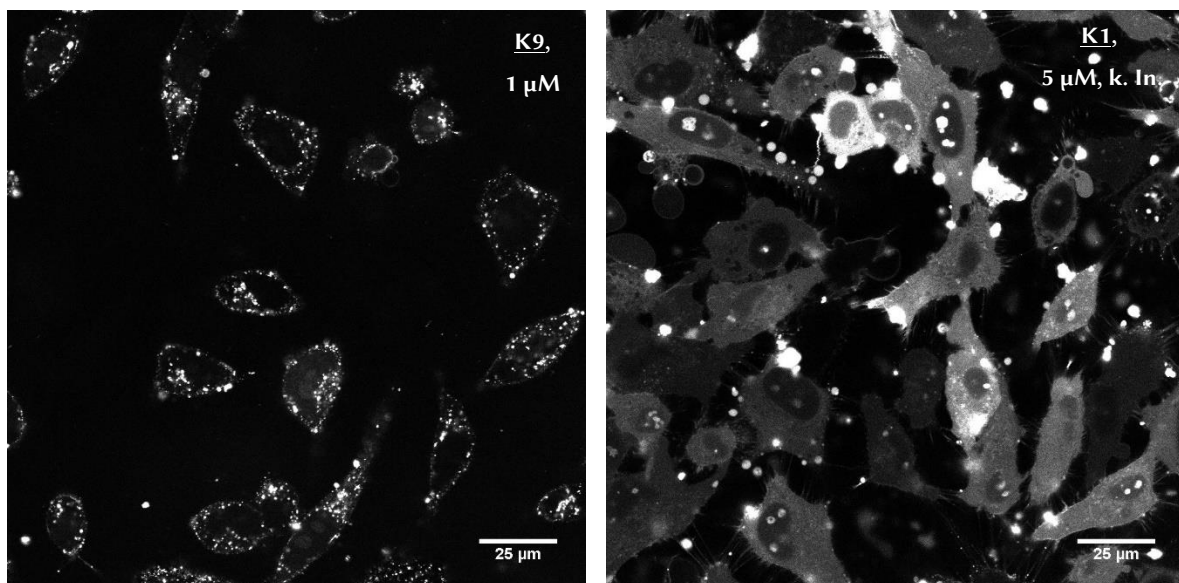


Abbildung 62: HeLa-Zellen, **K9** 1 µM, 1,5 Laserleistung (links); HeLa-Zellen, **K1** 5 µM, 10 min Inkubation (rechts). Bei höheren Konzentrationen (5 µM) scheint eine zytosolische Freisetzung der Konjugate mit niedriger Anzahl an zellpenetrierenden Peptiden möglich zu sein. Allerdings ist die Verwendung dieser Konzentrationen aufgrund hoher Zytotoxizitäten nicht immer möglich.

Weiterhin wurden mehr Äquivalente der zellpenetrierenden Peptide pro Konjugat gekuppelt, um deren Einfluss auf die zelluläre Aufnahme zu überprüfen. Die Konjugate **K4** (4,5 hochaffine Peptide, 1,9 NLS-TAT) und **K8** (6,3 hochaffine Peptide, 2,2 NLS-TAT) zeigten beide bei 1 μM eine gute zelluläre Aufnahme der Konjugate. Weiterhin konnte eine größtenteils diffuse Verteilung der Konjugate im Zytosol und im Nukleus (**Abbildung 63**) gesehen werden. Die stärkere Lokalisation in einzelnen Bereichen im Nukleus war auch hier zu sehen. Generell schien die endosomale Freisetzung besser zu verlaufen, als bei den Konjugaten mit der geringeren Beladung an zellpenetrierenden Peptiden. Zelluläre Aufnahmen bei Konzentrationen von 5 μM konnten aufgrund hoher Zytotoxizitäten bei den hochbeladenen NLS-TAT Konjugaten nicht erhalten werden.

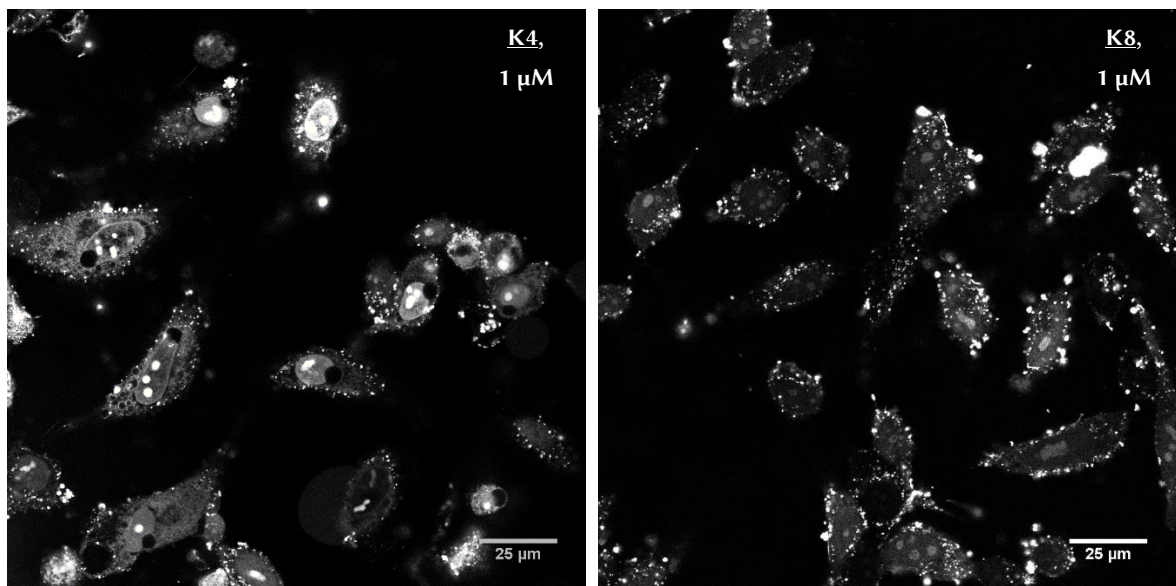


Abbildung 63: HeLa-Zellen, **K4** 1 μM , 0,2 Laserleistung (links); HeLa-Zellen, **K8** 1 μM , 0,2 Laserleistung (rechts). Bei höheren Beladungen an zellpenetrierenden Peptiden nimmt die zytosolische Freisetzung und Aufnahme in den Nukleus zu. Allerdings steigt auch die Zytotoxizität.

Die zelluläre Aufnahme der hochbeladenen TAT-NLS Konjugate gestaltete sich ähnlich, wie die ihrer NLS-TAT Pendants. Auch hier war bei 1 μM eine größtenteils diffuse Verteilung im Zytosol und eine Anreicherung im Nukleus für das Konjugat **K5** (4,8 hochaffine Peptide, 1,5 TAT-NLS) zu beobachten (**Abbildung 64**). Aufgrund geringerer Zytotoxizitäten konnten mikroskopische Aufnahmen bei einer Konzentration von 5 μM durchgeführt werden. Hierbei konnte eine starke Anreicherung der Konjugate im Nukleus beobachtet werden. Allerdings zeigte sich hier trotz mehrfacher Waschschriffe und Mediumwechsels eine starke extrazelluläre Fluoreszenz, deren Ursache bislang unerklärt bleibt.

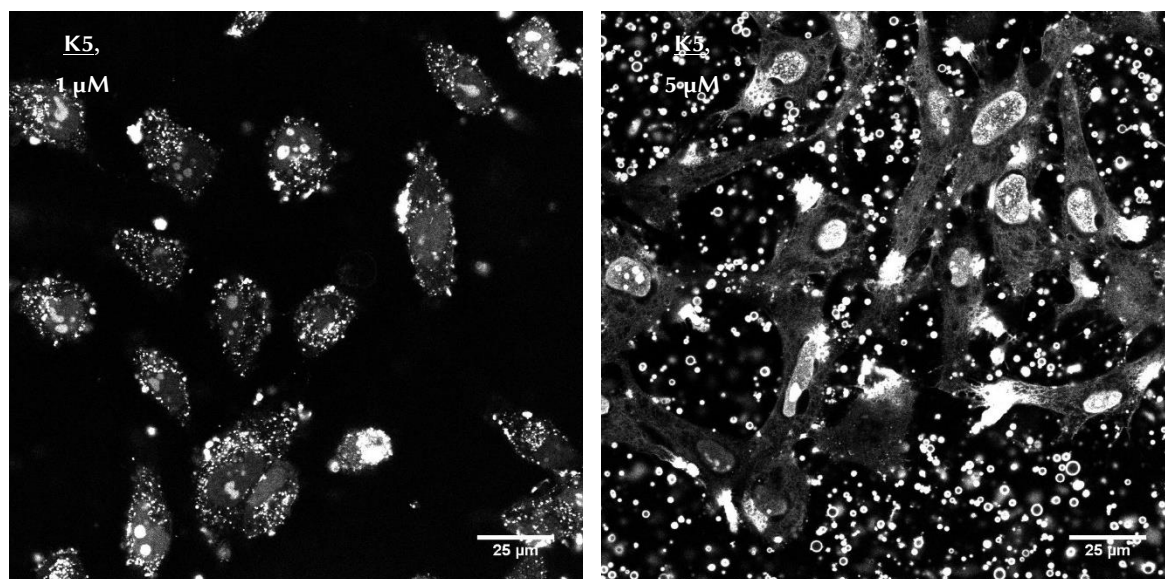


Abbildung 64: HeLa-Zellen, **K5** 1 µM, 0,2 Laserleistung (links); HeLa-Zellen, **K5** 5 µM, 0,02 Laserleistung (rechts). Die Aufnahme in den Nucleus steigt mit zunehmender Konzentration der Konjugate. Bei längerer Inkubationszeit und hoher Konzentration konnte allerdings eine starke extrazelluläre Fluoreszenz gesehen werden, die bislang unerklärt bleibt.

Insgesamt zeigte sich, dass die zelluläre Aufnahme und Freisetzung der Konjugate mit zunehmender Anzahl an zellpenetrierenden Peptiden anstieg. Weiterhin konnte gesehen werden, dass die Funktionspeptid-tragenden Konjugate eine bessere endosomale Freisetzung im Zytosol erfuhren, als Konjugate, die nur zellpenetrierende Peptide tragen. So wurde beispielsweise das Konjugat **K1** (6,1 hochaffine Peptide, 0,44 TAT-NLS) ins Zytosol aufgenommen, während das Konjugat **K3** (1,0 TAT-NLS) bei gleicher Konzentration in den Endosomen verblieb.

Die zelluläre Aufnahme der hochbeladenen TAT-NLS und NLS-TAT Konjugate zeigte bei gleichen Konzentrationen keine deutlichen Unterschiede. Allerdings konnten für die TAT-NLS Konjugate aufgrund geringerer Zytotoxizitäten Konzentrationen von 5 µM eingesetzt werden. Hierbei zeigte sich eine starke nukleare Aufnahme des Konjugats **K5**, die allerdings von einer noch unerklärten extrazellulären Fluoreszenz begleitet war.

Für weiterführende Arbeiten wäre es sinnvoll ein stabiles System für die Colokalisation zu entwickeln. Hiermit könnte die Ursache der gesehenen Lokalisation der Konjugate im Nucleus geklärt werden.

Des Weiteren wäre die mikroskopische Untersuchung von Konjugaten mit affinen Peptiden **8** interessant, da diese generell geringere Zytotoxizitäten im ATP/ Luciferase-Assay aufwiesen. Somit könnten sie in höheren Konzentrationen eingesetzt werden, bei welchen potentiell der Aufnahmemechanismus der Translokation an Bedeutung gewinnen würde (siehe Kapitel 1.5.1).

3.7. *In vitro* Splicing-Assay

Nachdem die zelluläre Aufnahme der mit Funktionspeptid und zellpenetrierenden Peptiden beladenen Konjugate gezeigt werden konnte, sollte im weiteren Verlauf der Arbeit die Funktionalität der Peptide und Konjugate *in vitro* untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden von Miriam Bertazzon (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Christian Freund, Freie Universität Berlin) *in vitro* Splicing-Assays durchgeführt. Hierbei wird RNA aus Zellen durch nukleare Extraktion gewonnen und diese unter Zuhilfenahme eines Minigens (hier MINX 4.2) an bestimmten Stellen gespleißt (**Abbildung 65**). Bei Inhibition eines Splicing-proteins, in unserem Fall FBP21, wird die Splicingaktivität im Vergleich zur unbehandelten Zellprobe (Positivkontrolle) gemindert. Nach Extraktion der gespleißten RNA, kann diese schließlich mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) in die entsprechende komplementäre DNA übersetzt und anschließend vervielfältigt werden. Die Transkription in die komplementäre DNA dient hierbei dem Schutz des gespleißten Produktes, da RNA sehr Hydrolyse-anfällig ist und durch Ribonukleasen abgebaut wird. Durch abschließende Auftragung auf Polyacrylamidgele und Gelelektrophorese kann die DNA sichtbar gemacht werden.

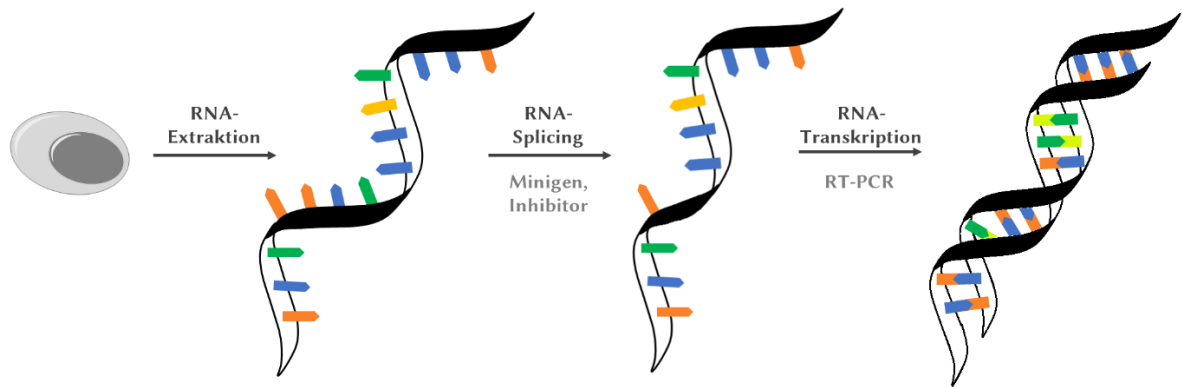


Abbildung 65: Schematische Darstellung des *in vitro* Splicing-Assays. Die RNA wird aus den Zellen extrahiert und unter Einfluss des Minigens und den Inhibitoren gespleißt. Anschließend wird die RNA transkribiert und somit zur komplementären DNA umgesetzt. Diese kann mittels Gelelektrophorese detektiert werden.

Die für die Splicing-Assays verwendeten Peptide und Konjugate (**Tabelle 12**) wurden in der vorliegenden Arbeit nach den in Kapitel 3.1.2 und 3.1.3 beschriebenen Methoden synthetisiert. Es wurden exemplarisch ein Funktionspeptid **9** und ein Konjugat (**K13**), sowie eine Negativkontrolle **22** und dessen Konjugat (**K25**) hergestellt.

Tabelle 12: Im *in vitro* Splicing-Assay verwendete Peptide und Konjugate konnten in guten Ausbeuten erhalten werden. Das hochaffine Funktionspeptid W_2 und das entsprechende Konjugat **K13** wurden mit der IVS-Negativkontrolle **22** und dessen Konjugat **K25** verglichen.

SUBSTANZ	FUNKTIONSPeptID	M [g/mol]	AUSBEUTE [%]
Hochaffines Peptid 9 (W_2)	WPPPPRVPRWPPPPRVPR	2285,8	79 %
K13	5,9 W_2	25 100	98 %
IVS-Negativ 22	WSPSADVDP	972,0	63 %
K25	7 IVS-Negativ	19 000	59 %

Vor Verwendung der Konjugate im *in vitro* Splicing-Assay, wurden die Bindungsaffinitäten zu den Tandem-WW-Domänen des FBP21 mittels ITC bestimmt (siehe Kapitel 1.1). Hierbei konnte ein K_D -Wert von $6,80 \mu\text{M}$ für das hochaffine W_2 -Peptid **9** und $1,41 \mu\text{M}$ für das Konjugat **K13** erhalten werden. Es sollte somit eine ausreichende Affinität zum FBP21 vorliegen, um dieses zu inhibieren und somit das mRNA-Splicing zu beeinflussen. Als Negativkontrolle wurde das Peptid WSPSADVDP **22** und dessen Konjugat **K25** (sieben Peptide pro Dextran) gewählt. Dieses Peptid ist vom affinen Peptid **8** (WPPPPRVPR) abgeleitet, jedoch wurden die für die Bindung zum FBP21 wichtigen Proline teilweise durch Serin und Alanin ausgetauscht. Ein alleiniger Austausch der Proline durch Alanin war hierbei nicht möglich, da das resultierende Peptid (WAPAAEVPE) nicht wasserlöslich war. Die ITC-Messungen zeigten, dass die Negativkontrollen **22** und **K25** keine Bindungsaffinitäten zum FBP21 aufwiesen (**Abbildung 66**) und somit im *in vitro* Splicing-Assay als nicht-inhibierende Negativkontrollen eingesetzt werden konnten.

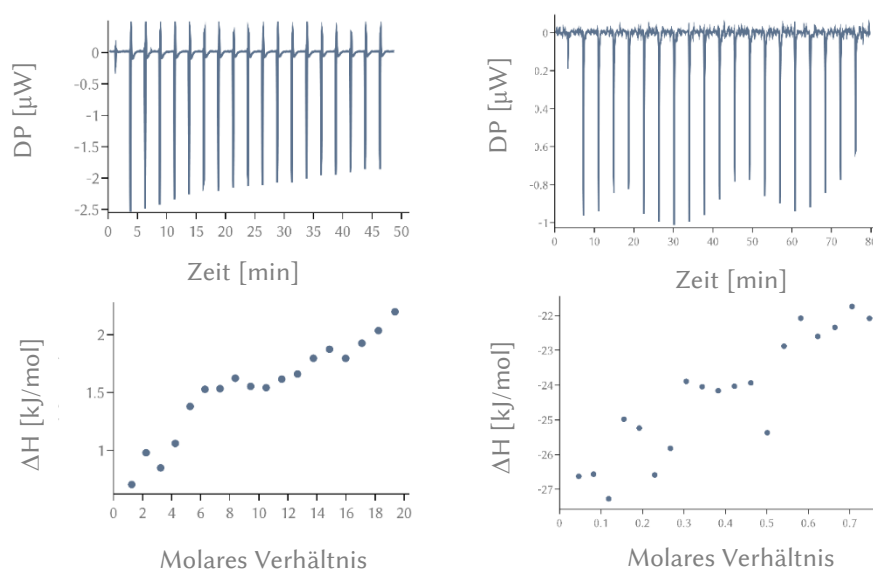


Abbildung 66: ITC-Spektren der IVS-Negativkontrollen **22** (Peptid, links) und **K25** (Konjugat, rechts). Es findet keine Interaktion mit FBP21 statt.

Die Substanzen wurden anschließend von Miriam Bertazzon für die Splicing-Assays mit HEK293-, als auch HeLa-Zellen bei Konzentrationen von 4 μM und 20 μM eingesetzt. Hierbei zeigte sich jedoch, dass die HeLa-Zellen generell eine geringe Splicingaktivität aufwiesen, sodass dessen Änderung durch Interaktion mit den Inhibitoren nur schwer ausgewertet werden konnte. Somit wurden im weiteren Verlauf nur HEK293-Zellen für den Splicing-Assay verwendet. Die Auftragung der komplementären DNA auf das Polyacrylamidgel (**Abbildung 67**) zeigte eine stark ausgeprägte Bande bei 219 Basenpaaren (bp) bei allen untersuchten Substanzen. Dieses ist die ungespleißte DNA, die im Splicingzyklus nicht umgesetzt wurde. Der Vergleich der Bande der ungespleißten DNA zur Bande der gespleißten DNA bei 99 bp zeigte, dass bei den unbehandelten HEK293-Zellen der Anteil von gespleißter DNA 8,9 % beträgt. Das Funktionspeptid-tragende Konjugat **K13** zeigte bei einer Substratkonzentration von 20 μM eine klare Reduktion der Splicingaktivität. Dieses konnte durch das fast vollständige Verschwinden der Bande bei 99 bp gesehen werden. Somit weist das Konjugat **K13** einen inhibitorischen Effekt auf das mRNA-Splicing auf.

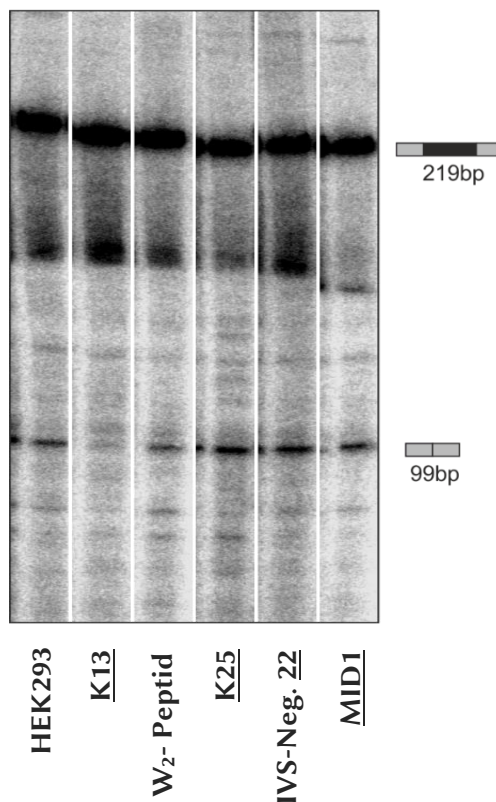


Abbildung 67: Acrylamidgel des *in vitro* Splicing-Assays bei einer Substratkonzentration von 20 μM . Die Bande für die ungespleißte DNA (219 bp) ist in allen Proben stark ausgeprägt. Die Bande der gespleißten DNA (99 bp) weist Unterschiede zwischen den einzelnen Proben auf, wobei das Funktionspeptid/-tragende Konjugat den Anteil der gespleißten DNA verringert haben. Die Bande bei etwa 200 bp ist ein Artefakt und muss nicht weiter beachtet werden.

Die prozentualen Anteile der MINX4.2 gespleißten Fraktion bei Substanzkonzentrationen von 20 μM und 4 μM wurde optisch anhand der Polyacrylamidgele ausgewertet und in **Abbildung 68** aufgetragen. Zusätzlich wurden die auf die Positivkontrolle normierten Anteile der gespleißten Fraktionen in **Tabelle 13** angegeben. Hier konnte die schon im Polyacrylamidgel gesehene Reduktion der Splicingaktivität des Konjugats **K13** bei 20 μM bestätigt werden. Unter Einbezug der Fehlergrenzen ergab sich hier ein signifikanter Unterschied zu den unbehandelten HEK293-Zellen. Allerdings konnte für das hochaffine W₂-Peptid **9** kein signifikanter Unterschied zu den unbehandelten HEK293-Zellen gesehen werden. Somit wird der inhibitorische Effekt durch die multivalente Präsentation des hochaffinen Peptids auf dem Dextran hervorgerufen. Diese Annahme wird zusätzlich dadurch bestätigt, dass die verwendeten Negativkontrollen **22** und **K25**, sowie das Maleimidextran **MID1** keine signifikante Veränderung der Splicingaktivität aufwiesen. Somit basiert der inhibitorische Effekt des Konjugats **K13** nicht auf einer Interaktion des Dextrangrundgerüsts im Splicingzyklus. Ferner scheint die Prolin-reiche Sequenz des hochaffinen Peptids **9** für den inhibitorischen Effekt des Konjugats **K13** wichtig zu sein, da der Austausch der Prolin mit Alanin und Serin diesen Effekt unterbindet.

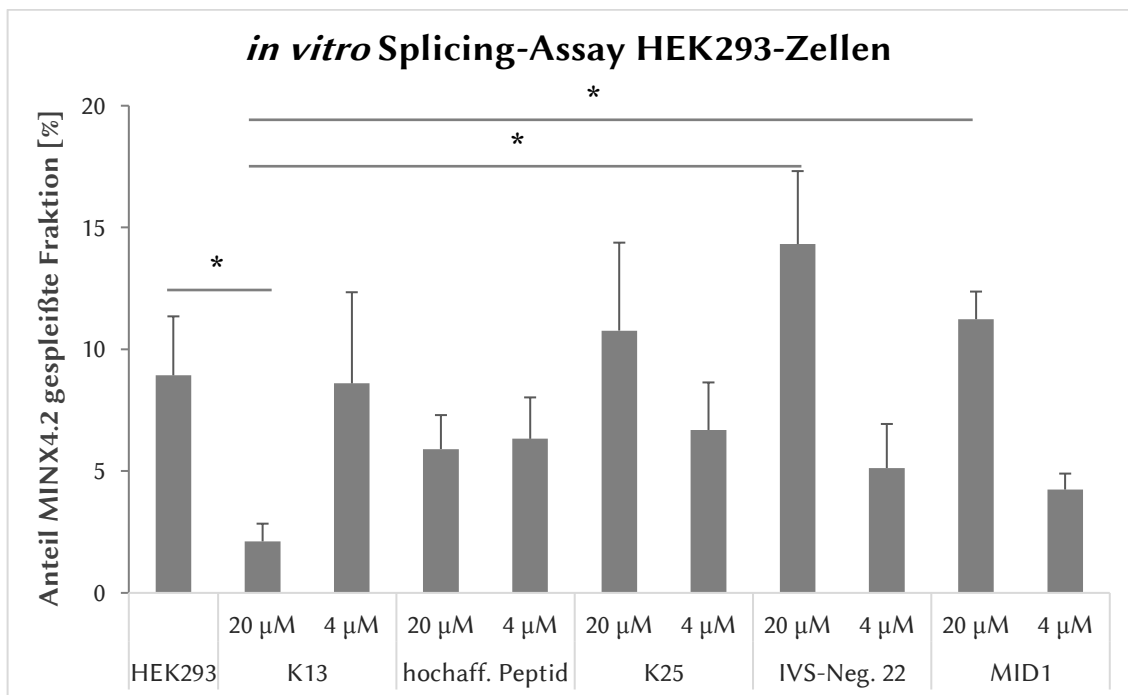


Abbildung 68: Anteil der gespleißten Fraktionen der HEK293-Zellen bei Behandlung mit den verschiedenen Peptiden und Konjugaten für Konzentrationen von 4 μM und 20 μM (Mittelwerte der Triplikate). Die signifikanten Änderungen der Splicingaktivität sind mit einem Stern * angegeben.

Tabelle 13: Prozentuale gespleißte Anteile der einzelnen Proben bei 20 μM und 4 μM . Weiterhin wurden die auf die Positivkontrolle normierten Werte angegeben. Es konnten signifikante Unterschiede bei einer Konzentration von 20 μM zwischen **K13** und den unbehandelten HEK293 Zellen, der Negativkontrolle **22**, sowie dem Maleinimidextran (**MID1**) detektiert werden.

#	<u>GESPLEIßTER ANTEIL [%]</u>			
	20 μM	20 μM (NORMIERT)	4 μM	4 μM (NORMIERT)
HEK293	8,93 \pm 2,42	100 \pm 27,1	8,93 \pm 2,42	100 \pm 27,1
K13	2,11 \pm 0,73	23,7 \pm 8,1	8,60 \pm 3,74	96,3 \pm 41,9
Hochaffines Peptid (W ₂)	5,90 \pm 1,40	66,1 \pm 15,6	6,33 \pm 1,70	70,8 \pm 19,0
K25	10,8 \pm 3,61	120,6 \pm 40,4	6,69 \pm 1,95	74,9 \pm 21,8
IVS-Neg. 22	14,3 \pm 3,00	160,3 \pm 33,6	5,13 \pm 1,81	57,4 \pm 20,3
MID1	11,2 \pm 1,14	125,8 \pm 12,7	4,24 \pm 0,66	47,5 \pm 7,34

Bei Verwendung des hochaffinen Peptids **9** ließ sich, genau wie bei Verwendung der Substanzen in geringeren Konzentrationen (4 μM), keine signifikante Reduktion der Splicingaktivität zeigen. Somit scheint die lokale, hohe Konzentration an hochaffinen Peptiden auf dem Konjugat ausschlaggebend zu sein. Da das Konjugat **K13** bei einer Konzentration von 4 μM ebenfalls zu keiner signifikanten Reduktion der Splicingaktivität führte, scheint bei der generell geringen Splicingaktivität der HEK293-Zellen eine erhöhte Konzentration der Substanzen benötigt zu werden, um eine Inhibition zu erreichen. Dieses kann daran liegen, dass die Interaktionspartner im Zelllysate in Multiproteinkomplexen gebunden und somit für die Inhibitoren nur schwer zugänglich sind. Eine erhöhte Konzentration der Substanzen würde somit zu einer höheren Wahrscheinlichkeit der Interaktion führen.

Generell konnte somit gezeigt werden, dass die Splicingaktivität von HEK293-Zellen durch Inkubation mit Funktionspeptid-tragenden Konjugaten beeinflusst werden kann. Dieses wurde exemplarisch am Beispiel des Konjugats **K13** gezeigt. Da eine Interaktion des Prolin-reichen, hochaffinen Konjugats mit anderen Splicingproteinen ebenfalls denkbar ist, sollten die Interaktionspartner der Konjugate weiterführend mittels Pulldown-Assay bestimmt werden (Kapitel 3.8). Es ist jedoch anzunehmen, dass Funktionspeptid-tragende Konjugate wie gewünscht eine Inhibition der Tandem-WW-Domänen des FBP21 bewirken können und somit die Splicingaktivität beeinflussen.

3.8. Bestimmung der Interaktionspartner mittels Pull-down-Assay

Nachdem nun die Aufnahme der zellpenetrierenden Konjugate in den Nukleus und die Funktionalität der homomultivalenten Konjugate im Splicing-Assay bestätigt wurden, sollte abschließend die Interaktion der Funktionspeptid-tragenden Konjugate mit dem Zelllysate anhand eines Pull-down-Assays überprüft werden. Hierbei sollte zum einen bestätigt werden, dass die Konjugate an das FBP21 binden und somit für die gesehene Reduktion der Splicingaktivität verantwortlich sind. Zum anderen sollten mögliche andere Interaktionspartner für die Konjugate identifiziert werden.

Hierfür wurden die zu untersuchenden Peptide bzw. Konjugate auf einem Harz reversibel immobilisiert (**Abbildung 69**). Es wurde ein System aus Harz-gebundenem anti-FLAG verwendet, welches spezifisch an das FLAG-Tag 23 (DYKDDDDK) bindet. Das FLAG-Tag 23 ist wiederum N-terminal über den Thiollinker 10 an das Dextran Grundgerüst gebunden, sodass bei Interaktion des anti-FLAGs mit dem FLAG-Tag 23 das Dextran am Harz immobilisiert wird.



Abbildung 69: Immobilisierung des Konjugats mithilfe eines anti-FLAG/ FLAG-Tag Systems.

Weiterführend wird das Zelllysate aus den entsprechenden Zellen extrahiert und mit den immobilisierten Inhibitoren inkubiert. Die enthaltenen Proteine kommen somit in Kontakt mit den Dextrankonjugaten und können mit diesen interagieren (**Abbildung 70**). Nach abgeschlossener Inkubationszeit wird das Harz mehrfach gewaschen. Hierdurch werden ungebundene Proteine entfernt, während die interagierenden Proteine zurückgehalten werden. Durch anschließende Elution mit dem hochaffinen 3x FLAG Peptid werden die Konjugat-gebundenen Proteine verdrängt und somit freigesetzt. Durch Auftragung auf SDS-PAGE und anschließendes Western Blotting können so die Bindungspartner identifiziert werden.

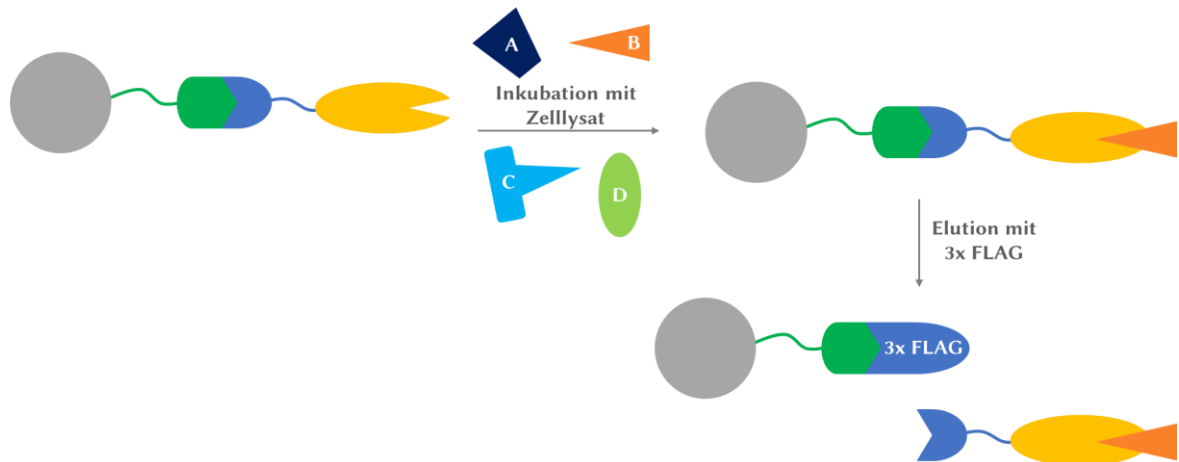


Abbildung 70: Schematische Darstellung des Pulldown-Assays. Die immobilisierte Substanz wird mit dem Zelllysate inkubiert. Hierbei können die verschiedenen Proteine mit dem Inhibitor interagieren. Nach Waschen des Harzes und somit entfernen der ungebundenen Proteine, werden die Konjugatgebundenen Proteine durch eine Konkurrenzreaktion mit dem 3x FLAG eluiert. Die Proteine können abschließend mittels SDS-PAGE / Western Blot nachgewiesen werden. Im angegebenen Beispiel wäre eine Interaktion zwischen dem immobilisierten Konjugat und Protein B oder C denkbar.

Für den hier durchgeführten Pulldown-Assay wurden verschiedene Peptide und Konjugate nach den in Kapitel 3.1.2 und 3.1.3 beschriebenen Methoden synthetisiert. Hierbei sollte der Unterschied zwischen Dextran-gebundenen und ungebundenen Peptiden, der bereits bei den ITC-Messungen anhand der Bindungsstöchiometrien gesehen wurde, untersucht werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Verwendung des affinen **8** oder hochaffinen Peptids **9** eine Abweichung der Bindungspartner hervorruft. Um die ungebundenen Peptide auf dem Harz zu immobilisieren, wurde jeweils eine Sequenz synthetisiert, die N-terminal das FLAG-Tag beinhaltet. FLAG-Tag und Funktionspeptid wurden durch einen kurzen Glycin-Glycin-Linker voneinander getrennt (**Tabelle 14**). Weiterhin wurde als Negativkontrolle der FLAG-Tag **23** verwendet.

Tabelle 14: Für den Pulldown sollte der FLAG-Tag **23** als Negativkontrolle verwendet werden. Weiterhin wurden das affine Peptide FLAG-Tag-WPPPPRVPR **24** und hochaffine Peptid FLAG-Tag-WPPPPRVPRWPPPPRVPR **25** hergestellt.

PEPTIDE	SEQUENZ	M [g/mol]	AUSBEUTE [%]
FLAG-Tag, 23	DYKDDDDK	1012,0	39 %
FLAG-Tag – W, 24	DYKDDDDKGG- WPPPPRVPR	2209,4	77 %
FLAG-Tag – W ₂ , 25	DYKDDDDKGG- WPPPPRVPRWPPPPRVPR	3292,7	51 %

Bei den synthetisierten Konjugaten wurde ein Konjugat (**K26**) ohne Funktionspeptid synthetisiert, um eine Interaktion des Dextrangrundgerüsts mit dem Zelllysate auszuschließen (**Tabelle 15**). Weiterhin wurde die Peptidsequenz **22** (WSPSADVPD), die bereits im *in vitro* Splicing-Assay als Negativkontrolle verwendet wurde, eingesetzt (siehe auch Kapitel 3.7). Abschließend wurde jeweils ein Konjugat mit dem affinen bzw. dem hochaffinen Peptid (**K28** und **K29**) hergestellt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass annähernd die gleiche Beladung an Funktionspeptid verwendet wurde. Jedoch unterschieden sich die Konjugate in ihrer Beladung des FLAG-Tags. Dieses sollte allerdings für die Interaktion mit den im Zelllysate enthaltenen Proteinen keinen Unterschied machen.

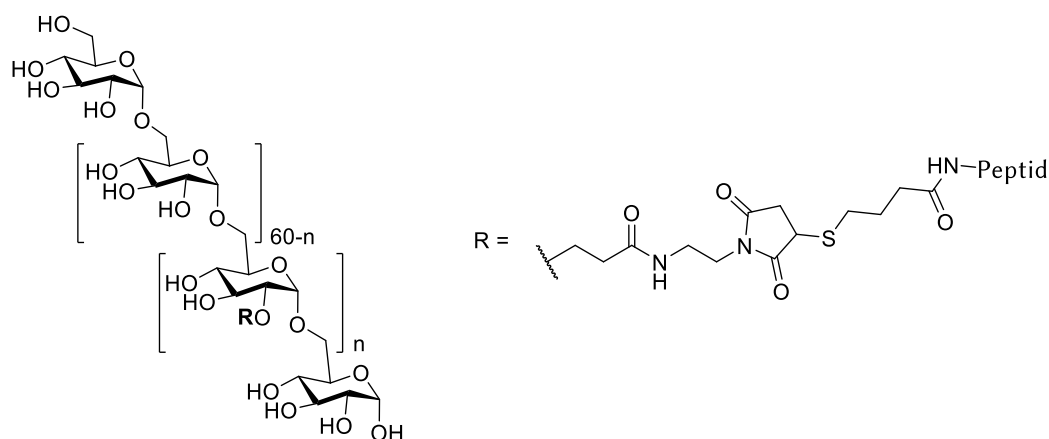


Tabelle 15: Für den Pulldown-Assay synthetisierte Konjugate. Es wurde jeweils ein Konjugat ohne Funktionspeptid, mit nicht-bindender Peptidsequenz und affinem/ hochaffinem Peptid hergestellt. Die Konjugatreaktionen verliefen hierbei in guten Ausbeuten.

KONJUGATE	FUNKTIONSPeptID	FLAG-TAG	M [g/mol]	AUSBEUTE [%]
K26		1,2	14 100	83 %
K27	3,9 WSPSADVPD	2,0	19 100	76 %
K28	3,5 WPPPPRVPR- WPPPPRVPR	1,6	22 500	96 %
K29	4,0 WPPPPRVPR	2,3	20 100	96 %

Die synthetisierten Peptide und Konjugate wurden im Pulldown-Assay von Miriam Bertazon (Arbeitskreis von Prof. Dr. Christian Freund, Freie Universität Berlin) eingesetzt. Hierbei stellte sich jedoch heraus, dass der für das Western Blotting verwendete Antikörper (FBP21 (N-16), Santa Cruz Biotechnology Inc.) nicht spezifisch mit dem FBP21 interagiert. Stattdessen färbte der Antikörper unselektiv weite Teile des Western Blots an. Der

verwendete Antikörper sollte das FBP21 selektiv durch Binden an dessen Zinkfinger markieren und somit detektierbar machen. Stattdessen liegt die Vermutung nahe, dass dieser ebenfalls mit Zinkfingern anderer Proteine interagiert und diese somit ebenfalls markierte. Der Pulldown-Assay wurde anschließend unter Verwendung der Konjugate **K26** (1,2 FLAG-Tag) und **K28** (1,6 FLAG-Tag, 3,5 hochaffine Peptide) wiederholt. Die mit 3x FLAG eluierten Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (**Abbildung 71**). Hierbei ist zu erkennen, dass das Konjugat **K28** viele Interaktionspartner aufwies, während die Negativkontrolle **K26** nahezu keine Interaktionen mit den Proteinen aus dem Zellysate eingegangen war. Da es aus zeitlichen Gründen nicht möglich war alle Interaktionspartner des Konjugats **K28** zu identifizieren, wurden weiterführend die Banden, in denen das FBP21 vermutet wurde, ausgeschnitten und für die Analyse mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) vorbereitet. Die Banden für die beiden Proben wurden hierfür jeweils gewaschen, um die Färbereagenzien zu entfernen und anschließend isotonenmarkiert. Hierbei wurden die Duplikate jeweils entgegengesetzt markiert, sodass in Probe A die Negativkontrolle **K26** ^{18}O - und das Konjugat **K28** ^{16}O -markiert war. Probe B wurde entgegengesetzt markiert, um Artefakte aufgrund der Markierung auszuschließen.

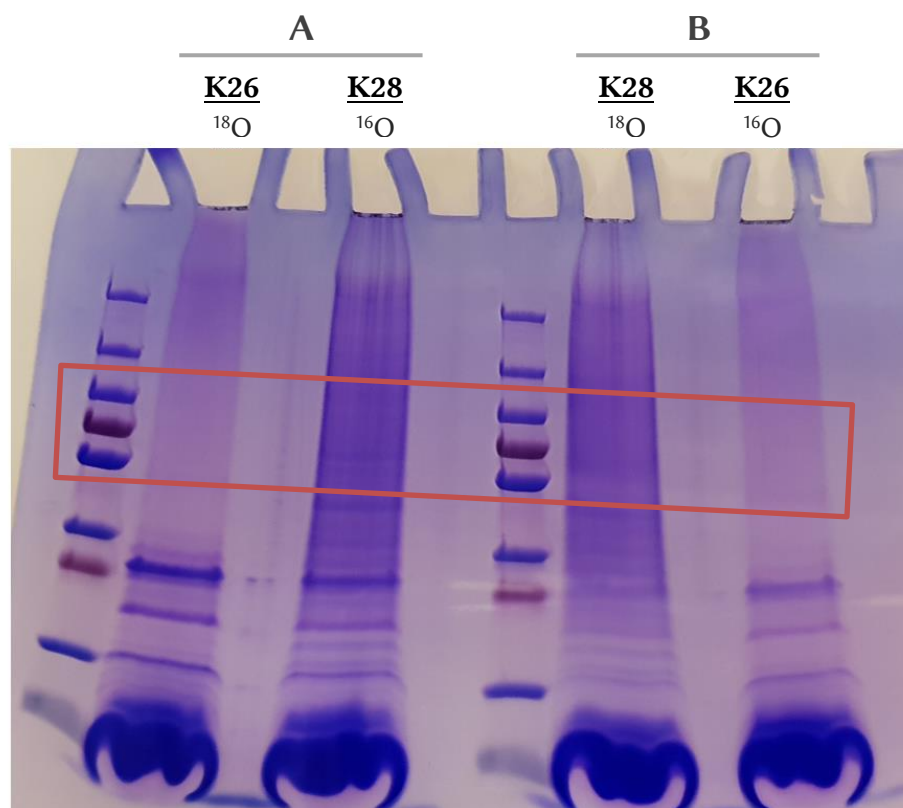


Abbildung 71: SDS-PAGE des Pulldown-Experiments mit den Konjugaten **K26** und **K28**. Die markierten Banden wurden ausgewählt, da sie aufgrund ihrer Größe eventuell gebundenes FBP21 enthalten könnten (roter Kasten). Die Duplikate wurden entgegengesetzt isotonenmarkiert, um mittels MS/MS analysiert werden zu können.

Durch Trypsinieren der jeweiligen Gelbanden wurden schließlich die enthaltenen Protein-Konjugat-Komplexe in einzelne Fragmente gespalten. Die Proben wurden mittels MS/MS vermessen und anhand der *Mascot* Datenbank identifiziert. Durch die Isotopenmarkierung konnte bei der MS/MS-Analyse die Herkunft der Proteinfragmente spezifisch der Negativkontrolle (**K26**) bzw. dem Funktionspeptid-tragenden Konjugat **K28** zugeordnet werden.

Eines der intensivsten Signale, welches in allen Banden detektiert werden konnte, gehört dem Fragment WPPPPR (748,4 g/mol). Es gehört zum ¹⁶O-markierten Konjugat **K28** aus Probe A und dem ¹⁸O-markierten **K28** aus Probe B und entspricht einem Sequenzabschnitt des hochaffinen Peptids **9**. Somit scheint es wahrscheinlich, dass die Interaktion mit den im Pulldown-Assay gebundenen Proteinen über diese Sequenz stattfindet.

Weiterhin konnten in den untersuchten Banden eine Vielzahl an interagierenden Proteinen identifiziert werden. Der Vergleich der isotopenmarkierten Proteine der Negativkontrolle **K26** zum Konjugat **K28** jeweils aus einer Probe, konnte eine klare Anreicherung der Proteine in der jeweiligen **K28**-Fraktion zeigen. Somit banden die entsprechenden Proteine das Funktionspeptid-tragende Konjugat besser als die Negativkontrolle. Weiterhin konnte gesehen werden, dass die Verhältnisse von ¹⁶O **K28**/¹⁸O **K26** und ¹⁸O **K28**/¹⁶O **K26** nicht dieselben Werte ergaben, sondern in der letzteren Probe eine stärkere Anreicherung der Proteine stattfand (**Abbildung 72**). Für eine qualitative Auswertung der bindenden Proteine ist dieses jedoch nicht von Bedeutung. Da für die MS/MS-Analyse nur ein Teil der Banden und nicht das komplette SDS-Gel verwendet wurde, konnte eine quantitative Auswertung nicht stattfinden.

FBP21, welches im Assay nach seiner Gen-Nomenklatur als WBP4 bezeichnet wird, ist unter den 30 am häufigsten bindenden Proteinen vertreten (siehe Anhang **Tabelle A. 4**). Somit ist die Interaktion der hochaffinen Peptide-tragenden Konjugate mit dem FBP21 selbst in Konkurrenz mit anderen Proteinen des Zelllysats nachgewiesen. Allerdings kann hier keinesfalls von einer selektiven Inhibierung des FBP21 ausgegangen werden, da etwa 900 andere Bindungspartner im untersuchten Teil des SDS-PAGE gefunden wurden.

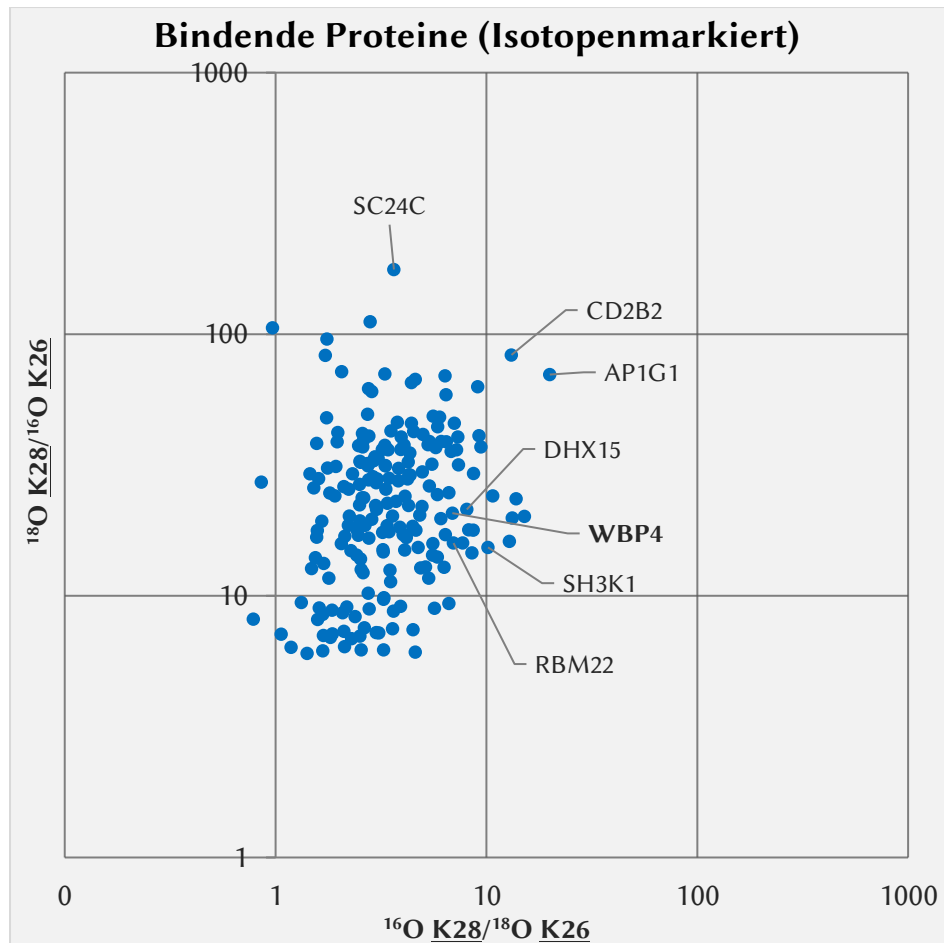


Abbildung 72: Die im Pull-down-Assay gefundenen, isotopenmarkierten Interaktionspartner (angegeben in ihrer Gen-Nomenklatur) wurden in ihren jeweiligen Anreicherungsverhältnissen gegeneinander aufgetragen. Insgesamt konnten über 900 bindende Proteine identifiziert werden, von denen die 200 häufigsten Vertreter hier aufgetragen sind.

Das am häufigsten gebundene Protein der Probe B (^{18}O **K28**/ ^{16}O **K26**) ist das SC24C, welches an der Bildung von Transportvesikeln vom Endoplasmatischen Retikulum beteiligt ist. Für die Probe A (^{16}O **K28**/ ^{18}O **K26**) wurde das AP1G1 als am häufigsten bindendes Protein identifiziert. Dieses ist eine Untereinheit des Clathrin-assoziierten Adaptorprotein-Komplexes I, welcher für die Ausbildung von *Clathrin-coated pits* und Vesikeln verantwortlich ist. Weiterhin konnte das Protein SH3K1, eine SH3-Domänen-beihaltende Kinase, als Interaktionspartner bestätigt werden. Dieses ist nicht verwunderlich, da SH3-Domänen als Bindungspartner für Prolin-reiche Sequenzen (siehe Kapitel 1.4) bekannt sind.^[82]

Die meisten gefundenen Bindungspartner des Konjugats **K28** gehören jedoch zu den im Spliceosom interagierenden Proteinen. Hierbei konnten allein unter den 30 häufigsten Interaktionspartnern neun Proteine (bspw. CD2B2, DHX15 und RBM22) dieser Kategorie

gefunden werden. Weiterhin banden zwei in der Transkription vorkommende Proteine (HNRDL und TF3C4) ebenfalls an das **K28**. Die Gründe der Interaktion der Splicingproteine mit dem Konjugat **K28** konnten abschließend noch nicht geklärt werden. Allerdings ist es denkbar, dass die Selektivität der Prolin-reichen Sequenz des hochaffinen Peptids **9** nicht ausreichend ist, um zwischen den einzelnen Proteinen des Spliceosoms zu unterscheiden. Insbesondere da viele der Proteine selbst mit Prolin-reichen Sequenzen interagieren.^[97-98] Weiterhin ist es ebenso möglich, dass das FBP21 mit den anderen Splicingproteinen interagiert und diese somit zusätzlich gebunden werden.

Die Analyse der restlichen Peptide und Konjugate könnte Aufschluss über die Interaktionen liefern, indem hierbei Unterschiede in den Bindungshäufigkeiten oder Bindungspartnern analysiert werden könnten. In diesem Zusammenhang wäre insbesondere das Konjugat mit der nicht-bindenden Peptidsequenz **22** (WSPSADVDP) von Interesse. Weiterhin könnte durch die Auswertung der kompletten Banden des SDS-PAGE eine Aussage über die quantitative Verteilung der Bindungspartner gemacht werden.

**4. Ergebnisse und Diskussion:
Inhibitoren der West-Nil-Virus Protease
NS2B-NS3**

4.1. Synthese von WNV NS2B-NS3 Protease Inhibitoren und Aktivitätsbestimmungen *in vitro*

Die West-Nil-Virus Protease NS2B-NS3 ist ein geeignetes Target für die antivirale Wirkstoffentwicklung (Kapitel 1.6). Dieses liegt vor allem an seiner Bedeutung für die Prozessierung des viralen Polyproteins. Die Spaltung der Funktionsproteine durch das Polyprotein und somit die Freisetzung dieser in die Wirtszelle ist essentiell für die virale Replikation.^[164] Bislang zeigten besonders Strukturen mit Substratähnlichkeit starke Affinitäten. Hierbei konnten erste Leitstrukturen durch peptidomimetische Ansätze entwickelt werden.^[1, 198] Insbesondere die Verwendung von kurzen, basischen Peptiden, die in P2- und P3-Position zumeist Lysine aufweisen, zeigten gute Wirksamkeiten *in vitro*. So konnten beispielsweise Störmer *et al.* zeigen, dass Lys-Lys Tripeptidmimetika, die in P1-Position Arginalaldehyde tragen, K_i -Werte im unteren nM-Bereich aufweisen. Die besten Mimetika wiesen hierbei eine gewisse Flexibilität zwischen der Aminosäure in P3 und der N-terminalen Gruppe (zumeist Phenacyl, Naphthoyl oder ähnliche) in P4-Position auf.^[199] Weiterhin konnten Schüller *et al.* zeigen, dass die Verwendung von Lysin in P2-Position von WNV präferiert wird, während DENV dort Arginin favorisiert.^[200]

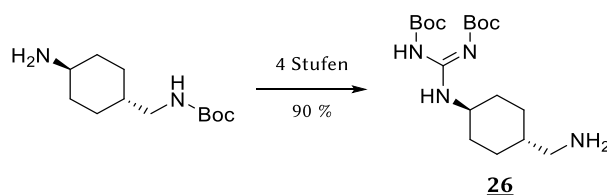
Die Verwendung von Arginalen für antivirale Wirkstoffe stellte sich jedoch als schwierig heraus, da diese nur eine geringe Zellpermeabilität aufwiesen.^[1] Um dieses Problem zu umgehen, wurde auf decarboxylierte Argininmimetika zurückgegriffen, von denen beispielsweise die Agmantine eine potentiell gute Leitstruktur darstellten. So konnten Lim *et al.* Tetrapeptidomimetika mit IC_{50} -Werten von etwa 5 μ M herstellen.^[162] Allerdings wiesen diese eine zu geringe Selektivität in Bezug auf die humane Serin-Protease Matriptase auf, sodass eine gleichzeitige Inhibition dieser nicht ausgeschlossen werden konnte.^[1]

Weiterhin konnten Nitsche *et al.* C-terminale Boronsäure-tragende Peptidomimetika als potente Inhibitoren der Flaviviren aufzeigen. Hierbei erreichten die dipeptidischen Inhibitoren K_i -Werte um die 40-80 nM.^[201] Allerdings konnten die Boronsäure-Inhibitoren in zellulären Assays nur vergleichsweise geringe Aktivität aufweisen, welches wahrscheinlich auf der hohen Polarität der Verbindungen und somit einer geringen zellulären Aufnahme beruht.^[202]

Wie schon in Kapitel 1.6 beschrieben, konnten Hammamy *et al.* mit dem Argininmimetikum *trans*-(4-Guanidinium)cyclohexylmethylamid (GCMA) einen guten Ersatz für die zuvor verwendeten Arginale und Agmantine liefern. In Verbindung mit verschiedenen

Phenacylderivaten in P4-Position konnten die Peptidomimetika K_i -Werte $\leq 1,2 \mu\text{M}$ erreichen. Weiterhin zeigten sie eine gute Selektivität gegenüber den humanen Serin-Proteasen Matriptase, Faktor Xa und Thrombin.^[1] Jedoch konnten zellulär ebenfalls keine Aktivitäten der GCMA-tragenden Peptidomimetika gezeigt werden. Dieses könnte auch aufgrund mangelnder Zellgängigkeit der Fall sein.

In dieser Arbeit sollten Dextranskonjugate auf ihre Vielseitigkeit untersucht werden, indem sie als Grundgerüst für potentielle antivirale Wirkstoffe der West-Nil-Virus Protease NS2B-NS3 eingesetzt wurden. Hierfür sollte das von Hammamy *et.al* beschriebene Peptidomimetikum Phenacyl-Lys-Lys-GCMA multivalent an die Dextrane gebunden werden, um somit eine Zellpermeabilität der Inhibitoren zu ermöglichen.^[1] Die Synthese der Peptidomimetika erfolgte durch Lisa Redl (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Rademann, Freie Universität Berlin). Hierbei stellte sie zuerst das zweifach Boc-geschützte GCMA in vier Stufen aus Boc-geschütztem 4-(Aminomethyl)cyclohexylamin **26** in 90 % Ausbeute her (**Schema 10**).



Schema 10: Synthese des Argininmimetikums **26** aus Boc-geschütztem 4-(Aminomethyl)cyclohexylamin in 90 % Ausbeute, durchgeführt von Lisa Redl.

Weiterführend stellte sie die beiden *N*-terminal TAMRA- und Thiollinker-modifizierten Peptidomimetika Phenacyl-Lys-Lys-GCMA **27** und **28** her (**Schema 11**). Hierfür wurden ausgehend von 1,4-Diodbutan und 4-Hydroxyphenylessigsäure die Thiol- und Azid-haltigen Substituenten **29** und **31** synthetisiert. Diese wurden schließlich *N*-terminal an die zuvor synthetisierten Di-Lysinbausteine mittels Festphasenpeptidsynthese gekuppelt. Nach Abspaltung der Peptide vom Chlortrityl-Harz konnten diese mit dem geschützten GCMA-Baustein **26** gekuppelt werden. Die Vollentschützung lieferte die Peptidomimetika **27** und **28** in 22 % und 7 % Gesamtausbeute.

$$IC_{50} = K_i \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_M} \right) \quad (29)$$

mit: K_i : Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes

$[S]$: Substratkonzentration

K_M : Michaelis-Konstante des Substrats

Der IC_{50} -Wert ist Substrat- und Enzymkonzentrationsabhängig und kann deshalb nur in Systemen verglichen werden, in denen diese konstant sind.

Im vorliegenden Assay wurde ein Fusionsprotein der NS2B-NS3 Protease verwendet, welches aus den für die Funktion der Protease essentiellen Anteilen der NS2B- und NS3-Proteine besteht (**Abbildung 73**).^[204]



Abbildung 73: Fusionsprotein der WNV NS2B-NS3 Protease. Im NS2B-Protein wurde die Aminosäure K96A mutiert, um die Autoproteolyse des Proteins zu verhindern. Weiterhin wurden die Sequenzen durch kurze Linker (grün) voneinander und das NS3 vom His-Tag (orange) getrennt.

Als Substrat wurde das C-terminal 7-Amino-4-methylcoumarin-tragende Tripeptid Boc-GKR-AMC verwendet. Durch Spaltung der Protease in P1-Position wird das AMC freigesetzt und Fluoreszenz kann bei 465 nm detektiert werden. Durch Inhibition der Protease wird weniger AMC freigesetzt und somit nur eine verringerte Fluoreszenz gemessen.^[205] Die Auftragung der Proteaseaktivität gegen den Logarithmus der Konzentration des Inhibitors ermöglicht die Bestimmung des IC_{50} -Werts bei 50 % der Enzymaktivität. Bei Kenntnis der verwendeten Substrat- und Enzymkonzentrationen können nach Gleichung (29) die K_i -Werte berechnet werden. Hierfür wurde für das West-Nil-Virus der von Dr. Christoph Arkona bestimmte K_M -Wert (95 μ M) verwendet. Die Konzentration des Boc-GKR-AMC im Assay beträgt 32,3 μ M.

Das Thiol-Peptidomimetikum **27** zeigte einen IC_{50} -Wert von 460 ± 40 nM ($K_i = 343$ nM). Für das TAMRA-modifizierte Peptidomimetikum **28** konnte ein Wert von $2,83 \pm 0,33$ μ M ($K_i = 2,11$ μ M) erhalten werden (**Abbildung 74**). Die TAMRA-Modifizierung sorgte somit für eine etwa sechsfach geringere Aktivität des Peptidomimetikums gegenüber NS2B-NS3. Der Inhibitor von Hammamy *et al.*, das PhAc-Lys-Lys-GCMA, wies einen K_i -Wert von

1,2 μM auf.^[1] Somit lässt sich sagen, dass der Thiol-haltige Inhibitor **27** ungefähr 3,5-mal so aktiv ist, wie der von Hammamy entwickelte.

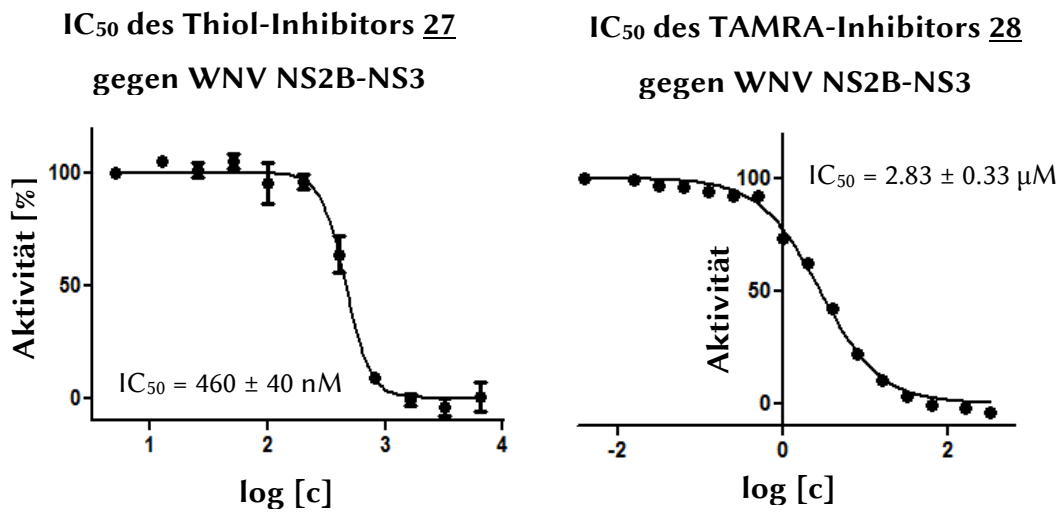


Abbildung 74: IC₅₀-Bestimmungen der Thiol- (links) und TAMRA-haltigen (rechts) Inhibitoren. Der Thiol-haltige Inhibitor **27** besaß eine sechsfach höhere Aktivität gegenüber der WNV-Protease als der TAMRA-haltige Inhibitor **28**.

WNV wird durch Clathrin-vermittelte Endozytose (siehe auch Kapitel 1.5) in Zellen aufgenommen, sodass eine Zellgängigkeit für entsprechende antivirale Wirkstoffe unabdingbar ist.^[206] Somit wurde die zelluläre Aufnahme des TAMRA-Peptidomimetikums **28** von Lisa Redl untersucht, um die Verwendbarkeit der Substanzen *in vivo* zu bestimmen. Für die Untersuchung der zellulären Aufnahme wurden HeLa-Zellen für vier Stunden mit dem Inhibitor inkubiert und anschließend gewaschen. Bei Konzentrationen von 10 μM – 100 μM kann eine Aufnahme des Inhibitors in die Zellen gesehen werden. Die zelluläre Aufnahme des TAMRA-Peptidomimetikums **28** bei 2 μM ist im Vergleich nur gering (**Abbildung 75**).

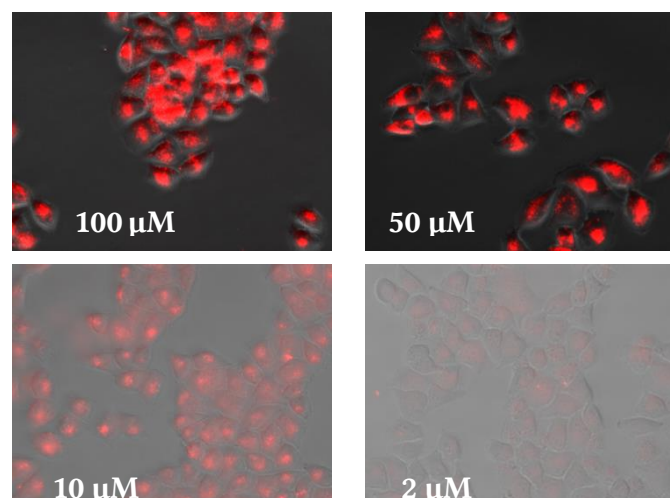


Abbildung 75: Zelluläre Aufnahme des TAMRA-Peptidomimetikums **28** bei verschiedenen Konzentrationen. Der Inhibitor wird bei Konzentrationen $\geq 10 \mu\text{M}$ in die HeLa-Zellen aufgenommen.

Somit konnte das TAMRA-Peptidomimetikum **28** bei hohen Konzentrationen in Zellen aufgenommen werden. Dieses liegt wahrscheinlich an den drei basischen Aminosäuren bzw. dem Aminosäuremimetikum und der daraus resultierenden hohen Ladungsdichte. Wie bereits in Kapitel 1.3 beschrieben, ist die Anzahl der Ladungen und Ladungsdichte bei der Aufnahme von (zellpenetrierenden) Peptiden äußerst wichtig.^[64]

Weiterführend sollte in dieser Arbeit das Thiol-haltige Peptidomimetikum **27** multivalent an das hier verwendete Maleinimiddextran **4** gekuppelt werden, um einen möglichen kooperativen Effekt der Multivalenz zu generieren und somit potente Inhibitoren für die West-Nil-Virus Protease NS2B-NS3 zu entwickeln.

Es konnte nicht mit Sicherheit abgeschätzt werden, ob die Ladung der drei basischen Aminosäuren am Peptidomimetikum für eine zelluläre Aufnahme und zytosolische Freisetzung der Konjugate ausreichen würde. Daher wurden vergleichend Konjugate synthetisiert, die zusätzlich das zellpenetrierende Peptid TAT **11** trugen. Die Synthese der Konjugate erfolgte analog zu der in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Methode und lieferte die mit Peptidomimetikum **27**, Fluorophor **21** und TAT **11** beladenen Konjugate in guten Ausbeuten (**Tabelle 16**, **Abbildung 76**).

Tabelle 16: Beladung und Molmassen der synthetisierten Konjugate für die Inhibition der WNV Protease NS2B-NS3. Molmassen wurden mittels ¹H-NMR-Spektroskopie und Absorptionsspektroskopie bestimmt.

<u>KONJUGAT</u>	<u>INHIBITOR</u>	<u>TAT</u>	<u>FLUOROPHOR</u>	<u>M [g/mol]</u>	<u>AUSBEUTE [%]</u>
<u>K30</u>		2,6	0,5	15 800	98 %
<u>K31</u>	2,0	2,6	0,5	17 800	72 %
<u>K32</u>	4,0	2,6	0,5	19 100	94 %
<u>K33</u>	3,6		0,5	15 100	67 %
<u>K34</u>	6,0		0,4	16 600	77 %

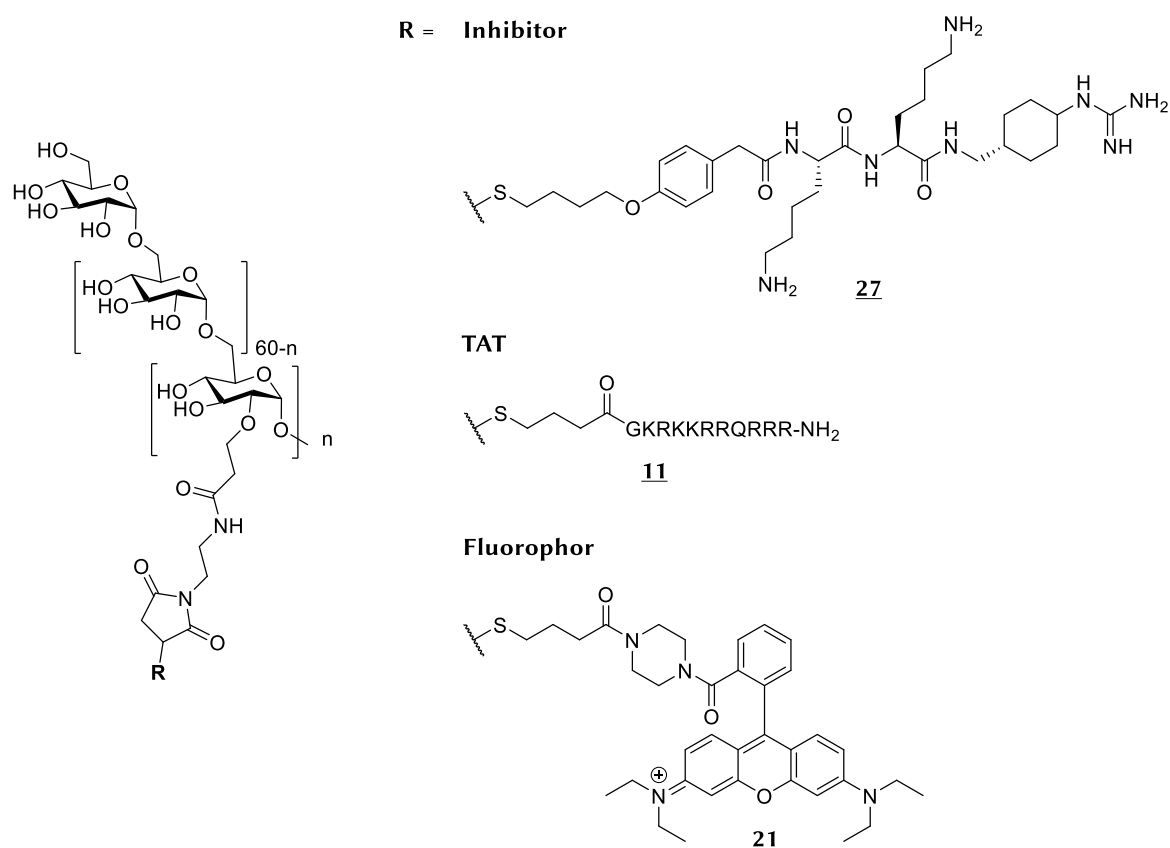


Abbildung 76: In dieser Arbeit synthetisierte Inhibitoren für die WNV Protease NS2B-NS3 mit den entsprechenden gekoppelten Peptiden und Fluorophoren.

Die IC_{50} -Bestimmungen der synthetisierten Konjugate und des TAT-Peptids **11** wurden von Lisa Redl anschließend durchgeführt (**Tabelle 17**). Im Vergleich der einzelnen Substanzen konnte gesehen werden, dass das zellpenetrierende Peptid TAT **11** einen überraschend guten IC_{50} -Wert von 137 nM aufweist. Es ist somit anzunehmen, dass die NS2B-NS3 Protease dieses ebenfalls als Substrat verwendet und an einem der zahlreichen Arginine spaltet. Die Konjugate **K33** und **K34**, welche nur Fluorophor **21** und Peptidomimetikum **27** tragen, wiesen IC_{50} -Werte von 408 nM (bei 3,6 Peptidomimetika) und 138 nM (bei 6,0 Peptidomimetika) auf. Es kommt somit zu einer Aktivitätssteigerung durch die multivalente Präsentation des Inhibitors **27**. Bei der zusätzlichen Kupplung von TAT (**K31** und **K32**) wurden IC_{50} -Werte von 44 nM (bei 2,0 Peptidomimetika und 2,6 TAT) und 12 nM (bei 4,0 Peptidomimetika und 2,6 TAT) erhalten. Dies stellt eine starke Aktivitätssteigerung gegenüber dem monovalenten Peptidomimetikum **27** dar. Allerdings können die guten IC_{50} -Werte nicht allein durch die Verwendung des TAT-Peptids **11** begründet werden, da das Konjugat **K30** (2,6 TAT und Fluorophor) einen ähnlichen IC_{50} -Wert wie das affine TAT-Peptid **11** aufweist. Somit hat die multivalente Präsentation des TATs allein nur

einen geringen Einfluss bei der Aktivitätssteigerung. Vielmehr scheint ein kooperativer Effekt bei der Verwendung des heteromultivalenten Systems vorzuliegen.

Tabelle 17: Bestimmte IC_{50} -Werte der Konjugate/ Peptide für die WNV Protease und Aktivitätssteigerungen der multivalenten Konjugate gegenüber dem Peptidomimetikum 27.

<u>VERBINDUNGEN</u>	<u>$IC_{50, WNV}$</u>	<u>K_i, WNV</u>	<u>AKTIVITÄTSSTEIGERUNG</u>
<u>28</u>	2,8 μ M	2,1 μ M	
<u>27</u>	460 nM	343 nM	
TAT <u>11</u>	137 nM	102 nM	
<u>K30</u>	169 nM	126 nM	
<u>K31</u>	44 nM	32,8 nM	10,5-fach gegenüber <u>27</u>
<u>K32</u>	12 nM	9,0 nM	38,3-fach gegenüber <u>27</u>
<u>K33</u>	408 nM	304 nM	1,1-fach gegenüber <u>27</u>
<u>K34</u>	138 nM	103 nM	3,3-fach gegenüber <u>27</u>

Im weiteren Verlauf sollte die potentielle Aktivität der Inhibitoren gegenüber den Flaviviren Dengue-Virus und Zika-Virus untersucht werden. Da die NS2B-NS3 Proteasen der Flaviviren eine hohe Sequenzidentität aufweisen, ist eine gewisse Aktivität der synthetisierten Inhibitoren zu erwarten.

Für die IC_{50} -Bestimmung des Zika-Virus wurde ein Replikon der Zika NS2B-NS3 Protease verwendet (**Abbildung 77**), welches eine Sequenzübereinstimmung von 68 % mit der verwendeten West-Nil-Virus Protease aufweist.^[201] Die Assaydurchführung erfolgte analog zur IC_{50} -Bestimmung der WNV Protease.



Abbildung 77: Replikon der Zika NS2B-NS3 Protease. Im NS2B-Protein wurde die Aminosäure R95A und im NS3-Protein die Aminosäure R29A mutiert, um die Autoprotolyse des Proteins zu verhindern. Weiterhin wurde die Sequenzen durch einen kurzen Linker (grün) voneinander getrennt. Zur Aufreinigung des Proteins wurde am C-terminalen Ende ein His-Tag (orange) eingefügt.

Die Hemmung der Zika-Virus Protease durch die Inhibitoren wurde durch Dr. Christoph Nitsche (Australien National University, Canberra) im Konzentrationsbereich zwischen

80 μM und 8 nM bestimmt (**Tabelle 18**). Hierbei zeigten die Konjugate **K31** und **K32** und das affine TAT-Peptid **11** bis zu einer Konzentration von 800 nM jeweils 100 % Enzymhemmung. Bei einer Konzentration von 80 nM konnten sie jeweils noch 30 % bzw. 35 % Hemmung aufweisen, während das TAT-Peptid **11** keine Aktivität mehr zeigte. Das affine Peptidomimetikum **27** wies eine etwas geringere Enzymhemmung (92 % bei 800 nM) auf als das TAT-Peptid **11**. Das Konjugat **K35** (1,9 TAT und 0,3 Fluorophore) wies hingegen schon bei 8 μM eine Enzymhemmung von 40 % auf und zeigte somit kaum Aktivität gegenüber der Zika-Virus Protease.

Tabelle 18: Hemmung der Proteaseaktivität durch die verwendeten Konjugate und Peptide bestimmt durch Dr. Christoph Nitsche. Für die beiden potentesten Inhibitoren (**K31** und **K32**) wurden im Anschluss die IC_{50} -Werte von Dr. Christoph Arkona ermittelt.

<u>VERBINDUNG</u>	<u>KONZENTRATION</u>	<u>HEMMUNG [%]</u>
<u>K31</u>	80 μM	100
	8 μM	
	800 nM	
	80 nM	30
	8 nM	0
<u>K32</u>	80 μM	100
	8 μM	
	800 nM	
	80 nM	35
	8 nM	0
TAT <u>11</u>	80 μM	100
	8 μM	
	800 nM	
	80 nM	0
<u>27</u>	80 μM	100
	8 μM	
	800 nM	92
	80 nM	0
<u>K35</u>	80 μM	91
	8 μM	40
	800 nM	0

Für die potentesten Konjugate (**K31** und **K32**) und das Peptidomimetikum **27** wurden anschließend die IC_{50} -Werte gegenüber der Zika-Virus Protease durch Dr. Christoph Arkona (Arbeitskreis von Prof. Dr. Jörg Rademann, Freie Universität Berlin) bestimmt (**Abbildung 78**).

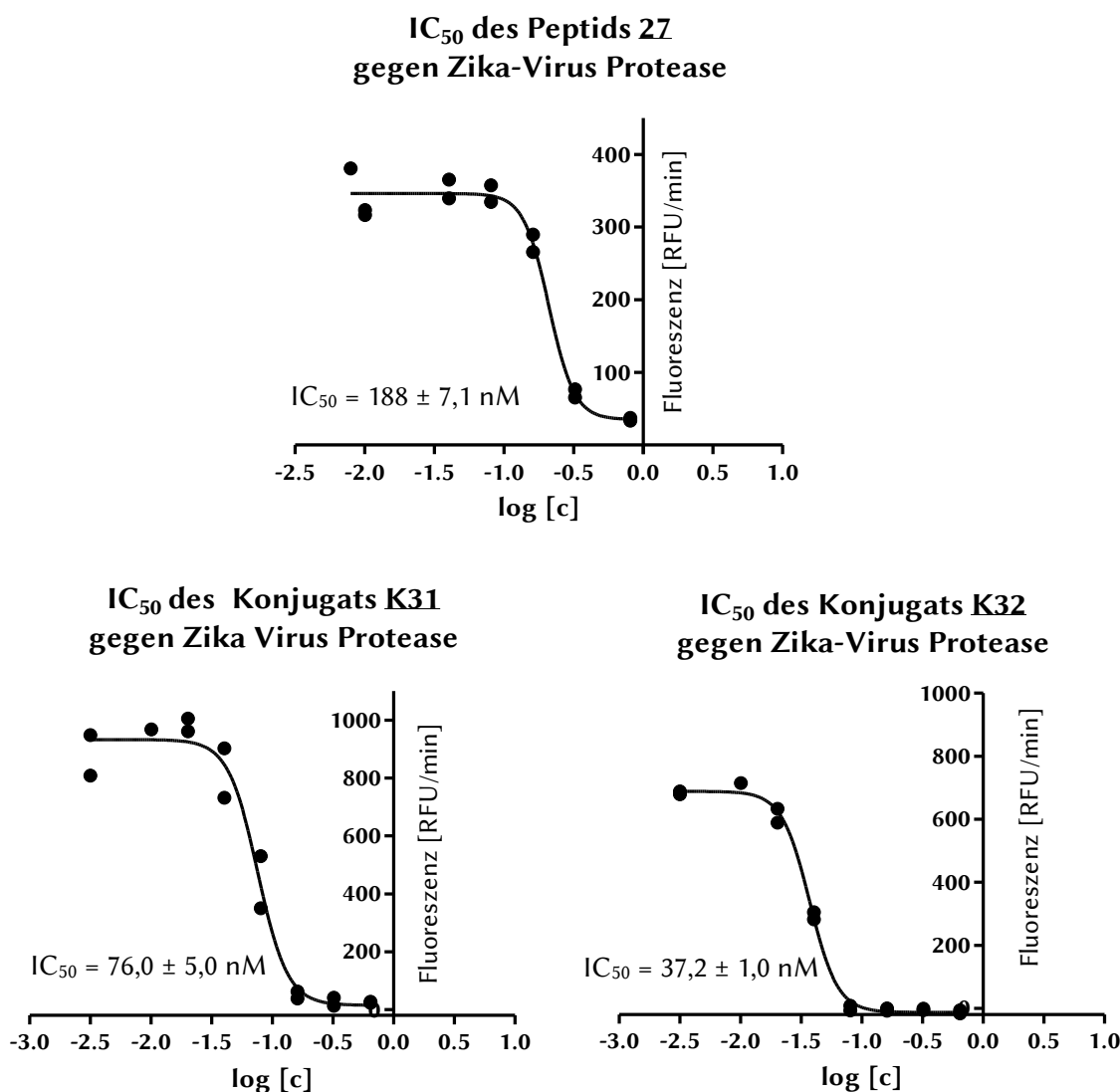


Abbildung 78: IC_{50} -Bestimmung des Peptidomimetikums **27** (oben), der Konjugate **K31** (links) und **K32** (rechts) gegenüber der Zika-Virus Protease NS2B-NS3.

Aus den erhaltenen IC_{50} -Werten wurden nach Gleichung (29) die K_i -Werte bestimmt (**Tabelle 19**). Da K_M -Werte für die Zika-Virus Protease stark von der Salzkonzentration und dem Glyceringehalt der Lösung abhängig sind, wurde der K_M -Wert für das Boc-GKR-AMC Substrat für unser spezifisches System (10 mM MOPS-NaOH, pH 8,0 und 20 %Vol. Glycerin) von Dr. Christoph Arkona bestimmt.^[207] In der Literatur wird Boc-GKR-AMC als nur mäßig bindendes Substrat für die Zika-Virus Protease beschrieben (**Abbildung 79**).^[207] Dieses konnte hier allerdings nicht bestätigt werden, da ein K_M -Wert von 52,3 μ M

erhalten wurde. Somit scheint das hier verwendete Puffersystem vergleichsweise gut für die Vermessung der IC_{50} -Werte geeignet zu sein.

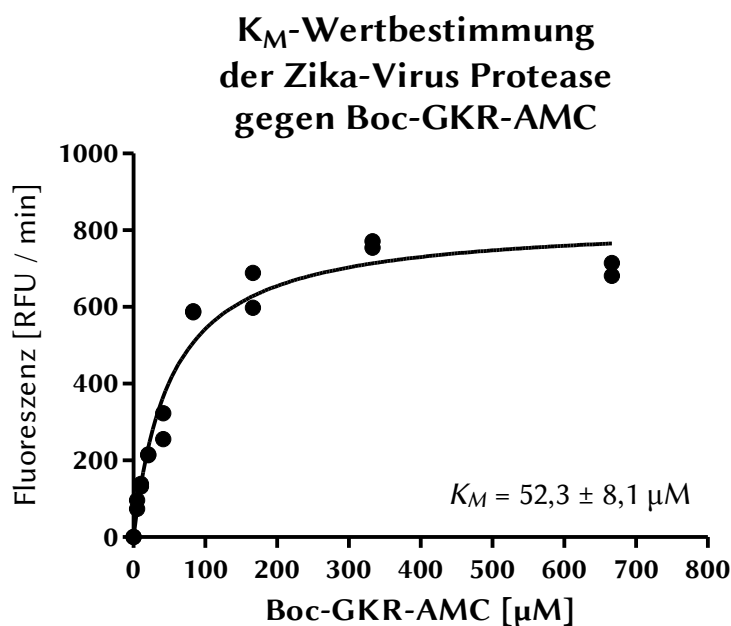


Abbildung 79: Bestimmung des K_M -Wertes der Zika-Virus Protease gegen Boc-GKR-AMC. Es wurde ein guter K_M -Werte von $52,3 \mu\text{M}$ erhalten.

Im Gegensatz zur WNV Protease konnte bei der Zika-Virus Protease keine große Affinitätssteigerung zwischen dem Peptidomimetikum **27** und den Konjugaten gesehen werden (**Tabelle 19**). Während bei der WNV Protease eine etwa zehnfache Steigerung der Affinität durch das heteromultivalente Konjugat **K31** (2 Peptidomimetika und 2,6 TAT-Peptide) vorlag, fand bei der Zika-Virus Protease eine Verdoppelung der Affinität statt. Dieses legt die Vermutung nahe, dass die WNV Protease nicht nur das Peptidomimetikum **27** als Substrat verwendet, sondern auch das TAT-Peptid **11** an einem seiner zahlreichen Arginine spaltet. Bei der Zika-Virus Protease scheint es hierzu nicht zu kommen, da die 2,5-fache Steigerung der Affinität in etwa der Beladung des Konjugats mit Peptidomimetikum **27** entspricht. Im direkten Vergleich der errechneten K_i -Werte konnte weiterhin gesehen werden, dass das untersuchte Peptid eine etwa dreifach so große Affinität für die Zika-Virus Protease aufwies, wie für die WNV-Protease. Die untersuchten Konjugate zeigten wiederum eine stärkere Affinität zur WNV-Protease.

Tabelle 19: Bestimmte IC_{50} - und K_i -Werte des Peptidomimetikums **27** und der Konjugate **K31** (zwei gekuppelte Peptidomimetika) und **K32** (vier gekuppelte Peptidomimetika) für die Zika-Virus Protease bestimmt durch Dr. Christoph Arkona.

KONJUGAT	$IC_{50, \text{Zika}}$ [nM]	K_i, Zika [nM]	$IC_{50, \text{WNV}}$ [nM]	K_i, WNV [nM]
27	188 ± 7,1	116	460 ± 40	343
K31	76,1 ± 5,0	47,0	44	32,8
K32	37,2 ± 1,0	23,0	12	9,0

4.2. Zellbasierte Aktivitätsbestimmung der Inhibitoren gegenüber WNV, DENV-2 und ZIKV

Um weiterführend die Funktion der Inhibitoren *in vivo* zu überprüfen, wurden die potentesten, multivalenten Inhibitoren (**K31**, **K32** und **K34**) in zellbasierten Assays von Stephanie Kallis (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Bartenschlager, Universität Heidelberg) untersucht. Hierfür wurde zunächst der zytotoxische Effekt der Inhibitoren auf humane Leberkarzinomzellen (Huh7) anhand eines CellTiter Glo Assays (siehe auch Kapitel 3.5) bestimmt. Die Inhibitoren **K31** und **K32** wiesen bei Konzentrationen $\geq 25 \mu\text{M}$ hohe Zytotoxizitäten auf (**Abbildung 80**). Zellviabilitäten oberhalb 80 % konnten für die beiden Inhibitoren bei Konzentrationen unter $12,5 \mu\text{M}$ erhalten werden (**Abbildung 81**). Für das Konjugat **K34** konnten ausreichende Zellviabilitäten bereits bei Konzentrationen $\leq 25 \mu\text{M}$ erhalten werden. Somit scheint das TAT-Peptid **11** für die erhöhte Zytotoxizität der Konjugate **K31** und **K32** ausschlaggebend zu sein. Die entsprechenden Konzentrationen konnten im weiteren Verlauf für die Zellassays verwendet werden.

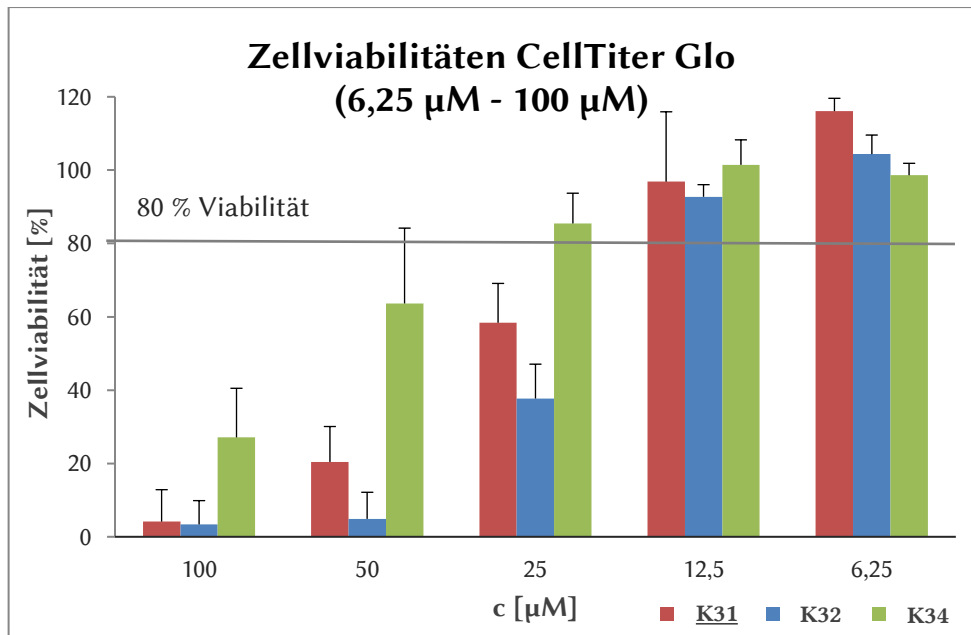


Abbildung 80: Bestimmte Zellviabilitäten der Konjugate **K31**, **K32** und **K34** im Konzentrationsbereich von 6,25 µM - 100 µM. Der hierfür verwendete CellTiter Glo Assay wurde durch Stephanie Kallis (Universität Heidelberg) durchgeführt. Die Konjugate wiesen bei Konzentrationen unter 12,5 µM gute Zellviabilitäten auf.

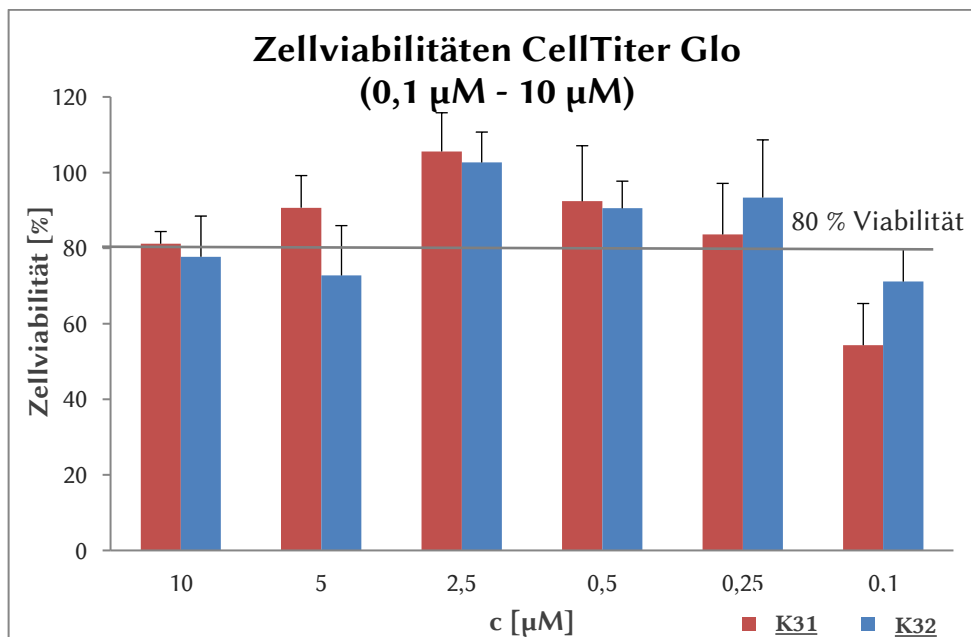


Abbildung 81: Bestimmte Zellviabilitäten der Konjugate **K31** und **K32** im Konzentrationsbereich von 0,1 µM - 10 µM. Der hierfür verwendete CellTiter Glo Assay wurde durch Stephanie Kallis (Universität Heidelberg) durchgeführt. Die Zellviabilitäten sind in diesem Bereich generell sehr gut. Die bestimmte Zellviabilität bei 0,1 µM scheint ein Artefakt zu sein, da sie nicht zu den restlichen Werten passt.

Im Anschluss wurden von Stephanie Kallis zellbasierte Assays durchgeführt, um die Aktivität der Inhibitoren auf die West-Nil-, Dengue- und Zika-Viren *in vivo* zu überprüfen.

Hierfür wurden für WNV und DENV sogenannte Plaque-Assays durchgeführt, die die Wirkung der Inhibitoren auf die Virusreplikation untersuchen (**Abbildung 82**). Die zu untersuchenden Substanzen werden hierbei zusammen mit dem entsprechenden Virus in Huh7-Zellen inkubiert. Nach Mediumwechsel und weiterer Inkubation wird der erhaltene Überstand zur viralen Infizierung von Vero E6-Zellen verwendet. Die Zellen werden anschließend mehrere Tage inkubiert, um eine ausreichende Replikation der Viren zu gewährleisten. Schließlich werden die Zellen fixiert und angefärbt, sodass der Virustiter anhand der ungefärbten Plaques in der Probe bestimmt werden kann.^[208]



Abbildung 82: Schematische Darstellung des Plaque-Assays. Huh7-Zellen wurden mit Inhibitor und Flavivirus inkubiert. Nach Medienwechsel und weiterer Inkubation wurde der Überstand der Zellen zur Infizierung von Vero E6-Zellen verwendet. Diese wurden mehrere Tage inkubiert, um die Virusreplikation zu ermöglichen. Der Virustiter wurde anschließend nach Fixierung der Zellen und Färbung bestimmt. Tote Zellen werden nicht gefärbt und können als Plaques gezählt werden.

Bei hoher Aktivität der zu untersuchenden Substanzen wird die NS2B-NS3 Protease der Viren stark inhibiert und somit die Proliferation der Viren gemindert. Bei der Infizierung der Vero E6-Zellen können somit nur wenige Viren übertragen werden. Die Virusproliferation wird somit nur im geringeren Maße voranschreiten, als in unbehandelten Zellen. Bei der Färbung mit Kristallviolett oder Methylenblau, welche nur lebende Zellen anzeigen, werden somit Plaques sichtbar. Je höher die Anzahl an ungefärbten Plaques in der Probe, desto geringer ist auch die Aktivität der zu untersuchenden Inhibitoren. Durch einberechnen des eingesetzten Volumens und eines Verdünnungsfaktors, kann die Konzentration der in der Probe enthaltenen Viren errechnet werden. Diese kann im Diagramm gegen die gewählten Konzentrationen der Inhibitoren aufgetragen werden und wird generell als PFU/mL (*plaque forming units*) angegeben. Unter Verwendung der Positivkontrolle, welche eine Inhibition von 0 % aufweist, können die für die Konjugate erhaltenen PFU/mL-Werte in prozentuale Inhibitionen umgerechnet werden (siehe auch **Tabelle A. 5** - **Tabelle A. 7** im Anhang).

Die Ergebnisse des Plaque-Assays für die untersuchten Konjugate (**K31**, **K32** und **K34**) zeigten keine Aktivitäten gegenüber West-Nil-Virus bei einer Multiplizität der Infektion

(MOI) von 0,2 (**Abbildung 83**). Diese beschreibt das Verhältnis von Viren zu Zielzellen bei der viralen Infektion. Weiterhin wurde als Referenzsubstanz Ribavirin verwendet, welches als antiviraler Wirkstoff gegen DNA- bzw. RNA-Viren, wie das Hepatitis-C-Virus, Influenza-Virus und Adenoviren, eingesetzt wird. Jordan *et al.* konnten bei Verwendung hoher Konzentrationen von Ribavirin eine Inhibition der WNV Replikation in neuronalen Zellen detektieren.^[209] Im durchgeführten Assay zeigte Ribavirin nur bei einer Konzentration von 200 μM einen inhibitorischen Effekt von etwa 70 % gegenüber WNV. Alle weiteren Konzentrationen wiesen keine Inhibition des WNV auf.

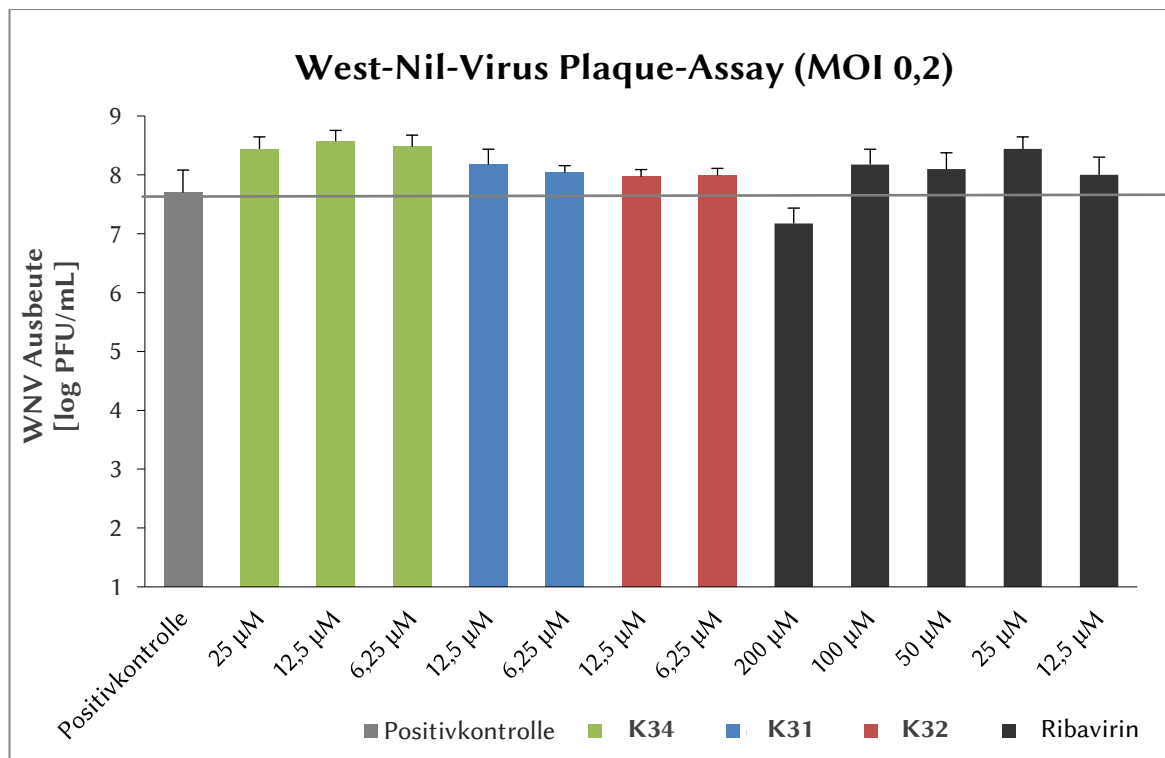


Abbildung 83: Bestimmung des inhibitorischen Effekts der synthetisierten Konjugate auf die West-Nil-Virus Protease mittels Plaque-Assay (MOI 0,2) durchgeführt von Stephanie Kallis. Die Konjugate zeigen im ausgewählten Konzentrationsbereich keine Aktivität.

Bei Wiederholung des Plaque-Assay bei einer geringeren Viruskonzentration (MOI = 0,1) konnte für Ribavirin eine vollständige Inhibition des West-Nil-Virus bei Konzentrationen von 100 μM – 200 μM festgestellt werden (**Abbildung 84**). Bei Konzentrationen von 50 μM – 12,5 μM konnten hier Inhibitionen zwischen 99 % – 90 % gesehen werden (**Tabelle 20**). Im Vergleich zeigten die Konjugate bei 12,5 μM eine Inhibition des West-Nil-Virus von 67 % (**K31**) bzw. 78 % (**K32**). Für **K32** konnte bei einer Konzentration von 6,25 μM eine virale Inhibition von 54 % erhalten werden. Das Konjugat **K31** zeigte bei dieser Konzentration keine inhibitorischen Effekte. Die untersuchten Konjugate weisen somit eine

geringere Aktivität gegenüber der WNV Protease NS2B-NS3 auf, als die Referenzsubstanz bei gleicher Konzentration.

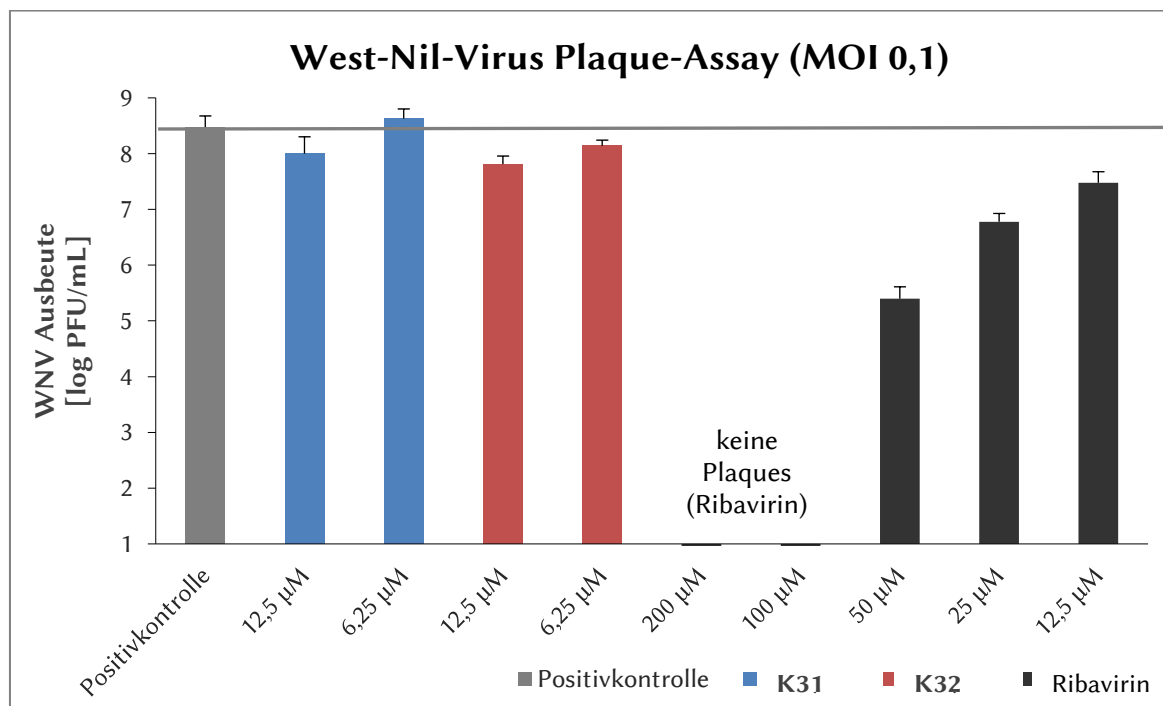


Abbildung 84: Bestimmung des inhibitorischen Effekts der synthetisierten Konjugate **K31** und **K32** auf die West-Nil-Virus Protease mittels Plaque-Assay (MOI 0,1) durchgeführt von Stephanie Kallis. Die Konjugate zeigten bei Konzentrationen von 12,5 µM Inhibitionen von 67 % und 78 %.

Tabelle 20: Prozentuale Inhibitionen der WNV Protease durch die verwendeten Konjugate und die Referenzsubstanz Ribavirin.

<u>KONJUGAT</u>	<u>FUNKTIONS-PEPTID</u>	<u>WEITERE BELADUNG</u>	<u>KONZENTRATION [µM]</u>	<u>INHIBITION [%]</u>
Positivkont.				0 %
K31	2,0	0,5 Thiol-RhB Pip 2,6 TAT	12,5	66,7 %
			6,25	-41,7 %
K32	4,0	0,5 Thiol-RhB Pip 2,6 TAT	12,5	78,3 %
			6,25	54,2 %
Ribavirin			200	100 %
			100	100 %
			50	99,9 %
			25	98,0 %
			12,5	90,0 %

Überraschenderweise zeigte sich ein größerer inhibitorischer Effekt der untersuchten Konjugate auf die virale Proliferation des Dengue-Virus als beim zuvor untersuchten West-Nil-Virus. Hierbei konnte insbesondere eine gute Inhibition durch die Konjugate **K31** und **K32** gezeigt werden, die sich durch die zusätzliche Kupplung des TAT-Peptids **11** gegenüber **K34** unterscheiden. Bei Konzentrationen zwischen 25 μM – 6,25 μM konnte für alle Konjugate eine sehr gute Inhibition (90 – 99 %) der Dengue-Viren festgestellt werden (**Abbildung 85**, **Tabelle A. 6** im Anhang).

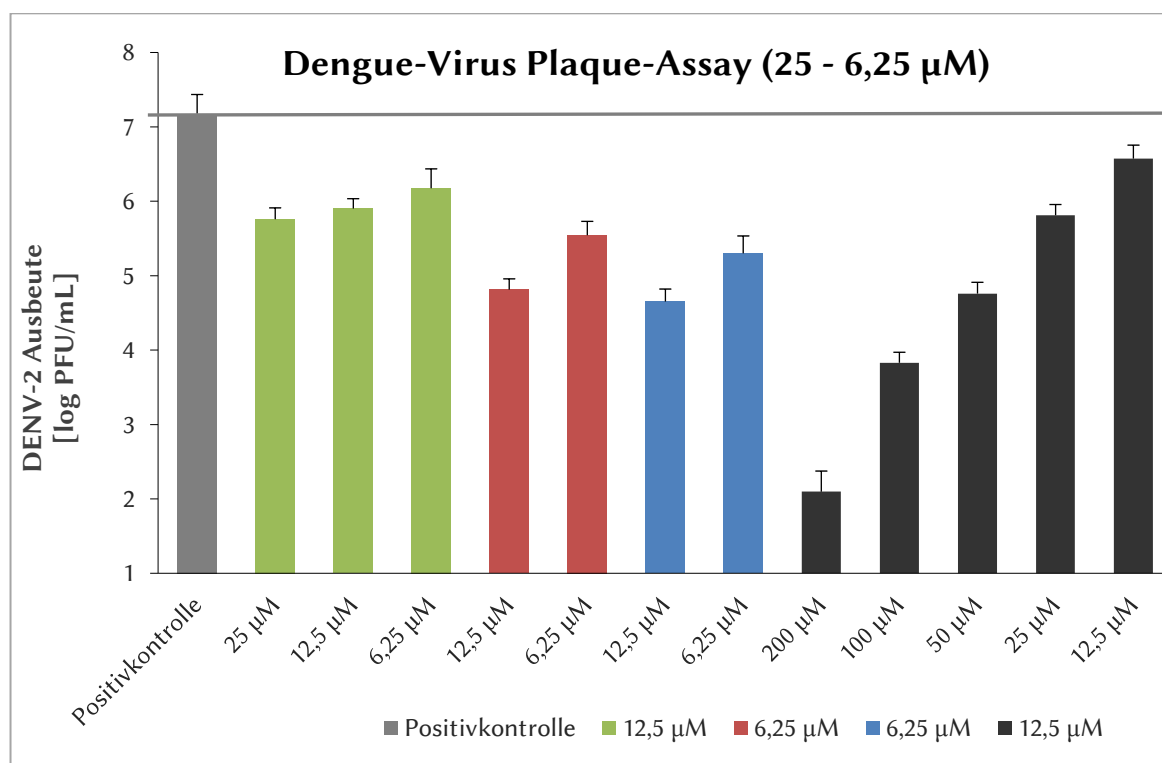


Abbildung 85: Inhibition des Dengue-Virus im Konzentrationsbereich zwischen 25 - 6,25 μM . Es konnten allgemein gute Inhibitionen zwischen 90 - 99 % erhalten werden.

Zur weiteren Differenzierung zwischen den einzelnen Konjugaten, wurde die Inhibition der Dengue-Viren im Konzentrationsbereich zwischen 10 μM – 0,1 μM bestimmt (**Abbildung 86**). Hierbei zeigten sich die ersten Unterschiede zwischen den beiden heteromultivalenten Konjugaten **K31** und **K32**, sowie dem Konjugat **K34**, welches kein TAT-Peptid **11** trägt. Während die heteromultivalenten Konjugate bei Konzentrationen $\geq 2,5 \mu\text{M}$ Inhibitionen des Dengue-Virus zwischen 90 – 98 % aufwiesen, inhibierte das Konjugat **K34** die Dengue-Viren bei 5 μM nur noch zu 40 %. Somit scheint ein Anteil der Inhibition durch Interaktion des TAT-Peptids **11** mit der Dengue-Virus Protease hervorgerufen zu werden. Bei der weiteren Betrachtung der beiden heteromultivalenten Konjugate war schließlich ein starker Unterschied bei einer Konzentration von 0,25 μM zu sehen. Während das

Konjugat **K32**, welches vier Peptidomimetika auf dem Dextrangrundgerüst trägt, hier eine Inhibition des Virus von 82 % aufwies, konnte das Konjugat **K31** nur noch eine Inhibition von 37 % hervorrufen. Das Konjugat **K31** trägt im Vergleich nur zwei Peptidomimetika pro Dextran, somit ist die Anzahl dieser ebenfalls ein wichtiger Faktor für die Inhibition des Dengue-Virus.

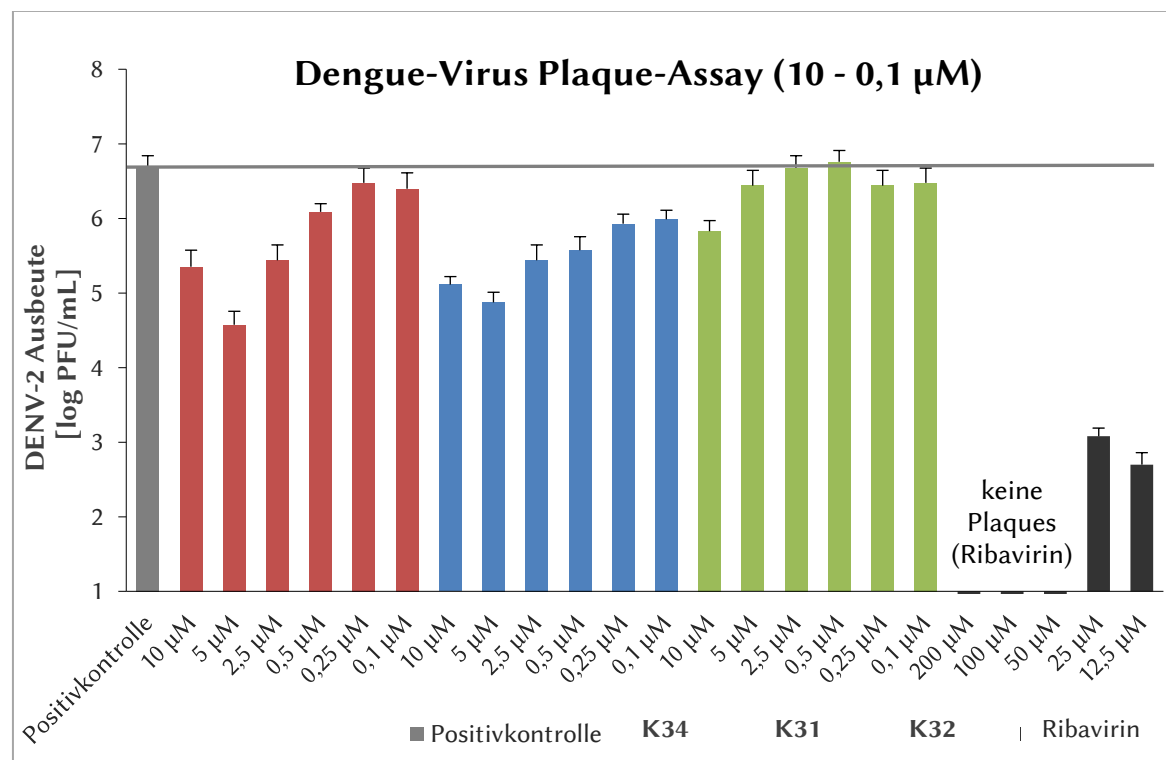


Abbildung 86: Inhibition des Dengue-Virus im Konzentrationsbereich zwischen 10 – 0,1 µM. Die heteromultivalenten Konjugate **K31** und **K32** wiesen bei geringen Konzentrationen eine bessere Inhibition der Dengue-Viren auf, als das Konjugat **K34**.

Durch Normalisierung der erhaltenen Virus-Ausbeuten im Plaque-Assay und Auftragung gegen die vermessenen Konzentrationen, konnten vorläufige IC₅₀-Werte der Konjugate für DENV-2 erhalten werden (**Abbildung 87**). Anhand der Graphen konnte gesehen werden, dass die verwendeten Konzentrationen den Sättigungsbereich näherungsweise abdeckten. Somit können die erhaltenen IC₅₀-Werte einen groben Überblick über die Aktivität der Konjugate gegenüber dem Dengue-Virus geben. Dennoch ist hier zu sehen, dass die heteromultivalenten Konjugate eine mittlere Aktivität um 400 nM aufwiesen. Das homomultivalente Konjugat **K34** wies hingegen einen IC₅₀-Wert von etwa 5 µM auf und ist somit deutlich weniger aktiv.

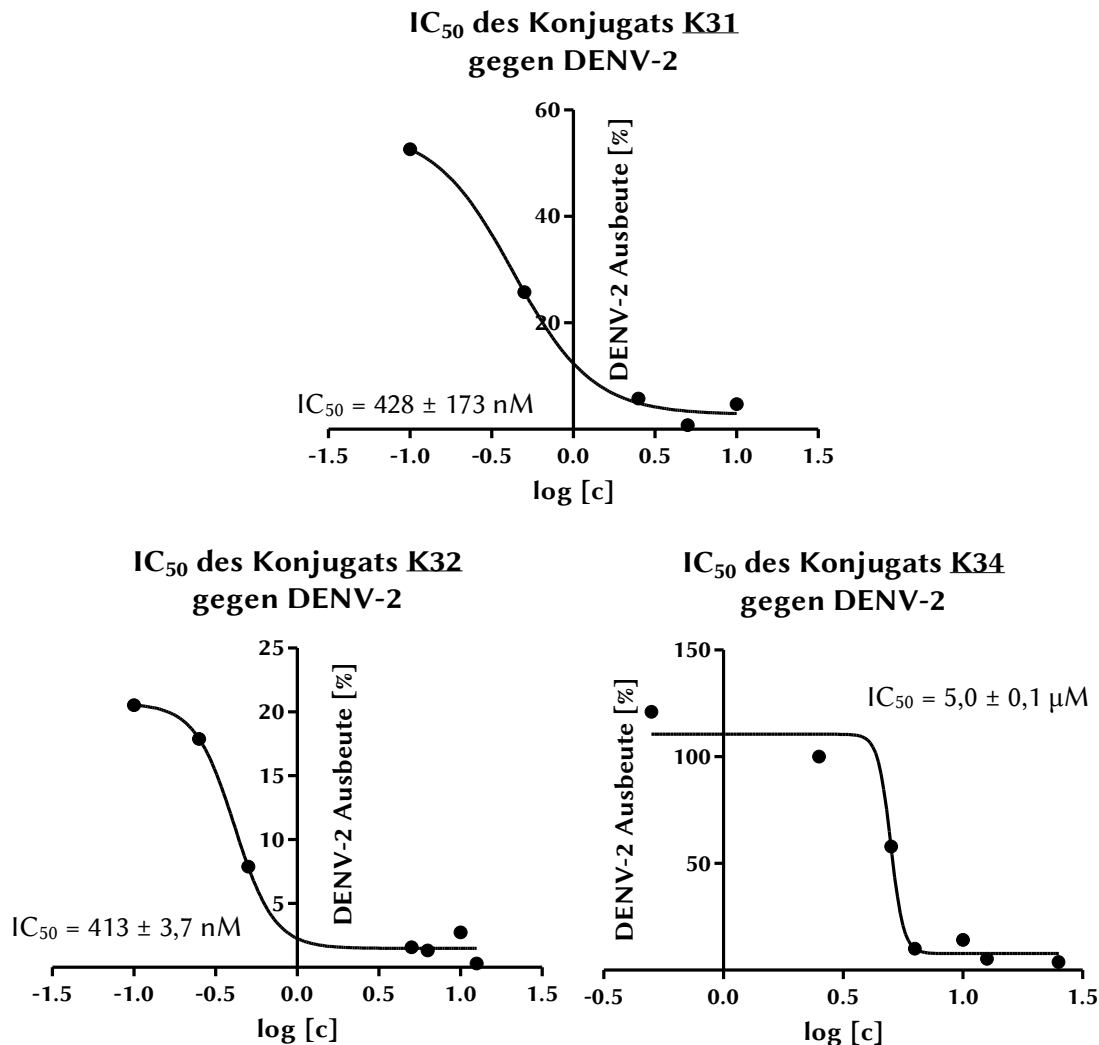


Abbildung 87: IC₅₀-Bestimmung anhand der normalisierten Virus-Ausbeuten, die aus den Plaque-Assays erhalten wurden.

Weiterführend wurde für die Aktivitätsbestimmung der Substanzen gegenüber ZIKV ein Zika-Virus Replikations-Assay durchgeführt. Hierfür wurde der Zika MR766 Luciferase Reporter Virus von Stephanie Kallis verwendet. Huh7-Zellen wurden mit den zu untersuchenden Inhibitoren (**K31**, **K32** und **K34**) versetzt und anschließend mit dem entsprechenden Zika-Virus infiziert. Nach Inkubation und Medienwechsel, wurden die Zellen lysiert. Durch Zugabe des Luciferase-Substrats Coelenterazin konnte die emittierte Lumineszenz vermessen werden (**Abbildung 88**). Bei hoher viraler Inhibition durch die vermessenen Substanzen kommt es folglich nur zu einem geringeren Lumineszenzsignal, da die Luciferase-vermittelte Umsetzung des Coelenterazins inhibiert wird.

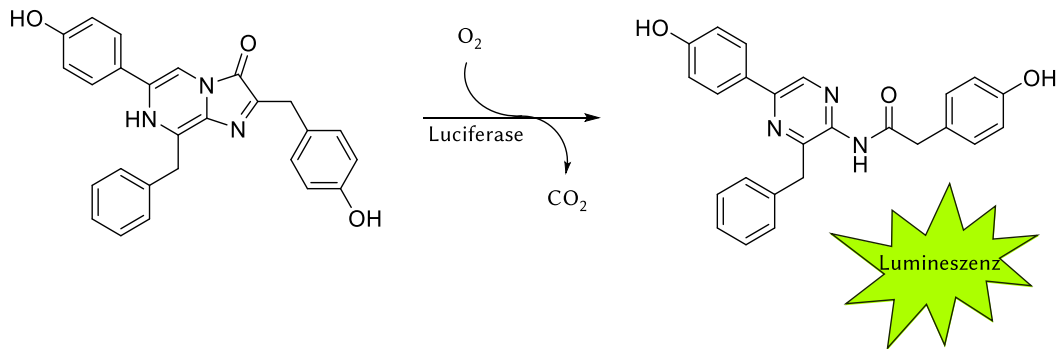


Abbildung 88: Umsetzung von Coelenterazin mittels Luciferase in Coelenteramid. Hierbei wird Licht emittiert, welches als Lumineszenz detektiert werden kann.

Der inhibitorische Effekt der heteromultivalenten Konjugate (**K31** und **K32**) auf die Zika-Virus-Protease ist recht stark ausgeprägt (**Abbildung 89**). Beide Konjugate weisen bei einer Konzentration von 12,5 μM eine Replikation der Zika-Viren von etwa 28 % auf. Konzentrationen oberhalb 12,5 μM konnten aufgrund der Zytotoxizität der beiden Konjugate nicht vermessen werden. Bei einer Konzentration von 6,25 μM wird eine Inhibition von 34 % für **K31** und 20 % für **K32** erreicht. Das Konjugat **K34**, welches sechs Peptidomimetika trägt, weist bei einer Konzentration von 25 μM eine Zika-Virus Replikation von 62 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf. Bei geringeren Konzentrationen konnte keine Inhibition der Replikation festgestellt werden. Es ist somit möglich, dass der inhibitorische Effekt der Konjugate **K31** und **K32** allein vom zellpenetrierenden Peptid TAT **11** ausgeht. Weiterhin ist es ebenso denkbar, dass das Konjugat **K34** aufgrund fehlender Aufnahme bzw. Freisetzung in den Huh7-Zellen die Zika-Viren nicht inhibieren konnte. Somit könnte in diesem Fall die Replikation der Viren ungehindert fortschreiten. Für eine genauere Differenzierung sind mikroskopische Untersuchungen notwendig.

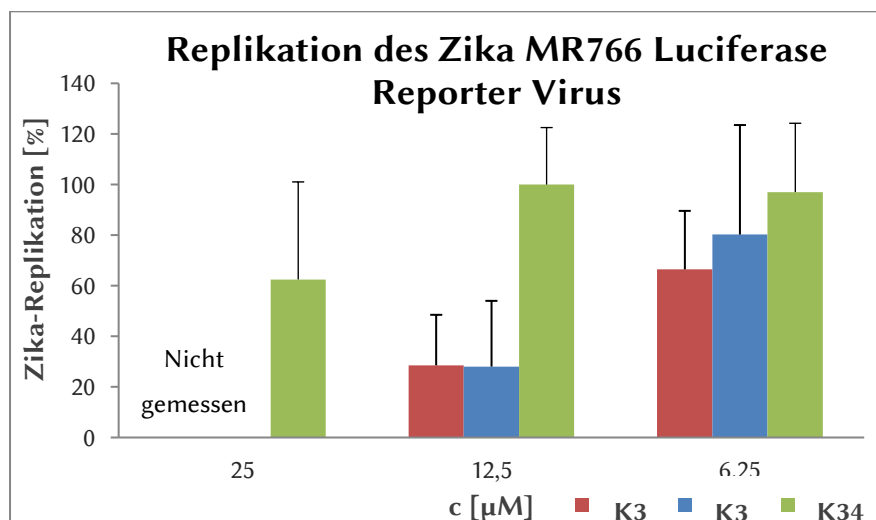


Abbildung 89: Zika-Virus Replikation bei Inhibition mit den synthetisierten Konjugaten (**K31**, **K32** und **K34**). Bei 12,5 μM Konzentration trat ein guter inhibitorischer Effekt der heteromultivalenten Konjugate auf. Die Inhibition der Virus-Replikation für das Konjugat **K34** ist nur schwach ausgeprägt.

Abschließend kann gesagt werden, dass die synthetisierten Konjugate allgemein gute Aktivitäten gegenüber den untersuchten Flaviviren aufwiesen. Die heteromultivalenten Konjugate, die zusätzlich zum Peptidomimetikum 27 das zellgängige TAT-Peptid 11 auf dem Dextrangrundgerüst trugen, zeigten hierbei größere Aktivitäten als die homomultivalenten Konjugate. Dieses könnte zum einen an einer nicht ausreichenden Zellgängigkeit der homomultivalenten Konjugate liegen. Zum anderen scheint das TAT-Peptid 11 selbst als Substrat für die verschiedenen Proteasen zu wirken. Hierbei scheint die Affinität der TAT-haltigen Konjugate gegenüber WNV größer zu sein als gegenüber Zika, da hier eine größere Differenz in den IC₅₀-Werten des Peptidomimetikums 27 zu den entsprechenden Konjugaten auftrat. Weiterhin wies das Konjugat **K30** (0,5 Fluorophore und 2,6 TAT) einen IC₅₀-Wert von 169 nM für die WNV Protease auf, während die Hemmung der Zika-Virus Protease für das Konjugat **K35** (0,3 Fluorophore und 1,9 TAT) bei 8 µM nur 40 % betrug. Ein IC₅₀-Wert wurde hier nicht bestimmt.

Um weiterführende Aussagen zu treffen, müssen jedoch noch umfangreichere Experimente durchgeführt werden. Hierzu zählen insbesondere die Bestimmung der IC₅₀-Werte der Konjugate für die WNV Protease *in vivo* und die mikroskopische Untersuchung der zellulären Aufnahme der homo- und heteromultivalenten Konjugate.

5. Resümee und Ausblick für zukünftige Arbeiten

Bislang gestaltete sich die Inhibition von Protein-Protein Interaktionen aufgrund ihrer ausgedehnten und flachen Bindungsflächen als schwierig. Der Verwendung von hochaffinen Peptiden, welche als natürliche Mimetika der PPI verwendet werden könnten, steht die oftmals geringe Zellpermeabilität und der rasche proteolytische Abbau der Substanzen im Wege. Somit wäre die Entwicklung eines Inhibitorsystems, welches variabel an die entsprechenden zu inhibierenden Proteine angepasst werden und die angesprochenen Probleme negieren könnte, von besonderer Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurden Dextrane als Grundgerüst für multivalente, peptidische Inhibitoren des mRNA-Splicing-proteins FBP21 und der West-Nil-Virus Protease NS2B-NS3 verwendet.

Die genaue Rolle des FBP21 im mRNA-Splicingzyklus ist bislang unklar. Somit sollte ein potenter, zellgängiger Inhibitor entwickelt werden, um diese weiterführend untersuchen zu können. Hierbei stand die funktionelle Untersuchung der Inhibitoren und deren Einfluss auf das FBP21 im Vordergrund (**Abbildung 90**).

Das Maleinimidextran **4**, dessen Synthese aus Vorarbeiten von Dr. Martin Richter bereits zugänglich war, diente hierbei als Startmaterial für die Konjugatsynthese. Verschiedene Funktionspeptide und zellpenetrierende Peptide konnten in einer effizienten Einstufensynthese kovalent an das Dextrangrundgerüst gebunden werden. Als inhibitorische Peptide wurden die Prolin-reichen Funktionspeptide WPPPPRVPR (affines Peptid **8**, W) und WPPPPRVPRWPPPPRVPR (hochaffines Peptid **9**, W₂) gewählt, da sie bereits von unserem Kooperationspartner (AG Freund, Freie Universität Berlin) als vielversprechende Inhibitoren der Tandem-WW-Domäne des FBP21 identifiziert wurden.

Die Konjugatsynthese konnte selbst bei der gleichzeitigen Kupplung mehrere Peptidspezies gute Ausbeuten erzielen. So wurden beispielsweise Konjugate für konfokalmikroskopischen Untersuchungen synthetisiert (**K1** – **K13**), die zusätzlich zum Funktionspeptid auch zellpenetrierende Peptide gebunden hatten, um eine effiziente Aufnahme und Freisetzung in die Zellen zu ermöglichen.

Bei der Analytik dieser hochkomplexen Produkte konnte die konventionell verwendete NMR-Spektroskopie jedoch keinen ausreichenden Aufschluss über die erhaltenen

Produkte liefern. Dieses lag vor allem an der Signalüberlagerung durch die verschiedenen Peptidspezies und das Dextrangrundgerüst, die eine gleichzeitige quantitative Auswertung der einzelnen Peptide verhinderte.

Die Kupplung eines Rhodamin B-Piperazinderivats **17** in die Seitenkette der zellpenetrierenden Peptide ermöglichte eine zusätzliche Auswertung der Beladung mittels Absorptionsspektroskopie. Zu diesem Zweck wurde eine kostengünstige und zeitsparende Analysemethodik entwickelt. Die Beladung der Funktionspeptide wurde hierbei, wie bei der Analyse der homomultivalenten Konjugate, aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum entnommen. Weiterführend wurde das Absorptionsspektrum der Konjugate aufgenommen und unter Verwendung der zuvor bestimmten Extinktionskoeffizienten die jeweiligen anteiligen Absorptionswerte der Konjugatbestandteile bei drei ausgewählten Wellenlängen bestimmt. Aus den erhaltenen Absorptionsanteilen konnten im weiteren Verlauf die Konzentrationen der Konjugatbestandteile in Lösung und somit die Beladungen bestimmt werden. Weiterhin konnte die Molmasse der Konjugate auf diesem Weg ermittelt werden.

Um die Methodik zu verifizieren, wurden die wasserlöslichen Konjugate anschließend mittels Gelpermeationschromatographie vermessen. Die erhaltenen Molmassenmittelwerte wiesen zumeist nur geringe Abweichungen zu denen in der Absorptionsspektroskopie erhaltenen Molmassen auf. Somit bestärkten die in der GPC erhaltenen Ergebnisse die in dieser Arbeit entwickelte Analysemethodik.

Des Weiteren sollten die synthetisierten Konjugate (**K1** – **K17**) auf ihr Bindungsverhalten zur Tandem-WW-Domäne des FBP21 untersucht werden. Hierfür wurden Bindungsstudien mittels isothermaler Titrationskalorimetrie durchgeführt. Diesbezüglich sollte insbesondere das Augenmerk auf den Unterschied zwischen ungebundenen und Dextran-gebundenen Funktionspeptiden, sowie zwischen affinen W-Peptiden **8** und hochaffinen W₂-Peptiden **9** gelegt werden. Weiterhin wurde der Einfluss der zellpenetrierenden Peptide, als auch des Dextrangrundgerüsts untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass diese keinerlei Bindungsaffinität zum FBP21 aufwiesen.

Bei den Funktionspeptiden zeigten sich wiederum stärkere Unterschiede. So wies das ungebundene, affine Peptid **8** (WPPPPRVPR) eine geringe Bindungsaffinität zum FBP21 auf, während die Verwendung des hochaffinen Peptids **9** diese etwa um den Faktor zehn verbesserte. Die Kupplung der Funktionspeptide zeigte eine Steigerung der Bindungsaffinität mit steigender Beladungszahl. Allerdings wurde hier ab einer Beladung von vier bis fünf W₂-Peptiden pro Dextran ein Optimum erreicht. Der Blick auf die Bindungsstöchiometrien zeigte hierbei, dass das affine Peptid in einem 1:1 Verhältnis zur Tandem-WW-

Domäne des FBP21 bindet, während das hochaffine Peptid **9** eine höhere Stöchiometrie aufweist. Die Vermutung liegt nahe, dass das hochaffine Peptid **9** hierbei sowohl im Verhältnis 1:1 mit dem Protein interagieren kann, als auch durch seine verlängerte Sequenz gleichzeitig mit beiden WW-Domänen des FBP21 wechselwirkt. Die Bindungsstöchiometrien der Konjugate wiesen eine Interaktion von bis zu 6,7 Proteinen pro Dextran auf. Es ist wahrscheinlich, dass hier aus sterischen Gründen keine Interaktion aller zehn hochaffinen Peptide auf dem Dextrangrundgerüst möglich war. Dieses würde auch die Entwicklung des Maximums der Bindungsaffinitäten mit steigender Beladungszahl erklären.

Bei der Betrachtung der thermodynamischen Zustandsgrößen konnte zudem eine Enthalpie-Entropie-Kompensation der multivalenten Konjugate gesehen werden. Durch die zunehmenden Interaktionen zwischen Konjugat und Protein mit steigender Beladungszahl, nahm durch Addition der einzelnen Bindungsevents die Bindungsenthalpie des Systems zu. Da jedoch diese steigende Interaktion eine Verringerung der Flexibilität des Systems hervorzurufen schien, sank die Bindungsentropie des Systems. Es kam zur Kompensation. Die hochaffinen W_2 -tragenden Konjugate stellten sich durch die Steigerung der Bindungsaffinitäten und der guten Bindungsstöchiometrien als vielversprechende Systeme heraus, sodass diese im weiteren Verlauf der Arbeit verwendet wurden.

Weiterhin wurde die zelluläre Aufnahme der hochaffinen W_2 -Konjugate untersucht. Die Aufnahme der Konjugate in den Zellkern sollte durch eine Kombination aus dem zellpenetrierenden Peptid TAT und der Kernlokalisationssequenz des SV40 langen T-Antigens (NLS) stattfinden. Anhand von durchgeführten Resazurin- und ATP/ Luciferase-Zytotoxizitätsassays zeigte sich, dass das W_2 -Funktionspeptid einen zytotoxischen Effekt auf die verwendeten Zellen hatte, der sich mit steigender Beladung der Konjugate verstärkte. Diese Zytotoxizität liegt potentiell in der biologischen Aktivität der Peptide begründet, welche als Splicinginhibitoren Einfluss auf die Zellen und ihren Metabolismus nehmen können.

Für die Untersuchung der zellulären Aufnahme der Konjugate, welche in Kooperation mit Miriam Bertazzon durchgeführt wurde, wurden Konzentrationen im nicht-zytotoxischen Bereich gewählt. Hierbei zeigte sich, dass bei alleiniger Kupplung von zellpenetrierenden Peptide (**K2** und **K3**) nur eine geringe Freisetzung der Konjugate im Zytosol erfolgte. Stattdessen verblieben die Konjugate vermehrt in Endosomen. Bei zusätzlicher Kupplung des hochaffinen W_2 -Peptids konnte bereits bei einer geringeren Beladung an zellpenetrierenden Peptiden eine Freisetzung der Konjugate im Zytosol erreicht werden (**K1**). Weiterhin zeigte sich, dass sobald die Konjugate in das Zytosol freigesetzt wurden, auch eine

Aufnahme in den Nukleus erfolgte. Hierbei zeigte sich wiederum, dass mit steigender Beladung an zellpenetrierendem Peptid auch eine vermehrte nukleare Aufnahme zu sehen war. Somit scheint die Verwendung eines Systems aus Funktionspeptid und zellpenetrierendem Peptid die beste Aufnahmestrategie zu sein. Allerdings ist aufgrund erhöhter Zytotoxizitäten von einer Beladung oberhalb 1,5 zellpenetrierenden Peptiden und 4 hochaffinen Peptiden abzuraten. Die Untersuchung der zellulären Aufnahme von affinen Peptid-Konjugaten konnte aus zeitlichen Gründen nicht erfolgen. Sie wäre jedoch in diesem Zusammenhang von Interesse, da diese generell eine geringere Zytotoxizität aufwiesen und somit in höheren Konzentrationen eingesetzt werden könnten.

Ausgehend von den ITC-Ergebnissen sollte außerdem die Funktionalität der Konjugate, also ihr Einfluss auf das Splicingverhalten von Zellen, anhand eines *in vitro* Splicing-Assays von Miriam Bertazzon untersucht werden. Hierfür wurden die Splicingaktivität des hochaffinen W_2 -Peptids **9**, sowie eines Konjugats mit etwa sechs hochaffinen Peptiden (**K13**) mit der Aktivität der nicht-bindenden Peptidsequenz **22** (WSPSADVPD) und dessen Konjugat **K25** verglichen. Es konnte eine signifikante Reduktion der Splicingaktivität durch das Funktionspeptid-tragende Konjugat **K13** gesehen werden, während die nicht-bindende Sequenz **22** und ihr Konjugat keinen Einfluss auf die Splicingaktivität aufwiesen. Das hochaffine W_2 -Peptid **9**, welches nicht Konjugat-gebunden vorlag, zeigte hingegen nur eine geringe Reduktion der Splicingaktivität. Somit ist die Verwendung eines multivalenten Systems für die Funktionalität von äußerster Bedeutung.

Schließlich sollte bestimmt werden, ob die Funktionalität der Konjugate auf die Interaktion mit FBP21 zurückzuführen sei oder eine Interaktion mit anderen Splicingproteinen die Ursache war. Hierfür wurden die Interaktionspartner der Inhibitoren mittels Pull-down-Assay von Miriam Bertazzon bestimmt. Durch Immobilisierung der synthetisierten Peptide und Konjugate auf einem Harz und Inkubation mit dem Zelllysate konnten die Bindungspartner für die Konjugate ermittelt werden. Hierbei konnte mittels SDS-PAGE eine Vielzahl an bindenden Proteinen detektiert werden. Durch Vergleich eines isotonenmarkierten Konjugats (**K28**) und seiner Bindungspartner mit denen der Negativkontrolle (**K26**) mittels MS/MS, konnten die relativen Häufigkeiten der gefundenen Proteine bestimmt werden. Insgesamt wurden etwa 900 bindende Proteine in der ausgewählten SDS-PAGE Bande gefunden, von denen etwa 200 Proteine eine große Anreicherung in der Konjugatprobe im Vergleich mit der Negativkontrolle aufwiesen. Bei genauerer Betrachtung der gebundenen Proteine, zeigte sich, dass viele Interaktionspartner selbst aus dem

Splicingzyklus stammen und somit bekannt dafür sind, an Prolin-reiche Sequenzen zu binden. Weiterhin ist es ebenso denkbar, dass das FBP21 durch Interaktion mit den übrigen Splicingproteinen diese für den Pulldown-Assay detektierbar machte.

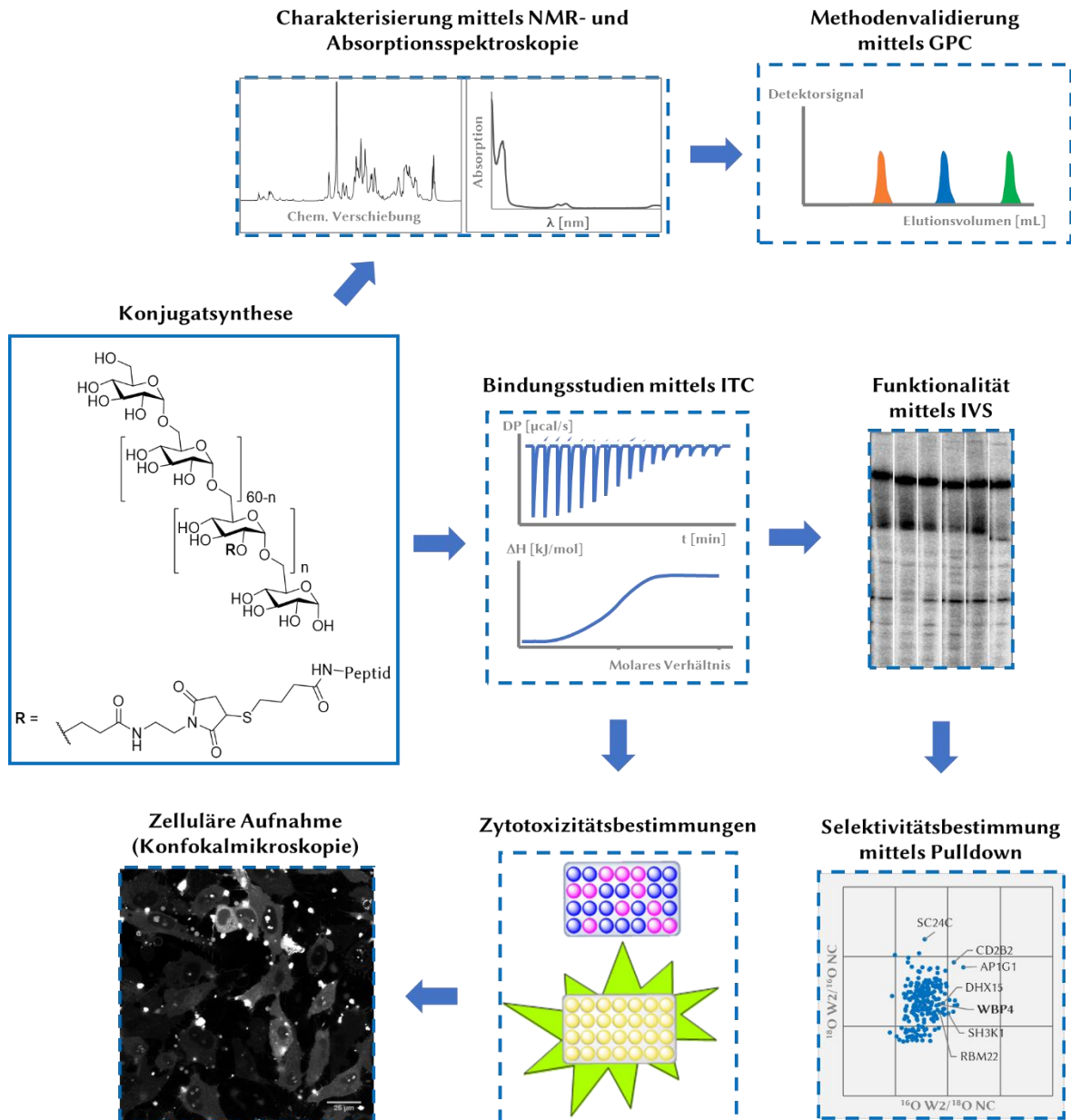


Abbildung 90: Konjugatsynthese, Charakterisierung und biochemische Untersuchungen der Konjugate auf ihre Eignung als potente Inhibitoren des FBP21. Die synthetisierten Konjugate wurden auf ihre Bindungsaffinitäten, ihre Funktionalität und ihre Selektivität untersucht. Weiterhin wurde ihre zelluläre Aufnahme in HeLa-Zellen untersucht.

Abschließend lässt sich sagen, dass das Konjugatsystem ausgiebig analysiert wurde. Es konnte gesehen werden, dass die Konjugate durch ihren multivalenten Aufbau an gewünschte Bindungsaffinitäten angepasst werden können. Hierbei zeigte sich, dass die Beladung mit hochaffinen W₂-Peptiden **9** eine stärkere Bindungsaffinität lieferte als mit den

affinen W-Peptiden **8**. Weiterhin konnte die Zellgängigkeit bei der Verwendung einer Kombination aus TAT und NLS nachgewiesen werden, die eine Interaktion der Splicingproteine *in vivo* ermöglicht. Im *in vitro* Splicing-Assay konnte zudem gezeigt werden, dass eine multivalente Präsentation für die funktionelle Aktivität der FBP21-Inhibitoren unabdingbar ist. Die Untersuchung der Interaktionspartner der Konjugate mittels Pulldown-Assay zeigte eine vermehrte Interaktion mit Splicingproteinen. Somit sind die verwendeten Peptid-Dextrankonjugate als PPI-Inhibitoren für das pre-mRNA Splicing grundlegend geeignet.

In weiterführenden Arbeiten wäre es möglich das Verständnis über die Interaktion der Inhibitoren mit dem FBP21 durch *in vivo* Funktionsassays wie beispielsweise *in vivo* Splicing-Assays noch weiter auszubauen. Weiterhin wäre die Analyse der nicht-bindenden Konjugate und des FLAG-W₂-Peptids im Pulldown-Assay von Interesse, um eine mögliche Veränderung der Interaktionspartner zu untersuchen.

Die Entwicklung von antiviralen Wirkstoffen für das West-Nil-Virus gestalten sich bislang als schwierig, obwohl bereits einige potente Inhibitoren für die WNV Protease NS2B-NS3 gefunden werden konnten. Dieses liegt vor allem an der geringen Zellgängigkeit der synthetisierten Peptidomimetika.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden Dextrankonjugate als multivalente Inhibitoren für die West-Nil-Virus Protease NS2B-NS3 untersucht (**Abbildung 91**). Das von Hammamy *et al.* entwickelte Peptidomimetikum Phenacyl-Lys-Lys-GCMA diente hier als Funktionspeptid. Anfängliche Untersuchungen von Lisa Redl zeigten eine Zellgängigkeit des Peptidomimetikums **27** ausschließlich bei hohen Konzentrationen $\geq 10 \mu\text{M}$. Die Synthese und Analytik der Peptidomimetika-tragenden Konjugate erfolgte nach der für die FBP21-Konjugate beschriebenen Methodik. Hierbei wurden sowohl homomultivalente Konjugate synthetisiert, die nur das Peptidomimetikum in unterschiedlicher Beladung trugen (**K33** und **K34**), als auch heteromultivalente Konjugate (**K31** und **K32**). Diese trugen zusätzlich das zellpenetrierende Peptid TAT **11**, um eine Zellgängigkeit auch bei geringeren Konzentrationen sicherzustellen. Für die synthetisierten Konjugate wurden anschließend IC₅₀-Werte für die West-Nil-Virus Protease und die Zika-Virus Protease von Lisa Redl und Dr. Christoph Arkona bestimmt. Hierbei zeigten die homomultivalenten Konjugate eine geringe Aktivitätssteigerung gegenüber dem ungebundenen Peptidomimetikum. Die heteromultivalenten Konjugate wiesen hingegen eine starke Aktivitätssteigerung auf. Dies liegt darin

begründet, dass das TAT-Peptid **11** selbst als Substrat für die Proteasen wirken kann und somit eine Affinitätssteigerung hervorruft. Allerdings kann allein dieser Effekt nicht die Größe der IC₅₀-Steigerung hervorrufen, sodass ein multivalenter Effekt des heteromultivalenten Systems vorliegen muss. Der Vergleich der aus den IC₅₀-Werten errechneten K_i-Werte für die WNV und ZIKV Proteasen zeigte eine ähnliche Affinität der Konjugate. Somit sind die synthetisierten Dextranskonjugate nicht spezifisch für WNV, sondern können auch für anderen Flaviviren eingesetzt werden.

Die Untersuchung der inhibitorischen Effekte der potentesten Konjugate *in vivo* wurde von Stephanie Kallis durchgeführt. Hierbei zeigten sich hohe Zytotoxizitäten für die Konjugate oberhalb Konzentrationen von 12,5 µM für die TAT-tragenden Konjugate bzw. 25 µM für das Konjugat ohne TAT.

Im Plaque-Assay zeigte sich für die heteromultivalenten Konjugate eine WNV Inhibition zwischen 65 – 80 %, während das homomultivalente Konjugat keine Wirkung zeigte. Weiterhin zeigte die Verwendung der Konjugate für die Inhibition der Dengue-Virus Replikation eine hohe Aktivität für alle verwendeten Substanzen im Konzentrationsbereich zwischen 12,5 – 6,25 µM. Bei geringeren Konzentrationen wies das homomultivalente Konjugat nur noch eine geringe Inhibition auf. Für die heteromultivalenten Konjugate (**K31** und **K32**) konnte selbst bei 0,1 µM noch eine Inhibition der Virusreplikation von 47 % für das Konjugat mit zwei Peptidomimetika und 80 % für das Konjugat mit vier Peptidomimetika erreicht werden. Somit zeigt sich, dass zwar die Verwendung des TAT-Peptids den inhibitorischen Effekt der Konjugate steigert, die Beladung der Peptidomimetika pro Konjugat jedoch auch einen wichtigen Beitrag leistet.

Die Inhibition der Zika-Virus Replikation wurde anhand eines Luciferase-Assays bestimmt. Hierbei zeigte sich, wie auch bei den anderen beiden Flaviviren, eine höhere Potenz der heteromultivalenten Konjugate gegenüber dem homomultivalenten Konjugat. Bei Konzentrationen zwischen 12,5 – 6,25 µM wiesen die Konjugate eine ähnliche Inhibition der Replikation wie für die West-Nil-Virus Protease auf.

Abschließend lässt sich somit sagen, dass die multivalente Präsentation der Peptidomimetika potente Inhibitoren für die Flaviviren West-Nil-, Dengue- und Zika-Virus liefern kann. Die Unterschiede zwischen heteromultivalenten und homomultivalenten Konjugaten sollten hierfür in weiterführenden Arbeiten noch genauer untersucht werden. So ist es auch denkbar, dass die verminderte Aktivität *in vivo* durch eine geringere Zellgängigkeit der Systeme ohne TAT hervorgerufen wird. Somit wäre weiterführend eine Untersuchung der zellulären Aufnahme der Konjugate sinnvoll. Weiterhin sollte das System

angepasst werden, um die Zytotoxizität der Konjugate zu reduzieren und somit größere Konzentrationsbereiche für die zellulären Untersuchungen zugänglich zu machen.

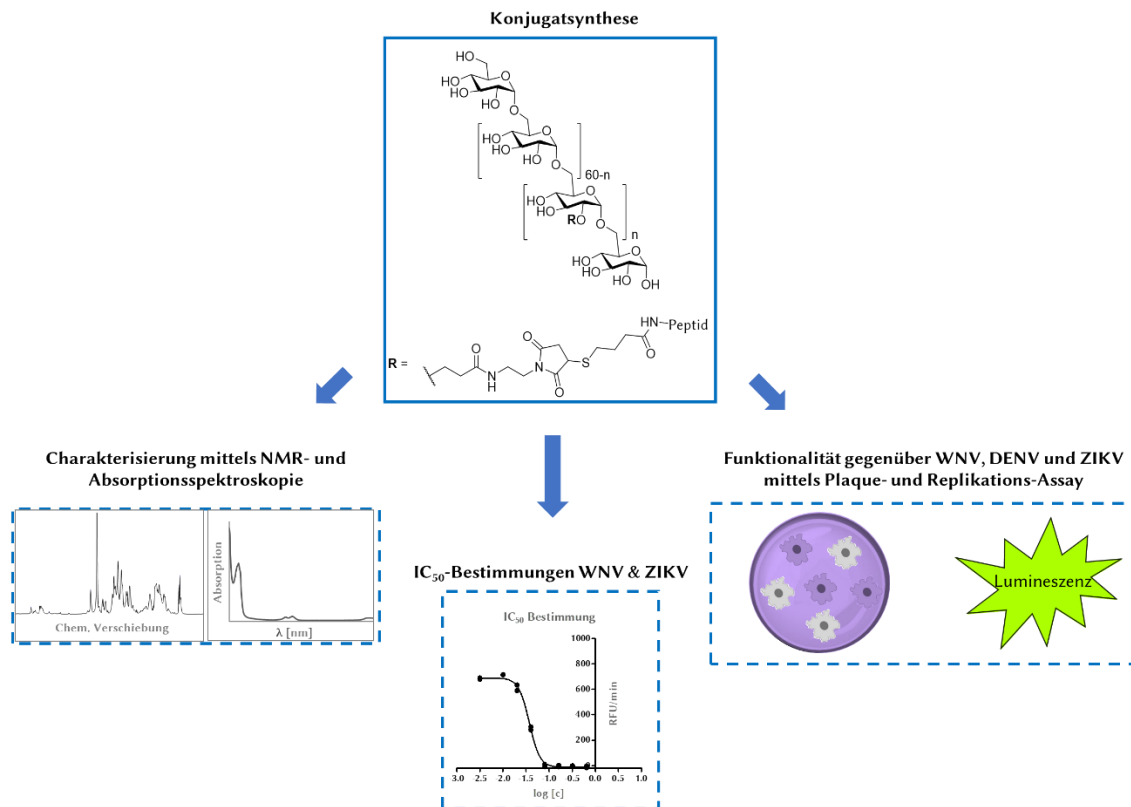


Abbildung 91: Konjugatsynthese, Charakterisierung und Untersuchungen der Funktionalität der Konjugate für die flavivirale Wirkstoffentwicklung. Die IC₅₀-Werte und *in vivo* Untersuchungen wurden von Kooperationspartnern durchgeführt.

6. Experimentaltteil

6.1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien, Harze, Aminosäuren und (deutierten) Lösungsmittel wurden von den Firmen ABCR, Acros organics, Carl Roth, Deutero, Fluka, Fisher Scientific, GL Biochem, Merck, Novabiochem, Rapp Polymere, Sigma Aldrich, VWR und 007chemicals im höchstmöglichen Reinheitsgrad erworben und ohne weitere Aufreinigung in den hier beschriebenen Synthesen eingesetzt. Lösungsmittel, die für die Synthese unter inerten Bedingungen benötigt wurden, wurden einem Lösungsmitteltrocknungssystem MB-SPS-800 der Firma MBraun entnommen. Das für die GPC-, LC/MS-, HPLC- und MPLC-Messungen verwendete Wasser wurde einer Millipore Milli-Q Anlage (Serie LaboStar) der Firma Siemens entnommen. Für die Dialyse wurde deionisiertes Wasser verwendet.

6.2. Analytische Methoden und Geräte

Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Überprüfung der Reaktionsverläufe wurde mittels Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Hierfür wurden die Proben auf mit Kieselgel bezogene Aluminiumplatten (DC Kieselgel 60 F₂₅₄ Platten der Firma Merck KGaA) aufgetragen. Die Chromatogramme wurden in Glaskammern mit Lösungsmittelgemischen (Hexan/Ethylacetat und DCM/Methanol) entwickelt. Die anschließende UV-Detektion erfolgte bei 254 nm oder 360 nm. Nicht UV-aktive Verbindungen wurden mit Ninhydrin oder Vanillin/Schwefelsäure angefärbt.

Elementaranalyse

Die Bestimmung der Kohlenstoff-, Wasserstoff-, Stickstoff- und Schwefelanteile einer Probe wurden von Frau Eleonore Christmann-Osterreich mittels Elementaranalysator VARIO EL der Firma Elementar durchgeführt.

Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die Messungen für die Gelpermeationschromatographie wurden auf einem individuellen GPC-System (PSS Polymer Standards Service GmbH) durchgeführt. Es wurde eine Kationensäule (Novema Max, 1000 Å, 10 µm, 8x300 mm) mit entsprechender Vorsäule (Novema Max, 10 µm, 8x50 mm) verwendet. Als mobile Phase wurde deionisiertes Wasser (Millipore) mit einem Zusatz von 0,3 M Ameisensäure bei einer Flussrate von 1,0 mL/min gewählt. Die Detektion erfolgte mittels differenziellem Brechungsindexdetektor (RI-Detektor). Die Säulen und der RI-Detektor wurden hierbei auf 30°C geheizt.

Für die einzelnen Messungen wurde ein Injektionsvolumen von 100 µL der gelösten Proben substanz (1,5 mg/mL) gewählt. Als Lösungsmittel wurde hierbei ein Teil des Elutionsmittels verwendet, welchem zusätzlich Ethylenglycol als interne Standard zugesetzt wurde. Die erhaltenen Messdaten wurden mithilfe der WinGPC UniChrom Software der Firma PSS ausgewertet. Die angegebenen Molmassen und Molmassenverteilungen wurden in Bezug auf einen Poly(2-vinylpyridin) Standard angegeben (PSS Polymer Standard Services GmbH).

Die erhaltene Kalibrationsgerade für den Dextranstandard ist in **Abbildung A. 1** zu sehen.

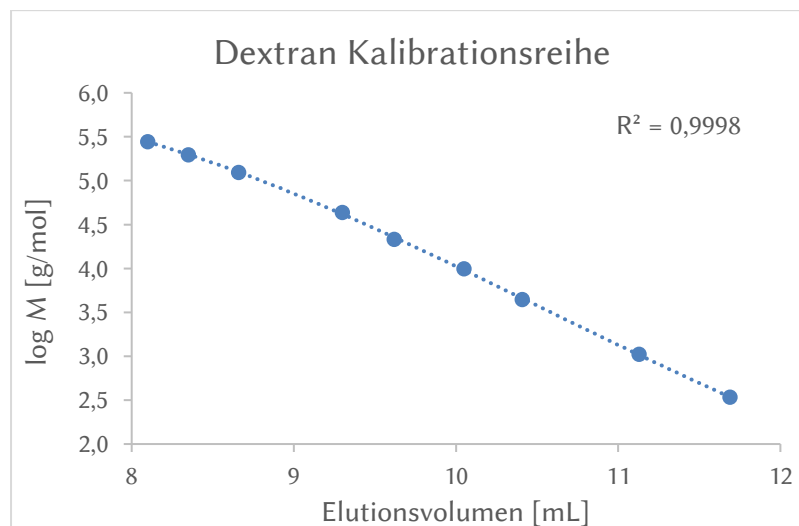


Abbildung A. 1: Vermessene Dextran-Kalibrationsreihe. Der Logarithmus der Molmasse ist gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Verwendung eines Polynoms 3. Grades für die Trendlinie.

Die erhaltene Kalibrationsgerade für den P2VP-Sandrad ist in **Abbildung A. 2** zu sehen

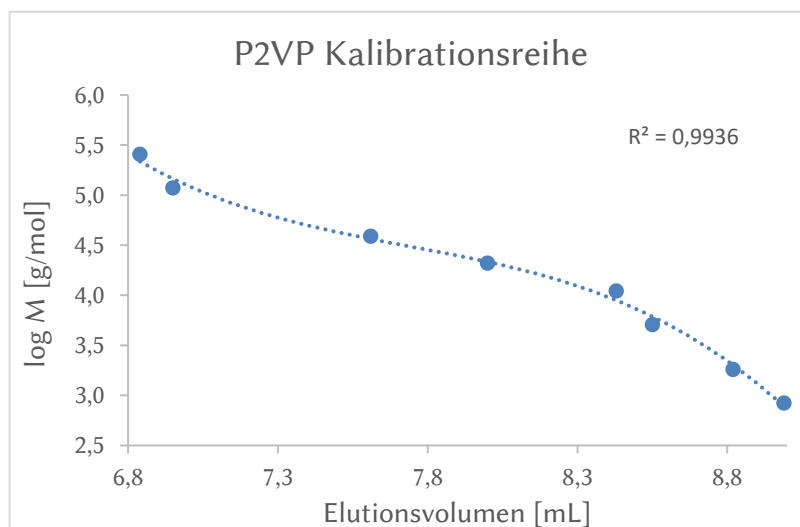


Abbildung A. 2: Vermessene P2VP-Kalibrationsreihe. Der Logarithmus der Molmasse ist gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Verwendung eines Polynoms 3. Grades für die Trendlinie.

Hochaufgelöste Massenspektrometrie (HRMS)

Die Aufnahme der hochaufgelösten Massenspektren erfolgte durch Frau Eleonore Christmann-Oesterreich und Herrn Dr. rer. nat. Jan Joseph anhand eines 6550 iFunnel ESI-Q-ToF LC/MS Spektrometers der Firma Agilent Technologies, welches mit einer HPLC-Anlage der 1290 Infinity 2 Serie gekoppelt war. Für die Messungen wurden folgende Trennsäulen verwendet:

- Agilent Technologies, Zorbax Eclipse Plus C₁₈ RRHD (1,8 µm, 2,1 x 50 mm, 95 Å)
- Phenomenex, Jupiter C₁₈ (5,0 µm, 3,0 x 250 mm, 300 Å)

Als Elutionsmittel wurden Wasser (Millipore, 0,1 Vol.-% Ameisensäure) und Acetonitril (0,1 Vol.-% Ameisensäure) in individuellen Gradienten verwendet. Die Flussrate betrug hierbei 0,5 – 1 mL/min. Die Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 210, 254 und 325 nm. Die erhaltenen Spektren wurden mittels *MassHunter* Software der Firma Agilent Technologies ausgewertet.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie (LC/MS)

Zur Reaktionskontrolle und zur Überprüfung der Reinheit von Verbindungen wurden HPLC-ESI-MS Messungen (auch LC/MS-Messungen) durchgeführt. Diese wurden anhand eines LC/MS Geräts der 1100 Serie (G1956B) der Firma Agilent Technologies durchgeführt. Das Gerät war mit einem Diodenarray-Detektor (DAD), einem Autosampler und einem Single-Quadrupol Massenspektrometer mit ESI-Quelle ausgestattet.

Für die Messungen wurden folgende Trennsäulen verwendet:

- Agilent Technologies, Pursuit XRs-C₈ (3,0 µm, 4,6 x 100 mm, 100 Å)
- Phenomenex, LUNA C₁₈(2) (3,0 µm, 4,6 x 100 mm, 100 Å)

Als Elutionsmittel wurden Wasser (Millipore, 0,1 Vol.-% Ameisensäure) und Acetonitril (0,1 Vol.-% Ameisensäure) eingesetzt. Für die LUNA Säule wurde hier ein Gradient von 5 % Acetonitril zu Beginn der Messung, bis zu 99 % Acetonitril nach 5,5 min verwendet. Für die Pursuit Säule wurde zu Beginn der Messung 10 % Acetonitril verwendet. Der Gradient lief hier ebenfalls nach 5,5 min auf 99 % Acetonitril. Die Flussrate betrug hierbei jeweils 1 mL/min. Die Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 210, 254 und 325 nm. Die erhaltenen Spektren wurden mittels *Chemstation* Software der Firma Agilent Technologies ausgewertet.

Mikrotiterplatten-Lesegerät

Für die Beladungsbestimmung mittels Absorption, die Zytotoxizitätsbestimmungen sowie die IC₅₀-Bestimmungen der WNV Protease wurden Mikrotiterplatten-Lesegeräte der Firma Tecan verwendet.

Die Bestimmungen der Lumineszenz beim CellTiter® Glo 2.0 Assay und die Affinitätsbestimmungen der WNV Protease wurden hierbei mit einem Safire 2 Gerät vermessen, während für alle weiteren Absorption- und Fluoreszenzmessungen auf das Infinite M1000 Pro Gerät zurückgegriffen wurde. Die erhaltenen Daten wurden mittels *Magellan* Software der Firma Tecan und Microsoft *Excel* ausgewertet.

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die Aufnahme der Kernresonanzspektren erfolgte durch die Mitarbeiter des Gerätezentrums BioSupraMol der Freien Universität Berlin. Die ^1H -, ^{13}C - und ^{19}F -Spektren wurden an den Spektrometern DPX 400, AVANCE II 500, AVANCE 600 und AVANCE III 700 der Firma Bruker sowie ECX und ECP 500 der Firma JEOL aufgenommen. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm angegeben und bezieht sich auf das jeweilige Lösungsmittelsignal. Als Lösungsmittel wurden CDCl_3 , D_2O , Methanol- d_4 , DMSO- d_6 , Acetonitril- d_3 , Aceton- d_6 , DMF- d_7 und THF- d_8 verwendet. Die Prozessierung und Auswertung der NMR-Spektren erfolgte mithilfe der Software *MestReNova 10* der Firma Mestrelab Research. Hierbei wurden die ausgewerteten Signale der NMR-Spektren folgendermaßen gekennzeichnet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett und br = breites Signal

6.3. Präparative Methoden und Geräte

Säulenchromatographie mittels MPLC

Zur Aufreinigung der Produkte nach Abschluss der Reaktionen wurde auf die Mittel-druckflüssigkeitschromatographie (MPLC) zurückgegriffen. Hierfür wurde das MPLC-System Isolera One der Firma Biotage verwendet. Als Säulenmaterial wurden vorgepackte Säulen der Sorte SNAP-HP und SNAP-Ultra verwendet. Als Elutionsmittel wurden hierbei Laufmittelgemische bestehend aus Hexan/Ethylacetat und DCM/Methanol verwendet, deren Verhältnis vorher mittels DC oder LC/MS bestimmt wurde. Die Detektion erfolgte bei 210 und 254 nm.

Präparative HPLC

Die Aufreinigung polarer Verbindungen (zumeist Peptide) erfolgte mittels präparativer HPLC. Das hierfür verwendete Gerät (Infinity Serie 1260) stammt von der Firma Agilent Technologies. Für die Aufreinigung wurden folgende Trennsäulen verwendet:

- Macherey-Nagel, Nucleodur C₁₈ HTec (5,0 μm , 32 x 150 mm, 110 Å)
- Agilent, Prep C₁₈ (10 μm , 30 x 150 mm, 100 Å)

Als Elutionsmittel wurden Wasser (Millipore, 0,1 Vol.-% Trifluoressigsäure) und Acetonitril (0,1 Vol.-% Trifluoressigsäure) in individuellen Gradienten verwendet. Die Detektion erfolgte mittels Multiwellenlängen-Detektor bei 210, 254 und 550 nm.

6.4. Biophysikalische Methoden

Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Das Protein (Tandem-WW-Domänen des FBP21, siehe auch Kapitel 1.1) wurde von Miriam Bertazzon (Arbeitsgruppe Freund, Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin) exprimiert und aufgereinigt. Anschließend wurde das Protein in PBS (pH 7,4) dialysiert und auf Eis gelagert. Derselbe PBS-Puffer wurde im Weiteren für alle ITC-Messungen verwendet, um einen Puffer *mismatch* zu vermeiden. Die zu untersuchenden Substanzen wurden in DMSO ($\geq 99,5\%$) gelöst und mit Puffer so verdünnt, dass ein DMSO-Anteil von 10 % in den Stammlösungen gegeben war. Weiterhin wurde mittels pH-Elektrode (pH-Meter 766 Calimatic, Knick) der pH-Wert der Lösungen auf 7,40 ($\pm 0,05$) eingestellt. Zur Anpassung des pH-Wertes wurden hierbei 1 M HCl und 1 M NaOH verwendet, die ebenfalls mit demselben PBS-Puffer hergestellt wurden. Die Konzentrationen der Stammlösungen wurden auf 1 mM berechnet und nach Belieben für die entsprechenden Messungen durch Verdünnen mit PBS-Puffer (10 % DMSO) auf die gewünschten Konzentrationen angepasst.

Die Proteinlösungen wurden mit demselben DMSO auf ebenfalls 10 % DMSO-Anteil eingestellt und anschließend mit einem PBS-Puffer (10 % DMSO) verdünnt. Die Konzentrationen wurden jeweils vor Beginn der Messungen mittels NanoDrop One (Thermo Scientific) bestimmt. Der hierfür verwendete Extinktionskoeffizient beläuft sich auf $32430 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Die molare Masse des Proteins beträgt $M = 10173,23 \text{ g/mol}$. Anschließend wurde auch hier der pH-Wert auf 7,40 ($\pm 0,05$) eingestellt.

Die ITC-Messungen wurden anschließend mit den hergestellten Protein- und Ligandenlösungen mit Hilfe eines isothermalen Titrationskalorimeters (MicroCal PEAQ-ITC) der Firma Malvern aufgenommen. Zwischen den einzelnen Messungen wurden jeweils automatische Waschläufe für die Messzelle und Injektionsnadel durchgeführt, um das Gerät zu reinigen. Ein anschließendes Spülen der Messzelle mit Wasser und PBS-Puffer sollte

einen Puffer *mismatch* bei der Messung durch eventuell zurückbleibende Kleinstmengen an Waschflüssigkeit verhindern.

Die erhaltenen ITC-Spektren wurden mit der *MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software* der Firma Malvern ausgewertet.

Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Für die Mikroskopieaufnahmen wurden HeLa-Zellen von Miriam Bertazzon kultiviert und in Lysin-beschichtete ibidi slides ausgesät. Als Medium wurde hierbei die Live cell imaging solution (1x) with HEPES der Firma Invitrogen verwendet. Nach ausreichender Inkubationszeit, damit die Zellen anwachsen und proliferieren konnten, wurden sie mit den entsprechenden Konjugaten (10 μM , 7,5 μM , 5 μM , 1 μM) versetzt und für 1 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und mehrfach mit frischem Medium gewaschen. Die Zellen wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie mit dem CLSM Leica SP8 Mikroskop des Gerätezentrums BioSuproMol der Freien Universität Berlin vermessen. Hierfür wurde ein Diodenlaser bei einer Wellenlänge von 561 nm verwendet. Die Laserintensität wurde für jede vermessene Probe individuell angepasst. Die Auswertung der aufgenommenen Zellbilder erfolgte mit der Bildbearbeitungssoftware *ImageJ*. Hierbei wurde die Bildintensität bei allen Aufnahmen auf eine Helligkeit von 0 - 165 normiert.

6.5. Zellbiologische Methoden

Allgemeine Vorgehensweise bei der Zellkultivierung

Zur Lagerung wurden die Zellen in Medium (20 % FCS, 1 % Natriumpyruvat, 0,5 % Glutamin) versetzt mit 10% DMSO aufgenommen und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Zur Kultivierung wurden die tiefgefrorenen Zellen aufgetaut, mit 10 mL Medium versetzt und für 5 min bei 1500 RPM zentrifugiert, um das DMSO zu entfernen. Die überstehende Lösung wurde entfernt, das Zellpellet in 6 mL Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche (25 cm²) überführt. Die Zellen wurden über Nacht im Inkubator (37°C, 5 % CO₂) aufbewahrt. Bei ausreichender Konfluenz (>80 %) wurden die Zellen schließlich passagiert. Hierfür wurden sie zuerst mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA-Lösung für 3-4 min trypsiniert und anschließend mit 10 mL Medium aufgenommen. Die Zellen wurden

in der entsprechenden Konzentration (zumeist 1-1,5 mL Zellslösung auf 10 mL Medium) in einer neuen Zellkulturflasche (75 cm²) ausgesät und im Inkubator weiter kultiviert. Vor der Verwendung für zellbiologische Experimente wurden die Zellen mindestens drei Mal passagiert, um ihre allgemeine Vitalität und ihr Wachstum zu überprüfen.

Als Medien wurde DMEM mit Phenolrot der Firma PAN Biotech (4,5 g/L Glukose, + Glutamin, 3,7 g/L NaHCO₃, Art. Nr. P04-04500) oder DMEM ohne Phenolrot der Firma gibco (4,5 g/L D-Glukose, 3,7 g/L NaHCO₃, Art. Nr. 31053-028) verwendet. Beiden Medien wurden vor dem Gebrauch 10 % FCS und 1 % Natriumpyruvat zugefügt. Bei Verwendung des Mediums der Firma gibco wurden zusätzlich 0,5 % Glutamin zugesetzt.

Verwendete Zelllinien

HeLa-Zellen

Die menschlichen Zervixkarzinom-Epithelzellen wurden wie beschrieben in DMEM kultiviert. Für die Wahl des Mediums war hierbei die zellbiologische Verwendung ausschlaggebend, sodass das Phenolrot-freie Medium für die Zytotoxizitätsassays gewählt wurde. Das Fluorobright-Medium wurde für die mikroskopischen Untersuchungen verwendet. Für alle anderen Verwendungen wurde das Phenolrot-haltige Medium gewählt.

HEK293-Zellen

Die menschlichen, embryonalen Nierenzellen wurden wie beschrieben in DMEM (10 % FCS, 1 % Na-Pyruvat) kultiviert.

Zytotoxizitätsassay: Resazurin

Die HEK293-Zellen wurden wie beschrieben vorbereitend in DMEM (PAN Biotech) kultiviert. Bei zufriedenstellender Vitalität wurden die Zellen schließlich mit 3 mL Trypsin/EDTA-Lösung trypsinisiert und in 10 mL DMEM aufgenommen. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt und in einer Konzentration von $1,2 \cdot 10^4$ Zellen pro Well auf einer transparenten 96-Microwellplatte (Sarstedt) ausgesät. Das Volumen der Zellslösung betrug 100 µL pro Well. Die Zellen wurden für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Währenddessen wurden die zu untersuchenden Substanzen in DMSO gelöst und mit DMEM verdünnt (Stammlösungen enthalten 10 % DMSO).

Nach der benötigten Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und die Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen (je 100 μL) versetzt. Hierbei wurden jeweils Triplikate der Konzentrationen 50 μM , 25 μM , 10 μM , und 5 μM verwendet. Zusätzlich wurde ein Well mit den entsprechenden Substanzen versetzt, welches später als Negativkontrolle für die Fluorophor-haltigen Substanzen zählen sollte. Nach Zugabe der Substanzen wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

Schließlich wurden die Zellen (ausgenommen der Negativkontrollen) mit jeweils 10 μL Resazurin-Lösung versetzt und weiter bei 37°C inkubiert. Die Absorption wurde im weiteren Verlauf jede Stunde für die ersten sechs Stunden und anschließend nach 24 h, 48 h und 72 h bei 570 nm und 600 nm mittels Mikrotiterplattenreader (Tecan Infinite M1000 Pro) vermessen. Die erhaltenen Daten wurden mittels *Magellan* Software der Firma Tecan und Microsoft *Excel* ausgewertet.

Zytotoxizitätsassay: CellTiter® Glo 2.0

Die HeLa-Zellen wurden wie beschrieben vorbereitend in DMEM (gibco) kultiviert. Bei zufriedenstellender Vitalität wurden die Zellen schließlich mit 3 mL Trypsin/EDTA-Lösung trypsiniert und in 10 mL DMEM aufgenommen. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt und in einer Konzentration von $2 \cdot 10^4$ Zellen pro Well auf einer weißen 96F Nunclon Delta Surface Microwellplatte ausgesät. Das Volumen der Zelllösung betrug 100 μL pro Well. Die Zellen wurden für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

Währenddessen wurden die zu untersuchenden Substanzen in DMSO gelöst und mit DMEM verdünnt (500 μM Stammlösung, 10 % DMSO).

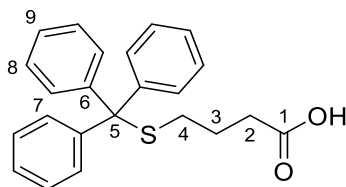
Nach der benötigten Inkubationszeit wurden die Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen versetzt. Hierbei wurden jeweils Triplikate der Konzentrationen 25 μM , 5 μM , 1 μM und 0,5 μM verwendet. Die Zellen wurden anschließend für 25 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert und danach weitere 20 min unter der laminar flow bench bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses ist notwendig, da das CellTiter® Glo 2.0 Assay Kit bei Temperaturen oberhalb 30°C nicht stabil ist und somit die Lumineszenzintensität abnehmen würde. Die ATP-Kalibrationsreihe (100 μL pro Well) wurde jeweils in Duplikaten in leere Wells

gegeben. Die Konzentrationen betragen 100 μM , 10 μM , 1 μM , 100 nM, 10 nM und 1 nM. Anschließend wurde die Assaylösung (100 μL pro Well) in alle Proben- und Kalibrationswells pipettiert. Als Kontrolle zur Zellzählung dienten Wells, die nur 100 μL Zelllösung enthielten. Weiterhin wurden mehrere Wells als Positivkontrolle verwendet, die nur die Zelllösung und das Assaykit enthielten.

Nach Zugabe der Assaylösung wurde die Platte auf dem Horizontalschüttler für 2 min bei 800 RPM geschüttelt und die Platte anschließend weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um das Lumineszenzsignal zu stabilisieren. Die Lumineszenz wurde schließlich mittels Mikrotiterplattenreader (Tecan Safire 2) gemessen. Nach weiteren 30 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das Lumineszenzsignal erneut vermessen. Die erhaltenen Daten wurden mittels *Magellan* Software der Firma Tecan und Microsoft *Excel* ausgewertet.

6.6. Synthetisierte Verbindungen

4-(Triphenylmethanthio)butansäure (**10**)



Natriumhydrid (3,184 g, 79,7 mmol) wurde in 25 mL abs. THF vorgelegt. Triphenylmethanthiol (10,03 g, 36,3 mmol) wurde portionsweise hinzugegeben und anschließend 30 min bei Raumtemperatur gerührt. 4-Brombuttersäure (6,115 g, 36,3 mmol) wurde in 35 ml abs. THF gelöst und ebenfalls portionsweise hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde anschließend bei Raumtemperatur für 18 h gerührt. Zur Beendigung der Reaktion wurden 10 mL H_2O hinzugegeben und für 15 min gerührt, um den Natriumhydrid-Überschuss zu quenchen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels MPLC (5-65 % Gradient Hex : EtOAc) aufgereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (10,79 g, 82 %) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1,69 (p, *J* = 7,1 Hz, 2 H, H-3), 2,25 (t, *J* = 7,1 Hz, 2 H, H-2), 2,33 (t, *J* = 7,1 Hz, 2 H, H-4), 7,22 (t, *J* = 7,4 Hz, 3 H, H-9), 7,29 (t, *J* = 7,4 Hz, 6 H, H-8), 7,43 (d, *J* = 7,4 Hz, 6 H, H-7) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 23,7 (C-3), 31,2 (C-4), 33,0 (C-2), 66,8 (C-5), 126,8 (C-9), 128,0 (C-7), 129,7 (C-8), 144,9 (C-6), 179,3 (C-1) ppm.

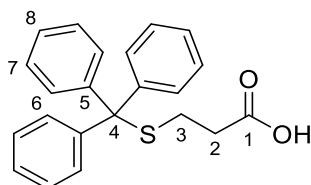
HRMS (QTOF) *m/z*: **berechnet für C₂₃H₂₂O₂S:** 385,1233 [M+Na]⁺

gefunden: 385,1246 [M+Na]⁺

Elementaranalyse: **berechnet:** C: 76,2 H: 6,12 S: 8,84

gefunden: C: 76,8 H: 6,15 S: 8,96

3-(Triphenylmethanthio)propionsäure (**18**)



Triphenylmethylchlorid (1,000 g, 3,59 mmol) wurde in 5 mL DCM gelöst. 3-Mercaptopropionsäure (285 µL, 3,28 mmol) wurde in 5 mL DCM gelöst und langsam hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der entstandene Feststoff abfiltriert und mit DCM gewaschen. Der Feststoff wurde mit CHCl₃/MeOH gelöst und ebenfalls filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Aufarbeitung als farbloser Feststoff (1,057 mg, 93 %) erhalten.^[210]

¹H-NMR (500 MHz, DMF-d₇): δ = 2,30 (t, *J* = 7,2 Hz, 2 H, H-2), 2,44 (t, *J* = 7,2 Hz, 2 H, H-3), 7,28 (t, *J* = 7,2 Hz, 3 H, H-8), 7,38 (t, *J* = 8,0 Hz, 6 H, H-7), 7,44 (d, *J* = 8,0 Hz, 6 H, H-6) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, DMF-d₇): δ = 27,3 (C-3), 33,3 (C-2), 66,8 (C-4), 127,1 (C-8), 128,3 (C-6), 129,7 (C-7), 145,2 (C-5), 173,0 (C-1) ppm.

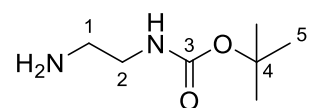
HRMS (QTOF) *m/z*: **berechnet für C₂₂H₂₀O₂S:** 371,1076 [M+Na]⁺

gefunden: 371,1080 [M+Na]⁺

Elementaranalyse: **berechnet:** C: 75,8 H: 5,79 S: 9,20

gefunden: C: 76,2 H: 5,80 S: 9,21

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)ethan-1,2-diamin (5)



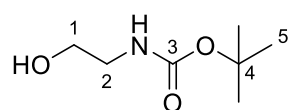
Ethylendiamin (6,12 mL, 91,6 mmol) wurden in 90 mL Chloroform vorgelegt und auf 0°C abgekühlt. Boc₂O (2,000 g, 9,16 mmol) wurde in 45 mL Chloroform gelöst und langsam hinzuge tropft. Die Lösung wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Reaktionsende wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 150 mL 0,2 M Na₂CO₃-Lösung gelöst. Die Lösung wurde mit DCM extrahiert und anschließend die organische Phase mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das Produkt wurde als farbloses Öl (1,449 g, 99 %) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,44 (s, 9 H, H-5), 2,80 (t, *J* = 5,9 Hz, 2 H, H-2), 3,18 (q, *J* = 5,9 Hz, 2 H, H-1), 4,89 (s br, 1 H, NH) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 28,5 (C-5), 41,0 (C-2), 43,4 (C-1), 79,6 (C-4), 156,4 (C-3) ppm.

HRMS (QTOF) *m/z*: **berechnet für C₇H₁₆N₂O₂: 161,1285 [M+H]⁺**
 gefunden: 161,1285 [M+H]⁺

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)ethanolamin (7)



Ethanolamin (196 µL, 3,27 mmol) wurden zusammen mit Al₂O₃ (500,6 mg, 4,91 mmol) in einem Kolben vorgelegt. Anschließend wurde Boc₂O (766,0 mg, 3,51 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung für eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Hierbei sorgt die Reaktionswärme für ein Schmelzen des Boc₂O. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Gemisch in EtOAc aufgenommen und filtriert. Das abfiltrierte Al₂O₃ wurde ausgiebig mit EtOAc gewaschen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der ölige Rückstand mit EtOAc aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 10 %iger Zitronensäure gewaschen und anschließend mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel

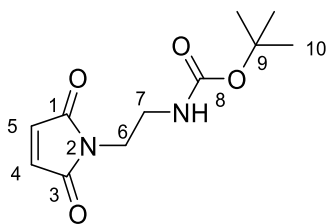
wurde erneut im Vakuum entfernt und das Produkt wurde als farbloser Feststoff (521,2 mg, 99 %) erhalten.^[169]

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1,42 (s, 9 H, H-5), 2,98 (s br, 1 H, OH), 3,25 (q, J = 5,0 Hz, 2 H, H-2), 3,66 (t, J = 5,0 Hz, 2 H, H-1), 5,01 (s br, 1 H, NH) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 28,5 (C-5), 43,2 (C-2), 62,5 (C-1), 79,7 (C-4), 157,0 (C-3) ppm.

HRMS (QTOF) m/z : **berechnet für C₇H₁₅NO₃:** 184,0944 [M+Na]⁺
gefunden: 184,0946 [M+Na]⁺

N-Boc-(2-Aminoethyl)maleinimid (**6**) (Methode 1)



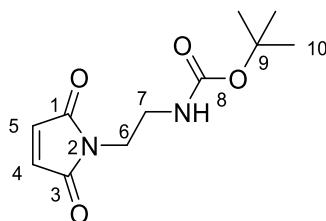
N-(*tert*-Butoxycarbonyl)ethan-1,2-diamin **5** (4,557 g, 28,4 mmol) und NEt₃ (4,0 mL, 28,9 mmol) wurden in 350 mL EtOH gelöst. Maleinsäureanhydrid (6,853 g, 69,9 mmol) wurde ebenfalls in 250 mL EtOH gelöst und bei 0°C in einem Zeitraum von 1,5 h zur anderen Lösung hinzugegossen. Die Reaktionslösung wurde für 7 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 70 mL Acetanhydrid gelöst. Natriumacetat (1,944 g, 23,7 mmol) wurde hinzugegeben und die Lösung für 1 h unter Rückfluss erhitzt. Das überschüssige Acetanhydrid wurde durch Zugabe von H₂O gequench und die Lösung mit gesättigter NaHCO₃-Lösung neutralisiert. Das Rohprodukt wurde mittels EtOAc extrahiert und anschließend mittels MPLC (0-60 % Gradient Hex : EtOAc) aufgereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (4,877 g, 71 %) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,39 (s, H-10), 3,32 (q, J = 5,5 Hz, 2 H, H-7), 3,65 (t, J = 5,5 Hz, 2 H, H-6), 4,75 (s br, NH), 6,70 (s, 2 H, H-4/ H-5) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 28,4 (C-10), 38,1 (C-6), 39,5 (C-7), 79,7 (C-9), 134,1 (C-4/ C-5), 156,1 (C-8), 171,0 (C-1/ C-3) ppm.

HRMS (QTOF) m/z : **berechnet für $C_{11}H_{16}N_2O_4$: 241,1183 [M+H]⁺**
gefunden: 241,1189 [M+H]⁺

N-Boc-(2-Aminoethyl)maleinimid (**6**) (Methode 2)



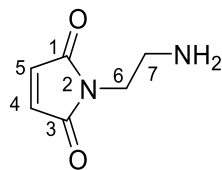
Maleinimid (136,5 mg, 1,41 mmol) und Triphenylphosphin (369,9 mg, 1,41 mmol) wurden in 5 mL abs. THF gelöst und bei 0°C gerührt. *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)ethanolamin **7** (206,7 mg, 1,28 mmol) wurden ebenfalls in 5 mL abs. THF gelöst und zur Maleinimidlösung hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 10 min bei 0°C gerührt. Schließlich wurde DIAD (277 μ L, 1,41 mmol) hinzugegeben und die Reaktion für 1 h gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand wurde in Diethylether gelöst und das ausfallende Triphenylphosphinoxid abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde erneut im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels MPLC (0-60 % Gradient Hex : EtOAc) aufgereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (184,1 mg, 60 %) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,39 (s, H-10), 3,32 (q, J = 5,5 Hz, 2 H, H-7), 3,65 (t, J = 5,5 Hz, 2 H, H-6), 4,75 (s br, NH), 6,70 (s, 2 H, H-4/ H-5) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 28,4 (C-10), 38,1 (C-6), 39,5 (C-7), 79,7 (C-9), 134,1 (C-4/ C-5), 156,1 (C-8), 171,0 (C-1/ C-3) ppm.

HRMS (QTOF) m/z : **berechnet für $C_{11}H_{16}N_2O_4$: 241,1183 [M+H]⁺**
gefunden: 241,1189 [M+H]⁺

N-(2-Aminoethyl)maleinimid (**3**)



N-Boc-(2-Aminoethyl)maleinimid **6** (757,4 mg, 3,15 mmol) wurde in 10 mL DCM gelöst. TFA (3,80 mL, 49,3 mmol) wurde hinzugegeben und die Lösung für 90 min bei 0°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 3 mL MeOH aufgenommen und durch langsames Zutropfen in 50 mL Diethylether gefällt. Der Feststoff wurde abfiltriert, in H₂O gelöst und erneut filtriert. Das Lösungsmittel wurde durch Lyophilisation entfernt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (666,1 mg, 83 %) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 3,24 (t, *J* = 5,8 Hz, 2 H, H-7), 3,84 (t, *J* = 5,8 Hz, 2 H, H-6), 6,91 (s, 2 H, H-4/ H-5) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ = 35,1 (C-7), 38,5 (C-6), 134,8 (C-4/ C-5), 172,7 (C-1/ C-3) ppm.

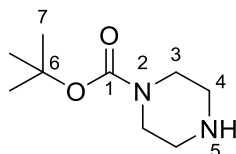
HRMS (QTOF) *m/z*: **berechnet für C₆H₈N₂O₂**: 141,0659 [M⁺]

gefunden: 141,0660 [M⁺]

Elementaranalyse: **berechnet**: C: 37,8 H: 3,57 N: 11,02

gefunden: C: 37,8 H: 3,63 N: 11,03

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)piperazin (**14**)



Piperazin (1,002 g, 11,6 mmol) wurde in 20 mL abs. DCM gelöst und bei 0°C gerührt. Boc₂O (1,267 g, 5,81 mmol) wurde ebenfalls in 20 mL abs. DCM gelöst und langsam zur Piperazinlösung hinzugegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für 18 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend filtriert und der Feststoff mit kaltem DCM gewaschen. Das Filtrat wurde im Vakuum eingedunstet und das Rohprodukt mit H₂O gelöst. Der

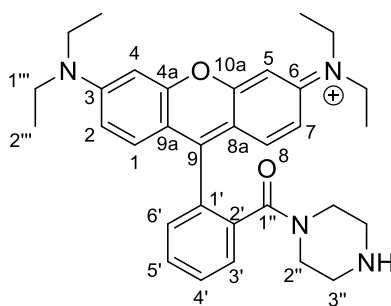
verbleibende Niederschlag wurde erneut abfiltriert. Die wässrige Phase wurde mit K_2CO_3 ausgesalzen und das Produkt mit Diethylether extrahiert. Das saubere Produkt wurde als farbloser Feststoff (596,9 mg, 55 %) erhalten.^[178]

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,38$ (s, 9 H, H-7), 1,60 (s, 1 H, NH), 2,72 (t, $J = 5,1$ Hz, 4 H, H-4), 3,30 (t, $J = 5,1$ Hz, 4 H, H-3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 28,4$ (C-7), 45,9 (C-3/C-4), 79,5 (C-6), 154,8 (C-1) ppm.

HRMS (QTOF) m/z : berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$: 187,1441[M+H]⁺, 209,1260 [M+Na]⁺
gefunden: 187,1445[M+H]⁺, 209,1263 [M+Na]⁺

Rhodamin B-Piperazinamid (**13**) (Methode 1)



Rhodamin B (2,598 g, 5,43 mmol) wurde in 70 mL MeCN gelöst und bei 0°C mit DIPEA (1200 μL , 7,06 mmol) versetzt. TBTU (2,227 g, 6,95 mmol) wurde in 15 mL MeCN gelöst, zur Rhodamin B Lösung gegeben und 20 min bei 0°C gerührt. Anschließend wurde *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)piperazin **14** (1,202 g, 6,45 mmol) in 15 mL MeCN gelöst und ebenfalls zur Rhodamin B-Lösung gegeben. Die Lösung wurde 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Mittels LC/MS konnte die vollständige Umsetzung zum Boc-geschützten Piperazinamid nachgewiesen werden. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 30 mL DCM gelöst. Bei 0°C wurden der Lösung 8 mL TFA zugesetzt, um das Produkt zu entschützen. Die Lösung wurde für 5 h gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels MPLC (4-20 % MeOH in DCM) aufgereinigt. Das violette Produkt wurde als TFA-Salz (3670,8 mg, 92 %) erhalten.^[178]

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,26$ (t, $J = 7,1$ Hz, 12 H, H-2''), 3,02 – 3,10 (m br, 4 H, H-3''), 3,51 (q, $J = 7,1$ Hz, 8 H, H-1''), 3,71 – 3,76 (m br, 4 H, H-2''), 6,69 (d, $J = 2,4$ Hz, 2 H,

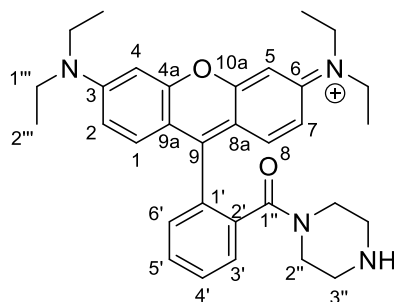
H-4/ H-5), 6,87 (dd, $J = 9,6$ und $2,4$ Hz, 2 H, H-2/ H-7), 7,10 (d, $J = 9,6$ Hz, 2 H, H-1/ H-8), 7,30 (dd, $J = 5,9$ und $3,2$ Hz, 1 H, H-4'), 7,52 (dd, $J = 5,9$ und $3,3$ Hz, 1 H, H-5'), 7,62 (d, $J = 3,3$ Hz, 1 H, H-3'), 7,64 (d, $J = 3,2$ Hz, 1 H, H-6')

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 12,5$ (C-2'''), 42,1 (C-2''), 42,7 (C-3''), 46,1 (C-1'''), 96,3 (C-4/ C-5), 113,6 (C-8a/ C-9a), 114,3 (C-2/ C-7), 127,6 (C-3'), 130,2 (C-6'), 130,3 (C-5'), 130,4 (C-4'), 131,0 (C-9), 131,5 (C-1/ C-8), 134,4 (C-1'), 155,7 (C-3), 157,7 (C-10a), 161,5 (C-4a), 161,8 (C-6), 167,2 (C-1'') ppm.

$^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz, CDCl_3): $\delta = -76,5$ (TFA) ppm.

HRMS (QTOF) m/z : **berechnet für $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_2^+$: 511,3068 [M⁺]**
gefunden: 511,2990 [M⁺]

Rhodamin B-Piperazinamid (**13**) (Methode 2)



Rhodamin B (6,601 g, 13,8 mmol) wurden in 200 mL EtOAc suspendiert und mit 200 mL 1 M NaOH versetzt. Die erhaltene Lösung wurde 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Phasen wurden im Scheidetrichter getrennt und die wässrige Phase mehrfach mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und über Nacht im Hochvakuum getrocknet.

Weiterführend wurde Piperazin (4,757 g, 55,2 mmol) unter Argon in 23 mL abs. DCM gelöst. 13,8 mL Trimethylaluminium (2 M in Toluol) wurden tropfenweise zugegeben. Die erhaltene Lösung wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die zuvor hergestellte Rhodamin B-Base wurde in 22 mL abs. DCM gelöst und in einem Zeitraum von etwa 30 min zum Piperazin hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 20 h unter Rückfluss erhitzt.

Nach Beendigung der Reaktion wurde 2 M HCl zur Lösung hinzugegeben, bis die Gasentwicklung stoppte. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und mit viel DCM und schließlich DCM/ Methanol (4:1) gewaschen. Das Filtrat wurde im Vakuum eingedunstet und der entstandene Rückstand in 350 mL gesättigter NaHCO_3 -Lösung/ H_2O (2:1) gelöst.

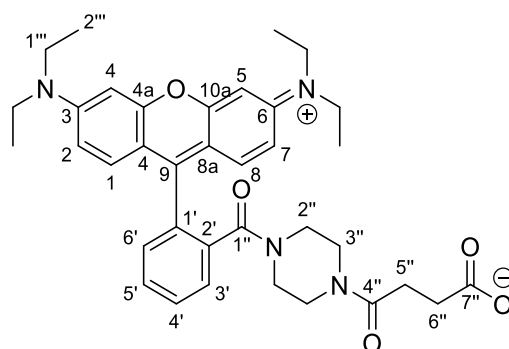
Eduktreste wurden durch waschen mit EtOAc entfernt und die wässrige Phase anschließend mit NaCl gesättigt. Die Lösung wurde schließlich mit 6 M HCl versetzt, um das verbleibende NaHCO₃ zu entfernen. Die wässrige Phase wurde schließlich mit einer Isopropanol/ DCM-Lösung (2:1) extrahiert, bis die wässrige Phase nur noch schwach rosa war. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde schließlich in wenig Methanol gelöst, in 600 mL Diethylether ausgefällt und abfiltriert.

Zum Entfernen des Hydrochlorids wurde der Rückstand in 200 mL Isopropanol/ DCM-Lösung (2:1) gelöst und mit Na₂CO₃-Lösung versetzt, bis keine Gasbildung mehr auftrat. Die organische Phase wurde abschließend mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das violette Produkt wurde nach Trocknen im Hochvakuum als poröser Feststoff (4,545 g, 65 %) erhalten.^[177]

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1,26 (t, *J* = 7,1 Hz, 12 H, H-2'''), 3,02 – 3,10 (m br, 4 H, H-3''), 3,51 (q, *J* = 7,1 Hz, 8 H, H-1'''), 3,71 – 3,76 (m br, 4 H, H-2''), 6,69 (d, *J* = 2,4 Hz, 2 H, H-4/ H-5), 6,87 (dd, *J* = 9,6 und 2,4 Hz, 2 H, H-2/ H-7), 7,10 (d, *J* = 9,6 Hz, 2 H, H-1/ H-8), 7,30 (dd, *J* = 5,9 und 3,2 Hz, 1 H, H-4'), 7,52 (dd, *J* = 5,9 und 3,3 Hz, 1 H, H-5'), 7,62 (d, *J* = 3,3 Hz, 1 H, H-3'), 7,64 (d, *J* = 3,2 Hz, 1 H, H-6') ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 12,5 (C-2'''), 42,1 (C-2''), 42,7 (C-3''), 46,1 (C-1'''), 96,3 (C-4/ C-5), 113,6 (C-8a/ C-9a), 114,3 (C-2/ C-7), 127,6 (C-3'), 130,2 (C-6'), 130,3 (C-5'), 130,4 (C-4'), 131,0 (C-9), 131,5 (C-1/ C-8), 134,4 (C-1'), 155,7 (C-3), 157,7 (C-10a), 161,5 (C-4a), 161,8 (C-6), 167,2 (C-1'') ppm.

HRMS (QTOF) *m/z*: **berechnet für C₃₂H₃₉N₄O₂⁺: 511,3068 [M⁺]**
gefunden: 511,2990 [M⁺]

Bernsteinsäure Rhodamin B-Piperazinamid (**15**)

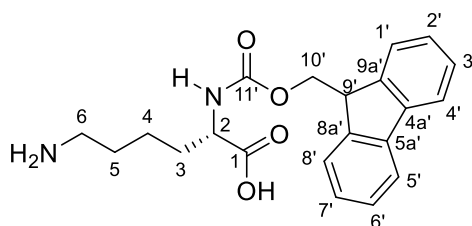
Rhodamin B-Piperazinamid **13** (950,0 mg, 1,34 mmol) wurde in 15 mL abs. DCM gelöst. Anschließend wurden nacheinander Bernsteinsäureanhydrid (243,3 mg, 2,41 mmol), DMAP (287,4 mg, 2,35 mmol) und Triethylamin (331,0 μ L, 2,39 mmol) hinzugegeben und ebenfalls gelöst. Die Lösung wurde 7 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle mittels LC/MS zeigte zu diesem Zeitpunkt, dass die Reaktion noch nicht beendet war, sodass erneut Bernsteinsäureanhydrid (122,0 mg, 1,21 mmol), DMAP (144,1 mg, 1,18 mmol) und Triethylamin (166,0 μ L, 1,20 mmol) zur Reaktionslösung hinzugegeben wurden. Die Lösung wurde für weitere 20 h gerührt. Nach Reaktionsende wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit 10 % K_2CO_3 -Lösung aufgenommen. Die Lösung wurde mit EtOAc extrahiert und die organische Phase verworfen. Die wässrige Phase wurde mit NaCl ausgesalzen und mehrfach mit Isopropanol/DCM (2:1) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde in Chloroform gelöst, erneut filtriert und das Lösungsmittel erneut entfernt. Das Produkt wurde abschließend im Hochvakuum getrocknet und als violetter Feststoff (848,7 mg, 98 %) erhalten.^[177]

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD- d_4): δ = 1,31 (t, J = 7,1 Hz, 12 H, H-2^{'''}), 2,41 (t, J = 7,2 Hz, 2 H, H-5^{''}), 2,56 (t, J = 7,2 Hz, 2 H, H-7^{''}), 3,38 – 3,51 (m br, 8 H, H-2^{''}/ H-3^{''}), 3,69 (q, J = 7,1 Hz, 8 H, H-1^{'''}), 6,96 (d, J = 2,2 Hz, 2 H, H-4/ H-5), 7,08 (s br, 2 H, H-2/ H-7), 7,28 (d, J = 9,5 Hz, 2 H, H-1/ H-8), 7,51 (s br, 1 H, H-4'), 7,70 (s br, 1 H, H-5'), 7,77 – 7,78 (m, 2 H, H-3'/ H-6') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, MeOD- d_4): δ = 12,8 (C-2^{'''}), 30,6 (C-6^{''}), 34,0 (C-5^{''}), 42,1 (C-2^{''}), 42,7 (C-3^{''}), 46,9 (C-1^{'''}), 97,4 (C-4/ C-5), 114,8 (C-8a/ C-9a), 115,4 (C-2/ C-7), 128,9 (C-9), 131,2 (C-1/ C-8), 131,3 (C-5'), 131,7 (C-3'), 133,2 (C-6'), 133,3 (C-4'), 136,6 (C-1'/ C-2'), 156,8 (C-3), 157,0 (C-10a), 157,2 (C-4a), 159,2 (C-6), 169,5 (C-1^{''}), 173,9 (C-4^{''}), 180,6 (C-7^{''}) ppm.

HRMS (QTOF) m/z : **berechnet für $C_{36}H_{42}N_4O_5$: 611,3228 [M+H]⁺**
gefunden: 611,3163 [M+H]⁺

Fmoc-Lys-OH (**16**)

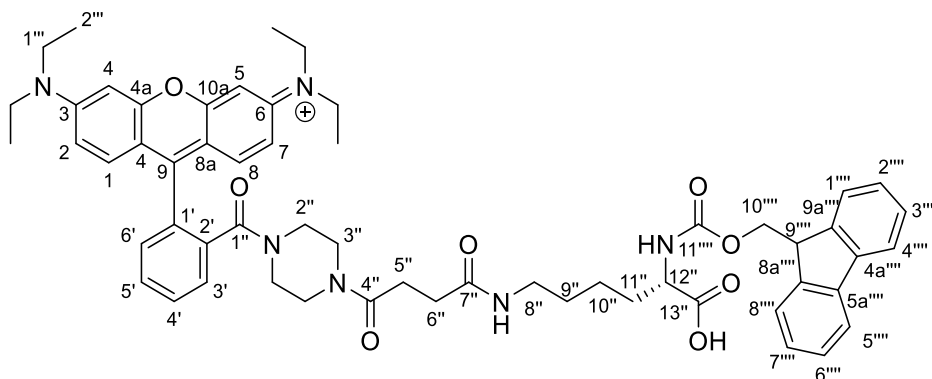


Fmoc-Lys(Boc)-OH (501,0 mg, 1,07 mmol) wurde in 5 mL DCM suspendiert und mit 1 mL TFA versetzt. Die entstehende Lösung wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt mittels RP-HPLC (5 min 95:5 H₂O:MeCN, danach Gradient bis 30 min bis 5:95) aufgereinigt. Das Lösungsmittel wurde mittels Lyophilisation entfernt und das Produkt als farbloser Feststoff (481,4 mg, 94 %) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 1,12 (quint, J = 7,8 Hz, 2 H, H-4), 1,32 – 1,45 (m, 4 H, H-3/H-5), 1,55 (s br, 1 H, NH), 2,72 (q, J = 7,8 Hz, 2 H, H-6), 3,56 (t, J = 6,2 Hz, 1 H, H-9'), 3,85 – 3,91 (m, 3 H, H-2'/ H-10'), 6,80 (s, 1 H, NH), 6,81 – 6,86 (m, 4 H, H-2'/ H-7' und H-3'/ H-6'), 7,00 (d, J = 7,0 Hz, 2 H, H1'/ H8'), 7,11 – 7,16 (m, 2 H, H-4'/ H-5') ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ = 22,0 (C-4), 26,3 (C-3/ C-5), 30,4 (C-3/ C-5), 39,0 (C-6), 46,5 (C-9), 53,9 (C-2), 66,4 (C-10'), 119,7 (C-4'), 124,8 (C-1'), 126,9 (C-2'/ C-3'), 127,5 (C-2'/ C-3'), 140,7 (C-4a'/ C-5a'), 143,4 (C-8a'/ C-9a'), 143,6 (C-8a'/ C-9a'), 157,1 (C-2), 175,8 (C-1) ppm.

HRMS (QTOF) m/z : **berechnet für $C_{21}H_{24}N_2O_4$: 369,1809 [M+H]⁺**
gefunden: 369,1820 [M+H]⁺

Fmoc-Lys(Bernsteinsäure Rhodamin B-Piperazinamid)-OH (**17**)

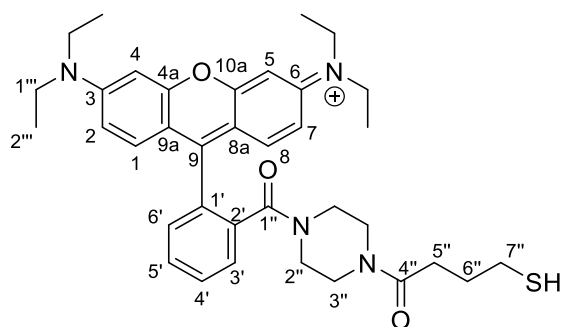
Bernsteinsäure Rhodamin B-Piperazinamid **15** (419,0 mg, 0,687 mmol) wurde in 8 mL DCM gelöst. Die Lösung wurde mit *N*-Hydroxysuccinimid (237,2 mg, 2,07 mmol) und DIC (319 μ L, 2,05 mmol) versetzt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 6 mL DCM aufgenommen. Fmoc-Lys-OH **16** (500,9 mg, 1,36 mmol) und DIPEA (584 μ L, 3,43 mmol) wurden zugegeben und die Lösung für weitere 26 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, das Rohprodukt in H₂O:MeCN (7:3) gelöst und mittels RP-HPLC (5 min 95:5 H₂O:MeCN, danach Gradient bis 35 min bis 5:95) aufgereinigt. Das Lösungsmittel wurde mittels Lyophilisation entfernt und das Produkt als violetter Feststoff (575,5 mg, 87 %) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 0,48, 1,22, 1,39, 1,40, 1,42, 1,43, 1,46, 1,48, 1,49, 1,51, 1,56, 1,69, 1,90, 2,02, 2,27, 2,28, 2,28, 2,45, 2,60, 2,72, 2,79, 2,83, 2,88, 3,26, 3,34, 3,46, 3,54, 3,57, 3,75, 3,76, 3,78, 3,79, 3,80, 3,82, 3,83, 3,84, 3,87, 3,90, 4,12, 4,25, 4,32, 4,49, 6,61, 6,88, 7,03, 7,08, 7,18, 7,20, 7,28, 7,41, 7,43, 7,49, 7,63, 7,78, 7,79, 7,82, 7,83, 7,88, 7,89, 7,94, 8,02 ppm.

Aufgrund von sich stark überlagernden Signalen konnte die Zuordnung im ¹H-Spektrum nicht vorgenommen werden.

HRMS (QTOF) *m/z*: **berechnet für C₅₇H₆₅N₆O₈:** 961,4858 [M+H]⁺
gefunden: 961,4858 [M+H]⁺

Bezeichnet als: Fmoc-Lys(RhB Pip)-OH

4-Mercaptobutanon Rhodamin B-Piperazinamid (21)

Rhodamin B-Piperazinamid 13 (577,1 mg, 1,13 mmol) wurde in 20 mL MeCN gelöst und mit γ -Thiobutyrolacton (977 μ L, 11,3 mmol) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 min entgast. Anschließend wurden $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ (40,7 mg, 0,113 mmol) und DIPEA (1,92 mL, 11,0 mmol) hinzugegeben. Die Lösung wurde schließlich für 48 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde wenig TCEP zur Reaktionslösung hinzugegeben und für weitere 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde schließlich im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt mittels RP-HPLC (5 min 95:5 $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$, bis 20 min 60:40, danach Gradient bis 30 min bis 5:95) aufgereinigt. Das Lösungsmittel wurde mittels Lyophilisation entfernt und das Produkt als violetter Feststoff (445,3 mg, 64 %) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, MeOD-d_4): $\delta = 1,30$ (t, $J = 6,9$ Hz, 12 H, H-2'''), 1,92 (quint, $J = 7,0$ Hz, 2 H, H-6''), 2,45 (t, $J = 7,0$ Hz, 2 H, H-7''), 2,68 (s br, 2 H, H-5''), 3,35 – 3,47 (m br, 8 H, H-2''/H-3''), 3,68 (q, $J = 6,9$ Hz, 8 H, H-1'''), 6,96 (s, 2 H, H-4'/H-5'), 7,06 (d, $J = 8,92$ Hz, 2 H, H-2'/H-7'), 7,27 (d, $J = 8,9$ Hz, 2 H, H-1'/H-8'), 7,51 (dd, $J = 5,9$ und 3,2 Hz, 1 H, H-4'), 7,69 (dd, $J = 5,9$ und 3,4 Hz, 1 H, H-5'), 7,77 (d, $J = 3,2$ Hz, 1 H, H-3'), 7,78 (d, $J = 3,4$ Hz, 1 H, H-6') ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (175 MHz, MeOD-d_4): $\delta = 12,8$ (C-2'''), 25,5 (C-7''), 32,1 (C-5''), 38,5 (C-6''), 42,8 (C-3''), 43,1 (C-2''), 46,9 (C-1'''), 97,4 (C-4'/C-5'), 114,8 (C-8a'/C-9a'), 115,4 (C-2'/C-7'), 128,9 (C-9), 131,3 (C-1'/C-8), 131,7 (C-5'), 132,2 (C-3'), 133,0 (C-6'), 133,1 (C-4'), 136,4 (C-1'/C-2'), 156,9 (C-3), 157,2 (C-10a), 159,2 (C-4a), 160,1 (C-6), 169,6 (C-1''), 173,4 (C-4'') ppm.

HRMS (QTOF) m/z : **berechnet für $\text{C}_{36}\text{H}_{45}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}^+$:** 613,3207 [M^+]
gefunden: 613,3198 [M^+]

Bezeichnet als: Thiol-RhB Pip

6.7. Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV I. Festphasenpeptidsynthese

Das Fmoc-Rink-Amid AM Harz (0,43, 0,40 bzw. 0,34 mmol/g) wurde in einer Polypropylen-spritze mit Filterfritte vorgelegt und in DMF 20 min gequollen. Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe durch 15-minütige Behandlung mit 20 % Piperidin in DMF entfernt. Die Lösung wurde abgesaugt und das Harz mehrfach mit DMF gewaschen. Die Fmoc-Aminosäure (5 Äq.) wurde in DMF gelöst, mit HOBt und DIC (jeweils 4,8 Äq) versetzt und nach 5 min Pre-Inkubationszeit auf das gewaschene Harz gegeben. Das Harz wurde anschließend im Schüttler für 1-24 h geschüttelt. Die Beendigung der Reaktion konnte mit der Farbreaktion nach Kaiser überprüft werden. Hierfür wurden einige Harzkügelchen in einem Eppendorf-Gefäß mit jeweils 0,1 mL der entsprechenden Kaiser-Test Lösungen (1 mM KCN in 20 mL Pyridin und 0,5 g Ninhydrin in 10 mL Ethanol) versetzt und zum Sieden erhitzt. Eine Blaufärbung des Harzes, das sogenannte Ruhemanns Blau, weist auf die Anwesenheit von freien Aminen und somit eine noch nicht beendete Reaktion mit der Fmoc-Aminosäure hin. Für sekundäre Aminosäuren, welche keine eindeutige Färbung im Kaiser-Test aufweisen, wurde der Chloranil-Test durchgeführt. Hierfür wurde ein Harzaliquot mit je 0,1 mL der Testlösungen (2 % *p*-Chloranil in DMF und 2 % Acetaldehyd in DMF) versetzt und für 10 min stehen gelassen. Eine Gelb- bzw. Rotfärbung des Harzes zeigt hierbei freie Amine an. Bei Nichtverfärben des Harzes (sowohl im Kaiser- als auch Chloranil-Test) und somit Beendigung der entsprechenden Kupplung, wurde die übrige Reaktionslösung entfernt, das Harz mehrfach mit DMF gewaschen und die Fmoc-Schutzgruppe am Ende des entstehenden Peptids mit 20 % Piperidin in DMF entfernt. Die weiteren Kupplungsschritte erfolgten analog.

Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde das Harz erneut mehrfach mit DMF gewaschen. Das Harz wurde schließlich mit viel DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das synthetisierte Peptid wurde der Sequenz entsprechend mit einem variierenden *Scavenger*-Cocktail vom Harz abgespalten.

Die Beladung des Harzes wurde standardmäßig nach der Kupplung der ersten und letzten Aminosäure der Sequenz bestimmt. Hierfür wurden einige Milligramm des Harzes vor der Fmoc-Spaltung der jeweiligen Aminosäure in eine neue Polypropylen-spritze mit

Filterfritte überführt, mit DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde das Harz für mindestens zwei Stunden im Hochvakuum getrocknet. Das trockene Harz wurde in einen 10 mL Maßkolben eingewogen und mit 20 % Piperidin in DMF versetzt. Die Lösung wurde mindestens 30 min stehen gelassen und schließlich UV-spektrometrisch bei 301 nm vermessen. Die praktische Harzbeladung ergibt sich folgendermaßen:

$$L_P = \frac{A_{301 \text{ nm}} \cdot V}{\epsilon_{301 \text{ nm}} \cdot m} \quad (30)$$

mit: L_P = praktische Beladung

$A_{301 \text{ nm}}$ = UV - Absorption bei 301 nm

V = Volumen Piperidin in DMF [mL]

ϵ = Extinktionskoeffizient bei 301 nm

m = Einwaage Harz [mg]

Sie kann mit der theoretischen Beladung verglichen werden, um die Effektivität der Kuppelung einzuschätzen:

$$L_T = \frac{L_S}{\left(\frac{1+L_S}{1000 \cdot (S-P)}\right)} \quad (31)$$

mit: L_T = theoretische Beladung

L_S = Ausgangsbeladung

S = gebundenes Substrat

P = Abgangsgruppe (Fmoc)

Arginin-reiche Sequenzen

Für die Abspaltung von Arginin-reichen Sequenzen wurde mit einem Abspalt-Cocktail aus TFA (75 %), Thioanisol (7 %), EDT (3,75 %), *m*-Kresol (0,75 %) und TMSBr (13,7 %) mit einem Gesamtvolumen von etwa 4,0 mL gearbeitet. Hierfür wurde ein Schlenkkolben im Vakuum ausgeheizt und unter Argonatmosphäre TFA, Thioanisol, EDT und *m*-Kresol bei 0°C vorgelegt. Das zuvor getrocknete, mit Peptid beladene Harz wurde eingewogen und ebenfalls zugegeben. Anschließend wurde das TMSBr zugesetzt und die Reaktionslösung nach kurzem Schwenken für 30 min bei 0°C stehen gelassen.

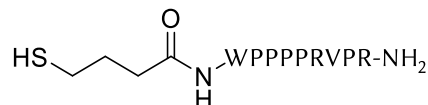

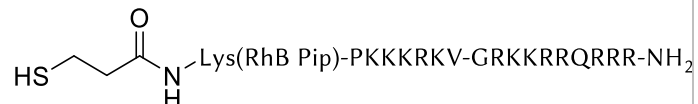
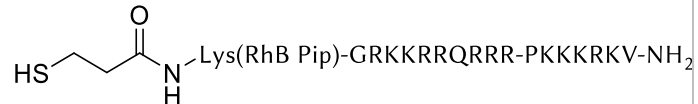
Um das Harz nach Beendigung der Abspaltung aus der Lösung zu entfernen, wurde diese mittels Filterfritte filtriert. Die TFA-haltige Lösung wurde in kalten Diethylether gegeben,

um das enthaltene Peptid auszufällen. Das abfiltrierte Harz wurde mehrfach mit frischem TFA gewaschen, welches ebenfalls in Diethylether gegeben wurde. Das Gesamtvolumen des Ethers belief sich hierbei auf etwa 100 mL (10 *Falkon tubes* mit jeweils 10 mL Ether). Die *Falkon tubes* wurden zentrifugiert und die überstehende Lösung entfernt. Der Rückstand wurde erneut mit Diethylether gewaschen und zentrifugiert. Nach Entfernen der Lösung wurde das abgespaltene Peptid in wenig H₂O bzw. H₂O/MeCN gelöst und anschließend mittels RP-HPLC aufgereinigt. Mit der TMSBr-Methode wurden sieben verschiedene Peptidsequenzen (**Tabelle 21**) erfolgreich abgespalten.

Phenol-Methode

Für die Abspaltung aller anderer Sequenzen wurde mit einem Abspalt-Cocktail aus TFA (84 %), Thioanisol (5,1 %), H₂O (5,1 %), Phenol (3,3 %), TIPS (1,4 %) und EDT(1,1 %) mit einem Gesamtvolumen von etwa 3,0 mL gearbeitet. Hierbei wurden der Abspalt-Cocktail in einem Reaktionsgefäß frisch zubereitet und nach einer 5 min Pre-Inkubationszeit zum trockenen Harz gegeben. Das Harz wurde zur Abspaltung für 3-6 h im Schüttler geschüttelt und anschließend, wie schon in der TMSBr-Methodik beschrieben, in Diethylether gefällt. Das abgespaltene und mit Diethylether gewaschene Peptid wurde schließlich in wenig H₂O bzw. H₂O/MeCN gelöst und mittels RP-HPLC aufgereinigt. Mit der Phenol-Methode wurden sechs verschiedene Peptidsequenzen (**Tabelle 22**) erfolgreich abgespalten.

Table 21: Ausbeuten und Peptidsequenzen der nach der TMSBr-Methode erfolgreich abgespaltenen Peptide.

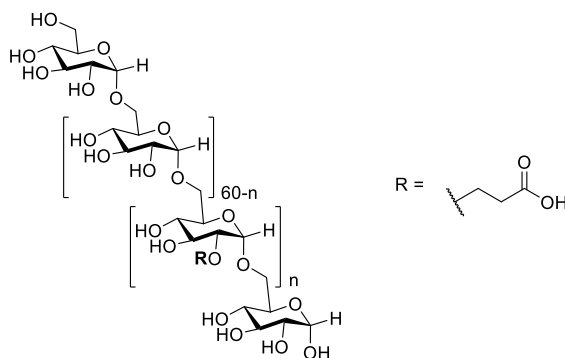
#	SEQUENZ	AUS- BEUTE	HRMS (QTOF) [<i>m/z</i>]		
			Summen- formel	berechnet	gefunden
Affines Peptid 8		73 %	C ₅₇ H ₈₇ N ₁₇ O ₁₀ S	1202,6615 [M+H] ⁺ 601,8344 [M+2H] ²⁺ 401,5587 [M+3H] ³⁺	1202,6615 [M+H] ⁺ 601,8355 [M+2H] ²⁺ 401,5589 [M+3H] ³⁺
hochaff. Peptid 9		79 %	C ₁₁₀ H ₁₆₅ N ₃₃ O ₁₉ S	1143,6430 [M+2H] ²⁺ 762,7644 [M+3H] ³⁺ 572,3251 [M+4H] ⁴⁺	1143,6388 [M+2H] ²⁺ 762,7629 [M+3H] ³⁺ 572,3245 [M+4H] ⁴⁺
19 (NLS-TAT)		65 %	C ₁₄₀ H ₂₄₃ N ₅₂ O ₂₄ S ⁺	1023,9762 [M+3H] ³⁺ 768,2340 [M+4H] ⁴⁺ 614,7887 [M+5H] ⁵⁺	1023,9507 [M+3H] ³⁺ 768,2158 [M+4H] ⁴⁺ 614,7741 [M+5H] ⁵⁺
20 (TAT-NLS)		76 %	C ₁₄₀ H ₂₄₃ N ₅₂ O ₂₄ S ⁺	1023,9762 [M+3H] ³⁺ 768,2340 [M+4H] ⁴⁺ 614,7887 [M+5H] ⁵⁺ 512,4918 [M+6H] ⁶⁺	1023,9526 [M+3H] ³⁺ 768,2167 [M+4H] ⁴⁺ 614,7752 [M+5H] ⁵⁺ 512,4808 [M+6H] ⁶⁺
24 (FLAG- Tag-W)	DYKDDDDKGGWPPPPRVPR-NH ₂	77 %	C ₉₈ H ₁₄₅ N ₂₉ O ₃₀	1105,5446 [M+2H] ²⁺ 737,3655 [M+3H] ³⁺ 553,2759 [M+4H] ⁴⁺ 442,8222 [M+5H] ⁵⁺	1105,5470 [M+2H] ²⁺ 737,3682 [M+3H] ³⁺ 553,2794 [M+4H] ⁴⁺ 442,8257 [M+5H] ⁵⁺
25 (FLAG- Tag-W ₂)	DYKDDDDKGGWPPPPRVPRWPPPPRVPR-NH ₂	51 %	C ₁₅₁ H ₂₂₃ N ₄₅ O ₃₉	1098,2367 [M+3H] ³⁺ 823,9294 [M+4H] ⁴⁺ 659,3449 [M+5H] ⁵⁺ 549,6220 [M+6H] ⁶⁺ 471,2485 [M+7H] ⁷⁺	1098,2403 [M+3H] ³⁺ 823,9320 [M+4H] ⁴⁺ 659,3484 [M+5H] ⁵⁺ 549,6254 [M+6H] ⁶⁺ 471,2521 [M+7H] ⁷⁺

11 (TAT)		46 %	C ₅₇ H ₁₁₃ N ₃₁ O ₁₁ S	720,9551 [M+2H] ²⁺ 480,9725 [M+3H] ³⁺ 360,9812 [M+4H] ⁴⁺	720,9570 [M+2H] ²⁺ 480,9738 [M+3H] ³⁺ 360,9825 [M+4H] ⁴⁺
--------------------	--	------	--	---	---

Tabelle 22: Ausbeuten und Peptidsequenzen der nach der Phenol-Methode erfolgreich abgespaltenen Peptide.

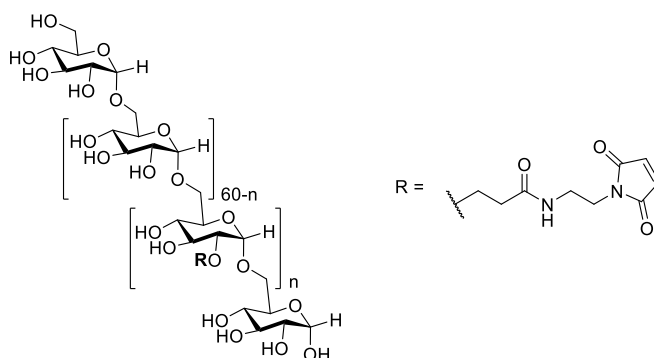
#	SEQUENZ	Aus- BEUTE	HRMS (QTOF) [m/z]		
			Summen- formel	berechnet	gefunden
hochaffines Peptid 9	WPPPPRVPRWPPPPRVPR-NH ₂	22 %	C ₁₀₆ H ₁₅₉ N ₃₃ O ₁₈	1092,6360 [M+2H] ²⁺ 728,7598 [M+3H] ³⁺ 546,8216 [M+4H] ⁴⁺ 437,6588 [M+5H] ⁵⁺	1092,6386 [M+2H] ²⁺ 728,7628 [M+3H] ³⁺ 546,8246 [M+4H] ⁴⁺ 437,6617 [M+5H] ⁵⁺
22 (IVS-Negativ)	WSPSADVPD-NH ₂	56 %	C ₄₃ H ₆₁ N ₁₁ O ₁₅	972,4421 [M+H] ⁺ 486,7247 [M+2H] ²⁺	972,4425 [M+H] ⁺ 486,7246 [M+2H] ²⁺
22 (IVS-Negativ mit Thiol- linker)		63 %	C ₄₇ H ₆₇ N ₁₁ O ₁₆ S	1074,4561 [M+H] ⁺	1074,4586 [M+H] ⁺
23 (FLAG-Tag)	DYKDDDDK-NH ₂	43 %	C ₄₁ H ₆₁ N ₁₁ O ₁₉	1012,4187 [M+H] ⁺ 506,7134 [M+2H] ²⁺	1012,4253 [M+H] ⁺ 506,7165 [M+2H] ²⁺
23 (FLAG-Tag mit Thiolinkler)		39 %	C ₄₅ H ₆₇ N ₁₁ O ₂₀ S	1114,4357 [M+H] ⁺ 557,7215 [M+2H] ²⁺	1114,4354 [M+H] ⁺ 557,7221 [M+2H] ²⁺
11 (TAT mit Thiollinker)		54 %	C ₅₇ H ₁₁₃ N ₃₁ O ₁₁ S	720,9551 [M+2H] ²⁺ 480,9725 [M+3H] ³⁺ 360,9812 [M+4H] ⁴⁺	720,9570 [M+2H] ²⁺ 480,9738 [M+3H] ³⁺ 360,9825 [M+4H] ⁴⁺

AAV II. Carboxyethyl-dextran-Synthese



Käuflich erworbenes Dextran wurde in 1 M NaOH (0,1 – 0,4 mol/L) gelöst und mit Acrylamid versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 24 h bei 30 °C und anschließend weitere 24 h bei 50 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum eingeeengt und der verbleibende ölige Rückstand in wenig H₂O gelöst. Das Rohprodukt wurde durch Fällen in kaltem MeOH erhalten. Die Aufreinigung erfolgte mittels Dialyse in 0,1 M HCl und H₂O (Zelluloseacetat, MWCO 3,5 kDa). Nach abschließender Lyophilisation wurde das Carboxyethyl-dextran als farbloser Feststoff erhalten. Die Analyse erfolgte mittels ¹H-NMR-Spektroskopie und Titration. Die genauen Spezifikationen für die einzelnen Carboxyethyl-dextrane sind in **Tabelle 23** angegeben.^[167]

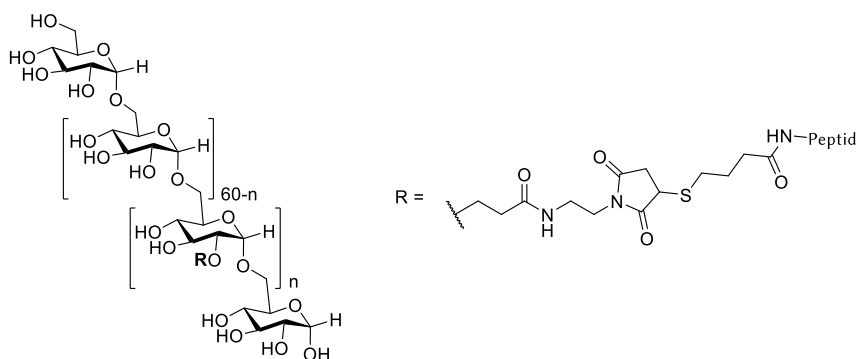
AAV III. Maleinimiddextran-Synthese



Das entsprechende Carboxyethyl-dextran wurde in wenig H₂O (0,01 – 0,02 mol/L) gelöst und mit *N*-(2-Aminoethyl)maleinimid Trifluoracetatsalz versetzt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung auf 6,5-7,0 angepasst. Anschließend wurde EDC-Hydrochlorid in zwei Portionen im Zeitraum von einer Stunde zugegeben und die Lösung bei Raumtemperatur 4 – 24 h gerührt.

Das Lösungsmittel wurde im Anschluss mittels Lyophilisation entfernt, das Rohprodukt in H₂O gelöst und mittels Sephadex G-25 Säule bzw. Dialyse (Zelluloseacetat, MWCO 3,5 kDa, H₂O) aufgereinigt. Nach Lyophilisation wurde das Maleinimiddextran als farbloser Feststoff erhalten. Die Analyse erfolgte mittels ¹H-NMR-Spektroskopie. Die genauen Spezifikationen für die einzelnen Maleinimiddextrane sind in **Tabelle 24** angegeben.^[167]

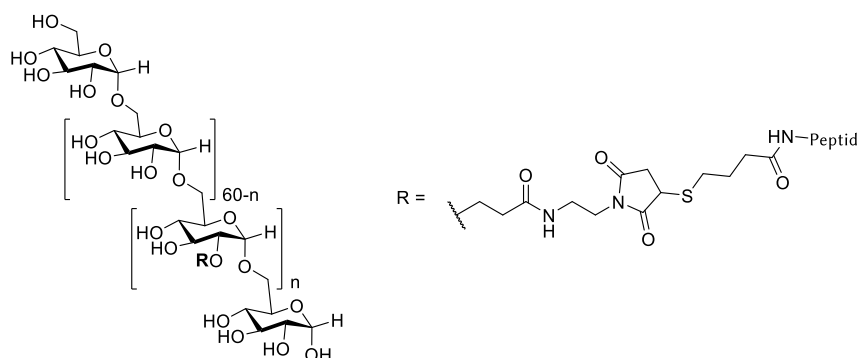
AAV IV. Konjugatsynthese Methode 1



Für die Synthese der Peptid-Dextran Konjugate wurde das entsprechende Maleinimiddextran in Phosphatpuffer (pH 7,5) / Formamid im Verhältnis 3:1 (800 µL) gelöst und 10 min entgast. Die zu kuppelnden Peptide wurden anschließend hinzugegeben und die Lösung erneut 5 min entgast. Die Reaktionslösung wurde 24 h unter Argon bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Konjugat mehrfach dialysiert (Zelluloseacetat, MWCO 3,5 kDa, H₂O). Das Lösungsmittel wurde anschließend durch Lyophilisation entfernt und das Konjugat als fluffiger Feststoff erhalten.

Die Analyse der Peptid-Dextran Konjugate erfolgte mittels ¹H-NMR- und ¹H, ¹H-COSY-Spektroskopie. Die genauen Spezifikationen für die einzelnen Konjugate sind in **Tabelle 25** angegeben.^[167]

AAV V. Konjugatsynthese Methode 2



Für die Synthese der Peptid-Dextran Konjugate wurde das entsprechende Maleinimid-dextran in 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäurelösung (1,5 mL, pH 4,5) gelöst und 10 min entgast. Die zu kuppelnden Peptide wurden anschließend hinzugegeben und die Lösung erneut 5 min entgast. Die Reaktionslösung wurde 24 h unter Argon bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Konjugat mehrfach dialysiert (Zelluloseacetat, MWCO 3,5 kDa bzw. 6,0 kDa, H₂O). Das Lösungsmittel wurde anschließend durch Lyophilisation entfernt und das Konjugat als fluffiger Feststoff erhalten.

Die Analyse der Peptid-Dextran Konjugate erfolgte mittels ¹H-NMR- und ¹H, ¹H-COSY- sowie mittels Absorptionsspektroskopie für Fluorophor-enthaltende Konjugate. Die genauen Spezifikationen für die einzelnen Konjugate sind in **Tabelle 26** angegeben.

Tabelle 23: Carboxyethyl-dextran-Synthese: Einwaagen, Beladung, Ausbeuten.

#	<u>DEXTRAN</u>		<u>ACRYLAMID</u>		<u>BELADUNG</u>		<u>AUSBEUTE [%]</u>	<u>M [g/mol]</u>
	m [g]	n [mmol]	m [mg]	n [mmol]	NMR	Titration		
<u>CED1</u>	10,00	1,00	2249,4	31,3	19,3	19,0	58	11 400
<u>CED2</u>	2,500	0,25	600,1	8,44	13,0	12,9	49	11 000
<u>CED3</u>	1,499	0,15	561,6	7,82	23,2	n.b.*	33	11 700
<u>CED4</u>	4,002	0,40	901,7	12,6	19,4	21,5	67	11 500

* n.b.: nicht bestimmt

Tabelle 24: Maleinimiddextran-Synthese: Einwaagen, Beladung, Ausbeuten.

#	<u>CARBOXYETHYL- DEXTRAN</u>		<u>N-(2-AMINO- ETHYL)MALEINIMID</u>		<u>EDC·HCl (je 2x)</u>		<u>AUFREINI- GUNG</u>	<u>BELADUNG</u>	<u>AUSBEUTE [%]</u>	<u>M [g/mol]</u>
	m [mg]	n [mmol]	m [mg]	n [mmol]	m [mg]	n [mmol]				
<u>MID1</u>	1009,6	0,089	2263,8	9,41	901,8	4,71	Dialyse	11,9	quant.	12 700
<u>MID2</u>	444,0	0,041	679,6	2,67	512,5	2,67	Sephadex	6,0	86	11 700
<u>MID3</u>	354,2	0,031	1274,3	5,01	960,0	5,01	Sephadex	17,0	58	13 800
<u>MID4</u>	601,4	0,054	975,1	5,34	514,8	2,69	Dialyse	10,2	49	12 800

Tabelle 25: Konjugatsynthese Methode 1: Einwaagen, Beladung, Ausbeuten.

#	<u>MALEINIMIDDEXTRAN</u>			<u>KOMPONENTE 1</u>			<u>KOMPONENTE 2</u>			<u>BELADUNG</u>		<u>Aus- BEUTE</u> [%]	<u>M</u> [g/mol]
	#	<u>m</u> [mg]	<u>n</u> [μmol]	#	<u>m</u> [mg]	<u>n</u> [μmol]	#	<u>m</u> [mg]	<u>n</u> [μmol]	<u>1</u>	<u>2</u>		
<u>K15</u>	<u>MID2</u>	16,7	1,48	W	18,7	15,5				4,6		73	17 200
<u>K16</u>	<u>MID3</u>	12,2	0,91	W	44,0	36,6				10,0		quant.	25 600
<u>K17</u>	<u>MID2</u>	12,5	1,10	W ₂	40,1	17,6				4,0		quant.	21 000
<u>K25</u>	<u>MID2</u>	12,2	1,08	WSP	14,3	13,3				7,0		59	19 000
<u>K35</u>	<u>MID1</u>	40,4	3,24	TAT	11,9	8,26	Thiol- RhB Pip	3,0	4,89	1,9	0,3	56	15 100

Tabelle 26: Konjugatsynthese Methode 2: Einwaagen, Beladung, Ausbeuten.

#	<u>MALEINIMIDDEXTRAN</u>			<u>KOMPONENTE 1</u>			<u>KOMPONENTE 2</u>			<u>BELADUNG</u>		<u>Aus- BEUTE</u> [%]	<u>M</u> [g/mol]
	#	<u>m</u> [mg]	<u>n</u> [μmol]	#	<u>m</u> [mg]	<u>n</u> [μmol]	#	<u>m</u> [mg]	<u>n</u> [μmol]	<u>1</u>	<u>2</u>		
<u>K11</u>	<u>MID1</u>	20,6	1,65				Thiol- RhB Pip	4,8	7,82		0,11	84	12 500
<u>K2</u>	<u>MID1</u>	25,2	2,03				NLS-TAT	6,5	2,12		1,1	70	15 800
<u>K3</u>	<u>MID1</u>	25,1	2,02				TAT-NLS	9,9	3,23		1,0	87	15 500
<u>K12</u>	<u>MID1</u>	20,1	1,62	W ₂	25,5	11,4	Thiol- RhB Pip	9,1	14,8	2,3	0,2	quant.	18 000
<u>K4</u>	<u>MID1</u>	24,7	1,99	W ₂	49,8	21,8	NLS-TAT	14,9	4,86	4,5	1,9	quant.	28 600
<u>K5</u>	<u>MID1</u>	25,6	2,06	W ₂	49,6	21,7	TAT-NLS	15,0	4,89	4,8	1,5	98	28 200
<u>K6</u>	<u>MID1</u>	25,2	2,03	W ₂	49,6	21,7	NLS-TAT	7,5	2,44	5,2	0,03	90	24 300
<u>K7</u>	<u>MID1</u>	24,7	1,99	W ₂	50,6	22,2	TAT-NLS	8,6	2,80	5,2	0,31	quant.	25 300
<u>K13</u>	<u>MID1</u>	20,6	1,70	W ₂	55,2	24,3	Thiol- RhB Pip	19,5	31,7	5,9	0,4	quant.	25 100
<u>K1</u>	<u>MID1</u>	24,7	1,99	W ₂	84,9	37,2	TAT-NLS	7,2	2,35	6,1	0,44	quant.	27 700
<u>K8</u>	<u>MID1</u>	24,9	2,00	W ₂	83,2	36,4	NLS-TAT	18,2	5,93	6,3	2,2	quant.	33 600

#	<u>MALEINIMIDDEXTRAN</u>			<u>KOMPONENTE 1</u>			<u>KOMPONENTE 2</u>			<u>BELADUNG</u>		<u>Aus- BEUTE</u> [%]	<u>M</u> [g/mol]
	#	<u>m</u> [mg]	<u>n</u> [μmol]	#	<u>m</u> [mg]	<u>n</u> [μmol]	#	<u>m</u> [mg]	<u>n</u> [μmol]	<u>1</u>	<u>2</u>		
<u>K9</u>	<u>MID1</u>	24,8	1,99	W ₂	85,0	37,2	NLS-TAT	8,0	2,61	7,2	0,4	quant.	30 100
<u>K10</u>	<u>MID1</u>	25,3	2,03	W ₂	85,1	37,2	TAT-NLS	18,0	5,86	9,9	1,8	99	40 500
<u>K14</u>	<u>MID2</u>	12,5	1,10	W	14,1	11,7				3,9		69	16 600
<u>K18</u>	<u>MID1</u>	20,1	1,58	W	9,9	8,24				2,2		66	14 900
<u>K19</u>	<u>MID1</u>	20,0	1,58	W	17,7	14,7				4,8		76	18 000
<u>K20</u>	<u>MID1</u>	20,3	1,60	W	25,0	20,8				6,6		94	20 100
<u>K21</u>	<u>MID1</u>	20,3	1,60	W	49,8	41,4				7,1		quant.	20 700
<u>K22</u>	<u>MID1</u>	19,7	1,56	W ₂	19,2	8,41				2,0		83	16 900
<u>K23</u>	<u>MID1</u>	20,2	1,60	W ₂	33,7	14,7				3,2		quant.	19 600
<u>K24</u>	<u>MID1</u>	19,9	1,57	W ₂	47,4	20,7				5,9		quant.	25 800
<u>K26</u>	<u>MID4</u>	19,9	1,60				FLAG	3,5	3,14		1,2	83	14 100
<u>K27</u>	<u>MID4</u>	20,3	1,63	WSPS	9,5	8,85	FLAG	3,4	3,05	3,9	2,0	76	19 100
<u>K28</u>	<u>MID4</u>	19,9	1,60	W ₂	38,5	16,9	FLAG	4,0	3,59	3,5	1,6	96	22 500
<u>K29</u>	<u>MID4</u>	20,2	1,63	W	25,0	20,8	FLAG	4,0	3,59	4,0	2,2	96	20 100

6. EXPERIMENTALTEIL

#	<u>MALEINIMIDDEXTRAN</u>			<u>KOMPONENTE 1</u>			<u>KOMPONENTE 2</u>			<u>BELADUNG</u>		<u>Aus- BEUTE</u> [%]	<u>M</u> [g/mol]
	#	<u>m</u> [mg]	<u>n</u> [μmol]	#	<u>m</u> [mg]	<u>n</u> [μmol]	#	<u>m</u> [mg]	<u>n</u> [μmol]	<u>1</u>	<u>2</u>		
<u>K30</u>	<u>MID1</u>	40,3	3,25	TAT	13,6	9,83	Thiol- RhB Pip	9,0	14,7	2,6	0,5	98	15 800
<u>K31</u>	<u>K30</u>	20,4	1,29	<u>27</u>	7,0	10,8				2,0	2,6 0,5	71	17 800
<u>K32</u>	<u>K30</u>	20,4	1,29	<u>27</u>	13,8	21,0				4,0	2,6 0,5	93	19 100
<u>K33</u>	<u>MID1</u>	11,8	0,94	<u>27</u>	5,4	8,32	Thiol- RhB Pip	6,5	10,6	3,6	0,5	67	15 100
<u>K34</u>	<u>MID1</u>	11,8	0,94	<u>27</u>	10,8	16,7	Thiol- RhB Pip	6,3	10,2	6,0	0,4	77	16 600

7. Literaturverzeichnis

- [1] M. Z. Hammamy, C. Haase, M. Hammami, R. Hilgenfeld, T. Steinmetzer, *ChemMedChem* **2013**, *8*, 231-241.
- [2] O. Keskin, A. Gursoy, B. Ma, R. Nussinov, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1225-1244.
- [3] A. Barnard, J. A. Miles, G. M. Burslem, A. M. Barker, A. J. Wilson, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 258-264.
- [4] X. Ran, J. E. Gestwicki, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *44*, 75-86.
- [5] M. Kovalainen, J. Mönkäre, J. Riikonen, U. Pesonen, M. Vlasova, J. Salonen, V.-P. Lehto, K. Järvinen, K.-H. Herzig, *Pharmacological Reviews* **2015**, *67*, 541.
- [6] J. L. Lau, M. K. Dunn, *Biorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 2700-2707.
- [7] I. R. Ruttekolk, A. Chakrabarti, M. Richter, F. Duchardt, H. Glauner, W. P. R. Verdurmen, J. Rademann, R. Brock, *Mol. Pharmacol.* **2011**, *79*, 692-700.
- [8] M. Richter, A. Chakrabarti, I. R. Ruttekolk, B. Wiesner, M. Beyermann, R. Brock, J. Rademann, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 16708-16715.
- [9] C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Kokschi, J. Dervede, C. Graf, E.-W. Knapp, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10472-10498.
- [10] J. W. Dennis, *Trends Biochem. Sci* **2015**, *40*, 673-686.
- [11] R. Nussinov, H. Jang, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2014**, *116*, 158-164.
- [12] A. M. Krachler, K. Orth, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 38939-38947.
- [13] D. Lauster, M. Glanz, M. Bardua, K. Ludwig, M. Hellmund, U. Hoffmann, A. Hamann, C. Böttcher, R. Haag, C. P. R. Hackenberger, A. Herrmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 5931-5936.
- [14] K. Autumn, M. Sitti, Y. A. Liang, A. M. Peattie, W. R. Hansen, S. Sponberg, T. W. Kenny, R. Fearing, J. N. Israelachvili, R. J. Full, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12252-12256.
- [15] H. Izadi, K. M. E. Stewart, A. Penlidis, *J. Royal Soc. Interface* **2014**, *11*, 20140371.
- [16] J. Huskens, L. J. Prins, R. Haag, B. J. Ravoo, *Models and Methods in Multivalent Systems in Multivalency: Concepts, Research & Applications*, John Wiley & Sons, Hoboken, **2017**.
- [17] R. H. Kramer, J. W. Karpen, *Nature* **1998**, *395*, 710-713.

- [18] J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922-14933.
- [19] T. A. Shewmake, F. J. Solis, R. J. Gillies, M. R. Caplan, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 3057-3064.
- [20] R. S. Kane, *Langmuir* **2010**, *26*, 8636-8640.
- [21] H. J. Hogben, J. K. Sprafke, M. Hoffmann, M. Pawlicki, H. L. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20962-20969.
- [22] B. L. Hartwell, L. Antunez, B. P. Sullivan, S. Thati, J. O. Sestak, C. Berkland, *J. Pharm. Sci.* **2014**, *104*, 346-361.
- [23] L. Röglin, E. H. M. Lempens, E. W. Meijer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *50*, 102-112.
- [24] U. Boas, P. M. H. Heegaard, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 43-63.
- [25] R. Narain, *Engineered Carbohydrate-Based Materials for Biomedical Applications: Polymers, Surfaces, Dendrimers, Nanoparticles, and Hydrogels*, John Wiley & Sons, Hoboken, **2011**.
- [26] K. Koschek, V. Durmaz, O. Krylova, M. Wieczorek, S. Gupta, M. Richter, A. Bujotzek, C. Fischer, R. Haag, C. Freund, M. Weber, J. Rademann, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 837-847.
- [27] R. Haag, F. Kratz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1198-1215.
- [28] S. Bhatia, D. Lauster, M. Bardua, K. Ludwig, S. Angioletti-Uberti, N. Popp, U. Hoffmann, F. Paulus, M. Budt, M. Stadtmüller, T. Wolff, A. Hamann, C. Böttcher, A. Herrmann, R. Haag, *Biomaterials* **2017**, *138*, 22-34.
- [29] H. Bisswanger, *Multiple Equilibria. In Enzyme Kinetics*, Wiley-VCH Weinheim, **2008**.
- [30] V. M. Krishnamurthy, L. A. Estroff, G. M. Whitesides, *Fragment-based Approaches in Drug Discovery, in Multivalency in Ligand Design*, Wiley-VCH, **2006**.
- [31] P. I. Kitov, D. R. Bundle, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16271-16284.
- [32] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2794.
- [33] P. W. Atkins, J. de Paula, *Pysikalische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2013**.
- [34] X. Du, Y. Li, Y.-L. Xia, S.-M. Ai, J. Liang, P. Sang, X.-L. Ji, S.-Q. Liu, *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 144-177.
- [35] J. D. Dunitz, *Chemistry & Biology* **1995**, *2*, 709-712.
- [36] D. H. Williams, E. Stephens, D. P. O'Brien, M. Zhou, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6596-6616.

- [37] C. Decroocq, A. Joosten, R. Sergent, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, P. Compain, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 2038-2049.
- [38] M. Almant, V. Moreau, J. Kovensky, J. Bouckaert, S. G. Gouin, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 10029-10038.
- [39] D. A. Mann, M. Kanai, D. J. Maly, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10575-10582.
- [40] J. Dervede, A. Rausch, M. Weinhart, S. Enders, R. Tauber, K. Licha, M. Schirner, U. Zügel, A. von Bonin, R. Haag, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 19679-19684.
- [41] E. Laigre, D. Goyard, C. Tiertant, J. Dejeu, O. Renaudet, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 8899-8903
- [42] K. Hirose, C. Schalley, *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- [43] T. D. Pollard, *Mol. Biol. Cell* **2010**, *21*, 4061-4067.
- [44] A. M. Rossi, C. W. Taylor, *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 365-387.
- [45] C. Dong, Z. Liu, F. Wang, *Biophysics reports* **2015**, *1*, 148-155.
- [46] Y. Liu, X.-X. Shao, L. Zhang, G. Song, Y.-L. Liu, Z.-G. Xu, Z.-Y. Guo, *Amino Acids* **2015**, *47*, 2237-2243.
- [47] Malvern, *Microcal ITC Systems: Understanding biomolecular interactions* **2016**.
- [48] I. Jelesarov, H. R. Bosshard, *J. Mol. Recognit.* **1999**, *12*, 3-18.
- [49] M. W. Freyer, E. A. Lewis, *Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions, in Methods in Cell Biology, Vol. 84*, Academic Press, **2008**.
- [50] G. Pasut, F. M. Veronese, *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 933-961.
- [51] P. Caliceti, F. M. Veronese, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 1261-1277.
- [52] M. Jäger, S. Schubert, S. Ochrimenko, D. Fischer, U. S. Schubert, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4755-4767.
- [53] J. Kopeček, P. Kopečková, T. Minko, Z.-R. Lu, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 61-81.
- [54] R. Mehvar, *J. Control. Release* **2000**, *69*, 1-25.
- [55] J. Varshosaz, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2012**, *9*, 509-523.
- [56] Y. Kato, H. Onishi, Y. Machida, *Biomaterials* **2004**, *25*, 907-915.
- [57] E. J. Oh, K. Park, K. S. Kim, J. Kim, J.-A. Yang, J.-H. Kong, M. Y. Lee, A. S. Hoffman, S. K. Hahn, *J. Control. Release* **2010**, *141*, 2-12.
- [58] S. Tiwari, P. Bahadur, *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *121*, 556-571.

- [59] C.-O. Turrin, A.-M. Caminade, *Dendrimer Conjugates for Drug Delivery, in Dendrimers: Towards Catalytic, Material and Biomedical Uses*, John Wiley & Sons, Chichester, **2011**.
- [60] A. R. Menjoge, R. M. Kannan, D. A. Tomalia, *Drug Discov. Today* **2010**, *15*, 171-185.
- [61] S. Abbina, S. Vappala, P. Kumar, E. M. J. Siren, C. C. La, U. Abbasi, D. E. Brooks, J. N. Kizhakkedathu, *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 9249-9277.
- [62] A. Chakrabarti, J. J. Witsenburg, M. D. Sinzinger, M. Richter, R. Wallbrecher, J. C. Cluitmans, W. P. R. Verdurmen, S. Tanis, M. J. W. Adjobo-Hermans, J. Rademann, R. Brock, *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.* **2014**, *1838*, 3097-3106.
- [63] J. Khandare, T. Minko, *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 359-397.
- [64] K. Koschek, M. Dathe, J. Rademann, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 1982-1990.
- [65] M. A. Gauthier, H.-A. Klok, *Chem. Commun.* **2008**, *23*, 2591-2611.
- [66] L. A. Canalle, D. W. P. M. Löwik, J. C. M. van Hest, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 329-353.
- [67] S. Dehn, R. Chapman, K. A. Jolliffe, S. Perrier, *Polym. Rev.* **2011**, *51*, 214-234.
- [68] D. J. Hall, H. M. Van Den Berghe, A. P. Dove, *Polym. Int.* **2011**, *60*, 1149-1157.
- [69] A. Sitterli, T. Heinze, *React. Funct. Polym.* **2019**, *136*, 66-74.
- [70] I. R. Ruttekolk, F. Duchardt, R. Fischer, K.-H. Wiesmüller, J. Rademann, R. Brock, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2081-2087.
- [71] W. Tang, M. L. Becker, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 7013-7039.
- [72] D. J. V. C. van Steenis, O. R. P. David, G. P. F. van Strijdonck, J. H. van Maarseveen, J. N. H. Reek, *Chem. Commun.* **2005**, *34*, 4333-4335.
- [73] X. Liu, P. Gong, P. Song, F. Xie, A. L. Miller II, S. Chen, L. Lu, *Polymer Chemistry* **2019**, *10*, 705-717.
- [74] I. van Baal, H. Malda, S. A. Synowsky, J. L. J. van Dongen, T. M. Hackeng, M. Merkx, E. W. Meijer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5052-5057.
- [75] M. H. Stenzel, *ACS Macro Lett.* **2013**, *2*, 14-18.
- [76] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776-779.
- [77] C. F. Brewer, J. P. Riehm, *Anal. Biochem.* **1967**, *18*, 248-255.
- [78] R. A. Bednar, *Biochemistry* **1990**, *29*, 3684-3690.
- [79] D. E. Shafer, J. K. Inman, A. Lees, *Anal. Biochem.* **2000**, *282*, 161-164.
- [80] Y. Sun, H. Liu, L. Cheng, S. Zhu, C. Cai, T. Yang, L. Yang, P. Ding, *Polym. Int.* **2018**, *67*, 25-31.
- [81] D. C. Chan, M. T. Bedford, P. Leder, *EMBO J.* **1996**, *15*, 1045-1054.

- [82] R. Ren, B. J. Mayer, P. Cicchetti, D. Baltimore, *Science* **1993**, 259, 1157-1161.
- [83] M. T. Bedford, R. Reed, P. Leder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 10602-10607.
- [84] S. Wiesner, G. Stier, M. Sattler, M. J. Macias, *J. Mol. Biol.* **2002**, 324, 807-822.
- [85] C. L. Will, R. Lührmann, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2011**, 3, 3707-3730.
- [86] M. C. Wahl, C. L. Will, R. Lührmann, *Cell* **2009**, 136, 701-718.
- [87] T. W. Nilsen, B. R. Graveley, *Nature* **2010**, 463, 457-463.
- [88] B. R. Graveley, *TIG* **2001**, 17, 100-107.
- [89] M. M. Scotti, M. S. Swanson, *Nat. Rev. Genet.* **2015**, 17, 19-32.
- [90] J. Tazi, N. Bakkour, S. Stamm, *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, 1792, 14-26.
- [91] M. A. Garcia-Blanco, A. P. Baraniak, E. L. Lasda, *Nat. Biotechnol.* **2004**, 22, 535-546.
- [92] J. Woolard, W. Vousden, S. J. Moss, A. Krishnakumar, M. V. R. Gammons, D. G. Nowak, N. Dixon, J. Micklefield, A. Spannhoff, M. T. Bedford, M. A. Gregory, C. J. Martin, P. F. Leadlay, M. Q. Zhang, S. J. Harper, D. O. Bates, B. Wilkinson, *Chem. Sci.* **2011**, 2, 273-278.
- [93] L. Galganski, M. O. Urbanek, W. J. Krzyzosiak, *Nucleic Acids Res.* **2017**, 45, 10350-10368.
- [94] L. M. Henning, K. F. Santos, J. Sticht, S. Jehle, C.-T. Lee, M. Wittwer, H. Urlaub, U. Stelzl, M. C. Wahl, C. Freund, *Nucleic Acids Res.* **2017**, 45, 7922-7937.
- [95] X. Huang, M. Beullens, J. Zhang, Y. Zhou, E. Nicolaescu, B. Lesage, Q. Hu, J. Wu, M. Bollen, Y. Shi, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 25375-25387.
- [96] Y. Zhang, B. Wen, J. Peng, X. Zuo, Q. Gong, Z. Zhang, *Protein Cell* **2015**, 6, 619-623.
- [97] R. J. Ingham, K. Colwill, C. Howard, S. Dettwiler, C. S. H. Lim, J. Yu, K. Hersi, J. Raaijmakers, G. Gish, G. Mbamalu, L. Taylor, B. Yeung, G. Vassilovski, M. Amin, F. Chen, L. Matskova, G. Winberg, I. Ernberg, R. Linding, P. O'Donnell, A. Starostine, W. Keller, P. Metalnikov, C. Stark, T. Pawson, *Mol. Cell. Biol.* **2005**, 25, 7092-7106.
- [98] S. Klippel, M. Wiczorek, M. Schuemann, E. Krause, B. Marg, T. Seidel, T. Meyer, E.-W. Knapp, C. Freund, *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 38478-38487.
- [99] L. M. Henning, S. Bhatia, M. Bertazon, M. Marczyne, O. Seitz, R. Volkmer, R. Haag, C. Freund, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, 11, 701-706.
- [100] S. D. Conner, S. L. Schmid, *Nature* **2003**, 422, 37-44.
- [101] M. R. Villarreal, https://de.wikipedia.org/wiki/Zellmembran#/media/File:Cell_membrane_detailed_diagram_de.svg **abgerufen am 12.02.2019**.
- [102] H. Hillaireau, P. Couvreur, *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, 66, 2873-2896.

- [103] S. A. Freeman, S. Grinstein, *Immunol Rev.* **2014**, *262*, 193-215.
- [104] G. Beards, https://en.wikipedia.org/wiki/Phagocytosis#/media/File:Phagocytosis_in_three_steps.png, **abgerufen am 04.11.2018**.
- [105] V. Bitsikas, I. R. Corrêa, Jr., B. J. Nichols, *eLife* **2014**, *3*, 3970-3996.
- [106] T. Kirchhausen, D. Owen, S. C. Harrison, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2014**, *6*, 16725-16755.
- [107] H. T. McMahon, E. Boucrot, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 517-533.
- [108] ViralZone Homepage, https://viralzone.expasy.org/957?outline=all_by_protein, **abgerufen am 04.11.2018**.
- [109] I. R. Nabi, P. U. Le, *J. Cell Biol.* **2003**, *161*, 673-677.
- [110] R. G. Parton, B. Joggerst, K. Simons, *J. Cell Biol.* **1994**, *127*, 1199-1215.
- [111] K. G. Rothberg, Y. S. Ying, J. F. Kolhouse, B. A. Kamen, R. G. Anderson, *J. Cell Biol.* **1990**, *110*, 637-649.
- [112] J. E. Schnitzer, P. Oh, E. Pinney, J. Allard, *J. Cell Biol.* **1994**, *127*, 1217-1232.
- [113] L. Pelkmans, J. Kartenbeck, A. Helenius, *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 473-483.
- [114] S. M. Campbell, S. M. Crowe, J. Mak, *J. Clin. Virol.* **2001**, *22*, 217-227.
- [115] V. Pietiäinen, V. Marjomäki, P. Upla, L. Pelkmans, A. Helenius, T. Hyypiä, *Mol. Biol. Cell* **2004**, *15*, 4911-4925.
- [116] A. L. Kiss, E. Botos, *J. Cell. Mol. Med.* **2009**, *13*, 1228-1237.
- [117] ViralZone Homepage, https://viralzone.expasy.org/976?outline=all_by_protein, **abgerufen am 04.11.2018**.
- [118] J. P. Lim, P. A. Gleeson, *Immunol. Cell Biol.* **2011**, *89*, 836-843.
- [119] ViralZone Homepage, <https://viralzone.expasy.org/800>, **abgerufen am 04.11.2018**.
- [120] E. Gros, S. Deshayes, M. C. Morris, G. Aldrian-Herrada, J. Depollier, F. Heitz, G. Divita, *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.* **2006**, *1758*, 384-393.
- [121] S. Veldhoen, S. D. Laufer, A. Trampe, T. Restle, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 6561-6573.
- [122] R. Fischer, M. Fotin-Mleczek, H. Hufnagel, R. Brock, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2126-2142.
- [123] F. Milletti, *Drug Discov. Today* **2012**, *17*, 850-860.
- [124] D. Derossi, A. H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10444-10450.
- [125] S. M. Fuchs, R. T. Raines, *Biochemistry* **2004**, *43*, 2438-2444.

- [126] H. Brooks, B. Lebleu, E. Vivès, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 559-577.
- [127] M. Pooga, U. Soomets, M. Hällbrink, A. Valkna, K. Saar, K. Rezaei, U. Kahl, J.-X. Hao, X.-J. Xu, Z. Wiesenfeld-Hallin, T. Hökfelt, T. Bartfai, Ü. Langel, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 857-861.
- [128] M. Rhee, P. Davis, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 1233-1240.
- [129] G. Tünnemann, G. Ter-Avetisyan, R. M. Martin, M. Stöckl, A. Herrmann, M. C. Cardoso, *J. Pept. Sci.* **2007**, *14*, 469-476.
- [130] C.-Y. Jiao, D. Delaroche, F. Burlina, I. D. Alves, G. Chassaing, S. Sagan, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 33957-33965.
- [131] I. D. Alves, C. Bechara, A. Walrant, Y. Zaltsman, C.-Y. Jiao, S. Sagan, *PLOS ONE* **2011**, *6*, 24096-24105.
- [132] A. Ziegler, J. Seelig, *Biophys. J.* **2008**, *94*, 2142-2149.
- [133] F. Duchardt, M. Fotin-Mleczek, H. Schwarz, R. Fischer, R. Brock, *Traffic* **2007**, *8*, 848-866.
- [134] J. Mueller, I. Kretzschmar, R. Volkmer, P. Boisguerin, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2363-2374.
- [135] A. Ziegler, P. Nervi, M. Dürrenberger, J. Seelig, *Biochemistry* **2005**, *44*, 138-148.
- [136] R. Wallbrecher, T. Ackels, R. A. Olea, M. J. Klein, L. Caillon, J. Schiller, P. H. Bovée-Geurts, T. H. van Kuppevelt, A. S. Ulrich, M. Spehr, M. J. W. Adjobo-Hermans, R. Brock, *J. Control. Release* **2017**, *256*, 68-78.
- [137] K. Saar, M. Lindgren, M. Hansen, E. Eiríksdóttir, Y. Jiang, K. Rosenthal-Aizman, M. Sassian, Ü. Langel, *Anal. Biochem.* **2005**, *345*, 55-65.
- [138] T. Sugita, T. Yoshikawa, Y. Mukai, N. Yamanada, S. Imai, K. Nagano, Y. Yoshida, H. Shibata, Y. Yoshioka, S. Nakagawa, H. Kamada, S. i. Tsunoda, Y. Tsutsumi, *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *153*, 1143-1152.
- [139] A. K. Cardozo, V. Buchillier, M. Mathieu, J. Chen, F. Ortis, L. Ladrière, N. Allaman-Pillet, O. Poirot, S. Kellenberger, J. S. Beckmann, D. L. Eizirik, C. Bonny, F. Maurer, *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.* **2007**, *1768*, 2222-2234.
- [140] S. El-Andaloussi, P. Järver, H. J. Johansson, U. Langel, *Biochem. J.* **2007**, *407*, 285-292.
- [141] S. W. Jones, R. Christison, K. Bundell, C. J. Voyce, S. M. V. Brockbank, P. Newham, M. A. Lindsay, *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *145*, 1093-1102.
- [142] P. Zhang, A. G. Cheetham, L. L. Lock, H. Cui, *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 604-613.

- [143] E. Dupont, A. Prochiantz, A. Joliot, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 8994-9000.
- [144] D. L. Spector, *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 2891-2893.
- [145] C. Strambio-De-Castillia, M. Niepel, M. P. Rout, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 490-501.
- [146] G. Kabachinski, T. U. Schwartz, *J. Cell Sci.* **2015**, *128*, 423-429.
- [147] R. Bayliss, T. Littlewood, M. Stewart, *Cell* **2000**, *102*, 99-108.
- [148] R. Hayama, S. Sparks, L. M. Hecht, K. Dutta, J. M. Karp, C. M. Cabana, M. P. Rout, D. Cowburn, *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 4555-4563.
- [149] M. Stewart, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 195-208.
- [150] A. Lange, R. E. Mills, C. J. Lange, M. Stewart, S. E. Devine, A. H. Corbett, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 5101-5105.
- [151] G. Cingolani, J. Bednenko, M. T. Gillespie, L. Gerace, *Mol. Cell* **2002**, *10*, 1345-1353.
- [152] D. Kalderon, B. L. Roberts, W. D. Richardson, A. E. Smith, *Cell* **1984**, *39*, 499-509.
- [153] R. Fagerlund, L. Kinnunen, M. Köhler, I. Julkunen, K. Melén, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 15942-15951.
- [154] Robert Koch Institut, https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/W/WestNilFieber/West-Nil-Fieber_Ueberblick.html **abgerufen am 30.12.2018.**
- [155] European Centre for Disease Prevention and Control, <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-fever-europe-2018-human-cases-compared-previous-seasons-updated-13> **abgerufen am 30.12.2018.**
- [156] European Centre for Disease Prevention and Control, <https://ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-west-nile-virus-transmission-season-europe-2018> **abgerufen am 30.12.2018.**
- [157] M. A. Brinton, *Annu. Rev. Microbiol.* **2002**, *56*, 371-402.
- [158] S. Mukhopadhyay, R. J. Kuhn, M. G. Rossmann, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 13-22.
- [159] H. Weissenböck, Z. Hubálek, T. Bakonyi, N. Nowotny, *Vet. Microbiol.* **2010**, *140*, 271-280.
- [160] K. J. Chappell, T. A. Nall, M. J. Stoermer, N.-X. Fang, J. D. A. Tyndall, D. P. Fairlie, P. R. Young, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 2896-2903.
- [161] T. A. Nall, K. J. Chappell, M. J. Stoermer, N.-X. Fang, J. D. A. Tyndall, P. R. Young, D. P. Fairlie, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 48535-48542.
- [162] H. A. Lim, J. Joy, J. Hill, C. San, B. Chia, *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 3130-3134.
- [163] P. Erbel, N. Schiering, A. D'Arcy, M. Renatus, M. Kroemer, S. P. Lim, Z. Yin, T. H. Keller, S. G. Vasudevan, U. Hommel, *Nat. Struct. Mol. Biol* **2006**, *13*, 372-373.

- [164] K. J. Chappell, M. J. Stoermer, D. P. Fairlie, P. R. Young, *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 2771-2784.
- [165] E. da Silva-Júnior, T. Schirmeister, J. Araújo-Júnior, *Recent Advances in Inhibitors of Flavivirus NS2B-NS3 Protease from Dengue, Zika, and West Nile Viruses, in Vector-Borne Diseases & Treatment*, Open Access eBooks, **2018**.
- [166] T. J. Chambers, R. C. Weir, A. Grakoui, D. W. McCourt, J. F. Bazan, R. J. Fletterick, C. M. Rice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 8898-8902.
- [167] M. Richter, *Dissertation*, Freie Universität Berlin, **2011**.
- [168] B. Lindberg, S. Svensson, *Acta Chem. Scand.* **1968**, *22*, 1907-1912.
- [169] V. K. Yadav, K. Ganesh Babu, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 577-580.
- [170] S. Guezane Lakoud, A. Djerourou, *Arab. J. Chem.* **2016**, *9*, S889-S892.
- [171] David B. Thompson, R. Villaseñor, Brent M. Dorr, M. Zerial, David R. Liu, *Chemistry & Biology* **2012**, *19*, 831-843.
- [172] P. Lönn, A. D. Kacsinta, X.-S. Cui, A. S. Hamil, M. Kaulich, K. Gogoi, S. F. Dowdy, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 32301-32309.
- [173] N. Imelli, O. Meier, K. Boucke, S. Hemmi, U. F. Greber, *J. Virol.* **2004**, *78*, 3089.
- [174] M. C. Morris, J. Depollier, J. Mery, F. Heitz, G. Divita, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 1173-1176.
- [175] S. Wu, Y. Song, Z. Li, Z. Wu, J. Han, S. Han, *Analytical Methods* **2012**, *4*, 1699-1703.
- [176] S. Sommerwerk, L. Heller, C. Kerzig, A. E. Kramell, R. Csuk, *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *127*, 1-9.
- [177] R. M. Kierat, *Dissertation*, Universität Heidelberg, **2008**.
- [178] P. Gobbo, P. Gunawardene, W. Luo, M. S. Workentin, *Synlett* **2015**, *26*, 1169-1174.
- [179] K. Koschek, *Dissertation*, Freie Universität Berlin, **2012**.
- [180] G. Wedler, *Lehrbuch der physikalischen Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [181] G. Schwedt, T. C. Schmidt, O. J. Schmitz, *Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2016**.
- [182] M. Gaborieau, P. Castignolles, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 1413-1423.
- [183] PSS Polymer Standards Service, *Webinar: Grundlagen der GPC/SEC/GFC*, <https://www.pss-polymer.com/de/kurse/webinare-und-webbasiertes-training/#c1566>, **20.01.2016**.
- [184] P. F. W. Simon, https://www.analytik-news.de/Fachartikel/Volltext/rhein_waal_gpc.pdf **abgerufen am 01.01.2019**.

- [185] X. M. Liu, W. Gao, E. P. Maziarz, J. C. Salamone, J. Duex, E. Xia, *J. Chromatogr. A* **2006**, *1104*, 145-153.
- [186] C.-S. Wu, D. J. Nagy, *Column Handbook for Size Exclusion Chromatography*, Academic Press, San Diego, **1999**.
- [187] G. Odian, *Principles of Polymerization*, John Wiley & Sons, Hoboken, **2004**.
- [188] R. T. Lee, Y. C. Lee, *Glycoconjugate J.* **2000**, *17*, 543-551.
- [189] X. Bian, S. W. Lockless, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 5549-5553.
- [190] A. Aysun, K. Yağmur, B. Yusuf, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2016**, *17*, 1213-1221.
- [191] J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, F. Pognan, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421-5426.
- [192] S. N. Rampersad, *Sensors* **2012**, *12*, 12347-12360.
- [193] N. S. Rodionova, E. Rota, A. S. Tsarkova, V. N. Petushkov, *Photochem. Photobiol.* **2017**, *93*, 416-428.
- [194] T. Wilson, J. W. Hastings, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1998**, *14*, 197-230.
- [195] P. Naumov, Y. Ozawa, K. Ohkubo, S. Fukuzumi, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11590-11605.
- [196] Promega, *CellTiter-Glo 2.0 Assay*, Technical Manual (TM403), **10/2018**.
- [197] I. M. Kaplan, J. S. Wadia, S. F. Dowdy, *J. Control. Release* **2005**, *102*, 247-253.
- [198] M. Z. Hammamy, A. Epp, K. Harges, S. Kallis, L. Zhang, R. Hilgenfeld, R. Bartenschlager, T. Steinmetzer, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32*, 712-721.
- [199] M. J. Stoermer, K. J. Chappell, S. Liebscher, C. M. Jensen, C. H. Gan, P. K. Gupta, W.-J. Xu, P. R. Young, D. P. Fairlie, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5714-5721.
- [200] A. Schüller, Z. Yin, C. S. Brian Chia, D. N. P. Doan, H.-K. Kim, L. Shang, T. P. Loh, J. Hill, S. G. Vasudevan, *Antivir. Res.* **2011**, *92*, 96-101.
- [201] J. Lei, G. Hansen, C. Nitsche, C. D. Klein, L. Zhang, R. Hilgenfeld, *Science* **2016**, *353*, 503-505.
- [202] C. Nitsche, L. Zhang, L. F. Weigel, J. Schilz, D. Graf, R. Bartenschlager, R. Hilgenfeld, C. D. Klein, *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 511-516.
- [203] B. T. Burlingham, T. S. Widlanski, *J. Chem. Educ.* **2003**, *80*, 214-218.
- [204] A. E. Aleshin, S. A. Shiryaev, A. Y. Strongin, R. C. Liddington, *Protein Sci.* **2007**, *16*, 795-806.
- [205] S. M. Tomlinson, S. J. Watowich, *Biochemistry* **2008**, *47*, 11763-11770.
- [206] J. J. H. Chu, M. L. Ng, *J. Virol.* **2004**, *78*, 10543-10555.
- [207] A. Roy, L. Lim, S. Srivastava, Y. Lu, J. Song, *PLOS ONE* **2017**, *12*, 180632-180653.

- [208] L. F. Weigel, C. Nitsche, D. Graf, R. Bartenschlager, C. D. Klein, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 7719-7733.
- [209] I. Jordan, N. Fischer, T. Briese, W. I. Lipkin, J. Y.-N. Lau, *The Journal of Infectious Diseases* **2000**, *182*, 1214-1217.
- [210] K. S. Sharma, G. Durand, F. Giusti, B. Olivier, A.-S. Fabiano, P. Bazzacco, T. Dahmane, C. Ebel, J.-L. Popot, B. Pucci, *Langmuir* **2008**, *24*, 13581-13590.
- [211] U. Knowledgebase, <https://www.uniprot.org/> **abgerufen am 15.02.2019.**

8. Veröffentlichungen

8.1. Publikationen

- C. Fischer, M. Bertazzon, C. Freund, J. Rademann, Peptide-dextran conjugates as multivalent inhibitors of the pre-mRNA splicing factor FBP21, *Manuskript in Vorbereitung*.
- C. Fischer, K. Koschek, O. Krylova, M. Wieczorek, S. Gupta, L. Henning, M. Bertazzon, V. Durmaz, C. Freund, M. Weber, J. Rademann, Multivalent peptide-polymer conjugates as inhibitors for protein-protein interactions, *Proceedings of the 34th European Peptide Symposium and the 8th International Peptide Symposium, 2016, PP VII – 113, 95*.
- K. Koschek, V. Durmaz, O. Krylova, M. Wieczorek, S. Gupta, M. Richter, A. Bujotzek, C. Fischer, R. Haag, C. Freund, M. Weber, J. Rademann, Peptide-polymer ligands for a tandem WW-domain, an adaptive multivalent protein-protein interaction: lessons on the thermodynamic fitness of flexible ligands, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 837–847.

8.2. Konferenzen und Postervorträge

06. 2018	Tag der Pharmazie , Berlin
03. 2018	SFB 765 Doktorandentag , Berlin
10. 2017	4. Internationales SFB 765 Symposium , Berlin
06. 2017	PhD Retreat SFB 765 , Lüneburg
03. 2017	SFB 765 Doktorandentag , Berlin
06. 2016	Tag der Pharmazie , Berlin
03. 2016	SFB 765 Doktorandentag , Berlin
06. 2015	PhD Retreat SFB 765 , Rheinsberg
03. 2015	German Peptide Symposium , Darmstadt
10. 2014	3. Internationales SFB 765 Symposium , Berlin und weitere

10. Anhang

10.1. Beladungsbestimmung mittels Absorptionsspektroskopie

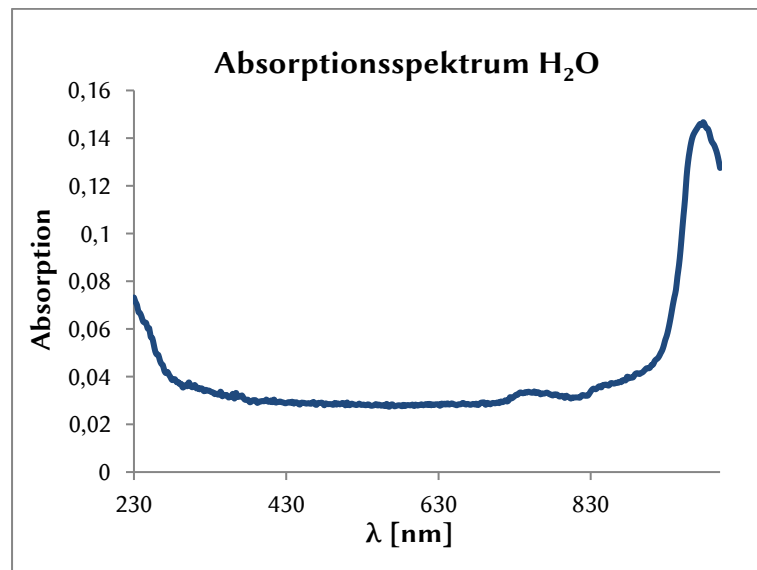


Abbildung A. 3: Absorptionsspektrum von Wasser. Verwendet für die Beladungsbestimmung der Fluorophor-tragenden Konjugate. Die Absorptionswerte des Wassers und der Titerplatte werden in der Berechnung von den Absorptionswerten für die Konjugate abgezogen.

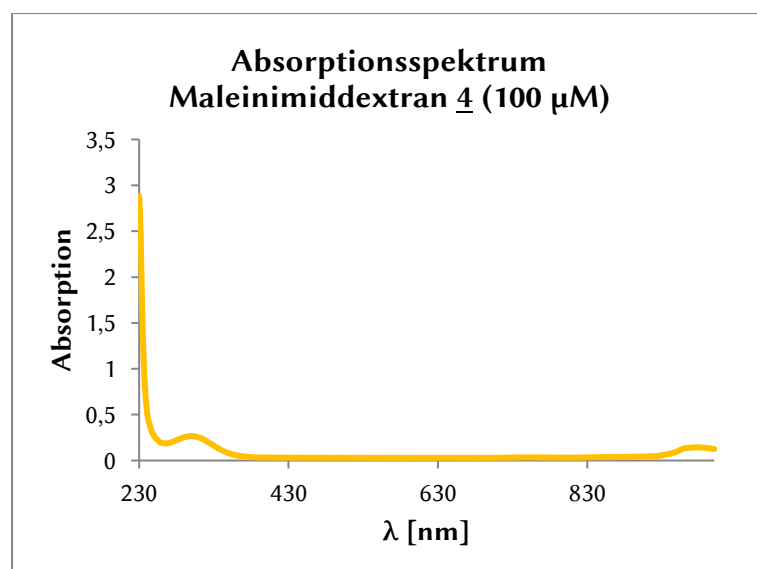


Abbildung A. 4: Absorptionsspektrum des Maleinimiddextrans 4. Verwendet für die Beladungsbestimmung der Fluorophor-tragenden Konjugate.

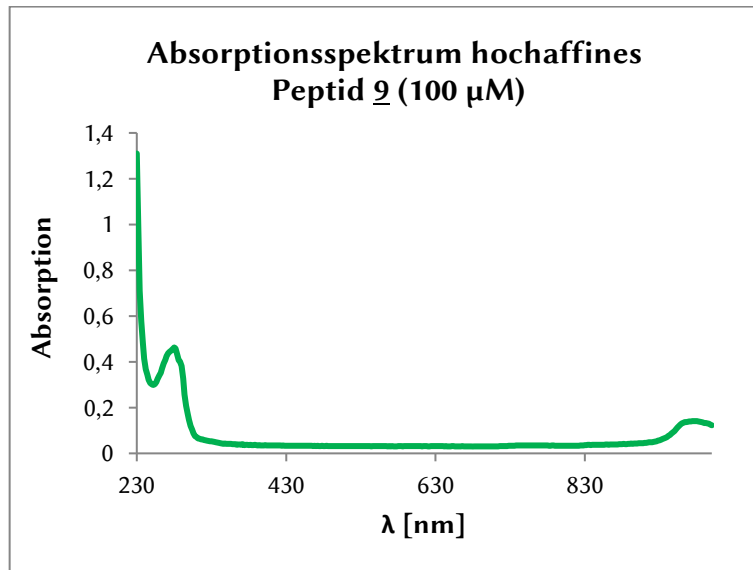


Abbildung A. 5: Absorptionsspektrum des hochaffinen Peptids 9. Verwendet für die Beladungsbestimmung der Fluorophor-tragenden Konjugate.

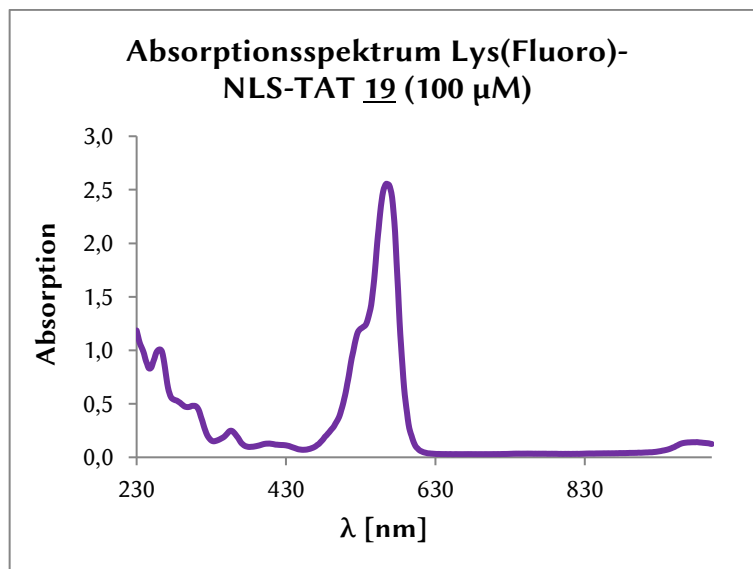


Abbildung A. 6: Absorptionsspektrum des zellpenetrierenden Peptids Lys(RhB Pip)-NLS-TAT 19. Verwendet für die Beladungsbestimmung der Fluorophor-tragenden Konjugate.

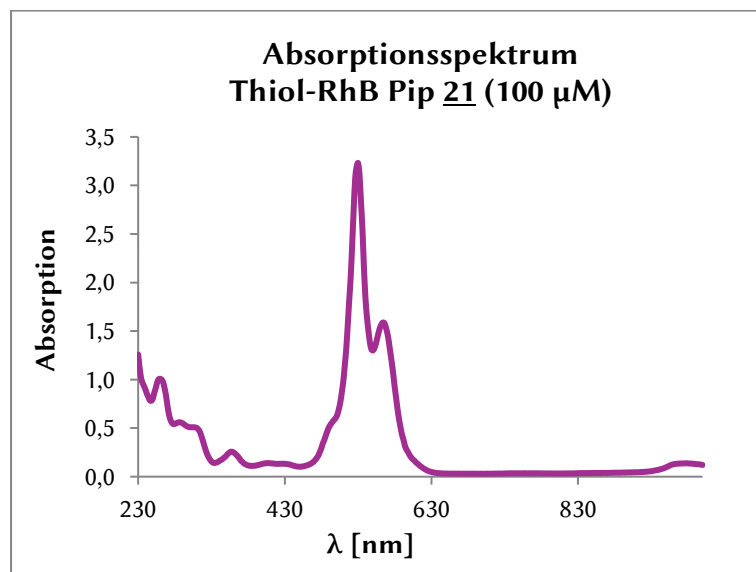


Abbildung A. 7: Absorptionsspektrum des Fluorophors Thiol-RhB Pip 21. Verwendet für die Beladungsbestimmung der Fluorophor-tragenden Konjugate.

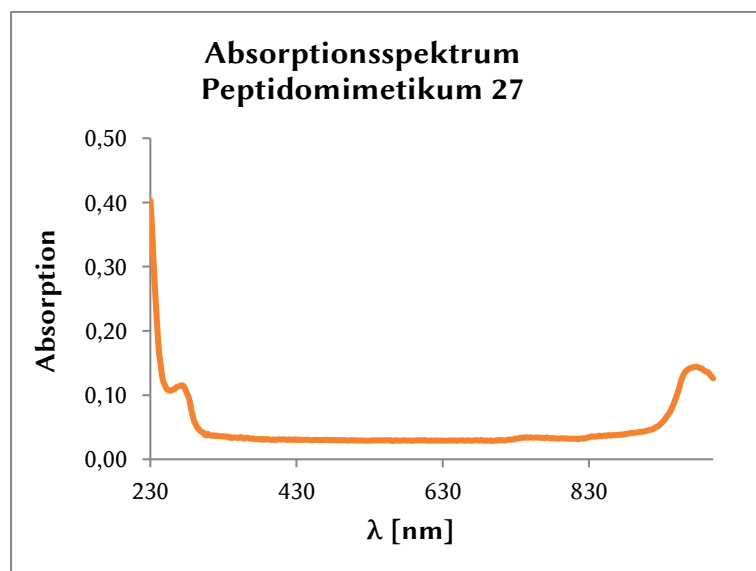


Abbildung A. 8: Absorptionsspektrum des Peptidomimetikums 27. Verwendet für die Beladungsbestimmung der Peptidomimetika-tragenden Konjugate.

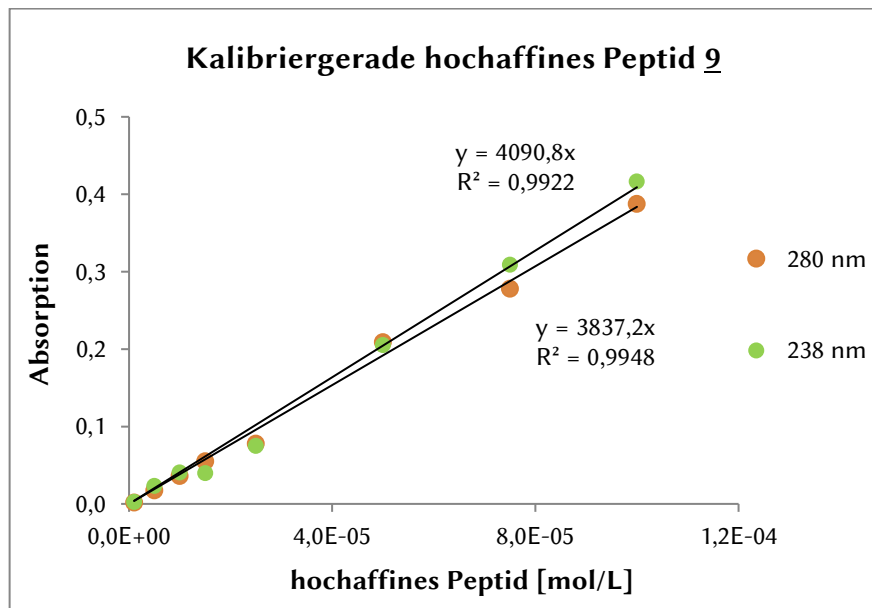


Abbildung A. 9: Kalibriergerade des hochaffinen Peptids 9 zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten bei 238 nm und 280 nm.

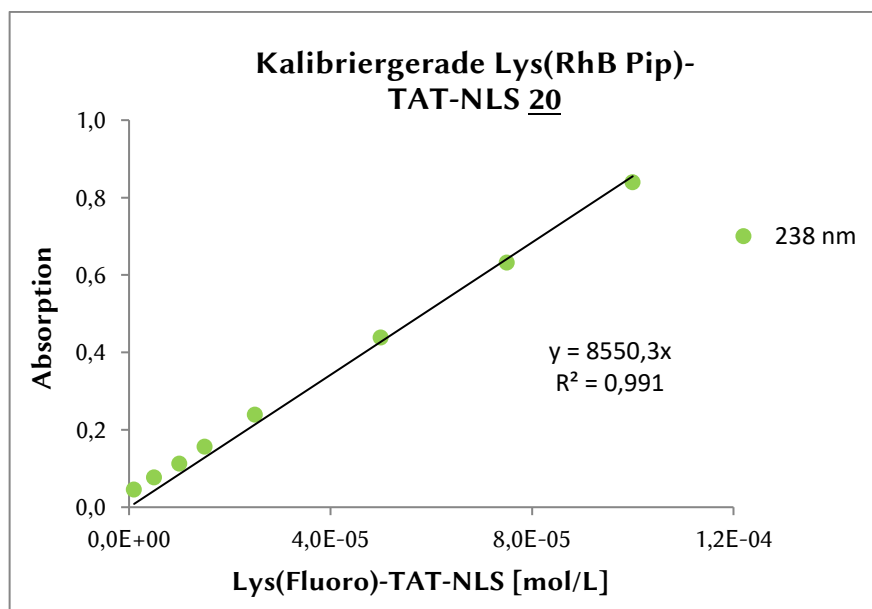


Abbildung A. 10: Kalibriergerade des zellpenetrierenden Peptids Lys(RhB Pip)-TAT-NLS 20 zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten bei 238 nm.

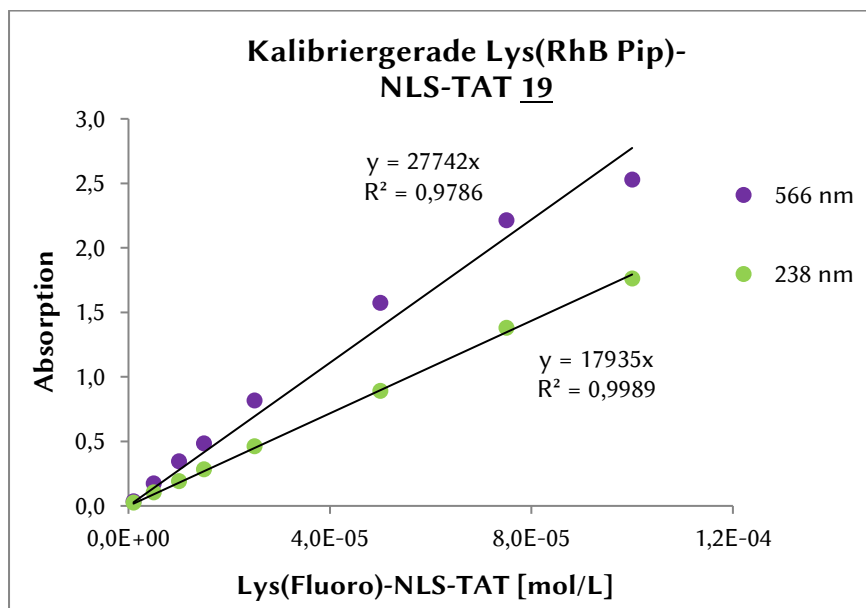


Abbildung A. 11: Kalibriergerade des zellpenetrierenden Peptids Lys(RhB Pip)-NLS-TAT 19 zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten bei 238 nm und 566 nm.

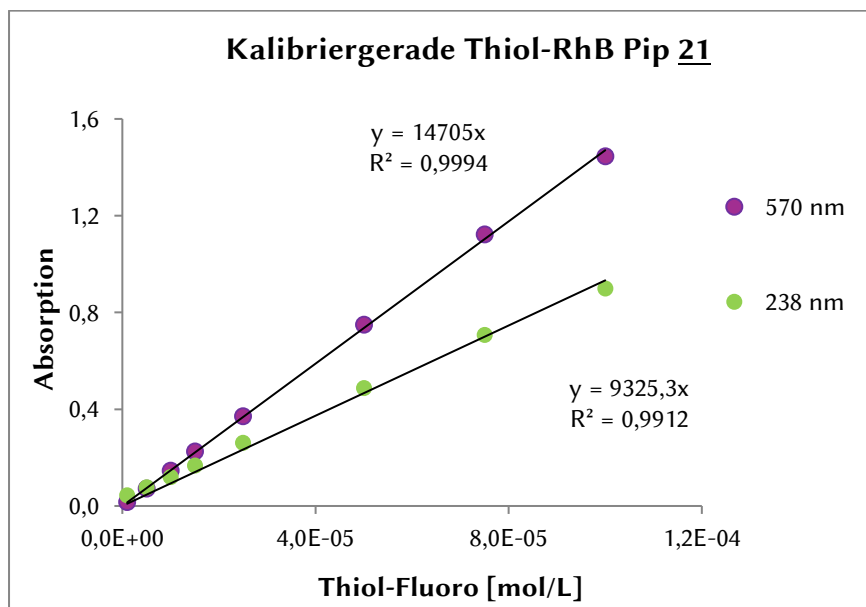


Abbildung A. 12: Kalibriergerade des Fluorophors Thiol-RhB Pip 21 zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten bei 238 nm und 570 nm.

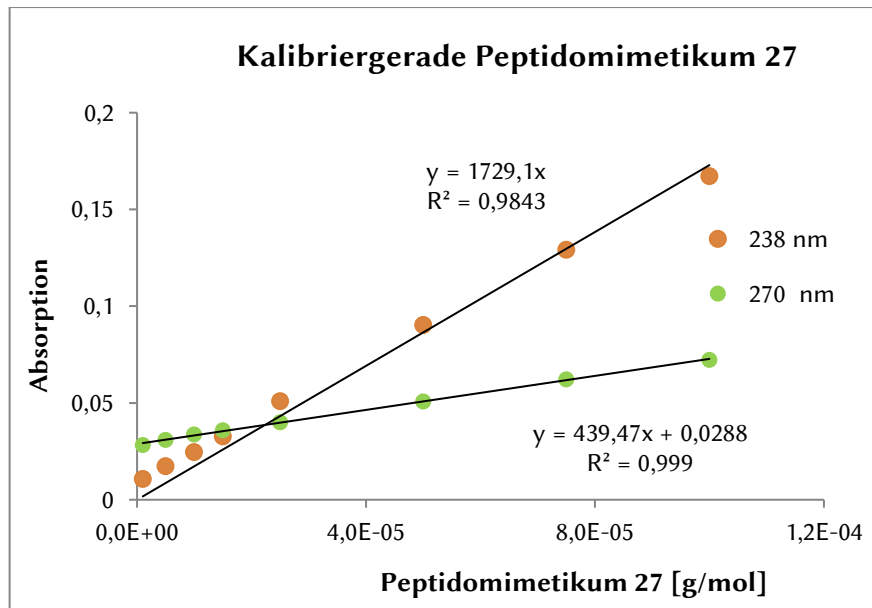


Abbildung A. 13: Kalibriergerade des Peptidomimetikums 27 zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten bei 238 nm und 270 nm.

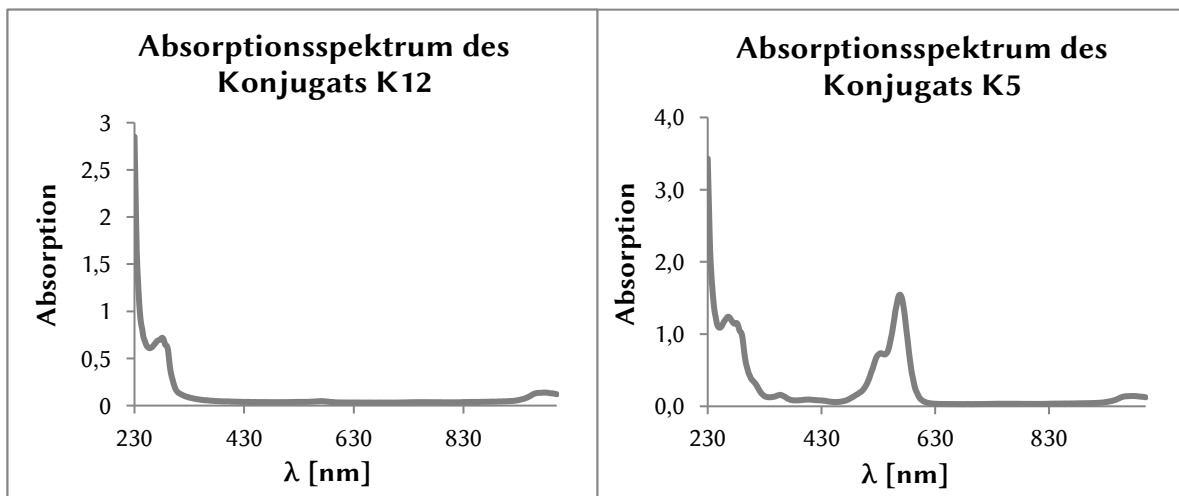


Abbildung A. 14: Absorptionsspektren der Konjugate K12 und K5.

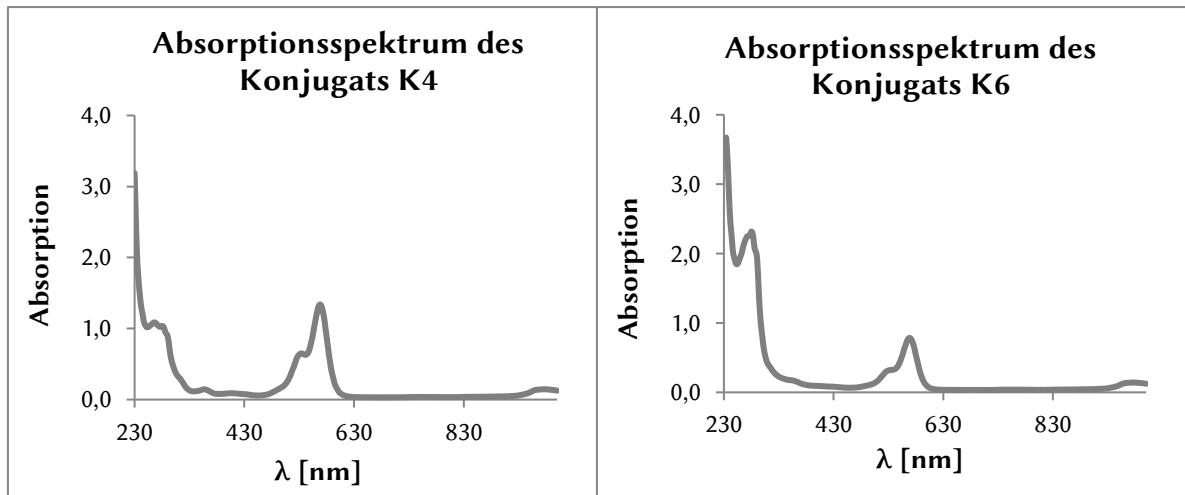


Abbildung A. 15: Absorptionsspektren der Konjugate **K4** und **K6**.

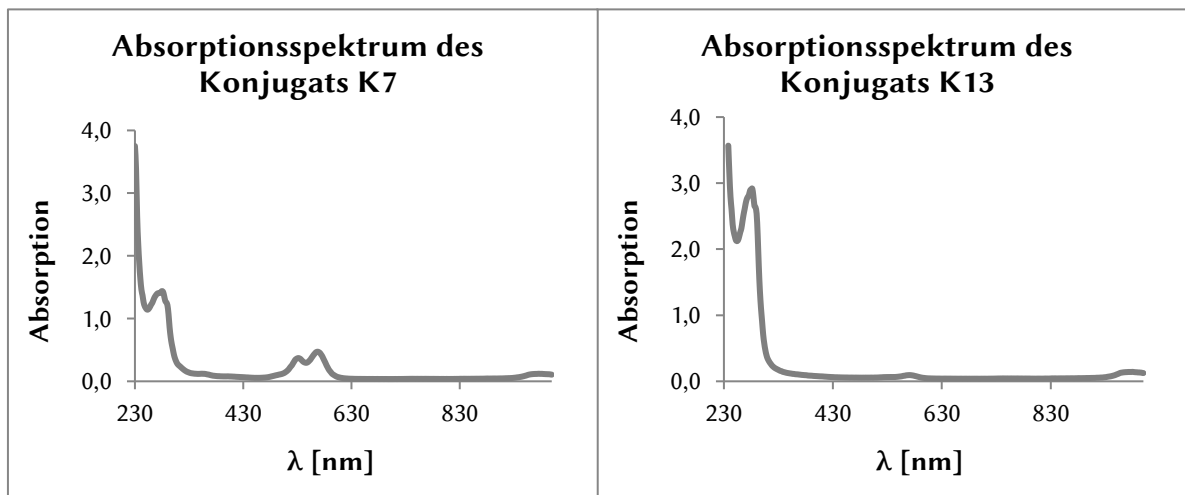


Abbildung A. 16: Absorptionsspektren der Konjugate **K7** und **K13**.

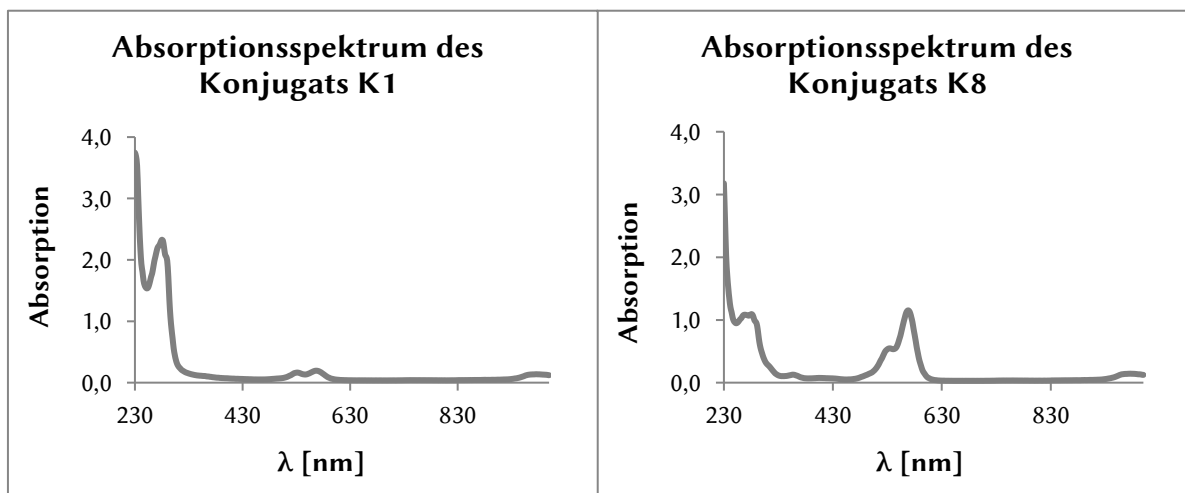


Abbildung A. 17: Absorptionsspektren der Konjugate **K1** und **K8**.

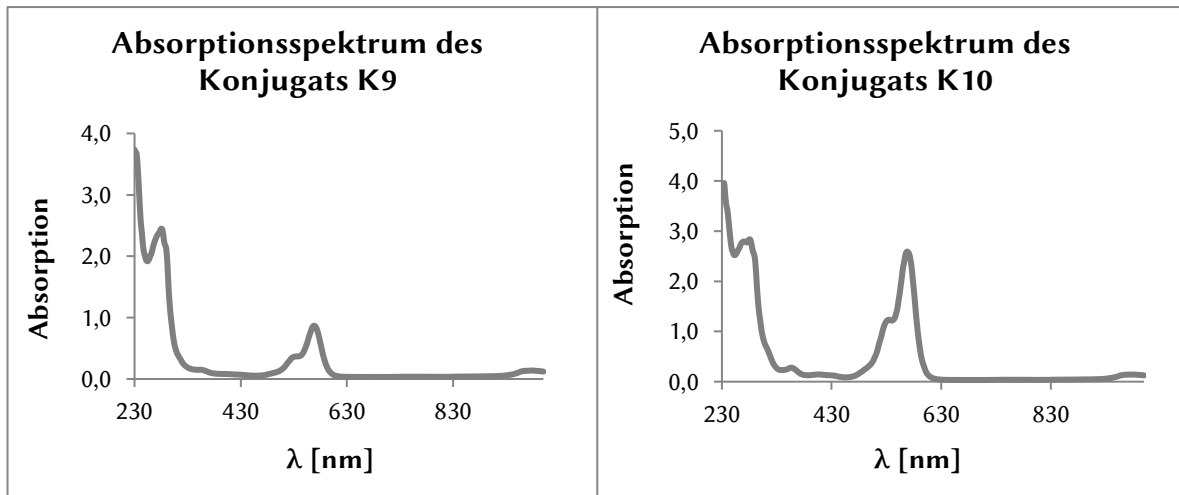


Abbildung A. 18: Absorptionsspektren der Konjugate **K9** und **K10**.

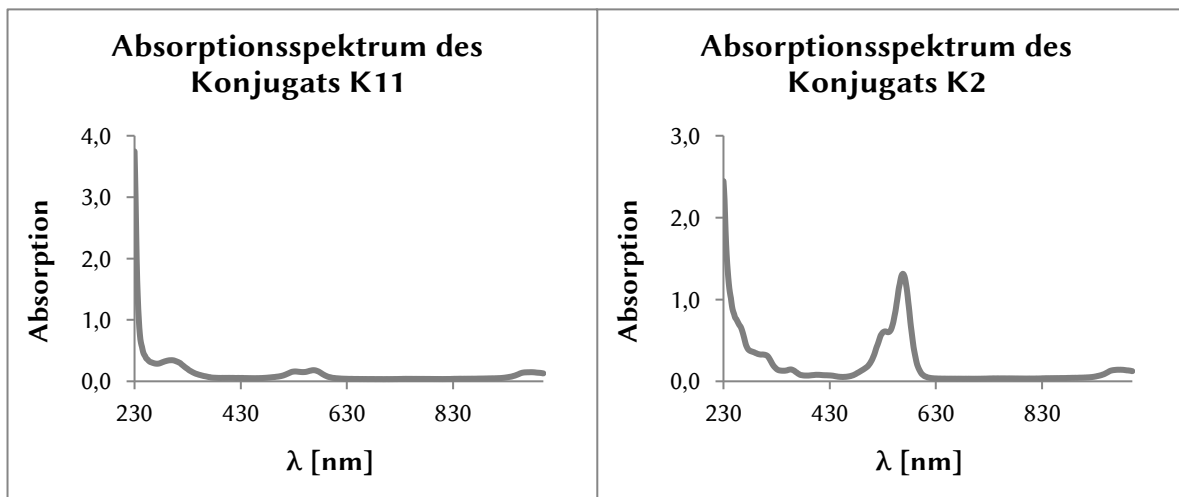


Abbildung A. 19: Absorptionsspektren der Konjugate **K11** und **K2**.

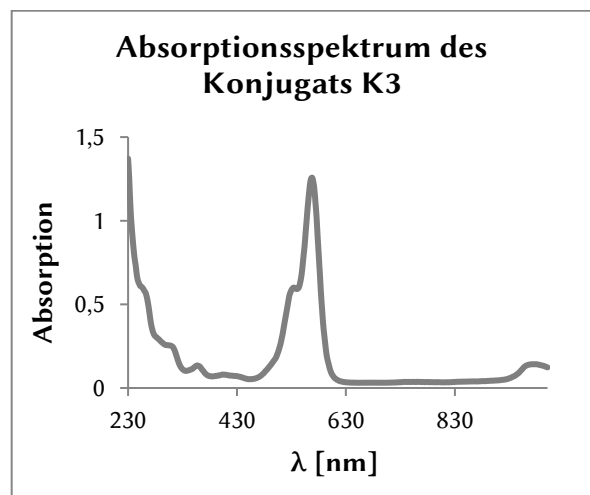


Abbildung A. 20: Absorptionsspektrum des Konjugats **K3**.

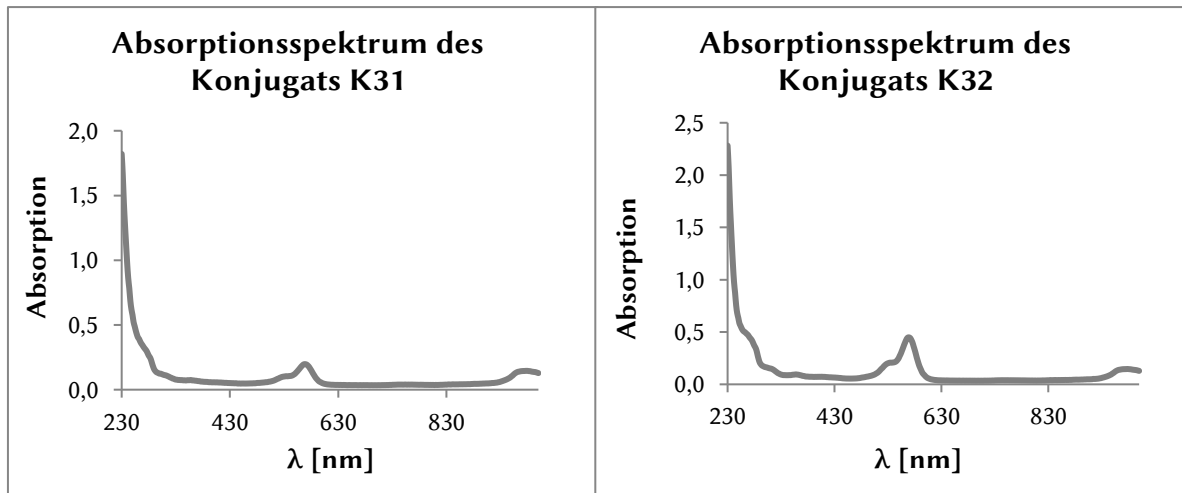


Abbildung A. 21: Absorptionsspektren der Konjugate **K31** und **K32**.

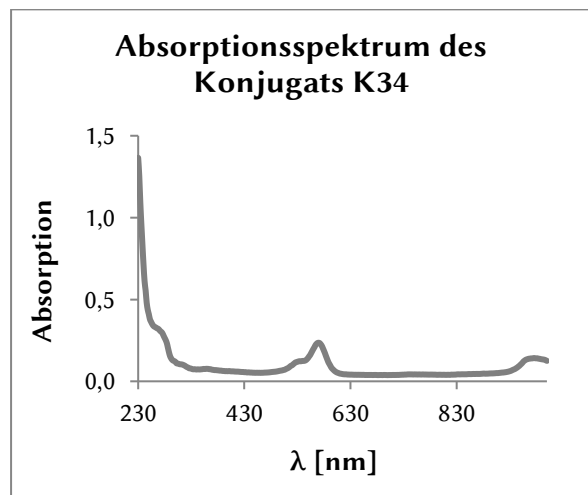


Abbildung A. 22: Absorptionsspektrum des Konjugats **K34**.

10.2. ITC-Daten

Table A. 1: Auflistung der im ITC erhaltenen Bindungsaffinitäten und thermodynamischen Zustandsgrößen aller vermessenen Konjugate und Peptide (jeweils Mittelwerte der Duplikate bzw. Triplikate). Die Konjugate wurden nach aufsteigender Beladung mit mono- und hochaffinem Peptid geordnet. Verbindungen, die mit einem Stern * gekennzeichnet sind, wurden auf einem ITC200 Gerät der Firma Malvern vermessen. Alle anderen Verbindungen wurden mit einem PEAQ-ITC (Malvern) vermessen.

<u>KONJUGAT</u>	<u>FUNKTIONS- PEPTID</u>	<u>ZELLPENETRIE- RENDES PEPTID</u>	<u>K_D [μM]</u>	<u>N</u>	<u>ΔH [kJ/mol]</u>	<u>$-T\Delta S$ [kJ/mol]</u>	<u>ΔG [kJ/mol]</u>
Affines Peptid 8 (W)*	WPPPPRVPR		72,1 \pm 2,1	1,23 \pm 0,11	-55,5 \pm 0,4	31,9 \pm 0,5	-23,7 \pm 0,1
K14 *	3,9 W		11,9 \pm 2,0	0,40 \pm 0,01	-157,5 \pm 7,5	129,5 \pm 7,5	-28,2 \pm 0,5
K15 *	4,6 W		4,82 \pm 0,19	0,33 \pm 0,01	-281,5 \pm 3,5	251,5 \pm 3,5	-30,4 \pm 0,1
K16 *	10 W		1,40 \pm 0,28	0,19 \pm 0,003	-396,5 \pm 13,5	363,5 \pm 13,5	-33,5 \pm 0,5
Hochaffines Peptid 9 (W ₂)*	WPPPPRVPR- WPPPPRVPR		6,80 \pm 0,43	0,79 \pm 0,01	-76,0 \pm 0,9	-46,5 \pm 0,4	-29,5 \pm 0,3
K12	2,3 W ₂	0,2 Thiol-RhB Pip	6,61 \pm 0,36	0,87 \pm 0,03	-71,5 \pm 4,3	41,9 \pm 4,3	-29,6 \pm 0,1
K17	4,0 W ₂		2,12 \pm 0,07	0,37 \pm 0,03	-128,5 \pm 2,5	96,3 \pm 2,8	-32,4 \pm 0,1
K4	4,5 W ₂	1,9 NLS-TAT	1,29 \pm 0,05	0,34 \pm 0,001	-209,0 \pm 1,0	175,5 \pm 1,5	-33,7 \pm 0,5
K5	4,8 W ₂	1,5 TAT-NLS	1,78 \pm 0,13	0,27 \pm 0,02	-202,0 \pm 17,0	169,0 \pm 17,0	-32,9 \pm 0,2
K6	5,2 W ₂	0,03 NLS-TAT	2,97 \pm 0,18	0,66 \pm 0,03	-83,0 \pm 1,1	51,4 \pm 0,9	-31,6 \pm 0,2

<u>KONJUGAT</u>	<u>FUNKTIONS- PEPTID</u>	<u>ZELLPENETRIE- RENDES PEPTID</u>	<u>K_D [μM]</u>	<u>N</u>	<u>ΔH [kJ/mol]</u>	<u>$-\Delta S$ [kJ/mol]</u>	<u>ΔG [kJ/mol]</u>
<u>K7</u>	5,2 W ₂	0,31 TAT-NLS	1,39 ± 0,03	0,31 ± 0,02	-194,0 ± 9,0	160,5 ± 9,5	-33,5 ± 0,1
<u>K13</u>	5,9 W ₂	0,4 Thiol-RhB Pip	1,41 ± 0,01	0,33 ± 0,002	-197,0 ± 9,0	163,0 ± 9,5	-33,5 ± 0,1
<u>K1</u>	6,1 W ₂	0,44 TAT-NLS	0,88 ± 0,08	0,27 ± 0,004	-253,5 ± 0,5	218,5 ± 0,5	-34,6 ± 0,2
<u>K8</u>	6,3 W ₂	2,2 NLS-TAT	1,22 ± 0,05	0,23 ± 0,01	-258,5 ± 9,5	225,0 ± 10,0	-33,8 ± 0,1
<u>K9</u>	7,2 W ₂	0,4 NLS-TAT	0,83 ± 0,05	0,23 ± 0,01	-280,0 ± 22,7	245,0 ± 22,7	-34,8 ± 0,1
<u>K10</u>	9,9 W ₂	1,8 TAT-NLS	0,75 ± 0,09	0,19 ± 0,02	-359,0 ± 30,6	324,0 ± 30,6	-35,0 ± 0,3

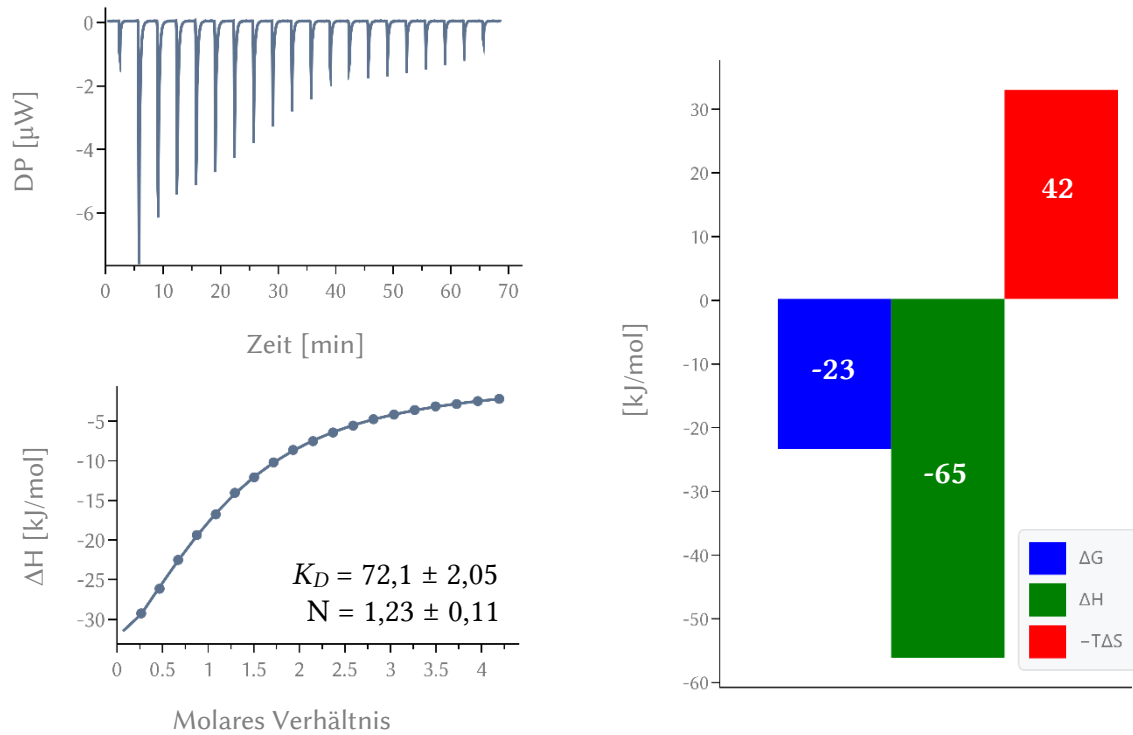


Abbildung A. 23: ITC-Spektren von W-Peptid **8** 2 mM (10% DMSO) in tWW 100 μM (10%DMSO).

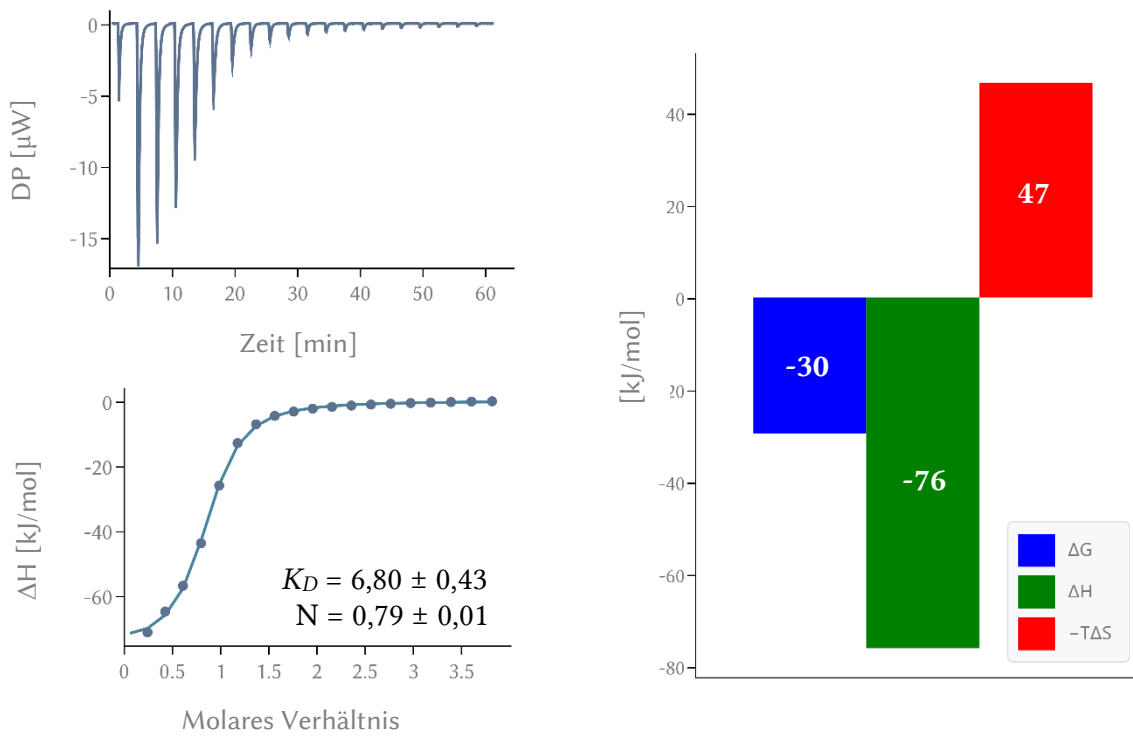


Abbildung A. 24: ITC-Spektren von W₂-Peptid **9** 2,7 mM (10% DMSO) in tWW 150 μM (10% DMSO).

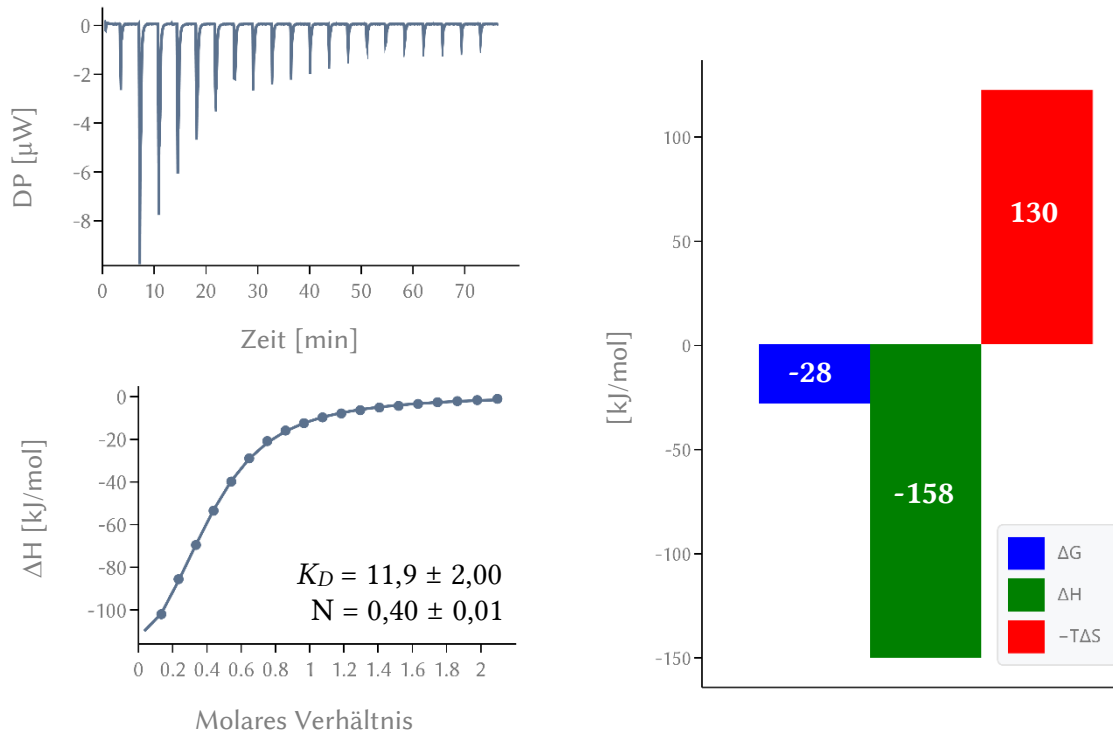


Abbildung A. 25: ITC-Spektren von **K14** 750 μM (10% DMSO) in tWW 75 μM (10% DMSO).

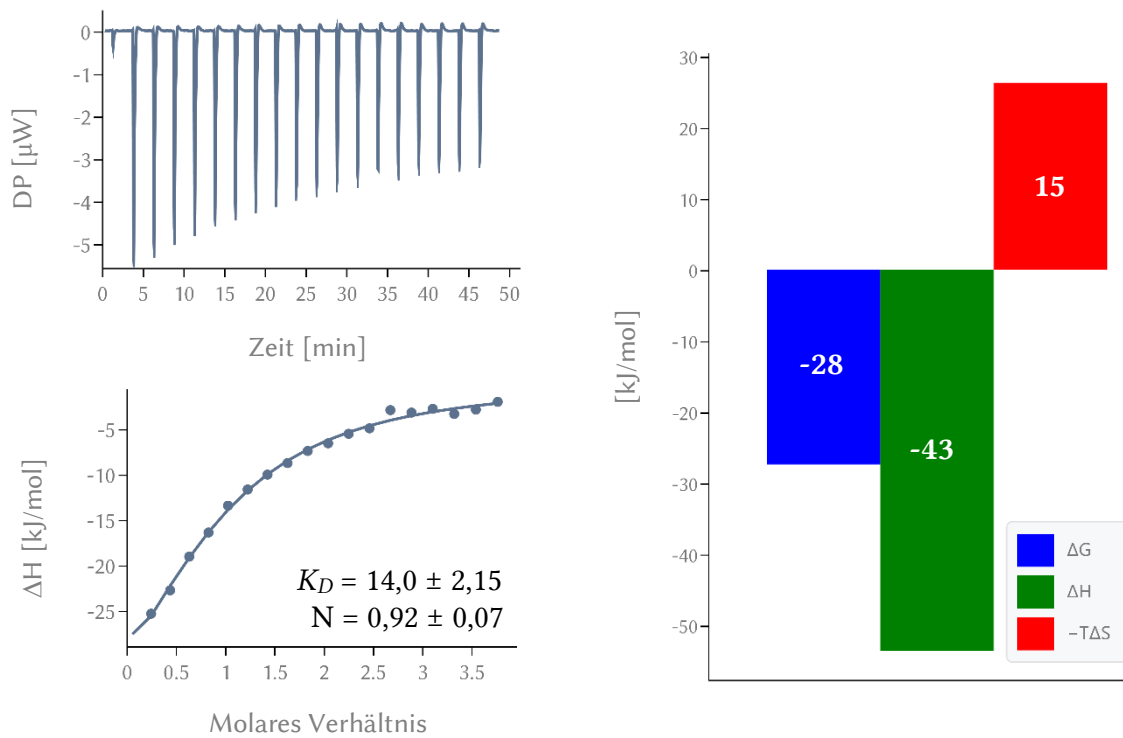


Abbildung A. 26: ITC-Spektren von **CF352** 400 μM (10% DMSO) in tWW 20,6 μM (10% DMSO).

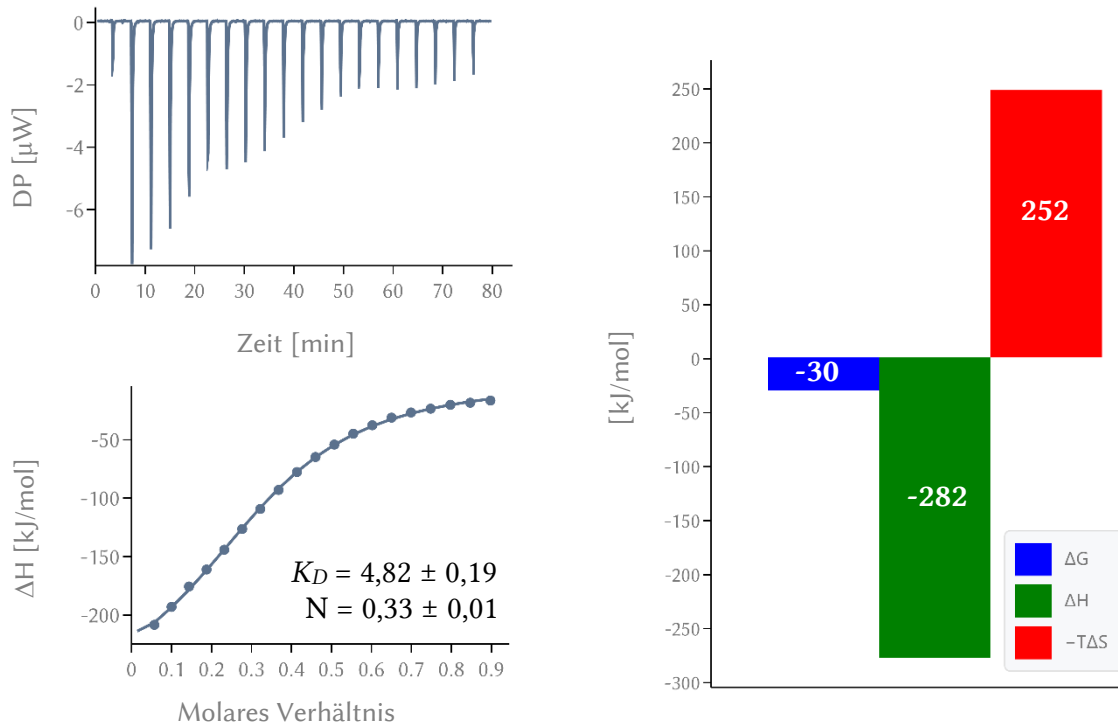


Abbildung A. 27: ITC-Spektren von **K15** $214 \mu\text{M}$ (10% DMSO) in $t\text{WW}$ $50 \mu\text{M}$ (10% DMSO).

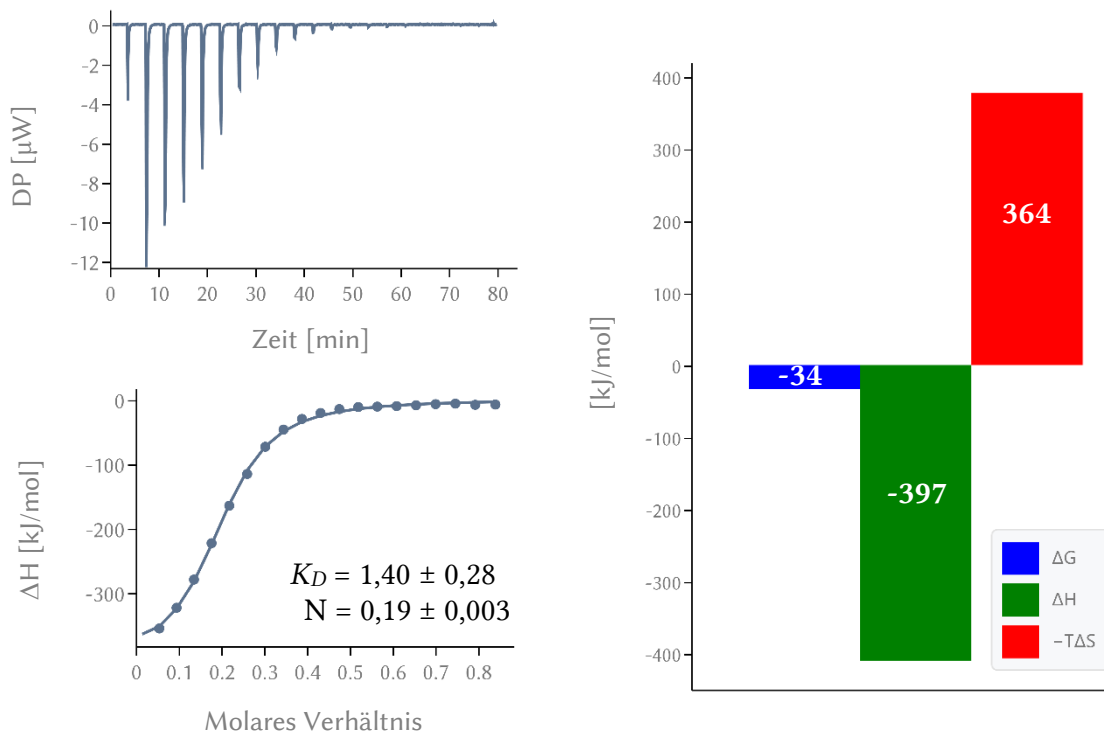


Abbildung A. 28: ITC-Spektren von **K16** $300 \mu\text{M}$ (10% DMSO) in $t\text{WW}$ $75 \mu\text{M}$ (10% DMSO).

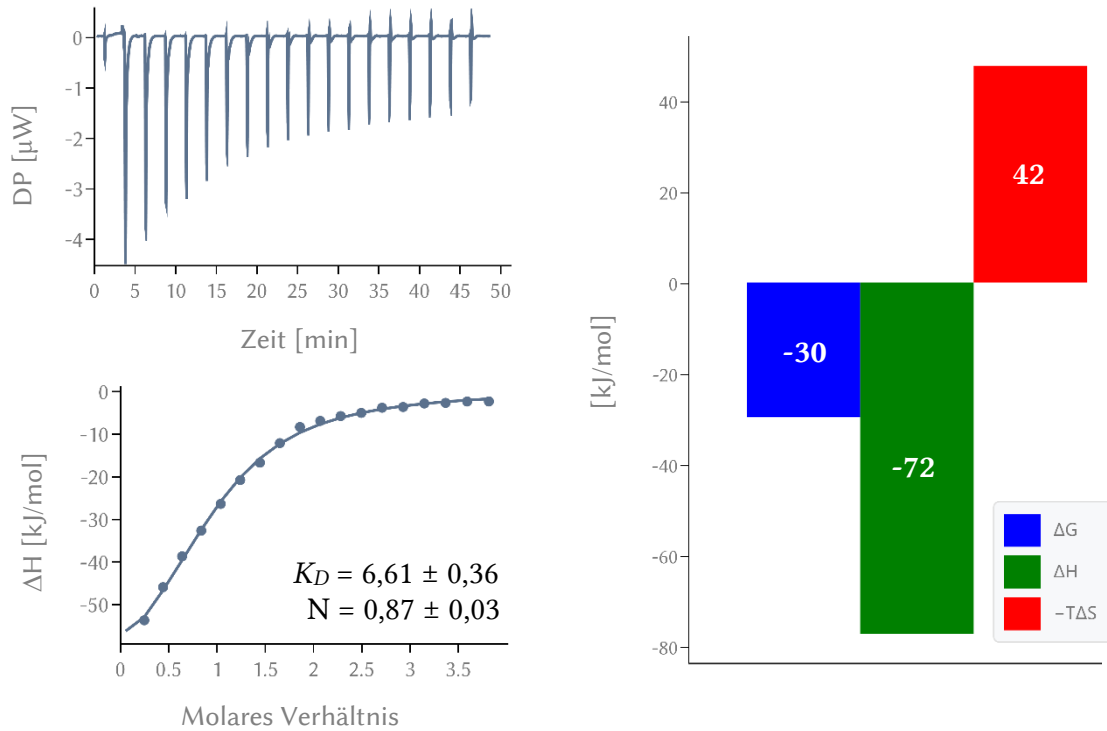


Abbildung A. 29: ITC-Spektren von **K12** $400 \mu\text{M}$ (10% DMSO) in $t\text{WW}$ $20,3 \mu\text{M}$ (10% DMSO).

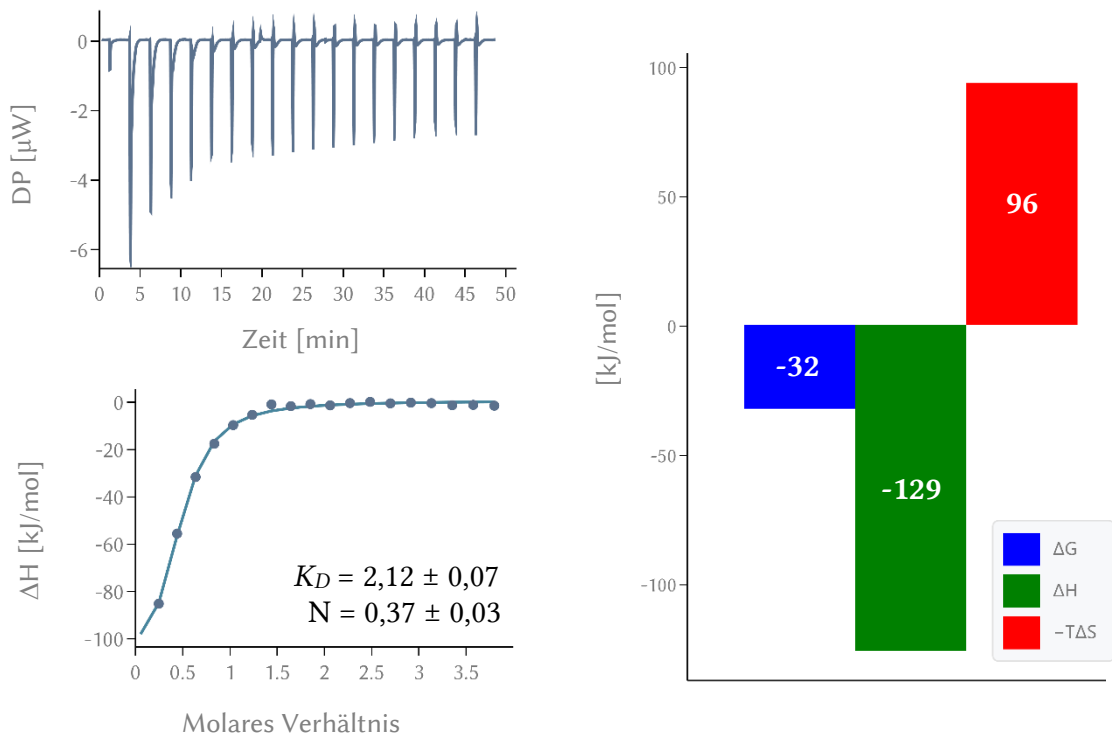


Abbildung A. 30: ITC-Spektren von **K17** $400 \mu\text{M}$ (10% DMSO) in $t\text{WW}$ $20,4 \mu\text{M}$ (10% DMSO).

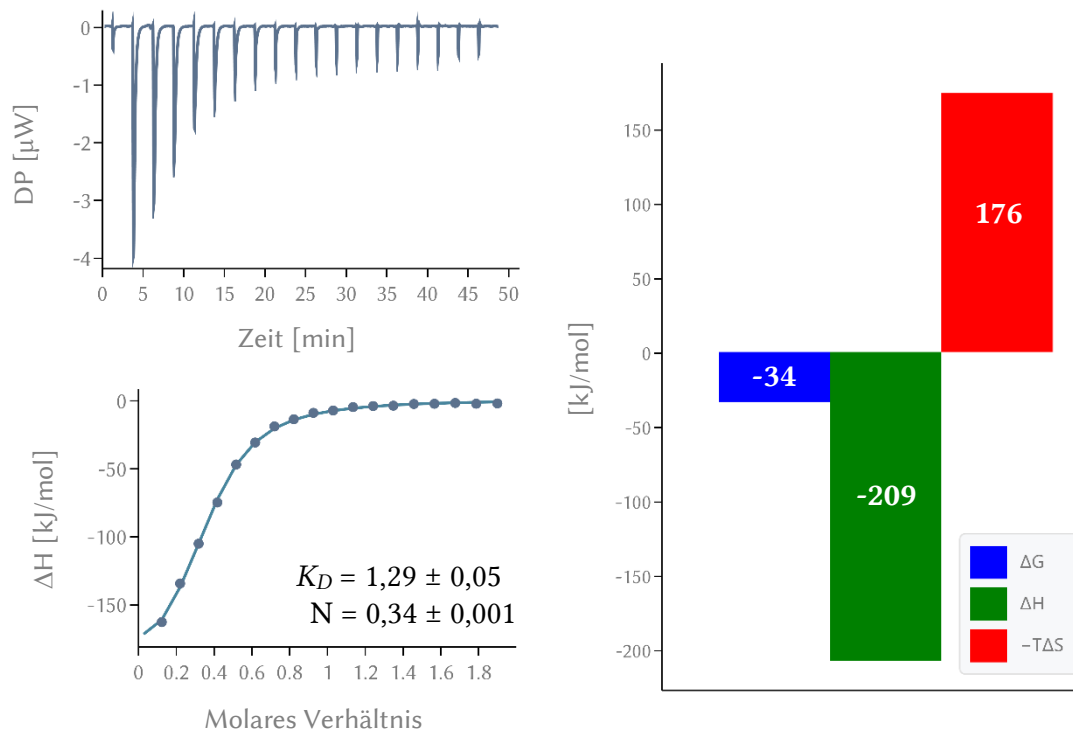


Abbildung A. 31: ITC-Spektren von **K4** 200 μM (10% DMSO) in *t*WW 20,3 μM (10% DMSO).

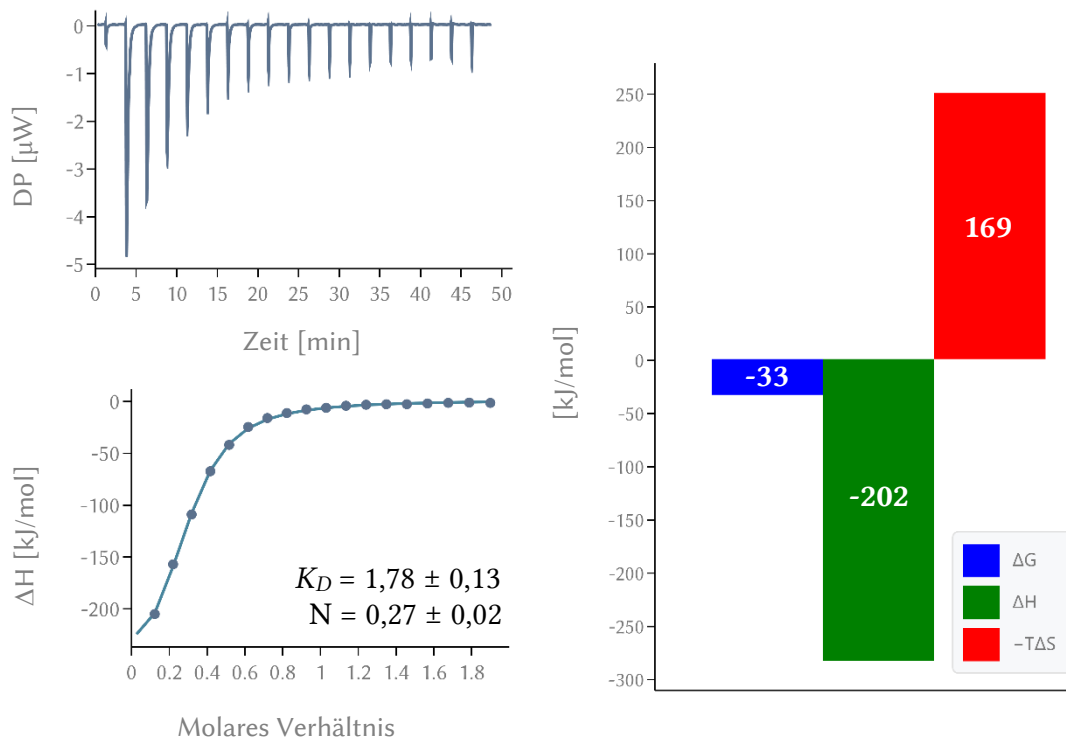


Abbildung A. 32: ITC-Spektren von **K5** 200 μM (10% DMSO) in *t*WW 20,4 μM (10% DMSO).

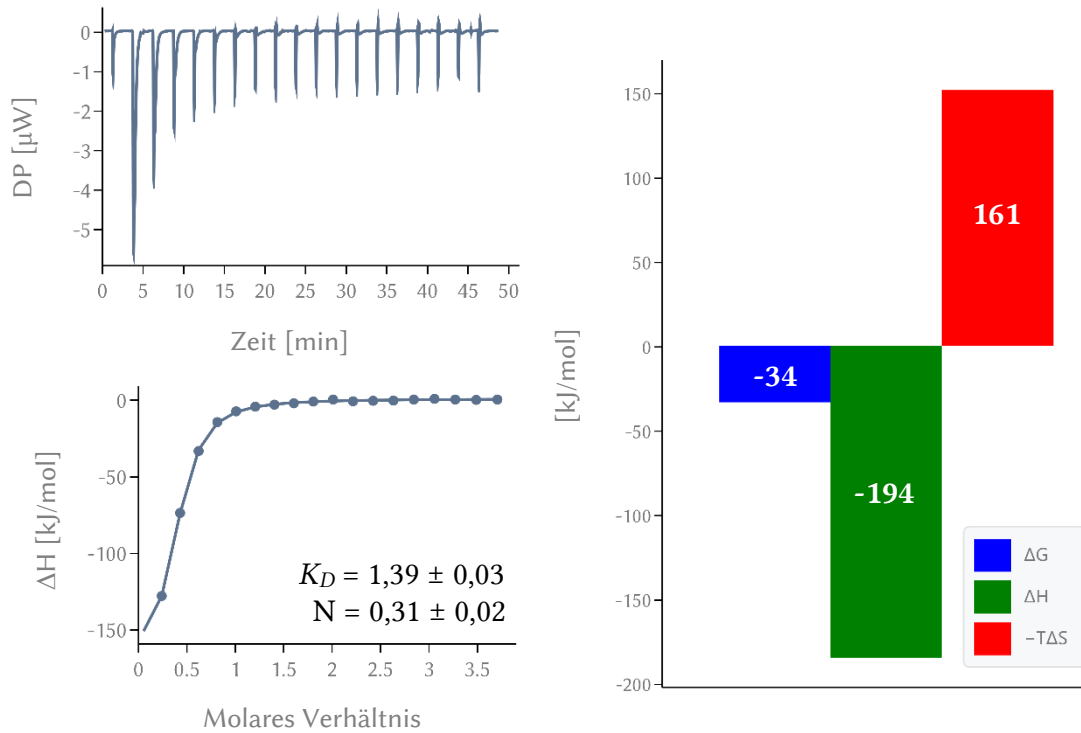


Abbildung A. 33: ITC-Spektren von **K7** $400 \mu\text{M}$ (10% DMSO) in $t\text{WW}$ $20,9 \mu\text{M}$ (10% DMSO).

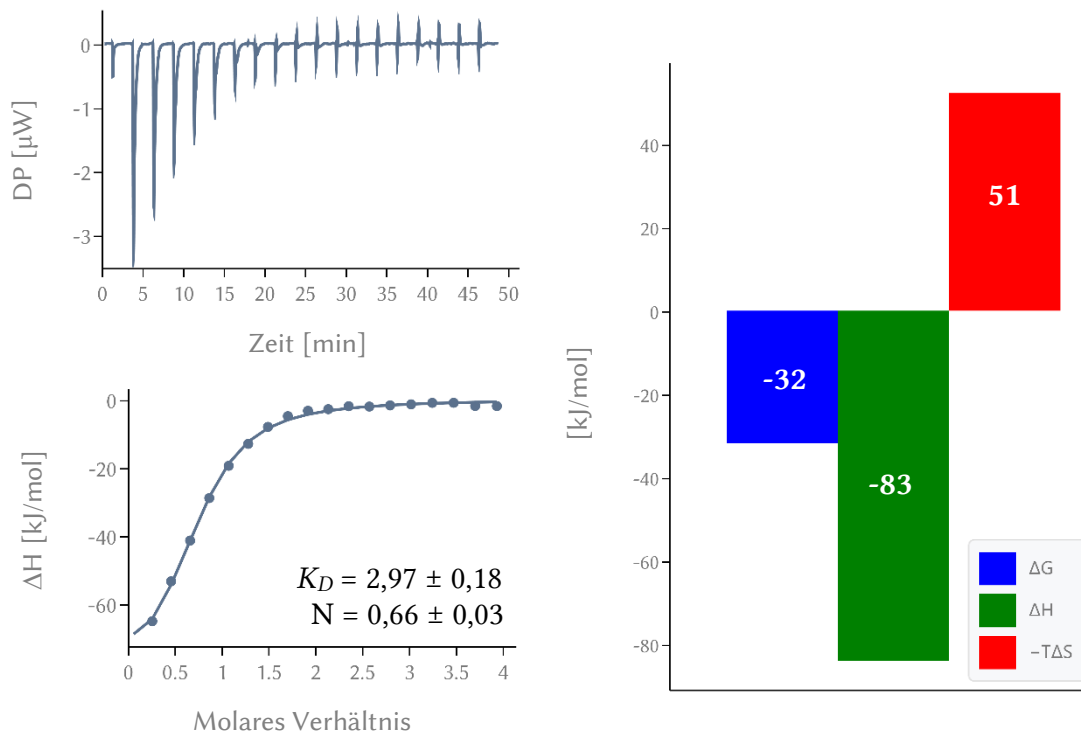


Abbildung A. 34: ITC-Spektren von **K6** $400 \mu\text{M}$ (10% DMSO) in $t\text{WW}$ $20,0 \mu\text{M}$ (10% DMSO).

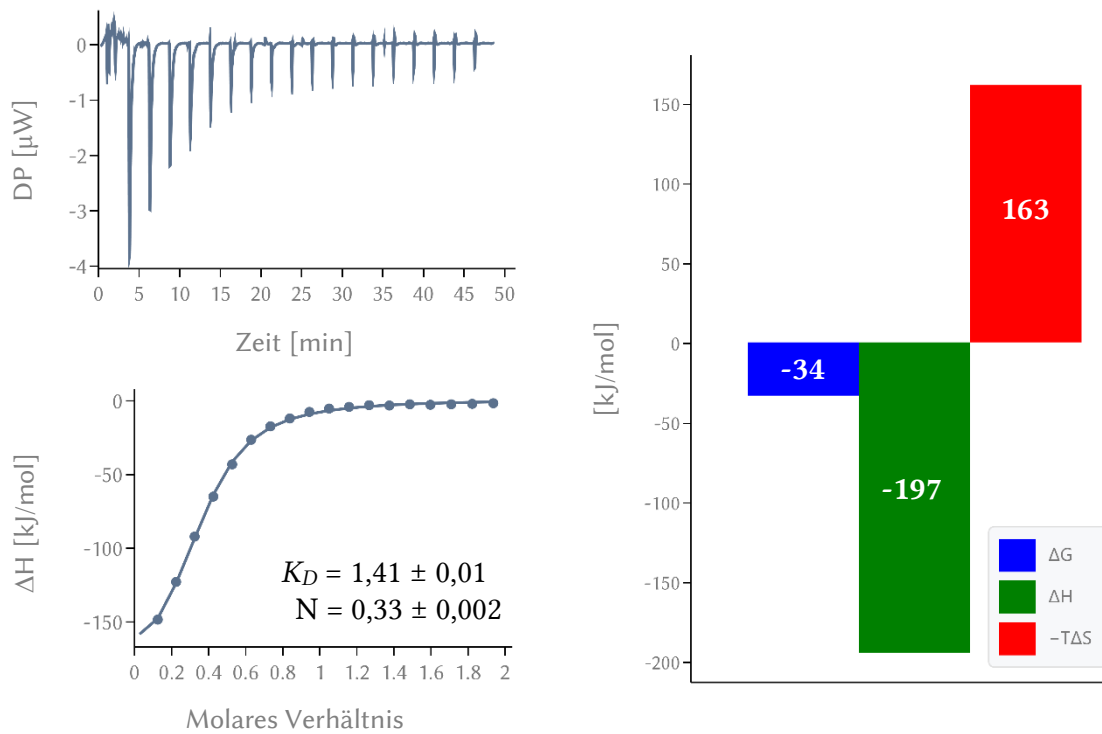


Abbildung A. 35: ITC-Spektren von **K13** 200 μM (10% DMSO) in *t*WW 20,0 μM (10% DMSO).

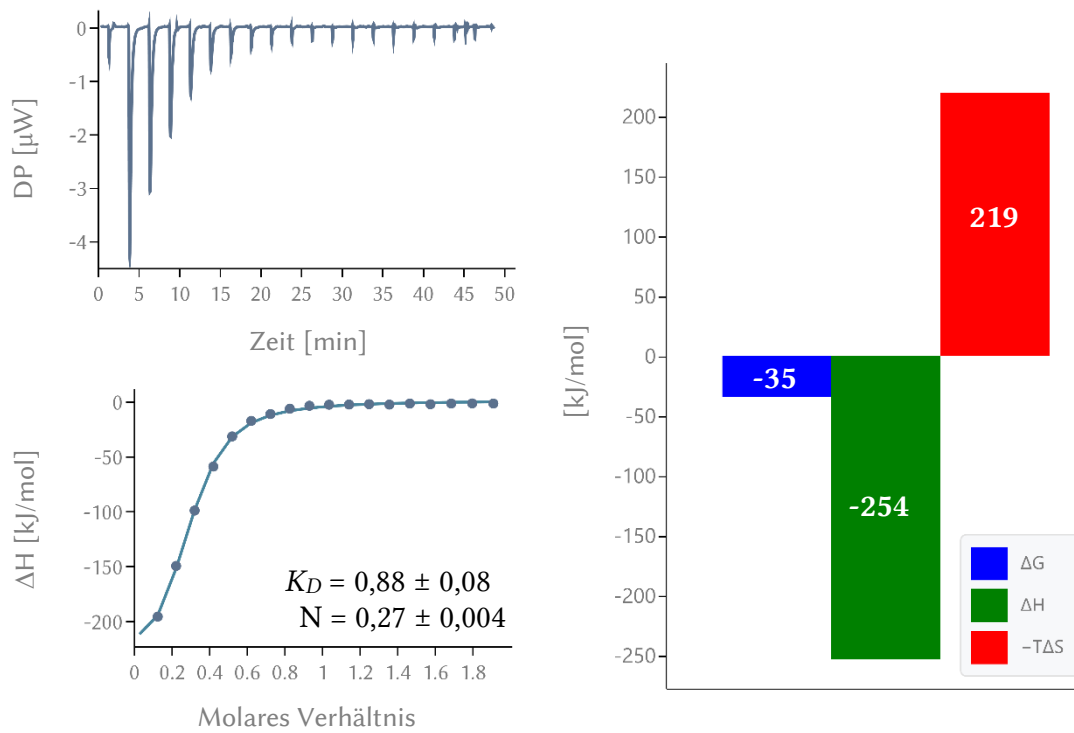


Abbildung A. 36: ITC-Spektren von **K1** 200 μM (10% DMSO) in *t*WW 20,3 μM (10% DMSO).

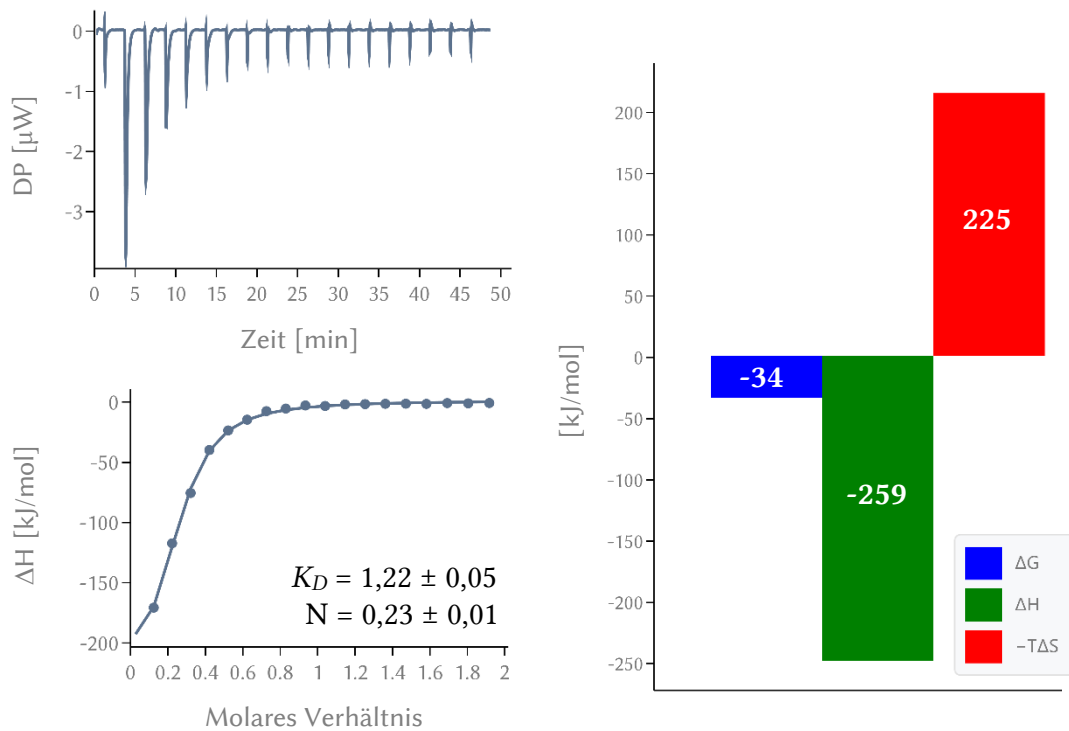


Abbildung A. 37: ITC-Spektren von **K8** 200 μM (10% DMSO) in *t*WW 20,2 μM (10% DMSO).

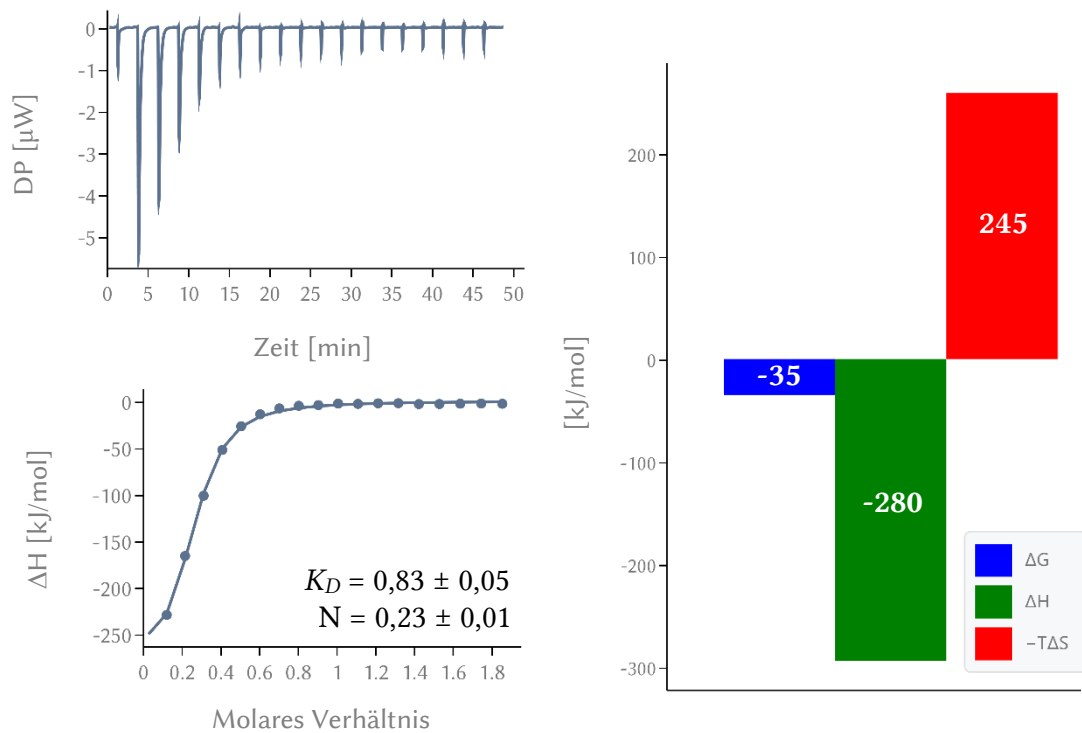


Abbildung A. 38: ITC-Spektren von **K9** 200 μM (10% DMSO) in *t*WW 20,9 μM (10% DMSO).

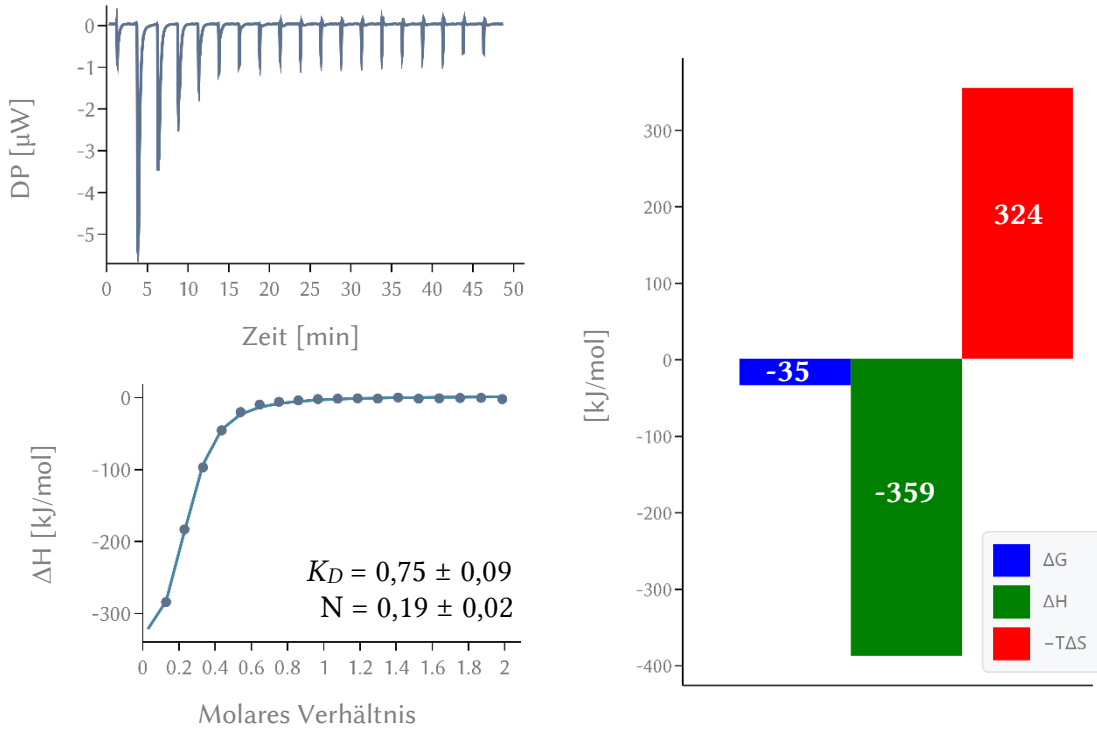


Abbildung A. 39: ITC-Spektren von **K10** 200 µM (10% DMSO) in *t*WW 19,5 µM (10% DMSO).

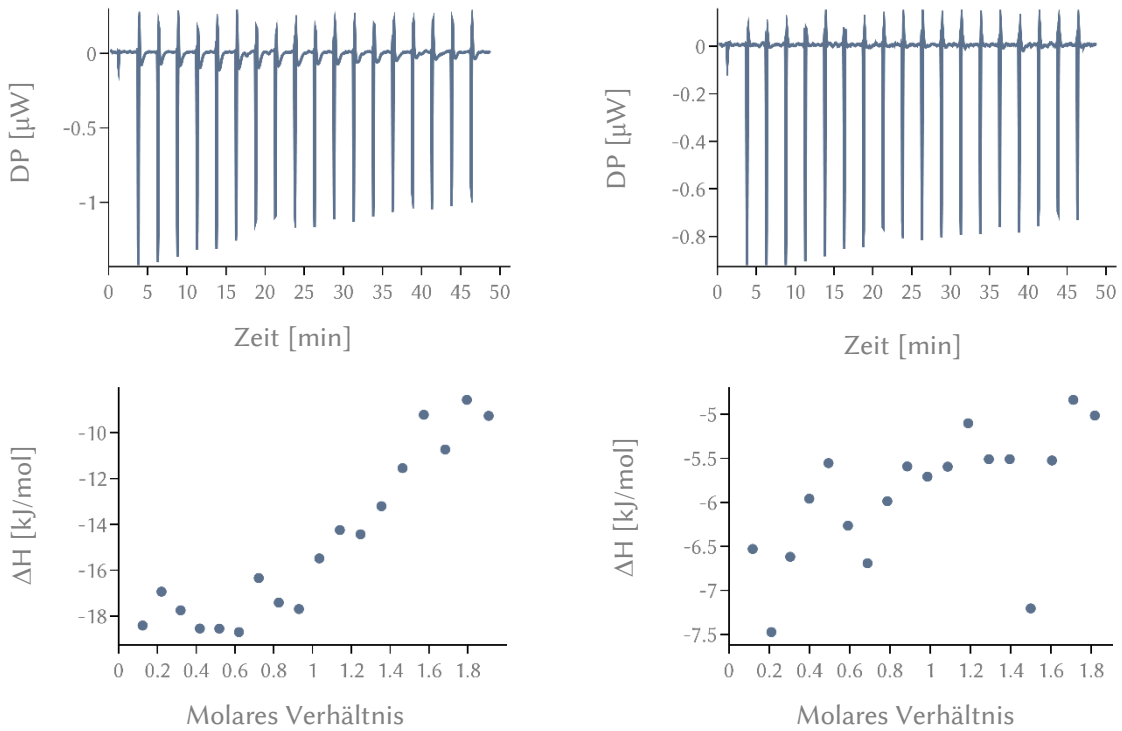


Abbildung A. 40: ITC-Spektren von **K2** 200 µM (10% DMSO) in *t*WW 20,3 µM (10% DMSO) (links) und **K3** 200 µM (10% DMSO) in *t*WW 21,3 µM (10% DMSO) (rechts).

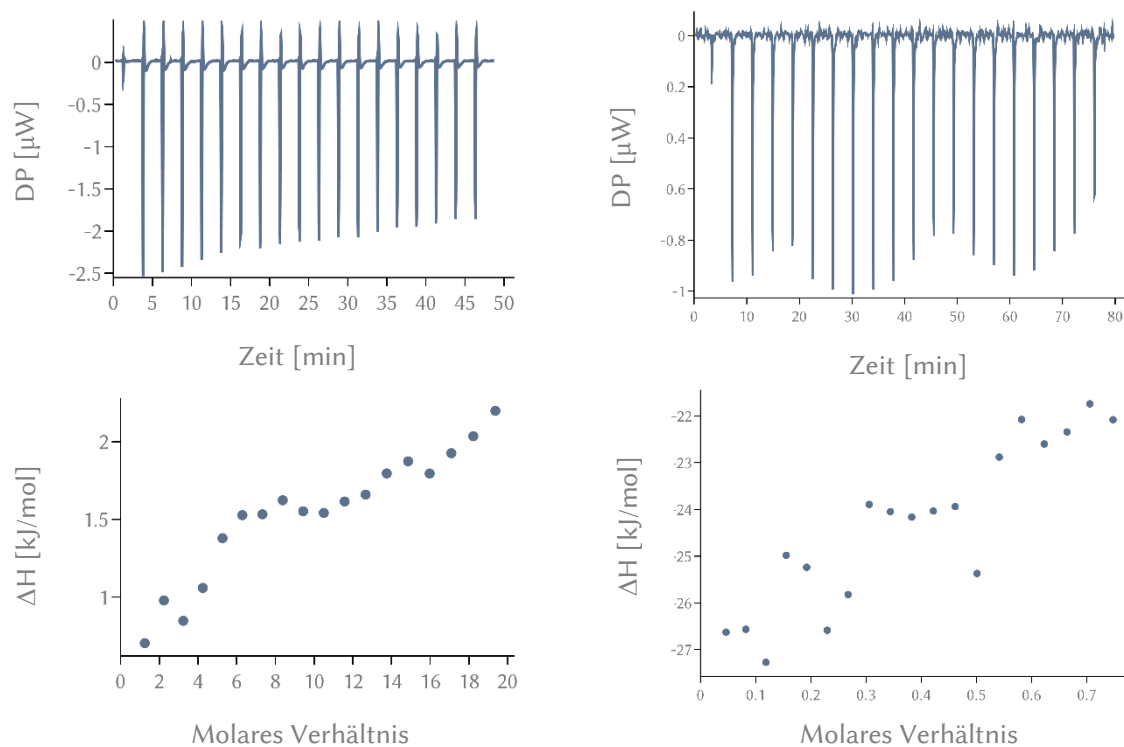


Abbildung A. 41: ITC-Spektren von IVS-Negativ 22 1 mM (10% DMSO) in *t*WW 10,0 µM (10% DMSO) (links) und K25 179 µM in *t*WW 50 µM (rechts).

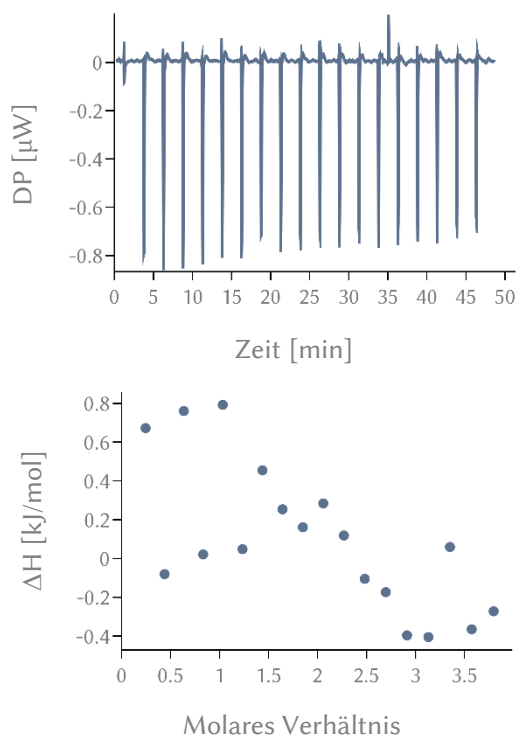


Abbildung A. 42: ITC-Spektren von MID1 400 µM (10% DMSO) in *t*WW 20,4 µM (10% DMSO).

10.3. Resazurin-Assay: Negativkontrolle

Um eine Reduktion des Resazurins durch die zu untersuchenden Substanzen auszuschließen, wurden diese vor Beginn des Assays auf ihr reduktives Potential gegenüber Resazurin untersucht. Hierzu wurden die zu untersuchenden Substanzen (100 μM) für 48 h mit der Resazurinlösung inkubiert. Die Absorption der Lösungen wurde sofort, nach 1 h und nach 48 h gemessen und in **Abbildung A. 43** vergleichend aufgetragen. Unter Einbeziehen der Fehlergrenzen bleibt die Absorption bei allen Werten konstant. Einzige Ausnahme bildeten hier das Konjugat **K4** (Abweichung $26 \pm 9 \%$) und das reaktive Maleinimidextran **MID1** (Abweichung $45 \pm 5 \%$), die die Absorption bei 570 nm senken. Somit wird das Resazurin durch die beiden Substanzen bereits in Abwesenheit der Zellen teils zu sehen. Der Einfluss der Substanzen auf das Resazurin war hierbei rasch zu sehen, da bereits nach einer Stunde ein Unterschied zu erkennen war. Im weiteren zeitlichen Verlauf änderte sich dieser nur noch marginal.

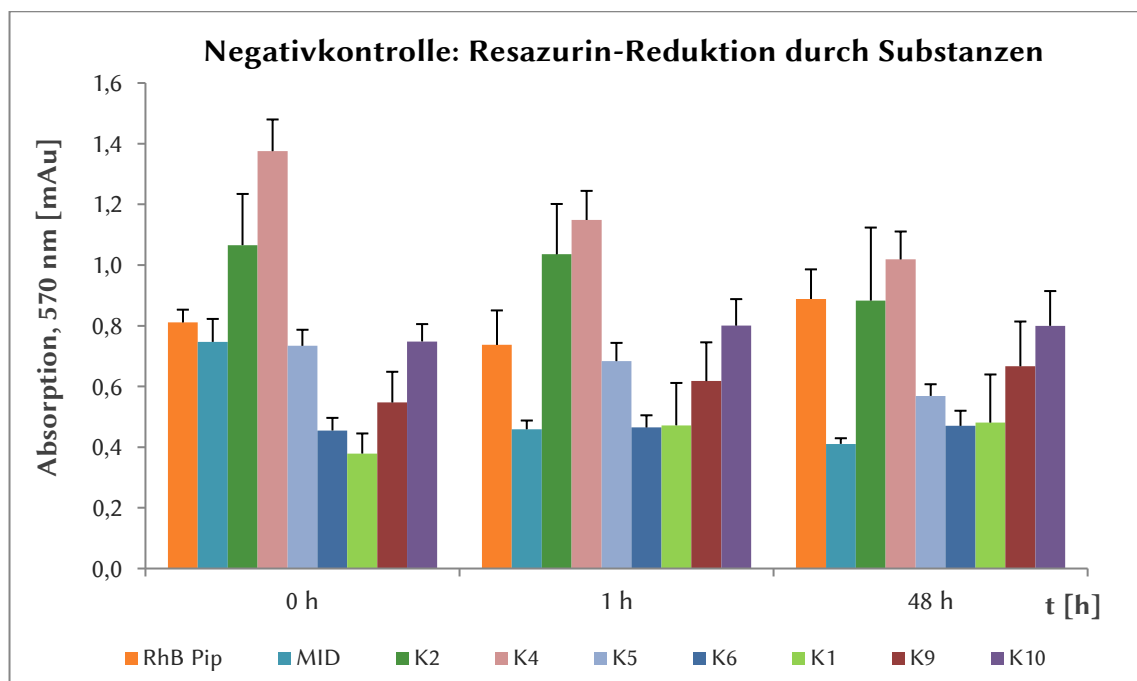


Abbildung A. 43: Negativkontrolle des Resazurin-Assays. Die verwendeten Substanzen wurden auf ihr reduktives Potential gegenüber Resazurin getestet. Die Substanzen wurden mit Resazurin (Verhältnis 10:1) für 48 h inkubiert. Die Absorption wurde sofort, nach 1 h und nach 48 h bestimmt. Es konnte gesehen werden, dass nur das reaktive Maleinimidextran und das Konjugat **K4** einen signifikanten Einfluss auf das Resazurin haben.

10.4. Zellviabilitäten

Tabelle A. 2: Zellviabilitäten der potentiell zellpenetrierenden Konjugate. Bestimmung erfolgte mittels Resazurin-Assay an HEK293-Zellen und ATP/Luciferase-Assay an HeLa-Zellen (Duplikate von Triplikaten). Proben, die mit einem Stern * versehen sind, tragen das zellpenetrierende Peptid Lys(RhB Pip)NLS-TAT 19. Proben ohne Stern tragen das zellpenetrierende Peptid Lys(RhB Pip)TAT-NLS 20.

<u>KONJUGAT</u>	<u>HOCHAFFINES PEP- TID</u>	<u>ZELLPENETRIERENDES PEPTID</u>	<u>KONZENTRATION [μM]</u>	<u>ZELLVIABILITÄT RESAZURIN [%]</u>	<u>ZELLVIABILITÄT ATP/LUCIFERASE [%]</u>
<u>K4</u>	4,5	1,90*	50	9,6 \pm 5,4	
			25	10,4 \pm 1,9	1,5 \pm 1,0
			10	29,6 \pm 3,4	
			5	82,4 \pm 0,8	12,3 \pm 6,5
			1		75,7 \pm 4,8
			0,5		87,0 \pm 8,2
<u>K5</u>	4,8	1,50	50	11,6 \pm 0,7	
			25	10,4 \pm 1,6	1,4 \pm 0,9
			10	29,2 \pm 1,7	
			5	82,0 \pm 0,8	9,6 \pm 3,3
			1		68,6 \pm 5,7
			0,5		70,6 \pm 15,1

<u>KONJUGAT</u>	<u>HOCHAFFINES PEP- TID</u>	<u>ZELLPENETRIERENDES PEPTID</u>	<u>KONZENTRATION [μM]</u>	<u>ZELLVIABILITÄT RESAZURIN [%]</u>	<u>ZELLVIABILITÄT ATP/LUCIFERASE [%]</u>
<u>K6</u>	5,2	0,03*	50	10,9 \pm 0,9	
			25	15,3 \pm 6,6	6,5 \pm 1,3
			10	88,6 \pm 5,8	
			5	60,9 \pm 3,3	46,2 \pm 6,4
			1		92,1 \pm 1,5
			0,5		104,5 \pm 7,8
<u>K1</u>	6,1	0,44	50	11,1 \pm 0,9	
			25	10,1 \pm 0,3	10,0 \pm 7,2
			10	24,9 \pm 12,8	
			5	55,2 \pm 3,1	48,8 \pm 0,7
			1		109,7 \pm 2,1
			0,5		108,3 \pm 1,7
<u>K9</u>	7,2	0,40*	50	8,6 \pm 2,8	
			25	9,0 \pm 0,2	3,0 \pm 1,7
			10	16,3 \pm 5,0	
			5	68,5 \pm 2,4	21,4 \pm 3,5
			1		88,2 \pm 12,6
			0,5		89,7 \pm 6,1

<u>KONJUGAT</u>	<u>HOCHAFFINES PEP- TID</u>	<u>ZELLPENETRIERENDES PEPTID</u>	<u>KONZENTRATION [μM]</u>	<u>ZELLVIABILITÄT RESAZURIN [%]</u>	<u>ZELLVIABILITÄT ATP/LUCIFERASE [%]</u>
<u>K10</u>	9,9	1,80	50	10,0 \pm 1,2	
			25	10,0 \pm 0,6	1,6 \pm 0,6
			10	11,0 \pm 0,6	
			5	28,5 \pm 8,6	11,7 \pm 2,5
			1		77,4 \pm 9,9
			0,5		74,6 \pm 17,7
<u>K2</u>		1,10*	50	33,4 \pm 0,5	
			25	30,7 \pm 0,9	43,5 \pm 6,4
			10	29,3 \pm 0,8	
			5	29,9 \pm 0,7	74,6 \pm 6,4
			1		102,1 \pm 6,0
			0,5		106,8 \pm 6,4
<u>K3</u>		1,00	50		
			25		24,4 \pm 6,1
			10		
			5		63,6 \pm 4,0
			1		92,9 \pm 0,6
			0,5		94,3 \pm 5,0

<u>KONJUGAT</u>	<u>HOCHAFFINES PEP- TID</u>	<u>ZELLPENETRIERENDES PEPTID</u>	<u>KONZENTRATION [μM]</u>	<u>ZELLVIABILITÄT RESAZURIN [%]</u>	<u>ZELLVIABILITÄT ATP/LUCIFERASE [%]</u>
<u>K11</u>		0,11 Thiol-RhB Pip	50		
			25		74,8 \pm 10,4
			10		
			5		95,8 \pm 8,4
			1		105,8 \pm 2,5
			0,5		108,0 \pm 2,3
<u>MID1</u>			50	63,0 \pm 5,6	
			25	54,5 \pm 2,3	101,6 \pm 7,0
			10	67,0 \pm 5,0	
			5	63,5 \pm 2,7	99,6 \pm 5,7
			1		107,3 \pm 3,3
			0,5		105,4 \pm 0,8
RhB Pip <u>15</u>			50	68,0 \pm 0,8	
			25	37,6 \pm 10,1	16,4 \pm 1,7
			10	41,4 \pm 8,2	
			5	52,3 \pm 5,6	38,8 \pm 5,5
			1		68,2 \pm 3,7
			0,5		77,5 \pm 12,4

Table A. 3: Zellviabilitäten der Funktionspeptide und -tragenden Konjugate. Bestimmt mittels ATP/Luciferase-Assay an HeLa-Zellen (Duplikate von Triplikaten).

<u>KONJUGAT</u>	<u>AFFINES PEPTID</u>	<u>HOCHAFFINES PEPTID</u>	<u>KONZENTRATION [μM]</u>	<u>ZELLVIABILITÄT ATP/LUCIFERASE [%]</u>
Affines Peptid <u>8</u>	WPPPPRVPR		25	101,7 ± 1,0
			5	100,1 ± 0,9
			1	101,9 ± 3,8
			0,5	101,4 ± 1,0
Hochaffines Peptid <u>9</u>		WPPPPRVPR- WPPPPRVPR	25	93,0 ± 1,8
			5	100,1 ± 1,0
			1	103,7 ± 0,5
			0,5	101,6 ± 0,6
<u>K18</u>	2,2		25	103,8 ± 1,5
			5	102,4 ± 1,1
			1	103,2 ± 2,3
			0,5	102,2 ± 0,2
<u>K19</u>	4,8		25	101,5 ± 1,1
			5	99,6 ± 1,2
			1	103,5 ± 7,6
			0,5	101,4 ± 5,6

<u>KONJUGAT</u>	<u>AFFINES PEPTID</u>	<u>HOCHAFFINES PEPTID</u>	<u>KONZENTRATION [μM]</u>	<u>ZELLVIABILITÄT ATP/LUCIFERASE [%]</u>
<u>K20</u>	6,6		25	101,3 ± 0,5
			5	101,8 ± 1,4
			1	103,6 ± 4,2
			0,5	102,1 ± 3,0
<u>K21</u>	7,1		25	88,2 ± 3,2
			5	97,6 ± 0,9
			1	102,8 ± 3,6
			0,5	100,4 ± 2,2
<u>K22</u>		2,0	25	95,1 ± 2,1
			5	99,7 ± 1,1
			1	101,3 ± 4,9
			0,5	100,1 ± 2,1
<u>K23</u>		3,2	25	39,3 ± 15,6
			5	79,4 ± 8,5
			1	99,0 ± 1,7
			0,5	100,9 ± 3,5

<u>KONJUGAT</u>	<u>AFFINES PEPTID</u>	<u>HOCHAFFINES PEPTID</u>	<u>KONZENTRATION [μM]</u>	<u>ZELLVIABILITÄT ATP/LUCIFERASE [%]</u>
<u>K24</u>		5,9	25	20,1 \pm 8,9
			5	39,1 \pm 12,3
			1	82,4 \pm 0,2
			0,5	98,3 \pm 1,4

10.5. Pulldown-Assay: Die 30 häufigsten Bindungspartner

Table A. 4: Auflistung der im Pulldown gefundenen Bindungspartner, die jeweiligen Anreicherungen der isotope-markierten Proben A und B, sowie eine Beschreibung des Bindungspartners und ihrer Funktionen.

BINDUNGSPARTNER	$\frac{^{16}\text{O K28/}}{^{18}\text{O K26}}$	$\frac{^{18}\text{O K28/}}{^{16}\text{O K26}}$	BESCHREIBUNG (ENGL.)	FUNKTION / PROZESS ^[211]
AP1G1_HUMAN	20,0	70,1	<i>AP-1 complex subunit gamma-1</i>	Proteintransport
NT5D2_HUMAN	15,1	20,1	<i>5'-nucleotidase domain-containing protein 2</i>	Hydrolase
HNRDL_HUMAN	13,8	23,5	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like</i>	Transkription (Regulation)
NCBP3_HUMAN	13,3	19,8	<i>Nuclear cap-binding protein subunit 3</i>	mRNA Prozessierung & Export
CD2B2_HUMAN	13,2	83,4	<i>CD2 antigen cytoplasmic tail-binding protein 2</i>	mRNA Splicing
PKN2_HUMAN	12,9	16,1	<i>Serine/threonine-protein kinase N2</i>	Apoptose, Zellteilung, Zelladhäsion, Transkription
GIT1_HUMAN	10,7	24,1	<i>ARF GTPase-activating protein GIT1</i>	GTPase Aktivierung
SH3K1_HUMAN	10,2	15,3	<i>SH3 domain-containing kinase-binding protein 1</i>	Apoptose, Endozytose
APC4_HUMAN	9,43	37,1	<i>Anaphase-promoting complex subunit 4</i>	Zellzyklus, Zellteilung, Mitose
TFR1_HUMAN	9,23	40,9	<i>Transferrin receptor protein 1</i>	Endozytose, Wirt-Virus Interaktion
ABRX2_HUMAN	9,10	63,1	<i>BRISC complex subunit Abraxas 2</i>	Zellzyklus, Zellteilung, Mitose

BINDUNGSPARTNER	$\frac{^{16}\text{O K28}}{^{18}\text{O K26}}$	$\frac{^{18}\text{O K28}}{^{16}\text{O K26}}$	BESCHREIBUNG (ENGL.)	FUNKTION / PROZESS ^[211]
RTCB_HUMAN	8,69	29,4	<i>tRNA-splicing ligase RtcB homolog</i>	tRNA Prozessierung
LARP7_HUMAN	8,67	17,8	<i>La-related protein 7</i>	RNA Prozessierung
INO1_HUMAN	8,55	14,6	<i>Inositol-3-phosphate synthase</i>	Inosit-, Lipid- und Phospho- lipid- Biosynthese
CDC27_HUMAN	8,24	17,9	<i>Cell division cycle protein 27 homolog</i>	Zellproliferation
DHX15_HUMAN	8,07	21,4	<i>Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15</i>	mRNA Prozessierung & Splicing
DX39A_HUMAN	7,73	15,9	<i>ATP-dependent RNA helicase DDX39A</i>	mRNA Prozessierung & Splicing
MCM4_HUMAN	7,38	31,7	<i>DNA replication licensing factor MCM4</i>	Zellzyklus, DNA-Replikation
SMU1_HUMAN	7,34	40,5	<i>WD40 repeat-containing protein SMU1</i>	mRNA Prozessierung & Splicing
TERA_HUMAN	7,23	36,2	<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>	Autophagie, DNA Reparatur, Transportvesikel-Bildung
AP2C_HUMAN	7,04	45,8	<i>Transcription factor AP-2 gamma</i>	Transkription (Regulation)
RBM22_HUMAN	6,98	15,9	<i>Pre-mRNA-splicing factor RBM22</i>	mRNA Prozessierung & Splicing, Transport
WBP4_HUMAN	6,89	20,7	<i>WW domain-binding protein 4</i>	mRNA Prozessierung & Splicing
P3H1_HUMAN	6,81	35,6	<i>Prolyl 3-hydroxylase 1</i>	Dioxygenase, Oxidoreduk- tase
RED_HUMAN	6,64	24,8	<i>Protein Red</i>	mRNA Prozessierung & Splicing

<u>BINDUNGSPARTNER</u>	<u>$\frac{^{16}\text{O K28}}{^{18}\text{O K26}}$</u>	<u>$\frac{^{18}\text{O K28}}{^{16}\text{O K26}}$</u>	<u>BESCHREIBUNG (ENGL.)</u>	<u>FUNKTION / PROZESS</u> ^[211]
TF3C4_HUMAN	6,63	9,36	<i>General transcription factor 3C polypeptide 4</i>	Transkription
FIP1_HUMAN	6,45	38,8	<i>Pre-mRNA 3'-end-processing factor FIP1</i>	mRNA Prozessierung
AL1B1_HUMAN	6,43	58,8	<i>Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial</i>	Oxidoreduktase
RALY_HUMAN	6,39	17,1	<i>RNA-binding protein Raly</i>	mRNA Prozessierung & Splicing, Transkription (Regulation)
GIT2_HUMAN	6,37	69,3	<i>ARF GTPase-activating protein GIT2</i>	GTPase Aktivierung

10.6. Inhibition WNV (Plaque-Assay, MOI 0,1)

Table A. 5: Virustiter und Inhibitionen der Konjugate gegenüber WNV (Plaque-Assay, MOI 0,1, 12,5 - 6,25 μM).

<u>KONJUGAT</u>	<u>FUNKTIONS- PEPTID</u>	<u>WEITERE BELADUNG</u>	<u>KONZENTRATION [μM]</u>	<u>VIRUSTITER</u>	<u>LOG VIRUSTITER</u>	<u>INHIBITION [%]</u>
Positiv- kontrolle				300000000	8,48	0 %
<u>K31</u>	2,0	0,5 Thiol-RhB Pip 2,6 TAT	12,5	100000000	8,00	66,7 %
			6,25	425000000	8,63	-41,7 %
<u>K32</u>	4,0	0,5 Thiol-RhB Pip 2,6 TAT	12,5	65000000	7,81	78,3 %
			6,25	137500000	8,14	54,2 %
Ribavirin			200	Keine Plaques		100 %
			100			100 %
			50	250000	5,40	99,9 %
			25	6000000	6,78	98,0 %
			12,5	30000000	7,48	90,0 %

10.7. Inhibition DENV (Plaque-Assay, 25 – 6,25 μM)

Table A. 6: Virustiter und Inhibitionen der Konjugate gegenüber DENV (Plaque-Assay, 25 - 6,25 μM).

<u>KONJUGAT</u>	<u>FUNKTIONS- PEPTID 27</u>	<u>WEITERE BELADUNG</u>	<u>KONZENTRATION [μM]</u>	<u>VIRUSTITER</u>	<u>LOG VIRUSTITER</u>	<u>INHIBITION [%]</u>
Positiv- kontrolle				15000000	7,18	0 %
<u>K31</u>	2,0	0,5 Thiol-RhB Pip 2,6 TAT	12,5	65000	4,81	99.6 %
			6,25	350000	5,54	97.7 %
<u>K32</u>	4,0	0,5 Thiol-RhB Pip 2,6 TAT	12,5	45000	4,65	99.7 %
			6,25	200000	5,30	98.7 %
<u>K34</u>	6,0	0,4 Thiol-RhB Pip	25	575000	5,76	96.2 %
			12,5	800000	5,90	94.7 %
			6,25	1500000	6,18	90.0 %
Ribavirin			200	125	2,10	100 %
			100	6750	3,83	100 %
			50	57500	4,76	99.6 %
			25	650000	5,81	95.7 %
			12,5	3750000	6,57	75.0 %

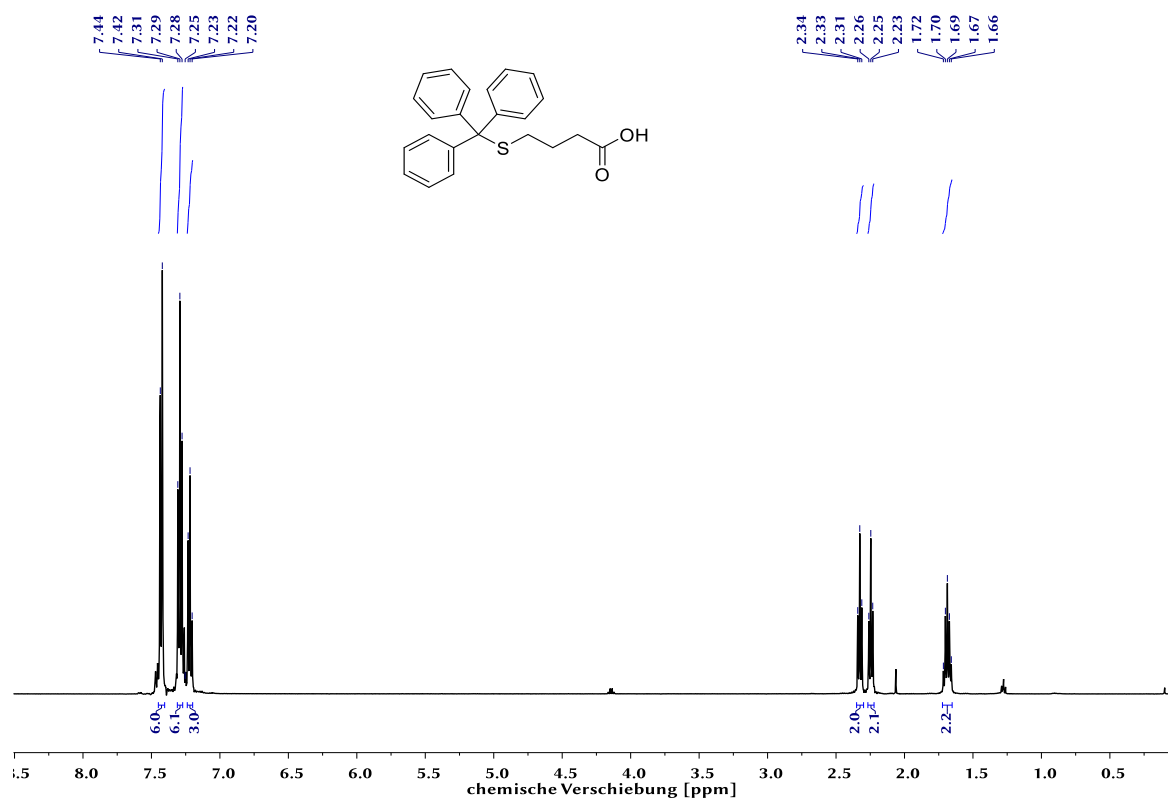
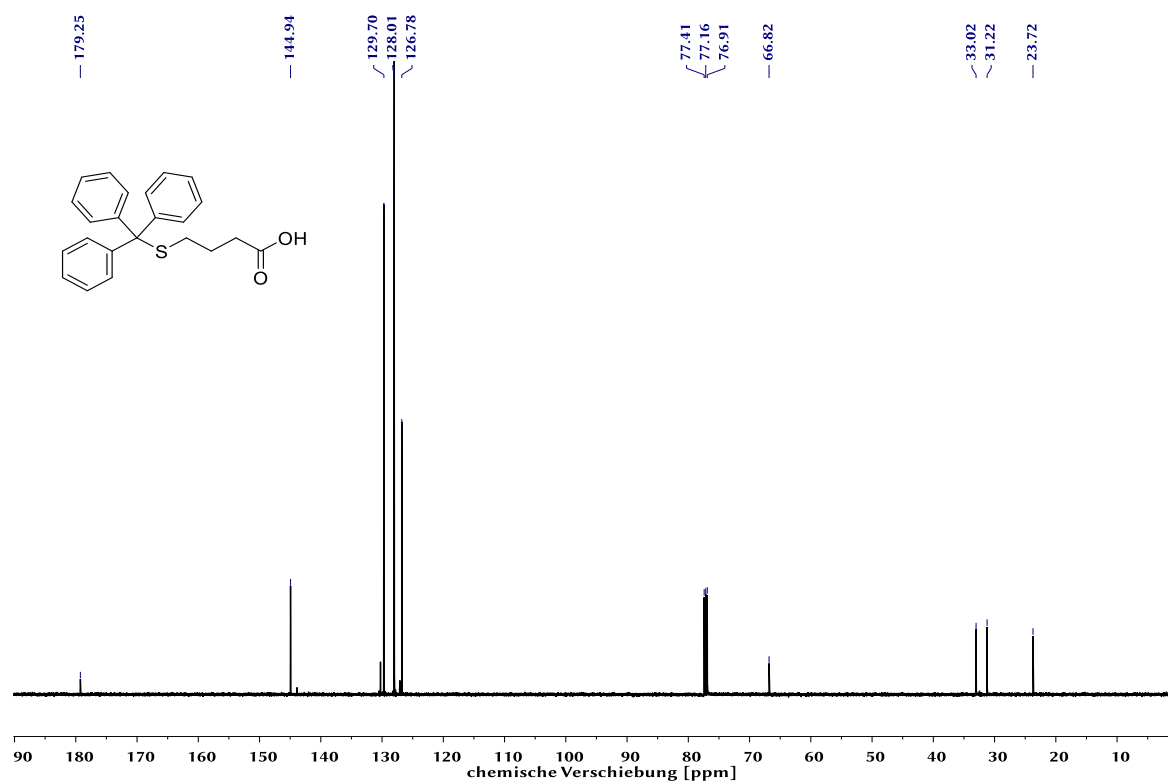
10.8. Inhibition DENV (Plaque-Assay, 10 – 0,1 μM)

Table A. 7: Virustiter und Inhibitionen der Konjugate gegenüber DENV (Plaque-Assay, 10 - 0,1 μM).

<u>KONJUGAT</u>	<u>FUNKTIONS- PEPTID 27</u>	<u>WEITERE BELADUNG</u>	<u>KONZENTRATION [μM]</u>	<u>VIRUSTITER</u>	<u>LOG VIRUSTITER</u>	<u>INHIBITION [%]</u>
Positiv- kontrolle				4750000	6,68	0 %
<u>K31</u>	2,0	0,5 Thiol-RhB Pip 2,6 TAT	10	225000	5,35	95,3 %
			5,0	37500	4,57	99,2 %
			2,5	275000	5,44	94,2 %
			0,5	1225000	6,09	74,2 %
			0,25	3000000	6,48	36,8 %
			0,1	2500000	6,40	47,4 %
<u>K32</u>	4,0	0,5 Thiol-RhB Pip 2,6 TAT	10	130000	5,11	97,3 %
			5,0	75000	4,88	98,4 %
			2,5	275000	5,44	94,2 %
			0,5	375000	5,57	92,1 %
			0,25	850000	5,93	82,1 %
			0,1	975000	5,99	79,5 %

<u>KONJUGAT</u>	<u>FUNKTIONS- PEPTID 27</u>	<u>WEITERE BELADUNG</u>	<u>KONZENTRATION [μM]</u>	<u>VIRUSTITER</u>	<u>LOG VIRUSTITER</u>	<u>INHIBITION [%]</u>
<u>K34</u>	6,0	0,4 Thiol-RhB Pip	10	675000	5,83	85,8 %
			5,0	2750000	6,44	42,1 %
			2,5	4750000	6,68	0 %
			0,5	5750000	6,76	-21,1 %
			0,25	2750000	6,44	42,1 %
			0,1	3000000	6,48	36,8 %
Ribavirin			200	Keine Plaques		100 %
			100			100 %
			50			100 %
			25	1200	3,08	99,9 %
			12,5	500	2,70	99,9 %

10.9. NMR-Spektren

Abbildung A. 44: ^1H -Spektrum von **10** (500 MHz, CDCl_3)Abbildung A. 45: ^{13}C -Spektrum von **10** (125 MHz, CDCl_3)

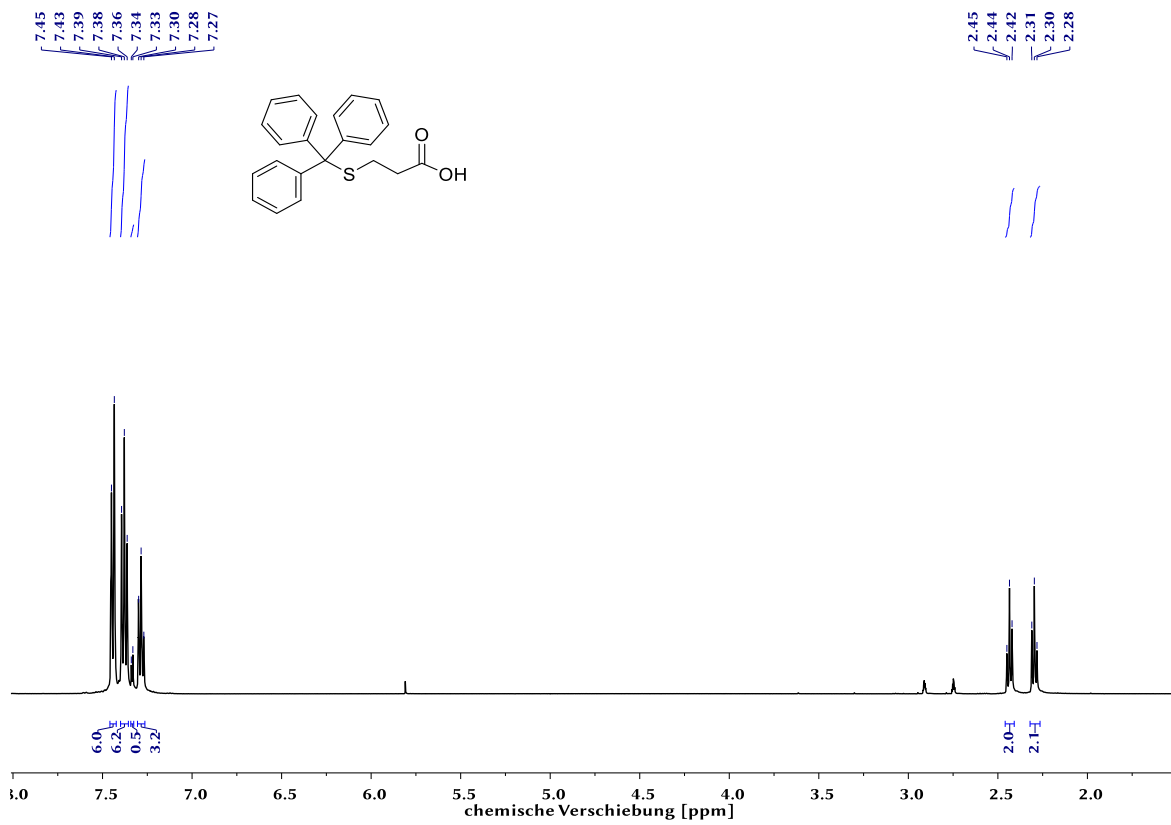


Abbildung A. 46: ^1H -Spektrum von **18** (500 MHz, DMF-d_7).

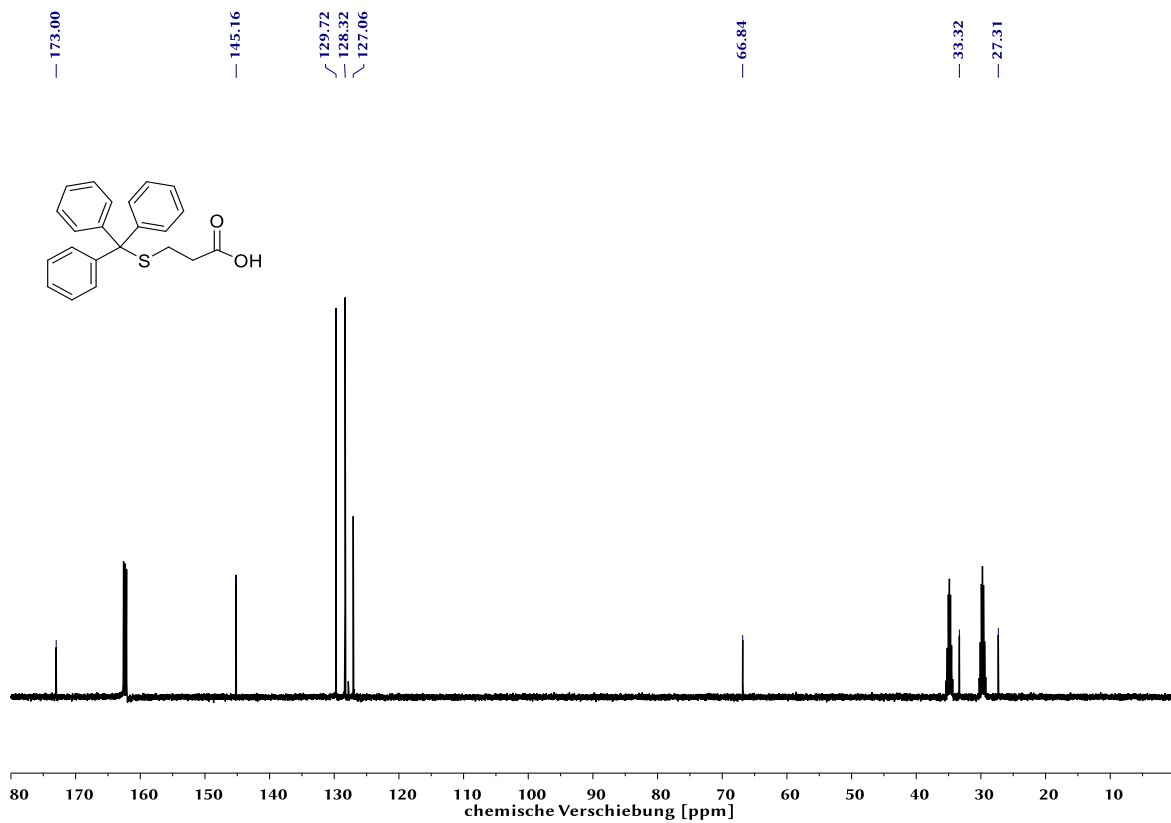


Abbildung A. 47: ^{13}C -Spektrum von **18** (125 MHz, DMF-d_7).

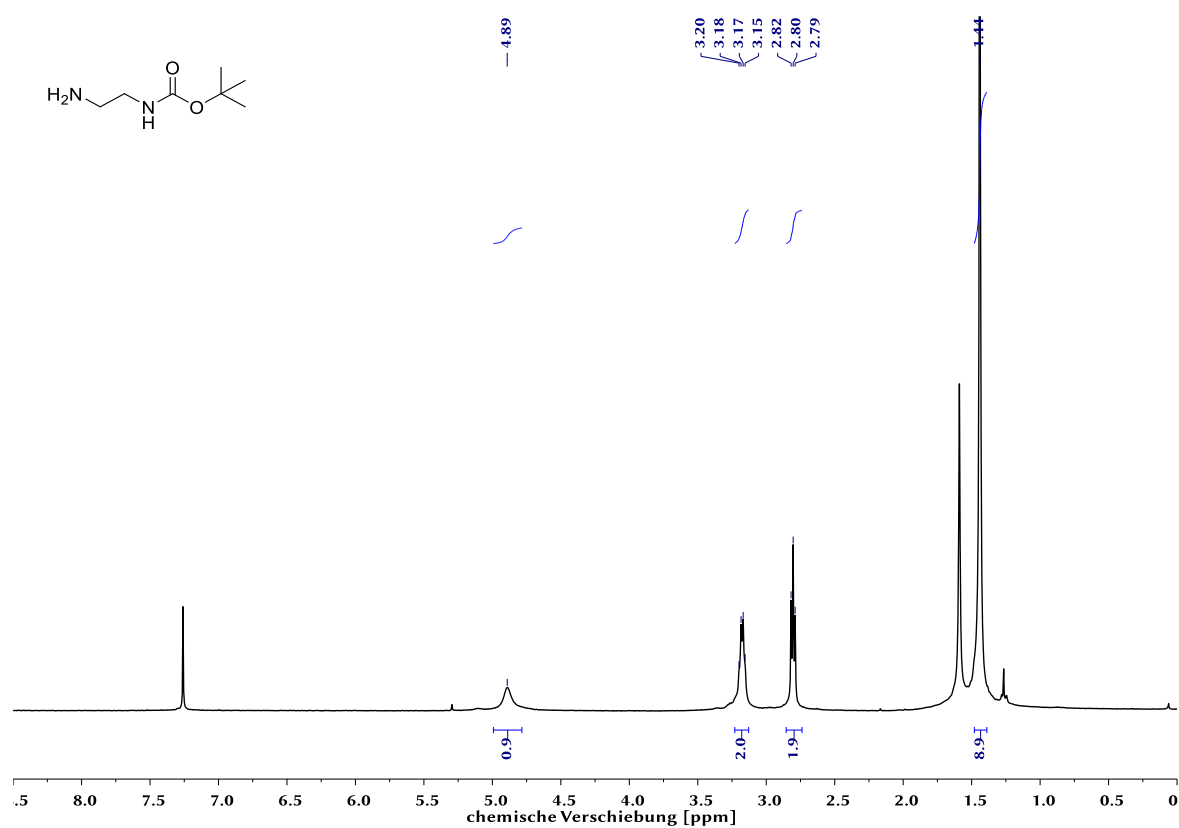


Abbildung A. 48: ¹H-Spektrum von **5** (400 MHz, CDCl₃).

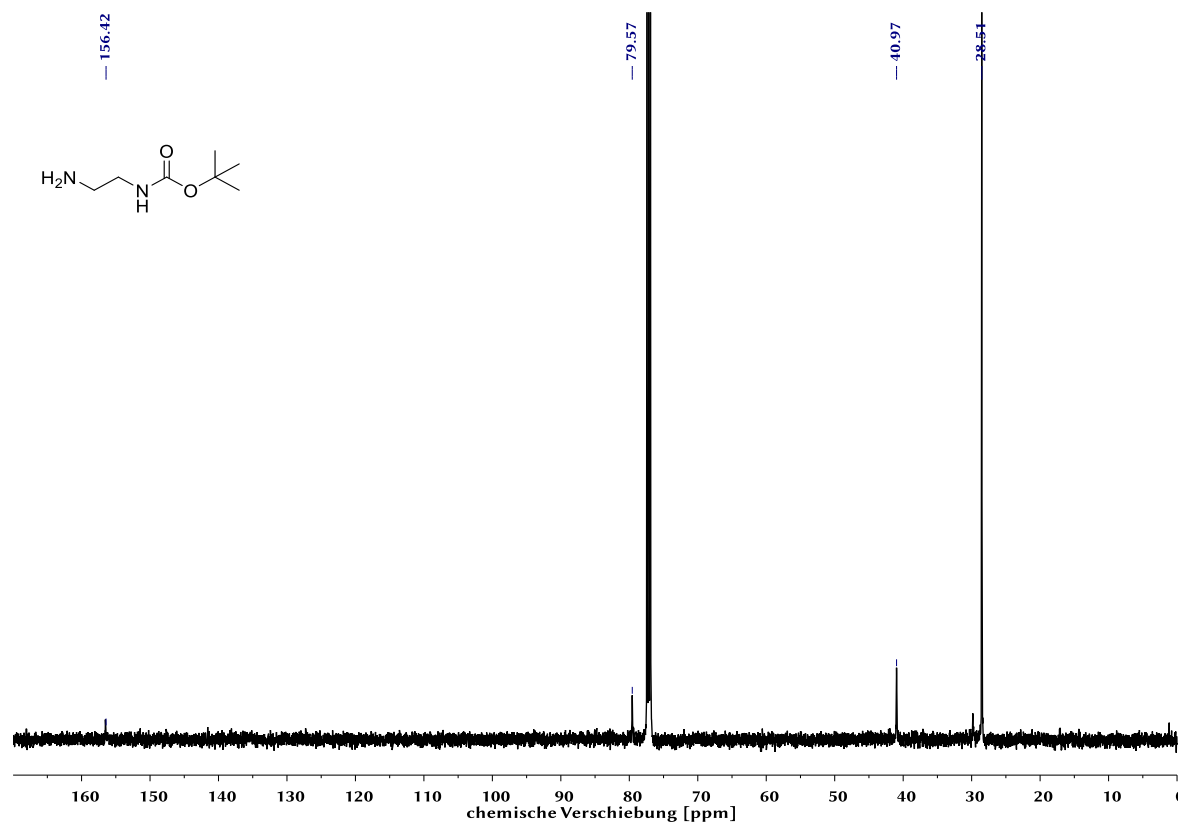


Abbildung A. 49: ¹³C-Spektrum von **5** (125 MHz, CDCl₃).

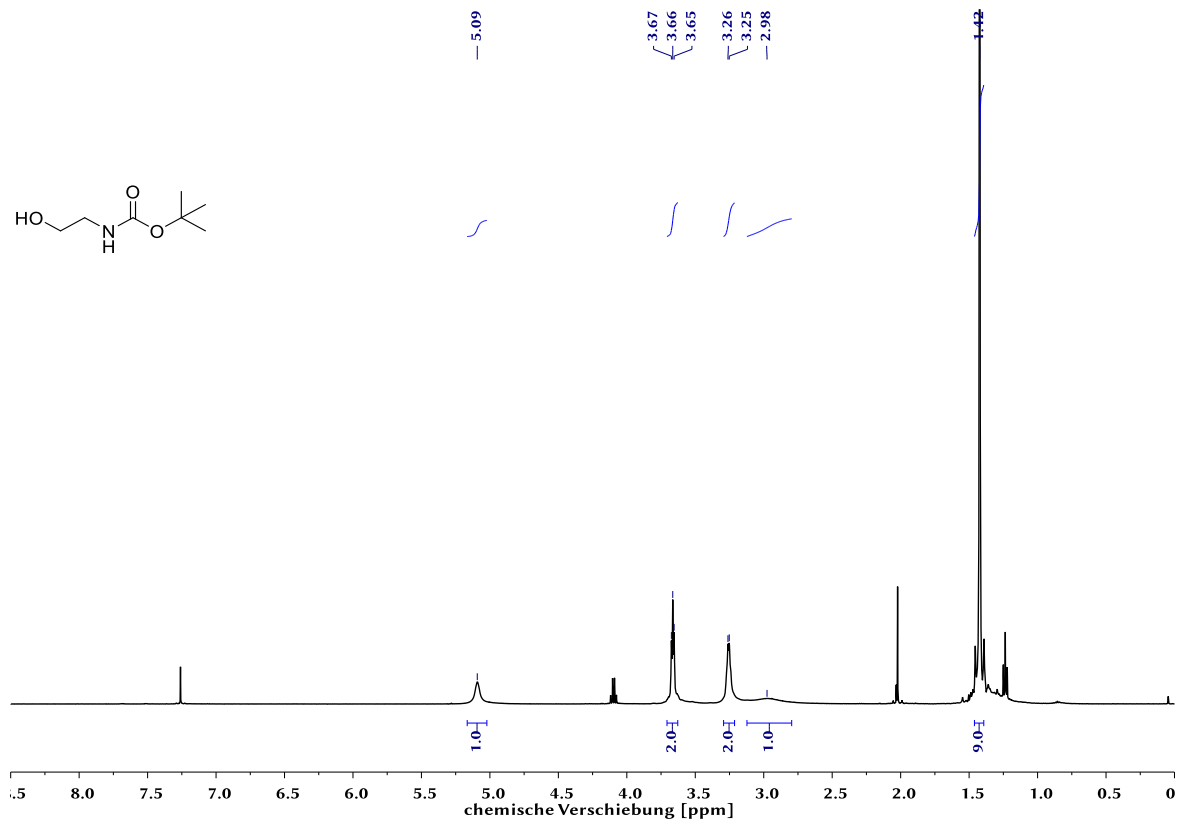


Abbildung A. 50: ¹H-Spektrum von **Z** (500 MHz, CDCl₃).

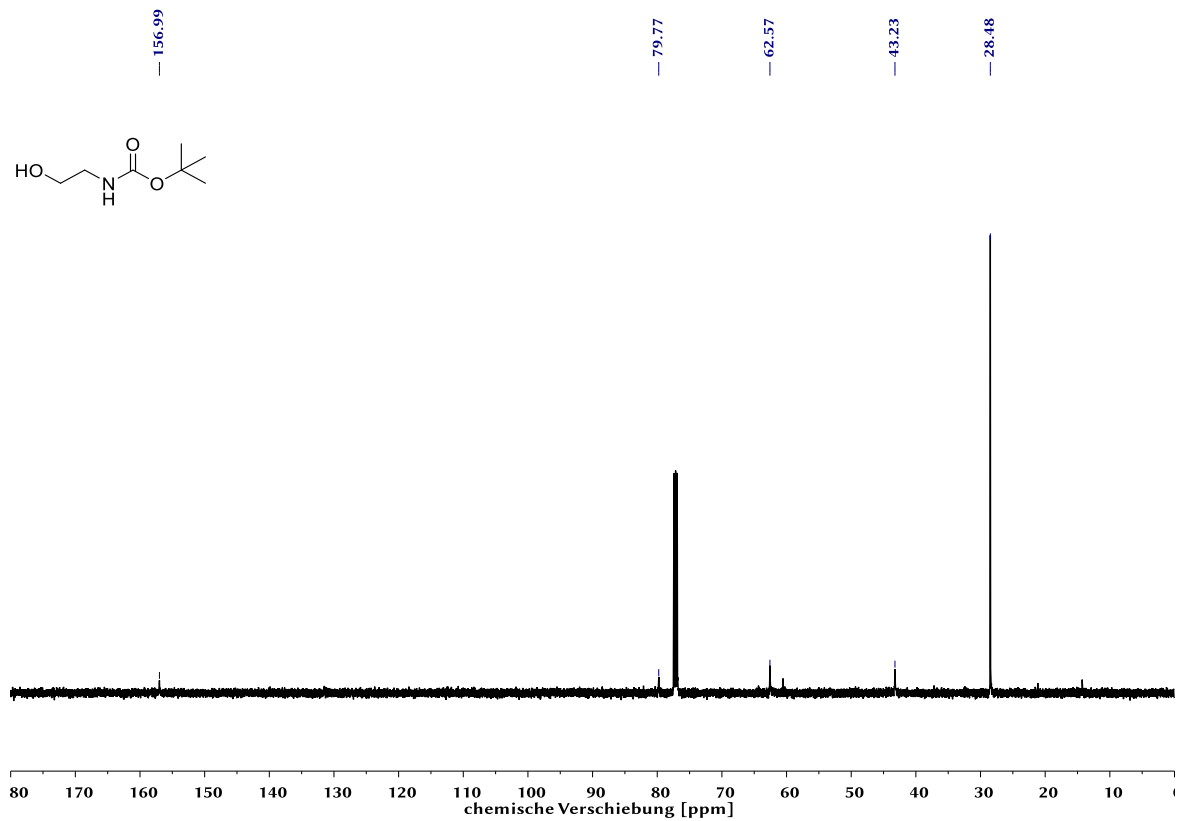


Abbildung A. 51: ¹³C-Spektrum von **Z** (125 MHz, CDCl₃).

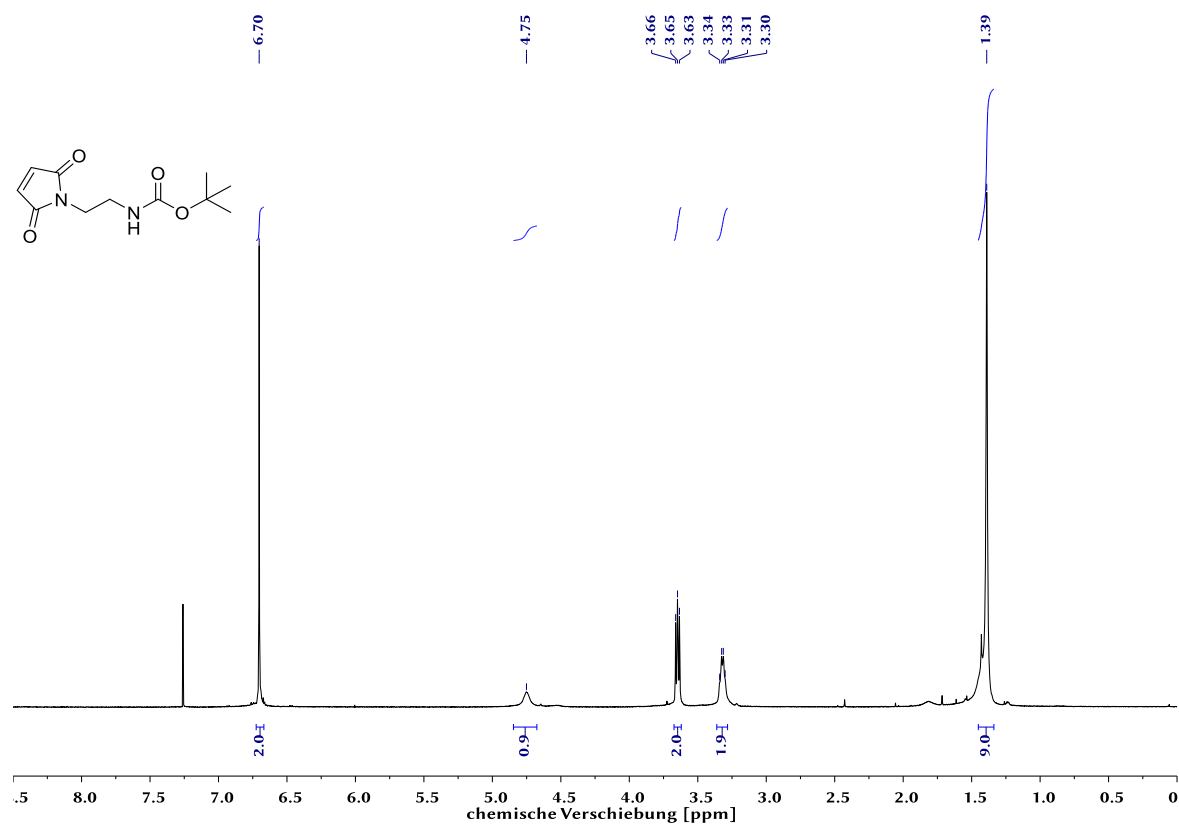


Abbildung A. 52: ^1H -Spektrum von **6** (400 MHz, CDCl_3).

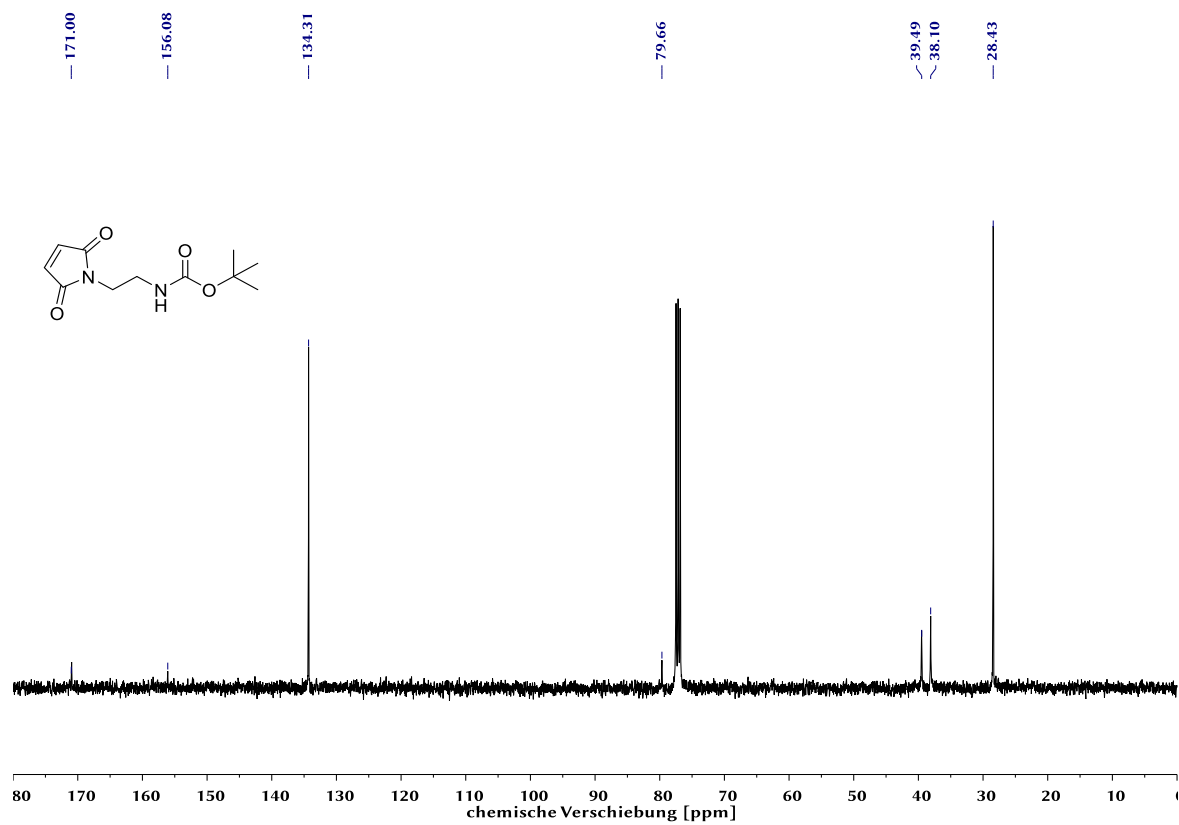


Abbildung A. 53: ^{13}C -Spektrum von **6** (100 MHz, CDCl_3).

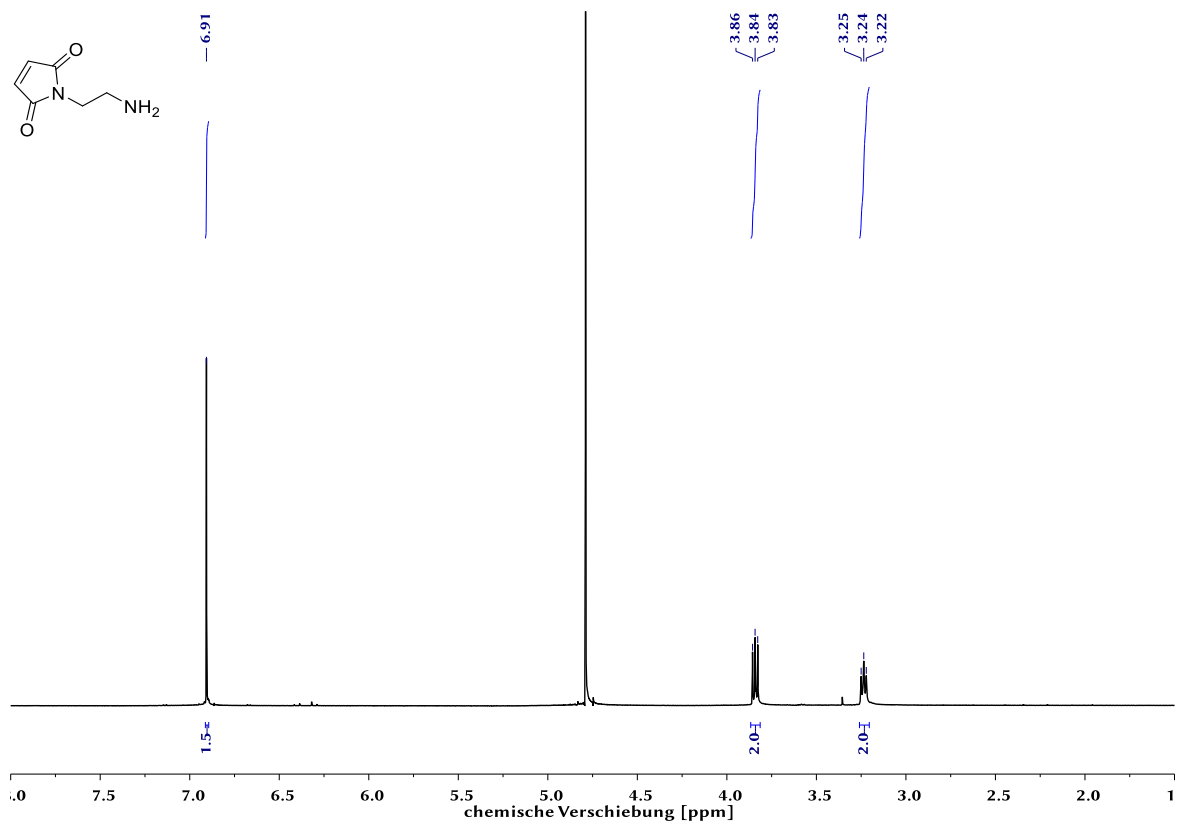


Abbildung A. 54: ^1H -Spektrum von **3** (400 MHz, D_2O).

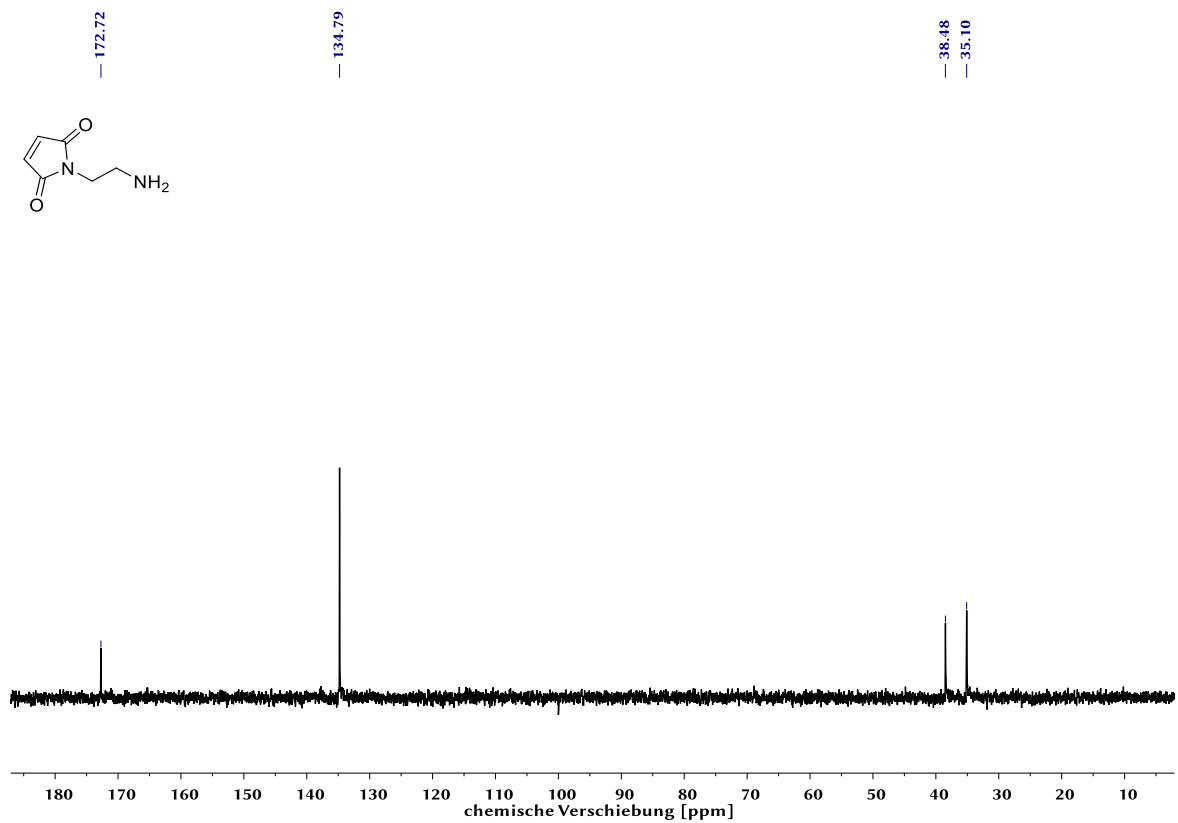


Abbildung A. 55: ^{13}C -Spektrum von **3** (100 MHz, D_2O).

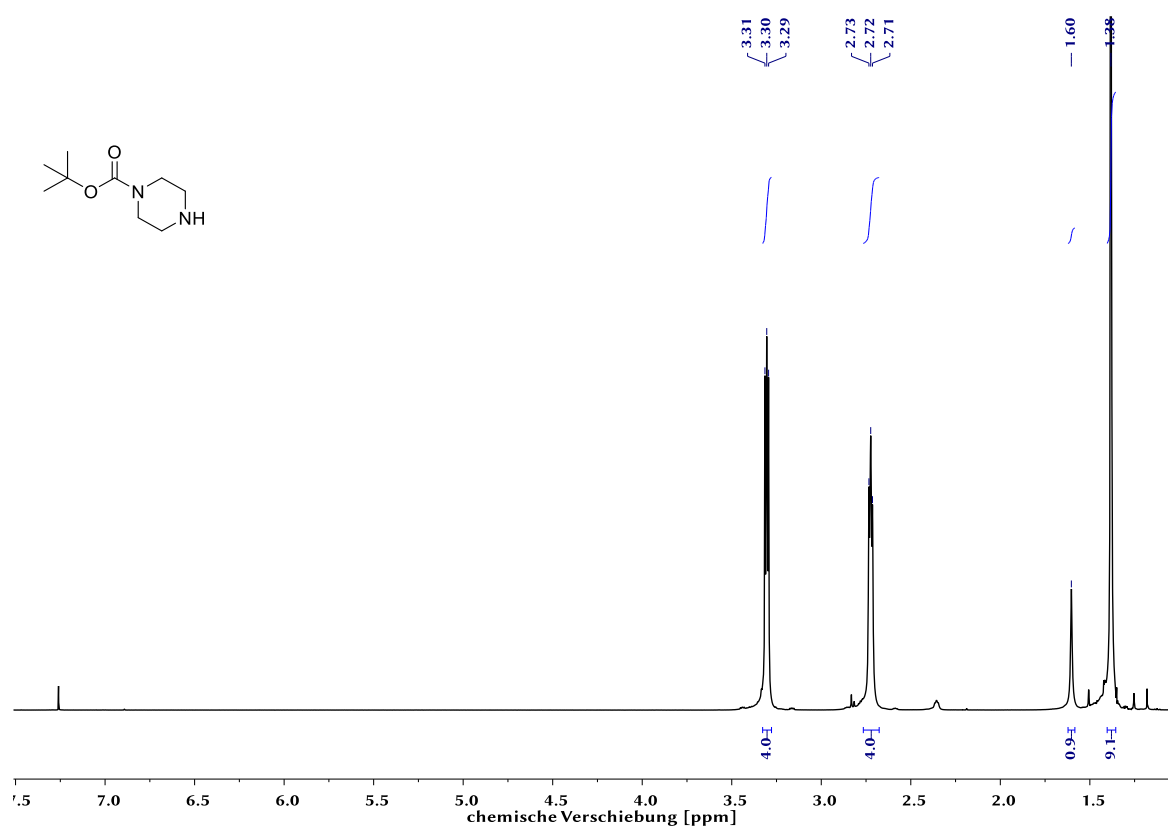


Abbildung A. 56: ¹H-Spektrum von **14** (500 MHz, CDCl₃).

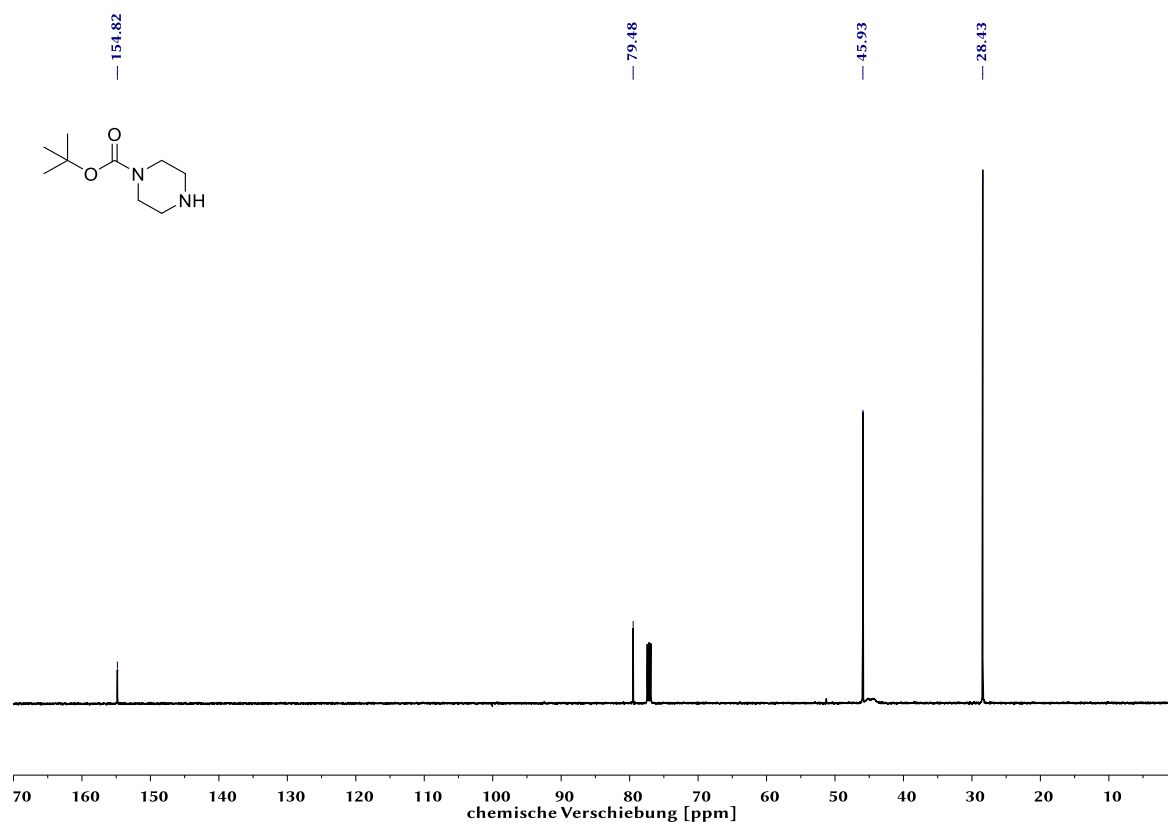


Abbildung A. 57: ¹³C-Spektrum von **14** (125 MHz, CDCl₃).

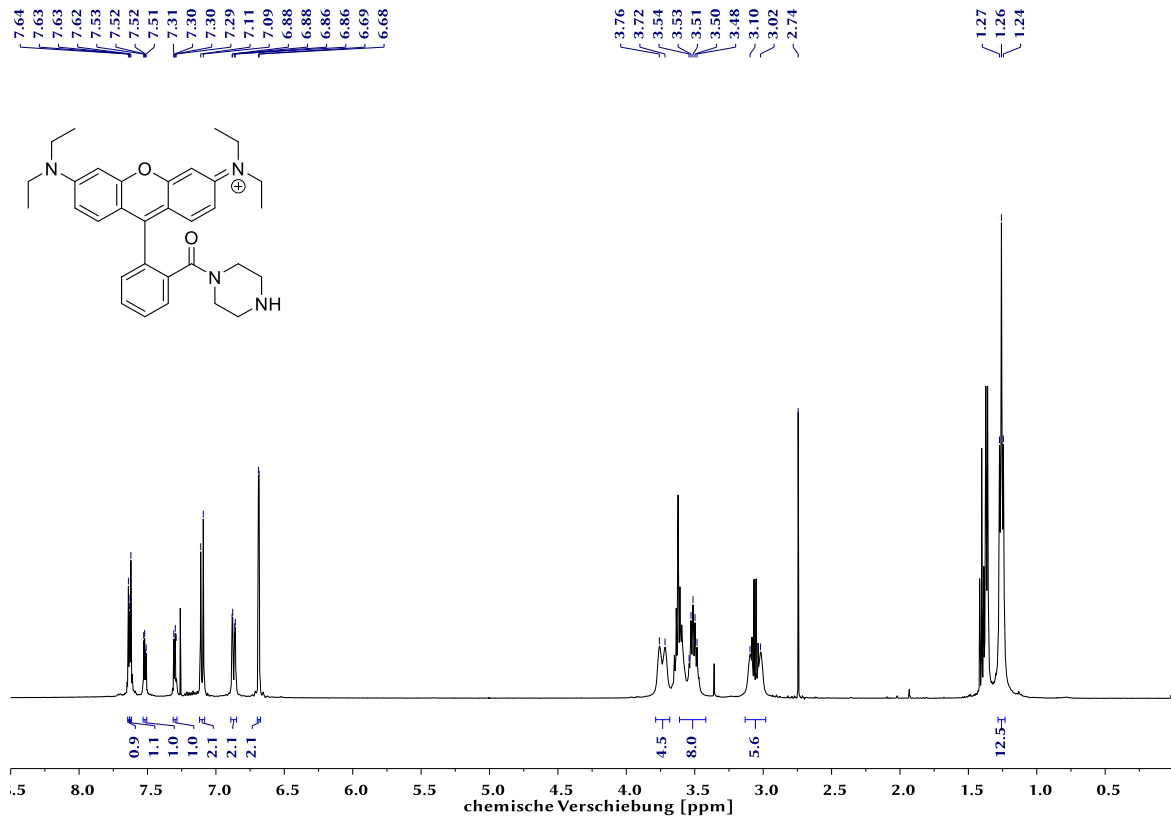


Abbildung A. 58: ^1H -Spektrum von RhB Pip **13** (500 MHz, CDCl_3).

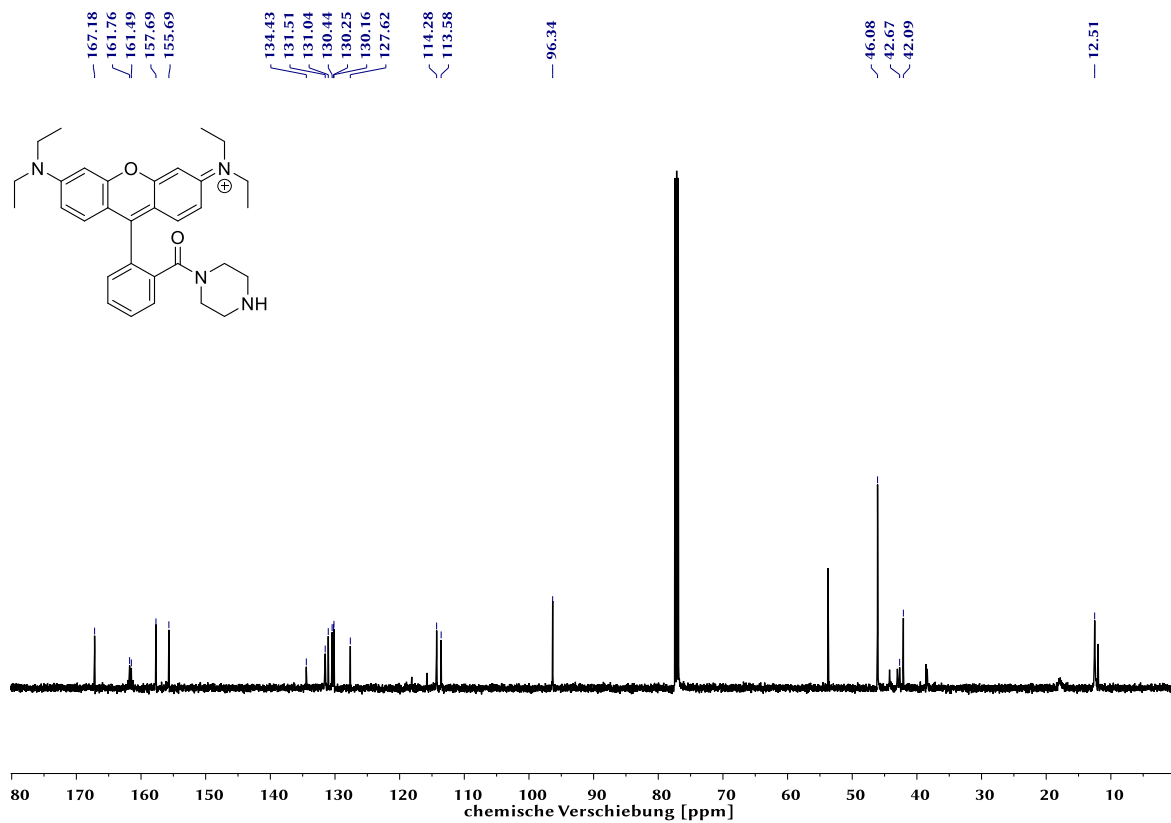


Abbildung A. 59: ^{13}C -Spektrum von RhB Pip **13** (125 MHz, CDCl_3).

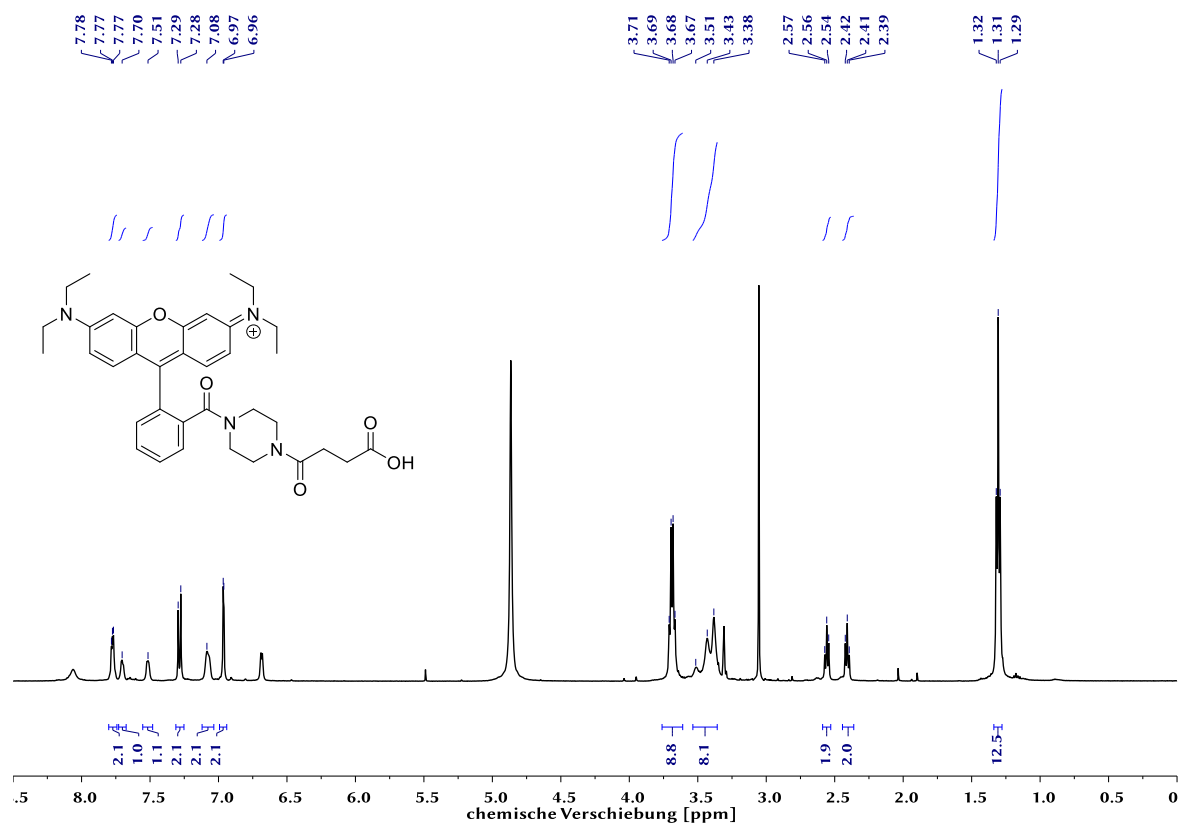


Abbildung A. 60: ^1H -Spektrum von Bernsteinsäure RhB Pip 15 (500 MHz, MeOD- d_4).

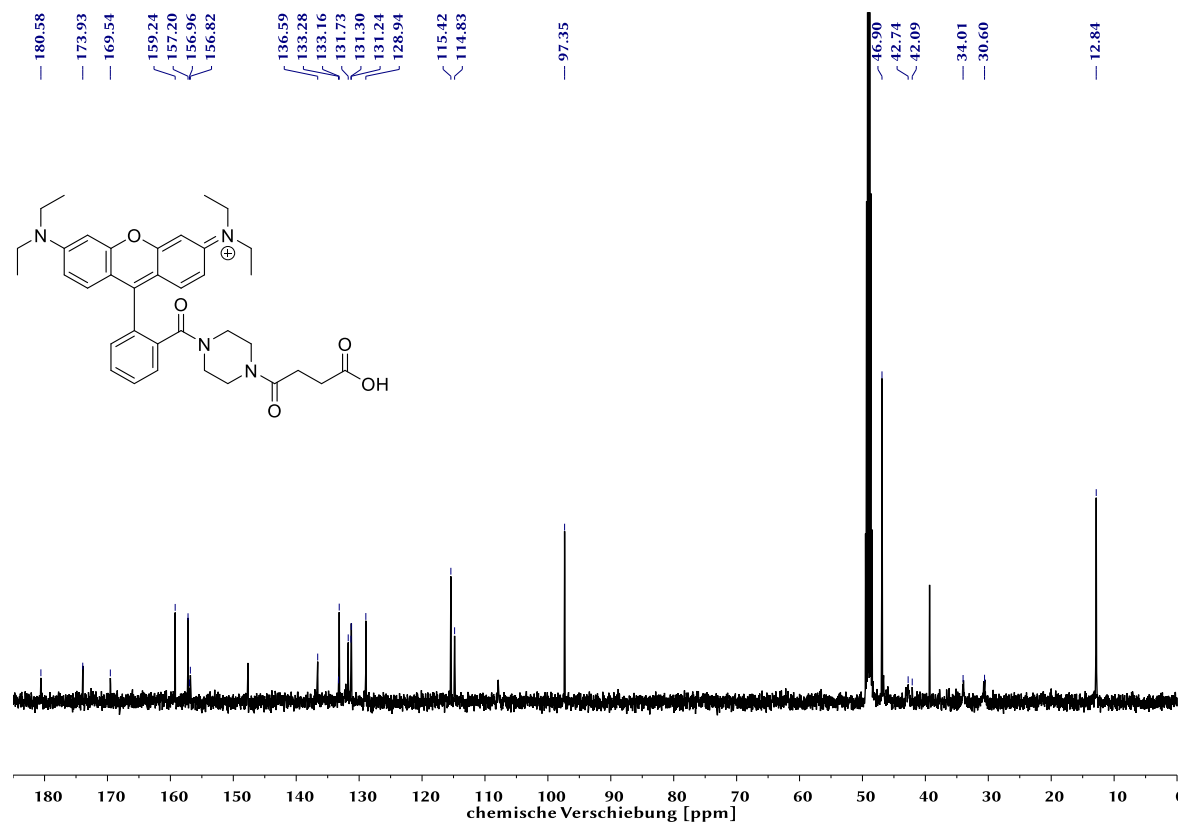


Abbildung A. 61: ^{13}C -Spektrum von Bernsteinsäure RhB Pip 15 (125 MHz, MeOD- d_4).

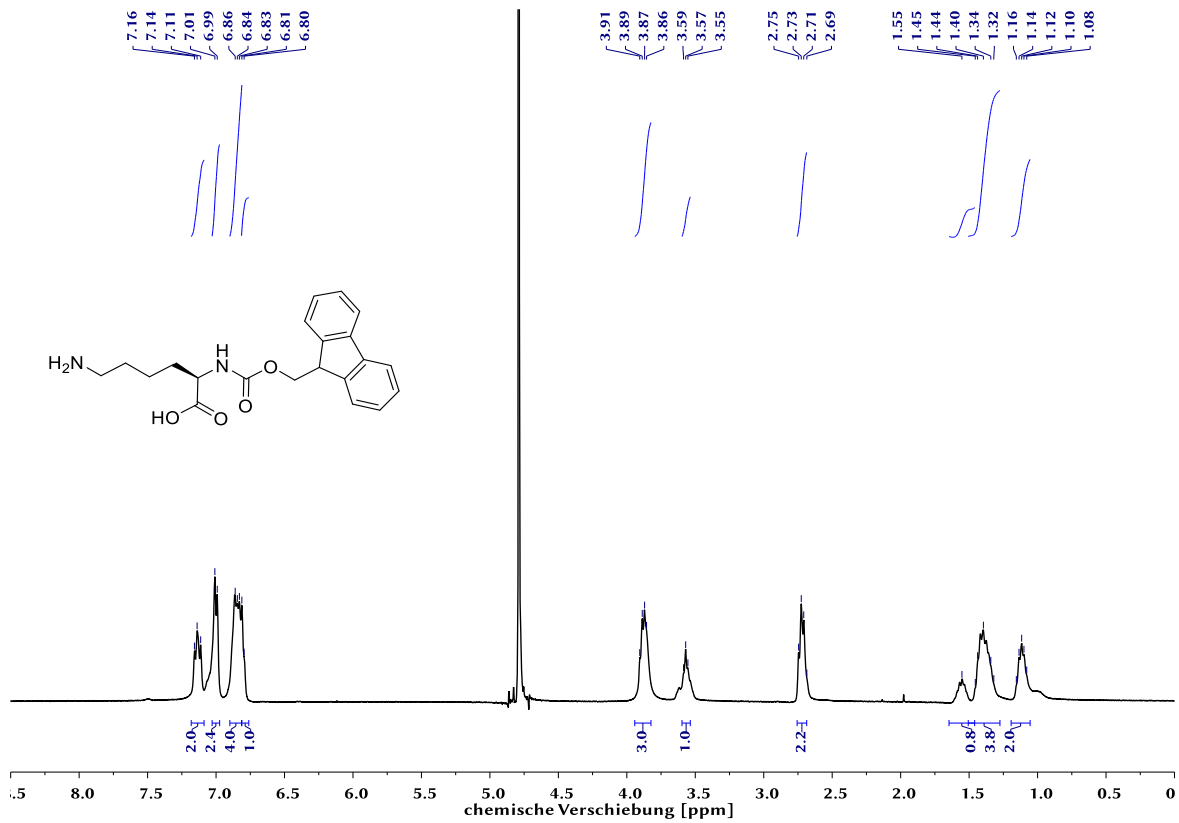


Abbildung A. 62: ^1H -Spektrum von Fmoc-Lys-OH **16** (400 MHz, D_2O).

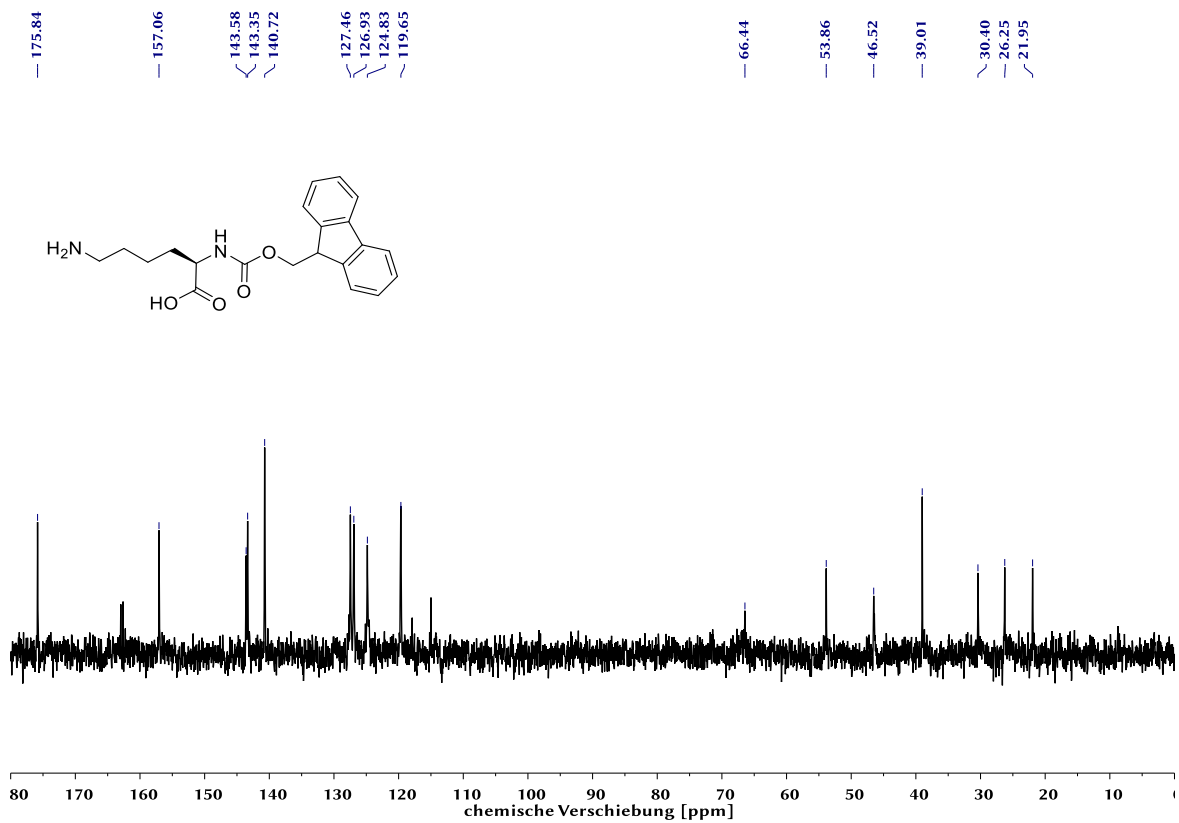


Abbildung A. 63: ^{13}C -Spektrum von Fmoc-Lys-OH **16** (100 MHz, D_2O).

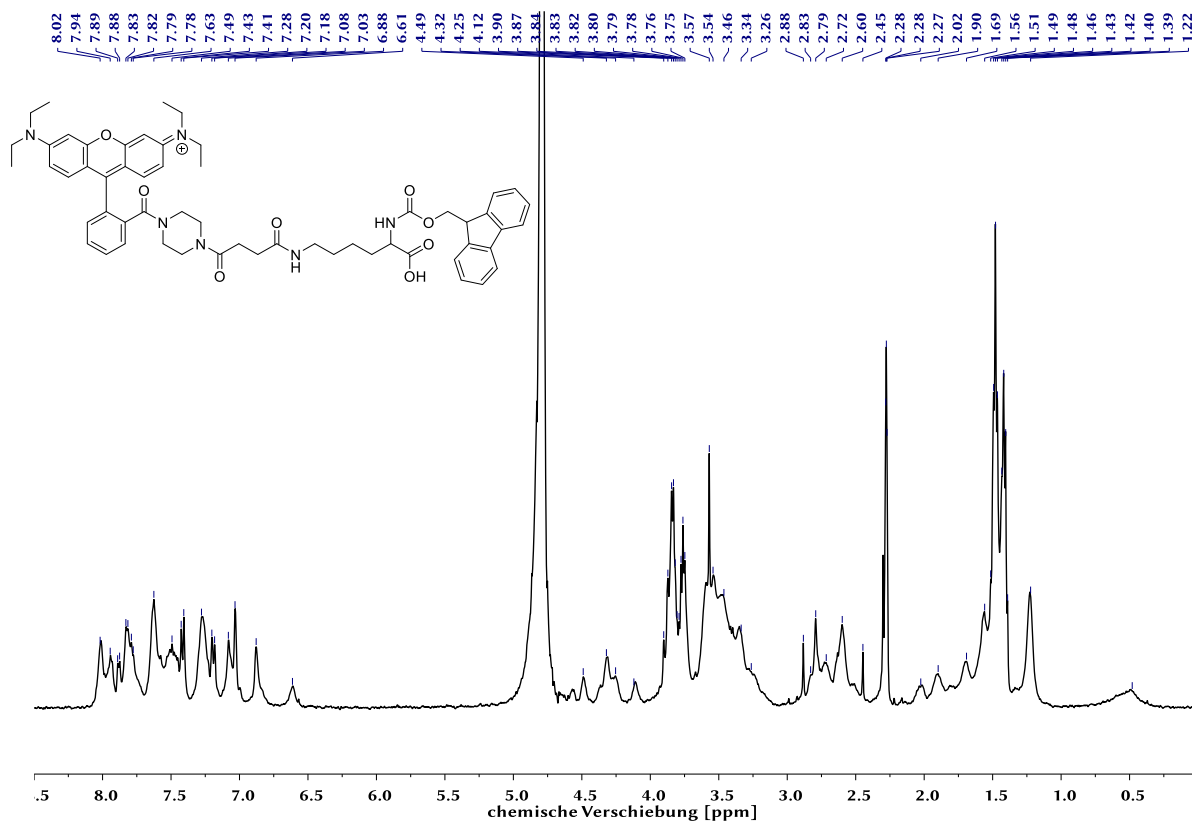


Abbildung A. 64: ^1H -Spektrum von Fmoc-Lys(RhB Pip)-OH **17** (500 MHz, D_2O).

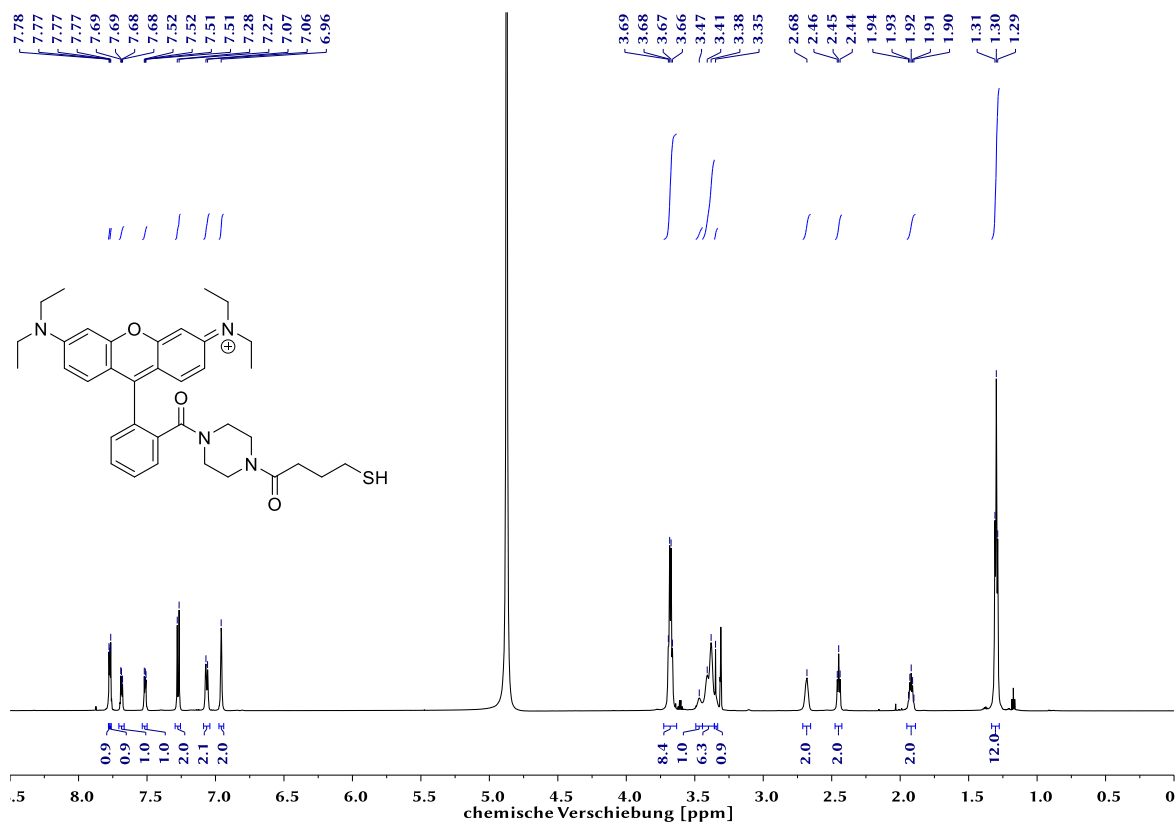


Abbildung A. 65: ^1H -Spektrum von Thiol-RhB Pip **21** (700 MHz, MeOD-d_4).

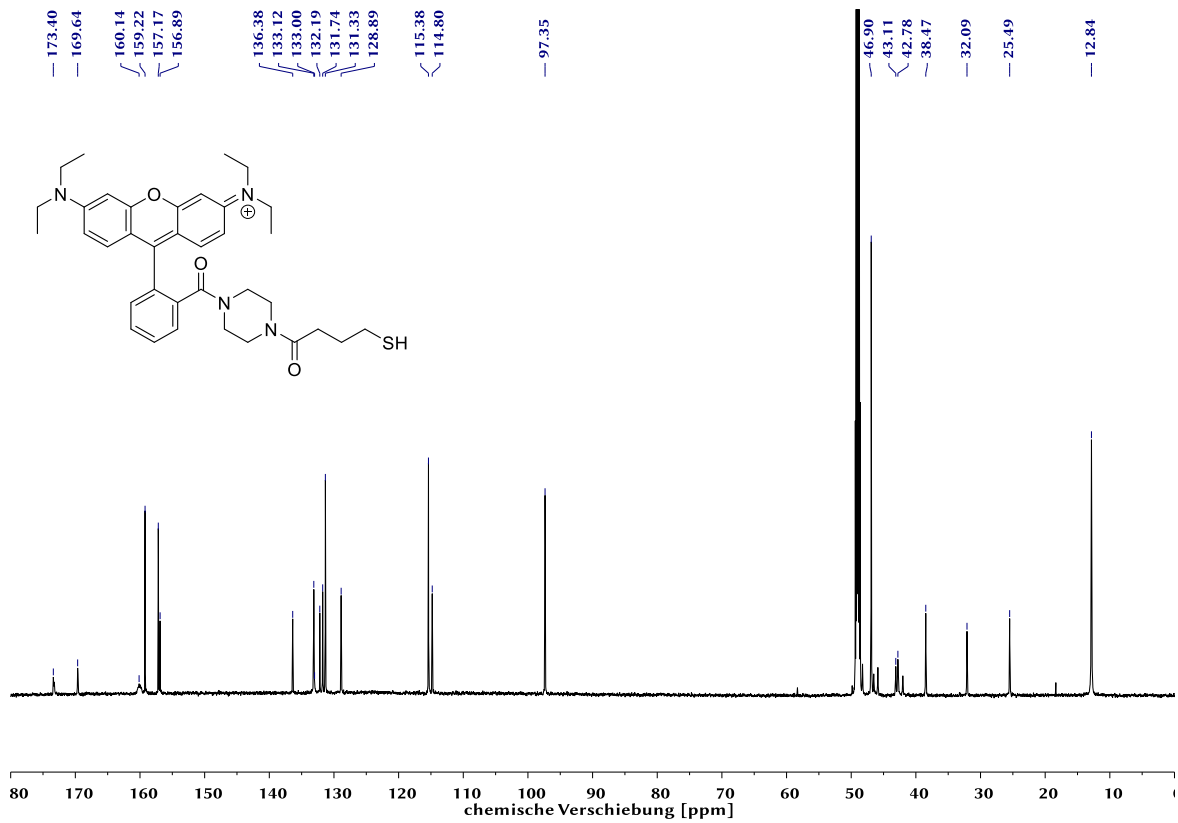


Abbildung A. 66: ^{13}C -Spektrum von Thiol-RhB Pip **21** (175 MHz, MeOD- d_4).

Carboxyethyl-dextrane

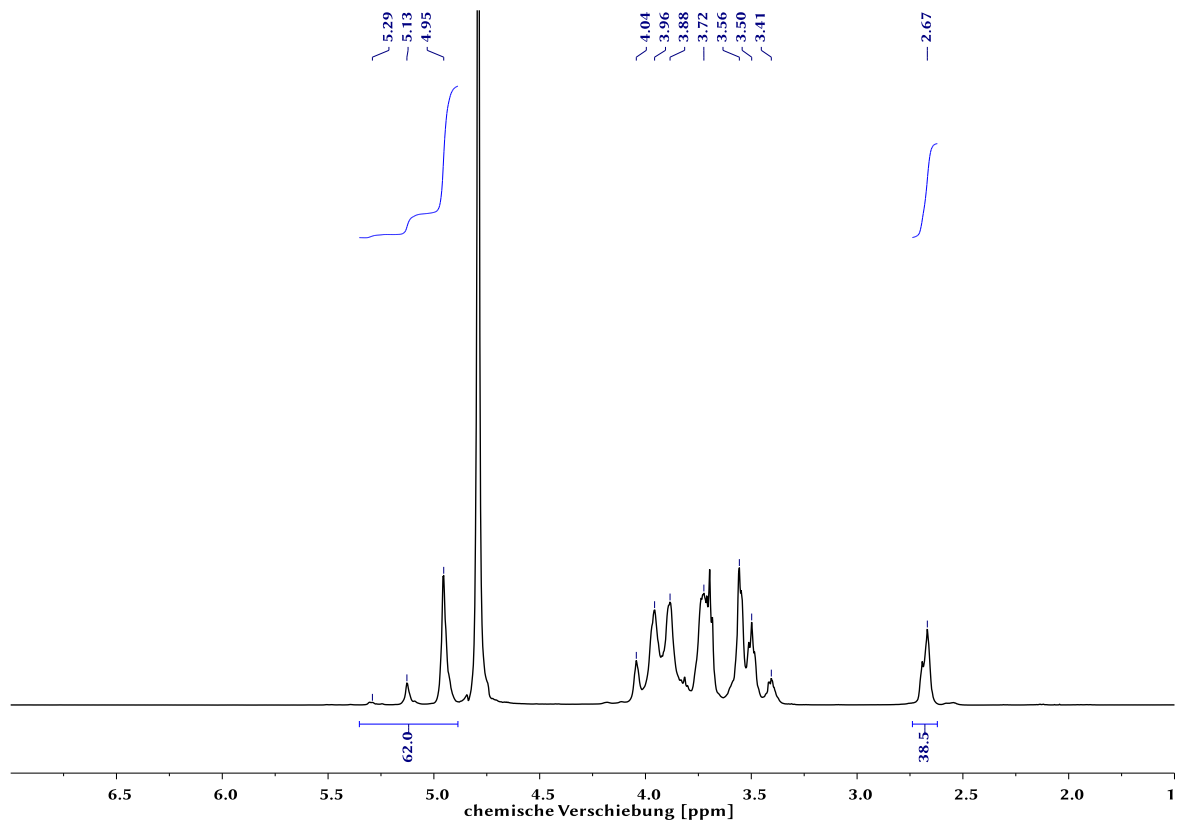


Abbildung A. 67: ^1H -Spektrum von **CED1** (700 MHz, D $_2$ O). Es sind 19,3 Carboxyethylsubstituenten pro Dextran gebunden.

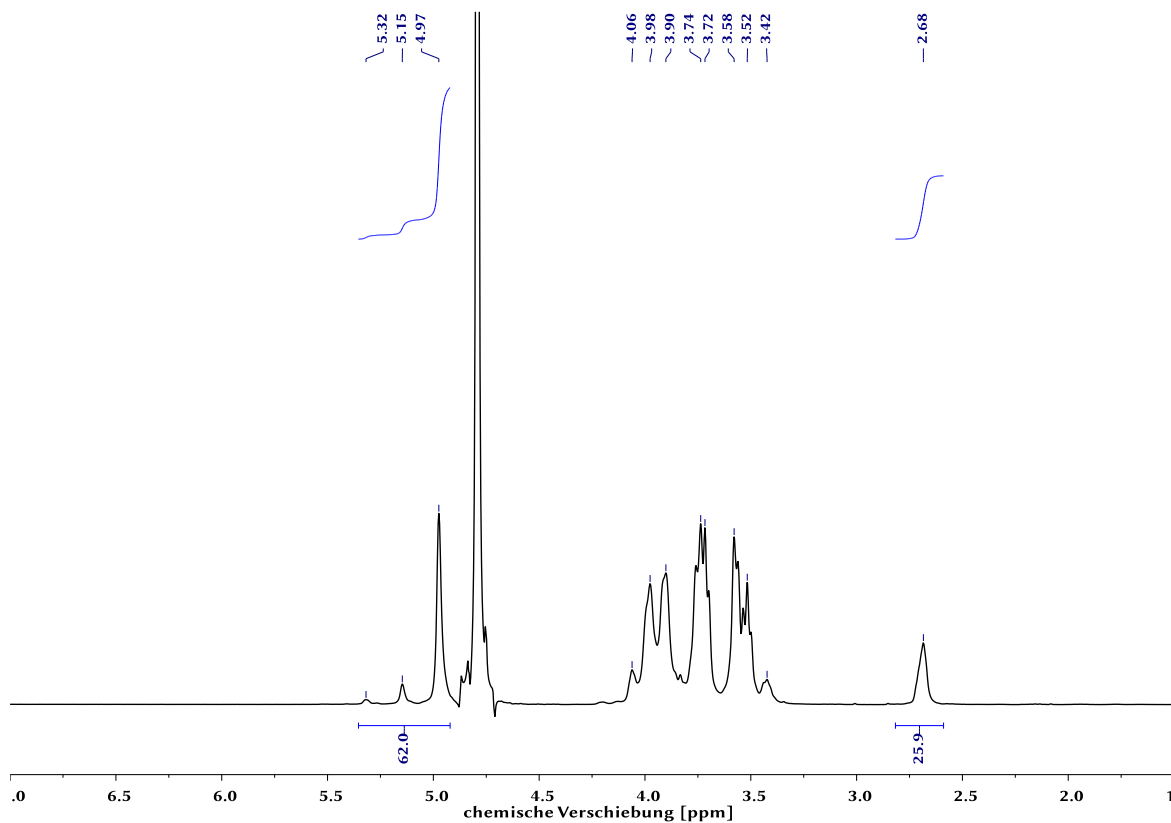


Abbildung A. 68: ^1H -Spektrum von **CED2** (500 MHz, D_2O). Es sind 13,0 Carboxyethylsubstituenten pro Dextran gebunden.

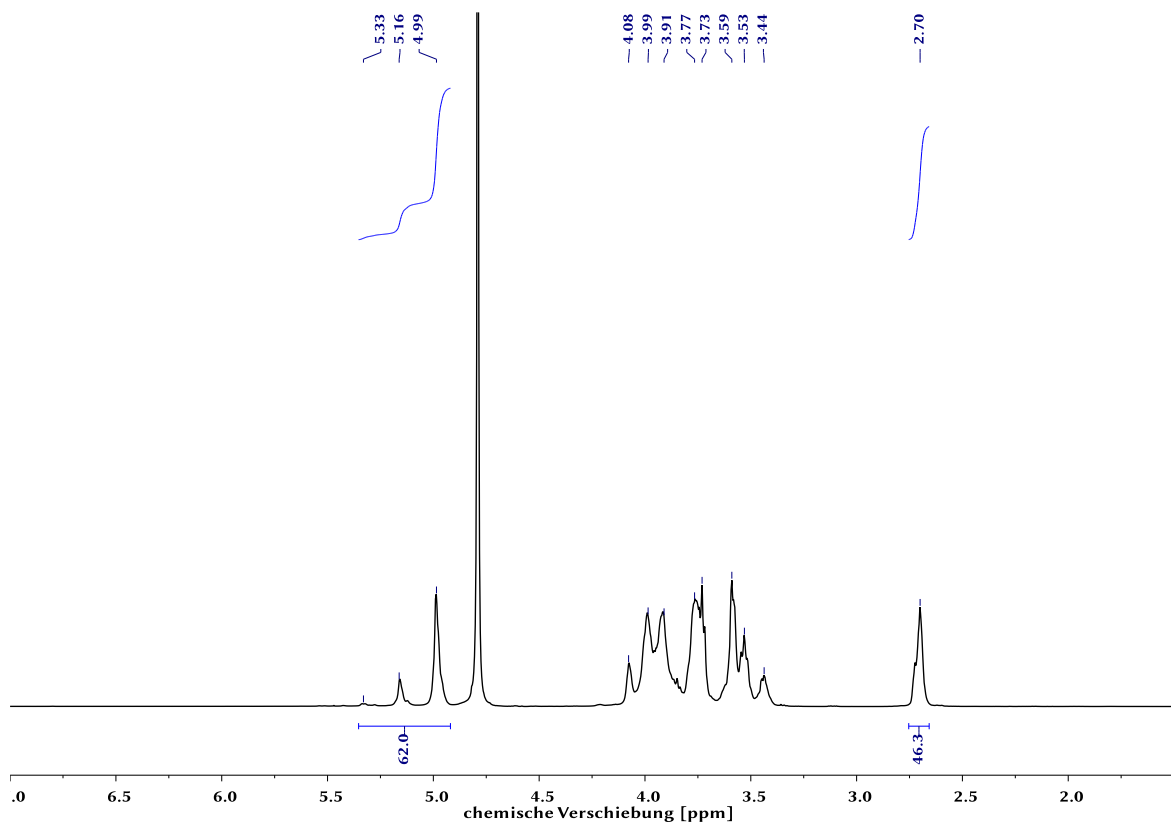


Abbildung A. 69: ^1H -Spektrum von **CED3** (700 MHz, D_2O). Es sind 23,2 Carboxyethylsubstituenten pro Dextran gebunden.

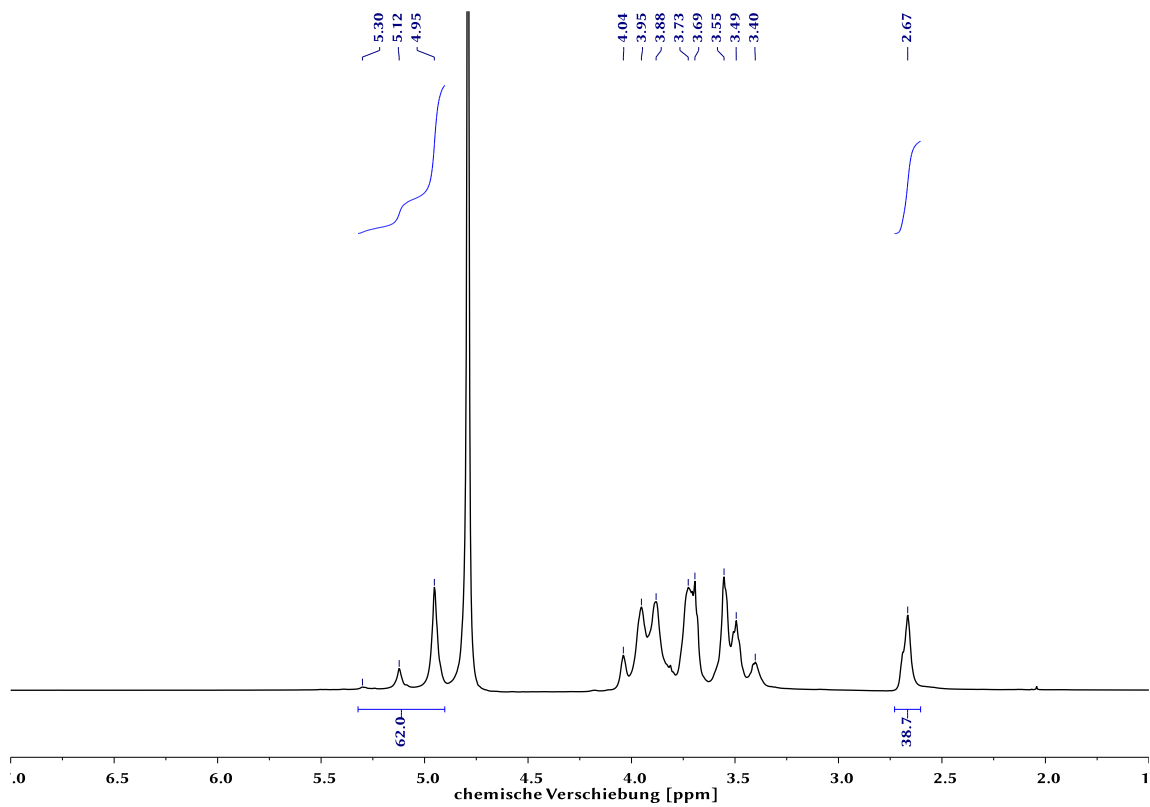


Abbildung A. 70: ^1H -Spektrum von **CED4** (700 MHz, D_2O). Es sind 19,4 Carboxyethylsubstituenten pro Dextran gebunden.

Maleinimidextrane

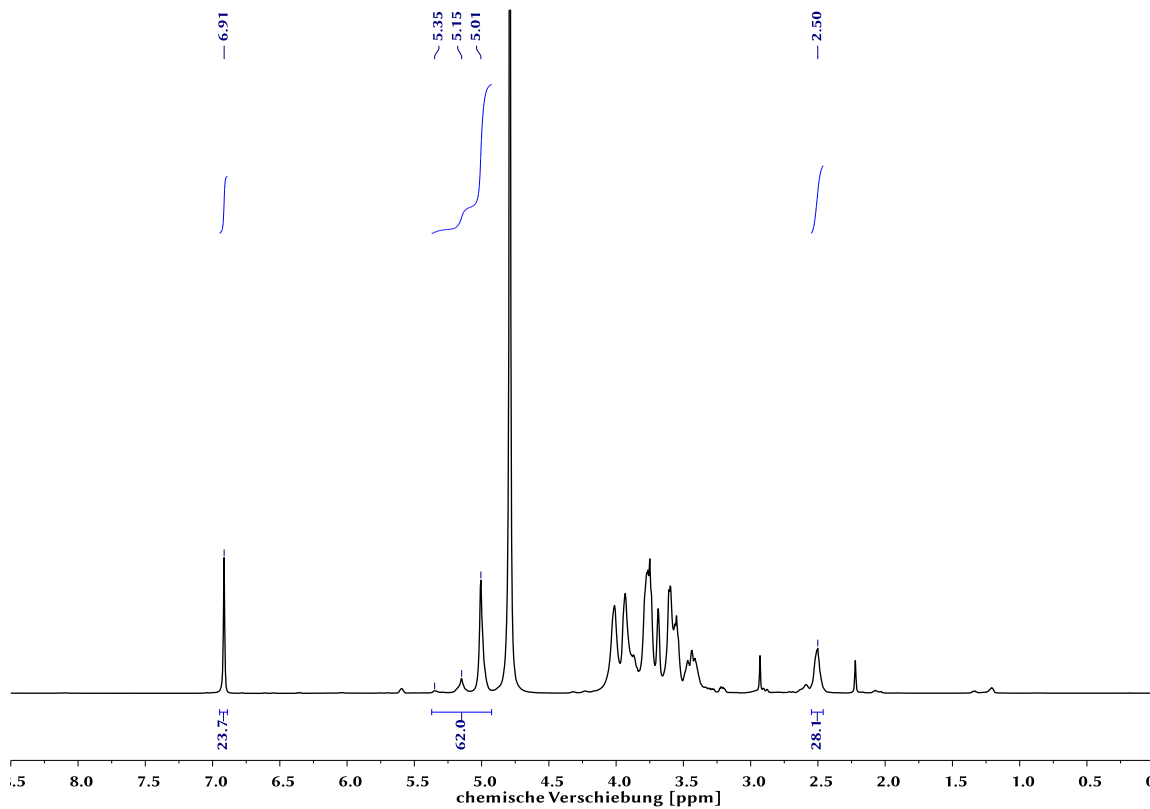


Abbildung A. 71: ^1H -Spektrum von **MID1** (700 MHz, D_2O). Es sind 11,9 Maleinimidsubstituenten pro Dextran gebunden.

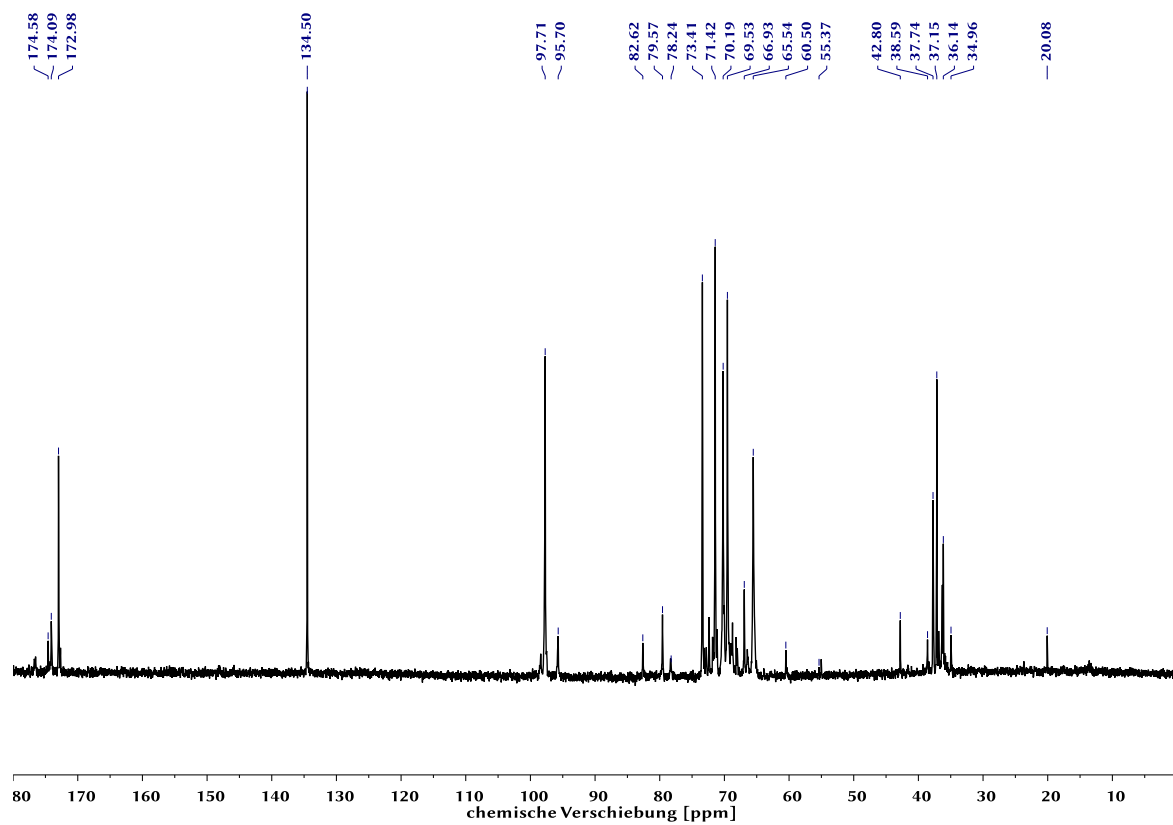


Abbildung A. 72: ^{13}C -Spektrum von **MID1** (176 MHz, D_2O).

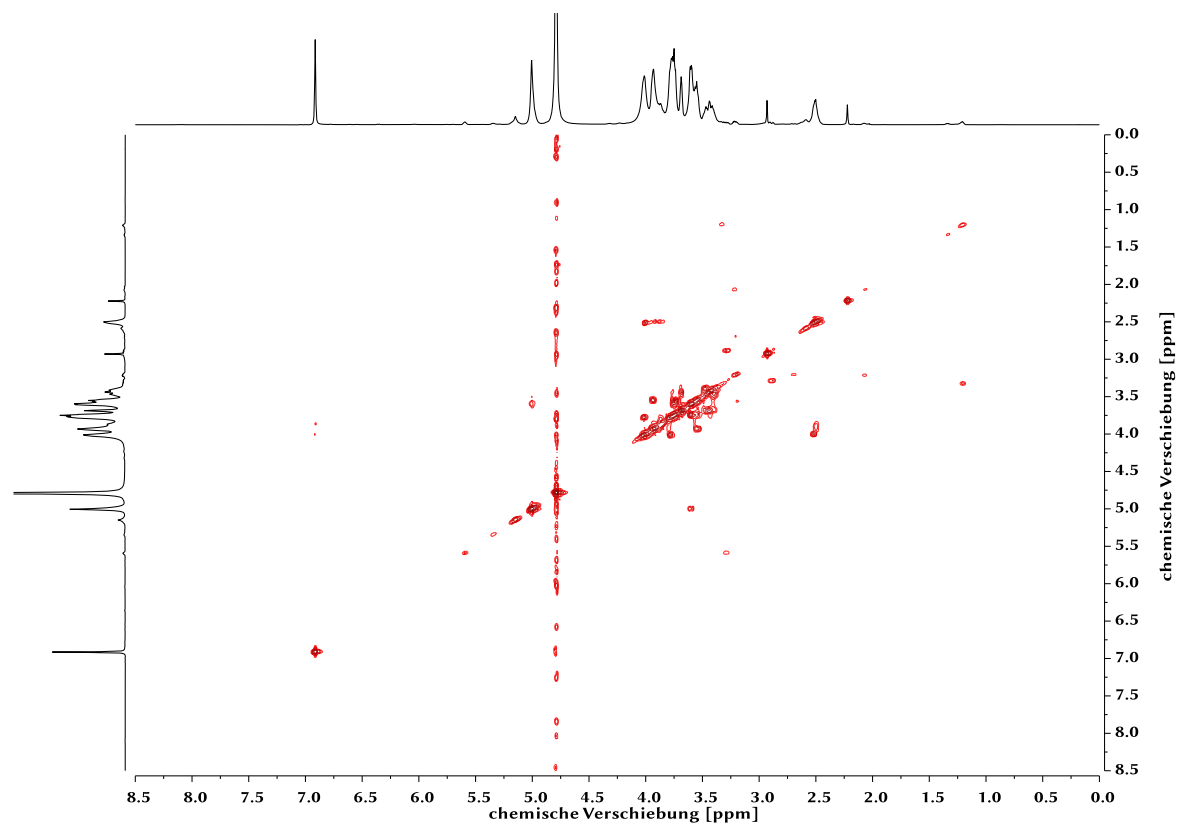


Abbildung A. 73: ^1H , ^1H -COSY-Spektrum von **MID1** (700 MHz, D_2O).

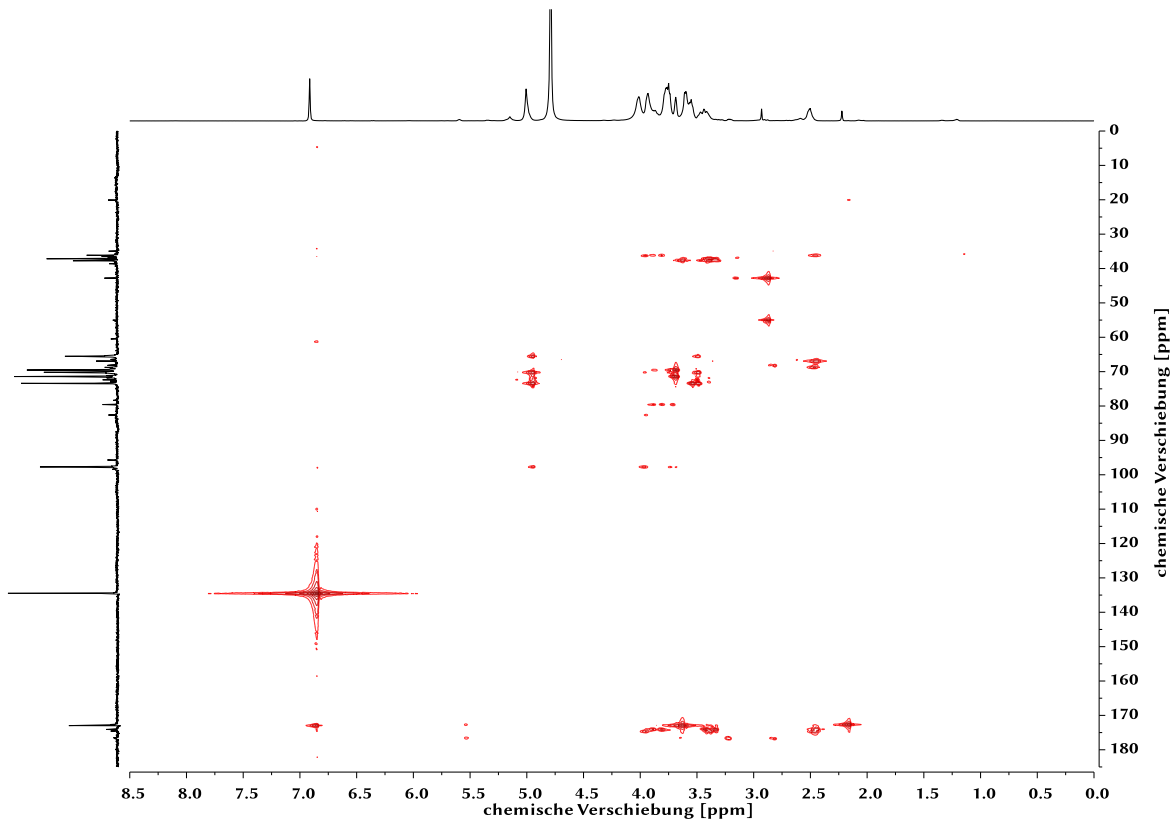


Abbildung A. 74: ^1H , ^{13}C -HMBC-Spektrum von **MID1** (700 MHz/ 176 MHz, D_2O).

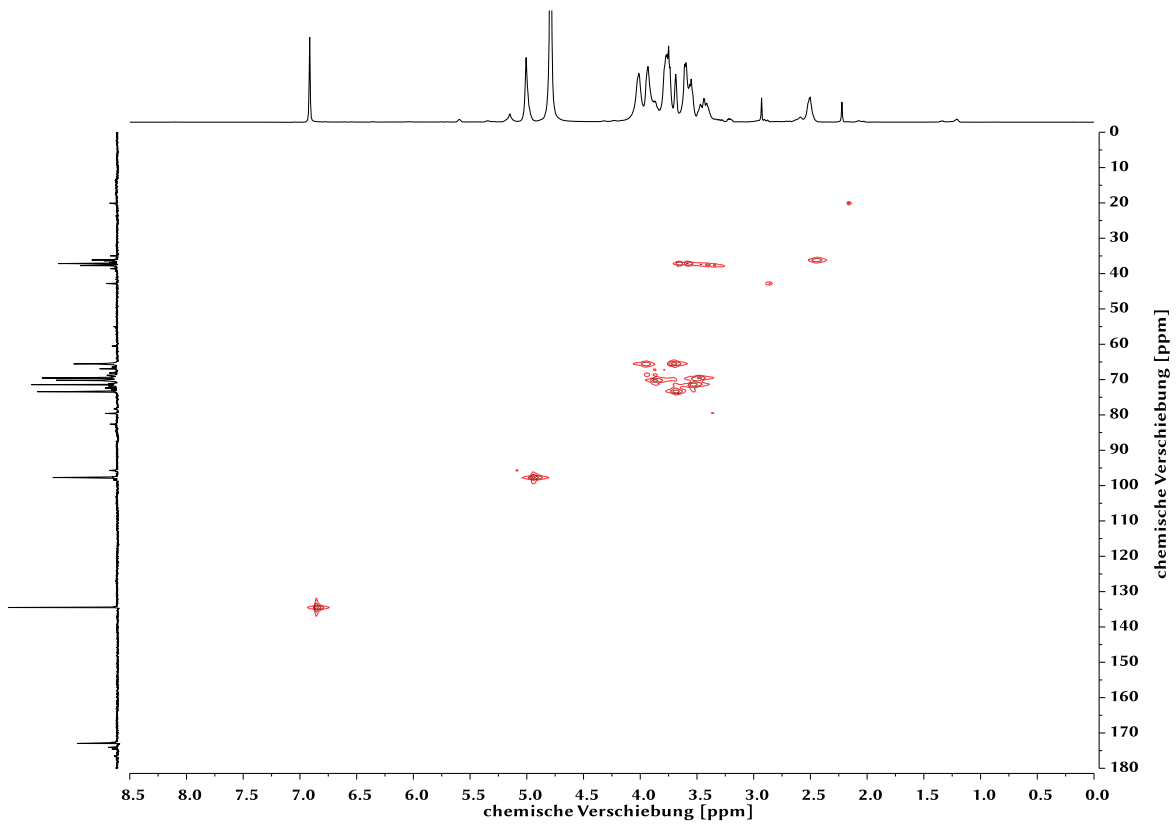


Abbildung A. 75: ^1H , ^{13}C -HMQC-Spektrum von **MID1** (700 MHz/ 176 MHz, D_2O).

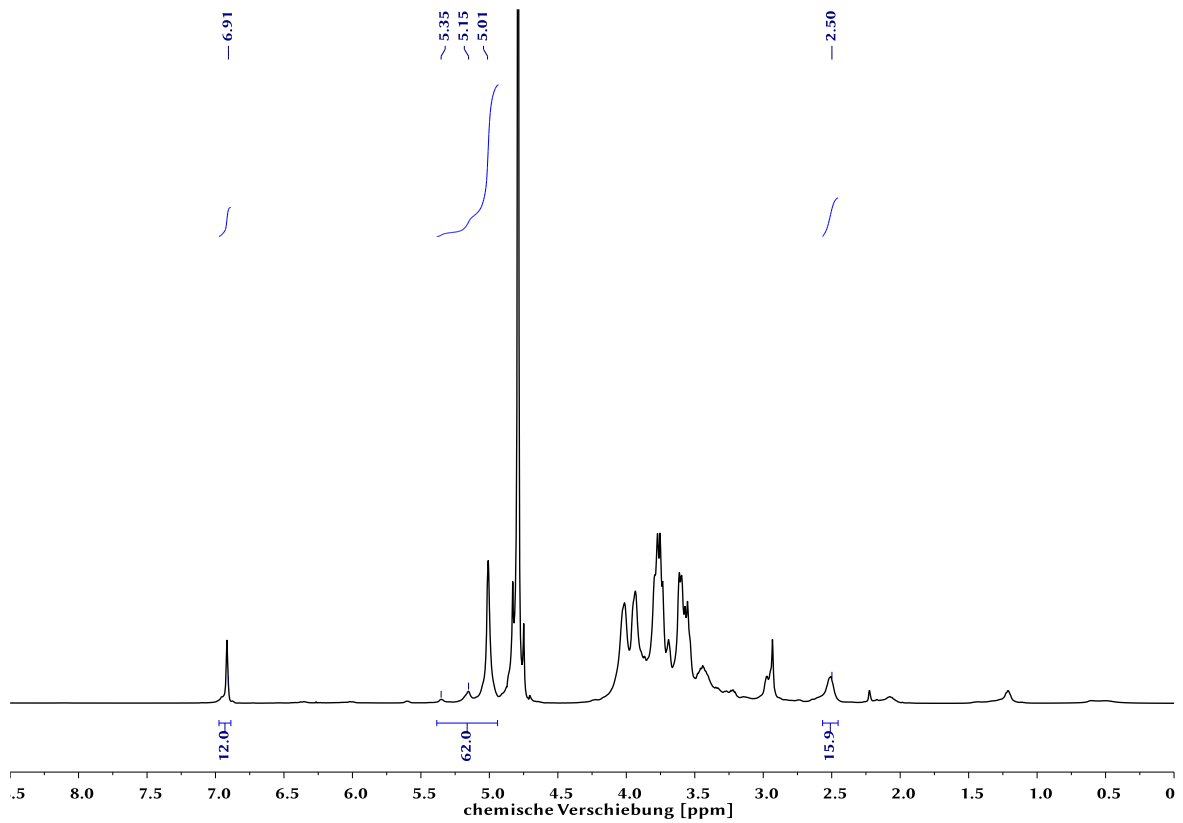


Abbildung A. 76: ^1H -Spektrum von **MID2** (500 MHz, D_2O). Es sind 6,0 Maleinimidsubstituenten pro Dextran gebunden.

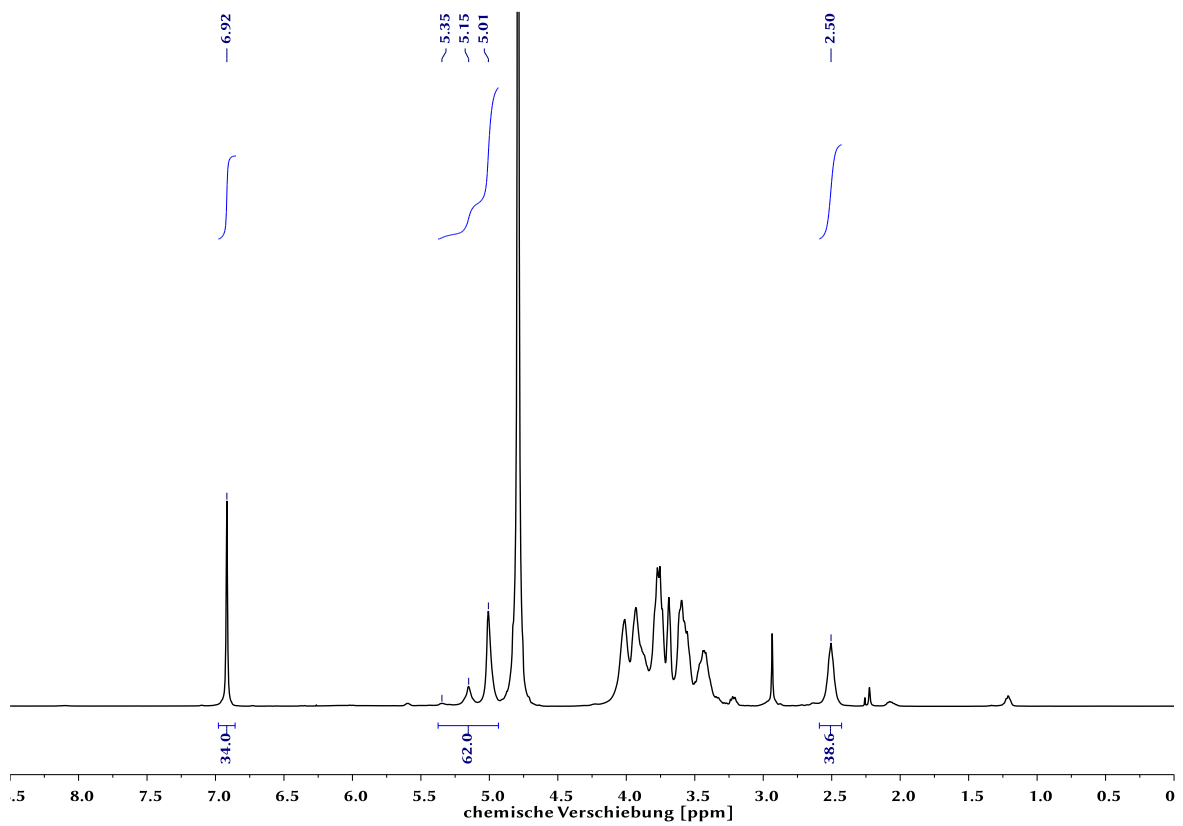


Abbildung A. 77: ^1H -Spektrum von **MID3** (500 MHz, D_2O). Es sind 17,0 Maleinimidsubstituenten pro Dextran gebunden.

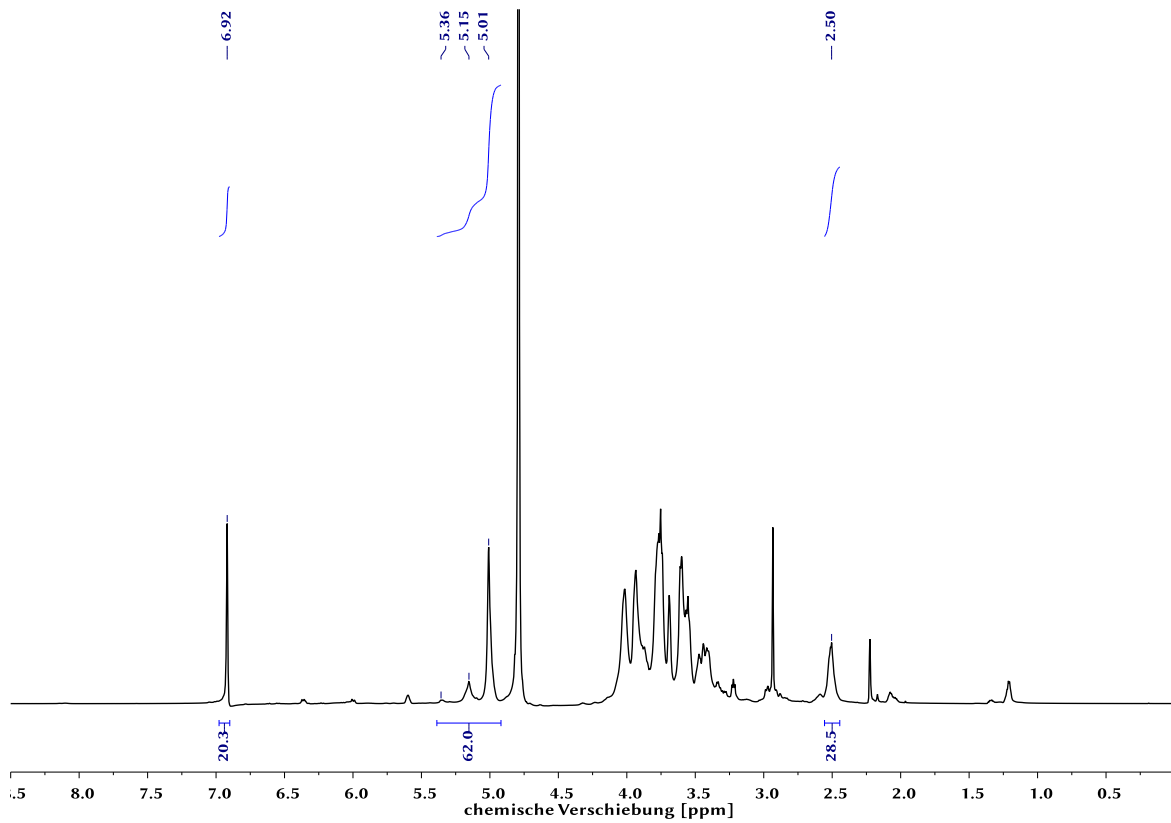


Abbildung A. 78: ^1H -Spektrum von **MID4** (700 MHz, D_2O). Es sind 10,2 Maleinimidsubstituenten pro Dextran gebunden.

Peptide

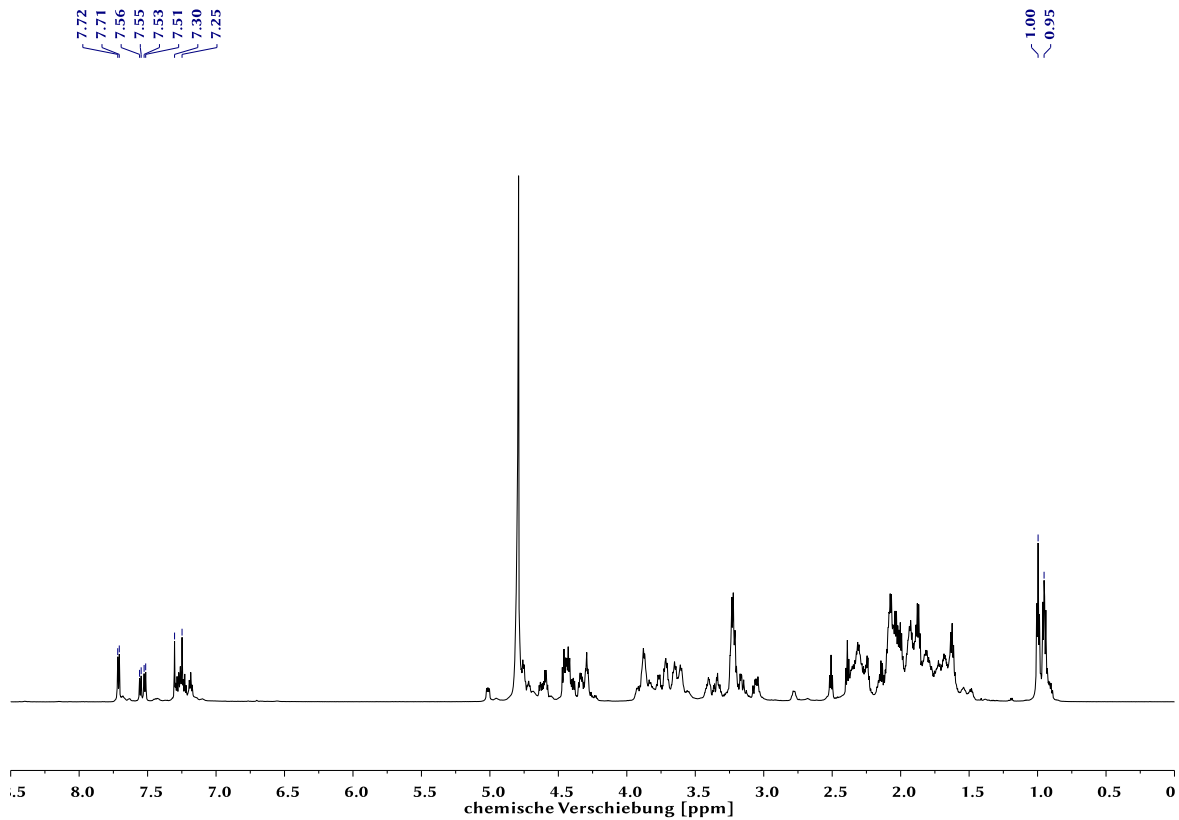


Abbildung A. 79: ^1H -Spektrum des affinen Peptids **8** (700 MHz, D_2O).

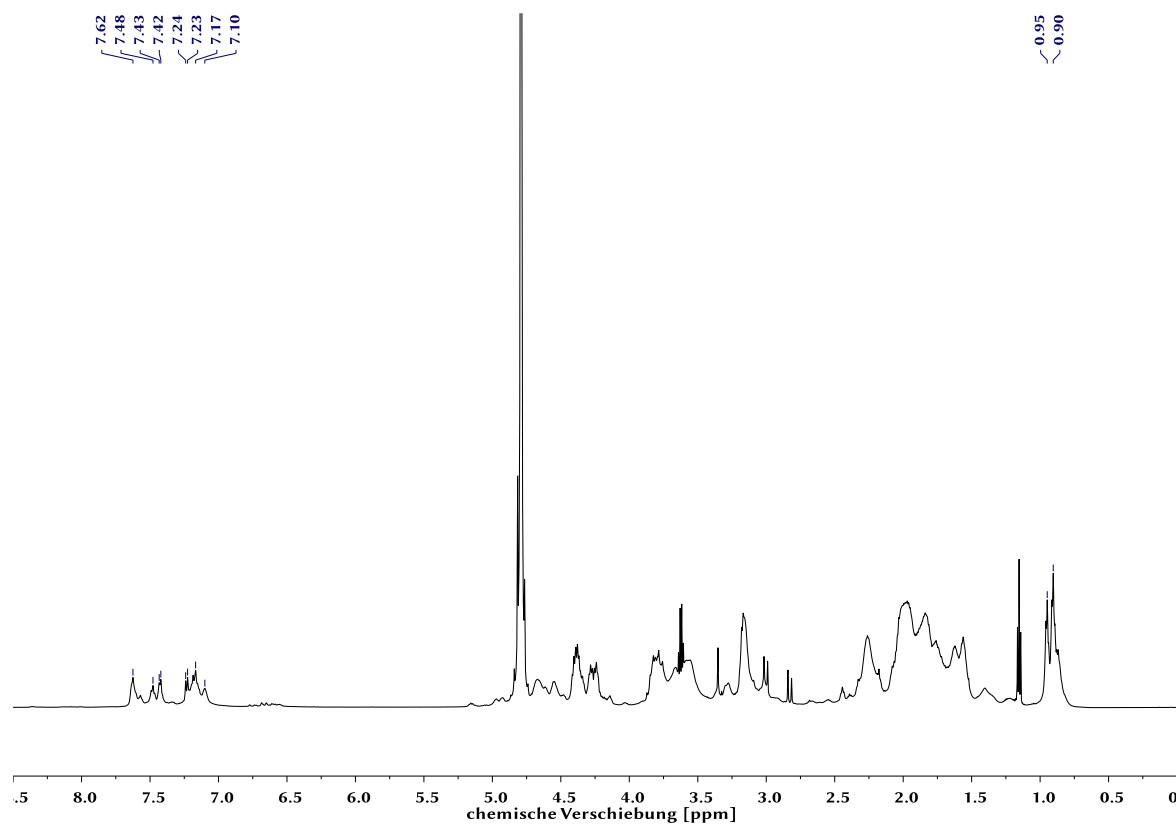


Abbildung A. 80: ^1H -Spektrum des hochaffinen Peptids **9** (600 MHz, D_2O).

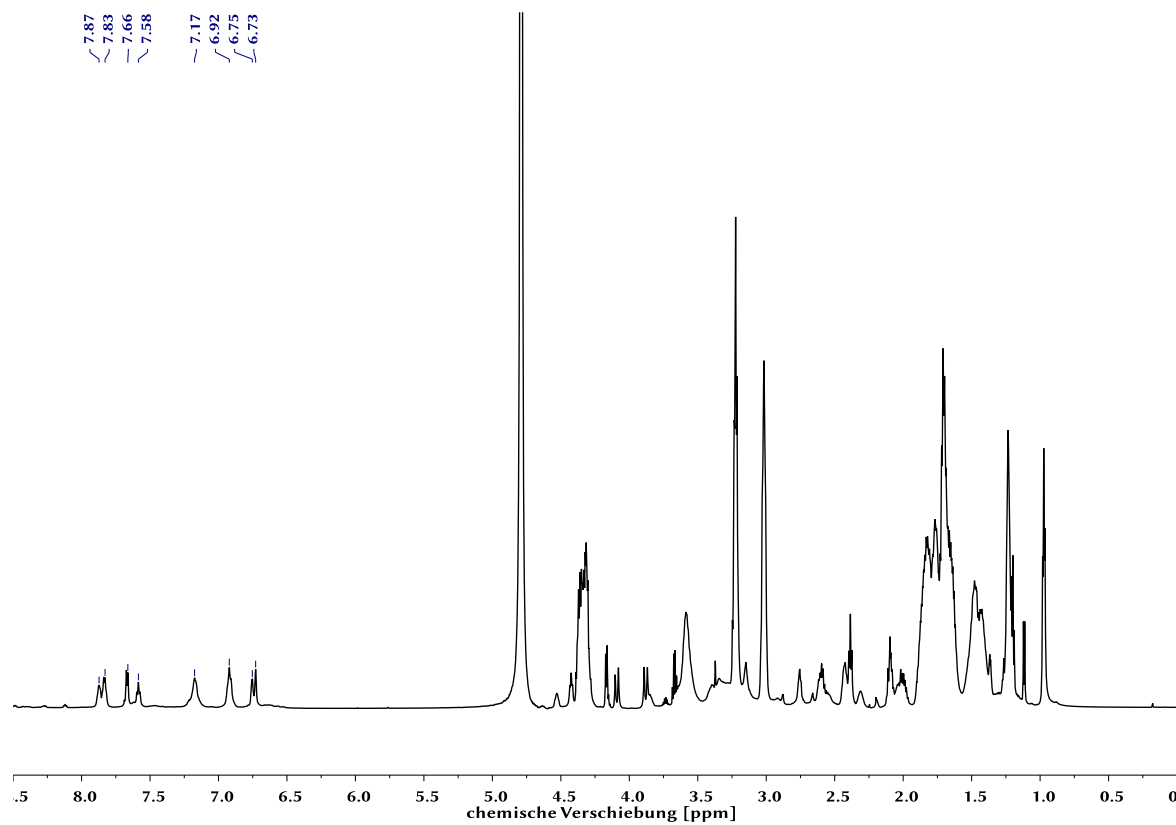


Abbildung A. 81: ^1H -Spektrum des Rhodamin B-Piperazinamid-tragenden Peptids Lys(RhB Pip)-NLS-TAT **19** (700 MHz, D_2O).

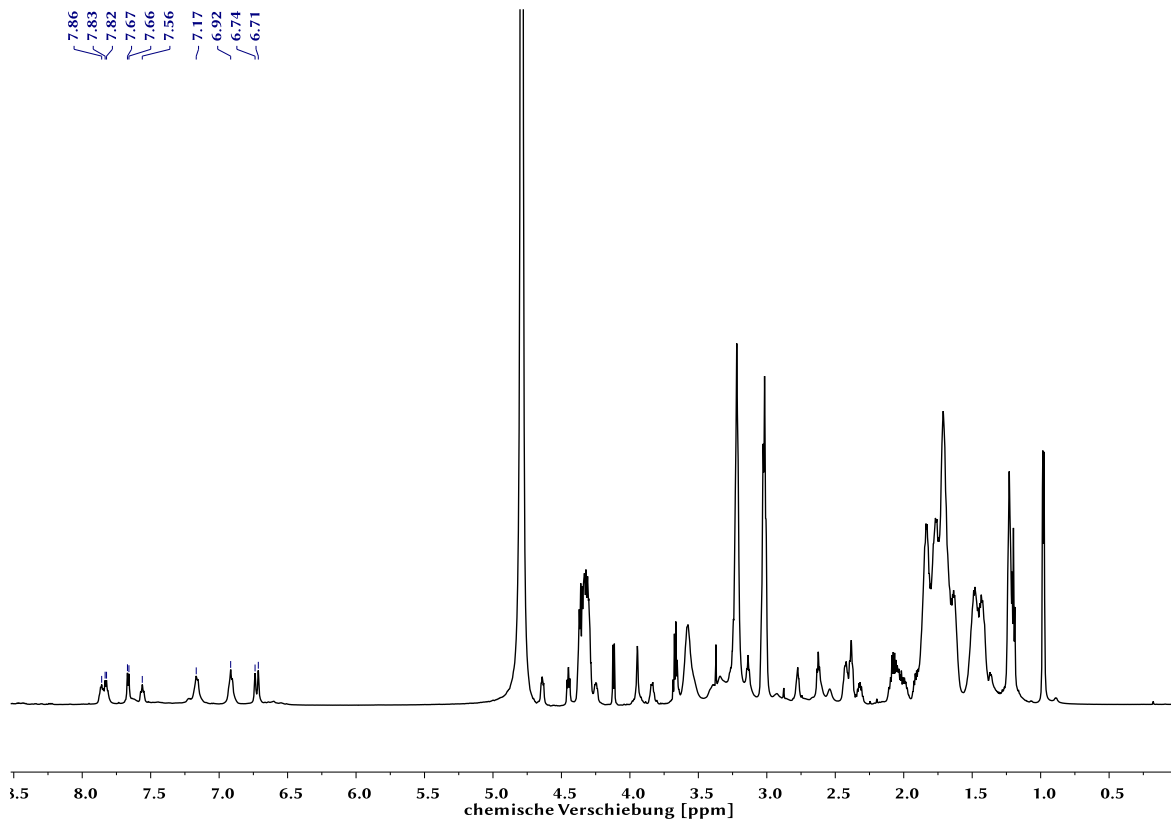


Abbildung A. 82: ¹H-Spektrum des Rhodamin B-Piperazinamid-tragenden Peptids Lys(RhB Pip)-TAT-NLS 20 (700 MHz, D₂O).

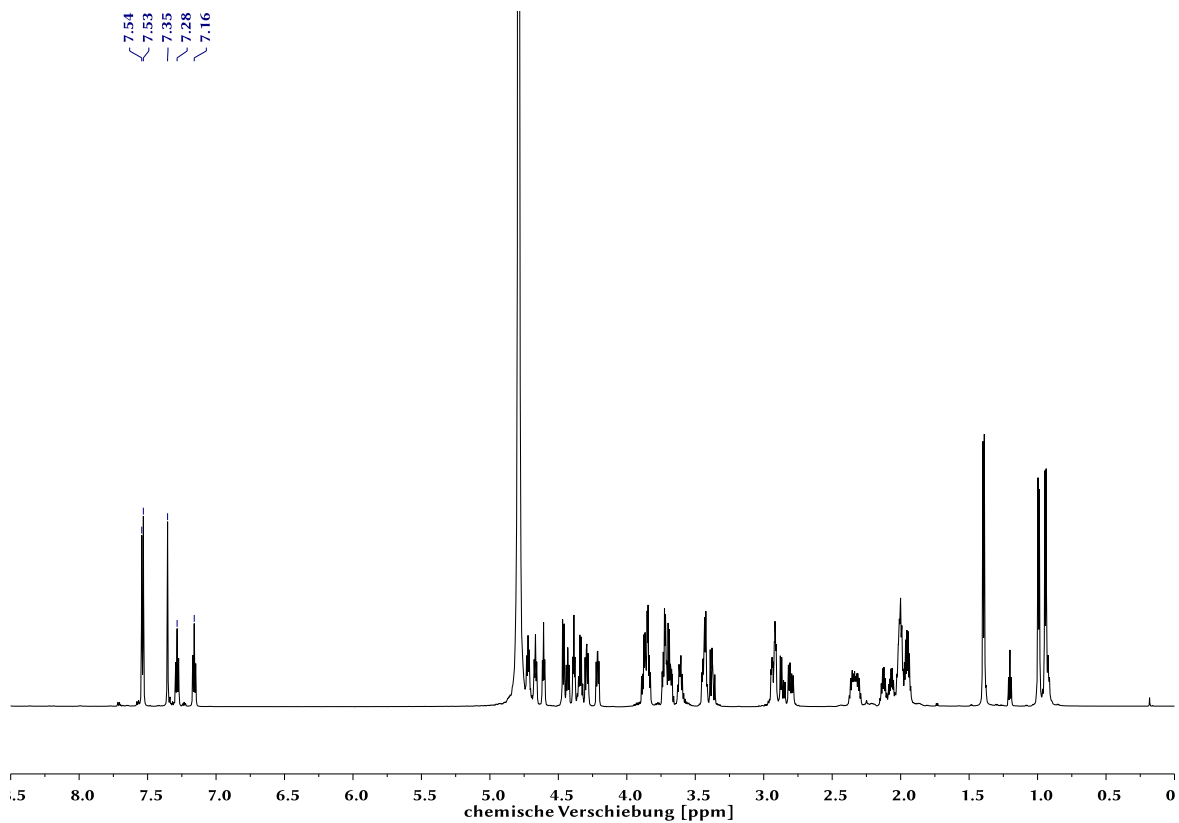


Abbildung A. 83: ¹H-Spektrum des nicht-bindenden Peptids IVS-Negativ 22 (700 MHz, D₂O).

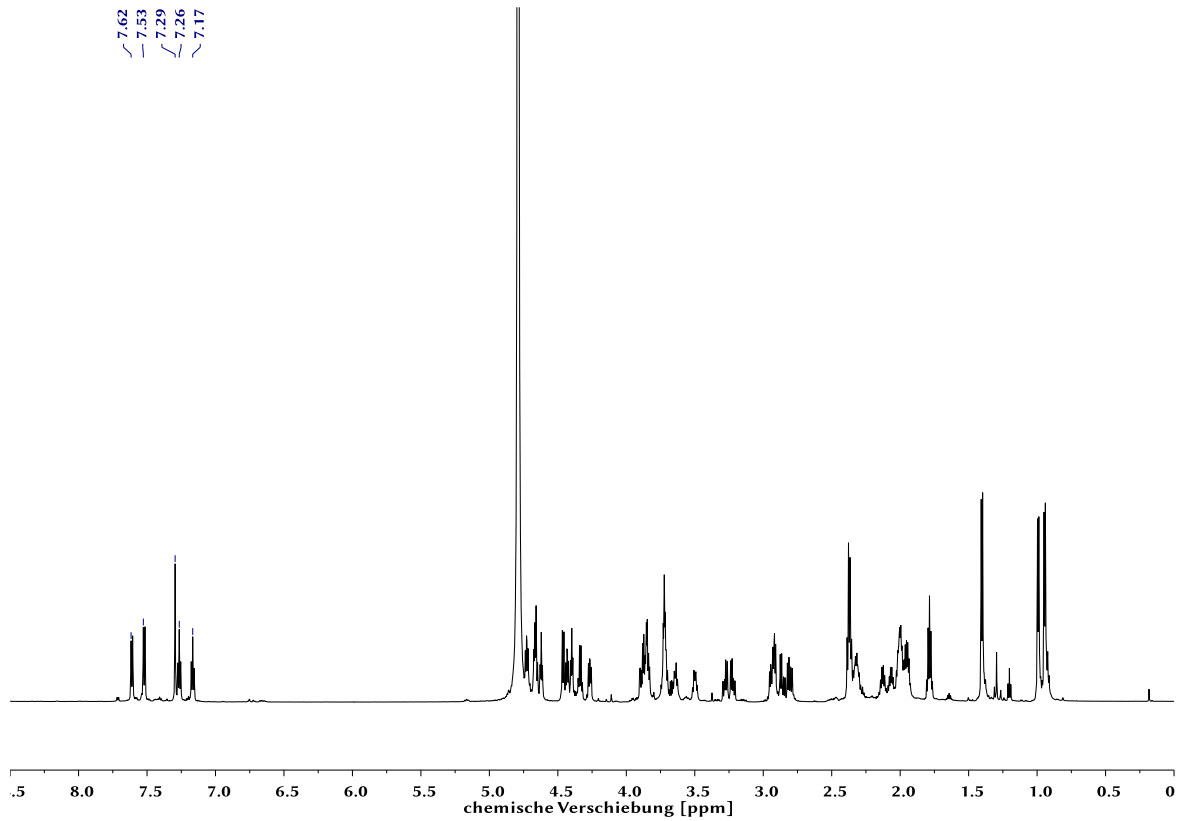


Abbildung A. 84: ^1H -Spektrum des nicht-bindenden Peptids IVS-Negativ mit Thiollinker **22b** (700 MHz, D_2O).

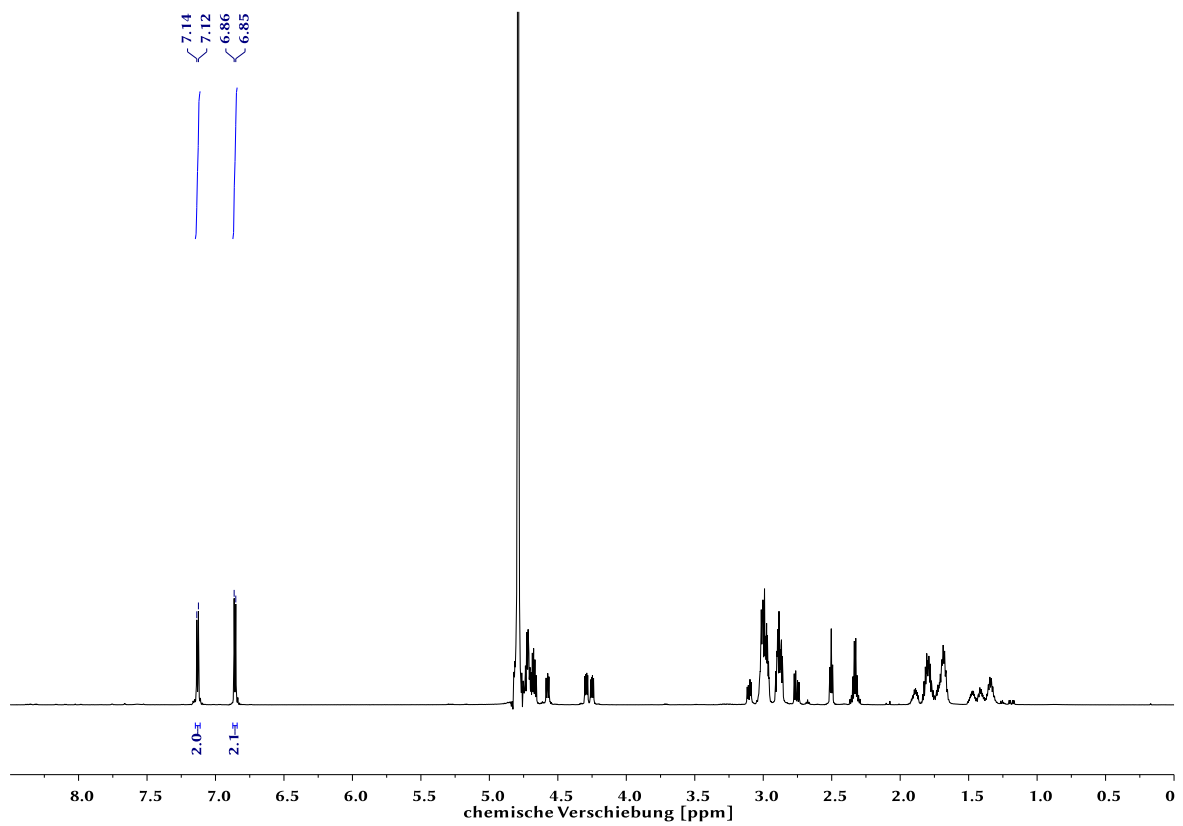


Abbildung A. 85: ^1H -Spektrum des FLAG-Tags **23** (700 MHz, D_2O).

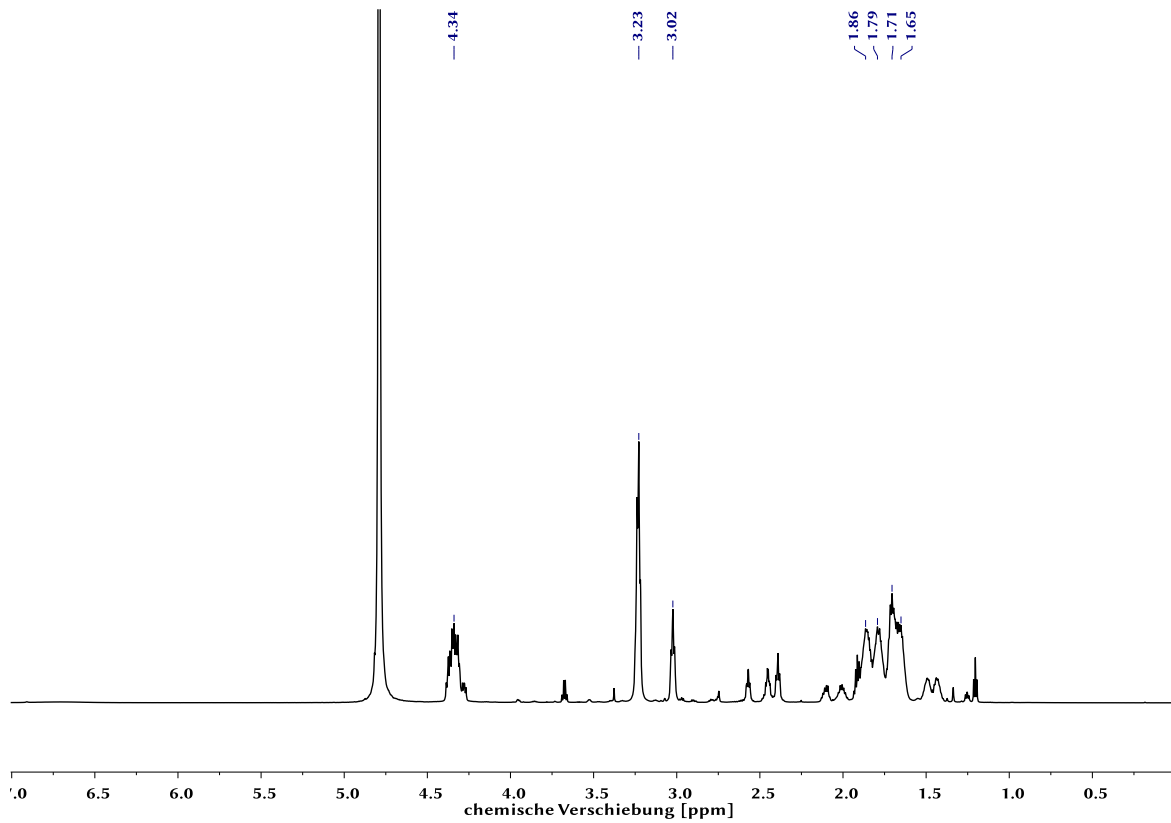


Abbildung A. 86: ¹H-Spektrum des zellpenetrierenden Peptids TAT **11** (700 MHz, D₂O).

Konjugate

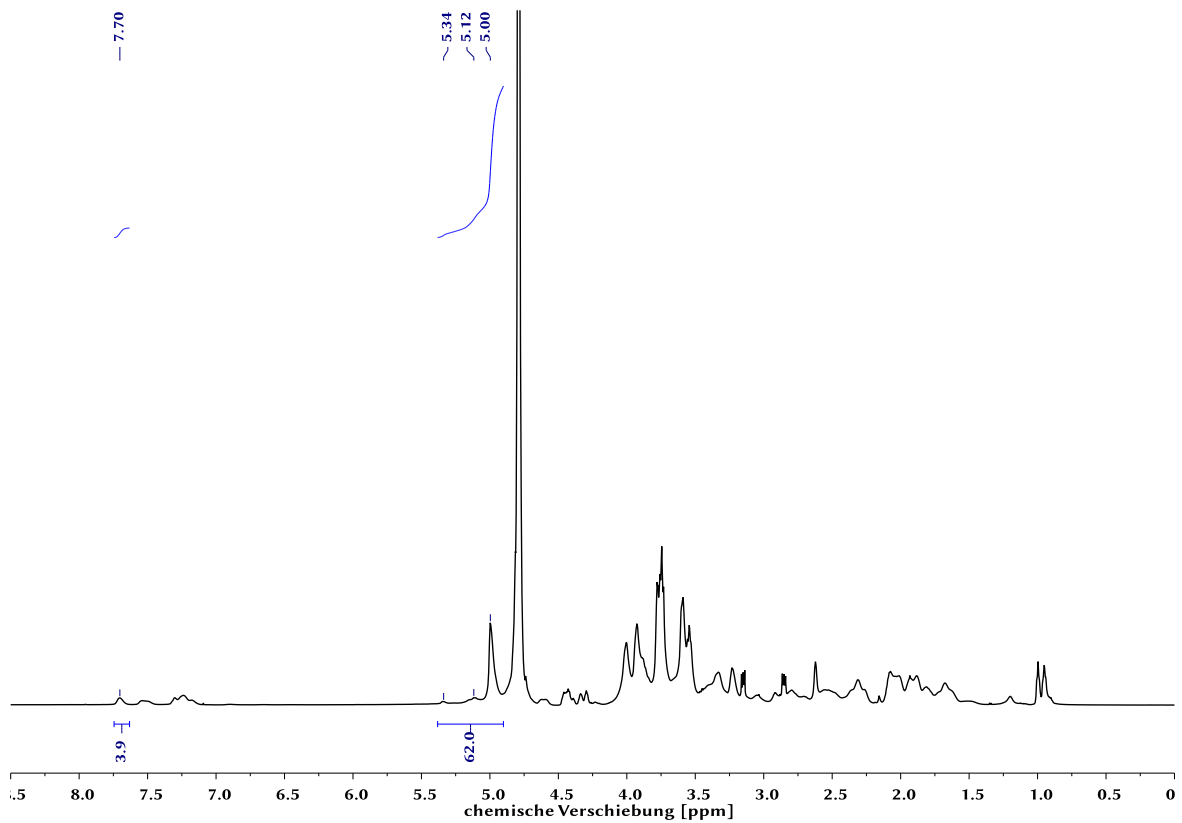


Abbildung A. 87: ¹H-Spektrum von **K14** (700 MHz, D₂O). Es sind 3,9 affine Peptide pro Dextran gebunden.

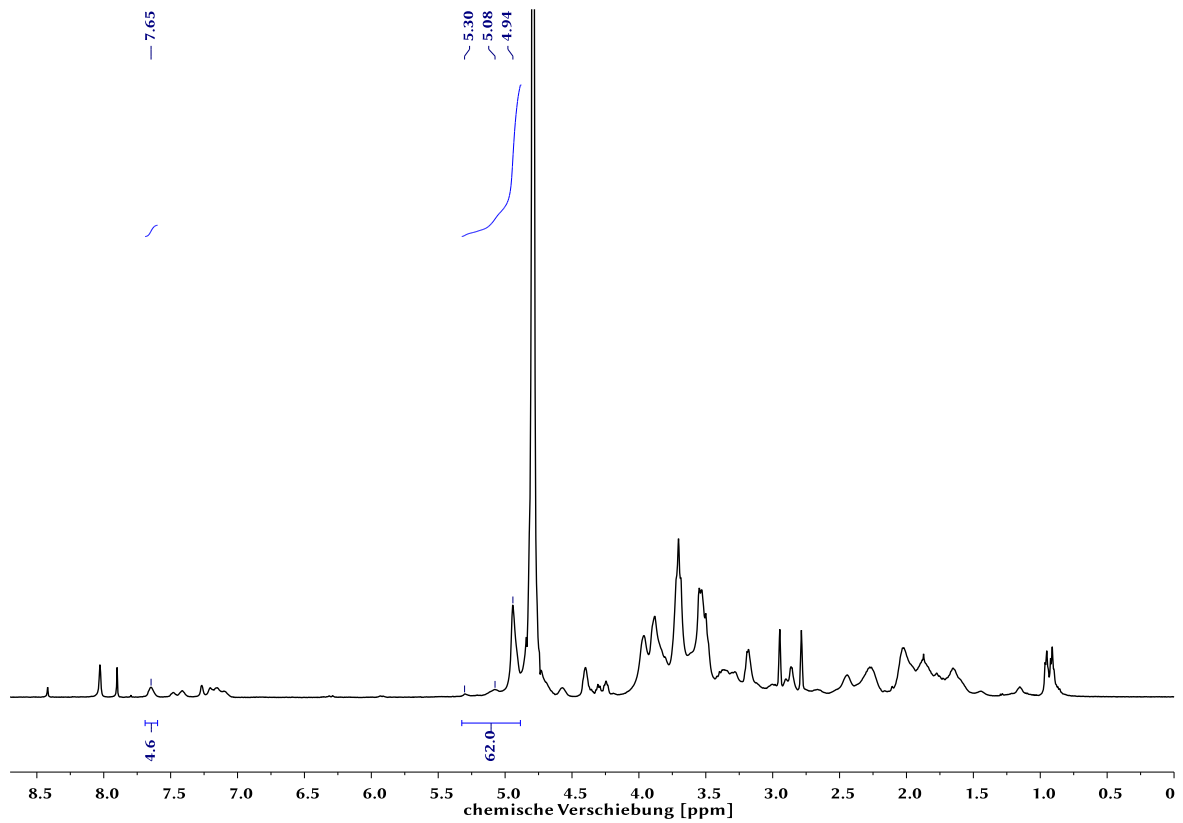


Abbildung A. 88: ^1H -Spektrum von **K15** (500 MHz, D_2O). Es sind 4,6 affine Peptide pro Dextran gebunden.

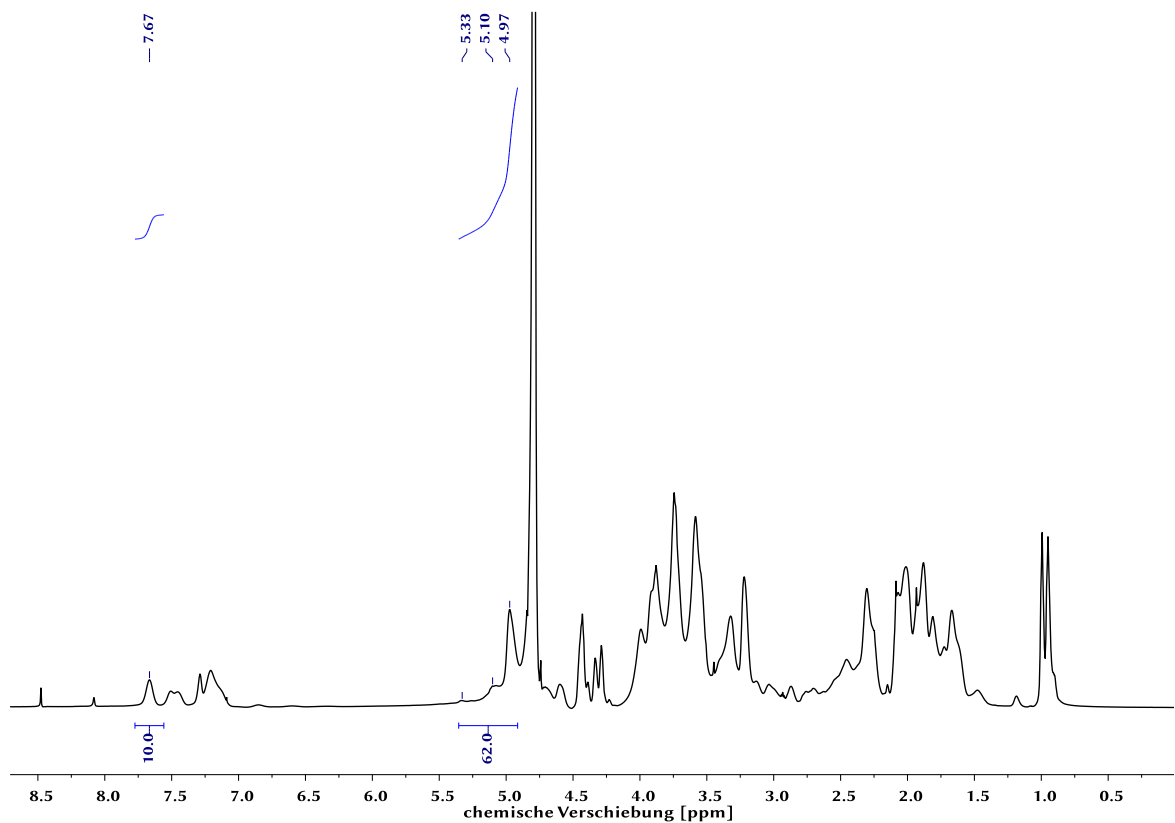


Abbildung A. 89: ^1H -Spektrum von **K16** (700 MHz, D_2O). Es sind 10,0 affine Peptide pro Dextran gebunden.

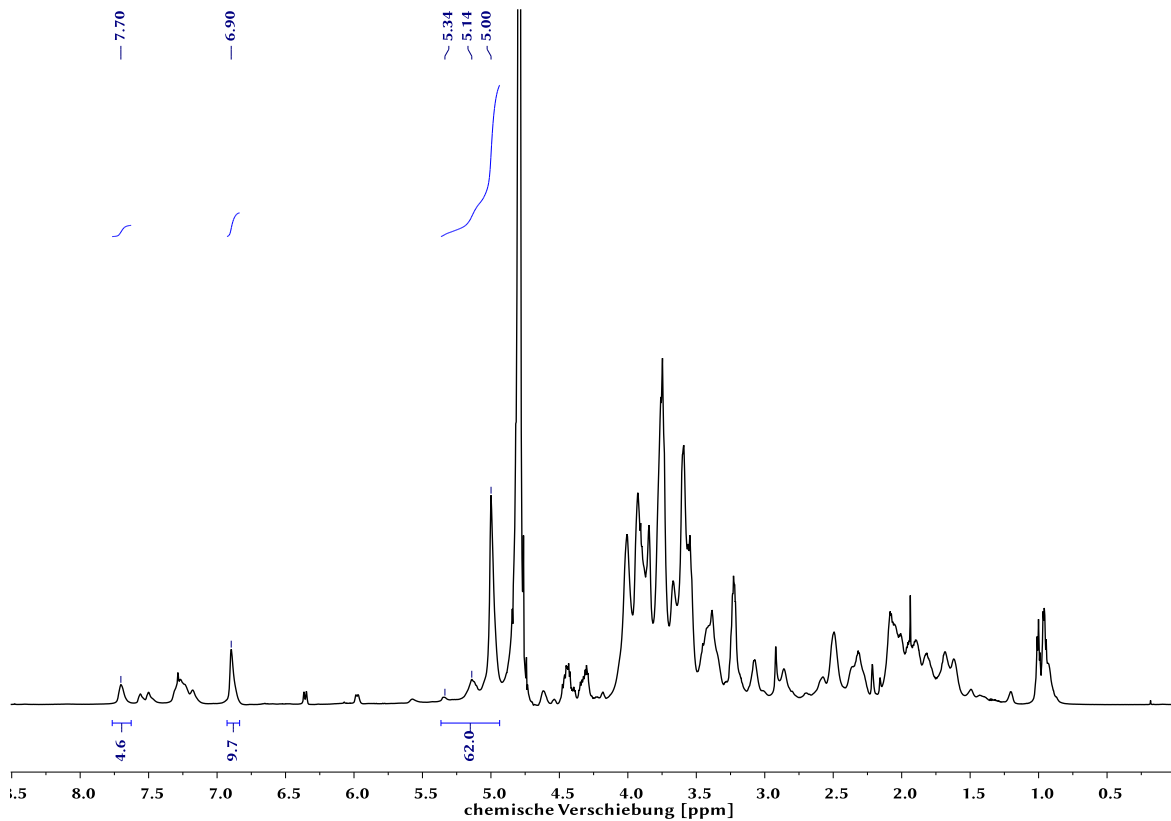


Abbildung A. 90: ^1H -Spektrum von **K12** (700 MHz, D_2O). Es sind 2,3 hochaffine Peptide pro Dextran gebunden. Die Beladung des Thiol-RhB Pips wurde mittels Absorption bestimmt.

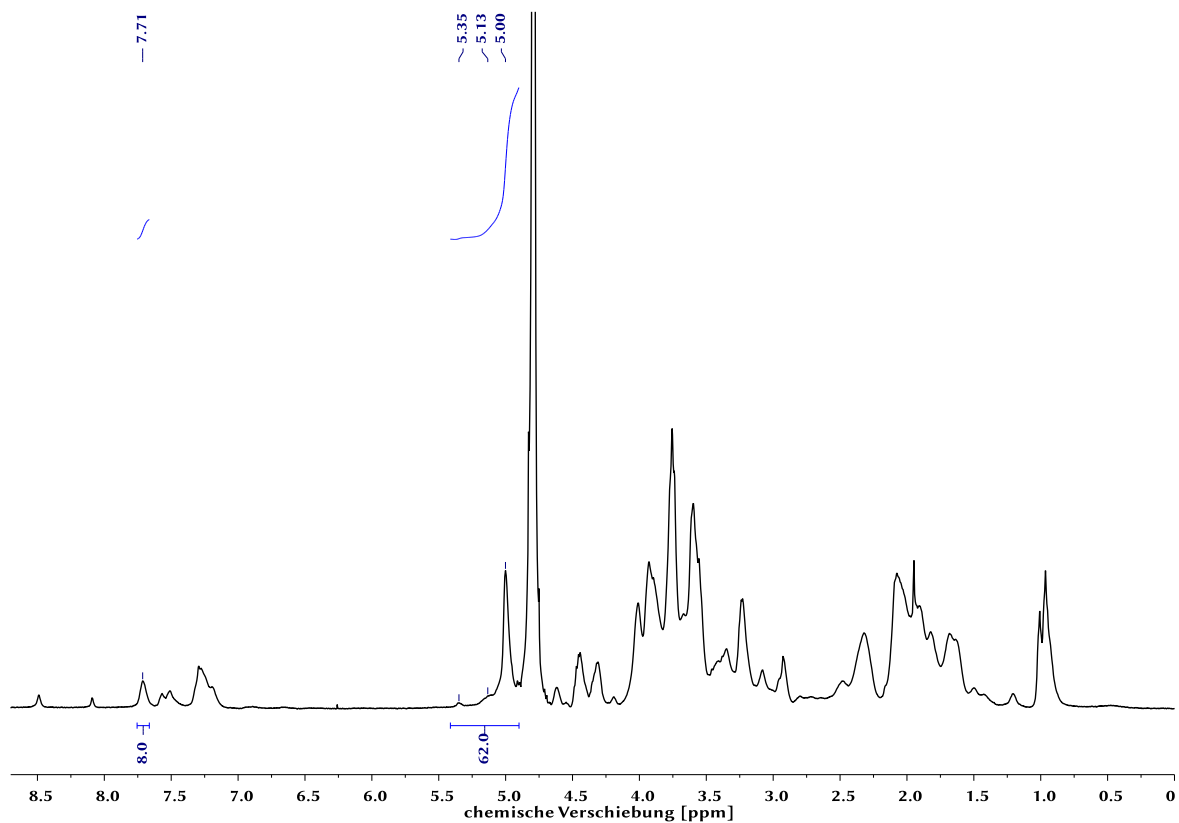


Abbildung A. 91: ^1H -Spektrum von **K17** (500 MHz, D_2O). Es sind 4,0 hochaffine Peptide pro Dextran gebunden.

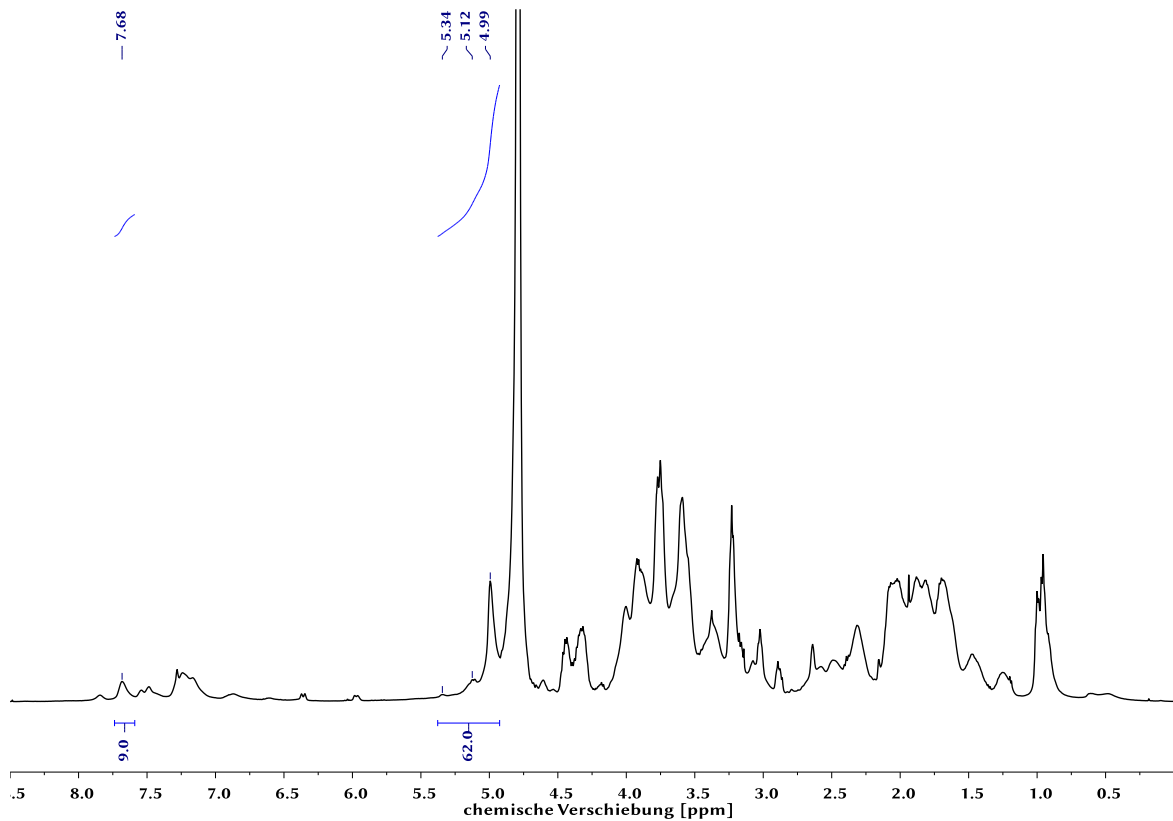


Abbildung A. 92: ¹H-Spektrum von **K4** (500 MHz, D₂O). Es sind 4,5 hochaffine Peptide pro Dextran gebunden. Die Beladung des Lys(RhB Pip)-NLS-TAT wurde mittels Absorption bestimmt.

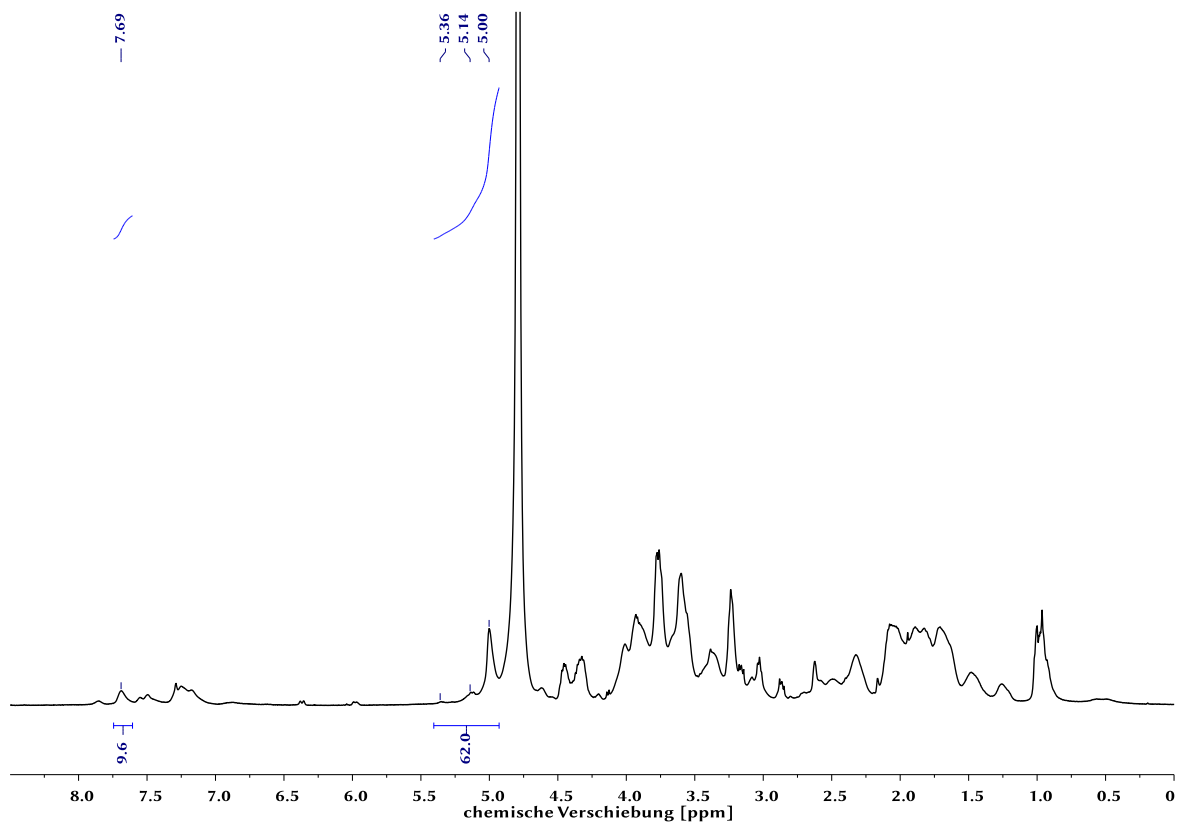


Abbildung A. 93: ¹H-Spektrum von **K5** (500 MHz, D₂O). Es sind 4,8 hochaffine Peptide pro Dextran gebunden. Die Beladung des Lys(RhB Pip)-TAT-NLS wurde mittels Absorption bestimmt.

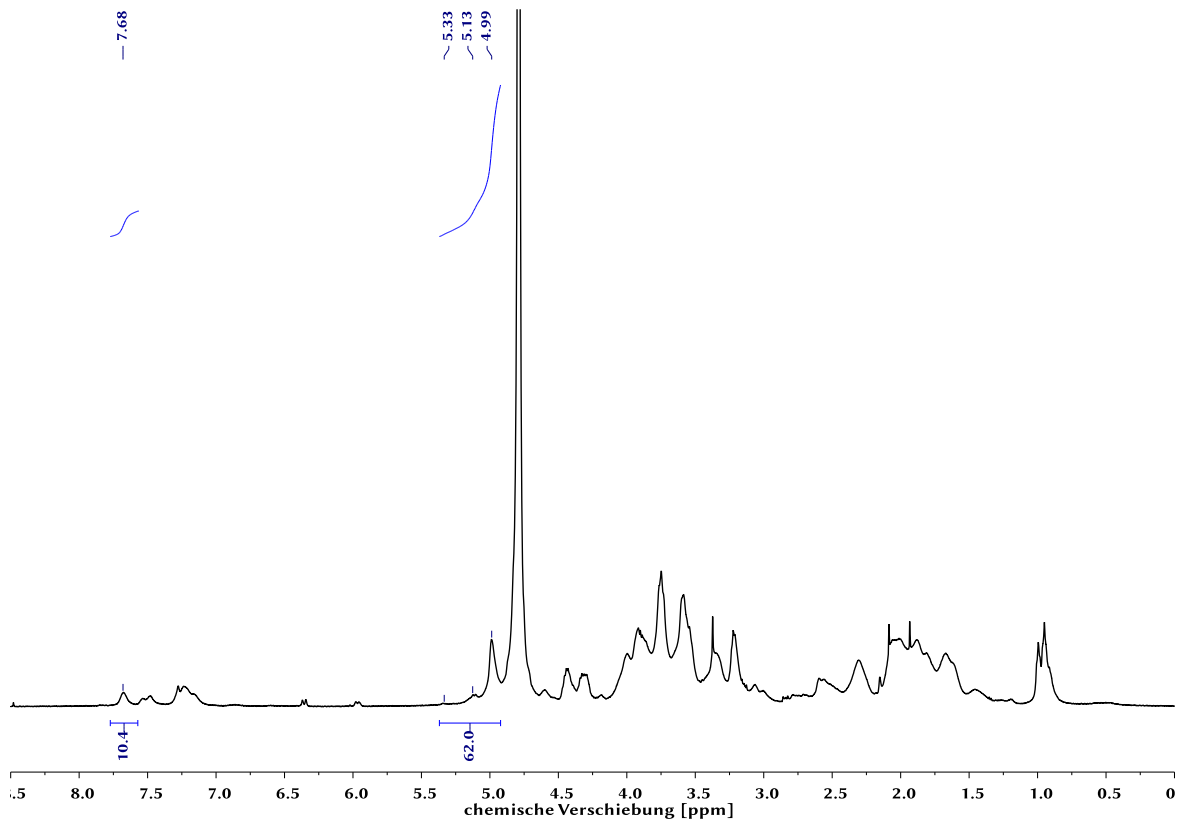


Abbildung A. 94: ^1H -Spektrum von **K6** (500 MHz, D_2O). Es sind 5,2 hochaffine Peptide pro Dextran gebunden. Die Beladung des Lys(RhB Pip)-NLS-TAT wurde mittels Absorption bestimmt.

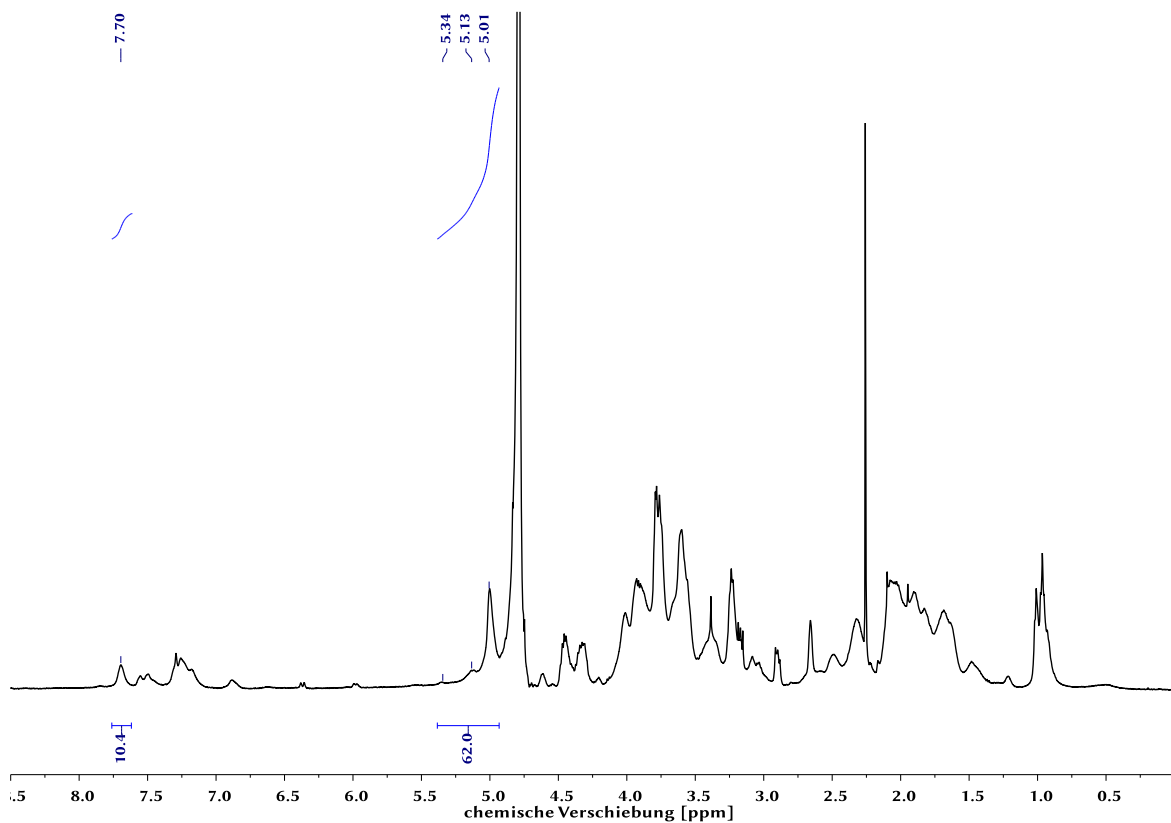


Abbildung A. 95: ^1H -Spektrum von **K7** (500 MHz, D_2O). Es sind 5,2 hochaffine Peptide pro Dextran gebunden. Die Beladung des Lys(RhB Pip)-TAT-NLS wurde mittels Absorption bestimmt.

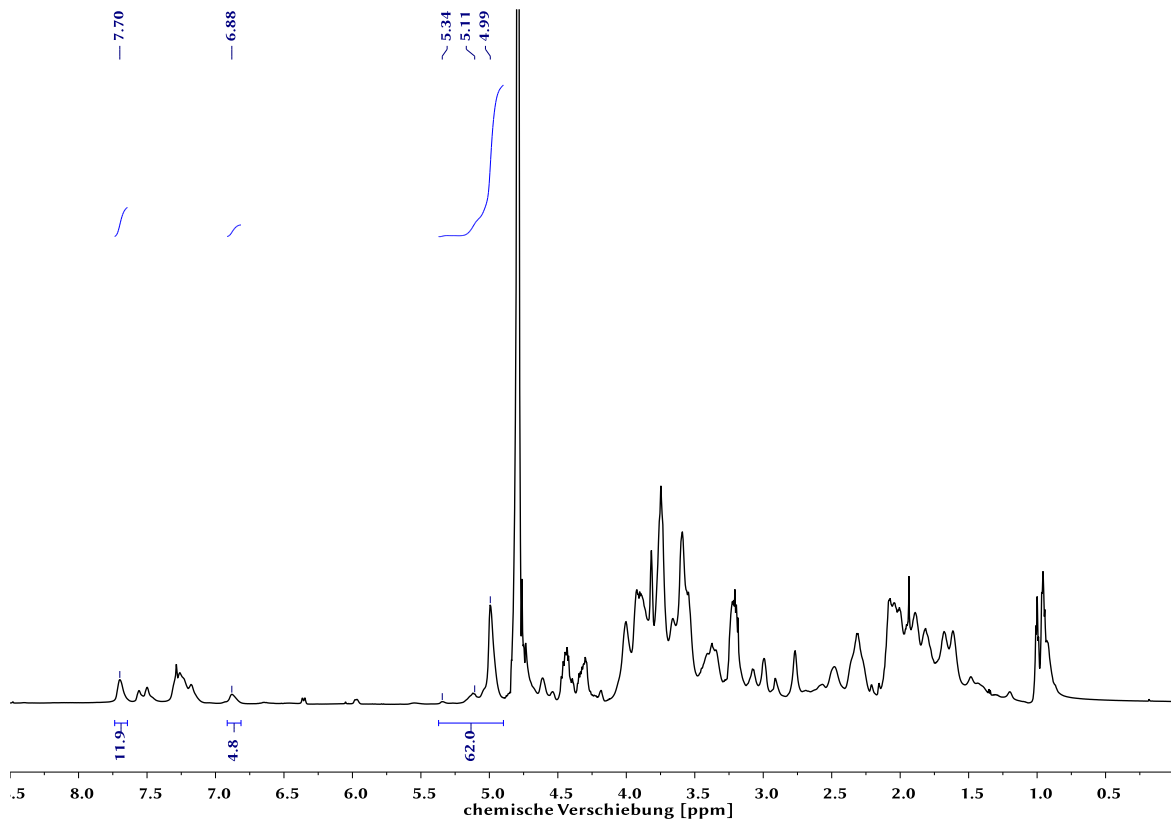


Abbildung A. 96: ^1H -Spektrum von **K13** (700 MHz, D_2O). Es sind 5,9 hochaffine Peptide pro Dextran gebunden. Die Beladung des Thiol-RhB Pips wurde mittels Absorption bestimmt.

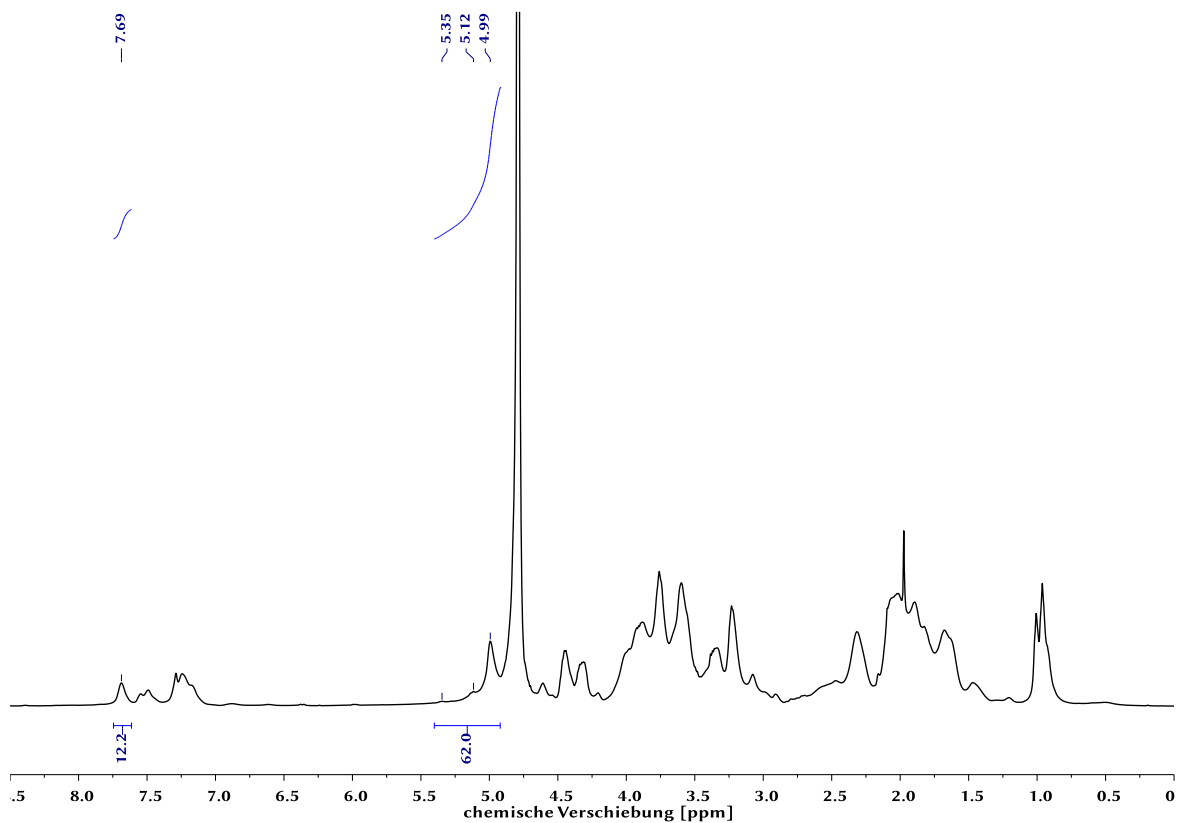


Abbildung A. 97: ^1H -Spektrum von **K1** (500 MHz, D_2O). Es sind 6,1 hochaffine Peptide pro Dextran gebunden. Die Beladung des Lys(RhB Pip)-TAT-NLS wurde mittels Absorption bestimmt.

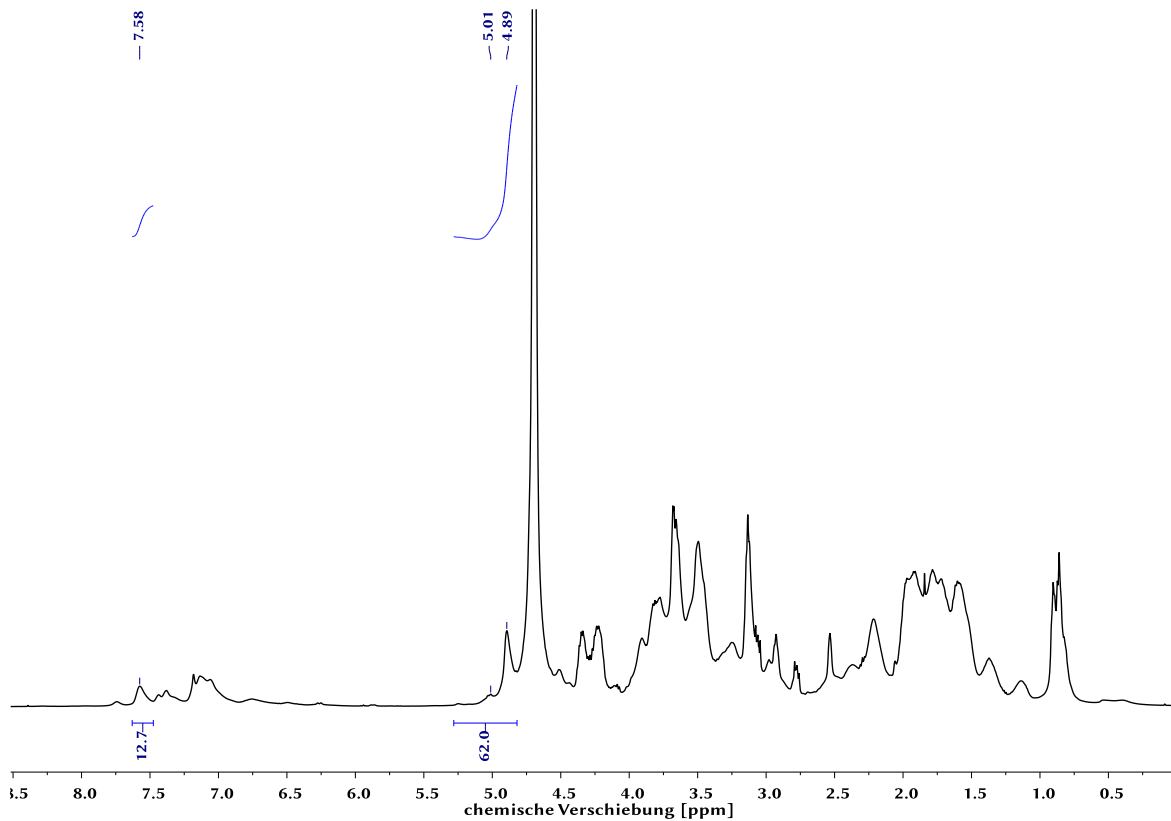


Abbildung A. 98: ¹H-Spektrum von **K8** (500 MHz, D₂O). Es sind 6,3 hochaffine Peptide pro Dextran gebunden. Die Beladung des Lys(RhB Pip)-NLS-TAT wurde mittels Absorption bestimmt.

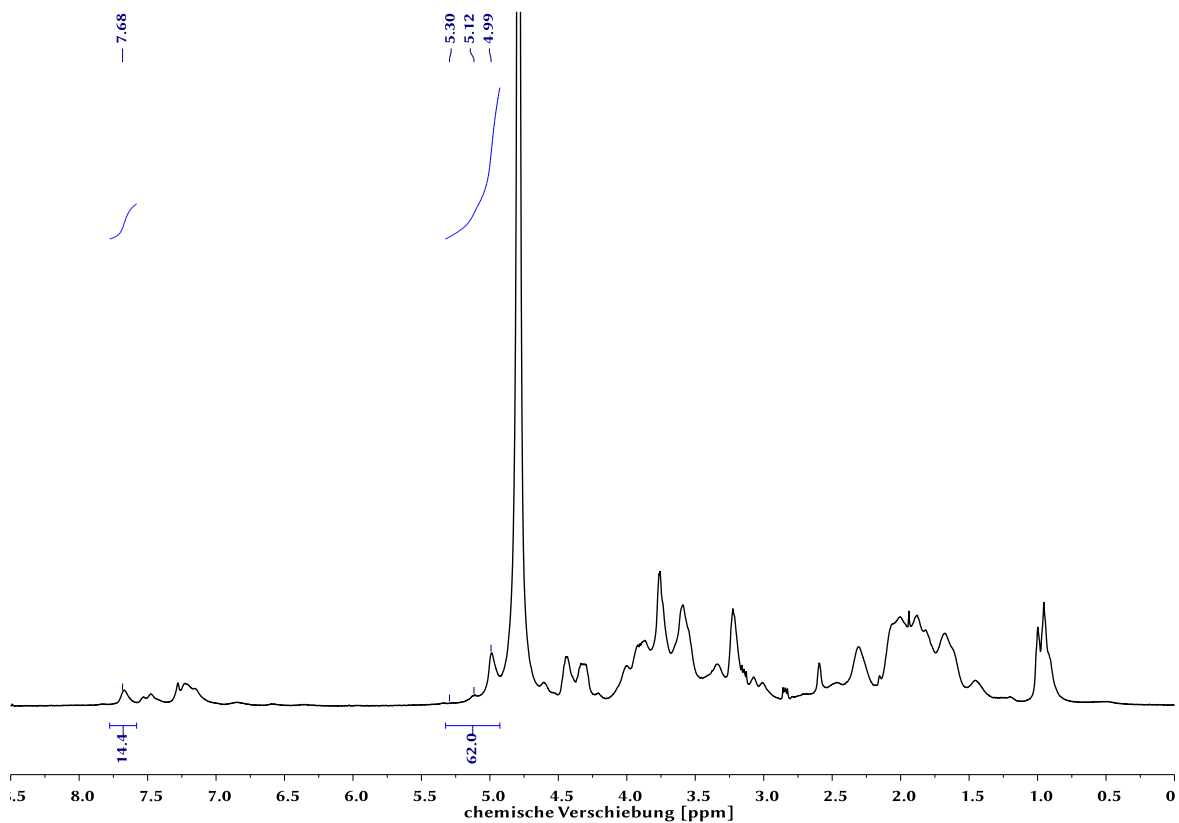


Abbildung A. 99: ¹H-Spektrum von **K9** (500 MHz, D₂O). Es sind 7,2 hochaffine Peptide pro Dextran gebunden. Die Beladung des Lys(RhB Pip)-NLS-TAT wurde mittels Absorption bestimmt.

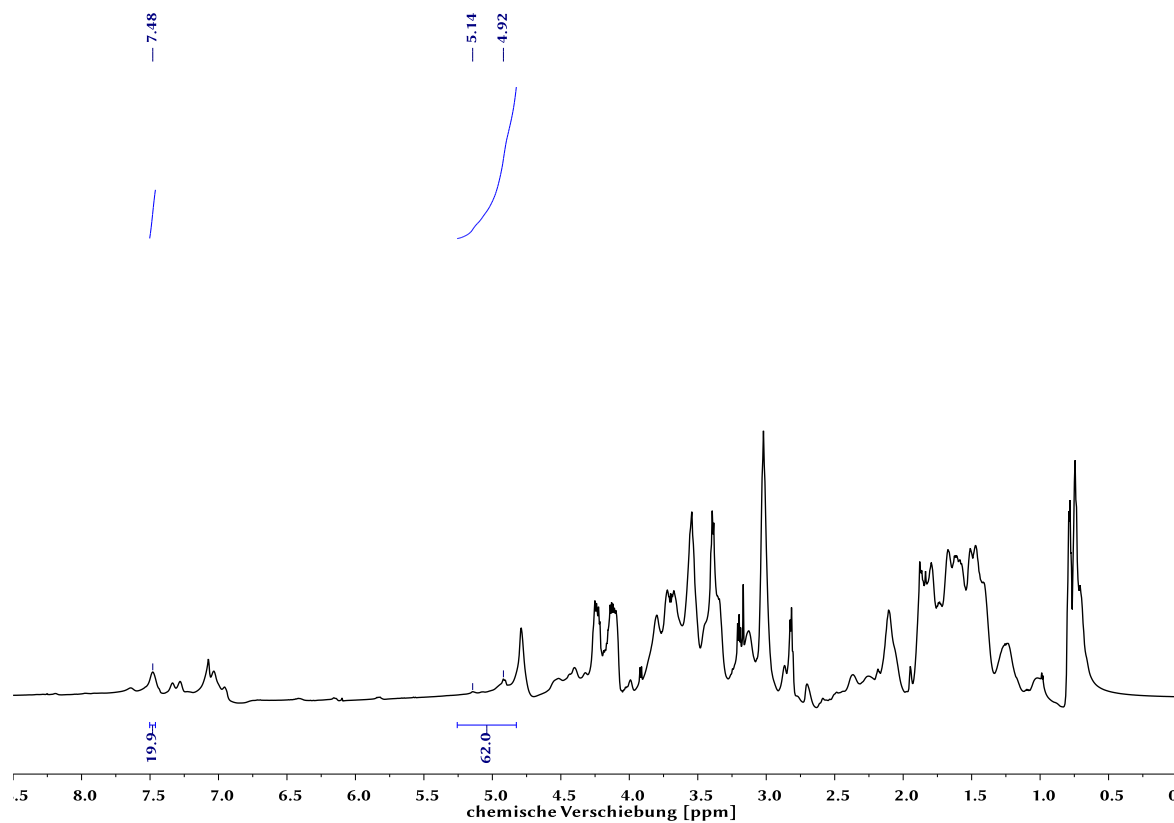


Abbildung A. 100: ^1H -Spektrum von **K10** (700 MHz, D_2O). Es sind 9,9 hochaffine Peptide pro Dextran gebunden. Die Beladung des Lys(RhB Pip)-TAT-NLS wurde mittels Absorption bestimmt.

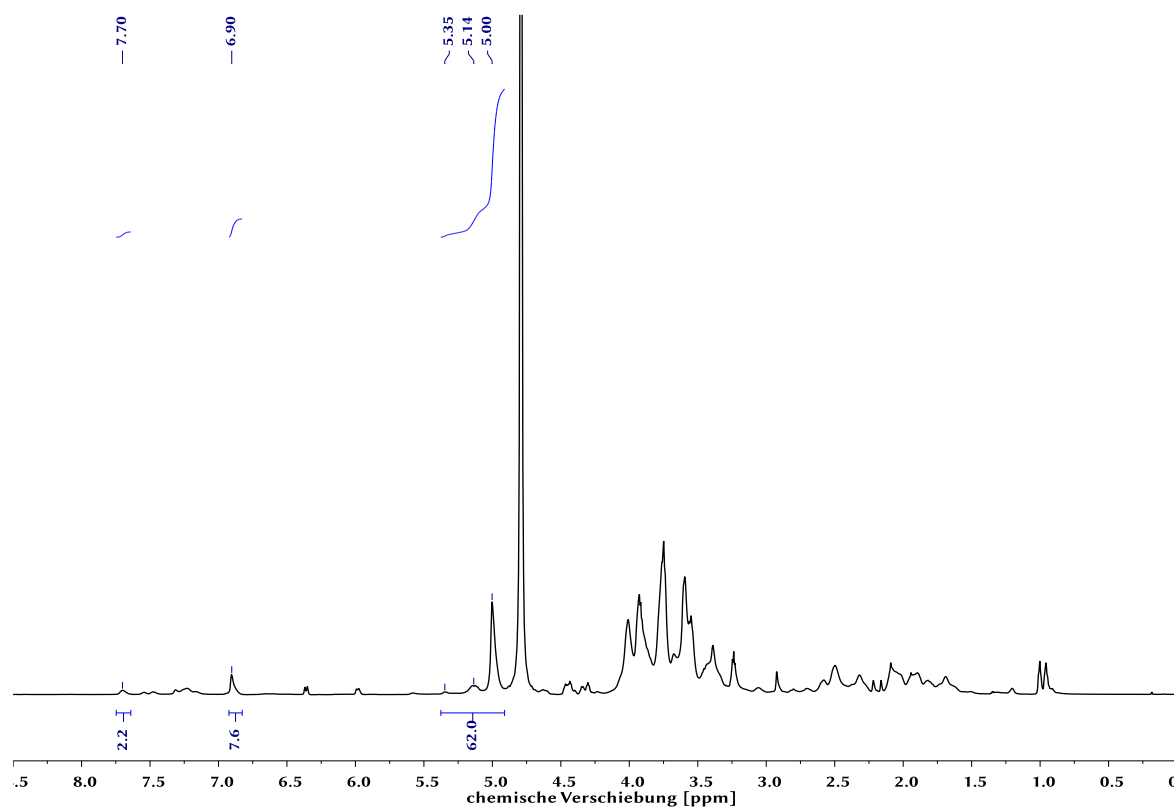


Abbildung A. 101: ^1H -Spektrum von **K18** (700 MHz, D_2O). Es sind 2,2 affine Peptide pro Dextran gebunden.

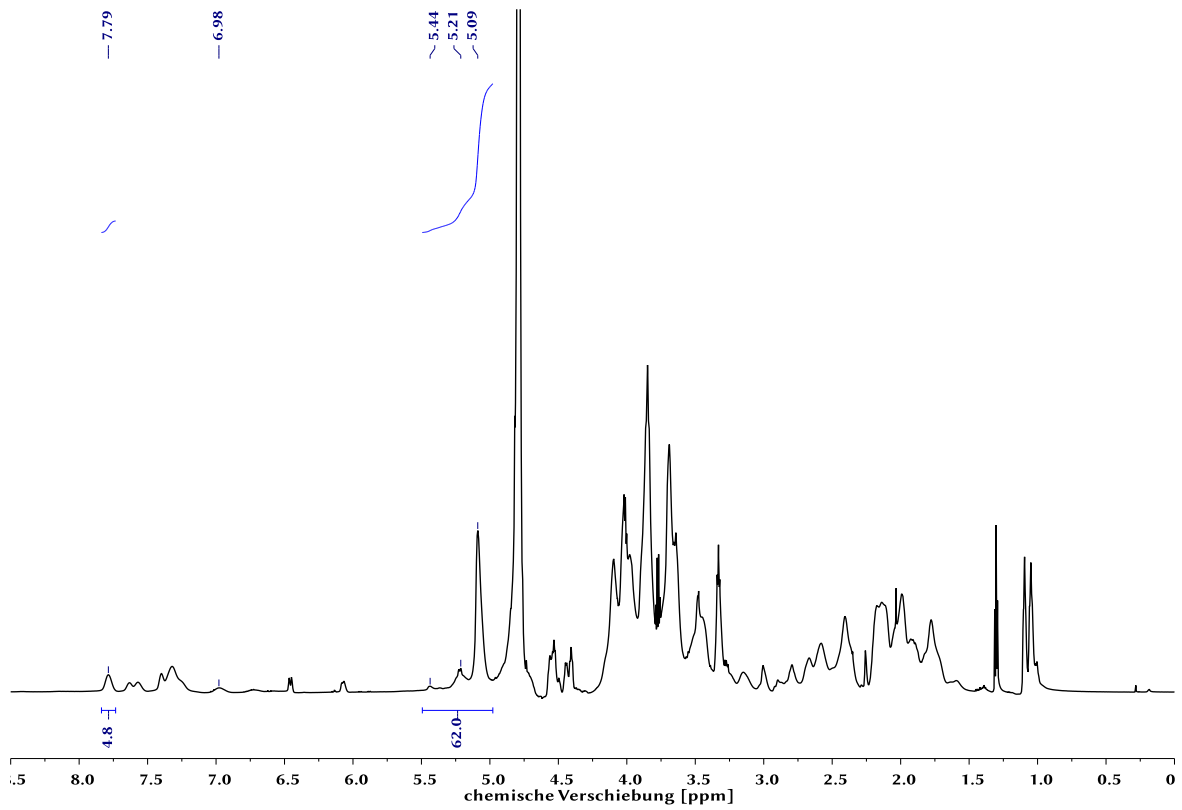


Abbildung A. 102: ^1H -Spektrum von **K19** (700 MHz, D_2O). Es sind 4,8 affine Peptide pro Dextran gebunden.

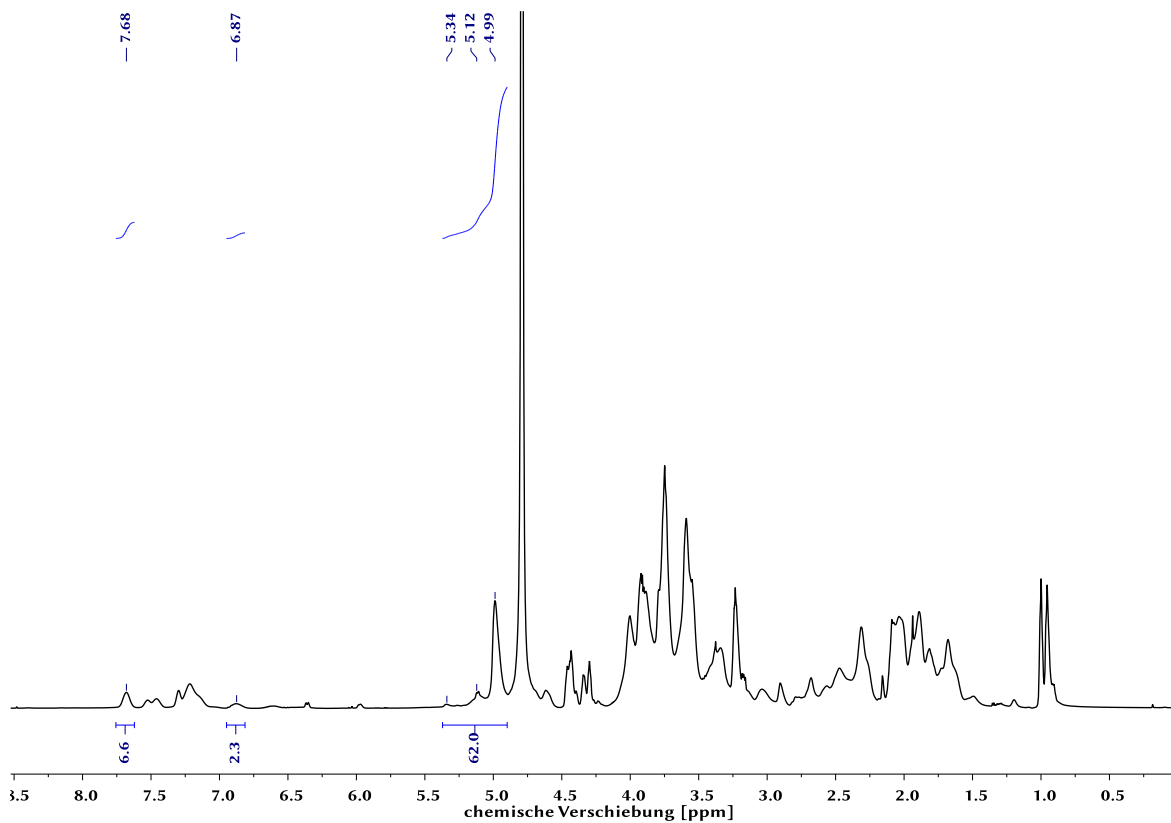


Abbildung A. 103: ^1H -Spektrum von **K20** (700 MHz, D_2O). Es sind 6,6 affine Peptide pro Dextran gebunden.

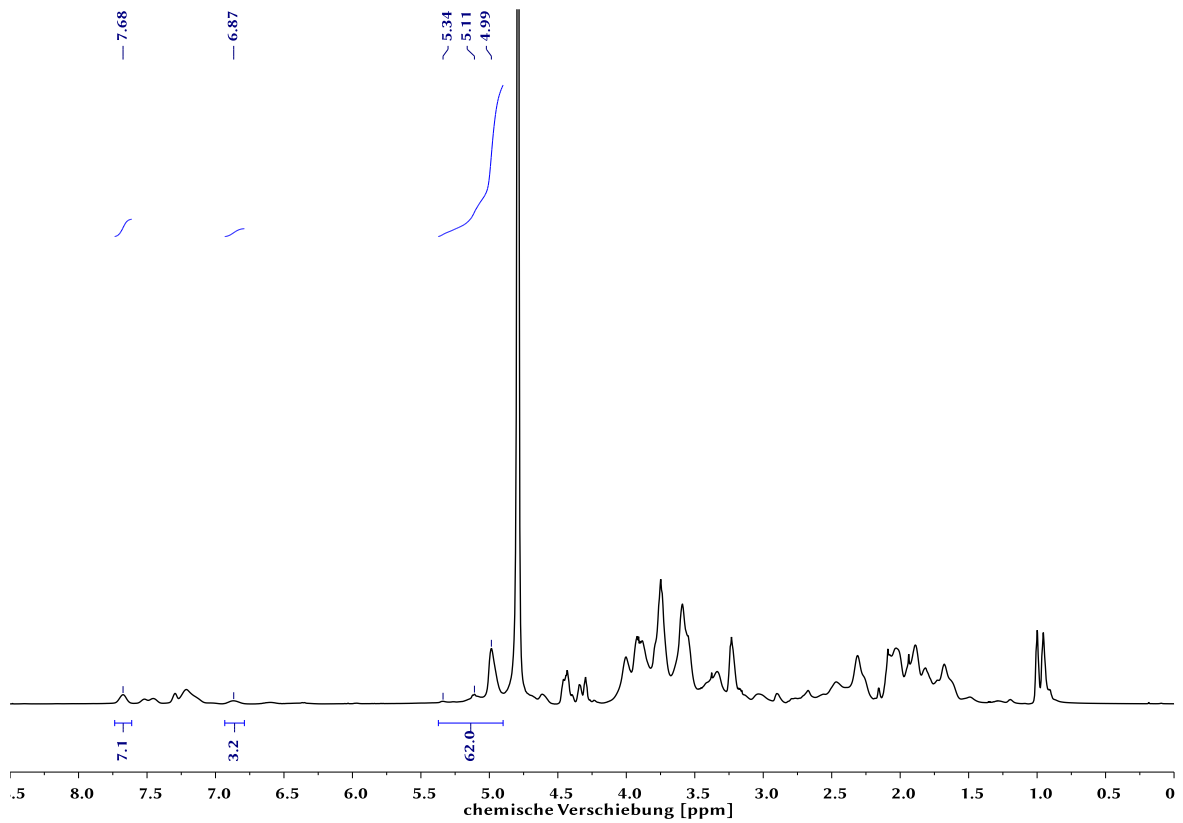


Abbildung A. 104: ^1H -Spektrum von **K21** (700 MHz, D_2O). Es sind 7,1 affine Peptide pro Dextran gebunden.

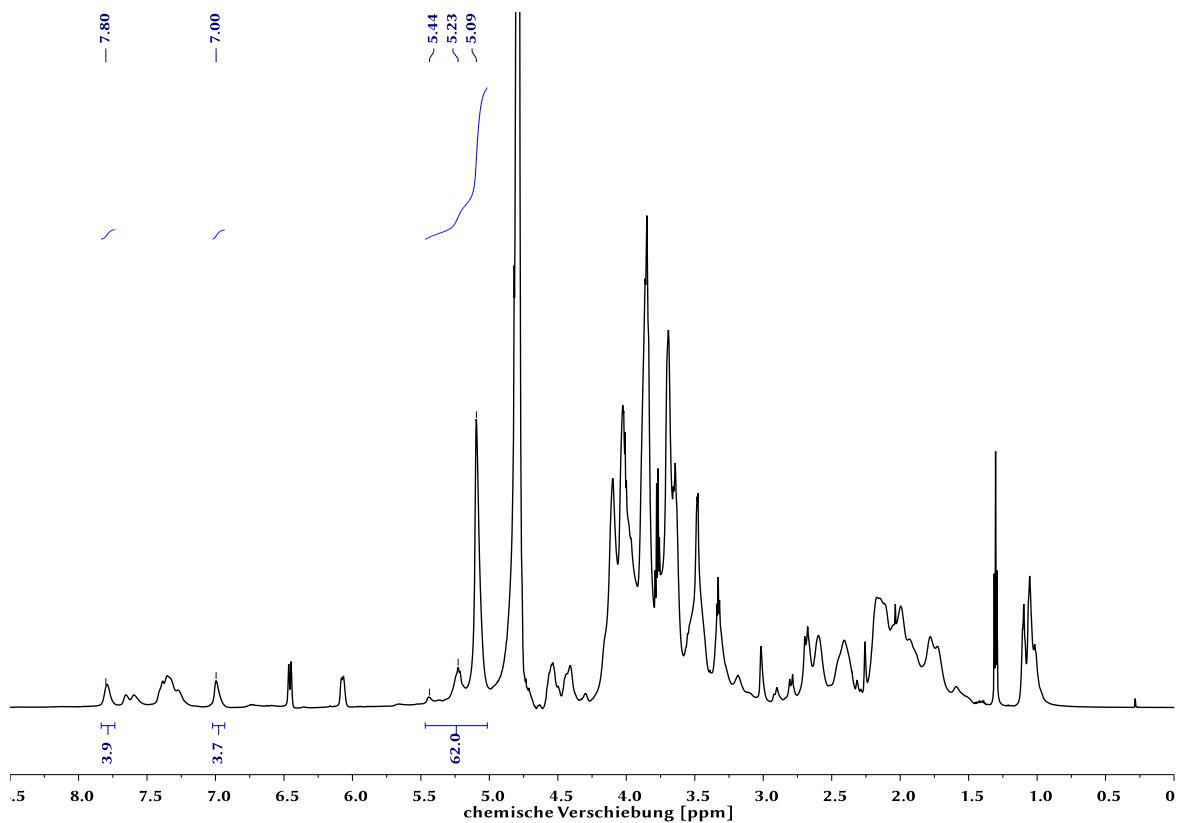


Abbildung A. 105: ^1H -Spektrum von **K22** (700 MHz, D_2O). Es sind 2,0 hochaffine Peptide pro Dextran gebunden.

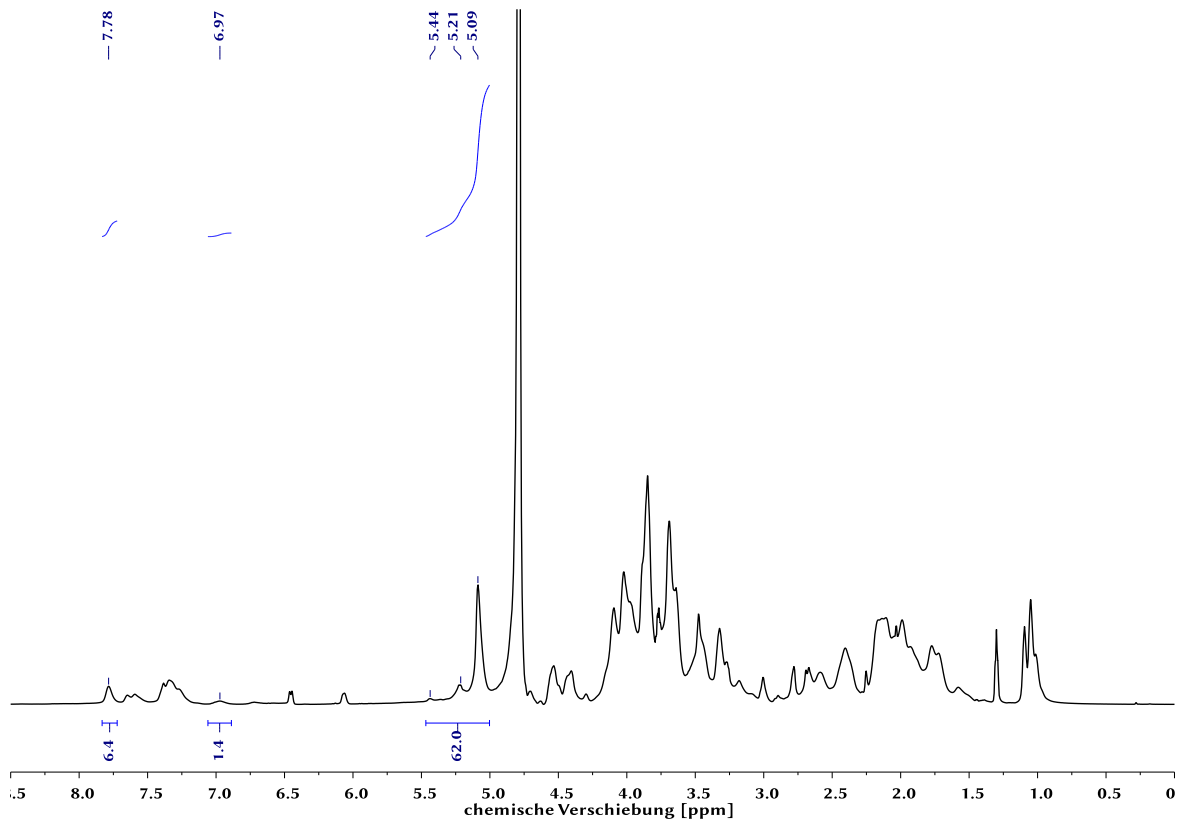


Abbildung A. 106: ^1H -Spektrum von **K23** (700 MHz, D_2O). Es sind 3,2 hochaffine Peptide pro Dextran gebunden.

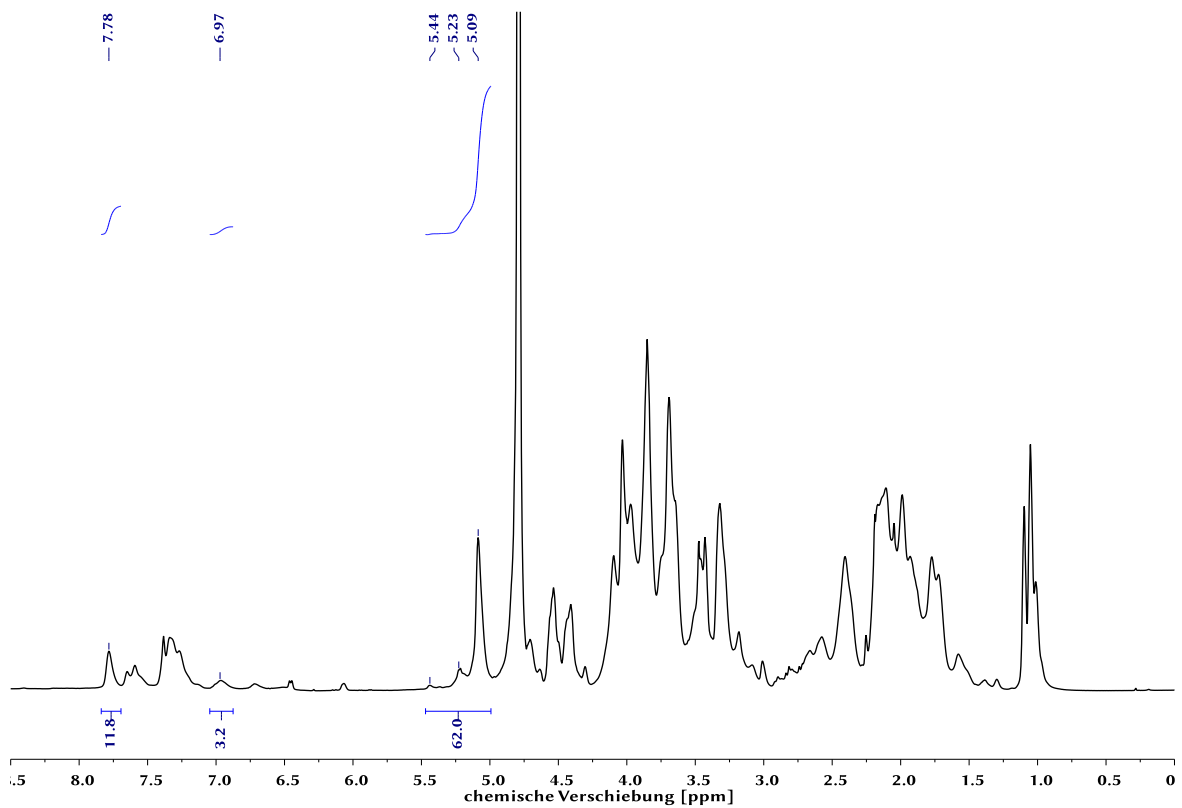


Abbildung A. 107: ^1H -Spektrum von **K24** (700 MHz, D_2O). Es sind 5,9 hochaffine Peptide pro Dextran gebunden.

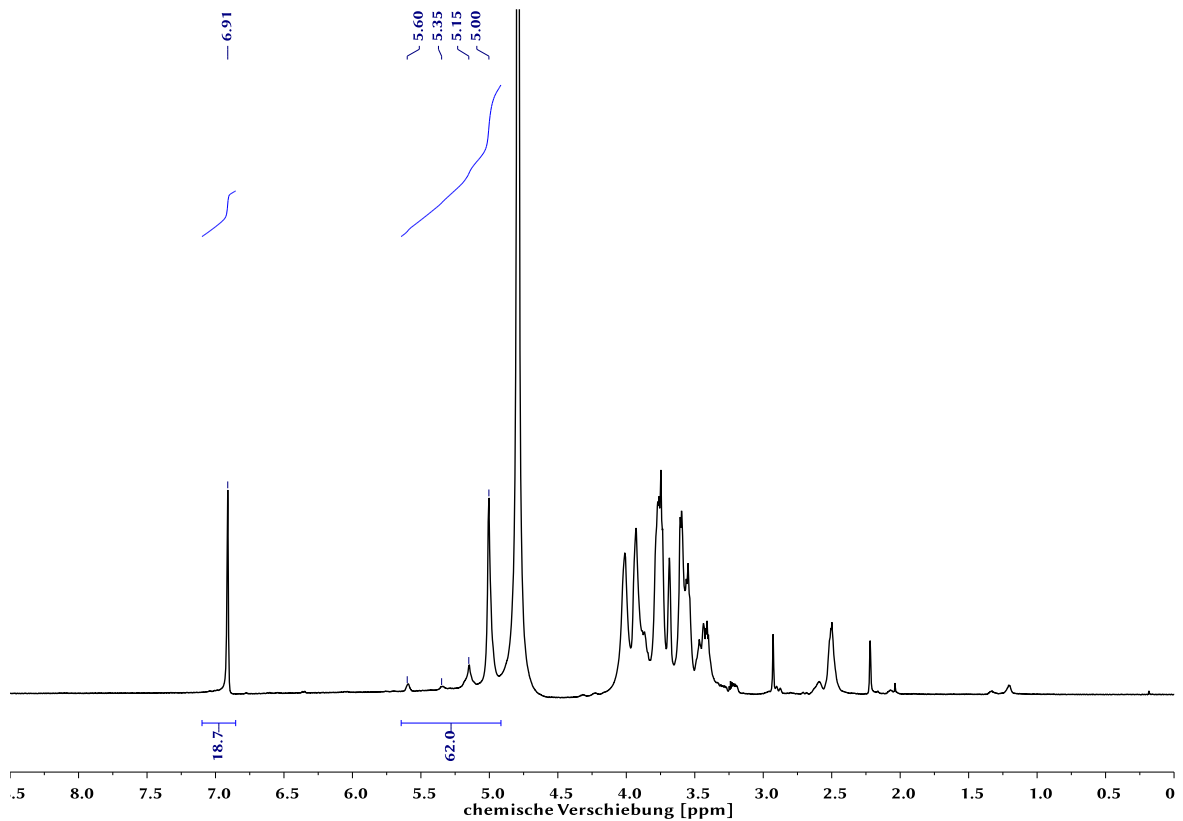


Abbildung A. 108: ^1H -Spektrum von **K11** (700 MHz, D_2O). Es sind noch 9,4 freie Maleinimide vorhanden. Die Beladung des Thiol-RhB Pips wurde mittels Absorption bestimmt.

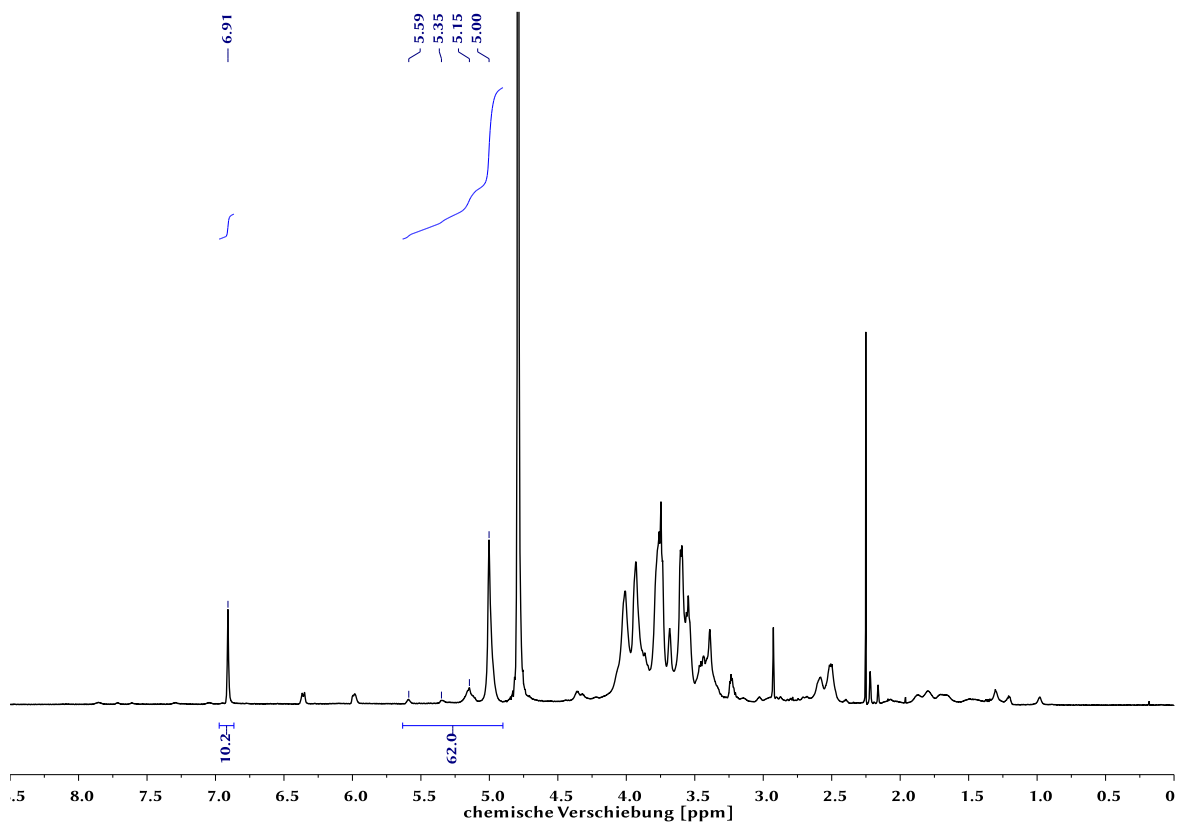


Abbildung A. 109: ^1H -Spektrum von **K2** (700 MHz, D_2O). Es sind noch 5,1 freie Maleinimide vorhanden. Die Beladung des Lys(RhB Pip)-NLS-TAT wurde mittels Absorption bestimmt.

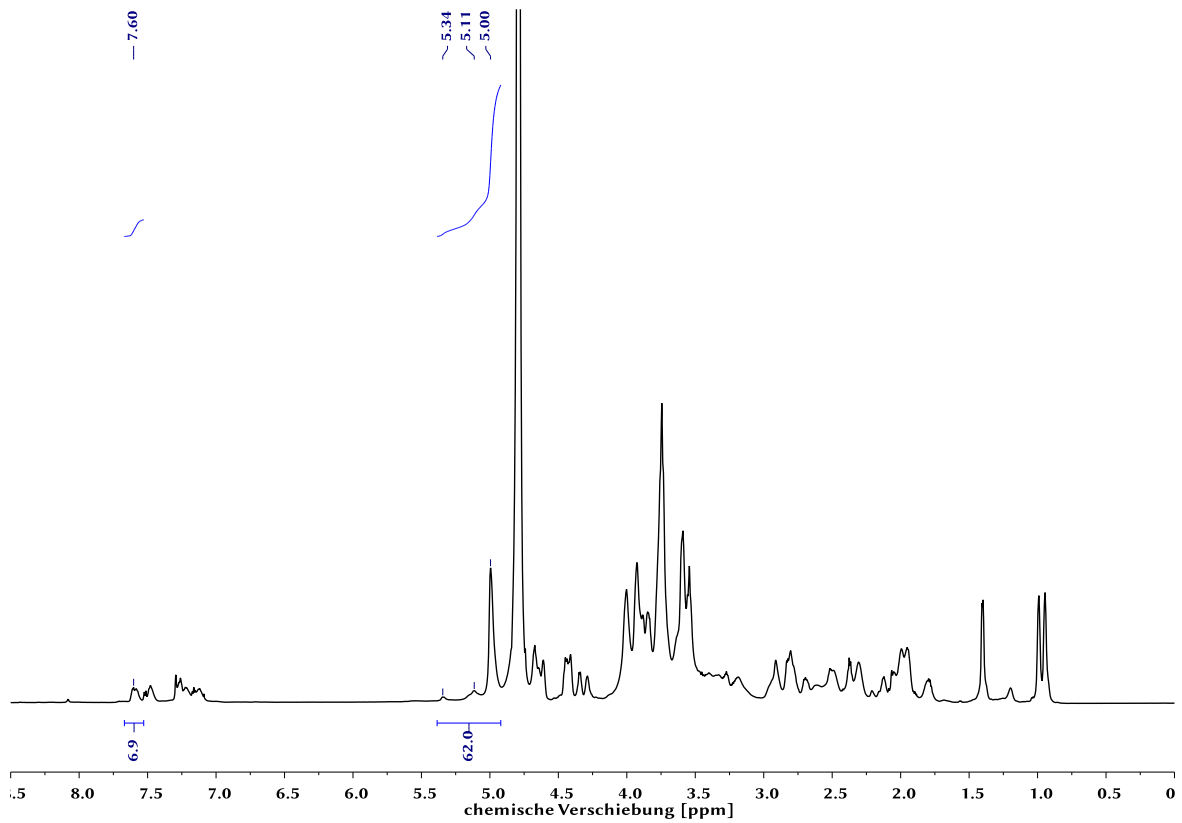


Abbildung A. 110: ^1H -Spektrum von **K25** (700 MHz, D_2O). Es sind 6,9 IVS-Negativpeptide pro Dextran gebunden.

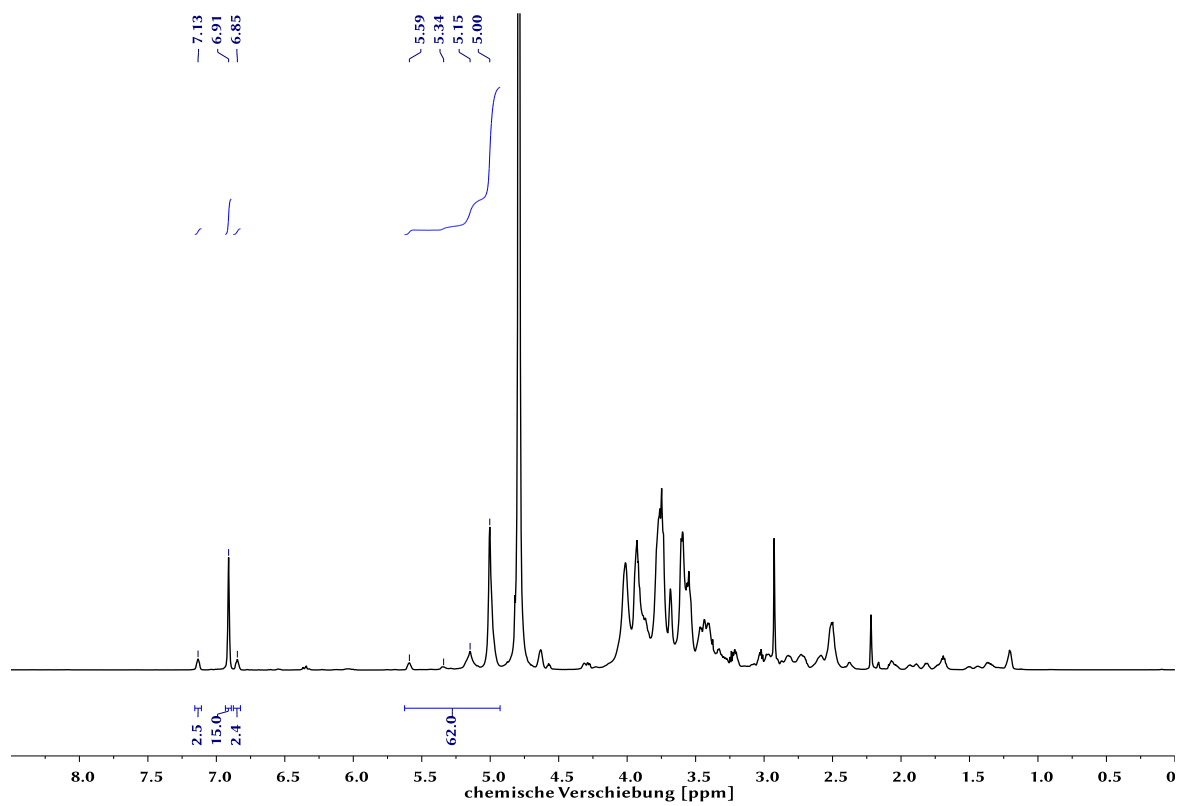


Abbildung A. 111: ^1H -Spektrum von **K26** (700 MHz, D_2O). Es sind 1,2 FLAG-Tags pro Dextran gebunden.

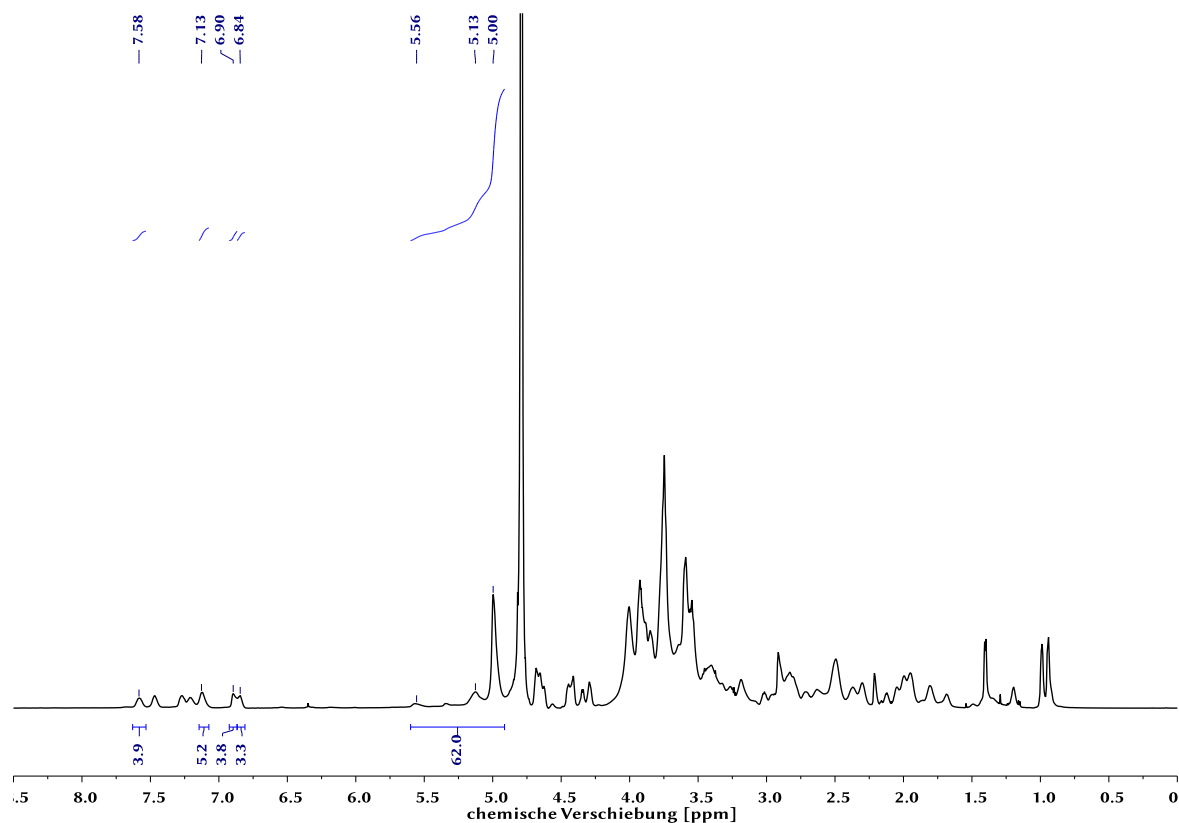


Abbildung A. 112: ^1H -Spektrum von **K27** (700 MHz, D₂O). Es sind 2,0 FLAG-Tags und 3,9 IVS-Negativpeptide pro Dextran gebunden.

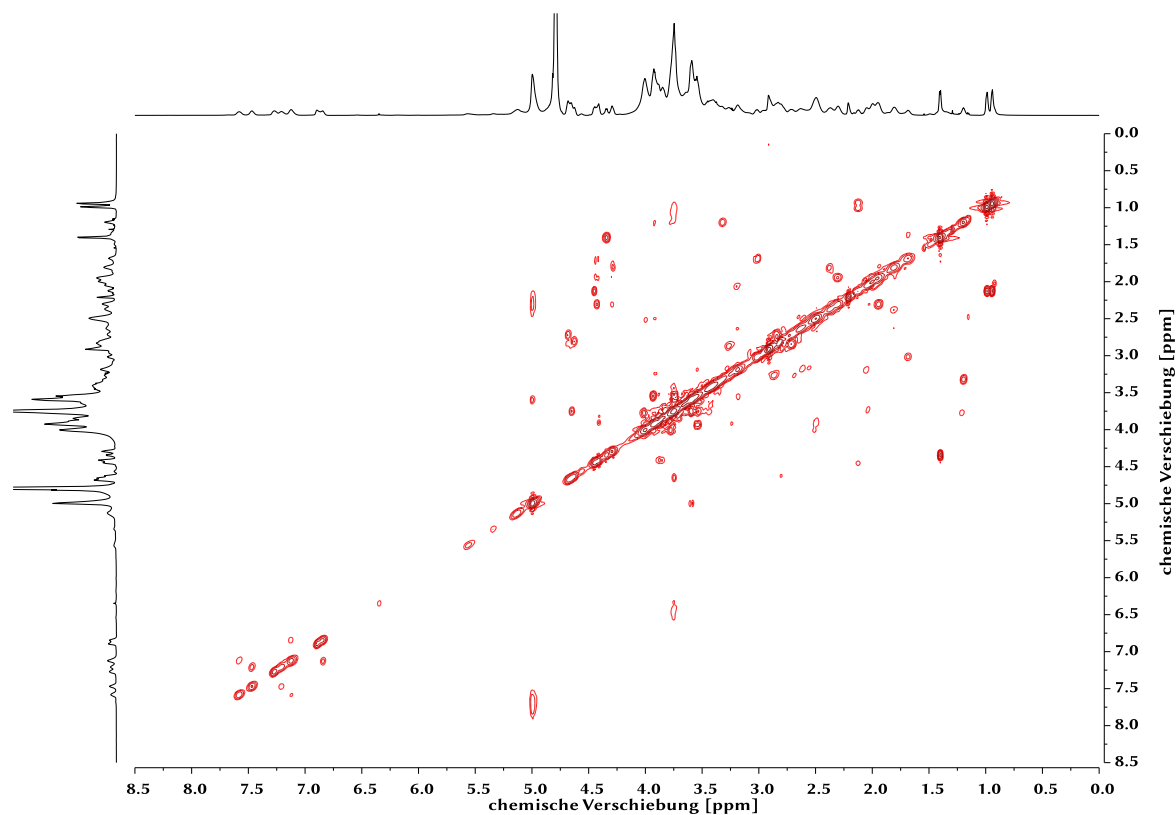


Abbildung A. 113: ^1H , ^1H -COSY Spektrum von **K27** (700 MHz, D₂O). Anhand des COSY Spektrums können die Signale des FLAG-Tags identifiziert werden.

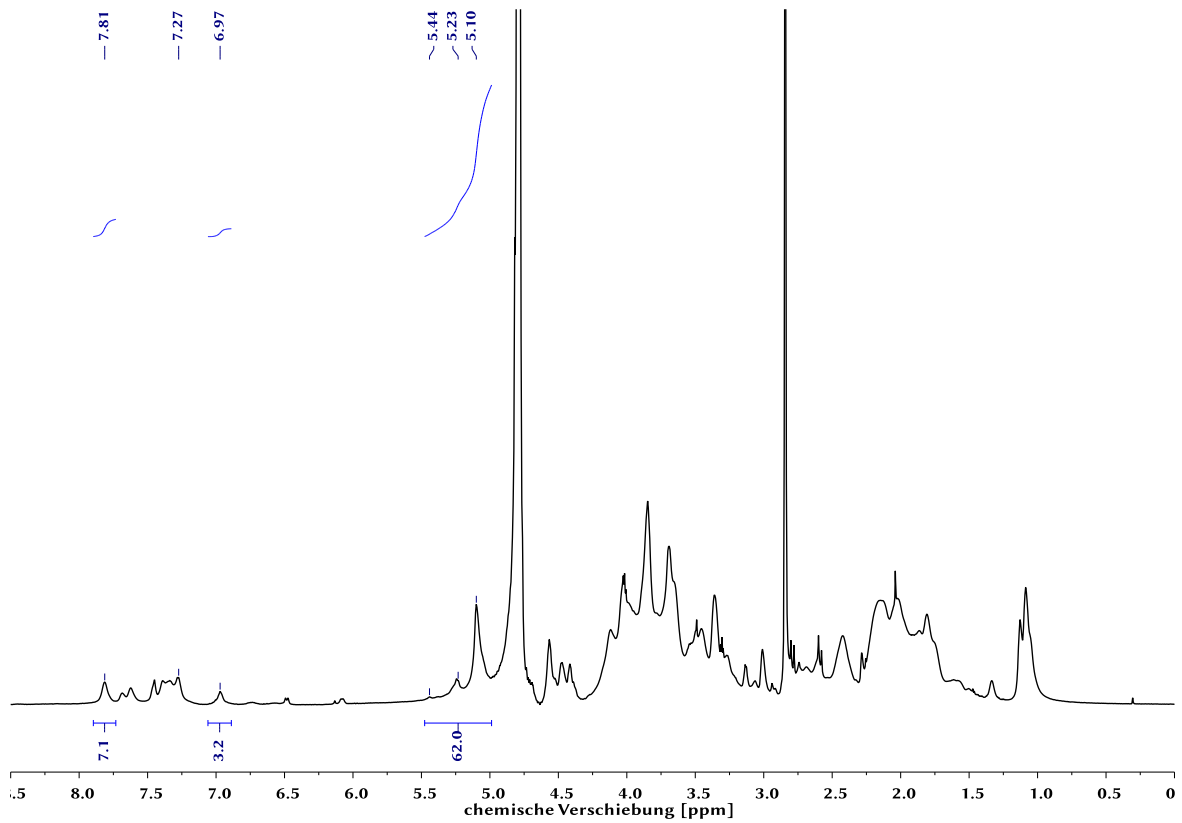


Abbildung A. 114: ^1H -Spektrum von **K28** (700 MHz, D_2O). Es sind 1,6 FLAG-Tags und 3,5 hochaffine Peptide pro Dextran gebunden.

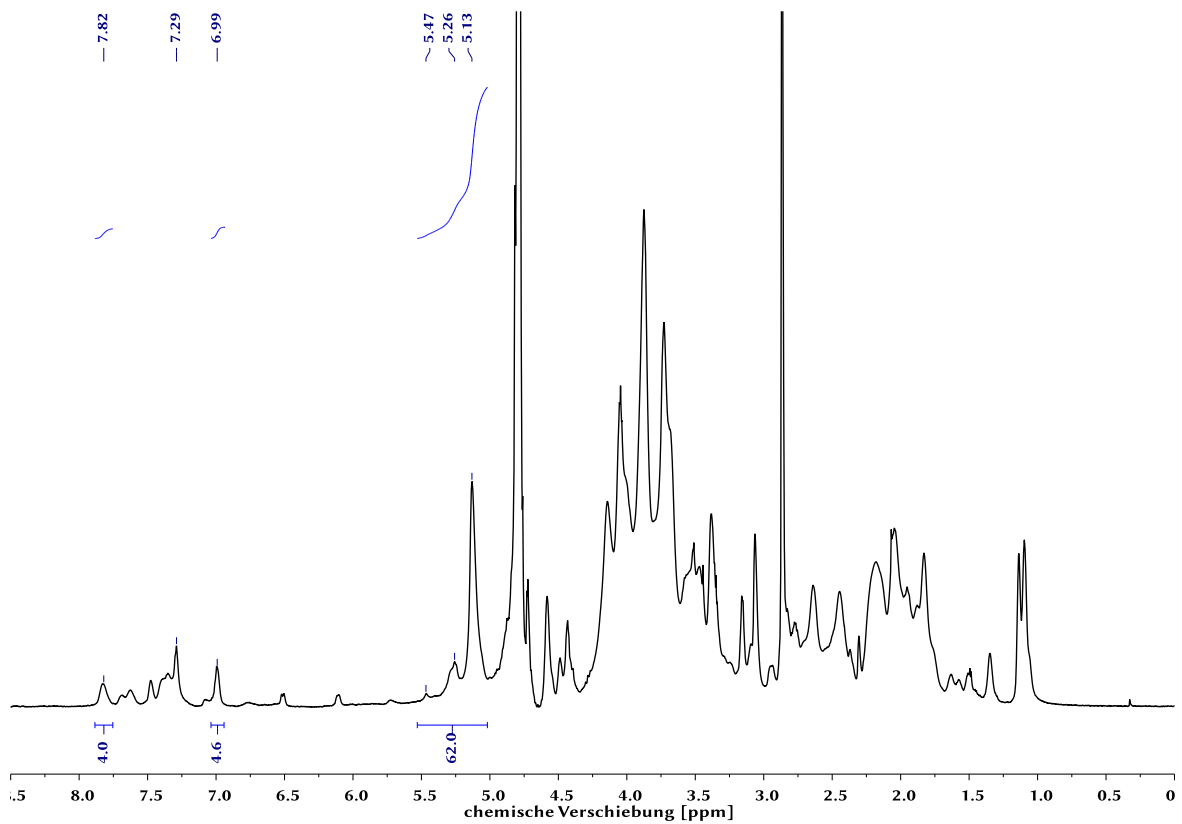


Abbildung A. 115: ^1H -Spektrum von **K29** (700 MHz, D_2O). Es sind 2,3 FLAG-Tags und 4,0 affine Peptide pro Dextran gebunden.

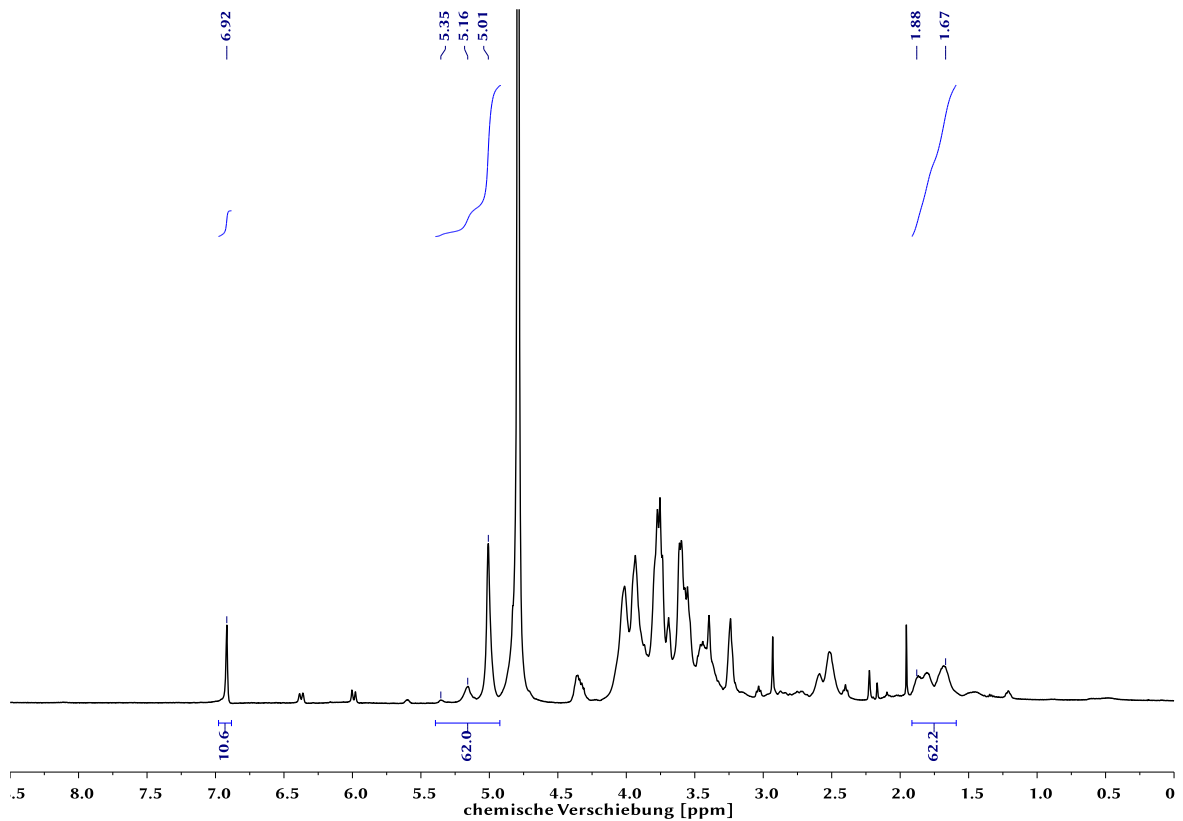


Abbildung A. 116: ^1H -Spektrum von **K30** (500 MHz, D_2O). Es sind 2,6 TAT-Peptide pro Dextran gebunden. Die Beladung des Thiol-RhB Pips wurde mittels Absorption bestimmt.

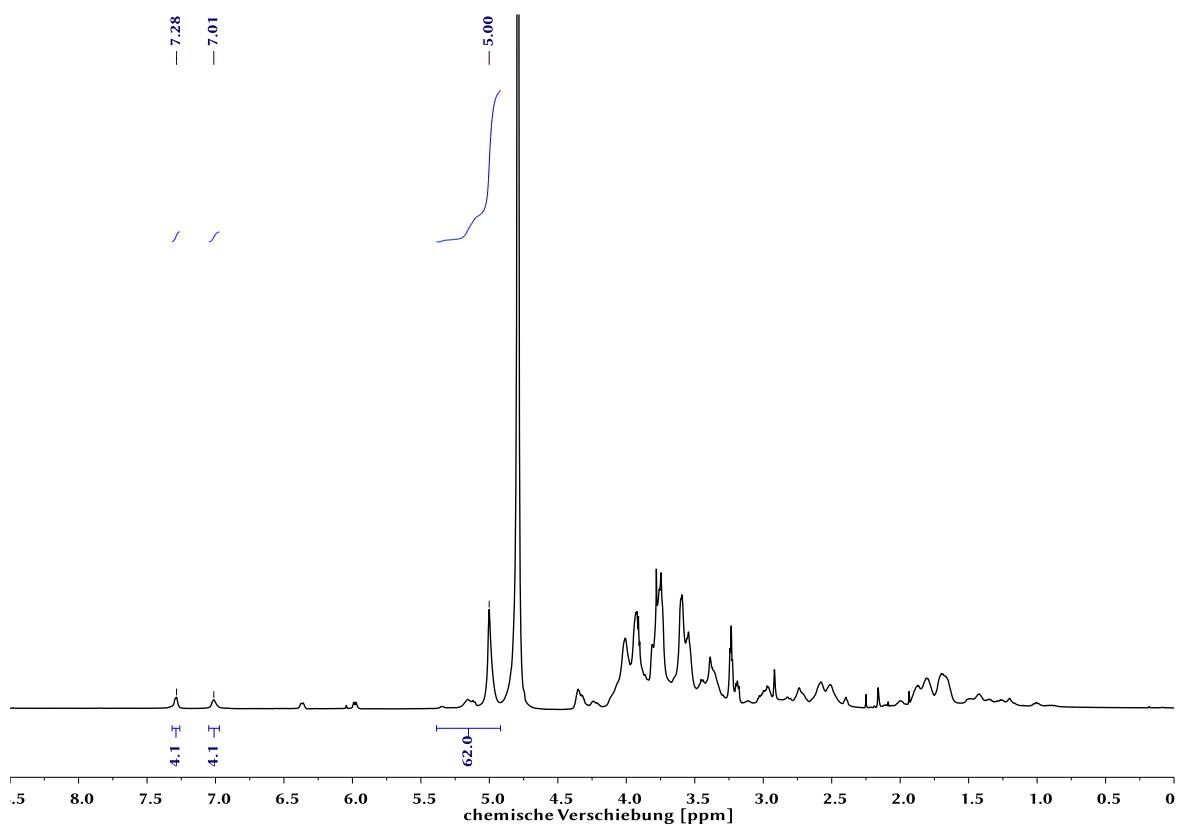


Abbildung A. 117: ^1H -Spektrum von **K31** (700 MHz, D_2O). Es sind 2,0 Peptidomimetika **2Z**, 2,6 TAT-Peptide und 0,5 Fluorophore pro Dextran gebunden.

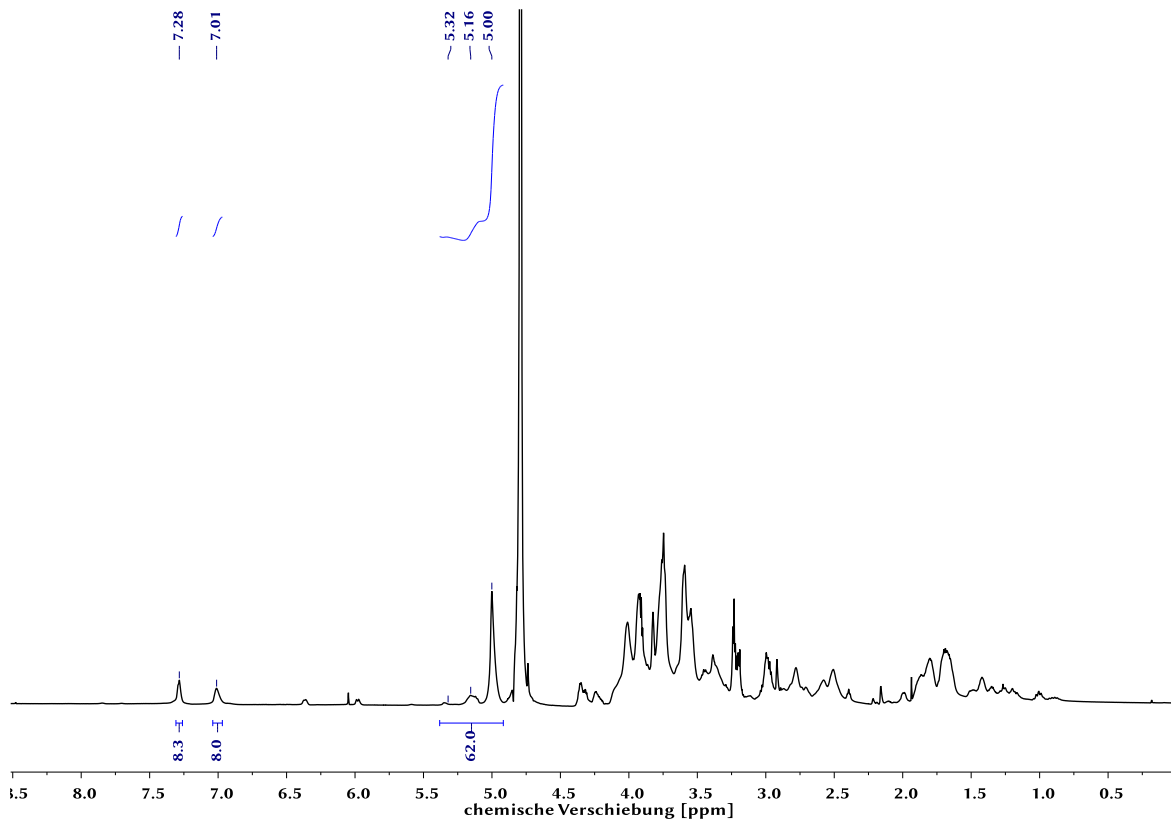


Abbildung A. 118: ^1H -Spektrum von **K32** (700 MHz, D_2O). Es sind 4,0 Peptidomimetika **27**, 2,6 TAT-Peptide und 0,5 Fluorophore pro Dextran gebunden.

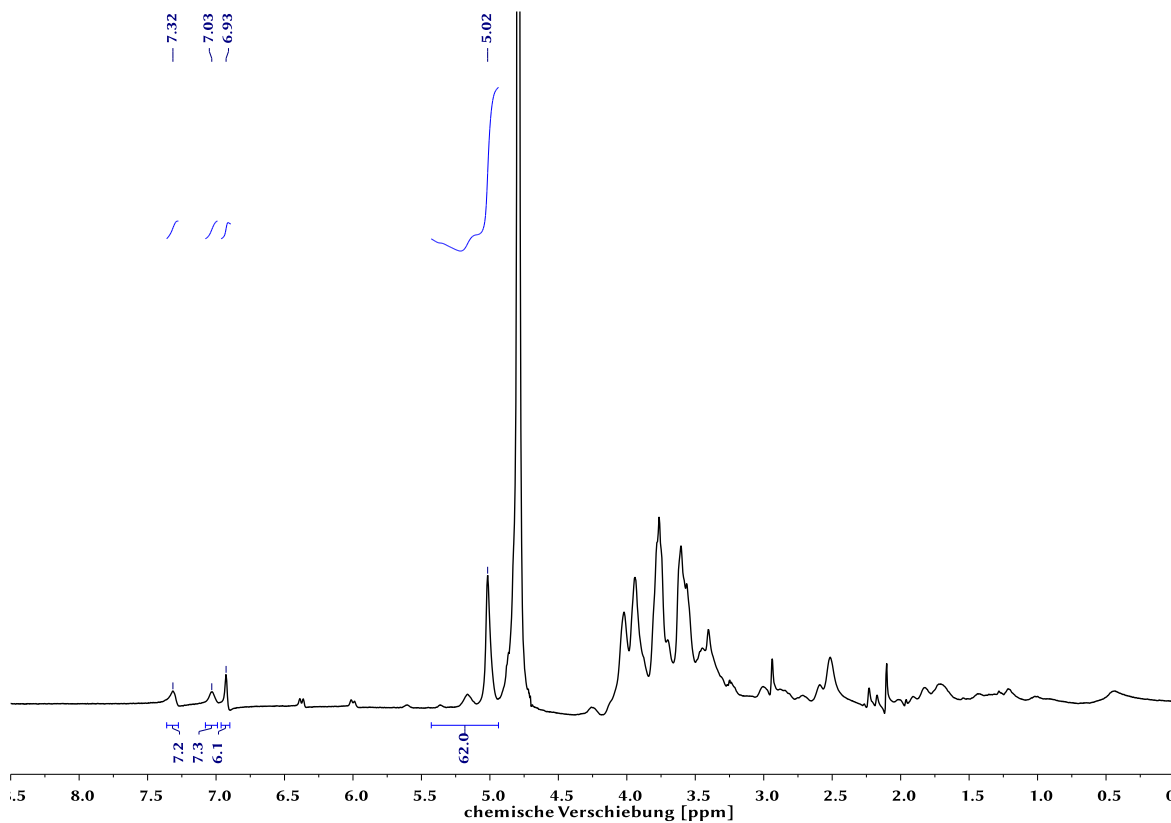


Abbildung A. 119: ^1H -Spektrum von **K33** (500 MHz, D_2O). Es sind 3,6 Peptidomimetika **27** pro Dextran gebunden. Die Beladung des Thiol-RhB Pips wurde mittels Absorption bestimmt.

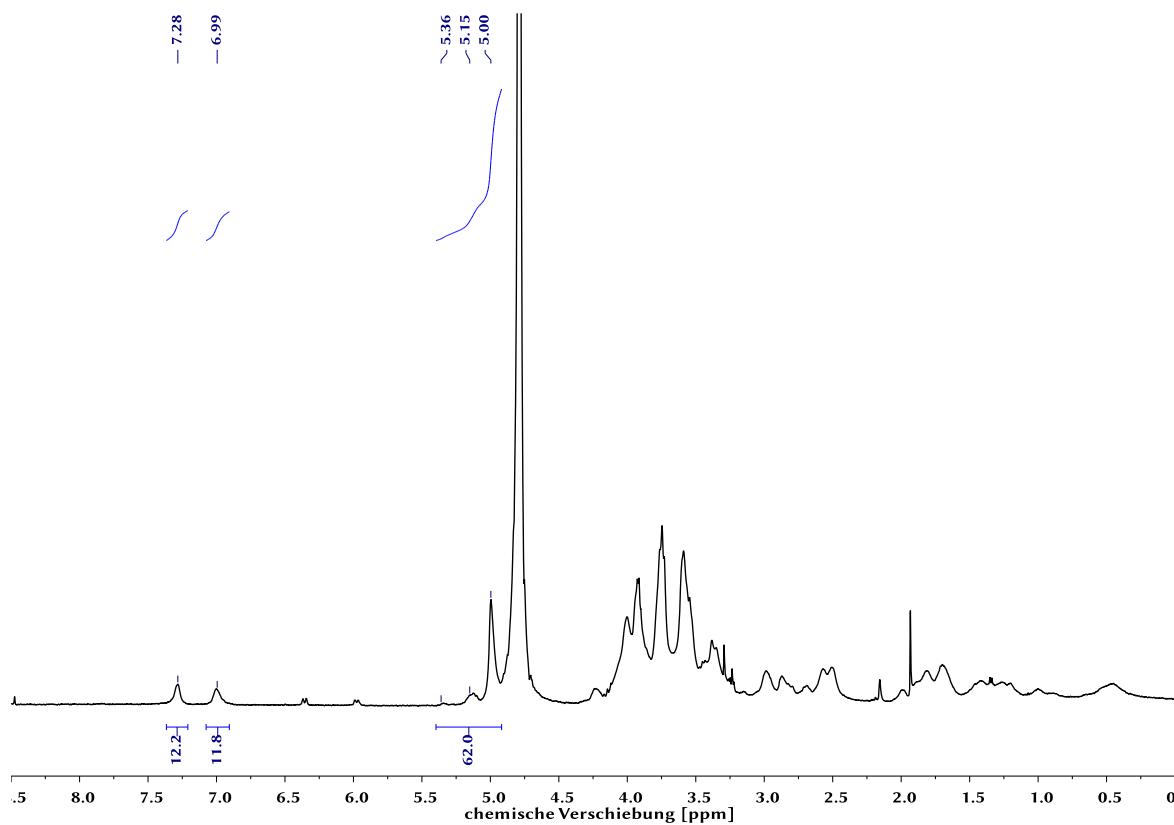


Abbildung A. 120: ^1H -Spektrum von **K34** (500 MHz, D_2O). Es sind 6,0 Peptidomimetika **27** pro Dextran gebunden. Die Beladung des Thiol-RhB Pips wurde mittels Absorption bestimmt.

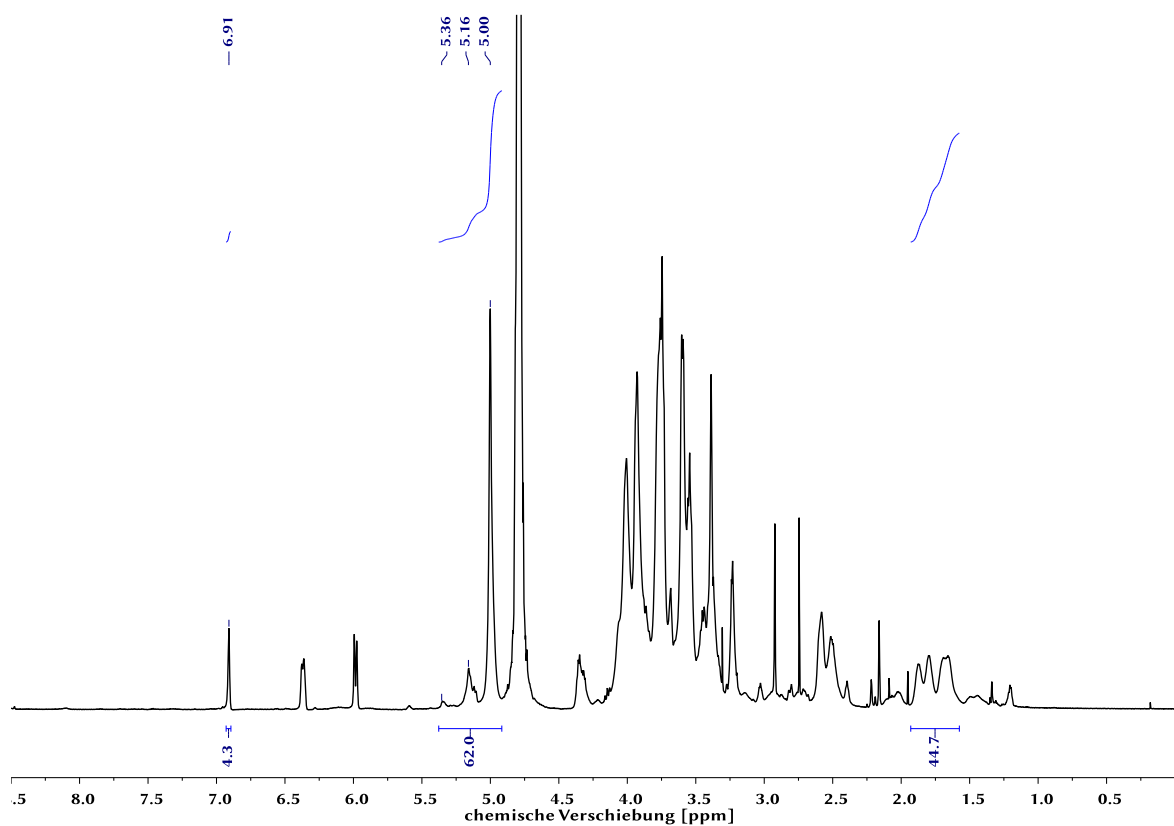


Abbildung A. 121: ^1H -Spektrum von **K35** (700 MHz, D_2O). Es sind 1,9 TAT-Peptide pro Dextran gebunden. Die Beladung des Thiol-RhB Pips wurde mittels Absorption bestimmt.