# Multivalente Peptidpolymere zur effizienten Modulation von intrazellulären Signaltransduktionen

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

Martin Richter

aus Berlin

April 2011

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum zwischen Dezember 2006 und April 2011 am Leibniz Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg Rademann angefertigt.

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Rademann
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Haag

Disputation am 04.07.2011

Für meine Familie

# Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Mentor Prof. Dr. Jörg Rademann für Bereitstellung der interessanten Aufgabenstellung, für die Freiheit bei der Gestaltung der Arbeit und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Besonders dankbar bin ich ihm auch dafür, dass er mir die Teilnahme an zahlreichen Tagungen und die Forschungsaufenthalte in Nijmegen (NL) ermöglicht hat.

Prof. Dr. Rainer Haag danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens und die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Roland Brock für die fruchtbare Zusammenarbeit in den verschiedenen Kooperationen und die hilfreichen Diskussionen der biologischen Ergebnisse. In diesem Zusammenhang sei auch Dr. Ivo R. Ruttekolk und Alokta Chakrabarti aus dem Arbeitskreis Brock für die Zusammenarbeit gedankt.

Für die Unterstützung während der Mikroskopieuntersuchungen danke ich Dr. Burkhard Wiesner und Jenny Eichhorst.

Dr. Michael Beyermann danke ich für die Unterstützung bei der Peptidsynthese und die wertvollen Diskussionen rund um die Peptidchemie.

Der DFG und speziell dem SFB 765 danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel, ohne die meine Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen Laborkollegen Ahsanullah, Dr. Isabel Fernández Bachiller, Dr. Kai Holland-Nell, André Horatscheck, Dr. Boo Geun Kim, Katharina Koschek, Dr. Vera Martos Riaño, Dr. Liudmila Perepelitchenko, Johannes Preidl, Richard Raz, Dr. Sina Meyer, Dr. Stefanie Grosskopf, Dr. Adeeb El-Dahshan, Dr. Samuel Beligny, Dr. Viviane Uryga-Polowy für die freundliche Atmosphäre in der Arbeitsgruppe Rademann.

Besonders danke ich Jörn Saupe und Dr. Marco Schmidt für die gemeinsame Zeit und die zahlreichen Diskussionen.

Yvette Roske danke ich für die Bereitstellung meines Büroarbeitsplatzes und die angenehme Atmosphäre. Meinen Eltern Annette und Harald Richter möchte ich an dieser Stelle für das Ermöglichen des Chemiestudiums und ihre immer währende Unterstützung danken.

Ganz besonders möchte ich aber meiner Lebensgefährtin Ann Lehnert und unserem Sohn Paul dafür danken, dass sie mir täglich Kraft geben, mich immer unterstützen und während der Promotion oftmals bereitwillig zurückstanden.

### Inhaltsverzeichnis

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iii
Zusammenfassung	vii
Abstract	ix
1 Einleitung	1
1.1 Multivalente Wechselwirkungen	1
1.1.1 Thermodynamik	2
1.2 Polymere Therapeutika	7
1.3 Die Apoptose – der programmierte Zelltod	10
1.3.2 Die rezeptorvermittelte Apoptose	11
1.3.3 Der mitochondriale Apoptoseweg	12
1.3.1 Caspasen	14
2 Fragestellung und Zielsetzung	17
3 Ergebnisse und Diskussion	19
3.1 BH3-Peptidpolymere zur Apoptose-Induktion	19
3.1.1 Auswahl des Polymers	20
3.1.2 Synthese von Carboxymethyldextran	22
3.1.3 Synthese von Thioester-Dextranen	25
3.1.4 Synthese von Carboxyethyldextran	28
3.1.5 Funktionalisierung von Thioestergruppen auf Carboxyethyldextran	32
3.1.6 Synthese des Fluoreszenzmarkers	35
3.1.7 Synthese fluoreszenzmarkierter Dextrane	37
3.1.8 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)	
3.1.9 Synthese zellpenetrierender Peptide	42
3.1.10 Synthese zellgängiger Dextrane	44
3.1.11 Aufnahmeuntersuchungen von Fluo- $R_{9}$ -Dextran in lebende Zellen	49
3.1.12 Synthese der Apoptose-induzierenden BH3-Peptide	52
3.1.13 BH3-beladene Dextrane und deren Aufnahme in lebende Zellen	57
3.1.14 Quantifizierung der Apoptose-Induktion	60
3.1.15 Caspase-3-Messungen in apoptotischen Zellen	63
3.1.16 Synthese fluoreszenzmarkierter BH3-Peptide	66
3.1.17 Synthese von Maleinimidodextran	66
3.1.18 Synthese zellgängiger BH3-Dextrane	70
3.1.19 Der Multivalenzeffekt bei der Apoptoseinduktion	71

#### Inhaltsverzeichnis

3.2 Der Einsatz von Nonaarginindextran zur Regulierung der Taxolresistenz	76
3.2.1 Einfluss zellpenetrierender Peptide auf die Wirkung von Taxol	77
3.3 Chlorid-sensitive Dextrane	81
3.3.1 Auswahl und Synthese der Farbstoffe	83
3.3.2 Synthese eines hochbeladenen Aminodextrans	85
3.3.3 Synthese und Untersuchung von MEQ-Dextran	89
3.3.4 Synthese von TMR-MEQ-Dextran	90
3.3.5 In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen des TMR-MEQ-Dextrans	92
3.3.6 Biologische Ergebnisse	94
3.3.7 Alternative Fluorophore	96
3.3.8 Synthese der TMR-SPQ- und TMR-NEQ-Dextrane	100
3.4 Polymergestützte Inhibition der Clathrin-vermittelten Endozytose	103
3.4.1 Die Clathrin-vermittelte Endozytose	103
3.4.2 Fragestellung und Ziele	105
3.4.3 Auswahl und Synthese der Peptide	106
3.4.4 Zelluläre Untersuchungen der Peptidpolymere	107
4 Fazit	111
5 Experimenteller Teil	115
5.1 Chemikalien	115
5.2 Geräte	115
5.3 Synthesen	117
5.4 Biologische Methoden	158
5.4.1 Zellkultur	158
5.4.2 Konfokale Laser Rastermikroskopie	158
5.4.3 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)	159
5.4.4 Elektroporation	160
5.4.5 AnnexinV Assay	160
5.4.6 Caspase-3 Assay	160
5.4.7Aminosäureanalyse	161
6 Quellen	163
7 Publikationen	169
8 Anhang	171

Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
AcCN	Acetonitril
AHG	Anhydroglukoseeinheit
ATR-IR	Abgeschwächte Totalreflexions Infrarot Spektroskopie
Boc	Tert-Butyloxycarbonyl
BP	Bandpass
bs	Beam splitter
BSA	Bovine Serum Albumin
CDCI3	Deuteriertes Chloroform
CDI	Carbonyldiimidazol
CE	Carboxyethyl
CED	Carboxyethyldextran
CHCI <sub>3</sub>	Chloroform
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
СМ	Carboxymethyl
CMD	Carboxymethyldextran
CPP	Cell-penetrating peptide
d	dublett
$D_2O$	Deuteriumoxid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DiPEA	Disopropylethylamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
eq	Äquivalente
ESI-MS	Elektrospray-Ionenfallen-Massenspektrometrie
Et	Ethyl
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fluorescence Correlation Spectroscopy

Fluo	5(6)-Carboxyfluorescein
Fmoc	N-(9-Fluorenyl)methoxycarbonyl
fpm	Fluorescence per molecule
FRET	Fluoreszenz Resonanz Elektronentransfer
HCI	Chlorwasserstoff
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N-(2-ethansulfonic acid)
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HR-ESI-MS	High Resolution Electron Spray Ionization Mass Spectrometry
IR	Infrarotspektroskopie
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
Μ	Molare Masse
m	Masse
m/z	Masse pro Ladung
MALDI	matrix-assisted laser desorption ionisation
MeOD-d4	Deuteriertes Methanol
МеОН	Methanol
MEQ	6-Methoxychinolin
M <sub>n</sub>	mittlere molare Masse
M <sub>w</sub>	Molare Masse
n	Stoffmenge
Ν	Normale
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NEQ	N-Ethylchinolin
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OSu	O-Succinimidylester
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PDI	Polydispersitätsindex
PEG	Polyethylenglycol
Ph	Phenyl
ppm	Parts per million
q	Quartett
Rf	Refraktionsindex
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

RT	Raumtemperatur
S	Singulett
SPQ	6-Methoxy-N-(3-sulfopropyl)-quinoline
t	triplett
TAMRA	5(6)-Carboxytetramethylrhodamine
tBU	Tert-Butyl
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Tis	Triisopropylsilan
TMR	Tetramethylrhodamin
TOF	Time of flight
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trt	Trityl
UV	Ultraviolett
UV/Vis	Ultraviolet-visible spectroscopy
δ	Verschiebung
λ	Wellenlänge
τ <sub>D</sub>	Diffusionszeit

# Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde Dextran eingesetzt, um den Transport biologisch aktiver Peptide in lebende Zellen zu vermitteln. Dafür wurde Dextran mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 10 kDa zu Carboxyethyldextran umgesetzt. In einem modularen System wurden verschiedene funktionelle Gruppen, wie Thioester, Maleinimid- oder Aminogruppen auf dem Polymer immobilisiert. Dadurch war eine breite Anwendbarkeit dieses multifunktionellen Polymers gegeben.

Mittels nativer chemischer Ligation (NCL) oder Maleinimid-Thiol-Kupplung wurden in einem einzigen Schritt Fluorophore, zellpenetrierende Peptide und biologisch relevante Peptide, wie BH3 mit dem Polymer verknüpft. Die Beladungsgrade wurden durch <sup>1</sup>H NMR Spektroskopie und Aminosäureanalyse ermittelt. Die zelluläre Aufnahme wurde an Jurkat E6.1, HeLa-S und HEK293 Zellen untersucht. Dabei wurden keine ungewünschten zytotoxischen Effekte detektiert.

Unterschiedlich hoch beladener BH3-Dextrane wurden eingesetzt um Apoptose in lebenden Jurkat Zellen auszulösen. Das Maß der Apoptoseinduktion in den behandelten Zellen wurde Annexin-V-Aktivität mittels Durchflusszytometrie beziehungsweise die Caspase-3 Aktivität photometrisch bestimmt. Dabei zeigte sich, dass bei gleicher Peptidkonzentration höher beladene BH3-Peptidpolymere stärker Apoptose induzierten als bivalente BH3-Dextrane. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse stützen somit die theoretischen Annhamen zum Multivalenzeffekt.

Des Weiteren wurden Dextrane mit einer unterschiedlich hohen Zahl an Aminogruppen synthetisiert. Im Gegensatz zu kommerziell erhältlichen Aminodextranen, blieben bei dem in dieser Arbeit eingesetzten Verfahren die Pyranringe des Polymers intakt. Darüber hinaus konnte die Anzahl der Aminogruppen pro Dextran nach belieben reguliert werden. Die so synthetrisierten AAE-Dextrane wurden parallel mit Chlorid-sensitiven und insensitiven Farbstoffen verknüpft. Mit Hilfe dieser Farbstoffpolymere konnte die Änderung der lysosomalenen Chloridkonzentration gemessen werden. Zusammenfassung

# Abstract

In the presented work dextran polymers were used as carrier systems to enable the transport of biological active peptides into living cells. Therefore dextran with an average molecular weight of 10 kDa was modified to carboxyethyl dextran. Coming from the carboxy groups, in a modular system different functionalities, such as thioester, maleimide or amine groups were immobilized on that polymer. Thus a broad applicability of the multifunctional polymer was possible.

Using native chemical ligation or maleimide-thiol coupling, in a single step the polymer could be loaded with fluorescent dyes for imaging purposes, cell penetrating peptides and functional peptides, such as BH-3, a potent inducer of apoptosis. The degree of substitution was measured by <sup>1</sup>H-NMR and amino acid analysis. Cellular uptake was demonstrated on HEK293 and HeLa-S and Jurkat cells. Cells, treated with synthesized peptide polymers showed a good viability.

Finally, the multivalency effect of the BH3-activity was investigated. Apoptosis in Jurkat cells was induced with dextrans bearing 2 and 5 BH-3 peptides, respectively, per polymer and, alternatively with CPP-BH-3 peptides. Apoptosis induction was quantified by FACS-analysis of annexin-V stained cells and by measuring caspase-3 activity. Dextrans with 5 BH-3 groups showed 2-3 fold higher caspase-3 activity per peptide and a 2-3 fold higher activity per peptide compared to dextrans with 2 BH-3 peptides. Compared to the free CPP-BH-3 peptide the caspase-3 activity of dextran with 5 BH-3 groups was up to 20 times higher in same peptide concentration.

Furthermore dextrans with a varying number of amine groups were synthesized. In contrast to commercial available amino dextrans, the pyrane rings of the backbone were not opened. Moreover the number of amine groups per polymer was adjustrible at will. These AAE-dextrans were used for the parallel binding of chloride sensitive and insensitive dyes. Applying these polymers for imaging purposes in lysosomes, the investigation of the change of lysosomal chloride concentration was possible.

Abstract

### 1.1 Multivalente Wechselwirkungen

Wenn man Mechanismen der molekularen Erkennung in biologischen Systemen näher betrachtet, stellt man fest, dass diese häufig polyvalenter Natur sind. Schon lange Zeit ist bekannt, dass biologische Systeme oft gleichzeitig über mehrere Verknüpfungspunkte interagieren. In den Fokus der molekularen Biochemie rückte dieses Thema jedoch erst, als sich die Bedeutung polyvalenter Interaktionen abzeichnete. Multivalente Wechselwirkungen zeichnen sich dadurch aus, dass mehrere Liganden eines Teilchens (eines Moleküls, einer Oberfläche oder einer sonstigen Einheit) mit Rezeptoren eines anderen Teilchens parallel interagieren. Verschiedene Möglichkeiten der polyvalenten Interaktion sind möglich. Im Fall der homomeren Multivalenz wechselwirken jeweils mehrere Liganden eines Typs mit Rezeptoren von jeweils gleicher Sorte. Darüber hinaus gibt es aber auch den Fall, dass unterschiedliche Ligand-Rezeptorpaare an sogenannten heteromeren polyvalenten Bindungen beteiligt sind.



Abb. 1: Vergleich monovalenter und trivalenter Wechselwirkungen

Besonders im Verbund können die Bindungsstärken multivalenter Systeme wesentlich größer sein als die Summe einzelner monovalenter Bindungen in derselben Anzahl. Diese Eigenschaft bietet eine Grundlage neuer Strategien für das Design von Medikamenten. Durch Blockade oder Aktivierung multivalenter Bindungsstellen könnten so biologische Mechanismen verstärkt oder gehemmt werden, wie es bei der Modulation von monovalenten Wechselwirkungen nicht möglich wäre. In der Natur sind nur wenige Wechselwirkungen als eindeutig multivalent anerkannt. Ein Beispiel eines multivalenten Systems aus der Humanbiologie ist die Bindung des Influenzavirus an die Oberfläche einer bronchialen Epithelzelle.<sup>[1]</sup> Über mehrere Trimere des Hämagglutinins (200-400 Kopien pro Virusteilchen) bindet das Viruspartikel an *N*-Acetylneuraminsäureeinheiten (50-200 Kopien pro 100 nm<sup>2</sup>), die sich auf der Oberfläche der bronchialen Epithelzellen befinden.<sup>[2]</sup>



**Abb. 2**: Zelluläre Anlagerung und Aufnahme des Influenzavirus: Über seine Hämagglutinintrimäre (gelb) bindet das Viruspartikel an die auf der Zelloberfläche befindlichen *N*-Acetylneuraminsäureeinheiten (grün).

#### 1.1.1 Thermodynamik

Georges Whitesides stellte 1998 die Hypothese auf, dass beim Vorhandensein mehrerer Liganden und Rezeptoren im Allgemeinen die multivalente Interaktion gegenüber der monovalenten bevorzugt wird.<sup>[3]</sup> Zum besseren Verständnis der vorliegenden Arbeit sollen an dieser Stelle die thermodynamischen Zusammenhänge kurz diskutiert werden.

Die durchschnittliche Gibbs-Bindungsenergie zwischen *N* Rezeptoren und *N* Liganden in einem polyvalenten System kann größer, gleich oder kleiner sein als die durchschnittliche Wechselwirkungsenergie im entsprechenden monovalenten System. Dabei spielt die Kooperativität<sup>[4,5]</sup> eine wichtige Rolle. Als Maß der Kooperativität wurde der Parameter  $\alpha$ eingeführt.<sup>[6]</sup> Für multivalente Interaktionen gilt

$$\Delta G_{avg}^{poly} = \alpha \Delta G^{mono}$$

Dabei ist  $\Delta G_{avg}^{poly}$  die durchschnittliche Gibbs-Bindungsenergie einer jeden multivalenten Bindung und  $\Delta G^{mono}$  die freie Bindungsenthalpie einer entsprechenden monovalenten Bindung zwischen einem Liganden und einem Rezeptor. Die Kooperativität  $\alpha$  ist definiert als

$$\alpha = \frac{\lg(K_N^{poly}N)}{\lg(K^{mono})^N}$$

mit

N:Anzahl der Bindungen $\mathcal{K}_N^{poly}$ :Bindungskonstante einer polyvalenten Bindung $\mathcal{K}^{mono}$ :Bindungskonstante einer monovalenten Bindung

Die Einheiten von  $\alpha$  hängen von der Ordnung der polyvalenten Wechselwirkung ab. Ist der Wert von  $\alpha > 1$  (positiv kooperativ), bezeichnet man die Wechselwirkung als synergetisch. Ist  $\alpha = 1$  (nicht kooperativ), ist die Interaktion additiv beziehungsweise für  $\alpha < 1$  (negativ kooperativ) interferierend. Die Größe von  $\alpha$  ist jedoch für die Beschreibung einer polyvalenten Bindung aus zwei Gründen ungeeignet. Zum einen ist meistens die Anzahl der an einem multivalenten Bindungsvorgang beteiligten Bindungen N unbekannt. Zum anderen kann die Bindungskonstante eines monovalenten Systems K<sup>mono</sup> kleiner sein als die einer polyvalenten Bindung  $K_N^{poly}$ , obwohl die einzelnen Bindungsvorgänge additiv ( $\alpha = 1$ ) oder interferierend ( $\alpha < 1$ ) sind. So wurde die Bindung bi- und trivalenter galactosehaltiger Liganden mit Lectinen auf Leberzellen untersucht.<sup>[7]</sup> Für die Bindungskonstanten wurde ermittelt, dass  $K_2^{bi} < (K^{mono})^2$  und  $K_3^{tri} < (K^{mono})^3$  war. Obwohl in diesem Fall die bi- und trivalenten Liganden mit negativer Kooperativität binden, war die gemessene Affinität für biund trivalente Moleküle höher als für die monovalenten Liganden. Da nur durch den quantitativen Vergleich von multivalenten mit monovalenten Wechselwirkungen eine Art Kooperativität ermittelbar ist, wurde von Whitesides ein empirischer Parameter  $\beta$  eingeführt.  $\beta$  ist definiert als

$$\beta = \frac{K_N^{\text{poly}}}{K^{\text{mono}}},$$

wobei  $K_N^{poly}$  die gemessene Bindungskonstante einer polyvalenten Bindung und  $K^{mono}$  die Bindungskonstante einer monovalenten Bindung ist.  $\beta$  wird auch als Verstärkungsfaktor bezeichnet und ist also das Verhältnis der Avidität (Bindungsstärke einer multivalenten Bindung) zur Affinität der Komponente einer entsprechenden monovalenten Bindung. Auch wenn die Anzahl der an einem multivalenten Bindungsvorgang beteiligten Bindungen *N* unbekannt, die Anzahl der gebundenen Moleküle aber bekannt ist, so ist  $\beta$  ein geeigneter Parameter zur Quantifizierung von Multivalenzeffekten.

Zum genauen Verständnis der Einflüsse auf die Verstärkung oder Schwächung von Bindungen sollen nun die unterschiedlichen Enthalpie- und Entropiebeiträge von mono- und polyvalenten Wechselwirkungen betrachtet werden. Die freie Bindungsenthalpie  $\Delta G_N^{poly}$  ist definiert als

$$\Delta G_N^{poly} = \Delta H_N^{poly} - T \Delta S_N^{poly}$$

Die Enthalpie  $\Delta H_N^{poly}$  ist näherungsweise gleich der Summe der Enthalpien von *N* monovalenten Bindungen. Durch sekundäre Wechselwirkungen am aktiven Zentrum kann eine multivalente Bindung enthalpisch gestärkt oder geschwächt werden.



**Abb. 3**: Vergleich der Bindungsenthalpien zwischen polyvalenten Rezeptoren und verschiedenen polyvalenten Liganden

Im Fall einer ungespannten, sich gegenseitig nicht beeinflussenden Interaktion der Erkennungseinheiten ist die polyvalente Bindungsenthalpie  $\Delta H_N^{poly}$  gleich der Summe der einzelnen monovalenten Bindungsenthalpien  $N\Delta H^{mono}$ . Eine gespannte Bindungssituation oder eine gegenseitige Beeinflussung der Bindungsereignisse führt zu einer Vergrößerung von  $\Delta H_N^{poly}$ . Je starrer die Konformation einer polyvalenten Einheit ist, desto stärker führt eine geringe Änderung der räumlichen Orientierung zur enthalpischen Schwächung einer polyvalenten Bindung. Zur enthalpischen Verstärkung einer Bindung kommt es dagegen, wenn durch die Bindung der ersten Erkennungseinheit darauffolgende Bindungsereignisse mit günstigerer Enthalpie induziert werden. Das kann durch einen positiven allosterischen Effekt beziehungsweise durch sekundäre Effekte induziert werden und führt zu einer kleineren Bindungsenthalpie  $\Delta H_N^{poly}$  als die Summe der einzelnen monovalenten Bindungsenthalpien  $N\Delta H^{mono}$ .

Für eine gezielte Nutzung des Multivalenzeffektes ist außerdem ein genaues Verständnis des Einflusses der Entropie notwendig. Die Änderung der Gesamtentropie einer multivalenten Wechselwirkung setzt sich zusammen aus den einzelnen Änderungen der Translations- ( $\Delta S_{trans,N}^{poly}$ ), der Rotations- ( $\Delta S_{rot,N}^{poly}$ ) und der Konformationsentropie ( $\Delta S_{konf,N}^{poly}$ ) von Liganden und Rezeptoren bei deren Assoziation. Dazu kommt ein Betrag der Entropieänderung des umgebenden Wassers, die Solvatationsentropie ( $\Delta S_{H_2O,N}^{poly}$ ).

$$\Delta S_{N}^{poly} = \Delta S_{trans,N}^{poly} + \Delta S_{rot,N}^{poly} + \Delta S_{konf,N}^{poly} + \Delta S_{solv,N}^{poly}$$

Die Translationsentropie hängt mit den Translationsfreiheitsgraden zusammen und ist proportional zum Logarithmus der molaren Masse ( $\Delta S_{trans} \sim \ln(M)$ ).<sup>[3]</sup> Die Rotationsentropie hängt ab von den Rotationsfreiheitsgraden und ist proportional zum Logarithmus des Produktes der drei Hauptträgheitsmomente ( $\Delta S_{rot} \sim \ln(I_x I_y I_z)$ ).<sup>[3]</sup> Die Änderungen der Translations- sowie der Rotationsentropiewerte hängen also nur schwach (logarithmisch) von der Masse und der Größe des Teilchens ab. Die Translations- und Rotationsentropien von Liganden, Rezeptoren und Ligand-Rezeptor-Konjugaten sind näherungsweise gleich groß. Wenn man die Massenunterschiede zweier Teilchen vernachlässigt (fast immer sind die Massenverhältnisse von an der Bindung beteiligten Molekülen kleiner als 100:1), dann sind bei deren Vereinigung die Verlustwerte für Rotations- und Translationsentropie in einem monovalenten System genauso groß wie in einem multivalenten. Daher können diese Terme zur einfacheren Betrachtung der Gesamtentropie vernachlässigt werden.

Die Solvatationsentropie ist ein weiterer Beitrag zur Gesamtentropie und bezieht sich auf die Entropieänderung der umgebenden Lösungsmittelmoleküle. Der Solvatationsentropie-Gewinn resultiert bei der Zusammenlagerung zweier Moleküle aus der partiellen Aufhebung der Ordnung der Lösungsmittelmoleküle innerhalb der Solvathülle jedes einzelnen Bindungspartners. Unabhängig davon, ob es sich um eine monovalente oder polyvalente Interaktion handelt, wird für jede Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung ein negativer Wert zur Gesamtentropieänderung  $\Delta S$  addiert. Daher wird auch dieser Term bei der Betrachtung von  $\Delta S_N^{poly}$  nicht weiter berücksichtigt.



Abb. 4: Entropieunterschiede bei unterschiedlichen Linkern

Je nachdem, wie der Linker zwischen den Liganden beschaffen ist, können die Bindungen zwischen Liganden und Rezeptoren entropisch verstärkt oder geschwächt werden. Die Gesamtentropie bei der Bindung zwischen zwei monovalenten Liganden und zwei monovalenten Rezeptoren ist  $2\Delta S^{mono} = 2\Delta S^{mono}_{trans} + 2\Delta S^{mono}_{rot}$ . Sind die beiden Rezeptoren beziehungsweise die beiden Liganden über einen starren Linker verbrückt und ist keine Rotation um die Bindung möglich ( $\Delta S_{konf}^{bi} \approx 0$ ), so ist die Gesamtentropie dieses bivalenten Systems halb so groß wie bei der Assoziation zweier unverbrückter, monovalenter Systeme. Nach der ersten Assoziation in diesem rigiden System findet die Bindung des zweiten Liganden an den Rezeptor ohne weitere Aufwendungen an Translations-, Rotations- oder Konformationsentropie statt. Diese intramolekulare Bindung erfolgt mit einer größeren Änderung der Gibbs-Energie, wenn es keine weiteren Ethalpie-Aufwendungen gibt  $(\Delta G \approx \Delta H^{mono})$ , wenn  $\Delta S \approx 0$  und  $\Delta H \approx \Delta H^{mono}$ ). Eine solche Bindung wäre entropisch verstärkt. Dieser Fall ist in der Realität jedoch kaum anzutreffen. Normalerweise sind die Linker wenigstens etwas flexibel, sodass die Anzahl der möglichen Konformationen eines Linkers vor dem Bindungsereignis größer ist als danach. Wenn die Summe aus Rotationsund Translationsentropie kleiner ist als die Konformationsentropie, so ist die bivalente Bindung gegenüber zwei monovalenten Bindungen immer noch entropisch begünstigt. Ist die Konformationsentropie für die zweite Bindung im bivalenten System größer als die Summe aus Translations- und Rotationsentropie, so ist die bivalente Bindung gegenüber den beiden

6

monovalenten entropisch geschwächt. Dadurch kommt es zur Assoziation eines zweiten Liganden anstatt zur bivalenten Bindung.

Der hohe Entropiegewinn bei der Bildung von multivalenten Komplexen bietet großes Potenzial für die Anwendung in Therapeutika. So kann die Bindungsstärke einer bivalenten Bindung um den Faktor 1000 größer sein als bei zwei entsprechenden monovalenten Verbindungen zusammen. Bei pentavalenten Komplexen kann die Bindungsstärke bis zu 10<sup>8</sup>-fach verstärkt werden.<sup>[8]</sup>

### 1.2 Polymere Therapeutika

Will man einen neuen Wirkstoff als Medikament zulassen, so muss seine Wirkung besser sein als die eines Placebos und von bereits zugelassenen Substanzen. Ferner ist der Unbedenklichkeitsnachweis zu erbringen. Es ist also das Ziel, den therapeutischen Index (Verhältnis von toxischer zu therapeutischer Dosis) zu verbessern. Ein möglicher Zugang zu potenteren Pharmaka mit geringeren Nebenwirkungen sind polymere Therapeutika.<sup>[9-11]</sup> Bei den meisten der heute erhältlichen Pharmazeutika handelt es sich um niedermolekulare, monovalent bindende Verbindungen (small molecules) mit einem Molekulargewicht von weniger als 800 g/mol. Aufgrund ihrer Größe verbleiben diese Substanzen nicht nur am eigentlichen Wirkort, sondern sie diffundieren auch in gesundes Gewebe und verteilen sich aleichmäßig im gesamten Körper. Infolgedessen müssen wesentlich höhere Konzentrationen eingesetzt werden, als am Wirkort erforderlich sind. Das entscheidende Problem dabei ist das Auftreten von Nebenwirkungen. Besonders bei Medikamenten mit geringem therapeutischen Index wie Zytostatika oder Immunsuppressiva führen Wechselwirkungen in gesundem Gewebe zu ungewollten Begleiterscheinungen, wie Schädigungen des zentralen Nervensystems, Herz- oder Nierentoxizität. Dadurch ist der Einsatz von solchen Medikamenten stark dosislimitiert und eine effektive Behandlung nur schwer möglich.<sup>[12]</sup> Polymere Transportsysteme als mögliche Alternativen zu den niedermolekularen Verbindungen sind in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung gerückt. Im Gegensatz zu kleinen Molekülen, die in der Lage sind, die geschlossene Endothelzellschicht von Blutkapillaren zu durchdringen, können Makromoleküle aufgrund ihrer Größe diese Barriere nicht überwinden. Im Tumorgewebe sind die Blutkapillaren porös. Zwischen den Endothelzellen befinden sich Poren von 60-80 nm, durch die Nährstoffe, aber auch Makromoleküle ins krankhafte Gewebe dringen können und sich aufgrund des mangelhaft funktionierenden lymphatischen Systems dort anreichern. Dieser EPR-Effekt (enhanced permeability and retension), der 1986 erstmals von Yasuhiro Matsumura und Hiroshi Maeda beschrieben wurde,<sup>[17, 18]</sup> wird bei Makromolekülen mit einem Molekulargewicht von über

7

20 kDa beobachtet. Weiteren Einfluss auf die Anreicherung des Polymers im Tumorgewebe haben seine Ladung, Immunogenität, Hydrophobie sowie seine Konformation. Für eine effektive Anreicherung des Makromoleküls im malignen Gewebe ist eine lange Aufenthaltszeit im Organismus nötig. Die längsten Plasmahalbwertszeiten können von Polymeren erreicht werden, die ein Molekulargewicht von über 30 kDa (oberhalb der Nierenschwelle) und eine neutrale Ladung aufweisen.<sup>[19, 20]</sup>



Abb. 5: Vergleich von freien und polymergebundenen Wirkstoffen

Es wurden bereits verschiedene Möglichkeiten der makromolekularen Wirkstoffzufuhr untersucht. Zum einen gibt es partikuläre Transportsysteme, bei denen der Wirkstoff physikalisch durch Nanopartikel aufgenommen wird. Dieses Prinzip wurde in Form von Liposomen<sup>[13, 14]</sup> oder nichtkovalenten Trägersystemen<sup>[15, 16]</sup> realisiert. Zum anderen gibt es aber auch Wirkstoff-Polymerkonjugate, bei denen der Wirkstoff kovalent an ein Polymer gebunden ist. Dazu wurden in der Vergangenheit Proteine, Polysaccharide oder synthetische Polymere als Wirkstoffträger eingesetzt. Die Struktur von solchen polymeren Trägern kann variieren und gerade im Fall der synthetischen Polymere an die jeweiligen Gegebenheiten wie den Wirkstoff oder den Wirkort angepasst werden.



Abb. 6: Strukturen polymerer Wirkstofftransporter

Die Stabilität und Haltbarkeit von therapeutisch relevanten Proteinen wie Zytokinen oder Antikörpern wird beispielsweise durch die Immobilisierung von Polyethylenglycolketten an deren Oberfläche erhöht. Dadurch entstehen sternförmige Makromoleküle, deren Molekulargewicht, und damit auch deren Halbwertszeit, *in vivo* gegenüber dem freien Protein deutlich erhöht ist. Die damit einhergehende Abnahme der Aktivität wird durch die längere Halbwertszeit kompensiert.<sup>[21]</sup>

Wie in Abbildung 6 erkennbar, ist der Wirkstoff meistens über einen Linker am Polymer gebunden. Dieser Linker kann spaltbar oder chemisch inert sein. Spaltbare Linker können Hydrazone<sup>[22]</sup> sein, die abhängig vom pH-Wert gespalten werden. Aber auch Ester<sup>[23]</sup> oder spezielle Peptidsequenzen<sup>[24]</sup> können als spaltbare Linker verwendet werden, um am Wirkort von Enzymen freigesetzt zu werden. Chemisch inerte Linker werden dagegen von Enzymen am Wirkort gar nicht oder nur sehr langsam zersetzt. Damit bietet sich die Möglichkeit, dass multiple Wirkstoffliganden, die auf einem Polymer-Rückgrat gebunden sind, gleichzeitig mit multiplen Rezeptoren auf Oberflächen von Proteinen oder Zellorganellen wechselwirken. Diese multivalenten Wechselwirkungen sollten, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, die Effizienz des jeweiligen Wirkstoffes deutlich erhöhen. Verschiedene lineare Glycopolymere, aber auch Dendrimere wurden über chemisch inerte Linker mit Wirkstoffen belegt und ihre Wirkung untersucht. So wurden L-Lysin-Dendrimere mit 2 bis16 Sialinsäure-Resten belegt

und die Bindungsaffinitäten in verschiedenen Assays untersucht. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass 6 Sialinsäureeinheiten pro Polymer optimal für eine antivirale Aktivität gegen Influenza-A-Viren sind. Dabei wurde eine 200-fach höhere Bindungsaffinität zum trivalenten Hämagglutinin im Vergleich mit den entsprechenden monovalenten Sialinsäureliganden festgestellt.<sup>[25]</sup> Da diese Dendrimere jedoch mit einem Durchmesser von 3-6 nm deutlich kleiner sind als die Abstände zwischen zwei Hämagglutinintrimeren auf der Virusoberfläche, können sie auch nur maximal an einen Rezeptor binden. Ein lineares Polymer mit einem Molekulargewicht von 10<sup>6</sup> Da zeigte *in vitro* dagegen eine 10<sup>8</sup>-fach höhere Bindungsaffinität und blockierte das Andocken des Virusteilchens wesentlich effektiver.<sup>[26]</sup> Dafür ist neben der

stark erhöhten Bindungsstärke auch das Polymer-Rückgrat als solches verantwortlich, indem es die Oberfläche sterisch abschirmt.

Insgesamt ist in vorherigen Untersuchungen gezeigt worden, dass Polymere die Wirkungseffizienz von Wirkstoffen erhöhen können. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Ausnutzung des Multivalenzeffektes bei Polymer-Wirkstoffkonjugaten mit inerten Linkern.

### 1.3 Die Apoptose – der programmierte Zelltod

In mehrzelligen Organismen müssen Zellteilung und Zelltod aufeinander abgestimmt sein, damit eine gesunde Entwicklung gewährleistet ist und die Gefahr, die von defekten Zellen ausgeht, reduziert wird. Deshalb müssen überflüssige, geschädigte oder entartete Zellen aus dem Organismus entfernt werden. Störungen dieser Prozesse haben schwerwiegende Konsequenzen, wie die Fehlbildung von Organen, Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen oder Krebs. Das Sterben von Zellen kann nekrotisch oder apoptotisch erfolgen. Bei der Nekrose kommt es, bedingt durch mechanische Verletzungen oder Kontakt mit Toxinen, zur Anschwellung des Zytoplasmas und der Zellorganellen, was zur Zerstörung der Plasmamembran führt. Infolgedessen wird der Zellinhalt in den extrazellulären Raum freigesetzt und führt dort zur Schädigung des Nachbargewebes.<sup>[27, 28]</sup> Der Abbau der Zelltrümmer erfolgt hier durch Makrophagen. Im Gegensatz zur Nekrose, die passiv verläuft, handelt es sich bei der Apoptose um ein Selbstmordprogramm, bei dem einzelne Zellen aktiv ihren eigenen Abbau durchführen, ohne umliegendes Gewebe zu schädigen. Dies ist ein normaler Vorgang des Zellstoffwechsels. Apoptose kann durch verschiedene Stimuli wie DNA-Schäden, Entzug von Wachstumsfaktoren, Chemotherapeutika oder Aktivierung der Todesrezeptoren induziert werden. Über definierte Signaltransduktionswege werden zunächst Zellbestandteile zerkleinert, in membranumhüllte Vesikel verpackt und diese schließlich vom Immunsystem phagozytiert.<sup>[29]</sup> Intrazelluläre Bestandteile gelangen somit nicht in den extrazellulären Raum und führen auch nicht zu Entzündungsreaktionen. Für einen geordneten Ablauf dieses Prozesses sind bestimmte Proteasen, sogenannte Caspasen, verantwortlich. Durch ihre gegenseitige Aktivierung verstärken Caspasen zum einen das proapoptotische Signal und zum anderen induzieren sie durch die Spaltung von Enzymen und Strukturproteinen charakteristische morphologische Veränderungen der Zellen. Die Apoptose kann über zwei Wege initiiert werden: rezeptorvermittelt (extrinsischer Weg) oder durch bestimmte intrazelluläre Signale, die zu mitochondrialen Veränderungen führen (intrinsischer Weg).

#### **1.3.2 Die rezeptorvermittelte Apoptose**

Der extrinsische Weg wird durch die Bindung eines Tumor-Nekrose-Faktor-(TNF)-Liganden an einen Rezeptor der TNF-Rezeptor-Familie induziert. Diese Rezeptoren besitzen im zytoplasmatischen Teil eine Todesdomäne (death domain, DD), die für die Transduktion des apoptotischen Signals essenziell ist. Aus diesem Grund werden sie auch Todesrezeptoren genannt. Die am besten charakterisierten Apoptose-vermittelnden Rezeptoren sind der FAS-Rezeptor (auch CD95-Rezeptor genannt) und der TNF1-Rezeptor. Am Beispiel des TNF1-Rezeptors soll der Mechanismus der rezeptorvermittelten Apoptose erklärt werden. TNF wird zunächst von Lymphozyten und Makrophagen als Zelloberflächenmolekül gebildet. Bindet TNF an den TNF1-Rezeptor, induziert dieser trimere Ligand die Trimerisierung der Todesdomäne.<sup>[30]</sup> An dieses Proteininteraktionsmotiv lagern sich nun drei TRADD (Tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein) Adapterproteine an. Diese rekrutieren ihrerseits FADD-Proteine (Fas-associated protein with death domain, FADD), wobei die Bindung durch Wechselwirkungen ihrer jeweiligen Todesdomäne zustande kommt. Neben der Todesdomäne besitzt das FADD außerdem eine sogenannte Todes-Effektor-Domäne (DED, death effector domain), wie sie auch in der Prodomäne der Procaspase-8 zu finden ist. Durch die Wechselwirkungen der Domänen kommt es zur Anbindung der Procaspase-8 an den sogenannten Zelltod-induzierenden Signalkomplex DISC (death inducing signal complex).<sup>[31]</sup> Dieser Komplex beinhaltet mehrere Procaspase-8-Motive, die sich aufgrund ihrer räumlichen Nähe zueinander gegenseitig aktivieren. Die aktivierte Caspase-8 verlässt den Komplex, aktiviert ihrerseits weitere Caspasen und löst somit die Caspase-Kaskade aus, an deren Ende die Effektorcaspasen aktiviert werden. Caspase-8 kann aber nicht nur andere Caspasen aktivieren, sondern auch durch Spaltung des proapoptotischen Bcl-2-Homologs Bid den mitochondrialen Apoptoseweg initiieren.



Abb. 7: Verlauf der rezeptorvermittelten Apoptose

### 1.3.3 Der mitochondriale Apoptoseweg

Die Mitochondrien-vermittelte Apoptose wird durch intrazelluläre Signale induziert, wie etwa bei der Schädigung von DNA. Das wesentliche Ereignis in beiden Signalwegen ist die Freisetzung von Cytochrom c, das für die Bildung des Apoptosoms und die Aktivierung der Procaspase-9 wichtig ist.

Bei dem intrinsischen Apoptoseweg spielt die Aktivierung der Mitochondrien eine wesentliche Rolle. Da dieser Mechanismus in dieser Arbeit einen besonderen Stellenwert einnimmt, soll er an dieser Stelle detailliert beschrieben werden. Um proapoptotische Proteine wie Cytochrom c aus dem mitochondrialen Innenraum freizusetzen und die Caspase-Kaskade zu initialisieren, muss die äußere Mitochondrienmembran permeabilisiert werden. Dieser Prozess wird von pro- und antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-(B-cell lymphoma-2)-Familie reguliert. Man findet sie sowohl im Zytoplasma als auch auf den Membranen der Mitochondrien, des Zellkerns oder des endoplasmatischen Reticulums. 15 Mitglieder dieser Familie sind bekannt.<sup>[32, 33]</sup> Diese Proteine sind durch den Besitz einer oder mehrerer  $\alpha$ -helikaler Bcl-2-homology-domains gekennzeichnet, die abgekürzt als BH-Domänen bezeichnet werden. Die BH-Domänen sind für die Struktur und die Funktion der Proteine wichtig, da sie Bindungen zwischen den Familienmitgliedern ermöglichen und so

die gegenseitige Aktivierung oder Desaktivierung regulieren. Die Bcl-2-Familie teilt sich auf in antiapoptotische Mitglieder (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w oder Bcl-B) mit 3-4 BH-Domänen, proapoptotischen Mitgliedern mit 3 BH-Domänen (Bax, Bak) und proapoptotischen Mitgliedern, die außer der BH3-Domäne keine strukturellen Gemeinsamkeiten besitzen (Bad, Bid, Bim). Letztere werden daher BH3-only-Proteine genannt.<sup>[34]</sup>



Abb. 8: Bcl-2-Proteine

Diese Proteine bilden untereinander Homodimere beziehungsweise Heterodimere, die je nach Zusammensetzung pro- oder antiapoptotisch wirken. So wirken Bax/Bax-Homodimere proapoptotisch, Bcl-2/Bax-Heterodimere und Bcl-2/Bcl-2-Dimere dagegen antiapoptisch. Bestimmte proapoptotische Signale regulieren die Verfügbarkeit und Aktivität der einzelnen Proteine und damit die Zusammensetzung der Dimere.<sup>[35-38]</sup> So stimuliert beispielsweise p53, ein Transkriptionsfaktor, der bei DNA-Schädigungen aktiviert wird, die Expression proapoptotischer Proteine. Unter physiologischen Bedingungen werden die proapoptotischen Proteine Bax und Bak durch ihre Bindung an antiapoptotische Bcl-2-Familienmitglieder desaktiviert. Bei der Aktivierung spielen die BH3-only-Proteine eine besondere Rolle. Sie werden ihrerseits durch extra- und intrazelluläre Stresskaskaden aktiviert, wobei es zur Phosphorylierung oder proteolytischen Spaltung der BH3-only-Proteine kommt und damit zu deren Aktivierung. Bid und Bim sind nicht nur in der Lage, alle antiapoptotischen Familienmitglieder zu binden, sondern auch Bax und Bad.<sup>[39-42]</sup> Die anderen BH3-only-

Proteine interagieren mit einigen antiapoptotischen, jedoch nicht mit proapoptotischen Multidomänenproteinen. Bei der Bindung an antiapoptotische Proteine kommt es durch Verdrängung zur Freisetzung von inaktiven Bax und Bak aus den inhibitorischen Komplexen. Die damit einhergehende Konformationsänderung von Bax und Bak befähigt diese Proteine, in der mitochondrialen Membran zu oligomerisieren. Dabei kommt es zu einer Kanalbildung, wodurch Cytochrom c in das Zytosol freigesetzt wird. Aktivierte BH3-only-Proteine wie Bid, Bim oder Puma können auch direkt an die BH3-Domänen von Bak und Bax binden und so zu deren Aktivierung führen. Dadurch kommt es ebenfalls zur Konformationsänderung, zu deren Oligomerisierung und zur Kanalbildung in den Mitochondrien. Nach seiner Freisetzung ins Zytoplasma induziert Cytochrom c, das unter physiologischen Bedingungen für den mitochondrialen Elektronentransport zuständig ist, die Aktivierung von Caspase-9. Dazu bindet Cytochrom c an das Adapterprotein APAF-1 (apoptotic protease-activating factor-1), ein zytosolisches Protein, das eine CARD-Domäne und eine Nukleotid-Bindungsstelle besitzt. Die Bindung von Nukleotiden an den APAF-1/Cytochrom-c-Komplex führt zu seiner Oligomerisierung und es bildet sich das Apoptosom.

Die CARD-Domänen der APAF-1-Einheiten sind nun frei zugänglich. Über homotypische Bindungen der CARD-Domänen binden mehrere Procaspase-9-Motive. Durch deren räumliche Nähe kommt es in einem Autoaktivierungsprozess zur Freisetzung von aktiver Caspase-9. Diese aktiviert analog zu Caspase-8 in einer Caspase-Kaskade weitere Caspasen.

#### 1.3.1 Caspasen

Bei den Caspasen (**C**ystein-abhängige **Asp**artat-spezifische Prote**asen**) handelt es sich um Cystein-Proteasen, die Substrate innerhalb einer bestimmten Tetrapeptidsequenz von einem in der P1-Position befindlichen Aspartat spalten. Während das Vorhandensein von Aspartat in der P1-Position des Substrates für die katalytische Wirkung der Caspasen notwendig ist, dienen die in den P2-P4-Positionen sitzenden Aminosäuren lediglich als spezifische Erkennungssequenz für die verschiedenen Caspasen.<sup>[43-46]</sup>

Insgesamt wurden bis heute 17 Familienmitglieder der Caspasen in Säugetieren identifiziert. Davon werden 11 im Menschen exprimiert.

Nicht alle diese Enzyme vermitteln Apoptose. Die Caspasen-1, -4 und -5 tragen zur Reifung proinflammatorischer Zytokine bei und fördern somit Entzündungsprozesse. Die apoptotischen Caspasen werden aufgeteilt in Initiator- und Effektorcaspasen. Zu den Initiatorcaspasen zählen Caspase-2, -8, -9 und -10. Sie sind die ersten aktivierten Caspasen in der Caspasekaskade und aktivieren im Verlauf der Apoptose die Effektorcaspasen-3, -6 und -7.<sup>[47, 48]</sup> Die Effektorcaspasen sind die eigentlichen Exekutoren dieses programmierten

Zelltodes, da sie eine Reihe von Proteinen spalten, die für die Aufrechterhaltung der Funktion der Organellen und die Struktur des Zytoskeletts notwendig sind. Durch den Abbau von Proteinen, welche die DNA- oder RNA-Synthese beziehungsweise zelluläre Reparaturprozesse steuern, werden Transkription, Translation und Proliferation unterdrückt. Durch die Aktivierung oder Desaktivierung von Signalmolekülen werden ganze Signalkaskaden verändert.<sup>[49]</sup> Caspasen steuern also die Degradierung von Proteinen nicht unspezifisch, sondern sie spalten ihre Substrate sehr selektiv.

Strukturell sind alle Caspasen sehr ähnlich aufgebaut. Sie besitzen N-terminal eine Prodomäne, die von einer großen (17-20 kDa) und einer kleinen katalytischen Einheit (10-12 kDa) gefolgt ist. Die Prodomänen enthalten Protein-Protein-Interaktionsdomänen. Während die für den intrinsischen Weg relevanten Initiatorcaspasen-2 und -9 die CARD-Domäne (caspase recruting domain) in ihrer Prodomäne enthalten, besitzen die für den extrinsischen Weg essenziellen Initiatorcaspasen in ihrer Prodomäne sogenannte DEDs (death effector domain).



Abb. 9: Humane Caspasen mit spezifischer Substratsequenz im Überblick

Da Caspasen am Apoptosemechanismus in ihrer aktiven Form eine wesentliche Rolle spielen, werden sie in ihrer inaktiven Form exprimiert. Bei ihrer Aktivierung werden die große und die kleine Untereinheit getrennt. Zusätzlich wird die Prodomäne abgetrennt. Zwei große

und zwei kleine Untereinheiten dimerisieren zu einem Heterotetramer.<sup>[50]</sup> Die aktive Caspase ist ein Heterotetramer, in dem sich zwei Dimere, bestehend aus einer großen und einer kleinen Untereinheit, in gegenläufiger Orientierung zusammenlagern. Dabei kommt es zu einem Konformationswechsel, durch den das aktive Zentrum aktiviert wird. Allen Caspasen ist die Lokalisation eines Cysteins im aktiven Zentrum innerhalb eines spezifischen Pentapeptids QACXG gemein, wobei *X* stellvertretend für Q, G oder R steht. Die Seitenkette des Cysteins ist als Nucleophil für die Hydrolyse der Peptidbindung notwendig und bildet zusammen mit ebenfalls enthaltenem Histidin eine katalytische Dyade am aktiven Zentrum.<sup>[51]</sup>



Abb. 10: Freisetzung des aktiven Zentrums bei der Aktivierung von Caspasen (links) und Kristallstruktur einer dimerisierten Caspase-1

# 2 Fragestellung und Zielsetzung

Innerhalb der Zelle werden Signale über Kaskaden molekularer Wechselwirkungen übertragen. Ein großer Teil dieser Protein-Protein-Wechselwirkungen wird durch die Bindung linearer Peptide in Proteindomänen vermittelt. Mittels synthetisch hergestellter Peptide können solche Domänen adressiert und durch ihre Bindung Prozesse innerhalb der Zelle gezielt gesteuert werden.<sup>[52, 53]</sup> Da die meisten Peptide nur schlecht in Zellen aufgenommen und im Zytosol rasch abgebaut werden, ist ihr Einsatz für die Untersuchung schlecht- bzw. nichtverstandener Transduktionswege in lebenden Zellen stark beschränkt.<sup>[54]</sup>

Ziel dieser Dissertation war es, ein Polymer so zu modifizieren, dass die parallele Anknüpfung unterschiedlicher Peptide kontrolliert und effizient erfolgen konnte. Eine wesentliche Anforderung an das Polymer war seine gute biologische Verträglichkeit. Für spätere zelluläre Experimente war sowohl eine gute Wasserlöslichkeit als auch eine zufriedenstellende Zellpermeabilität des Polymers notwendig.

Die erhaltenen multifunktionellen Peptidpolymere sollten einerseits den Transport verschiedener kovalent aufgebrachter Peptide in Zellen gewährleisten und andererseits ihre zytosolische Stabilität erhöhen. Aus diesem Grund war es unerlässlich, dass das gewählte Polymer selbst eine hohe zytosolische Stabilität aufwies, ohne dabei aber zytotoxisch zu wirken. Wünschenswert war weiterhin die Verwendung eines leicht zugänglichen Polymergrundgerüsts, das in einer modularen Synthese mit verschiedenen funktionellen Gruppen belegt werden konnte, um eine breite Anwendbarkeit zu schaffen.

Sowohl der Multivalenzeffekt als Schlüssel zu besseren Aktivitäten als auch der Vorteil von polymeren Therapeutika wurde bereits ausführlich in den ersten beiden Einleitungskapiteln diskutiert. Daher war in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Frage, ob durch die Anknüpfung mehrerer Kopien eines biologisch aktiven Peptids auf das gewählte Polymer eine Affinitäts- und Aktivitätssteigerung der gebundenen Spezies erfolgt. Ferner sollte untersucht werden, ob die theoretischen Annahmen zum Multivalenzeffekt experimentell nachweisbar waren. Dazu war es notwendig, die Anzahl der aufgebrachten biologisch aktiven Peptide pro Polymereinheit zu variieren.

Der Vorteil der modularen Synthese sollte in verschiedenen Anwendungen geprüft werden. So sollte das Polymer neben dem Einsatz als multivalenter Peptidtransporter auch für die Bildgebung in zellulären Systemen eingesetzt werden. Ergebnisse und Diskussion
# 3 Ergebnisse und Diskussion

# 3.1 BH3-Peptidpolymere zur Apoptose-Induktion

Im Einleitungsteil wurde bereits ausführlich auf die Apoptose und die dabei ablaufenden Mechanismen eingegangen. Während im gesunden Gewebe über diesen Mechanismus das Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau von Zellen geregelt wird, ist in Tumorzellen durch veränderte Signalkaskaden die Apoptose inhibiert. Da der Ablauf des programmierten Zelltods heute gut verstanden ist, wird im Bereich der Forschung intensiv nach verschiedenen Wegen gesucht, auf denen man in die Regulationsprozesse dieses Signalnetzwerkes eingreifen kann, um das Selbstmordprogramm in Tumorzellen selektiv zu aktivieren. Heutzutage werden in der Therapie oftmals Zytostatika auf Basis von *small molecules* in Kombination mit energiereicher Strahlung eingesetzt, um Apoptose in Tumorzellen auszulösen.<sup>[55]</sup> Wie bereits in Kapitel 1.2 erwähnt, wird bei dieser Form der Therapie auch gesundes Gewebe zerstört. Ferner können auch die Abbauprodukte solcher Substanzen toxisch sein. Alternativ dazu wurden monoklonale Antikörper oder Peptide eingesetzt, die unter teilweiser Verfolgung des apoptotischen Weges den programmierten Selbsmord in Zellen auslösen. So wurde beispielsweise versucht, proapoptotische Proteine zu aktivieren.<sup>[56]</sup> oder antiapoptotische Proteine zu blockieren.<sup>[57]</sup>

Da Peptide zwar sehr spezifisch an Proteine binden, ihre zytosolische Stabilität jedoch relativ gering ist, sollte ihre Wirkung in diesem Projekt durch die Anknüpfung an ein Polymer erhöht werden. Wie schon im Kapitel 2 beschrieben, war in diesem Projekt ein Ziel ein modular aufgebautes Polymer parallel mit proapoptotischen Peptiden kovalent beladen werden, um diese in lebende Zellen zu transportieren, dort spezifisch bestimmte Protein-Protein-Interaktionen zu modulieren und somit Apoptose zu induzieren.

Da der Mechanismus des programmierten Zelltods heute gut verstanden ist, stellt die Apoptose ein geeignetes Testsystem dar. Gleichzeitig war auch die Induktion des programmierten Zelltodes ein therapeutisch relevantes Ziel.

#### 3.1.1 Auswahl des Polymers

Zunächst war es notwendig, ein geeignetes Polymergrundgerüst zu finden. Ein synthetisches Polymer bietet oftmals den Vorteil, dass die Monomerbausteine mit den gewünschten Funktionalitäten direkt für die Polymerisation eingesetzt werden können. Mithilfe der lebenden Polymerisation kann man eine enge Verteilung der molaren Massen und die Bildung definierter Strukturen stark beeinflussen. Natürliche Polymere weisen dagegen eine breite Verteilung ihrer molaren Massen auf und sind daher auch nur mit relativ großen Polydispersitäten kommerziell erhältlich. Lediglich teure Standards zur Eichung von Gelpermeations-Chromatographieanlagen weisen eine geringe Massenverteilung auf. Oftmals ist der Einsatz synthetischer Polymere in biologischen Systemen jedoch durch eine schlechte Abbaubarkeit limitiert. Zudem müssen synthetische Polymere erst aufwendig synthetisiert und charakterisiert werden. Natürliche Polymere dagegen sind leicht zugänglich und werden im Organismus enzymatisch in nicht toxische Bestandteile zerlegt. Da die Polydispersität des Rückgrats für die Fragestellung der hier vorliegenden Arbeit eine eher untergeordnete Rolle spielt, die gute Biokompatibilität jedoch ein wichtiges Kriterium ist, fiel die Wahl für ein Grundgerüst auf ein natürliches Polymer. Verschiedene solcher Polymere sind seit Langem in Gebrauch. So wurden in den letzten Jahren zahlreiche Puplikationen zu Arbeiten mit Stärke, Cellulose, Chitosan oder Dextran veröffentlicht. All diese hier aufgeführten Polymere sind Zuckerpolymere, mit guter biologischer Verträglichkeit. Während Dextran und Stärke aus  $\alpha$ -verknüpter D-Glukose aufgebaut sind, besteht Cellulose aus  $\beta$ -D-Glukosemonomeren und Chitosan aus 2-Acetamido-2-desoxy-β-D-glukopyranose-Einheiten. Aufgrund ihrer Struktur sind Chitosan, Stärke und Cellulose schlecht wasserlöslich. Im Fall von Cellulose und Chitosan sind die Monomerbausteine über β-1,4-glykosidische Bindungen miteinander verknüpft. Da die benachbarten Pyranringe jeweils um 180° verdreht sind, bilden sich inter- und intramolekulare Waserstoffbrücken aus. Somit kann sich keine Solvathülle um die einzelnen Polymere ausbilden. Stärke besteht zu etwa 20 % aus Amylose und zu 80 % aus Amylopektin. Während die Glukoseeinheiten bei der Amylose 1,4-verknüpft vorliegen, sind die D-Glukoseeinheiten des Amylopektins sowohl über α-1,4-glykosidische als auch über α-1,6-glykosidische Bindungen miteinander verbunden. Durch diese Verzweigung besitzt Amylopektin weniger freie Hydroxylgruppen, um die sich eine Solvathülle ausbilden kann und ist daher auch nur sehr schlecht wasserlöslich. Dagegen ist Amylose aufgrund ihrer Struktur besser in Wasser solvatisierbar. Allerdings ist dazu Energie von außen in Form von Wärme nötig.

Diese α-D-Glukosebausteine im Dextran sind hauptsächlich durch 1,6-glykosidische Bindungen miteinander verknüpft.<sup>[58]</sup> Durch diese Struktur weist Dextran neben einer guten biologischen Verträglichkeit auch eine sehr gute Wasserlöslichkeit auf. Daher schien dieses









Abb. 11: Aufbau verschiedener natürlicher Polymere

Polymer für den hier vorgesehenen Einsatz sehr gut geeignet. Dextran wird enzymatisch von grampositiven Bakterien der Gattung *Leuconostoc (Leuconostoc dextranicum* und *Leuconostoc mesenteroides*) aus Saccharose hergestellt und erreicht ein Molekulargewicht von bis zu 500 kDa. In der Medizin wird Dextran mit einer molekularen Masse von 75 kDa in sechsprozentiger Lösung aufgrund des gleichen kolloidosmotischen Drucks als Blutplasma-Ersatzmittel eingesetzt. Ferner werden in der Chirurgie niedermolekulare Dextrane als Thrombosehemmer eingesetzt.<sup>[59]</sup> Der Abbau dieses Polysaccharids erfolgt in biologischer Umgebung nur enzymatisch durch Dextranase. Dieses Enzym wird jedoch ausschließlich von Bakterien hergestellt, aber nicht in Gewebezellen exprimiert. Daher kann der Abbau im menschlichen Körper nur dort erfolgen, wo eine mikrobielle Population vorhanden ist, wie im Verdauungssystem oder im Rachenraum.<sup>[60]</sup> Im menschlichen Organismus werden Dextrane hauptsächlich über die Niere ausgeschieden.<sup>[61]</sup> Die Nierenschwelle von Dextran liegt bei einem Molekulargewicht von 60 kDa. Größere Dextrane werden enzymatisch in der Leber und der Milz gespalten.<sup>[62]</sup>

### 3.1.2 Synthese von Carboxymethyldextran

In dieser Arbeit wurde kommerziell erhältliches Dextran mit einer durchschnittlichen molaren Masse von 10 kDa als Polymergrundgerüst eingesetzt. Polydispersitätsuntersuchungen des Polymers mittels Gelpermeations-Chromatographie ergaben einen Polydispersitätsindex (PDI) von 1.582. Dieser Wert war für ein natürliches Polymer gut und erlaubte den weiteren Einsatz dieses Dextrans. Zunächst war die Frage der Funktionalisierung des Polymers zu klären. Da es sich bei Dextran um ein Glukosepolymer handelt, besitzt es abgesehen von einem Halbacetal an einem Ende des Polymerstranges nur Hydroxylgruppen, die als Anknüpfungsstellen für andere Moleküle verwandt werden können. Da die Ausnutzung des Multivalenzeffektes in der späteren Anwendung eine zentrale Rolle spielt, war es notwendig, ein System zu finden, bei dem Peptide so immobilisiert werden können, dass die Bindung zum Polymer im zellulären Milieu nicht oder nur sehr langsam gespalten wird. Außerdem sollte die Kupplung der jeweiligen Peptide schnell und quantitativ erfolgen. Da Hydroxylgruppen im Verhältnis zu anderen Funktionalitäten nur eine geringe Reaktivität aufweisen, wurde zunächst nach einer geeigneten Möglichkeit gesucht, um reaktivere Gruppen auf dem Polymer zu generieren.

In der Vergangenheit wurden bereits Dextrane auf unterschiedliche Weise derivatisiert. So wurden Aminodextrane durch Periodatspaltung einzelner Pyranringe und anschließender reduktiver Aminierung aus nativem Dextran hergestellt.<sup>[63]</sup> Nachteilig bei dieser Synthese ist

jedoch der Integritätsverlust des Polysaccharid-Rückgrats. Zudem weisen kommerziell erhältliche Aminodextrane meist nur eine geringe Anzahl an Aminogruppen auf, sodass nur eine geringe Beladung dieser Polymere erfolgen kann. Ferner wurden bereits Allyldextrane synthetisiert und für die Anknüpfung von Thiolen unter Ausbildung von Thioethern eingesetzt.<sup>[64]</sup> Bei der Verwendung von olefinischen Gruppen erschien jedoch die hohe und unspezifische Reaktivität gegenüber verschiedenen Nucleophilen als nachteilig. In einer Reihe von Arbeiten wurde bereits erfolgreich mit Carboxymethyldextran (CMD) gearbeitet. Aufgrund der variablen Beladbarkeit und der hohen Stabilität fiel die Wahl auf dieses Polymer.

In Anlehnung an eine Vorschrift von Chau et al. wurde in einer nucleophilen Substitutionsreaktion Bromessigsäure mit Dextran unter basischen Bedingungen zur Reaktion gebracht.<sup>[65]</sup> In einem ersten Schritt wurden die Hydroxylgruppen des Dextrans deprotoniert. Die negativ geladenen Alkoholatgruppen sind starke Nucleophile und reagierten mit den stark elektrophilen,  $\alpha$ -ständigen Kohlenstoffatomen der Bromessigsäure unter Ausbildung von Carboxymethylgruppen. Die Anzahl der Carboxymethylgruppen auf dem Polymer konnte durch die eingesetzte Menge an Bromessigsäure reguliert werden. Die Verteilung der Carboxymethylgruppen auf die einzelnen Glukoseeinheiten des Dextrans erfolgte statistisch. Um die gebildeten Carboxylatgruppen in Carboxylgruppen zu überführen, wurde die Lösung nach beendeter Reaktion mit verdünnter Salzsäure angesäuert.



Abb. 12 Synthese von Carboxymethyldextran (CMD) aus Dextran

Die Aufarbeitung erfolgte durch Dialyse der Reaktionslösung gegen Wasser. Anschließend wurde die Lösung etwas eingeengt und das Produkt in Methanol ausgefällt, um restliche Verunreinigungen zu entfernen. Das Lyophilisat war ein weißer Feststoff. Das molare

Verhältnis von Carboxymethylgruppen zu Glukoseeinheiten entsprach dem Carboxymethylierungsgrad. Diese Substitutionsgrade wurden mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie ermittelt. Die Spektren von nativem Dextran und Carboxymethyldextran sind zum Vergleich in Abbildung 13 gegenübergestellt.



Abb. 13: <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von Dextran (oben) und CMD (unten) im Vergleich

Beide Spektren wurden in D<sub>2</sub>O aufgenommen. Durch den H-D-Austausch, dem die unterlagen, waren die Spektren auf die Resonanzen Hydroxylgruppen der kohlenstoffgebundenen Protonen reduziert. Die Dubletts bei 4.96 ppm waren die Signale der C(1)H-Protonen der Acetalgruppen mit 1,6-glykosidischen Bindungen. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des CMDs erschien neben diesem Signal zusätzlich eines bei 5.1 ppm. Dabei handelte es sich ebenfalls um C(1)H-Protonen von Acetalgruppen mit  $\alpha$ -1,6-glykosidischen Bindungen. Offensichtlich führte die Einführung der Carboxymethylgruppe zu einem Tieffeldshift um 0.14 ppm dieses Signals gegenüber den unsubstituierten Glukoseeinheiten. Außerdem unterschied sich das Spektrum des CMD von dem des nativen Dextrans durch das zusätzliche Auftreten eines Multipletts der CM-Methylenprotonen zwischen 4.19 und 4.48 ppm. Da die Anzahl der C(1)H-Protonen im nativen sowie im derivatisierten Dextran gleich waren, konnte man über alle diese Signale integrieren und erhielt die Anzahl aller Glukoseeinheiten im Polymer. Um den Carboxymethylierungsgrad zu ermitteln, wurde zusätzlich über das Multiplettsignal der CM-Methylenprotonen integriert und beide

Integralwerte ins Verhältnis gesetzt. In dem in Abbildung 13 dargestellten Spektrum wurde ein Dextran mit 10 kDa umgesetzt. Folglich bestand dieses Polymer aus 62 Glukoseeinheiten mit insgesamt 62 C(1)H Protonen. Das Integral über dem Multiplettsignal der Carboxymethylgruppe ergab einen Wert von 16.65. Da jede Methylengruppe zwei Protonen enthielt, wurde dieser Wert durch 2 geteilt und man erhielt die Anzahl der Carboxymethylgruppen pro 62 Glukoseeinheiten. Somit sind in dem oben aufgeführten Beispiel durchschnittlich 8 Carboxymethylgruppen pro Dextranmolekül gebunden. Diese Methode war sinnvoll, um den Substitutionsgrad von CMD zu bestimmen. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde alternativ zu diesem Verfahren der Carboxymethylierungsgrad mithilfe der Titration bestimmt. Vorausgesetzt, dass zuvor alle Carboxylatgruppen zu den entsprechenden Säuren umgesetzt wurden, bot diese Methode eine sehr genaue Bestimmung der Substitutionsgrade. Dazu wurde eine bestimmte Menge an CMD eingewogen, in Wasser gelöst und gegen 0.1 molare Natronlauge titriert. Als Indikator für den Umschlagpunkt diente Phenolphthalein. Der Carboxymethylierungsgrad ergab sich aus

$$n(CM): n(AHG) = \frac{n(NaOH) \cdot M(AHG)}{m(CMD) - n(NaOH) \cdot \Delta M(AHG)}$$
, mit

- n(NaOH): verbrauchte Stoffmenge an 0.1 N NaOH während einer Titration
- m(CMD): CMD-Einwaage
- M(AHG): molare Masse einer unsubstituierten Glukoseeinheit (AHG)
- ΔM(AHG): Zunahme der molaren Masse einer Glukoseeinheit nach ihrer Substitution (M(AHG)<sub>substituiert</sub>-M(AHG)<sub>unsubstituiert</sub>)

Die so ermittelten Werte für die Substitutionsgrade stimmten mit denen, die durch <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie ermittelt wurden, überein.

### 3.1.3 Synthese von Thioester-Dextranen

Das nächste Ziel war, schnell und möglichst quantitativ verschiedene Peptide gleichzeitig auf dem Dextran zu immobilisieren. Verschiedene Ligationsmethoden sind in den letzten Jahren etabliert worden, mit denen man in relativ kurzer Zeit eine hohe Kupplungseffizienz erreicht. In der Peptidchemie bedient man sich häufig der nativen chemischen Ligation (NCL),<sup>[66-68]</sup> um zwei Peptide zu verbinden. Dabei reagiert ein Peptid, das C-terminal eine Thioesterguppe trägt, mit einem zweiten Peptid, das N-terminal ein Cystein trägt. In einem ersten Schritt kommt es reversibel zu einer Transthioesterifizierung zwischen dem Thioester des einen Peptids mit der Thiolgruppe des Cysteins. In einer spontanen Folgereaktion erfolgt ein  $S \rightarrow N$ -

Acyltransfer mit der α-ständigen Aminogruppe des Cysteins. Da die daraus resultierende Amidbindung thermodynamisch wesentlich stabiler ist als der intermediär gebildete Thioester, ist dieser Schritt nicht mehr reversibel. Da bei diesem Verfahren oftmals gute Umsätze erzielt wurden und, abgesehen von der Hydrolyse des Thioesters, keine Nebenprodukte entstehen können, wurde diese Methode für die Anknüpfung der Peptide an das Polymer gewählt. In Abbildung 14 ist der Mechanismus der NCL anhand von Carboxymethyldextran und einem Cysteinylpeptid gezeigt.



Abb. 14: Mechanismus der nativen chemischen Ligation

Analog zu dieser Darstellung wurde versucht, einen aliphatischen Thioester auf Dextran zu generieren, indem die Carboxylgruppen des CMD direkt mit Ethanthiol zur Reaktion gebracht wurden. Als Kupplungsreagenz wurde 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-Hydrochlorid (EDC) eingesetzt. Carbodiimide werden in der Peptidchemie standardmäßig eingesetzt, um Carbonsäuren und Amine zu Amiden zu kuppeln. Die meisten dieser Carbodiimide sind schlecht wasserlöslich beziehungsweise reagieren sofort mit Wasser zu den entsprechenden Harnstoffen. EDC ist als Hydrochlorid in Wasser gut löslich und hydrolysiert im schwach sauren Milieu langsamer als andere Carbodiimide, wie Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder Diisopropylcarbodiimid (DIC). Durch diese Eigenschaft kann es auch in wässriger Phase zur Amidkupplung eingesetzt werden. Die Synthese der Thioethylester auf CMD wurde bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt, wobei die besten Umsätze bei einem pH-Wert von 6 erfolgten. Bei höheren pH-Werten hydrolysierte der Thioester und bei niedrigeren pH-Werten nahm die Reaktivität des Thiols ab. Allerdings konnten auch auf diese Weise maximal 70 % aller Carboxymethylgruppen zu den entsprechenden Thioestern umgesetzt werden. Statt eines vollständigen Umsatzes aller Carboxylgruppen zu Thioestern waren noch Reste des umgelagerten N-Acylharnstoffs im <sup>1</sup>H-

NMR-Spektrum detektierbar. Auch verschiedenste Aufreinigungsversuche oder erneute Kupplungsschritte konnten diesen Harnstoff nicht entfernen.



**Abb. 15**: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von S-Ethylthiocarbonylmethoxydextran mit den Triplettsignalen des Thioesters (1.22 ppm) und des *N*-Acylharnstoffs (1.34 ppm)

Ein weiteres Problem war das Auftreten eines Tieffledshifts des CM-Methylengruppensignals und die damit einhergehende Überlappung dieses Signals mit dem Multiplett der Zuckerprotonen. Dadurch konnten die Signale der Thioestergruppen nicht einwandfrei mit denen der CM-Methylenprotonen verglichen werden.

# 3.1.4 Synthese von Carboxyethyldextran

Aufgrund der soeben geschilderten Probleme musste eine Alternative zu Carboxymethyldextran gefunden werden. Eine mögliche Lösung war die Immobilisierung von Carboxyethylgruppen auf Dextran. Der wesentliche Vorteil hierbei bestand in dem Vorhandensein einer weiteren Methylengruppe. Das Signal dieser zusätzlichen Gruppe im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum sollte, da sie sich nicht in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer Ethergruppe befand, weiter im Hochfeld liegen als das der Carboxymethylgruppe des CMD. Es gibt bereits ausgiebig Literatur über die Einführung von Carboxyethylgruppen in Polysaccharide.<sup>[69]</sup> Angelehnt an eine Vorschrift zur Synthese von Carboxyethylcellulose<sup>[70]</sup> wurde in einer Michael-Addition unter basischen Bedingungen aus Acrylamid und Dextran Carboxyethyldextran synthetisiert.



Abb. 16: Synthese von Carboxyethyldextran 2

Im ersten Schritt reagierten die Alkoholate des Dextrans mit dem elektrophilen β-C-Atom. Das zunächst gebildete Amidoethyldextran reagierte im zweiten Schritt mit den basischen Hydroxylgruppen der Natronlauge. Amide sind thermodynamisch wesentlich stabiler als Carbonsäuren und daher ist die Überführung von Amiden in Carbonsäuren nur schwer möglich. In dem hier diskutierten Fall bildete sich jedoch ein reaktionsträges Carboxylat. Aus diesem Grund konnte nach einer längeren Reaktionszeit aus dem Amidoethyldextran das Carboxyethyldextran erhalten werden. Bei der späteren Ansäuerung mit Salzsäure wurden die Carboxylatgruppen in Carboxylgruppen überführt.



Abb. 17: Mechanismus der Carboxyethyldextransynthese

Die Aufreinigung dieses Polymers erfolgte durch Ausfällen in Methanol und anschließender Dialyse gegen Wasser. Die Quantifizierung der Carboxyethylgruppen pro Dextranmolekül erfolgte analog zur Untersuchung des Substitutionsgrades von Carboxymethyldextran mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie und Titration. In Abbildung 18 ist ein <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von CED dargestellt. Das Signal der Methylengruppe in direkter Nachbarschaft zum Sauerstoff der Etherbindung erschien im Bereich der Zuckerprotonen. Das Signal der an die Carboxylgruppe angrenzenden Methylengruppe lag jedoch weiter im Hochfeld bei 2.67 ppm und war damit deutlich separiert von anderen Signalen. Der Substitutionsgrad ließ sich daher auch deutlich besser bestimmen als beim CMD. Das hier vorliegende <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum bezieht sich auf ein Dextran mit einer durchschnittlichen molaren Masse vom 10 kDa (62 Glukoseeinheiten). Integriert man nun über alle C(1)H-Protonen und vergleicht den Wert mit dem Integral über die Methylengruppe bei 2.67 ppm, so ergibt sich für die durchschnittliche Anzahl der Carboxyethyleinheiten pro Dextranmolekül ein Wert von 23. Die so ermittelten Ergebnisse konnten immer über Titration gegen 0.1 molare Natronlauge bestätigt werden.

#### Ergebnisse und Diskussion



Abb. 18: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Carboxyethyldextran

Informationen über die bevorzugt substituierten Positionen im CED konnten anhand von zweidimensionalen NMR-Spektren erhalten werden. Die Zuordnungen der einzelnen Signale erfolgten mittels HMQC-Tocsy, wobei Informationen über die Kopplungen der C-Atome zu den direkten und den darauffolgenden Nachbarkohlenstoffatomen erhalten wurden. Die Spektren sind im Anhang aufgeführt und sollen hier nicht weiter diskutiert werden. Die Aussagen über die Substitutionsmuster konnten anhand von HMQC- und HMBC-Spektren erhalten werden.

Das HMQC-Spektrum zeigt die Kopplungen der einzelnen Protonen mit den angrenzenden Kohlenstoffatomen. Da das untersuchte Polymer sowohl beladene als auch unbeladene Glukoseeinheiten enthielt, konnte anhand der unterschiedlichen Verschiebungen der Signale darauf geschlossen werden, welches Kohlenstoffatom innerhalb einer Glukoseeinheit am stärksten substituiert war. In Abbildung 19 weisen die Signale der C(3)H- und C(4)H- substituierten Glukoseeinheiten nur eine geringe Verschiebung gegenüber den entsprechenden Signalen in den unsubstituierten Glukoseeinheiten auf. Das Signal des C(2)H der substituierten Glukoseeinheiten liegt dagegen deutlich separiert von dem Signal des C(2)H der unbeladenen Glukoseeinheiten. Da dieser starke Shift der C(2)H-Signale nur durch eine starke Änderung der unmittelbaren elektronischen Umgebung zu erklären war, kann davon ausgegangen werden, dass die Substitution vorwiegend am C(2)H erfolgte.

#### Ergebnisse und Diskussion



Abb. 19: HMQC-Spektrum von CED

Die Bestätigung brachte die Überlagerung des HMQC- mit einem HMBC-Spektrum. In Abbildung 20 sind die interessanten Bereiche vergrößert dargestellt. Deutlich sichtbar waren die Weitbereichskopplungen zwischen dem Proton  $C(2)H_{beladen}$  und dem Kohlenstoffatom der Methylengruppe  $C(1')H_2$  sowie zwischen den Methylenprotonen  $C(1')H_2$  und dem Kohlenstoffatom  $C(2)H_{beladen}$ . Da jedoch keine Kopplungen zwischen  $C(1')H_2$  und  $C(3)H_{beladen}$  oder  $C(4)H_{beladen}$  erkennbar waren, konnte so eindeutig die vorrangige Substitution des Dextrans in Position 2 gezeigt werden.



Abb. 20: HMQC-HMBC-Spektrum von CED

# 3.1.5 Funktionalisierung von Thioestergruppen auf Carboxyethyldextran

Ausgehend von den Carboxyethylgruppen sollten im Folgenden Thioestergruppen auf dem Carboxyethyldextran immobilisiert werden. Im Gegensatz zu der in Kapitel 3.1.3 gewählten Strategie wurden nun die für die native chemische Ligation notwendigen Thioestergruppen durch Amidkupplung von Aminosäurethioestern mit den Carboxylgruppen des CED erzeugt. Diese Aminosäurethioester konnten beispielsweise aus *N*-Boc-Glycin und Ethanthiol erzeugt werden<sup>[71]</sup> Da Thioester unter basischen Bedingungen hydrolysiert werden, unter sauren Bedingungen aber stabil sind, war es wichtig, eine N-terminale Schutzgruppe zu verwenden, die unter sauren Bedingungen abspaltbar ist. Die Boc-Schutzgruppe (*tert*-**B**utyl**o**xy**c**arbonyl) zerfällt unter sauren Bedingungen zu CO<sub>2</sub> und Isobuten. Dies sowie die Tatsache, dass beide Zerfallsprodukte leicht von dem Thioester abtrennbar sind, machte die Boc-Gruppe in diesem Fall zur geeigneten Schutzgruppe für die N-Termini der Aminosäuren.

Um später die maximalen Kupplungserfolge mittels NCL zu erreichen, wurden weiterhin aromatische Thioester synthetisiert. Dazu wurden analog zu **3a** und **4a** *N*-Boc-Glycin und Thiophenol zur Reaktion gebracht. Die gereinigten Thioester wurden sauer entschützt.<sup>[72]</sup>



Abb. 21: Synthese der Glycinthioester

Die erhaltenen Thioester **4a**, **b** wurden in wässriger Lösung, mit EDC, bei einem pH-Wert von 6.5 auf die Säuregruppen des CED gekuppelt. Der Vorteil dieser Methode war, dass die Thioester zuvor synthetisiert und gereinigt wurden. Da man davon ausgehen konnte, dass unter den gewählten Bedingungen alle CE-Gruppen mit den Aminogruppen der Aminosäurethioester reagierten, war auch die gleiche Anzahl an Thioestergruppen wie CE-Gruppen zu erwarten. Eine geringere Anzahl an Thioestergruppen hätte für einen Abbau derselben während der Verknüpfung zum Polymer gesprochen. Demzufolge hätten die Bedingungen daran angepasst werden können.



Abb. 22: Synthese der Glycinthioesterdextrane 5a und 5b

Die <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie war für die Quantifizierung der Thioestergruppen auf den Dextranen das Mittel der Wahl. In dem exemplarisch abgebildeten Spektrum von **5a** erscheint das Signal der Thioester-CH<sub>2</sub>-Gruppe als Quartett bei 2.93 ppm. Direkt daneben bei 2.66 erscheint das Signal der Amidoethylgruppe des Polymers. Die Werte der Integrale über diese Signale waren gleich groß. Daraus ergab sich, dass beide Gruppen in gleicher

Anzahl vorhanden waren und dass die Kupplung somit quantitativ erfolgt war. Analog konnten bei der Analytik von **5b** die Integrale über den Phenylprotonen ins Verhältnis zu den Methylenprotonen der Amidoethylgruppe des Polymers gesetzt werden. In allen Fällen zeigte sich vollständiger Umsatz aller Carboxygruppen der Dextrane zu den entsprechenden Amiden.



Abb. 23: Synthese und <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Thioesterdextran 5a

Die Stabilität der Thioestergruppen wurde im Wässrigen bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Während im sauren bis neutralen Milieu keine Hydrolyse der aliphatischen Thioester erfolgte, zeigte sich, dass sich die aliphatischen Thioester bei einem pH-Wert von 8 bereits langsam zersetzten. Dennoch waren nach 24 Stunden immer noch Thioestersignale im <sup>1</sup>H-NMR-Spekrtum von **5a** detektierbar. Die Hydrolysegeschwindigkeit nahm aber mit steigendem pH-Wert drastisch zu. Bei pH-Werten oberhalb von 10 waren innerhalb von 30 Minuten alle Thioestergruppen hydrolisiert. Die aromatischen Thioesterdextrane waren wesentlich labiler. Bei einem pH-Wert von 8 waren selbst nach einer Stunde keine aromatischen Signale des Thioesters mehr im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **5b** nachweisbar. Daher musste für den Einsatz in der NCL darauf geachtet werden, dass ein pH-Wert von 7.4 nicht überschritten wird.

#### 3.1.6 Synthese des Fluoreszenzmarkers

Für spätere Anwendungen in Zellen brauchte man ein optisch detektierbares Polymer. Fluorophore wie Fluorescein oder Rhodamin dienen schon seit Langem als Marker für Biomoleküle. In der Konfokalmikroskopie können diese Fluorophore durch Laser verschiedener Wellenlängen angeregt und ihre Emission detektiert werden. In dem hier vorgestellten Projekt sollten die Dextrane zur besseren Detektierbarkeit Fluoresceingruppen tragen. Um dieses Fluorophor parallel mit den Peptiden auf dem Polymer zu immobilisieren, musste das Fluorophor ein Cystein mit freiem N-Terminus tragen. Dazu wurde N-Boc-Cystein mit 5(6)-Aminofluorescein in Lösung gekuppelt. Damit nicht die phenolischen Hydroxylgruppen des Fluorophors mit der freien Säuregruppe des Cysteins reagieren konnten, wurden diese zunächst mit Pivaloylgruppen geschützt.<sup>(73)</sup> Die anschließende Amidkupplung an das N-Boc-Cystein wurde mit Dicyclohexylcarbodiimid in Dichlormethan durchgeführt. Nach der Aufarbeitung wurden zunächst die Tritylschutzgruppe der Cystein-Seitenkette und die N-terminale Boc-Gruppe in 95% iger Trifluoressigsäure abgespalten. Als Scavenger für die Tritylgruppe wurden 2.5 % Triisopropylsilan der Abspaltlösung zugesetzt. Nach 1 Stunde waren alle Schutzgruppen am Cystein entfernt. Die Abspaltlösung wurde eingeengt und das Produkt in Diethylether ausgefällt. Die Pivaloylgruppen wurden in einmolarer Natriummethanolatlösung in Methanol abgetrennt.



Abb. 24: Synthese von Cysteinylfluorescein 8

Das so erhaltene Cysteinylfluoresceinamid konnte nun als Fluoreszenzmarker für die synthetisierten Thioesterdextrane eingesetzt werden.

Diese Synthese beinhaltete viele Reaktionsschritte und jedes Zwischenprodukt musste durch Kieselgelchromatographie aufgereinigt werden. Einen einfacheren Zugang zu Cysteinylfluorophoren bot die Festphasensynthese.<sup>[74]</sup> Dazu wurde im ersten Schritt ein Lysin auf ein Rink-Amid-Harz gekuppelt, dessen N-Terminus geschützt war durch eine 1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)ethyl-Gruppe (Dde) und die Seitenkette durch eine 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Gruppe (Fmoc). Da Dde und Fmoc unter verschiedenen Bedingungen entfernt werden, war der Einsatz dieser orthogonalen Schutzgruppen für die hier besprochene Synthese sehr hilfreich. Die Fmoc-Gruppe wurde durch 20% ige Piperidin-Lösung in DMF abgespalten und mit DMF vom Harz gewaschen. Im nächsten Schritt wurde 5(6)-Carboxyfluorescein auf die nun freie Aminogruppe der Lysin-Seitenkette gekuppelt. Neben der gewünschten Kupplung an die Aminogruppe der Lysin-Seitenkette reagierte die Carboxylgruppe aber auch mit den Hydroxylgruppen anderer Fluoresceinmoleküle. Die daraus resultierenden phenolischen Ester wurden durch mehrfaches Schütteln mit 20% iger Piperidinlösung gespalten und die überschüssigen Fluorophore vom Harz gewaschen. Die Vollständigkeit der Kupplung wurde mittels Kaisertest geprüft und anschließend die Dde-Schutzgruppe des Lysins in einer Lösung aus 2% iger Hydrazin in DMF abgespalten. N-Boc-Cystein wurde auf die verbleibende Aminogruppe des Lysins gekuppelt und nach mehrfachen Waschgängen das Cysteinyllysinylfluorescein in 95% iger TFA-Lösung vom Harz gespalten. Unter diesen Bedingungen wurden auch die verbleibenden Boc- und Trityl-Schutzgruppen vom Peptid gespalten. Nach Einengen der Lösung wurde das Peptid in kaltem Diethylether ausgefällt und mit Diethylether gewaschen. Die Analyse des Produktes mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie, LCMS und hochauflösender Massenspektrometrie ergab, dass das gebildete Produkt rein war.

Diese Methode bot einen wesentlich schnelleren und kostengünstigeren Zugang zu einem Cysteinylfluorophor als die Synthese von 8. Während für die Darstellung von 8 zahlreiche Synthese- und Reinigungsschritte notwendig waren, was mehrere Tage in Anspruch nahm, konnte 9 innerhalb von Stunden sauber dargestellt werden. Des Weiteren lag die Gesamtausbeute von 8 mit 70 % deutlich unter der von 9 mit 96 %.



Abb. 25: Synthese von Cysteinyllysin(fluorescein)amid (9)

# 3.1.7 Synthese fluoreszenzmarkierter Dextrane

Der Mechanismus der nativen chemischen Ligation wurde bereits zuvor beschrieben und in Abbildung 14 dargestellt. Um auf diese Weise die Fluorophore 8 beziehungsweise 9 auf Thioesterdextran 5a zu kuppeln, wurden 5a (0.4 mM) und 8 oder 9 (8 mM) in Phosphatpuffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM) bei pH 7.4 gelöst. Da Thiole unter basischen Bedingungen und bei Anwesenheit von Sauerstoff dimerisieren, wurde die Lösung entgast und unter Stickstoffatmosphäre gesetzt. Außerdem erwies sich die Zugabe von Tris(carboxyethyl)phosphin (TCEP) zur Lösung als sinnvoll. Hierbei handelt es sich um ein wasserlösliches Phosphin, das reduzierend auf gebildete Disulfidbrücken wirkt. Die über Disulfidbrücken verbundenen, inaktiven Cysteinyl-Fluorophor-Dimere wurden so gespalten und konnten wieder am Reaktionsgeschehen teilnehmen. Da aliphatische Thioester weniger reaktiv sind als aromatische Thioester, wurde der Lösung etwas Thiophenol als Katalysator zugesetzt. Dabei stellte sich in einer Umesterung ein Gleichgewicht zwischen den beiden Thioestern ein und führte zu einer effektiveren Ligation zwischen Cysteinylpeptid und Thioesterpolymer. Die gesteigerte Reaktivität der aromatischen gegenüber den aliphatischen Thioestern beruht auf der Tatsache, dass Thiophenol saurer ist als Ethanthiol und somit

auch eine bessere Abgangsgruppe ist. Somit konkurrierte dann die aliphatische Thiolgruppe des Cysteins mit dem Ethanthiol um die Bindung mit dem Carbonylkohlenstoff. Der Nachteil von Thiophenol war die schlechte Wasserlöslichkeit. Wesentlich besser geeignet war 4-Mercaptophenylessigsäure, die ebenso wie Thiophenol katalytisch wirkte, aber zudem noch wasserlöslich war.



Abb. 26: Synthese von 10

Nach einem Tag Rühren bei 37 °C wurde das entstandene Fluorescein-Dextran **10** durch Ausfällen und Waschen in Methanol aufgearbeitet. Mittels Dialyse gegen Wasser beziehungsweise Gelfiltration über Sephadex G-25 wurden restliche Salze und Edukte entfernt. Da Fluorescein UV-aktiv ist, konnte die Beladung des Polymers mit Fluorescein über die UV-Absorbtion ermittelt werden. Die genauen Werte lieferte das Lambert-Beer'sche Gesetz

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot \mathbf{c} \cdot \mathbf{d} \Rightarrow \mathbf{c} = \frac{E_{\lambda}}{\varepsilon_{\lambda} \cdot \mathbf{d}},$$
  
mit  $\varepsilon_{\lambda} = 75000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ und } \mathbf{d} = 0.5 \text{ cm}^{-1}$ 

Gemessen wurde bei einem pH-Wert von 7. Die maximale Beladung lag bei einem Fluorophor pro Dextran. Dieser Wert konnte bei den für die Reaktion notwendigen pH-Werten nicht überschritten werden, da die Wasserlöslichkeit des Fluorophors stark limitiert war und sich mit steigendem pH-Wert der Reaktionslösung verschlechterte. Auch der Zusatz von DMSO zur Reaktionslösung konnte die Kupplungseffizienz nicht verbessern.

Beim direkten Vergleich der Dextrane **5a** und **5b** in Bezug auf ihr Vermögen, Cysteinylpeptide zu binden, zeigten sich keine Unterschiede. Offensichtlich hatte die Zugabe der 4-Mercaptophenylthioessigsäure zu der Reaktionslösung mit **5a** eine so starke katalytische Wirkung, dass im Laufe der Reaktion alle aliphatischen Thioester ausgetauscht wurden und somit eine gleich große Reaktivität, wie bei **5b** erreicht wurde. Da aber der aliphatische Thioester wesentlich stabiler war als der aromatische, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit nur noch **4a** auf dem Polymer immobilisiert.

## 3.1.8 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Die Fluorophore wurden im vorherigen Kapitel über die native chemische Ligation auf dem Thioesterdextran immobilisiert. Obwohl das Fluorescein-Dextran **10** gründlich aufgereinigt wurde, war noch nicht eindeutig bestätigt, das alle Fluorophore kovalent am Dextran gebunden waren.Um das zu prüfen, wurde das Produkt **10** mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (**f**luorescence **c**orrelation **s**pectroscopy, FCS) untersucht. Da diese Methode im Bereich der Chemie wenig Anwendung findet, soll sie an dieser Stelle kurz vorgestellt werden.

Bei der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie handelt es sich um eine sehr sensitive optische Messmethode, mit deren Hilfe sich aus Veränderungen in der Fluoreszenzintensität auf der Basis von Einzelmolekülmessungen Informationen gewinnen lassen. Kernstück dieser Methode ist ein konfokales Laser-Rastermikroskop (Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM). Dabei handelt es sich um ein Lichtmikroskop, bei dem die zu untersuchende Probe in der Brennebene des Objektivs durch einen Laserstrahl Punkt für Punkt abgerastert wird (Punkt-Scanner). Die in einem Punkt durch den Laser erzeugte Fluoreszenzstrahlung wird in ihrer Helligkeit (Intensität) gemessen und als Bildpunkt dargestellt. Durch das verwendete Scan-Prinzip wird somit innerhalb der Probe eine Fläche Punkt für Punkt optisch angeregt, vermessen und zu einem Bild zusammengesetzt (häufig verwendete Bildgröße: 512 × 512 Bildpunkte, Aufnahmezeit < 1 s). Im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie, bei der das erhaltene Fluoreszenzbild keine Auflösung in Z-Richtung hat, werden bei der konfokalen Mikroskopie nur die Informationen aus einem sehr schmalen Volumen (in idealer Näherung der Brennebene des Objektivs) detektiert. Dies gelingt durch den Einsatz einer Lochblende (in der konfokalen Mikroskopie als Pinhole bezeichnet), die vor den Detektoren platziert ist. Der Öffnungsdurchmesser dieser Blende lässt sich verändern, sodass bei nahezu geschlossenem Pinhole nur Signale aus dem Fokus der Laserstrahlung zur Abbildung gebracht werden, während bei weit geöffnetem Pinhole die Tiefenschärfe in Richtung konventioneller Mikroskopie zunimmt. An den konfokalen Mikroskopen stehen unterschiedliche Laserlinien zur Verfügung. Dadurch können verschiedene Fluorophore separat wie parallel angeregt und vermessen werden. Die Fluoreszenzmessung erfolgt bei einem sehr schmalen Pinhole nur im konfokalen Volumen (Abbildung 27). Der Scan-Betrieb

wird bei diesen Messungen nicht benutzt, es wird quasi nur ein Bildpunkt erzeugt (*spot-mode*).



Abb. 27: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenz-Korrelations-Spektrometers

Eine weitere experimentelle Voraussetzung für diese Methode ist die richtige Konzentration des Fluorophors. Es soll garantiert werden, dass sich im konfokalen Volumen (etwa 0.25 fL) nur sehr wenige Moleküle "aufhalten". Deshalb arbeitet man üblicherweise im Konzentrationsbereich zwischen 10<sup>-7</sup>–10<sup>-9</sup> mol/l. Fluoreszenzmoleküle, die sich im konfokalen Volumen befinden, werden durch die Laserstrahlung optisch angeregt und geben daraufhin eine für sie charakteristische Emission ab. Die emittierten Photonen werden von einem empfindlichen Einzelphotonenzähler, einer Lawinen-Fotodiode (APD), detektiert. Aufgrund der Brownschen Molekularbewegung diffundieren die Moleküle innerhalb der

Lösung. Somit werden sie sich nur endliche Zeit im konfokalen Volumen aufhalten. In einem speziellen statistischen Verfahren, der Autokorrelationsanalyse, wird aus den detektierten Signalen die Verweildauer eines Moleküls im konfokalen Volumen ( $\tau_D$ ) ermittelt. Mit Kenntnis spezieller Systemdaten ( $\omega_1$  – Radius des Detektionsvolumens in Strahlrichtung) lassen sich im Anschluss weitere Berechnungen durchführen (z. B. die Ermittlung der Konzentration des Fluorophors oder seine Diffusionskonstante).



**Abb. 28**: Darstellung der Auswertung der Messdaten auf der Basis der Autokorrelation: Die Autokorrelationsfunktion wird aus der Messspur (obige Abbildung) die rote Kurve erhalten. Die 3D-Diffusionsgleichung legt ein FIT in diese Kurve (rote Linie) und lieferte die Diffusionszeit (Zeit im konfokalen Volumen  $\tau_D$ ).

Durch die Anwendung der FCS-Methode und der über die Autokorrelation erhaltenen mittleren Diffusionszeiten ( $\tau_D$ ) konnte ein deutlicher Unterschied zwischen dem Fluorescein-Dextran **10** und den freien Cysteinylfluorophoren **8** und **9** gezeigt werden. Für diese Untersuchungen wurden die Lösungen von **9** und **10** mit einer Stoffkonzentration von  $10^8$  mol/l angesetzt. Die erhaltenen mittleren Diffusionszeiten unterschieden sich deutlich voneinander. Mit Hilfe eines Zweikomponentenfits konnte gezeigt werden, dass in der Polymerlösung etwa 99.9 % der Fluorophore am Dextran gebunden waren. Um

#### Ergebnisse und Diskussion

auszuschließen, dass die Polymere in irgendeiner Form die Diffusionszeiten der freien Fluorophore beeinflussen (z. B. Erhöhung der Viskosität oder Einbettung in die helikale Struktur des Dextrans), wurde zur Abklärung eine Lösung aus Carboxyethyldextran **4** und **9** angesetzt. Dabei wurde berücksichtigt, dass die Lösung in der Zusammensetzung von Polymer zu Fluorophor der von **10** glich. Diese Untersuchungen führten zu einer mittleren Diffusionszeit, wie sie auch für die freien Fluorophore erhalten wurde. Daraus ließ sich schließen, dass im Polymer **10** eine 100%ige Bindung des Fluorophores am Polymer-Rückgrat vorlag.



Zwei-Komponenten-FIT für Fluo-Dextran

τ <sub>D1</sub> =	30 µs	A = 0.1%
τ <sub>D2</sub> =	84 µs	A = 99.9 %

**Abb. 29**: Untersuchung von **10** mittels FCS: Die mittleren Diffusionszeiten  $\tau_D$  von Fluo-Dextran sind deutlich größer als die des freien Fluorophors.

#### 3.1.9 Synthese zellpenetrierender Peptide

Das fluoreszenzmarkierte Polymer **10** wurde in zellulären Tests mit HEK-Zellen für 30 min inkubiert und erwies sich als nicht zellgängig. Um die Zellpermeabilität zu erhöhen, sollten zusätzlich zu den Fluorophoren zellpenetrierende Peptide (CPPs) auf dem Thioesterdextran immobilisiert werden.

In den letzten Jahren wurden die zellpenetrierenden Peptide zu einem wichtigen Werkzeug, um die zelluläre Aufnahmeeffizienz bioaktiver Moleküle zu steigern.<sup>[75]</sup> Aufgrund der zumeist kationischen Natur dieser Peptide können sie sich an die negativ geladene Zelloberfläche anlagern. Die Aufnahme erfolgt dann über Endozytose. Über diesen Mechanismus, der in einem späteren Kapitel detailliert beschrieben wird, können zellpenetrierende Peptide durch ihre Bindung an Moleküle, die um ein Vielfaches größer sind als sie selbst, deren zelluläre Aufnahme vermitteln.<sup>[76, 77]</sup> Bisher sind verschiedene zellpenetrierende Peptide mit Sequenzlängen von 9 bis 30 Aminosäuren bekannt. In diesem Projekt fiel die Wahl auf Nonaarginin. Es handelt sich hierbei um ein kurzes Peptid mit einer sehr guten Aufnahmeeffizienz in Zellen. Cysteinylnonaargininamid 11 wurde durch Standard-Festphasen-Peptidsynthese auf einem Polystyrolharz mit Rink-Amid-Linkern synthetisiert. Dabei diente das N-terminale Cystein wie zuvor der Anknüpfung an das Polymer. Die Anzahl der Linker und damit die maximale Beladbarkeit betrug 0.68 mmol/g. Die synthetisierten Peptide wiesen nach ihrer Abspaltung vom Harz starke Verunreinigungen durch Abbruchsequenzen auf. Da die Sequenz des gewünschten Peptids aufgrund der Guanidinogruppen an den Seitenketten eine sehr hohe Polarität aufwies, war die Aufreinigung mittels HPLC nur sehr eingeschränkt möglich. So erschien das Signal des Peptids sehr eng zusammen mit den Peaks der meisten Abbruchsequenzen unmittelbar nach dem Einspritzpeak. Für das starke Auftreten der Abbruchsequenzen gibt es verschiedene Gründe. Gerade bei Homo-Oligomeren wie Polyargininen kann es während der Synthese zu Aggregationen der Peptidseguenzen kommen. Dadurch kann sich nur sehr schlecht eine Solvathülle um diese Peptide bilden. Die Folge ist eine schlechte Erreichbarkeit der N-Termini durch Abspalt- oder Kupplungslösungen. Letztendlich nehmen nicht alle Peptide an den Reaktionen teil und es kommt zu unvollständigen Kupplungen. Die relativ hohe Beladung von 0.68 mmol/g führt zu einer stärkeren Nähe der Sequenzen und fördert damit die Aggregation. Ein weiterer Grund für das Entstehen von unvollständigen Kupplungen ist die Verwendung von Polystyrolharz. Dieses Harz besitzt gute Quelleigenschaften in DCM, aber nur mäßige in DMF. Bei Verwendung von DMF, was polarer als DCM ist, kommt es durch die schlechteren Quelleigenschaften des Harzes in diesem Lösungsmittel zu schlechter erreichbaren Kavitäten. Auch dadurch können möglicherweise nicht alle N-Termini erreicht werden, was wiederum zum Auftreten von Abbruchsequenzen führt. Aufgrund dieser Überlegungen wurde die Sequenz auf TentaGel-R-Ram-Harz wiederholt.



Abb. 30: Vergleich des Polystyrol-Harzes mit dem TentaGel-R-Ram-Harz

Dieses Harz wies nur eine maximale Beladung von 0.2 mmol/g auf, wodurch die räumliche Nähe der funktionellen Gruppen deutlich kleiner war als im zuvor verwendeten Polystyrol-Harz. Der große Vorteil bei diesem Harz war jedoch, dass die Rink-Amid-Linker nicht direkt an dem Polystyrol immobilisiert waren, sondern über Polyethylenglykolketten mit dem Harz verbunden waren. Dadurch erreichte das Harz auch in polaren Lösungsmitteln hervorragende Quelleigenschaften. Die bessere Solvatisierbarkeit und die höhere Flexibilität der PEG-Ketten führten zusätzlich zu einer besseren Erreichbarkeit der funktionellen Gruppen durch Abspalt- und Kupplungslösungen. Allein die Änderung des Harzes führte bei der Peptidsynthese des Cysteinylnonaargininamids zu deutlich reineren Peptiden, die in der Regel nicht aufgereinigt werden mussten.

# 3.1.10 Synthese zellgängiger Dextrane

Das Cysteinylnonaarginamid **11** wurde im Folgenden mit dem zuvor synthetisierten Thioesterdextran verknüpft. Die Kupplung dieses Peptides auf das Thioesterdextran **5a** wurde parallel mit Fluorophor **9** analog zu der oben beschriebenen Synthese zu **10** durchgeführt. Dabei wurden beide Peptide (5  $\mu$ M) und **5a** (1  $\mu$ M) in 1 ml Phosphatpuffer (pH 7.4) zur Reaktion gebracht. Unter den gewählten Bedingungen wurden durchschnittlich

1.2 Nonaarginingruppen 0.8 Fluoresceingruppen und Polymer gebunden. pro Untersuchungen zeigten, dass die Kupplungseffizienz durch weitere Aufkonzentration der Lösung nicht erhöht werden konnte. Die zuvor schon erwähnte schlechte Wasserlöslichkeit des Fluorophors wirkte dabei limitierend. Aufgrund dieser Tatsache war die Arbeit in einem Volumen von einem Milliliter Puffer ein guter Kompromiss zwischen hoher Peptidkonzentration und Löslichkeit. Auch Lösungen aus Phosphatpuffer mit DMSO führten zu keinen Verbesserungen der Kupplungseffizienz. Für optimale Kupplungsergebnisse der Peptide an das Polymer wurde eine Beladung von 0.8 Fluoresceingruppen pro Polymer in Kauf genommen. Unter sonst identischen Versuchsbedingungen, jedoch mit höheren Konzentrationen an Nonaarginin konnte gezeigt werden, dass mit diesem gut löslichen Peptid auch höhere Beladungsgrade erreicht werden konnten. Verschiedene Kupplungen mit den zugehörigen Polymerbeladungen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

c(Polymer) [µM]	c(CR <sub>9</sub> ) [µM]	Beladung CR <sub>9</sub> /Polymer	
1	5	1.2	
1	7	2.1	
1	10	3	

Tab. 1: Kupplungserfolge bei unterschiedlichen Peptidkonzentrationen

Die Aufreinigung des Fluo-R<sub>9</sub>-Dextrans **12** erfolgte durch Ausfällen, Waschen und Gelfiltration. Die Quantifizierung der gebundenen Nonaarginingruppen pro Polymer wurde im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum vorgenommen. Wie in Abbildung 32 erkennbar, war die Beladung der Dextrane mit Fluoresceingruppen im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum nur schwer detektierbar. Daher wurden die UV-Absorbtionen von **12** ermittelt und über das Lambert-Beer´sche Gesetz die Beladungsgrade ermittelt; gemessen wurde im Bereich zwischen 350 und 600 nm. Das Absorptionsmaximum von **12** lag bei 498.5 nm. Das Spektrum sowie die Rechnung der Fluoresceinbeladung sind in Abbildung 31 dargestellt.





Wie bereits erwähnt, lag die Beladung mit Fluorescein bei durchschnittlich 0.8 Gruppen pro Polymer.



**Abb. 32**: Quantifizierung der Beladung von **12** mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum

Die Methylenprotonen der Arginineinheiten gaben ein Multiplett zwischen 1.4 und 1.9 ppm. Setzt man das Integral dieses Signals zu dem Integral über den C(1)H-Protonen ins Verhältnis, so kann man den Grad der Beladung mit Nonaarginin ermitteln. Das in Abbildung 32 dargestellte Spektrum zeigt ein Polymer, das etwa 2 Nonaarginin-Einheiten enthält.

Um die Beladung mit Nonaarginin zu bestätigen, wurde eine Aminosäureanalyse (ASA) von der Firma Genaxxon durchgeführt. Bei dieser Methode kann sowohl die Aminosäure-Zusammensetzung eines Proteins oder Peptids als auch die Peptidmenge einer Probe bestimmt werden. Um die Peptidbeladung der in dieser Arbeit synthetisierten Peptidpolymere zu bestimmen, wurde zunächst eine frisch getrocknete Probe des jeweiligen Polymers eingewogen. Zu diesem Aliquot wurde eine bestimmte Stoffmenge eines internen Standards gegeben. Dabei handelte es sich um Norleucin, da es in der Regel in Peptidsequenzen nicht vorkommt. Die Probe wurde in 6 molarer Salzsäure unter Vakuum bei 150 °C hydrolysiert. Neben der Aufspaltung des Dextrangrundgerüsts führte die Hydrolyse zur Auftrennung der Peptidsequenz in die einzelnen Aminosäuren. Bei diesem Prozess können aber auch Veränderungen an manchen Aminosäuren auftreten. So wurde während der Aufspaltung Cystein beinahe vollständig abgebaut. Die Zersetzung von Cystein zu Taurin während der

#### Ergebnisse und Diskussion

sauren Hydrolyse wird immer wieder beobachtet. Bislang ist der Mechanismus dieser Reaktion nicht vollständig geklärt. Anhand der Spaltprodukte wird vermutet, dass Cystein über Cystin zur Cysteinsäure oxidiert wird. Anschließend findet eine Decarboxylierung statt, die zum Taurin führt.



Somit war später das Cystein nicht oder nur sehr schwach detektierbar. Um die freien Aminosäuren in der HPLC besser detektieren zu können, wurden diese unter basischen Bedingungen mit Phenylisothiocyanat zu den entsprechenden Phenylthiocarbamyl-Aminosäuren umgesetzt. Die Auftrennung der einzelnen Aminosäurederivate erfolgte auf einer HPLC-Anlage. Um die Stoffmenge der einzelnen Aminosäuren zu bestimmen, wurde vor dem eigentlichen Auftrennungslauf noch eine Eichlösung, die aus den 17 gängigsten Aminosäuren bestand, mit Phenylisothiocyanat derivatisiert und ebenfalls mittels HPLC aufgetrennt. Auf Grundlage dieser Kalibrierung konnten die Chromatographiepeaks integriert und somit die Stoffmenge jeder einzelnen Aminosäure in der Probe berechnet werden. Um die Peptidbeladungen der Polymere zu ermitteln, wurden die Stoffmengen des Peptids mit der eingewogenen Polymerprobe ins Verhältnis gesetzt. Die Werte für die Beladungen der Polymere mit Peptiden stimmten mit den Werten aus dem <sup>1</sup>H-NMR Spektrum überein. Als Beispiel sind in Abbildung 33 die Ergebnisse einer Aminosäureanalyse von **12** dargestellt.



HPLC und Integration der Peaks

Stoffmenge der einzelnen Aminosäuren



**Abb. 33**: ASA-Rohdaten von **12**: Aus den Analyse-Ergebnissen kann die Beladung des Polymers mit Peptid berechnet werden. Im gezeigten Fall waren durchschnittlich 104 nmol (0.158 mg) Peptid pro mg Dextran gebunden. Das bedeutet, dass etwa ein Dextran mit einem  $R_9$  Peptid belegt war.

# 3.1.11 Aufnahmeuntersuchungen von Fluo-R<sub>9</sub>-Dextran in lebende Zellen

Um ein analog modifiziertes Polymer zu 12 in späteren Versuchen als multivalenten Carrier zu verwenden, musste zunächst die Zellgängigkeit und Zytotoxizität von Fluo-R<sub>9</sub>-Dextran **12** geprüft werden. Ferner war die Frage zu beantworten, wie viel CPP pro Polymer gebunden sein muss, um die zelluläre Aufnahme zu gewährleisten, da Nonaarginin in hohen Konzentrationen zytotoxisch wirken kann. Dafür wurden Fluo-R<sub>9</sub>-Dextrane mit unterschiedlich starken Beladungen an Nonaarginin synthetisiert. Diese Polymere wurden verschiedenen Zelllinien, in verschiedenen Konzentrationen untersucht. auf Für Untersuchungen mit der schon zuvor erwähnten konfokalen Laser-Rastermikroskopie wurden die Polymere mit HEK-293- und HeLa-S-Zellen inkubiert und auf ihre biologische Verträglichkeit getestet. HEK-293 sind menschliche embryonale Nierenzellen. Bei HeLa-S-Zellen handelt es sich um Epithelzellen aus dem Gebärmutterhalskrebs der 1951 verstorbenen Henrietta Lacks. Beide Zelllinien wachsen adhärent auf mit Poly-L-Lysinbeschichteten Glasflächen, wie den hier verwendeten Objektträgern. Somit befanden sich alle Zellen mehr oder weniger in einer Ebene. Daher eigneten sich diese Zelllinien besonders gut für die Untersuchung der Polymere unter dem Laserrastermikroskop. Das auf den Dextranen aufgebrachte Fluorescein konnte mit einem Helium-Neon-Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden. Die Emission des Fluorophors gab Aufschluss über den Aufenthaltsort des Polymers. Es zeigte sich, dass schon eine durchschnittliche Beladung von einem CPP pro Dextran (mit einem Molekulargewicht von sowohl 10 kDa als auch 40 kDa) die Aufnahme vermittelte. Abhängig von der Reifephase der Zellen fand eine gut sichtbare Aufnahme innerhalb von 1-20 Minuten statt. Zu beobachten war anfangs eine Aufkonzentrierung des Polymers an der Zellmembran. Anschließend konnten Vesikel in den Zellen beobachtet werden, die sich später öffneten, wodurch das Polymer ins Zytosol freigesetzt wurde. Um vergleichbare Daten zu erhalten, wurde immer mit Zellen gearbeitet, die einen Tag zuvor ausgesät wurden. Die Aufnahmegeschwindigkeit und -effizienz konnte mit höheren Beladungen an Nonaarginin zwar gesteigert werden, allerdings zeigten Polymere mit zu hohen CPP-Beladungen zytotoxische Effekte. So erwies sich Dextran mit 6 aufgebrachten R<sub>9</sub> Gruppen in einer Konzentration von 50 µM als zytotoxisch. Schon während der Aufnahme veränderte sich die Morphologie der Zellen zu einer runden Gestalt. Daher wurde in weiteren Versuchen eine maximale Beladung von 2 Nonaarginin-Einheiten pro Polymer nicht überschritten.



**Abb. 34**: 30-minütige Zeitserie (von links nach rechts, pro Minute ein Bild): HeLa-S-Zellen mit 5  $\mu$ M Polymer mit 2 R<sub>9</sub>- und 1 Fluoresceingruppe pro Dextran. Deutlich sichtbar ist die Aufkonzentration des Polymers an den Membranen. Nach 12 Minuten sind erste Vesikel in den Zellen erkennbar. Außerdem binden die Polymere auch an Membranreste bereits toter Zellen (stark fluoreszierende Kompartimente außerhalb der lebenden Zellen).

Um auszuschließen, dass die Polymeranreicherung in den Zellen auf zytotoxische Effekte zurückzuführen war, wurden die behandelten Zellen nach beendeter Inkubation mit Zellmedium oder HEPES-Puffer (pH 7.2) gewaschen und Trypan-Blau in HEPES-Puffer zu den Zellen gegeben. Trypan-Blau ist ein fluoreszierender Diazofarbstoff, der an Proteine bindet. Aufgrund dieser Eigenschaft eignet er sich zur Anfärbung von Zellmembranen.



Bei intakten Zellen ist die Membran geschlossen. Bei sterbenden Zellen bilden sich Poren in der Membran und der Farbstoff kann auch Proteine innerhalb der Zelle anfärben. Das Absorptionsmaximum dieses Farbstoffes liegt bei etwa 595 nm in Wasser. Da seine Absorptionswellenlänge nicht mit der Absorptions- oder Emissionswellenlänge des Fluoresceins zusammenfällt, war Trypan-Blau als zusätzlicher Fluoreszenzmarker bestens geeignet. Die gewonnenen Ergebnisse zeigten, dass das Fluorescein-Dextran nicht zellgängig war. Fluo- R<sub>9</sub>-Dextran **12** mit 1-3 Nonaarginin-Einheiten zeichnete sich dagegen durch eine gute Zellpermeabilität und bei Peptidkonzentrationen von bis 50 µM durch eine gute Zellverträglichkeit aus.

### Ergebnisse und Diskussion





- Zellen läuft
- C) mit Höchst 33258 angefärbte Zellkerne
- D) Überlagerung aller Filter

# 3.1.12 Synthese der Apoptose-induzierenden BH3-Peptide

Wie in der Einleitung bereits ausführlich diskutiert, kann der programmierte Zelltod durch proapoptotische Proteine induziert werden, die bei ihrer Oligomerisierung auf der mitochondrialen Membran Poren in dieser Lipiddoppelschicht bilden. Durch diese Kanäle können proapoptotische Faktoren wie Cytochrom c ins Zytosol gelangen und über die Bildung des Apoptosoms zur Aktivierung der Caspase-Kaskade beitragen. Ebenfalls wurde in der Einleitung beschrieben, dass BH3-only-Proteine wie Bid, Bim oder Puma zur Aktivierung und Oligomerisierung von Bax- und Bad-Proteinen führen können. Diese Eigenschaft der BH3-only-Proteine sollte ausgenutzt werden, um den intrinsischen Weg der Apoptose zu aktivieren. In den folgenden Arbeiten sollten zellgängigen Polymere mit Apoptose-induzierende Sequenzen verknüpft werden und diese effizient in Zellen transportieren. Das Konzept ist in Abbildung 36 zusammengefasst.



**Abb. 36**: Übersicht über die endosomale Aufnahme eines BH3-Polymers in eine Zelle und die Aktivierung von proapoptotischen Bak (unten). Wie im vergrößerten Bild dargestellt, sollte die Bindung von polymergebundenen BH3 eine Konformationsänderung im antiapoptotischen Bcl-xl-Protein induzieren. Daraufhin wird deaktiviertes Bak freigesetzt und oligomerisiert in der mitochondrialen Membran. Die Folge ist der Austritt von Cytochrom c in das Zytosol, was zur Einleitung der Apoptose führt.

Da bei der Aktivierung von proapoptotischen Proteinen durch Bid die Interaktion der BH3-Domänen eine Schlüsselrolle einnimmt, wurde die Sequenz der Bid-BH3-Domäne an der Festphase synthetisiert. Um dieses Peptid über die native chemische Ligation auf dem Polymer zu immobilisieren, wurde N-terminal ein Cystein gekuppelt.

10	20	30	4 <b>0</b>	5 <b>0</b>	6 <b>0</b>
MDCEVNNGSS	LRDECITNLL	VFGFLQSCSD	NSFRRELDAL	GHELPVLAPQ	WEGYDELQTD
7 <b>0</b>	80	9 <b>0</b>	100	110	120
GNRSSHSRLG	RIEADSESQE	DIIRNIARHL	AQVGDSMDRS	IPPGLVNGLA	LQLRNTSRSE
130	140	15 <b>0</b>	16 <b>0</b>	17 <b>0</b>	180
EDRNRDLATA	LEQLLQAYPR	DMEKEKTMLV	LALLLAKKVA	SHTPSLLRDV	FHTTVNFINQ
19 <b>0</b>					
NLRTYVRSLA	RNGMD				

**Abb. 37**: Sequenz von Bid<sup>[78]</sup> mit der BH3-Domäne (Aminosäuren 86-100) und der synthetisierten Sequenz (rot)

Wie Cysteinylnonaargininamid wurde auch das Cysteinyl-BH3-Peptid **13a** an der festen Phase hergestellt. Für die Negativkontrolle wurde das Cysteinyl-BH3-Peptid in drei Aminosäuren punktuell mutiert. Die Sequenz des mutierten Peptids (mBH3) **13b** ist mit den rot markierten Punktmutationen in Tabelle 2 aufgeführt. Für spätere Vergleiche der polymergebundenen und freien BH3-Peptide bezüglich ihrer biologischen Effizienz wurden analog zu den Peptiden **13a**, **b** auch BH3-Peptide **14a**, **b** synthetisiert, die N-terminal anstatt des Cysteins eine Fluoresceingruppe trugen.

#	Name	Sequenz
13a	C-BH3	CEDIIRNIARHLAQVGDSMDRSI-NH <sub>2</sub>
13b	C-mBH3	CEDIIRNIARHAAQVGASADRSI-NH <sub>2</sub>
14a	Fluo-BH3	$\label{eq:Fluo-EDIRNIARHLAQVGDSMDRSI-NH_2} Fluo-EDIRNIARHLAQVGDSMDRSI-NH_2$
14b	Fluo-mBH3	Fluo-EDIIRNIARHAAQVGASADRSI-NH2
Tab. 2: Synthetisierte BH3-Peptide		

Im Gegensatz zur Darstellung von **11** war diese Synthese wesentlich aufwendiger. Die BH3-Peptide lagen nach beendeter Synthese so stark verunreinigt vor, dass die reinen Peptide nicht oder nur in Spuren erhalten werden konnten. Die Gründe hierfür waren einerseits die Bildung von Aspartimiden während der Synthese und andererseits die Bildung von Abbruchsequenzen. Aspartimide können sich bei der Anwesenheit von Asparaginsäure in einer Peptidsequenz während der Synthese bilden.<sup>[79]</sup> Dabei kann die Seitenkette des Asparagins unter basischen Bedingungen mit dem nucleophilen Amid-Stickstoff reagieren.
Die daraus resultierenden 5-Ring-Amide können durch Nucleophile wieder gespalten werden. Da bei dieser Öffnung der Angriff an jeweils einem der beiden Carbonylkohlenstoffatome im Ring erfolgt, kann neben der Racemisierung auch eine Isomerisierung erfolgen (Abbildung 38). Um diesen ungewollten Effekt zu unterbinden, wurde mit gepufferter Base gearbeitet, die einerseits stark genug war, um die Fmoc-Gruppen vom N-Terminus des Peptids abzuspalten, aber andererseits den Amidstickstoff der Asparaginsäure nicht aktivieren konnte. Das wurde durch den Zusatz von Essigsäure (0.1 M) zu der eingesetzten Piperidinlösung erreicht.



Abb. 38: Bildung und Spaltung von Aspartimiden

Obwohl ein niedrig beladenes Harz (0.2 mmol/g) für die Synthese eingesetzt worden war und es sich bei dem BH3-Peptid nicht um ein Homooligomer handelte, bildeten sich aufgrund der Sequenzlängen der BH3-Peptide Abbruchsequenzen. Die so gebildeten Verbindungen waren ähnlich polar, wie das jeweilige gewünschte Peptid. Dadurch war die Abtrennung der Verunreinigungen vom Peptid mittels HPLC nur schwer oder gar nicht möglich. Um der Bildung von Abbruchsequenzen entgegenzuwirken, wurden in den Synthesen der BH3-Peptide Pseudoproline eingesetzt. Bei diesem von Manfred Mutter entwickelten System handelt es sich um Dipeptide, in denen eine beliebige Aminosäure N-terminal an derivatisiertes Threonin oder Serin gekuppelt ist.<sup>[80]</sup> Dabei bilden die Seitenketten des Serins beziehungsweise Threonins zusammen mit dem Amidstickstoff Oxazolidinringe.



Aufgrund der damit einhergehenden Strukturänderung können die Pseudoproline als Sekundärstrukturbrecher in langen Peptidsequenzen dienen. Somit werden während der Synthese Zusammenlagerungseffekte unterbunden und Abbruchsequenzen vermieden.



Abb. 39: Pseudoproline innerhalb einer Peptidsequenz

Während der Abspaltung vom Harz werden die 5-Ringe hydrolysiert und das Peptid erhält seine ursprüngliche Sekundärstruktur zurück.



In den Sequenzen der synthetisierten BH3-Peptide konnten die Aminosäuren Asp17-Ser18 durch Asp-Ser( $\Psi^{Me,Me}$ pro) beziehungsweise Ala17-Ser18 durch Ala-Ser( $\Psi^{Me,Me}$ pro) ersetzt werden. Durch die genannten Eingriffe ließen sich die Verunreinigungen der BH3-Peptide deutlich reduzieren und die entstandenen Nebenprodukte durch HPLC abgetrennt werden.

# 3.1.13 BH3-beladene Dextrane und deren Aufnahme in lebende Zellen

Die zuvor synthetisierten BH3-Peptide 13a, b sollten im weiteren Verlauf dieser Arbeit mit den synthetisierten Thioesterdextranen verknüpft werden. Um zu testen, ob die Anbindung des BH3-Peptids an Dextran zu einer Verstärkung der Apoptoseinduktion führt, wurde zunächst ein Fluo-BH3-Dextran ohne CPP synthetisiert. Obwohl zuvor gezeigt wurde, dass CPPs die zelluläre Aufnahme der Dextrane über Endozytose vermitteln, wurde zunächst auf Zusatz solcher Peptide verzichtet. Der Grund hierfür den war. dass nur Aktivitätsunterschiede der polymergebundenen Peptide zu den freien BH3-Peptiden untersucht und jegliche Einflüsse des Nonaarginins ausgeschlossen werden sollten. Analog zur Synthese von 12 wurden Thioesterdextran 5 (0.3 µM) in 1 ml Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 7.4 mit Fluorophor 9 (1.6 µM) und einem der beiden BH3-Peptide 13a, b in Konzentrationen von 8 µM zur Reaktion gebracht. Wie schon zuvor wurden 4-Mercaptoessigsäure und TCEP zugesetzt, um die Dimerisierung der Cysteinylpeptide zu unterbinden und die Reaktivität des Thioesters zu erhöhen. Die Produkte wurden durch Ausfällen der Lösungen und mehrfaches Waschen der festen Rückstände in Methanol und DMF grob aufgereinigt. Da mit relativ kleinen Mengen an Peptidpolymeren gearbeitet wurde, war der Einsatz der Dialyse zur Produktaufreinigung unpraktikabel. Um möglichst wenig Produkt während der Reinigungsprozedur zu verlieren, wurden daher die grob gereinigten Peptidpolymere in Wasser gelöst und über Sephadex-G-25-Säulen gereinigt. Die Beladungsgrade der BH3-Dextrane mit Peptid wurden in Aminosäureanalysen bestimmt. Die Anzahl der Fluorophore pro Dextran wurde mittels UV-Spektrometrie ermittelt. Dabei zeigte sich, dass die Dextrane 15a und 15b mit etwa einem Fluorophor und mit 5 BH3beziehungsweise mit 5 mBH3-Peptiden synthetisiert wurden.

#	Name	Peptidbeladung am Polymer
15a	Fluo-5BH3-Dextran	5 C-BH3 und einer Fluo-Gruppe
15b	Fluo-5mBH3-Dextran	5 C-mBH3 und einer Fluo-Gruppe
Tab. 3 Synthetisierte BH3-Dextrane		

Da die BH3-Konjugate beziehungsweise die BH3-Peptide nicht zellpermeabel waren, wurden die Polymere mittels Nucleofection in Zellen gebracht. Diese besonders milde Form der Elektroporation wird normalerweise zur Transfektion von Nukleinsäuren wie RNA oder DNA in Zellen verwendet. Bei dieser Methode führt die schnelle Entladung eines Kondensators zu einem elektrischen Feld. Setzt man lebende Zellen diesem Feld aus, führen verschiedene Effekte, wie beispielsweise der Konformationsumkehr von Membranbestandteilen, zu einer temporären Permeabilisierung der Zellmembran. Durch diese Poren können nun Substanzen

aus der umliegenden Lösung in die Zellen gelangen. Da der Spannungspuls üblicherweise nur einen Bruchteil einer Sekunde dauert, sind die Zellen in der Lage, die entstandenen Poren wieder zu schließen und so zu überleben.

Die Verbindungen **14a, b** und **15a, b** wurden bei Peptidkonzentrationen von jeweils 5 µM zusammen mit Jurkat-E6.1-Zellen elektroporiert. Bei diesen Zellen handelt es sich um Leukämie-T-Zellen, die nicht adhärent wachsen, sondern frei im Medium schwimmen. Diese Zellen mussten daher nicht erst mit Trypsin von einer Oberfläche getrennt werden, sondern konnten direkt in einer Küvette zusammen mit dem Peptidpolymeren elektroporiert werden. Nach 30 Minuten auf Eis wurde die Vitalität der Zellen sowohl unter dem Konfokalmikroskop als auch mittels Durchflusszytometrie geprüft. Es konnte bestätigt werden, dass die Mehrzahl der Zellen diese Behandlung gut vertragen hatte und die Membranen nach 30 Minuten wieder völlig intakt waren. Die Zellen wurden gewaschen und ihnen wurde frisches Medium zugesetzt.



Abb. 40: Jurkat-E6.1-Zellen, 30 min. nach Elektroporation mit Fluo-BH3-Dextran 15a

Nach 14 Stunden Inkubation in Zellmedium bei 37°C wurden die behandelten Zellen in einem Apoptose-Assay mit Annexin-V untersucht.<sup>[81]</sup> Dabei wurde ausgenutzt, dass es im frühen Stadium der Apoptose zu Veränderungen der Zellmembran kommt. Das normalerweise auf der zytoplasmatischen Innenseite liegende Phosphatidylserin (PS) transloziert dabei auf die Außenseite der Plasmamembran. Annexin-V. ein kalziumabhängiges, Phospholipid-bindendes Protein, besitzt große Affinität zu PS (K<sub>D</sub> 7 nM). Daher kann dieses Protein als Sonde für die Expression von PS an der Außenseite der Membran fungieren. Dieses Protein ist mit Farbstoffen unterschiedlicher Wellenlängen

kommerziell erhältlich. Da auf dem Polymer schon Fluorescein gekuppelt war, wurde Annexin-V-Alexa Fluo 647 eingesetzt. Das Absorptionsmaximum dieses Farbstoffes liegt bei einer Wellenlänge von 650 nm und sein Emmisionsmaximum bei 665 nm.



Nach Abzentrifugation und Resuspension der Zellen in Annexin-Bindungspuffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl2, pH 7.4), wurde Annein-V-Alexa Fluo 647 der Zellsuspension zugesetzt. Überraschenderweise zeigten lediglich die Zellen, die mit **15a** elektroporiert worden waren, Apoptose-Aktivität. Der Alexa-Farbstoff war rund um die Zellen detektierbar. Außerdem konnte man vereinzelt bereits das sogenannte "Membrane Blebbing" beobachten. Dabei handelt es sich um den Abbau der Zelle durch Abschnüren kleinerer Kompartimente. Obwohl **14a** in der gleichen Peptidkonzentration wie **15a** eingesetzt worden war, konnte der Farbstoff bei diesen Zellen nicht an den Membranen binden. Auch die Zellen, die mit **14b** und **15b** elektroporiert worden waren, zeigten keine Apoptose-Aktivität.



**Abb. 41**: Jurkat-E6.1-Zellen, 14 h nach Elektroporation mit Fluo-BH3-Dextran **15a** und Annexin-V-Alexa Fluo 647: Deutlich erkennbar sind die grün fluoreszierenden Polymere innerhalb der Zellen und die Rosafärbung der äußeren Membranen (links mit und rechts ohne Durchlicht).

Wichtig bei diesen Versuchen war, dass man die Zellen im frühen Stadium der Apoptose untersuchte, da im späteren Verlauf die Plasmamembranen porös werden und das Annexin-V dann in die Zelle eindringen könnte. Um auszuschließen, dass das Annexin innerhalb der Zellen an die dort befindlichen PS-Gruppen gebunden hatte, wurde Trypan-Blau zu den Zellen gegeben. Wie bereits zuvor erwähnt, färbt dieser Marker alle Proteine unspezifisch an, sodass Zellen, bei denen die Membranintegrität gestört ist, vollständig angefärbt werden. Wie in Abbildung 42 erkennbar, konnte kein Trypan-Blau innerhalb der Zellen detektiert werden, was bedeutete, dass die Plasmamembranen intakt waren.



**Abb. 42**: Jurkat-E6.1-Zellen, 14 h nach Elektroporation mit Fluo-BH3-Dextran **15a**: A) Zellen mit **15a**; B) Annexin-V-Alexa Fluo 647; C) die anschließende Zugabe von Trypan-Blau führt lediglich zur Anfärbung der Membranen; D) Overlay

## 3.1.14 Quantifizierung der Apoptose-Induktion

Die Ergebnisse des letzten Kapitels zeigten deutlich, dass mithilfe des synthetisierten BH3-Dextrans 15a effizient Apoptose induziert werden konnte. Dennoch konnte auf diese Weise die Apoptoseinduktion noch nicht quantifiziert werden. Aus diesem Grund wurde die Anzahl der apoptotischen Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Diese Methode wird üblicherweise zum Analysieren und Sortieren von Partikeln oder Zellen verwendet. Prinzipiell beruht dieses Verfahren auf der Lichtemission von Zellen, wenn diese einen Laserstrahl passieren. Dafür wird die Zelllösung angesaugt und die Zellen einzeln durch einen Laserstrahl geleitet. Dabei sendet jede Zelle abhängig von ihrer Größe, Färbung und Gestalt Streulicht aus, das von geeigneten Detektoren ausgewertet wird. Die Lichtstreuung erfolgt allerdings nicht gleichmäßig nach allen Seiten, sondern besonders stark im Winkel von 10° zum einfallenden Lichtstrahl. Die Signalintensität dieses Vorwärtsstreulichts (FSC) hängt von der Größe der durchwandernden Zelle ab, wobei die Intensität mit der Größe zunimmt. Im Winkel von 90° streut ein kleiner Teil des emittierten Lichts. Dieses Seitwärtsstreulicht ist ein Maß der Granularität (Körnigkeit) der Zellen. Über die Fluoreszenzdetektoren (FL1-4) können außerdem verschiedene Wellenlängen detektiert werden. Somit erhält man Informationen über die Beschaffenheit, die Gestalt oder über die Fluoreszenz der Zellen.



**Abb. 43**: Prinzip eines Durchflusszytometers: Aus dem emittierten Licht der Zellen werden Informationen über die Größe (FSC-H), die Beschaffenheit (SSC-H) und die enthaltenen Farbstoffe (FL-1-4) der Zellen erhalten.

In den hier durchgeführten Versuchen ging es im Wesentlichen darum, bei wie vielen Zellen, welcher Farbstoff detektiert werden konnte. Dazu wurden 14 Stunden nach der Elektroporation mit den BH3-Konjugaten die Jurkat-E6.1-Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit Annexin-Bindungspuffer versetzt. Nach der Zugabe von 5 µl Annexin-V-Alexa Fluo 647 wurden die Zellen für 15 Minuten auf Eis gelagert. Diese Zelllösung wurde nun im Durchflusszytometer gemessen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 44 und 45 zusammengefasst. Die in Abbildung 44 dargestellten Rohdaten des Fluo- R<sub>9</sub>-Dextrans sollen an dieser Stelle exemplarisch diskutiert werden. Jeder Punkt in den Abbildungen 44 A-D bedeutet eine Zelle. Aus der Abbildung 44 A kann man Aussagen über die Vitalität der Zellen machen. Die auf der y-Achse aufgetragenen Intensitäten des Seitwärtsstreulichts sind ein Maß der Granularität (Körnigkeit) der Zellen. Die Intensitäten des Vorwärtsstreulichts sind auf der x-Achse aufgetragen und als Maß der Zellgröße zu verstehen. Da tote Zellen eine höhere Granularität besitzen als lebende Zellen und die Größe von Zelltrümmern deutlich kleiner ist als die der vitalen Zellen, würde man in der linken oberen Ecke von Abbildung 44 A Signale der toten Zellen erwarten. Tatsächlich befand sich aber die Mehrzahl der Zellen im linken unteren Viertel, was zeigt, dass die behandelten Zellen nach 20 Stunden größtenteils noch vital waren.

61

In Abbildung 44 B sind auf der x-Achse die Intensitäten der Fluorescein-positiven Zellen (FL4-H, 661 nm) und auf der y-Achse die Intensitäten der Annexin-V-positiven Zellen aufgetragen (FL1-H, 530 nm). Wie zu sehen ist, waren fast alle Zellen mit grün fluoreszierendem Fluo-5BH3-Dextran beladen. Wesentlich wichtiger war jedoch, dass man zwei unterschiedliche Populationen Annexin-V-positiver Zellen erhielt. Da die Fluoreszenz des am Annexin-V gekuppelten Alexa-647-Farbstoffs nur bei der Bindung des Proteins an Phosphatidylserin detektierbar war, konnte man die Zellen der unteren, nur schwach fluoreszierenden Population als vital und die Zellen der oberen, stark fluoreszierenden Population als apoptotisch einstufen. In den Abbildungen 44 C und 44 D sind die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Zellen gezeigt. Dabei sind in Abbildung 44 C die Zählraten für bei 530 nm (für Fluorescein) und in Abbildung 44 D die Zählraten bei 661 nm (für Alexa 647) dargestellt.



Abb. 44: FACS-Rohdaten elektroporierter Jurkat-E6.1-Zellen:

A) Vorwärts- (FSC-H) und Seitwärtsstreulicht (SSC-H) der gemessenen Zellen (488 nm)
B) Fluoreszenzlicht der Zellen (FL1-H: Fluorescein), (FL4-H: AnnexinV): obere Populationen stark Annexin-V- und Fluorescein-positiv, untere Population nur sehr schwach Annexin-V- und Fluorescein-positiv

C)+D) Fluoreszenzintensitäten gegen die Anzahl der Zellen

Anhand der Anzahl der Annexin-V-positiven Zellen in Abbildung 44 D konnte die Effizienz zur Apoptoseinduktion gemessen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 45 zusammengefasst. Deutlich erkennbar ist eine drastische Zunahme bei der Apoptose-Aktivität von **15a** im Vergleich zu dem freien BH3K(Fluo)-Peptid **16** bei gleicher Peptidkonzentration.



**Abb. 45**: Vergleich der gemessenen Apoptoseinduktion von **15a** im Annexin-V-Assay, 14 h nach Elektroporation

## 3.1.15 Caspase-3-Messungen in apoptotischen Zellen

Die Ergebnisse des Annexin-V-Aktivitätsassay sollten in einem Caspase-3-Aktivitätsassay bestätigt werden. Wie schon in der Einleitung beschrieben, werden während der Apoptose verschiedene Caspasen in einer Kaskade aktiviert. Da dieser Prozess nur in der Apoptose abläuft, ist die Anwesenheit von Caspase-3 ein sicherer Beweis dafür, dass es sich um apoptotische Zellen handelt. Für diesen Nachweis wurden elektroporierte Jurkat-E6.1-Zellen nach 6 Stunden mit Lysierpuffer (20 mm Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mm EDTA, 1 % Triton X-100, Protease-Inhibitionscocktail (Roche)) versetzt. Dieser Puffer war für den Aufschluss der Zellen notwendig, um die zellulären Proteine zu erhalten. Die zerstörten Zellorganellen wurden von der eigentlich wichtigen Proteinlösung durch Zentrifugation abgetrennt. Die Gesamtproteinmenge im Lysat wurde anhand des Bradford-Assays ermittelt. Dieser Assay beruht auf der Fähigkeit des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau, mit basischen Aminosäuren farbige Komplexe bilden zu können.



Während dieser fluoreszente Farbstoff ungebunden ein Absorptionsmaximum bei 470 nm hat, liegt in gebundener Form das Maximum des Absorptionsspektrums bei 595 nm. Da der Extinktionskoeffizient des Komplexes deutlich höher ist als der des freien Farbstoffes, kann die Absorptionszunahme detektiert und so die Proteinkonzentration bestimmt werden. Da das Maß der Farbreaktion von Protein zu Protein unterschiedlich ist, wurde zunächst eine Eichgerade mithilfe einer standardisierten Proteinlösung aus Rinderserumalbumin (**b**ovine **s**erum **a**lbumine, BSA) mit bekannten Konzentrationen aufgenommen.



Abb. 46: Eichkurve der standardisierten Proteinlösung

Anhand dieser Gerade konnte dann die Proteinkonzentration im Zelllysat bestimmt werden. Um die Caspaseaktivität im jeweiligen Lysat bestimmen zu können, wurden ein Aliquot, das 30 µg Protein enthielt, abgenommen und mit Substrat in Caspase-Aktivitätspuffer (20 mm HEPES, 10 mM Dithiothreiol, 10 % Glycerin, 100 mM NaCl, pH 7.5) versetzt. Bei dem Substrat handelte es sich um ein Tetrapeptid an dessen C-Terminus ein 7-Amino-4methylcoumarin (AMC) immobilisiert war. Diese Peptidsequenz (Ac-DEVD-AMC) wurde spezifisch von Caspase-3 geschnitten, was zur Freisetzung des Farbstoffs führte. Das fluoreszenzaktive AMC konnte bei 380 nm angeregt werden und emittierte bei 460 nm. Die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Proben wurden unmittelbar nach Substratzugabe ( $t_0$ ) und nach drei Stunden Inkubation ( $t_3$ ) bei 37- °C in einem Fluorescence Microplate Reader gemessen. Die Differenzen der Fluoreszenzintensitäten ( $t_3$ - $t_0$ ) gaben Auskunft über die jeweiligen Caspase-3-Aktivitäten. Wie man deutlich in Abbildung 47 erkennen kann, war die gemessene Caspase-3-Aktivität der pentavalenten Peptidpolymere deutlich höher als bei den freien Peptiden, die keine oder nur geringe Aktivität aufwiesen.



Abb. 47: Schema des Caspase-3-Assays (oben) und zusammengefasste Ergebnisse (unten)

# 3.1.16 Synthese fluoreszenzmarkierter BH3-Peptide

Im vorangehenden Kapitel konnte gezeigt werden, dass polymergebundene BH3-Peptide wesentlich stärker Apoptose induzierten als BH3-Peptide in ihrer freien Form. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte nun die endosomale Aufnahme der Apoptose-induzierenden Peptidpolymere gewährleistet werden. Dazu war es notwendig, zusätzlich zellpenetrierende Peptide auf den Polymeren zu immobilisieren. Um den Effekt der Aktivitätszunahme der polymergebundenen Peptide erklären zu können, sollten die BH3-Dextrane in Hinblick auf ihre Stabilität und den Multivalenzeffekt untersucht werden. Zur Untersuchung des Multivalenzeffektes war es notwendig, Dextrane mit unterschiedlich hohen Beladungen an BH3-Peptiden zu synthetisieren. Für die Untersuchungen der zytosolischen Stabilität der Konjugate war der Einsatz fluoreszenzmarkierter BH3-Peptide notwendig, da ihr Abbau mittels Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie ermittelt werden sollte.

Die fluoreszenzmarkierten Peptide **16a** und **16b** konnten analog zur Synthese von Fluorophor **9** dargestellt werden. Die freien BH3-Peptide mussten so modifiziert werden, dass sie ebenfalls über Endozytose in die Zellen transportiert werden konnten. Die Zellpermeabilität der Peptide **17a** und **17b** wurde durch die Synthese der BH3-Sequenzen auf mit Nonaarginin belegtem TentaGel-R-Ram-Harz erreicht. Um die Detektierbarkeit in Zellen zu gewährleisten, wurde das BH3-Peptid beziehungsweise seine mutierte Form N-terminal mit Carboxyfluorescein verknüpft. Sequenzen dieser Peptide sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

#	Name	Sequenz
16a	C-BH3K(Fluo)	CEDIIRNIARHLAQVGDSMDRSIK(Fluo)-NH2
16b	C-mBH3K(Fluo)	CEDIIRNIARHAAQVGASADRSIK(Fluo)-NH2
17a	Fluo-BH3-R9 Fluo-EDIIRNIARHLAQVGDSMDRSIRRRRRRRRR-NH	
17b	Fluo-mBH3-R <sub>9</sub>	$Fluo-EDIIRNIARHAAQVGASADRSIRRRRRRRRRR-NH_2$
Tab. 4: Fluoreszenzmarkierte BH3-Peptide		

## 3.1.17 Synthese von Maleinimidodextran

Wie schon bei der Synthese von Fluo- R<sub>9</sub>-Dextran **12** sollten parallel Cysteinylnonaarginin **11** und die Peptide **16a**, **b** auf Thioesterdextran **5** gekuppelt werden.

Die bei der nativen chemischen Ligation erreichte Kupplungseffizienz war relativ gering. Um die eingesetzten Peptide möglichst effektiv mit dem Polymer zu verknüpfen, wurde nach einem alternativen System gesucht. Es ist seit Langem bekannt, dass Maleinimide sehr

schnell und quantitativ mit Thiolen reagieren.<sup>[82, 83]</sup> Daher sollte diese Methode auch hier eingesetzt werden. Verschiedene Polymere wurden bereits mit Maleinimidgruppen belegt. So wurden bereits Dextrane durch die Anknüpfung von N-Chlormethylmaleinimid substituiert.<sup>[84]</sup> Bei dieser Methode befinden sich die Maleinimidfunktionalitäten bedingt durch den kurzen Spacer relativ dicht am Polymer, sodass nicht alle Gruppen gut erreichbar sind. Durch größere Abstände zum Dextran sollte hier eine bessere Erreichbarkeit und somit höhere Kupplungseffizienz erreicht werden. Die Carboxyethylgruppen von 2 waren gut als Anknüpfungspunkte für die Maleinimidgruppen geeignet. Zusätzlich konnten sie aber auch als Spacer zwischen den Maleinimidgruppen und dem Polymer dienen. Analog zur Synthese der Thioesterdextrane sollten daher die Carboxylgruppen von 2 mit N-Aminoethylmaleinimid umgesetzt werden. Zur Herstellung des Maleinimids wurde Ethylendiamin einfach mit einer Boc-Gruppe geschützt. Dafür wurde Ethylendiamin (1.3 M) mit Boc-Anhydrid (0.13 M) in trockenem Chloroform Reaktion gebracht. Nach zur Waschen mit Natriumhydrogencarbonatlösung wurde das N-Boc-1,2-Diaminoethan 18 in Ausbeuten von 99 % (bezogen auf Di-tert-Butyl-dicarbonat) erhalten.<sup>[85]</sup>



Abb. 48: Synthese von N-Boc-1,2-Diaminoethan 18

Die freie, primäre Aminogruppe konnte nun zum Maleinimid umgesetzt werden. Dafür wurde die ungeschützte Aminogruppe von **18** mit Maleinsäureanhydrid umgesetzt. Diese Reaktion erfolgte in zwei Stufen. Im ersten Schritt reagierte das cyclische Anhydrid unter Ringöffnung mit der Aminogruppe zum Amid. Die freie Säurefunktion wurde im zweiten Schritt mit Essigsäureanhydrid zum gemischten Anhydrid umgesetzt. Dieses reagierte intramolekular mit dem Amid zum *N*-Boc-(2-Aminoethyl)maleinimid **19**.



Abb. 49: Synthese von N-Boc-(2-Aminoethyl)maleinimid 19

Nach chromatographischer Aufarbeitung wurde die Boc-Schutzgruppe sauer abgespalten.



Analog zu der Synthese der Thioesterdextrane wurde 20 auf die Carboxylgruppen des CED mit EDC als Kupplungsreagenz bei einem pH-Wert von 6.5 in Wasser gekuppelt. Die reaktiven Gruppen auf dem entstandenen Maleinimidodextran **21** wurde wie zuvor mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie quantifiziert. Die Anzahl der Maleinimidgruppen pro Dextranmolekül konnte ermittelt aus dem Integralverhältnis des Integrals über dem Signal der Maleinimidprotonen bei 6.90 ppm zu den Integralen über dem jeweiligen Signal der C(1)H-Protonen bei 4.98 ppm beziehungsweise der Methylenprotonen bei 2.50 ppm. Es zeigte sich, dass auch hier die Carboxygruppen auf dem Dextran quantitativ mit 20 umgesetzt wurden. Da unterschiedlich stark beladene Carboxyethyldextrane in ausreichend großen Mengen vorhanden waren, war ausgehend von der Anzahl der immobilisierten SO Carboxyethylgruppen eine konstante Einstellung der Anzahl an Maleinimidgruppen pro Dextran möglich. Außerdem wiesen die auf diese Weise synthetisierten Maleinimidodextrane deutlich längere Abstände zwischen Polymer und funktioneller Gruppe auf.



Abb. 50: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Maleinimidodextran 21

Stabilitätsuntersuchungen ergaben, dass die Maleinimidogruppen bei pH-Werten von bis zu 6.5 auch über Nacht stabil blieben. Im neutralen und basischen Milieu reagierten die Maleinimidgruppen mit den nucleophilen Hydroxygruppen. So konnte bei einem Maleinimidodextran mit 8 Maleinimidgruppen, das 16 Stunden in wässriger Lösung bei einem pH-Wert von 7 rührte nur noch die Hälfte der Maleinimidogruppen im NMR detektiert werden. Bei einem pH-Wert von 8.5 konnten nach 16 Stunden Rühren keine Maleinimidgruppen mehr detektiert werden.

# 3.1.18 Synthese zellgängiger BH3-Dextrane

Die Daten des vorherigen Kapitels belegten, das alle Carboxylgruppen quantitativ umgesetzt wurden. In einem Schritt wurden parallel die BH3K(Fluo)-Peptide **16a**, **b** sowie das zellpenetrierende Peptid **11** auf die Maleinimidgruppen von **21** gekuppelt. Die so hergestellten Peptidpolymere sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

#	Name	Anzahl der Peptide pro Polymer
22a	5BH3K(Fluo)-2R <sub>9</sub> -Dextran	5 C-BH3K(Fluo) und 2 CR <sub>9</sub> Gruppen
22b	5mBH3K(Fluo)-2R9-Dextran	5 C-mBH3K(Fluo) und 2 CR <sub>9</sub> Gruppen
23a	2BH3K(Fluo)-2R9-Dextran	2 C-BH3K(Fluo) und 2 CR <sub>9</sub> Gruppen
23b	2mBH3K(Fluo)-2R9-Dextran	2 C-mBH3K(Fluo) und 2 CR <sub>9</sub> Gruppen
<b>Tab. 5</b> : Synthetisierte BH3K(Fluo)-R <sub>9</sub> -Dextrane		

Die Thioetherverknüpfungen wurden effizient in MES-Puffer bei einem pH-Wert von 6.5 gebildet. Dieser schwach saure pH-Wert wurde eingestellt, obwohl die Bindung mit der Thiolgruppe des Cysteins in einem neutralen bis schwach basischen Milieu schneller erfolgt wäre, da in einem leicht saurem Medium die Dimerisierung der Cysteine über Disulfidbrücken deutlich reduziert werden konnte. Ferner ist bekannt, dass Maleinimide auch mit anderen Nucleophilen wie etwa Aminen regieren können.<sup>[86]</sup> Bei einem neutralen bis schwach sauren pH-Wert erfolgt jedoch die Bildung der Thioether etwa um den Faktor 1000 schneller als die Anbindung eines Amins.<sup>[87]</sup>

Für die Synthese der BH3-Dextrane **22a**, **b** und **23a**, **b** wurden **21** (0.4  $\mu$ M), Cysteinylnonaargininamid **11** (1.2  $\mu$ M) und die BH3-Peptide **16a**, **b** (3.1  $\mu$ M, für 5 BH3-Gruppen pro Dextran) beziehungsweise (1.2  $\mu$ M, für 2 BH3-Gruppen pro Dextran) in 1-2 ml MES-Puffer (pH 6.5) gelöst. Nach 16 Stunden Rühren wurde der Lösung 2-Mercaptoethanol (6  $\mu$ M) zugesetzt und abermals 16 Stunden gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte durch Einengen der Lösungen, Ausfällen mit Methanol sowie Waschen sowohl mit Methanol als auch mit DMF. Die festen Rückstände wurden wie zuvor beschrieben in Wasser gelöst und über Sephadex G-25 gereinigt. Mittels FCS konnte gezeigt werden, dass die BH3-Peptide kovalent an Dextranen gebunden waren. Die Aminosäureanalyse gab Aufschluss über die jeweilige Peptidbeladung der Polymere.

In der Regel konnten auf diese Weise 75 % der eingesetzten Cysteinylpeptide am jeweiligen Polymer immobilisiert werden. Damit war die Kupplungseffizienz dreimal so hoch wie bei der anfangs durchgeführten nativen chemischen Ligation. Da die hier verwendeten Peptide nur ein Cystein und somit nur eine Thiolgruppe enthielten, konnte die Maleinimid-Thiol-Kupplung in diesem Projekt eingesetzt werden. Weitere Thiolgruppen im Peptid hätten ebenfalls mit

der Maleinimidfunktion zum Thioether reagieren können und wären damit zum Ausschlusskriterium für diese Methode geworden. Die wesentlichen Vor- und Nachteile der NCL und der Maleinimid-Thiol-Kupplung sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Native Chemische Ligation (NCL)	Maleinimid-Thiol-Kupplung	
Amidbildung	Thioetherbildung	
рН 7.2-7.4	рН 5.5-7	
langsam	schnell	
Reduktionsmittel notwendig	kein Reduktionsmittel notwendig	
bevorzugt bei Peptiden, die mehrere Thiolgruppen enthalten	bevorzugt bei Peptiden mit einer enthaltenen Thiolgruppe	
Kupplungserfolg bis zu 25 % des eingesetzten Peptids	Kupplungserfolg bis zu 75 % des eingesetzten Peptids	
Tab. Ci\/amilaiah mujaahan NOL.	und Malaininaid Thial Kunahuna	

Tab. 6: Vergleich zwischen NCL und Maleinimid-Thiol-Kupplung

# 3.1.19 Der Multivalenzeffekt bei der Apoptoseinduktion

Die so synthetisierten Peptidpolymere **22a**, **b** und **23a**, **b** sowie die Fluo-BH3-R<sub>9</sub>-Peptide **17a**, **b** wurden in zellulären Tests auf ihr Vermögen, Apoptose zu induzieren, untersucht. Die dabei eingesetzten jeweiligen BH3-Peptidkonzentrationen betrugen 2 und 10 µmol/L. Da alle BH3-Peptide Fluoresceingruppen trugen, war eine genaue Einstellung der Konzentrationen in den einzelnen Lösungen mittels UV-Vis-Spektroskopie möglich. Der Caspase-3-Aktivitätsassay ist ein unumstrittener Nachweis für den apoptotischen Zelltod. Aus diesem Grund wurde nur dieser durchgeführt und an dieser Stelle auf den Annexin-V-Assay verzichtet. Dazu wurden Jurkat-Zellen für 6 Stunden mit den jeweiligen Peptidkonjugaten inkubiert. Parallel dazu wurde die Zytotoxizität der Konjugate und die der freien BH3-Peptide mit Trypan-Blau untersucht. Es zeigte sich, dass weder die Peptide noch die Konjugate bei den getesteten Konzentrationen toxisch für die Zellen waren. Der Caspase-3-Assay wurde analog zu dem bereits vorher Beschriebenen durchgeführt. Der einzige Unterschied bestand jetzt darin, dass die Zellen mit den Peptidpolymeren beziehungsweise den Peptiden nicht elektroporiert, sondern inkubiert wurden.



Abb. 51: Caspase-3-Aktivitätsassay

Die freien Fluo-BH3-R<sub>9</sub>-Peptide **17a**, **b** sowie die mBH3-Peptidpolymere **23a**, **b** zeigten keinerlei Caspase-3-Aktivitäten. Die Dextrane mit den BH3-Wildtyppeptiden **22a**, **b** zeigten dagegen eine erhöhte Aktivität. Noch interessanter war jedoch der Vergleich von **22a** und **23a**. Bei gleicher Peptidkonzentration war die gemessene Caspase-3-Aktivität bei Zellen, die mit **22a** inkubiert wurden, bis zu dreimal höher als bei den Zellen, die mit **23a** behandelt wurden. Dieser drastische Unterschied der Caspase-3-Aktivitäten bei unterschiedlich stark beladenen BH3-Polymeren stützte die theoretischen Annahmen von George Whitesides in Bezug auf den Multivalenzeffekt. Die gleichzeitige Bindung der polymergebundenen BH3-Peptide an die auf den Mitochondrien befindlichen, antiapoptotischen BCI-2-Proteine sorgte also wesentlich stärker für die Freisetzung der proapoptotischen Proteine Bak und Bax, als es freie BH3-Peptide in den untersuchten Konzentrationen vermochten.



Abb. 52: Vergleich der Caspase-3-Aktivitäten zellgängiger BH3-Konjugate

In weiteren Experimenten wurden die proteolytischen Stabilitäten des Peptidpolymers 22a und die des freien Peptids 17a verglichen. Nach der Aufnahme in Jurkat-E6.1-Zellen wurden die Zellen lysiert. Direkt nach der Auftrennung der Zellen sowie nach 2, 4, 8 und 24 Stunden wurden Aliquots des Lysats entnommen und mittels FCS untersucht. Aufgrund der unterschiedlichen Diffusionszeiten konnten Rückschlüsse gezogen werden, ob die freien beziehungsweise die polymergebundenen Peptide noch intakt waren, oder ob sie durch die zellulären Enzyme bereits abgebaut worden waren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen belegten, dass die polymergebundenen Peptide eine wesentlich höhere proteolytische Stabilität aufwiesen als ihre freien Analoga. So zeigte sich, dass die freien Peptide innerhalb der ersten 4 Stunden abgebaut wurden. Die Hälfte der polymergebundenen BH3-Peptide war dagegen sogar nach 24 Stunden noch intakt.



**Abb. 53:** Es zeigte sich, dass die Konjugate wesentlich langsamer abgebaut wurden, als die freien Peptide.

In diesem Projekt wurden ausgehend von nativen Dextran Thioesterund Maleinimdodextrane synthetisiert. Durch die parallele Anknüpfung verschiedener Peptide konnten fluoreszenzmarkierte Dextrane synthetisiert werden, die zellgängig und zellverträglich waren. Die Variation in der Anzahl von polymergebundenen BH3-Peptiden beziehungsweise ihrer mutierten Formen, ermöglichte nicht nur Vergleiche der BH3-Dextrane zu freien Peptiden, sondern auch der verschieden beladenen Polymere untereinander.

So zeigte sich zunächst, dass die Peptidpolymere wesentlich effizienter Apoptose induzieren konnten als die freien Peptide in der gleichen Peptidkonzentration. Eine weitere wichtige Erkenntnis war, dass Dextrane mit fünf gebundenen BH3 Peptiden um ein Vielfaches wirkungsvoller waren, als die analogen Polymere mit nur immobilisierten 2 BH3 Gruppen in gleicher Peptidkonzentration. Diese Beobachtung stützte die theoretischen Annahmen von George M. Whitesides in Bezug auf den Multivalenzeffekt. Ferner konnte in diesem Projekt gezeigt werden, dass polymergebundene Peptide offensichtlich im Zytosol auch wesentlich stabiler sind, als ihre freien Analoge. Die gewonnenen Ergebnisse könnten helfen die Apoptose in Krebszellen zu induzieren. Für eine therapeutische Anwendung müssten jedoch die selektive Adressierung von Tumorzellen gewährleistet sein. Das könnte durch den Einsatz zusätzlich immobilisierter Targetpeptide auf den Polymeren gewährleistet werden. Solche Peptide, die spezifisch an Erkennungsmotive auf Tumorzellen binden sind jedoch bislang nicht verfügbar.

# 3.2 Der Einsatz von Nonaarginindextran zur Regulierung der Taxolresistenz

Eierstockkrebs (Ovarialkarzinom) ist eine Tumorerkrankung der weiblichen Keimdrüsen. Bei dieser Krebsart werden bösartige Tumore oft erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, da die Symptome wie etwa Schmerzen im Unterleib, Verstopfung oder Blutungen außerhalb der Periode auch Anzeichen harmloser Erkrankungen sind. Die späte Behandlung besteht im ersten Schritt aus einem operativen Eingriff, bei dem in der Regel die Gebärmutter, die Eierstöcke samt Eileitern und Teilen des Bauchfells entfernt werden. Im zweiten Schritt werden in einer Chemotherapie Zytostatika wie Carboplatin und Taxol<sup>®</sup> parallel eingesetzt, um die Vermehrung restlicher Krebszellen zu unterbinden.



Taxol<sup>®</sup> ist ein eingetragenes Warenzeichen der Firma Bristol-Myers Squibb (BMS) und bezeichnet den Wirkstoff Paclitaxel. Dieser wurde erstmals 1971 aus der Rinde der pazifischen Eibe isoliert und charakterisiert.<sup>[88]</sup> Chemisch gehört Paclitaxel zu der Gruppe der Diterpene und wird als Zytostatikum in der Tumortherapie eingesetzt. Seine Wirkung basiert auf der Stabilisierung der Mikrotubuli. Dabei handelt es sich um röhrenförmige Proteinoligomere von 25 µm Länge, die in allen Zellen vorkommen. Sie bestehen aus helikal angeordneten Heterodimeren der Proteine  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin.

Diese relativ labilen Proteinkomplexe sind an diversen Funktionen innerhalb der Zelle beteiligt. So sind sie wesentlich verantwortlich für die Erhaltung der Zellform, den intrazellulären Stofftransport sowie den Aufbau des Spindelapparates, der während der Mitose für die Verteilung der Chromosomen notwendig ist; nach der Chromosomenverteilung wird durch den Abbau der Mikrotubuli die nächste Phase der Mitose eingeleitet. Die Bindung von Taxol an β-Tubulin führt zu einer Stabilisierung der Mikrotubuli und somit zur Störung der notwendigen Auf- und Abbauprozesse dieser Proteinkomplexe.<sup>[89, 90]</sup> Der gestörte Abbau des Spindelapparates hat zur Folge, dass die Mitose nicht vollständig ablaufen kann, was letztlich zur Induktion der Apoptose führt.<sup>[91]</sup>

Ein unerwünschter Nebeneffekt der Anwendung von Paclitaxel in hohen Konzentrationen ist jedoch, dass nicht nur Tumorzellen, sondern auch gesunde Zellen in ihrer Zellteilung

gehemmt werden. Da sich aber Krebszellen verstärkt teilen, sind diese auch eher betroffen als gesunde Zellen. Ferner bildet sich häufig eine Taxolresistenz aus. Als wichtigster Mechanismus gilt dabei die Überexpression von P-Glykoprotein. P-Glykoprotein ist ein Genprodukt des MDR-1-Gens (*Multi Drug Resistance*) und bildet einen aktiven Transporter, der unter Verbrauch von ATP zelltoxische Stoffe aus der Zelle entfernt. Das lipophile Molekül Taxol ist ein sehr geeignetes Substrat dieser Pumpe und wird somit effektiv aus der Zelle transportiert.<sup>[92, 93]</sup>

## 3.2.1 Einfluss zellpenetrierender Peptide auf die Wirkung von Taxol

Im Kapitel 3.1 wurden zellpenetrierende Peptide eingesetzt, um die zelluläre Aufnahme von Polymeren mit darauf gekuppelten Wirkpeptiden zu gewährleisten. Bei den dabei eingesetzten Konzentrationen zeigten die Konjugate keine Zytotoxizität. Dennoch ist bekannt, dass gerade in hohen Konzentrationen positiv geladene Moleküle wie Polyarginine oder Polylysine zytotoxisch wirken können. Für die zelluläre Aufnahme wechselwirken die positiv geladenen Amino- beziehungsweise Guanidinogruppen der Peptidseitenketten mit den negativ geladenen Heparansulfat-Proteoglykanen auf der Zelloberfläche. Bei hohen Peptidkonzentrationen erfolgt eine Aufkonzentration an den Zellmembranen. Die anschließende Aufnahme der Peptide via Endozytose führt bei geringen Peptidkonzentrationen zu keinen Beeinträchtigungen der Membran. Eine übermäßig starke Aufkonzentration der Peptide und deren gleichzeitige endosomale Aufnahme führt durch noch nicht bekannte Mechanismen zu Veränderungen in der Membran. So wurde in der Arbeitsgruppe um Roland Brock bei Nonaargininkonzentrationen von 20 mM die Freisetzung von Ceramiden beobachtet.<sup>[94]</sup> Ceramide bestehen aus einem Sphingosin, das über eine Amidbindung mit einer Fettsäure verknüpft ist. Sie kommen in zellulären Lipiddoppelschichten vor und können unter bestimmten Bedingungen aus der Zellwand freigesetzt werden. Diese freien Ceramide können innerhalb von Zellen die Freisetzung von Cytochrom c induzieren und somit den apoptotischen Zelltod induzieren.<sup>[95]</sup> Da die Membranoberflächen von Krebszellen wesentlich mehr negativ geladene Gruppen aufweisen als gesunde Zellen,<sup>[96]</sup> sollte diese Anlagerung der positiv geladenen Polyarginine verstärkt an diesen Oberflächen erfolgen. Bedingt durch den Multivalenzeffekt war zu erwarten, dass Nonaarginindextrane auch wesentlich effizienter wirken als die monovalenten Peptide und dass die hochbeladenen Peptidpolymere schon in geringen Konzentrationen zur Freisetzung von Ceramiden in Krebszellen führen. Im Zusammenspiel mit Zytostatika sollten diese freigesetzten Ceramide die Toxizität und somit die Wirkung der Krebstherapeutika verbessern beziehungsweise einer Wirkstoffresistenz entgegenwirken. In einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Roland Brock wurde geprüft, welchen Einfluss

polyvalente R<sub>9</sub>-Dextrane auf die Wirkung von Zytostatika haben. Dabei war zu beachten, dass die Peptidpolymere nicht von sich aus so stark zytotoxisch sind, dass gesunde Zellen ebenfalls in die Apoptose gehen. Für diesen Einsatz wurde Maleinimidodextran **21** mit jeweils 5 Nonaarginingruppen und einem Fluorophor beladen. Das entstandene Fluo-Dextran **24** (10  $\mu$ M) wurde für 30 Minuten mit HeLa-S-Zellen bei 37°C inkubiert. Wie in Abbildung 54 gezeigt, kam es bei einer Peptidkonzentration von 25  $\mu$ M zu einer starken Anlagerung der Peptidpolymere an die Zellmembranen. Nach 30 Minuten war deutlich zu erkennen, dass die Peptidpolymere im Zytosol und den Nucleoli der Zellkerne lokalisiert waren. Ferner wiesen auch die Membranen nach mehreren Waschgängen eine starke Anlagerung des Polymers auf. Dennoch war die Membranintegrität nicht gestört. Trypan-Blau färbte lediglich die Membranen der behandelten Zellen an.



**Abb. 54**: HeLa-S-Zellen direkt nach Zugabe (A) und 30 min nach Inkubation mit 10  $\mu$ M 5R<sub>9</sub>-Fluo-Dextran **24** und mehrfachem Waschen (B und C). Die Polymere sind sowohl im Zytosol als auch in den Nucleoli der Zellkerne lokalisiert. Trotz mehrerer Waschgänge haften immer noch große Mengen des 5R<sub>9</sub>-Fluo-Dextrans an den Membranen. Dennoch sind die Membranen noch vollkommen intakt, was durch die Anfärbung mit Trypan-Blau gezeigt wird (C).

Da 5R<sub>9</sub>-Fluo-Dextran **24** in einer Konzentration von 10  $\mu$ M von den HeLa-S-Zellen gut vertragen wurden, wurde das Peptidpolymer sowohl mit als auch ohne Taxol auf Ovcar-3-Zellen getestet. Diese Zelllinie entstammt einem Adenokarzinom des Eierstocks und reagierte in Vorversuchen wesentlich empfindlicher auf freie Nonaargininpeptide als HeLa-S-Zellen. Für die zellulären Tests wurden Polymerlösungen in Konzentrationen von 0.6-3.3  $\mu$ M eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 55 zusammengefasst. In der Grafik 55 A ist deutlich zu erkennen, dass mit steigenden Polymerkonzentrationen auch in Abwesenheit von Taxol das Zellwachstum verringert werden konnte. Ein noch stärkerer Effekt konnte jedoch bei der Koinkubation mit Taxol festgestellt werden (Abb. 55 B). Während bei einer Behandlung der Zellen mit Taxol bei einer Konzentration von 50 nM lediglich 50 %

Wachstumsinhibition erreicht wurde, brachte der Zusatz von  $5R_9$ -Fluo-Dextran **24** in einer Konzentration von bereits 0.6 µM eine Hemmung der Wachstumsrate von 80 %. Ferner ist zu bemerken, dass eine Konzentrationssteigerung des Taxols von 5 auf 50 nM kaum einen Effekt auf die Hemmung der Zellteilung hatte. Offensichtlich besaßen 50 % der Zellen eine Taxolresistenz. Erst der Zusatz von Peptidpolymeren konnte diese Resistenz herunterregulieren und die Effizienz des Wirkstoffes steigern.



**Abb. 55**: Wachstumsinhibition von Ovcar-3-Zellen bei der Behandlung mit 5R<sub>9</sub>-Fluo-Dextran **24** (A) und im Zusammenspiel mit Taxol (B).

In diesem Projekt wurde ein pentavalentes Nonaarginindextran synthetisiert und seine Toxizität untersucht. Bei einer Konzentration von 10 µM blieben behandelte HeLa-S Zellen vital. Da gezeigt wurde, das einige Ovcar-3 Zellen eine Taxolresistenz besaßen, wurde das synthetisierte Polymer mit diesen Zellen inkubiert. Schon bei diesen Versuchen mit dieser Eierstock-Krebszelllinie zeigte sich eine deutliche Hemmung der Zellteilung. Dieser Effekt konnte weiter gesteigert werden, durch das Zusammenspiel von Nonaarginindextran und Paclitaxel. Während durch die Behandlung von Ovcar-3-Zellen mit Taxol in einer Konzentration von 50 nM lediglich 50 % Wachstumsinhibition erreicht wurde, konnte schon durch den Zusatz von 5R<sub>9</sub>-Fluo-Dextran in einer Peptidkonzentration von 0.6 µM eine Hemmung der Wachstumsrate von 80 % erreicht werden. Damit wurde gezeigt, dass sich die Taxolresistenz in Ovcar-3-Zellen durch den Zusatz von Nonaarginindextran deutlich herunter regulieren lässt. Dennoch stehen noch weitere biologische Tests an. So muss noch eindeutig das therapeutische Fenster des pentavalenten Nonaarginindextrans untersucht werden. Die Frage, wie gut das Peptidpolymer im biologischen Organismus vertragen wird ist bislang noch unbekannt und wird zur Zeit in der AG Brock untersucht.

# 3.3 Chlorid-sensitive Dextrane

Proteine haben innerhalb des Organismus lebenswichtige Aufgaben, wie den Aufbau des Zytoskeletts, den Stofftransport in Zellen (Transportproteine) oder als Antikörper. Haben sie ihre Aufgabe erfüllt, erfolgt ihre Verstoffwechselung in Proteasomen und Lysosomen innerhalb der Zelle. Während in Proteasomen endogene (cytoplasmatische und entartete) Proteine abgebaut werden, werden in Lysosomen endosomal aufgenommene Proteine verstoffwechselt. Lysosomen enthalten im Wesentlichen hydrolysierende Enzyme (Proteasen, Lipasen, Nukleasen) für den Verdau von exogenen Materialien. Die lysosomalen Proteine werden zunächst im Golgi-Apparat gebildet und verschmelzen mit den späten Endosomen zum Lysosom. Um die Zelle vor Schäden zu schützen, sind diese Proteine nur im sauren Milieu aktiv. Für die Aktivierung der enthaltenen Enzyme, muss der pH-Wert im Lysosom auf 4.5-5 abgesenkt werden.



Abb. 56: Zelluläre Aufnahme und Abbau von Proteinen

Diese Ansäuerung geschieht durch H<sup>+</sup>-ATPasen, die sich auf dem Endosom beziehungsweise Lysosom befinden. Bei diesen Ionenkanälen handelt es sich um multimere Proteinkomplexe, die die Energie aus der ATP-Hydrolyse verwenden, um Protonen gegen ihren elektrochemischen Gradienten über die Membranen in die Endosomen und Lysosomen

zu transportieren. Um eine ausreichende Ansäuerung zu gewährleisten, muss jedoch zusätzlich ein Ladungsausgleich geschaffen werden. Dazu werden parallel zu den Protonen Chloridionen über Chloridkanäle (beispielsweise CIC-5 oder CIC-7) in die Zellorganellen transportiert. Auf diese Weise wird für die einströmenden Protonen ein Ladungsausgleich geschaffen, sodass sich ein pH-Wert von 4.5 einstellt, ohne den ein enzymatischer Abbau von Proteinen nicht möglich ist. Lange war die genaue Funktion dieser Transportmechanismen nur teilweise verstanden, und es wurde angenommen, dass die einzige Aufgabe der Chloridkanäle darin besteht, den Ladungsausgleich für die stärker anwachsende Protonenkonzentration zu bilden. Schon vor Jahren konnte die Gruppe von Thomas Jentsch zeigen, dass Mutationen von CIC-7 in Maus und Mensch zu schwerwiegenden Krankheiten führen.<sup>[97]</sup> So führen Störungen des lysosomalen Verdaus von Proteinen im Gehirn zum Absterben von Nervenzellen. Eine verminderte Ansäuerung der Knochen abbauenden Zellen, den Osteoklasten, führt zu Osteopetrose. Bei dieser Krankheit wird weniger Knochenmaterial abgebaut, als aufgebaut wird, sodass die Knochen verkalken.<sup>[98-100]</sup> Obwohl gezeigt wurde, dass Lysosomen, denen CIC-7 fehlt, immer noch einen pH-Wert von 4 erreichen konnten, kam es zu einer starken Beeinträchtigung des Knochenabbaus durch Osteoklasten. Aus diesem Grund muss der Ladungsaustausch auch über einen bislang unbekannten, alternativen Mechanismus erfolgen. Es wurde vermutet, dass CIC-7 die Chloridkonzentration in Lysosomen reguliert, indem dieser Chloridkanal einen Austausch von Chlorid-Anionen gegen Wasserstoffkationen steuert und somit als ein Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter anzusehen ist.<sup>[101, 102]</sup> Da insgesamt mehr Protonen durch die Wasserstoffkanäle in die Organellen hinein- als heraustransportiert werden, sinkt der pH-Wert trotz dieses Transportvorganges. Um diesen Mechanismus zu belegen, wurden in der AG Jentsch Knock-in-Mäuse gezüchtet, bei denen der CIC-7-Kanal so mutiert wurde, dass aus diesem Chlorid-Protonen-Austauscher ein reiner Chlorid-Transporter wurde. Basierend auf Ergebnissen mit anderen Chloridtransportern wurde daraus geschlossen, an welcher Stelle des Proteins die Mutation zu erfolgen hatte.<sup>[103-105]</sup> Diese Mutation des 800-Aminosäuren-Proteins CIC-7 wurde erreicht durch den Austausch von Glutamat gegen Alanin (Glu<sup>245</sup> → Ala<sup>245</sup>). Obwohl die Ansäuerung des Lysosoms sogar besser gewährleistet werden sollte, zeigten die Mäuse mit mutierten Chloridtransportern die gleichen Krankheitssymptome wie Mäuse, denen CIC-7 vollkommen fehlte. Um die Zusammenhänge zwischen der Ansäuerung und den Chloridkonzentrationen in Lysosomen zu untersuchen, war es notwendig, ein System zu entwickeln, mit dem die Änderung der Chloridkonzentrationen messbar war. In diesem Projekt bestand die Aufgabe darin ein Tool zu entwickeln, dass es ermöglicht die Chloridkonzentrationen in den Lysosomen mesbar zu machen. Dazu solten Chlorid-sensitive und -insensitive Farbstoffe parallel auf Dextran immobilisiert werden und dieses Polymer in Lysosomen transportiert werden.

# 3.3.1 Auswahl und Synthese der Farbstoffe

Wie bereits in vorhergehenden Kapiteln erwähnt, war es notwendig, einen Chlorid-sensitiven Farbstoff in die Lysosomen zu transportieren, um die Veränderung der Chloridkonzentrationen in diesen Zellorganellen messbar zu machen. Verschiedene fluoreszente Farbstoffe. deren Fluoreszenzintensität sich abhängig von der Chloridkonzentration in Lösungen ändert, sind bekannt. Die wichtigsten Vertreter dieser Indikatoren sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Indikator	λ <sub>ex</sub> [nm]	λ <sub>em</sub> [nm]	K <sub>D</sub> [mM]]	рК <sub>s</sub>
Clomeleon	440	485	167	5.2
YFP-H148Q	514	527	140	7.14
MQxyDMAQ	365	450	10	insensitiv zwischen pH 6-8
Lucigenin	368	505	2.6	-
MEQ	344	440	16-61	pH-insensitiv
MQAE	355	460	15	-
SPQ	350	450	83	insensitiv zwischen pH 3-10

Tab. 7: Chlorid-sensitive Farbstoffe<sup>[106]</sup>

Aufgrund seiner Eigenschaften wurde 6-Methoxychinolin (MEQ) als Farbstoff ausgewählt. Im Gegensatz zu Clomeleon und YFP-H148Q ist MEQ kein Protein. Dadurch ist es billiger und im größeren Maßstab synthetisierbar. Lucigenin ist ebenso wie die Chinolinderivate ein im großen Maßstab synthetisch herstellbarer Farbstoff. Der große Nachteil gegenüber MEQ besteht in dem wesentlich kleineren K<sub>D</sub>-Wert. Dieser ist hier ein Maß für die Affinität des Moleküls für Chloridionen. Bei diesem Farbstoff ist die Affinität so stark, dass Messungen der Änderung der Chloridkonzentration in Lysosomen, wo 60-80 mmol/L Chloridionen erwartet werden, nicht möglich sind.

Die Synthese von MQxyDMAQ (6-Methoxychinolinium-xylyl-6'-(dimethylamino)chinolinium), das ebenfalls ein Chinolinderivat ist, ist im Gegensatz zu MEQ wesentlich aufwendiger. Ein wesentlich größerer Hinderungsgrund für den hier vorgesehenen Einsatz als Chloridsonde in Zellen stellte jedoch die Änderung der Fluoreszenzaktivität mit einer Änderung des pH-Wertes zwischen 6-8 dar. Gerade im Bereich zwischen pH 4.5 und 7.4 liegt jedoch das intrazelluläre Milieu. Somit war ein zufriedenstellender Einsatz dieses Farbstoffes hier nicht gewährleistet. MQAE (N-(Ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxyquinoliniumbromid) ist ebenso wie Lucigenin aufgrund seiner starken Chloridaffinität für Messungen der Änderung der Chloridkonzentrationen ungeeignet. Weder MEQ noch SPQ weisen derartige Nachteile auf. Die K<sub>D</sub>-Werte von beiden Substanzen liegen in einem Bereich, in dem intralysosomale Änderungen der Chloridkonzentrationen ausreichend gut messbar sein sollten. Die Fluoreszenzintensitäten der beiden Farbstoffe werden nicht beeinflusst von Änderungen des pH-Wertes zwischen pH 3 und 10. Sowohl SPQ als auch MEQ sind leicht zu synthetisierende Chinolinderivate. Dennoch fiel die Entscheidung, MEQ zu synthetisieren, da dieser Farbstoff über eine Modifikation an der Aminogruppe leichter zu funktionalisieren war. Da die Chloridkonzentration in Lysosomen nicht absolut gemessen werden konnte, war hierfür ein Referenzfluorophor notwendig. Die Fluoreszenzintensität dieses Farbstoffs musste unabhängig von pH-Werten und Chloridkonzentrationen sein. Die Wahl fiel auf N,N,N',N-Tetramethylrhodamin (TAMRA). Dieser Farbstoff wird bei 555 nm angeregt und emittiert bei 580 nm. Die Extinktion von MEQ liegt bei 344 nm und seine Emission im Bereich von 440 nm. Beide Farbstoffe werden somit bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt und emittieren auch nicht bei gleicher Wellenlänge. Ferner bilden sie auch kein gemeinsames FRET-Paar. Insgesamt sorgten diese Eigenschaften hervorragend für ein paralleles Zusammenspiel beider Fluorophore in dem zu untersuchenden System. Obwohl auch die Möglichkeit bestanden hätte, beide Fluorophore kovalent aneinanderzubinden und in Zellen zu transportieren, wurde diese Idee verworfen. Der Grund dafür war, dass die Membranen von Endosomen und Lysosomen aus Lipiddoppelschichten bestehen, die von kleinen Molekülen passiert werden können. Ein mögliches Hinausdiffundieren der Farbstoffe sollte aber in den hier durchgeführten Untersuchungen ausgeschlossen werden. Eine Möglichkeit, beide Farbstoffe in gleichbleibender Konzentration in den Lysosomen zu halten, war die Verknüpfung mit einem polymeren Träger. Eine sinnvolle Größe des Farbstoffträgers lag oberhalb von 5 kDa. Das hier entwickelte CED brachte alle notwendigen Eigenschaften mit und hatte sich bereits bei den BH3-Dextranen als zuverlässiger Transporter erwiesen. Um so effizient wie möglich die Farbstoffe kovalent an das Polymer zu binden, war eine Kupplungsmethode nötig, die möglichst schnell, spezifisch und quantitativ verläuft. Die Reaktion von Carbonsäuresuccinimidylestern mit Aminen besitzt genau diese Eigenschaften. Die Ausbildung eines Amids und der gleichzeitigen Abspaltung von N-Hydroxysuccinimid erfolgt bei dieser Reaktion sehr rasch und oftmals quantitativ.



Abb. 57: Mechanismus eines Carbonsäuresuccinimidylester mit einem Amin

Im Gegensatz zu den in Kapitel 3.1 beschriebenen BH3-Dextranen waren hier keine freien Peptide zu kuppeln, die mit ihren nucleophilen Seitenketten ebenfalls den O-Succinimidylester angreifen und so ihre eigentliche Wirkung verlieren könnten.

Da Rhodamin sowohl als Carboxytetramethylrhodamin als auch entsprechender O-Succinimidylester kommerziell erhältlich war, konnte dieser Farbstoff ohne weitere Umfunktionalisierungsschritte direkt eingesetzt werden. Die funktionellen Gruppen des CED beziehungsweise des MEQ mussten jedoch entsprechend angepasst werden. Im Fall des Chlorid-sensitiven Farbstoffes bedeutete das, eine Carboxyfunktion in das MEQ-Molekül einzufügen und diese ebenfalls zum O-Succinimidylester umzusetzen. Eine geeignete Substitutionsstelle hierfür war die Aminofunktion des 6-Methoxychinolins. Über eine einfache Substitution von  $\omega$ -Bromoctansäure an dem aromatischen Amin des Farbstoffes wurde so N-(7-Carboxyheptyl)-6-methoxychinoliniumbromid **25** synthetisiert. Um den Aktivester zu generieren, wurde die Carboxylgruppe mit N-Hydroxysuccinimid und DCC in DMF zu N-(7-(O-Succinimidyl)-oxycarbonyl-heptyl)-6-methoxychinoliniumbromid **26** umgesetzt. Beide Synthesen verliefen problemlos und lieferten Ausbeuten von 85-99 %.



**Abb. 58**: Synthese von *N*-(7-(*O*-Succinimidyl)-oxycarbonyl-heptyl)-6-methoxychinoliniumbromid **26** 

## 3.3.2 Synthese eines hochbeladenen Aminodextrans

Da beide Farbstoffe als O-Succinimidylester vorlagen, wurden im Folgenden Aminogruppen auf dem CED immobilisitert, um eine parallele Anknüpfung des MEQs und des Rhodamins an das Polymer zu gewährleisten. Kommerziell erhältliches Aminodextran wird aus nativem

Dextran durch Periodatspaltung und anschließender reduktiver Aminierung hergestellt.<sup>[107]</sup> Im ersten Schritt werden hier durch Diolspaltung innerhalb des Dextrans Aldehydgruppen erzeugt. Im zweiten Schritt werden diese unter Zusatz eines Amins oder von Ammoniak zum Imin umgesetzt und anschließend mit Natriumborhydrid oder Natriumcyanoborhydrid reduziert. Nachteilig bei dieser Synthese ist jedoch die Zerstörung des Polysaccharidrückgrats. Durch den Verlust der cyclischen Acetalstruktur sind solche Aminodextrane wesentlich säurelabiler. Da die Aminogruppen sich unmittelbar am Polymerrückgrat befinden, ist ihre Flexibilität und Reichweite stark eingeschränkt ist. Ferner weisen kommerziell erhältliche Aminodextrane nur eine geringe Anzahl an Aminogruppen auf. Dadurch konnten in ersten Versuchen mit kommerziell erhältlichen Aminodextranen nicht genug Farbstoffmoleküle gekuppelt werden, sodass eine Untersuchung der Chloridkonzentrationen in Lysosomen nicht möglich war.



Abb. 59: Herstellung von kommerziell erhältlichem Aminodextran

Um die als *N*-Hydroxysuccinimidester vorliegenden Farbstoffe in ausreichender Menge zu kuppeln, war die Synthese eines Dextrans mit einer größeren Anzahl an Aminogruppen notwendig. Ausgehend von zuvor synthetisiertem CED (2 µM) wurde zunächst *N*-Boc-

Ethylendiamin **19** (66  $\mu$ M) mit EDC (66  $\mu$ M) in Wasser auf das Polymer gekuppelt. Die Untersuchung des *N*-Boc-Aminoethylamidoetyhldextrans **27** erfolgte nach beendeter Reaktion und Aufreinigung durch Dialyse gegen Wasser mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie. Anhand des Integralverhältnisses der Boc-Protonen bei 1.44 ppm zum Integral der charakteristischen Methylengruppenprotonen bei 2.55 ppm konnte der Reaktionserfolg ermittelt werden. Die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren zeigten vollständigen Umsatz aller Carboxygruppen zu den entsprechenden Amiden.



Abb. 60: Synthese und <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von 27

Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppen wurde in 1 molarer Salzsäure über 3 Stunden durchgeführt. Die Untersuchung des erhaltenen Produktes erfolgte wieder mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie. Die Signale der Boc-Protonen waren nicht mehr detektierbar und das Signal der Methylengruppe neben dem freien Amin lag tieffeldverschoben inmitten des Multipletts der Glukoseprotonen. Die Integrale der Methylengruppen bei 2.58 ppm (Dextran-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH) und bei 3.15 ppm (CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) wurden verglichen. Beide Integrale zeigten gleiche Werte.



Abb. 61: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von AAE-Dextran 28

Die Umsetzung von CED zu *N*-(Aminoethyl)-amidoethyldextran (AAE-Dextran) **28** war problemlos und verlief quantitativ. Zur Vereinfachung der Herstellung von AAE-Dextran wurde in weiteren Syntheseansätzen auf den Einsatz von *N*-Boc-Ethylendiamin verzichtet und ungeschütztes Ethylendiamin direkt für die Kupplung verwendet. Um dabei ungewollte Quervernetzungen zwischen den Polymeren zu unterbinden, wurde Ethylendiamin jeweils im zehnfachen Überschuss zu den Carboxy-Gruppen des CED eingesetzt. Diese direkte Kupplung verlief ebenso problemlos und quantitativ, wie in den jeweiligen NMR-Spektren gezeigt werden konnte.

## 3.3.3 Synthese und Untersuchung von MEQ-Dextran

Das AAE-Dextran 28 konnte in weiteren Schritten mit den verschiedenen Farbstoffen belegt werden. Zunächst wurde nur der Chlorid-sensitive Farbstoff auf das Polymer gekuppelt, um zu prüfen, ob sich dieses als Chloridsonde für den vorgesehenen Einsatz eignete. Dazu wurde AAE-Dextran mit 8 Aminogruppen (40 µM) in OSu-MEQ 26 (80 µM) bei einem pH-Wert von 8-10 für 12 Stunden zur Reaktion gebracht. Die Aufreinigung erfolgte nach Einengen der Lösung durch Ausfällen und Waschen mit Methanol und DMF. Das grob gereinigte Polymer wurde in Wasser gelöst und über Sephadex G-25 gereinigt, bevor die Polymerlösung lyophillisiert wurde. Das erhaltene MEQ-Dextran 29 wurde mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie und UV-Spektrometrie analysiert. Die Signale der aromatischen Chinolinprotonen erschienen im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum zwischen 7.6 und 9.1 ppm. Das Integral dieser Signale konnte mit dem Integral über dem Signal der C(1)H-Protonen des Dextrans ins Verhältnis gesetzt werden. Diese Rechnung ergab, dass die Aminogruppen des Dextrans quantitativ mit MEQ-Farbstoffmolekülen umgesetzt wurden. In-vitro-Studien von 29 zeigten, wie sich die Fluoreszenzintensität des MEQ in Anwesenheit verschiedener Anionen veränderte. Die Stern-Volmer-Gleichung gibt die Quantenausbeute eines Fluorophors in Anwesenheit eines Fluoreszenzquenchers an. Die Stern-Volmer-Konstante K<sub>SV</sub> ist ein Maß für die Quenchbarkeit eines Fluorophors. Je größer ihr Zahlenwert ist, desto stärker wird Fluoreszenz des Farbstoffs vom Quencher gelöscht. Das Verhältnis aus den Fluoreszenzintensitäten F/F<sub>0</sub> wurde bestimmt mit

$$\frac{F}{F_0} = K_{SV} \cdot [Q] + 1 \quad \text{, wobei}$$

- F : Fluoreszenzintensität des Fluorophors in Anwesenheit des Quenchers
- F<sub>0</sub> : Fluoreszenzintensität des Fluorophors in Abwesenheit des Quenchers

[Q] : Konzentration des Quenchers

K<sub>SV</sub> : Stern-Volmer-Konstante

Aus Titrationsexperimenten konnte das Verhältnis von  $F/F_0$  des MEQ-Dextrans bei unterschiedlichen Anionenkonzentrationen bestimmt werden. Durch Auftragen dieser Werte in einem Stern-Volmer-Plot erhielt man eine Gerade, deren Steigung K<sub>SV</sub> war.



Stern Volmer (Chlorid in Wasser)

Lediglich in Anwesenheit von Chlorid nahm die Fluoreszenzintensität des MEQ-Dextrans ab. Während Natriumchloridlösungen schon in geringen Konzentrationen zum Löschen der Fluoreszenzintensität führten, hatten Lösungen der Nitrat-, Gluconat- und Aspartatsalze bei keiner Konzentration Einfluss auf die Fluoreszenzintensität des MEQ.

Anion	K <sub>sv</sub> [M⁻¹]	
Chlorid	110-130	
Nitrat	6	
Gluconat	6	
Aspartat	5	

Diese Ergebnisse legten nahe, dass das MEQ-Dextran zur Bestimmung der lysosomalen Chloridkonzentrationen geeignet war.

# 3.3.4 Synthese von TMR-MEQ-Dextran

Für eine Quantifizierung der Chloridkonzentration in Lysosomen reichte es jedoch nicht, das AAE-Dextran mit dem Chlorid-sensitiven Farbstoff zu belegen. Um die Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten quantitativ zu messen, musste zusätzlich Tetramethylrhodamin am Polymer gebunden sein, da es in Bezug auf seine Fluoreszenz weder pH- noch Chlorid-sensitiv ist. Die Änderungen der Chloridkonzentrationen in den Zellkompartimenten wurden ratiometrisch aus den Verhältnissen der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten ermittelt.

Analog zur Synthese von MEQ-Dextran wurden beide Farbstoffe auf AAE-Dextran mit 8 Aminogruppen pro Polymereinheit gekuppelt. Um eine ausreichende Beladung des MEQ zu gewährleisten, sollten auf dem Polymer 1-2 Rhodamingruppen gebunden und restliche
freie Aminogruppen mit MEQ-Einheiten belegt werden. Dafür wurden AAE-Dextran (24  $\mu$ M bezogen auf die Aminogruppen) mit *N*,*N*,*N*,*N*. Tetramethylrhodamin-O-succinimidylester (7  $\mu$ M) bei einem pH-Wert von 8-10 für 1 Stunde gerührt. Anschließend wurde OSu-MEQ **26** (46  $\mu$ M) der Lösung zugesetzt. Nach analoger Aufarbeitung zu **29** wurde das erhaltene Produkt mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie und UV-Vis-Spektroskopie untersucht.



Abb. 62: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von MEQ-TMR-Dextran 30

So wurde das Integral über den Signalen der Xanthen-Protonen des Rhodamins zu dem Integral der C(1)H-Dextranprotonen gesetzt, um die Anzahl der gekuppelten Rhodamingruppen pro Polymer zu ermitteln. Da restliche drei aromatische Signale der

Rhodamingruppen zusammen mit denen der Chinolingruppen erschienen, wurde die ermittelte Anzahl der Rhodamingruppen mit drei multipliziert und das Produkt von der Gesamtanzahl der aromatischen Protonen zwischen 7.5 und 9.2 ppm (rot markierter Bereich in Abbildung 62) subtrahiert. Die so durchgeführte Analytik des entstandenen TMR-MEQ-Dextrans **30** ergab, dass etwa 2 Rhodamin- und 5 MEQ-Einheiten pro Dextran gebunden waren. Diese Werte stimmten mit den Ergebnissen der UV-Spektroskopie überein.

#### 3.3.5 In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen des TMR-MEQ-Dextrans

In *In-vitro*-Studien wurde der pH-Wert einer Polymerlösung aus **30** zwischen pH 3.5 und 7.5 variiert. Dabei bestätigte sich, dass die ausgewählten Fluorophore in Bezug auf ihre Fluoreszenz nicht pH-sensitiv reagierten und das Verhältnis ihrer Fluoreszenzintensitäten nicht vom Ausgangswert abwich.



**Abb. 63:** *In-vitro*-Untersuchung des MEQ-TMR-Dextrans: MEQ/TMR-Fluoreszenz mit Änderung des pH-Wertes zwischen pH 3.5 und 7.5

Die Veränderung der Fluoreszenzintensitäten wurde durch die Variation der Anionenkonzentration in Polymerlösungen untersucht. Zunächst wurde eine Polymerlösung mit Natriumgluconat in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt. Da sich die Fluoreszenzintensität von MEQ in Anwesenheit von Gluconatanionen nicht änderte, blieb auch das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von MEQ und TMR konstant. Beim Zusatz von Chloridanionen zu der Polymerlösung wurde die Fluoreszenz des Chinolinderivates gequencht, wodurch das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten Fluoreszenzintensitäten sank.



**Abb. 64**: MEQ-Fluoreszenz nach Zugabe von Glutamatanionen (grau) und Chloridanionen (schwarz)

Unglücklicherweise zeigte diese Untersuchung, dass die größten Veränderungen der Fluoreszenzintensität hier bei einer Chloridkonzentration von etwa 20 mmol/L auftraten. Da aber in Lysosomen mit einer natürlichen Chloridkonzentration von 60-80 mmol/L zu rechnen war, wären unter natürlichen Bedingungen aufgrund der frühen Abnahme der Fluoreszenz keine Aussagen über Unterschiede zwischen Lysosomen mit mutierten und wildtypischen CIC-7-Proteinen möglich gewesen.

In zellulären Experimenten mussten daher die Chloridkonzentrationen in den Zellen künstlich herabgesetzt werden. Dafür wurden Maus-Fibroblasten mit einer Lösung von 20 mg/ml Polymer in HEPES-Puffer für 2 Stunden inkubiert und gewaschen. Nach einer Inkubation von 2 weiteren Stunden in Medium konnten die Farbstoffpolymere ausschließlich in Lysosomen detektiert werden. Das im zweiten Inkubationsschritt eingesetzte Medium enthielt jedoch nur 7 mmol/L Chloridanionen. Die künstliche Chloridverarmung durch Inkubation der Zellen in diesem Medium wurde von den Zellen gut toleriert und schaffte Bedingungen, unter denen die erforderlichen Experimente durchgeführt werden konnten. Dieser Eingriff hatte keine Auswirkungen auf die gewonnenen Aussagen, da sowohl mutierte als auch wildtypische Lysosomen den gleichen Bedingungen ausgesetzt waren und so ein direkter Vergleich möglich blieb.

Für die zelluläre Aufnahme des Polymers wurden in diesem Fall keine zellpenetrierenden Peptide eingesetzt, da es nicht das Ziel war, möglichst viel Polymer in möglichst kurzer Zeit in die Zellen zu transportieren. Der wesentlich wichtigere Grund war jedoch, dass bei diesen Untersuchungen die Polymere nicht aus den Endosomen freigesetzt werden, sondern dass sie die Lysosomen erreichen. Durch den basischen Charakter der CPPs würden aber

93

Protonen in so hoher Konzentration in die Endosomen gepumpt, dass es zur Freisetzung ins Zytosol käme.



**Abb. 65**: Maus-Fibroblasten (MAF) nach 2 h Inkubation mit TMR-MEQ-Dextran (20 mg/ml), Waschen und Inkubation in Chlorid-verarmtem Medium (7 mmol/L Chlorid)

### 3.3.6 Biologische Ergebnisse

Das synthetisierte Polymer war trotz der starken Chloridaffinität des polymergebundenen Chinolinderivates als Chloridsonde tauglich. Es konnte gezeigt werden, dass eine fehlende Kupplung von Chlorid- und Protonentransport in den mutierten Chloridkanälen zu einer erheblich geringeren Chloridkonzentration in Lysosomen führte, obwohl der gleiche pH-Wert erreicht wurde wie in den Lysosomen mit nativen CIC-7.



**Abb. 66**: Vergleich der pH-Werte (links) und der Chloridkonzentrationen (rechts) in Lysosomen: Während die pH-Werte unabhängig von jeglichen Mutationen nahezu konstant sind, ist die Chloridkonzentration in den wildtypischen Lysosomen deutlich höher als bei Lysosomen, deren CIC-7-Kanal mutiert ist oder komplett fehlt.

#### Ergebnisse und Diskussion

Ferner konnte in Mausexperimenten gezeigt werden, dass Mäuse deren CIC-7-Kanäle mutiert waren, dieselben Krankheitsbilder zeigten wie Mäuse, denen dieser Chloridkanal komplett fehlte. Die Osteoklasten waren unter diesen Bedingungen nicht in der Lage, überflüssiges Knochenmaterial abzubauen. Die Folge war, dass die fehlentwickelten Mäuse deutlich kleiner waren als ihre gesunden Artgenossen, da die erhöhte Knochendichte ihr Wachstum bremste. Außerdem blieben beispielsweise Mäuse mit mutierten oder fehlenden CIC-7-Ionenkanälen zahnlos (markiert durch Pfeile in Abbildung 67), da das Durchstoßen der Zähne durch die dichten Knochen im Kieferbereich nicht möglich war.



**Abb. 67**: Röntgenaufnahmen von Mausunterschenkelknochen (oben) und Mikro-CT-Bilder von Mausschädeln (unten): Während in der Wildtyp-Maus (Clcn7<sup>+/+</sup>) der Knochen normal beschaffen war, wiesen Mäuse mit mutierten (Clcn7<sup>unc/unc</sup>) oder fehlenden (Clcn7<sup>-/-</sup>) ClC-7-Transportern übermäßiges Knochenwachstum auf. Die Kiefer der fehlgebildeten Mäuse wiesen aufgrund der zu starken Knochendichte im Kiefer keine Zähne auf (unten).

Da also bei identischen pH-Werten, aber unterschiedlichen Chloridkonzentrationen Krankheitssymptome auftraten beziehungsweise nicht auftraten, konnte daraus geschlossen werden, dass die Chloridkonzentration in Lysosomen dabei eine wesentliche Rolle spielt. CIC-7 ist also nicht, wie lange zuvor angenommen, nur für einen Ladungsausgleich der wachsenden positiven Ladung in Lysosomen verantwortlich, sondern vielmehr als Regulator der Chloridkonzentration zu sehen, der essenziell für die Funktion der hydrolysierenden Enzyme ist. Welche Rolle die Chloridionen bei der Funktion der lysosomalen Enzyme besitzen, ist jedoch noch nicht bekannt und muss in weiteren Arbeiten geklärt werden.

#### Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 68**: CIC-7 in Lysosomen nach der bislang herrschenden Ansicht (links) als reine Chloridtransporter und der gezeigten realen Funktionsweise (rechts): CIC-7 als Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter, wobei mindestens zwei Chloridionen gegen ein Proton getauscht werden.

## 3.3.7 Alternative Fluorophore

Mithilfe einer in dieser Arbeit synthetisierten Chloridsonde auf Basis von Dextran konnte gezeigt werden, dass fehlende Kopplung von Chlorid und Wasserstoffionentransport die Anreicherung von Chloridionen in Lysosomen drastisch reduziert. Wie jedoch die In-vitro-Studien zeigten, musste unter artifiziellen Bedingungen gearbeitet werden, um das Verhältnis der Chloridkonzentrationen der verschiedenen Lysosomen ermitteln zu können, da aufgrund der lysosomalen Chloridkonzentration die Fluoreszenz des MEQ komplett gequencht worden wäre. Aus diesem Grund wurde versucht, durch die Verwendung alternativer Fluorophore dem Problem zu begegnen. Die in der Literatur angegebenen K<sub>D</sub>-Werte für die Quenchung von MEQ durch Chloridanionen liegen zwischen 16 und 61 mmol/L.<sup>[108]</sup> So ermittelten Biwersi und Verkman für N-Ethyl-6-methoxychinolin einen K<sub>D</sub>-Wert von 58 mmol/L. Da in den hier durchgeführten Untersuchungen aber ermittelt wurde, dass 50 % der Fluoreszenz schon bei 20 mmol/L Chlorid geguencht wurden, sollte geprüft werden, ob eine Ethylgruppe am Chinolinamin für eine geringere Affinität sorgen würde. Ebenfalls sollte das bereits zuvor erwähnte SPQ untersucht werden, da es laut Tabelle 7 einen K<sub>D</sub>-Wert von 83 aufweist und somit ein idealer Quencherfarbstoff für die Chloridanionen in Lysosomen wäre.

Beide Farbstoffe unterscheiden sich nur durch die unterschiedlichen Substitutenten am Chinolinstickstoff. Daher sollte die Anknüpfung dieser Farbstoffe an das Polymer über eine in Position 6 befindliche Hydroxylgruppe erfolgen.



Ausgehend vom 6-Hydroxychinolin wurde dazu die Hydroxylgruppe mit Bromessigsäure-tertbutylester umgesetzt. Die Deprotonierung der Hydroxylgruppe erfolgte mit Natriumhydrid in trockenem DMF, da eine wässrige Lauge zur Abspaltung der *tert*-Butylgruppe geführt hätte. Diese war aber für eine einfachere Aufarbeitung des späteren Produktes sinnvoll. Als Base wurde Natriumhydrid eingesetzt, da schwächere Basen wie Cäsiumcarbonat überraschenderweise nicht stark genug für die Deprotonierung waren.



Die Aufarbeitung des tert-Butyl-2-(chinol-6-xyloxy)acetats 31 erfolgte durch Einengen der Lösung, Lösen des Rückstands in Chloroform und Ausschütteln gegen Wasser. Die Ausbeuten beliefen sich dabei auf 95-99 %. *tert*-Butylcarboxymethyl-6-oxy-*N*ethylchinoliniumbromid 32 beziehungsweise tert-Butylcarboxymethyl-6-oxy-N-(3sulfonpropyl)chinolinium 33 wurden durch 16-stündiges Kochen von 31 unter Rückfluss mit lodethan beziehungsweise 1,3-Propansulton erhalten. Alternativ lief die Reaktion aber auch innerhalb von 45 Minuten in der Mikrowelle bei 150 °C vollständig ab. Unverbrauchte Edukte wurden durch mehrfaches Waschen mit THF vollständig entfernt. Auch diese Reaktionen lieferten Ausbeuten von 88-92 %. Die tert-Butyl-Schutzgruppe wurde durch 4 molare Salzsäure abgetrennt. Carboxymethyl-6-oxy-N-ethylchinoliniumchlorid 34 beziehungsweise Carboxymethyl-6-oxy-N-(3-sulfonpropyl)chinolinium 35 sollten mit N-Hydroxysuccinimid zur Reaktion gebracht werden. Da beide Chinolinderivate aber in den gängigen organischen Lösungsmitteln nicht löslich waren und daher die OSu-Ester nicht sauber generierbar waren, wurde versucht, die Polarität dieser Chinolinderivate herabzusetzen.



Abb. 69: Synthese von Carboxymethyl-6-oxy-N-ethylchinoliniumchlorid 34 und Carboxymethyl-6-oxy-N-(3-sulfonpropyl)chinolinium 35

Dazu wurde analog zur Synthese von **31** 6-Bromhexansäure-tert-butylester mit 6-Chinolinol zur Reaktion gebracht. Die erzielten Ausbeuten des tert-Butyloxycarbonylpentyl-6oxychinolins 36 beliefen sich auf 97 %. In weiteren Schritten wurde 36 mit lodethan bzw. 1,3-Propansulton zu tert-Butyloxycarbonylpentyl-6-oxy-N-ethylchinoliniumbromid 37 bzw. zu tert-Butyloxycarbonylpentyl-6-oxy-N-(3-sulfonpropyl)chinolinium 38 bei 150 °C in der Mikrowelle umgesetzt. Auch hier wurden die Produkte nach Waschen in THF in Ausbeuten von etwa 90 % erhalten. Nach saurer Entschützung der Carboxylgruppen und anschließendem Waschen mit Diethylether wurden Carboxypentyl-6-oxy-N-ethylchinoliniumchlorid 39 und Carboxypentyl-6-oxy-N-(3-sulfonpropyl)chinolinium 40 in 90%iger Reinheit erhalten. Im Gegensatz zu 34 und 35 wiesen 39 und 40 zumindest eine gute Löslichkeit in DMF auf und wurden mit N-Hydroxysuccinimid und DCC in DMF zur Reaktion gebracht. Nach der Aufreinigung durch Ausfällen und Waschen in Ethylacetat wurde O-Succinimidyloxycarbonylpentyl-6-oxy-N-ethylchinoliniumchlorid 41 beziehungsweise Succinimidyloxycarbonylpentyl-6-oxy-*N*-(3-sulfonpropyl)chinolinium 42 in reiner Form

erhalten. Die Ausbeuten von etwa 70-80 % waren akzeptabel und wurden nicht weiter optimiert.





#### 3.3.8 Synthese der TMR-SPQ- und TMR-NEQ-Dextrane

Die SPQ- beziehungsweise NEQ-Derivate **41** und **42** wurden mit Aminodextran und O-Succinimidyl-5,6-carboxytetramethylrhodamin in einer Eintopfreaktion zur Reaktion gebracht. Dabei wurde wie zuvor bei einem pH-Wert von 8-10 in Wasser gearbeitet. Die Fluorophore wurden analog zur Synthese von **30** eingesetzt, sodass nach beendeter Reaktion etwa 1-2 Rhodamingruppen und 6-7 Chinolingruppen pro Dextran gebunden waren.



Abb. 70: TMR-NEQ-Dextran 43 und TMR-SPQ-Dextran 44

Das entstandene TMR-NEQ-Dextran **43** sowie das TMR-SPQ-Dextran **44** wurden auf ihre Eignung als lysosomale Chloridsonden untersucht. Es zeigte sich, dass die Fluoreszenz der Farbstoff-Dextrane **43** und **44** nur unwesentlich langsamer gelöscht wurde, als die des TMR-MEQ-Dextrans **30**. In Abbildung 71 sind die Ergebnisse graphisch zusammengefasst. Genau, wie beim TMR-MEQ-Dextran **30** trat ein deutlicher Abfall der Fluoreszenzintensitäten auf. Während die Fluoreszenzintensität von TMR-MEQ-Dextran **30** auf ein sechstel der ursprünglichen Intensität abfiel, wurde die Fluoreszenzintensität von TMR-SPQ-Dextran **44** nur auf ein Drittel des Startwertes reduziert. Durch die geringen Änderungen der Fluoreszenzintensitäten, waren auch wesentlich schlechter Aussagen über Änderungen der Chloridkonzentrationen möglich.



**Abb. 71**: Abnahme der Fluoreszenzintensitäten von **30**, **43** und **44** nach Zugabe von Natriumgluconat (grau) und Natriumchlorid (schwarz).

Da TMR-NEQ-Dextran 43 und TMR-MEQ-Dextran 30 sich kaum unterscheiden, der synthetische Aufwand von TMR-MEQ-Dextran 30 aber wesentlich geringer ist, wird Polymer 30 auch für folgenden Untersuchungen als Chloridsonde eingesetzt. Dennoch wären Alternativen wünschenswert. Durch die Synthese weiterer Chinolinderivate könnte ein gefunden chloridsensitiver Farbstoff werden. dessen Fluoreszenz bei höheren Chloridkonzentrationen vollständig gequencht wird. Da die gewonnenen Daten zeigen, dass unterschiedliche Substitutenten an der Aminogruppe des Chinolins erhebliche Einflüsse auf das Quenchverhalten des Fluorophors haben, sollte an dieser Stelle auch weiter substituiert werden. So könnte durch das Einführen von elektronenschiebenden oder -ziehenden Gruppen in der Nähe der Aminogruppe die Affinität zu Chloridionen reguliert werden.

#### Ergebnisse und Diskussion

In diesem Projekt wurden Dextrane synthetisiert, die sowohl mit einem Chlorid-sensitiven Farbstoff als auch mit einem unsensitiven Farbstoff beladen waren. Als Chlorid-sensitiver Farbstoff wurde Methoxychinolin ausgewählt. Durch die Einführung einer Octansäure am Amin des Chinolingrundgerüsts, konnte dieser Farbstoff zusammen mit TAMRA auf dem zuvor synthetisierten AAE-Dextran immobilisiert werden. Das in diesem Projekt entwickelte AAE-Dextran wies verschieden Vorteile gegenüber kommerziell erhältlichen Aminodextranen auf. So war die Anzahl der Aminogruppen pro Dextran einstellbar und erstmalig ausreichend hohe Beladungen mit den unterschiedlichen Farbstoffen möglich. Da die Pyranringe während der Synthese intakt blieben, konnte die Stabilität von Dextran erhalten werden. Mit Hilfe der erzeugten TMR-MEQ-Polymere wurden Informationen über die Funktion von lysosomalen Chloridkanälen gewonnen. So zeigte sich, dass die Chloridkanäle auf Lysosomen nicht nur wichtig sind für die Bereitstellung von Gegenionen zu einer wachsenden Konzentration an lysosomalen Protonen, sondern als Chlorid-Protonen-Antiporter agieren. Ferner konnte gezeigt werden, das bei einer Störung dieser Funktion, schwere Stoffwechselerkrankungen die Folge sind.

## 3.4 Polymergestützte Inhibition der Clathrin-vermittelten Endozytose

### 3.4.1 Die Clathrin-vermittelte Endozytose

Um Nährstoffe ins Zellinnere zu transportieren, bedient sich die Zelle unterschiedlicher Mechanismen. Eine der wichtigsten Transportformen ist die Endozytose. Dabei unterscheidet man abhängig von dem zugrundeliegenden Mechanismus zwischen Phagozytose und Pinozytose.



Abb. 72: Vergleich der Endozytoseformen

Bei der Phagozytose werden große Partikel mit über 5 µm Länge aufgenommen. Dabei kann es sich um Zelltrümmer oder Bakterien handeln. Diese Form des Einverleibens findet nur in bestimmten Zellen, den Phagozyten, statt und dient in der Regel der Immunabwehr.<sup>[109]</sup> Im Verlauf dieses Prozesses werden spezielle Oberflächenrezeptoren auf der Zelloberfläche der Phagozyten aktiviert. Die Weiterleitung der Signale durch GTPasen führt zu Membranvorstülpungen, die extrazelluläre Partikel umschließen und so zur Aufnahme in die Zellen führen können.<sup>[110]</sup>

Kleinere Moleküle werden über Pinozytose aufgenommen. Dabei unterscheidet man Makropinozytose, Caveolae-vermittelte Endozytose, Clathrin-vermittelte Endozytose und Caveolae- beziehungsweise Clathrin-unabhängige Endozytose.<sup>[111]</sup> Ebenso wie bei der Phagozytose bildet bei der Makropinozytose das Aktinzytoskelett vermittelt durch GTPasen Ausstülpungen. Diese zerfallen allerdings wieder und fusionieren mit der Membran. Bei diesem Prozess bilden sich Vesikel, die Makropinosomen. Diese enthalten neben großen Mengen an extrazellulärer Flüssigkeit auch kleinere Moleküle aus dem Äußeren der Zelle.

Die Caveolae-vermittelte Endozytose stellt einen weiteren zellulären Aufnahmeweg dar. Caveolae bezeichnen kolbenförmige, Cholesterin- und Sphingolipid-reiche Einstülpungen in der Plasmamembran, die besonders häufig auf Endothelzellen vorkommen und hier dem transzellulären Transport von Nährstoffen dienen. In diesen 50-80 nm großen, flachen Membraninvaginationen sind verschiedene Rezeptoren und Transporter konzentriert.<sup>[112]</sup> Über komplexe Signalkaskaden wird in den Caveolae die zelluläre Aufnahme diverser Moleküle vermittelt, wie Sphingolipide, bakterielle Toxine (Choleratoxin) oder Viren (Echo Virus 1).<sup>[113-115]</sup>

Bei der in diesem Projekt untersuchten Clathrin-vermittelten Endozytose handelt es sich um den derzeit am besten verstandenen Mechanismus der zellulären Stoffaufnahme. Dabei bindet zunächst ein Frachtmolekül an einen spezifischen Rezeptor. Die Ligandenbindung löst eine Konformationsänderung des intrazellulären Rezeptor-Restes aus. Dadurch entstehen neue Interaktionsflächen, an denen sich Phosphatidyl(4,5)bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) anlagern kann. An diese Membranphospholipide können nun Adapterproteine (insbesondere der AP-2-Komplex) binden. Der AP-2-Komplex ist ein Heterotetramer, das seinerseits aus den 4 Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta 2$ ,  $\sigma$  und  $\mu 2$  aufgebaut ist. Durch die Bindung der  $\sigma$ - und  $\mu 2$ -Untereinheiten an die PIP2 und den Rezeptor kommt es zu einer positiven Feedbackschleife und es wird zusätzliches PIP<sub>2</sub> produziert. Diese Membranphospholipide binden ihrerseits an die Interaktionsflächen und rekrutieren neue AP-2-Komplexe. An die α- und β2-Ohrdomänen bindet nun Clathrin, ein dreiarmiges Gerüstprotein, das sich mit anderen Clathrineinheiten zusammenlagert. Diese akzessorischen Proteine sind notwendig, um die Wölbung der Membran zu induzieren und die Vesikel von außen zu stabilisieren. Sobald sich das Vesikel so weit geformt hat, dass es nur noch über einen dünnen Hals mit der Zellmembran verbunden ist, lagert sich um den Hals des Clathrinkäfigs das Mechanoenzym Dynamin an. Die vom Dynamin katalysierte GTP-Hydrolyse (Hydrolyse von Guanosintriphosphat zu Guanosindiphosphat) ändert die Konformation des Rings, was die finale Abschnürung des Vesikels von der Plasmamembran induziert. Damit das Vesikel mit Zellkompartimenten verschmelzen kann, wird zunächst der Clathrinmantel abgebaut. Durch die Hydrolyse des vom AP-2 gebundenen PIP<sub>2</sub> wird die Vesikelbindung dieses Clathrinadapters destabilisiert. Der Clathrinmantel wird durch katalytisch aktive ATPasen wie Hsc70 in die Clathrinmonomere zerlegt. Das befreite Vesikel fusioniert mit dem frühen Endosom und seine Fracht wird zum Lysosom transportiert oder in der Exozytose wieder aus der Zelle transportiert.[116]

104

## 3.4.2 Fragestellung und Ziele

Bei einer Reihe von Krankheiten spielt die Clathrin-vermittelte Endozytose eine wesentliche Rolle. So werden Hepatitis- und HI-Viren über Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen. Daher wäre eine Nutzung des Endozytose-Mechanismus als Therapieansatz von großer Bedeutung. Obwohl die Clathrin-vermittelte Endozytose heute mechanistisch gut verstanden ist, sind bislang keine potenten Inhibitoren für diesen Aufnahmeweg verfügbar. In vorhergehenden Studien hatte sich gezeigt, dass die Inhibition des für die Abschnürung der Vesikel essenziellen Dynamins ungeeignet war, da diese GTPase auch eine wesentliche Rolle bei der Bildung von Caveolae spielt und ein Inhibitor somit nicht spezifisch genug war. Der in diesem Projekt verfolgte Ansatz zielte darauf ab, die für die Ausbildung des Clathrinmantels notwendigen Protein-Protein-Interaktionen zu inhibieren. Es wurde eine Reihe von Proteinen identifiziert, die in der Lage sind, an die Ohrdomänen des AP-2-Komplexes zu binden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf Peptidsequenzen des EPS15-Proteins (epidermal growth factor receptor **p**athway **s**ubstrate clone **15**) und des Stonin2-Proteins gelegt (Tabelle 8).

Proteinname	aktive Peptidsequenz mit Bindungsmotiv	
Stonin2	GGNPKGWVTFEEEE-NH <sub>2</sub>	
EPS15	GGFQSDPFVGSDPFK-NH <sub>2</sub>	

**Tab. 8**: Peptidsequenzen, die mit den rot markierten Bindungsmotiven mit den  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ 2-Ohrdomänen des AP-2-Komplexes wechselwirken.

Die Arbeitsgruppe von Volker Haucke konnte zeigen, dass aktive Sequenzen aus diesen Proteinen in der Lage sind, durch ihre Bindung an die  $\alpha$ - und  $\beta$ 2-Ohrdomänen des AP-2-Komplexes diese gegen die Anbindung von Clathrin zu unterbinden. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Bindungsaffinitäten der Peptide deutlich zunahmen, wenn mehrere Bindungsmotive in einem Peptid enthalten waren.

In der AG Haucke wurde gezeigt, dass Stearinsäure-gekuppelte-EPS15 Peptide die Protein-Protein-Interaktion zwischen dem Clathrin und den Ohrdomänen des AP-2-Komplexes inhibieren können. Dabei dienten die Stearinamide an den N-Termini der EPS15-Peptide zur Vermittlung der zellulären Aufnahme. HeLa-S-Zellen wurden mit den Stearin-Peptiden für 30 Minuten inkubiert anschließend und gewaschen. Die Zellen wurden mit fluoreszenzmarkiertem Transferrin inkubiert. Transferrin ist ein Glycoprotein, das ausschließlich durch Bindung an den extrazellulären Transferrinrezeptor über Clathrinvermittelte Endozytose in Zellen aufgenommen werden kann. Die Fluoreszenzintensität des aufgenommenen Farbstoffes wurde als Maß für die erfolgte Aufnahme genommen. Dadurch war es möglich, die Inhibition der Clathrin-vermittelten Endozytose zu quantifizieren.

In diesem Assay zeigte sich außerdem, dass in gleichen Peptidkonzentrationen EPS15-Peptide mit 5 DPF-Motiven (Stearin-GGFQSDPFVGSDPFKDDPFGKIDPFGGDPFK-NH<sub>2</sub>) stärker inhibierend wirkten als EPS15-Peptide mit 2 DPF-Einheiten (Stearin-GGFQSDPFVGSDPFK-NH<sub>2</sub>). Je mehr DPF-Motive also vorhanden waren, desto stärker war die Inhibition der Transferrin-Aufnahme.

Aufgrund dieses beobachteten Effektes lag es nahe, die Peptide auf Polymere zu kuppeln, um unter Ausnutzung des Multivalenzeffektes mit einer geringeren Peptidkonzentration eine vollständige Inhibition der Clathrin-vermittelten Endozytose zu gewährleisten.



**Abb. 73**: Polymergestützte Inhibition der Clathrin-vermittelten Endozytose: Das EPS15-Dextran bindet an die  $\alpha$ - und ß2-Ohrdomänen des AP-2-Komplexes und inhibiert somit die Bindung von Clathrin. Somit kann sich keine Clathrinhülle ausbilden und die zelluläre Aufnahme des an den Rezeptor bindenden Proteins wird unterbunden.

### 3.4.3 Auswahl und Synthese der Peptide

Im vorherigen Kapitel wurde ausführlich auf den Mechanismus der Clathrin-vermittelten Endozytose eingegangen. Verschiedene Peptidsequenzen sollten nun auf ihre inhibitorischen Fähigkeiten untersucht werden. So wurden abgeleitet vom EPS15-Protein

#### Ergebnisse und Diskussion

Peptide mit zwei DPF-Motiven und abgeleitet vom Stonin2-Protein Peptide mit enthaltenem WxxF-Motiv synthetisiert. Außerdem wurden Peptide mit mutierten Bindungsmotiven hergestellt, um sie als Negativkontrolle in zellulären Assays einsetzen zu können. Um die Peptide auf Maleinimidodextran kuppeln zu können, mussten diese N-terminal mit einer Thiolgruppe versehen werden. Dafür wurden die Peptide wie vorher beschrieben an der festen Phase synthetisiert und ein Cystein N-terminal auf das Peptid am Harz gekuppelt. Die Abspaltung vom Harz erfolgte durch dreistündiges Schütteln in 95%iger TFA-Lösung und anschließender Fällung des Peptids in kaltem Diethylether. Die hergestellten Peptide sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

#	Name	Sequenz		
45a	short Eps15	$CGGFQS{DPFVGS}{DPFK-NH_2}$		
45b	short-Eps15-Mutante (mEPS15)	$CGGFQSRPLVGSRPLK-NH_2$		
46a	Stonin 2	CGGNPKGWVTFE-NH <sub>2</sub>		
46b	Stonin-2-Mutante (mStonin2)	CGGNPKGAVTAE-NH <sub>2</sub>		
47a	WADF	CPNNWADFSSTWP-NH <sub>2</sub>		
47b	WADF-Mutante (mWADF)	CPNNAADASSTWP-NH <sub>2</sub>		
Tab. 9: Synthetisierte Peptide				

## 3.4.4 Zelluläre Untersuchungen der Peptidpolymere

Analog zu den BH3(Fluo)-R<sub>9</sub>-Dextranen wurden die Peptide **45a-47b** (8µM) jeweils zusammen mit Fluorophor **9** (3 µM) und Dodecanthiol (8µM) auf Maleinimidodextran **22** (1 µM) gekuppelt. Da anstelle des wasserlöslichen Nonaarginins Dodecanthiol auf das Polymer gekuppelt wurde, erfolgte die Reaktion in einer Lösung aus Formamid und NMP. Die Verwendung dieser hydrophoben Ketten anstelle des vorher eingesetzten Nonaarginins hatte bereits in Vorversuchen zu guten Ergebnissen bezüglich der zellulären Aufnahme geführt. Da die hier eingesetzten Peptide ebenfalls Fettsäuregruppen trugen, sorgte dieses System außerdem für eine bessere Vergleichbarkeit. Die Beladungen der Dextrane mit Dodecangruppen wurden mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie ermittelt. Das Signal der Methylengruppen des Dodecanylrestes erschien bei 1.2 ppm. Das Integral über diesem Signal wurde mit dem über den C(1)HGruppen verglichen und so die Anzahl der Dodecangruppen pro Dextran ermittelt. Die Aminosäureanalysen gaben Aufschluss über die jeweiligen Peptidbeladungen der Polymere. Die synthetisierten Peptidpolymere sind in ihrer Zusammensetzung in Tabelle 10 aufgeführt.

#	Name	Sequenz
48a	Eps15-Dextran	4 EPS15, 1 Fluorophor und 2 Dodecaneinheiten
48b	mEps15-Dextran	4 mEPS15, 1 Fluorophor und 2 Dodecaneinheiten
49a	Stonin2-Dextran	4 Stonin2, 1 Fluorophor und 2 Dodecaneinheiten
49b	mStonin2-Dextran	4 mStonin2, 1 Fluorophor und 2 Dodecaneinheiten
50a	WADF-Dextran	4 WADF, 1 Fluorophor und 2 Dodecaneinheiten
50b	mWADF-Dextran	4 mWADF, 1 Fluorophor und 2 Dodecaneinheiten

Tab. 10: Synthetisierte Peptidpolymere zur Inhibition von Clathrin-vermittelter Endozytose

Diese Konjugate wurden auf ihre Zellgängigkeit und Zytotoxizität getestet. Dazu wurden die Peptidpolymere in HEPES-Puffer gelöst und mit HeLa-S-Zellen 30 Minuten inkubiert. Analog zu den Untersuchungen in den Kapiteln 3.1 und 3.2 konnte mittels konfokaler Mikroskopie gezeigt werden, dass die Peptidpolymere zellgängig und nicht toxisch waren.



**Abb. 74**: Zelluläre Aufnahme des Konjugates **50a** als exemplarisches Beispiel für die Endozytose-inhibierenden Dextrane

In ersten Untersuchungen wurden die EPS15-Dextrane **48a**, **b** mit HeLa-S Zellen für 30 Minuten inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen wurde die Transferrin-Aufnahme als Maß der Clathrin-vermittelten Endozytose untersucht. Es zeigte sich, dass die zelluläre Aufnahme von Transferrin durch das EPS15-Polymer **48a** nur sehr schwach inhibiert werden konnte obwohl das Peptidpolymer gut in die Zellen aufgenommen wurde. Das mEPS15-Dextran **48b** zeigte erwartungsgemäß keine Inhibition. Dagegen zeigten Zellen, die mit dem EPS15 Peptid behandelt wurden eine deutliche Abnahme der intrazellulären Transferrin-Konzentration.



**Abb. 75**: Transferrin-Aufnahme in HeLa-S Zellen nach der Inkubation mit EPS15-Dextran und EPS15-Peptid.

Ein möglicher Grund für die geringe Aktivität könnte eine schlechte Erreichbarkeit der Bindungsdomänen durch die polymergebundenen Peptide sein. Durch längere Linker zwischen den Peptiden und dem Dextran sollte dann eine Aktivitätssteigerung erfolgen. Des Weiteren ist die Affinität von EPS15 zur  $\beta$ -Ohrdomäne relativ gering. In vitro Studien zeigten, dass EPS15 einen K<sub>D</sub>-Wert von 120 µM für die Bindung an die  $\beta$ -Ohrdomäne aufweist. Für die Bindung mit der  $\alpha$ -Ohrdomäne weist das Stonin-2 Peptid dagegen einen K<sub>D</sub>-Wert von 10 µM beziehungsweise das WADF-Peptid einen K<sub>D</sub>-Wert von 2.5 µM auf.<sup>[117]</sup> Diese deutlich höhere Affinität könnte möglicherweise dazu führen, dass auch die Peptidpolymere effizient an die  $\alpha$ -Ohrdomäne binden. Daher müssen auch die Stonin-2- und die WADF-Dextrane in zellulären Assays untersucht werden. Diese Arbeiten werden momentan in der AG Haucke durchgeführt.

In diesem Projekt wurde die Inhibition der Clathrin-vermittelte Endozytose untersucht. Dazu wurden abgeleitet von Proteinen die an die α- und β-Ohrdomänen des AP-2 Komplexes binden, Peptide synthetisiert und auf Maleinimidodextran immobilisiert. Die Polymere wurden zusätzlich mit Dodecanylgruppen belegt, um die Zellgängigkeit zu erhöhen. In zellulären Tests zeigte sich, dass diese Polymere zellgängig und in den eingesetzten Konzentrationen nicht toxisch waren. Beim Vergleich vom EPS15-Dextranen und Stearin-EPS15 Peptiden in HeLa-S Zellen konnten die freien Peptide wesentlich stärker die Aufnahme von Transferrin hemmen als die Peptidpolymere in gleicher Peptidkonzentration. In weitern Untersuchungen müssen auch die Stonin-2- und WADF-Dextrane auf ihr Vermögen hin getestet werden die Clathrin-vermittelte Endozytose zu inhibieren.

Ergebnisse und Diskussion

## 4 Fazit

Das Ziel dieser Arbeit war es ein biokompatibles Polymer parallel mit unterschiedlichen Peptiden zu verknüpfen, dieses in lebende Zellen zu transportieren und dort spezifisch Protein-Protein-Wechselwirkungen zu modulieren. Aufgrund seiner guten biologischen Verträglichkeit wurde Dextran als polymerer Träger ausgewählt. In einer Michael-Addition wurde Acrylamid mit diesem Polysaccharid zu Carboxyethyldextran. Ausgehend von den Carbonsäuregruppen konnten in einem modularen System verschiedene reaktive Gruppen auf dem Polymer immobilisiert werden. Dadurch war eine auf die Anforderungen des jeweiligen Projektes maßgeschneiderte Synthese der Dextrane möglich. So wurden in der vorliegenden Arbeit Dextrane mit einer unterschiedlichen Anzahl an Amino-, Thioester- oder Maleinimidgruppen synthetisiert. Diese Polymere wurden dann für die unterschiedlichen Projekte eingesetzt.

In dem Projekt der polymerunterstützen Induktion von Apoptose durch BH3-Peptide wurden die Thioester und die Maleinimidodextrane erfolgreich eingesetzt, um unterschiedliche Cysteinylpeptide über native chemische Ligation oder Maleinimid-Thiol-Kupplung mit dem Polymer zu verknüpfen. Durch die unterschiedlich hohe Funktionalisierung der Dextrane konnte die Beladung mit biologisch aktiven Peptiden variiert werden und es war möglich große Peptidkonzentrationen effektiv an intrazelluläre Wirkorte zu transportieren. Als zellpentrierendes Peptid wurde in dieser Arbeit Nonaarginin eingesetzt. Nur 1-2 Gruppen dieses in hohen Konzentrationen zytotoxischen Peptides waren nötig, um ein Polymer mit Wirkpeptiden in unterschiedlicher Anzahl, in die Zellen zu transportieren. Durch den relativen geringen Einsatz dieser CPPs, konnten Peptide in wesentlich höheren Konzentrationen zu den entsprechenden Wirkorten transportiert werden, als es bei der direkten Verknüpfung von CPP mit dem biologisch aktiven Peptid möglich gewesen wäre. Ein weiterer Vorteil des in dieser Arbeit entwickelten Systems war, dass Dextran einerseits eine sehr hohe biologische Verträglichkeit aufweist, andererseits aber nur sehr langsam im Organismus abgebaut wird. Diese Eigenschaft konnte hier in vielerlei Hinsicht genutzt werden. Zum Einen konnte gezeigt werden, dass die freien BH3-Peptide im Zytosol wesentlich schneller proteolytisch abgebaut wurden als identische Peptide in polymergebundener Form. Durch diesen Effekt waren polymergebundene Peptide auch länger im Zytosol aktiv und somit deutlich wirkungsvoller als ihre freien Analoga.

Zum Anderen bot er Einsatz des stabilen Rückgrates aber die Möglichkeit, Untersuchungen bezüglich des Multivalenzeffektes durchzuführen. So zeigte sich zunächst, dass die BH3-

111

Peptidpolymere wesentlich effizienter Apoptose induzieren konnten als die freien Peptide bei gleicher Peptidkonzentration. Dieser Effekt für sich alleine hätte mit der soeben erwähnten zytosolischen Stabilität erklärt werden können. Der direkte Vergleich von Dextranen mit unterschiedlich hoher Beladung an BH3-Peptid stützte aber die theoretischen Annahmen zum Multivalenzeffekt. So konnten gezeigt werden, dass bei gleicher Peptidkonzentration Dextrane mit fünf gebundenen BH3-Peptiden um ein Vielfaches wirkungsvoller Apoptose induzieren konnten, als die analogen Polymere mit nur immobilisierten zwei BH3-Gruppen.



Die gewonnenen Ergebnisse könnten helfen die Apoptose in Krebszellen zu induzieren. Für eine therapeutische Anwendung müßte jedoch die selektive Adressierung von Tumorzellen gewährleistet sein. Das könnte durch den Einsatz zusätzlich immobilisierter Targetpeptide auf den Polymeren gewährleistet werden. Solche Peptide, die spezifisch an Erkennungsmotive auf Tumorzellen binden sind jedoch bislang nicht verfügbar.

In dem Projekt zur Untersuchung des Einflusses von Nonaarginindextran auf die Wirksamkeit von Taxol wurde pentavalentens Nonarginindextran synthetisiert und seine Cytotoxizität auf HeLa-S Zellen getestet. Da bei einer Konzentration von 10 µM keine toxischen Effekte beobachtbar waren, wurde dieses Polymer mit Ovcar-3 Zellen inkubiert. Bereits ohne den Zusatz von Paclitaxel konnte eine Wachstumsinhibition dieser

Eierstockkrebszellen nachgewiesen werden. Dieser Effekt verstärkte sich beim Zusammenspiel von Paclitaxel mit dem Nonaarginindextran.



In weiteren biologischen Tests wird momentan die Toxizität des Polymers auf gesunden Zellen untersucht. Sollte sich zeigen, dass in Polymerkonzentrationen bei denen gesunde Zellen vital bleiben, die Tumorzellen aufgrund ihres erhöhten Stoffwechsels absterben, könnte dieses Polymer im Zusammenspiel mit Taxol therapeutisch relevant werden.

Das Projekt der Chlorid-sensitiven Dextrane hatte zum Ziel, die Änderung der Chloridkonzentrationen in Lysosomen zu detektieren. Dafür wurden parallel chloridsensitive und -insensitive Farbstoffe mit dem Polymer verknüpft. Ausgehend von CED wurde ein Aminodextran synthetisiert. Im Gegensatz zu den kommerziell erhältlichen Aminodextranen, die meistens nur eine geringe Anzahl an Aminogruppen tragen, war dieses Polymer beliebig hoch mit Aminogruppen beladbar. Ein weiterer Vorteil dieses Polymer war, der Erhalt der zyklischen Acetalstruktur der Glucoseeinheiten. Dadurch war dieses Polymer auch wesentlich stabiler. Aufgrund der hohen Beladbarkeit konnten in diesem Projekt ausreichend viele Rhodamin- und Methoxychinolingruppen auf dem Polymer immobilisiert werden.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten Chloridsonde konnten waren Untersuchungen der lysosomalen Chloridkonzentrationen möglich. So konnte gezeigt werden, dass die Chloridkanäle auf den Lysosomen nicht nur als reine Chloridpumpen zu sehen sind, sondern als Chlorid-Protonen Antiporter agieren. Warum sie diese Aufgabe erfüllen, ist bislang noch unklar und wird zur Zeit untersucht.

#### Schlussfolgerungen und Ausblick



Zur exakten Bestimmung der Chloridkonzentrationen in Zellen wäre ein alternatives Chloridsensitives Fluorophor wünschenswert, da die Fluoreszenz von MEQ schon bei Chloridkonzentrationen um 20 µM erheblich gequencht wurde. Auch die in dieser Arbeit synthetisierten Fluorophore NEQ und SPQ zeigten diesbezüglich keine Verbesserung. Um einen geeigneteren Farbstoff zu finden, sollten daher zukünftig weitere Chinolinderivate synthetisiert werden und ihr Quenchverhalten in Anwesenheit von Chloridionen untersucht werden.

In dem Projekt zur Inhibition der Clathrin-vermittelten Endozytose wurden von den Proteinen Stonin-2 und EPS15 abgeleitete Peptide synthetisiert und auf Maleinimidodextran gekuppelt. Diese Peptide sollten genau, wie die entsprechenden Proteine an die α- beziehungsweise β-Ohrdomänen des AP-2-Komplexes binden und so die Clathrin-vermittelte Endozytose hemmen. In ersten biologischen Untersuchungen zeigte sich, dass das freie EPS15-Peptid wesentlich effizienter die Anbindung von Clathrin an die Ohrdomänen hemmen konnten, als das Polymergebundene. Ein möglicher Grund hierfür könnte die schlechte Erreichbarkeit der Ohrdomänen sein. Der Einbau von längeren Spacern zwischen Polymer und Peptiden könnte in diesem Fall zu einer Aktivitätssteigerung des EPS15-Dextrans führen. Die biologische Untersuchung des WADF-und des Stonin-2-Dextrans wird momentan in der AG Haucke durchgeführt. Da diese Peptide eine deutlich höhere Bindungsaffinität zur α-Ohrdomäne besitzen als EPS15, könnten die Peptidpolymere **49a** und **50a** wesentlich effizienter die Clathrin-vermittelten Endozytose inhibieren als das EPS15-Dextran.

# **5 Experimenteller Teil**

## 5.1 Chemikalien

Alle Chemikalien, sofern nicht anders angegeben wurden von Sigma Aldrich (Weinheim) und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Weitere Chemikalien und Reagentien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Aminosäuren	Iris	Biotech	GmbH	(Marktredw	itz), Novabiochem	
	(Dar	mstadt)				
Peptidharze	Nova	abiochem	(Darmsta	dt), Rapp Po	lymere (Tübingen)	
PD-10 Säulen	Phar	macia (Up	psala, Sc	hweden)		
Fluorophore	5(6)-	Carboxyte	tramethyl	rhodamin-	O-succinimidylester	
	(Invit	trogen, Da	rmstadt),			
AnnexinV Assay Kit	Invitr	ogen (Kar	lsruhe)			
AMAXA Cell Line Nucleofector Kit		Lonza (Köln)				

## 5.2 Geräte

NMR	Bruker AVANCE <sup>™</sup> 300 MHz spectrometer						
UV-Vis	JASCO V-550 UV/Vis spectrometer (JASCO GmbH, Groß-						
	Umstadt)						
Mikroskope	LSM-510 ConfoCor 2, LSM-710 ConfoCor 3 (Carl Zeiss						
	MicroImaging GmbH, Jena						
Elektroporatorationsgeräte	AMAXA <sup>®</sup> Nucleofector <sup>®</sup> (Lonza, Köln), GenePulser Xcell						
	Electroporation System (BioRad Laboratoies München)						
Durchflusszytometer	FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg)						
Aminosäureanalyse	Durchgeführt von der Firma Genaxxon Bioscience GmbH (Ulm),						
	Analysengerät: Aminosäurenanalysator LC3000,						
	Chromatographie-Software: ChromStar 6.0						
Gel-Permations-							
Chromatogrphie-Anlage	PSS SECcurity GPC-System (PSS Polymer Standards Service						
	GmbH, Mainz, Germany), Säule 1:PSS Suprema VS, Säule 2						
	PSS Suprema 1000 Å, Eluent 0.05 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 7ACN 80/20,						
	Software PSS WinGPC Unity						

Liquid Chromatography-

Mass Spectrometry (LC/MS) Agilent 1100 System mit Dioden Array Detektor (DAD) und ESI-MS Sinlge Quadropol-Spektrometer, Laufmittel A: Wasser, B: Acetonitril + 0.1% Armeisensäure oder C: Methanol + 0.1% Phase Säule (C-18 Säule, Armeisensäure. Reverse Partikelgröße, 3 µm 2x30 mm ), Gradient: 5-99 % A-B in 3.5 min, Wellenlängen: 450 nm, 220 nm, 254 nm, Software Chem Station B.01.03 HPLC-Anlage Agilent 1100 Series preparative HPLC, Reverse Phase Säule (C-18 Säule, 100 Å Porengröße, Partikelgröße 7 µm, 21x250 mm, Macherey-Nagel Nucleodur®), Gradient: 5-99 % A-B in 22 min

High Resolution Mass

Spektrometry (HR-MS-TOF) Agilent Accurate-Mass 6220 TOF LC/MS Station mit Dioden Array-Detektor und 1200 series LC, ZORBAX Eclipse Säule XDB C-18 Rapid Resolution HT 50xx4.6 mm, Partikelgröße^^ 1.8 μm

## 5.3 Synthesen

## Carboxymethyldextran (1)<sup>[65]</sup>



Dextran (Mw: 10 kDa, 5 g, 0.5 mmol) wird in Natronlauge (50 ml, 1 M) gelöst. Bromessigsäure (1.39 g, 10 mmol) wird der Lösung zugesetzt. Die Lösung wird über Nacht gerührt und anschließend mit HCI neutralisiert. Die Lösung wird gegen Salzsäure (0.1 M) und 24 h gegen Wasser dialysiert. Nach Lyophilisation entsteht ein weißer Feststoff (4.66 g, 88 %), der bei 4 °C gelagert wird.

<sup>1</sup>**H NMR** (D<sub>2</sub>O, 300 MHz):  $\delta$  = 3.37-4.05 (m, C(2-6)H-Glukoseeinheiten), 4.29-4.59 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>COO), 4.95 (d, J = 3.5 Hz, C(1)*H* unsubstituiert), 5.17 (d, J = 3.2 Hz, C(1)H substituiert) ppm;

<sup>13</sup>**C NMR** (D<sub>2</sub>O, 75 MHz): δ = 65.05 (*C*(6) Glukoseeinheiten), (69.05 (*C*H<sub>2</sub>COOH), 69.70 (*C*(4)Glukoseeinheiten), 70.91 (*C*(5) Glukoseeinheiten), 72.93 (*C*(3) Glukoseeinheiten), 79.30 (*C*(2) Glukoseeinheiten), 97.21 (*C*(1) Glukoseeinheiten), 177.28 (*C*OOH) ppm.

## Carboxyethyldextran (2)<sup>[70]</sup>



Dextran (5 g, 0.5 mmol) wird in Natronlauge (50 ml, 1 M) gelöst. Acrylamid (0.898 g, 12.5 mmol) wird der Lösung zugesetzt und bei 30 °C 16 h gerührt. Die Lösung wird auf 50 °C erwärmt und weitere 20 h gerührt. Die Lösung wird mit in Methanol (300 ml) gefällt, der Rückstand erneut in Wasser (50 ml) gelöst und mit Methanol abermals gefällt. Nach erneutem Lösen des Rückstandes in Wasser, wird die Lösung gegen HCI-Lösung (0.1 M) anschließend. gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die Lösung wird lyophilisiert und das weiße Produkt bei 4 °C gelagert wird. (Ausbeute: 4 g, 72 %, 13 Carboxyethyleinheiten pro Polymer)

<sup>1</sup>**H-NMR** (D<sub>2</sub>O, 300 MHz):  $\delta$  = 2.59 (t, 2 H, CH<sub>2</sub>COOH), 3.25-4.1 (m, C(2-6)H Glukoseeinheiten, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 4.87 (s, C(1)H unsubst.), 5.04 (s, C(1)H subst.) ppm;

<sup>13</sup>**C-NMR** (D<sub>2</sub>O, 75 MHz): δ = 34.20 (CH<sub>2</sub>COOH), 65.03 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH), 69.03 (C(6) Glukoseeinheiten), 69.67 (C(2) Glukoseeinheiten), 70.89 (C(4) Glukoseeinheiten), 72.89(C(3) Glukoseeinheiten), 97.18 (C(1) Glukoseeinheiten, 175.39 (CH<sub>2</sub>COOH) ppm;

## Tert-Butyl-oxycarbonylamino-thioessigsäure-S-ethylester (3a)<sup>[72]</sup>



*N*-Boc-Glycin (24.779 g, 141.448 mmol) und Carbonyldiimidazol (CDI) (25 g, 154.178 mmol) werden in trockenem THF (125 ml) unter Stickstoffatmosphäre gelöst und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Ethanthiol (31.386 ml, 424.344 mmol) wird der Lösung zugesetzt und über Nacht gerührt. Die Lösung wird mit Natronlauge (250 ml, 4 M) versetzt und das Produkt zügig mit Dichlormethan (3x150 ml) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen. Der Rückstand wird erneut in etwas Ethylacetat gelöst und mit Ethylacetat als Laufmittel über Kieselgel (100 ml) filtriert. Nach Einengen der organischen Phase erhält man das Produkt in Form eines gelben Öls (Ausbeute: 23.1 g, 75 %).

<sup>1</sup>**H NMR** (D<sub>2</sub>O, 300 MHz): δ= 1.23 (t, 3 H, *J* = 7.2 Hz, SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.44 (s, 9 H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.89 (q, 2 H, *J* = 7.2, SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.00 (s, 2 H, NHCH<sub>2</sub>COSEt), 5.19 (br s NHBoc) ppm;

<sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 75 MHz): 14.03 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 22.47 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 27.80 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)), 49.86 (CH<sub>2</sub>NHBoc), 79.76 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 155.04 (NHCOOC), 197.82 (COSEt) ppm;

**HR-ESI-MS** berechnet für C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>S: M+H = 220.1002 g/mol, gefunden: M+H = 220.1004 g/mol;

## Tert-Butyl-oxycarbonylamino-thioessigsäure-S-phenylester (3b)



*N*-Boc-Glycin (1 g, 5.708 mmol) wird in DCM (50 ml) gelöst und auf 0 °C gekühlt. HOBt (0.977 g, 5.708 mmol), EDC (1.094 g, 5.705 mmol) und DiPEA (1.989 ml, 11.416 mmol) werden nacheinander der Lösung zugesetzt und für 10 min gerührt. Anschließend werden Thiophenol (2.931 ml, 28.542 mmol) in die Lösung gegeben, für 2 h bei 0 °C gerührt und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 1 molarer HCI (2x 50 ml), 10 %iger Natriumcarbonatlösung (2x 50 ml) und Wasser (1x 50 ml) gewaschen und über

Magnesiumsulfat getrocknet. Das entstehende gelbe Öl wird in etwas DCM gelöst und mit Hexan ausgefällt. Nach dem Einengen der Lösung erhält man ein gelbes Öl (0.53 g, 34.7 %).

<sup>1</sup>**H NMR** (D<sub>2</sub>O, 300 MHz): δ= 1.47 (s, 9 H, OC(C*H*<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 4.13 (s, 2 H, NHC*H*<sub>2</sub>COS), 5.12 (br s N*H*Boc), 7.3-7.41 (m, 5 H, H-Phenyl) ppm;

<sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 75 MHz): 27.84 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)), 49.79 (CH<sub>2</sub>NHBoc), 80.03 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 126.16 (SC arom.), 128.84 (SCHCHCHCH arom.), 129.14 (SCHCHCH arom.), 134,25 (SCH arom.)
155.00 (NHCOOC), 196.05 (COSEt) ppm;

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{13}H_{17}NO_3S$ : [M+H]= 268.1002 g/mol, gefunden: [M+H] = 268.1003 g/mol;

## 2-Aminothioessigsäure-S-ethylester (4a)<sup>[71]</sup>



*Tert*-Butyl-oxycarbonylamino-thioessigsäure-*S*-ethylester **3a** (0.55 g, 2.508 mmol) wird in HCl in Dioxan (0.5 ml, 4 M) 1.5 h gerührt. Anschließend wird die Lösung eingeengt und mit kaltem, trockenem Ether das Produkt ausgefällt. Der farblose Niederschlag wird abfiltriert und mit Diethylether gewaschen (Ausbeute: 0.3 g, 77 %).

<sup>1</sup>**H-NMR** (D<sub>2</sub>O, 300MHz): δ = 1.22 (t, 3 H, *J* = 7.4 Hz, SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.98 (q, 2 H, *J* = 7.4 Hz, SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.11 (s, 2H, CH<sub>2</sub>COSEt) ppm;

<sup>13</sup>**C-NMR** (D<sub>2</sub>O, 75 MHz): δ = 13.3 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 23.08 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 46.63 (CH<sub>2</sub>COSEt), 194.92 (COSEt) ppm;

**HR-ESI-MS** berechnet für C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>NOS: [M+H] = 120.0478 g/mol, gefunden: [M+H] = 120.0476 g/mol;

## 2-Aminothioessigsäure-S-phenylester (4b)



*Tert*-Butyl-oxycarbonylamino-thioessigsäure-*S*-phenylester **3b** (2.848 g, 10.653 mmol) wird in HCl in Dioxan (0.5 ml, 4 M) 1.5 h gerührt. Anschließend wird die Lösung eingeengt und mit kaltem, trockenem Ether das Produkt ausgefällt. Der farblose Niederschlag wird abfiltriert und mit Diethylether gewaschen (Ausbeute: 1.570 g, 72.4 %).

<sup>1</sup>**H NMR** (D<sub>2</sub>O, 300 MHz): δ = 4.29 (s, 2 H, H<sub>3</sub>NC*H*<sub>2</sub>CO), 7.56 (m, 5 H, *H*-Ar) ppm;

<sup>13</sup>**C NMR** (D<sub>2</sub>O, 300 MHz): δ = 46.46 (H<sub>3</sub>NCH<sub>2</sub>), 123.8 (S-C-CH), 128.84 (para-CH), 130.38 (m-CH), 134.49 (o-CH), 194.71 (COSAr) ppm;

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{13}H_{17}NO_3S$ : [M+H] = 168.0478 g/mol, gefunden [M+1] = 168.0478 g/mol;

## S-Ethyl-thiocarbonylmethylamidoethyldextran (5a)



Carboxyethyldextran (200 mg, 0.019 mmol) und Glycinthioethylester **4a** (231 mg, 1.487 mmol) **4a** werden in 1 ml Wasser gelöst und ein pH-Wert von 5.5-6.5 mittels Natriumcarbonatlösung eingestellt. Anschließend wird EDC (143 mg, 0.744 mmol) zugesetzt. Nach 1 h wird erneut EDC (143 mg, 0.744 mmol) der Lösung zugesetzt und 4 h gerührt. Der

Niederschlag wird abfiltriert und das Filtrat mit Methanol gefällt. Das Präzipitat wird mit Methanol und DMF gewaschen, in 2.5 ml Wasser gelöst und über eine PD-10 Säule filtriert. Nach Lyophilisation erhält man ein weißen Feststoff (0.186 g, 77%).

<sup>1</sup>**H-NMR** (D<sub>2</sub>O, 300 MHz):  $\delta = 1.17$  (t, 3 H, J = 7.4, SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.59 (t, 2 H, J = 5.4, CH<sub>2</sub>CONH), 2.86 (q, 2 H, J = 7.4, SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.3-4.1 (m, C(2-6)H Glukoseeinheiten, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 4.92 (s, C(1)H unsubstituiert), 5.09 (s, C(1)H subst. an C(2)), 5.26 (s C(1)H subst. an C(3)) ppm;

<sup>13</sup>**C-NMR** (D<sub>2</sub>O, 75 MHz):  $\delta$  = 13.32 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 22.50 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 35.49 (CH<sub>2</sub>CONH), 48.70 (NHCH<sub>2</sub>CO), 59.95 (*C*(6)), 64.97 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 68.98 (*C*(5)), 69.64 (*C*(3)), 70.87 (*C*(2)), 72.87 (*C*(4)), 97.16 (*C*(1)), 174.14 (CONHCH<sub>2</sub>), 200.97 (COSEt) ppm;

## S-Phenyl-thiocarbonylmethylamidoethyldextran (5b)



Die Synthese erfolgt analog zu 5a. Ausbeute: 51 %

<sup>1</sup>**H-NMR** (D<sub>2</sub>O, 300 MHz):  $\delta$  = 2.49 (t, 2 H, *J* = 4.89 Hz, CH<sub>2</sub>CONH), 3.3-4.1 (m, C(2-6)*H* Glukoseeinheiten, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 4.95 (s, C(1)H unsubstituiert), 5.16 (s, C(1)H subst. an C(2)), 5.32 (s C(1)H subst. an C(3)), 7.45-7.7 (m, 5 H, S-Phenyl) ppm;

<sup>13</sup>**C-NMR** (D<sub>2</sub>O, 75 MHz):  $\delta$  = 35.52 (CH<sub>2</sub>CONH), 48.75 (NHCH<sub>2</sub>CO), 60.15 (C(6)), 63.78 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 66.23 (C(5)), 70.56 (C(3)), 71.97 (C(2)), 73.77 (C(4)), 95.38 (C(1)), 120.82, (SCH arom.), 128.61 (SCHCHCHCH arom.), 131.29 (SCHCHCH arom.), 134.36 (SCHCH arom.), 170.52 (CONHCH<sub>2</sub>), 202.23 (COSEt) ppm;

## Di-O-pivaloyI-5(6)-aminofluorescein (6)<sup>[73]</sup>



Zu einer Lösung aus 5,6-Aminofluorescein (1 g, 2.88 mmol) in DMF (125 ml) werden Cäsiumcarbonat (0.938 g, 2.88 mmol) gegeben und die Lösung auf 0 °C abgekühlt. Pivaloylanhydrid (146 ml, 7.2 mmol) wird langsam zugetropft und die Lösung anschließend noch 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Cäsiumcarbonat wird abfiltriert und das Lösungsmittel eingeengt. Der Rückstand wird in Ethylacetat gelöst und jeweils mit Wasser und Brine gewaschen. Die organische Phase wird absepariert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird abgezogen, der Rückstand wird auf Kieselgel gezogen und mittel Kieselgelchromatographie (Hexan:Ethylacetat 2:1) gereinigt. Man erhält einen gelben Feststoff (Ausbeute: 1.48 g, 99 %).

<sup>1</sup>**H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1.36$  (s, 18 H, CH<sub>3</sub> *t*Bu), 6.2 (s, 2 H, C(2)*H*, C(7)*H*), 6.78 (d, 1 H, J = 8.5 Hz, C(6)*H*), 6.95 (d, 2 H, J = 8.5 Hz, C(1)*H*, C(8)*H*)), 7.01 (s, 1 H, C(5)*H*), 7.53 (d, 2 H, J = 8.5 Hz, C(4)*H*, C(7)*H*), 7.75 (d, 1 H, J = 8.5 Hz, I C(3)H) ppm;

<sup>13</sup>**C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 27.06 (CH<sub>3</sub> *t*Bu), 39.18 (C tert. *t*Bu), 80.22 (C(9)H), 107.46 (C(3)H), 110.07 ((C(4)H), (C(5)H), 114.95 (C(8a), C(9a)), 116.88 (C(2)H, C(7)H), 117.57 (C(5)H), 126.8 (C(6)H), 128.97 (C(2)H), 129.44 (C(1)H, C(8)H), 143.18 (C(1')H), 147.17 (C(4')H), 151.31 (C(4a), C(10a)), 152.33 (C(3), C(6)), 172.49 (CO. Lacton), 176.2 (CO. Pivaloyl) ppm;

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{30}H_{29}NO_7$ : [M+H] = 516.2017 g/mol, gefunden [M+H] = 516.2020 g/mol;

N-Boc-Cysteinyl(S-trityl)-(di-O-pivaloyl)fluoresceinamid (7)



Di-O-pivaloyl-5(6)-aminofluorescein **6** (515 mg, 1 mmol) , *N*-Boc Cystein (1.158 g, 2.5 mmol) und HOBt (338 mg, 2.5 mmol) werden in trockenem Dichlormethan gelöst. Eine Lösung aus DCC (516 mg, 2.5 mmol) in Dichlormethan wird der Lösung bei 0 °C zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert und das Filtrat eingeengt. Das Rohprodukt wird mittels Kieselgelchromatographie (Hexan: Ethylacetat 2:1) gereinigt. Man erhält einen gelben Feststoff (Ausbeute: 0.85 g, 91 %).

<sup>1</sup>**H NMR** (300 MHz, MeOD):  $\delta$  = 1.35 (s, 18 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (Pivaloylgruppe)), 1.42 (s, 9 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (NHBoc)), 3.02-3.20 (m, 2 H, C(2<sup>''</sup>)H<sub>2</sub>SH), 4.43 (m, 1 H, C(1<sup>''</sup>)HNHBoc), 6.83-7.40 (m, 25 H (arom. Gruppen)) ppm;

<sup>13</sup>**C NMR** (75 MHz, MeOD):  $\delta$  = 29.51 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 30.03 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Boc) 33.68 (C(2΄)H), 57.75 (C(1΄)H), 66.92 (C(1΄΄)), 78.01 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Pivaloyl), 87.67 (C(9a)), 98.79 (C(4)H, C(5)H)), 102.13 (C(9a), C(8a)), 109.91 (C(2)H, C(7)H)), 118.22 (C(3΄)H), 124.22 (C(6΄)H), 126.49 (C(5΄)H), 126.83 (C(4΄΄΄)H), 128.13 (C(1)H, C(8)H)), 128.48 (C(3΄΄΄), C(5΄΄΄)), 131.31 (C(2΄΄), C(6΄΄΄)), 138.08 (C(4΄)), 146.12 (C(1΄΄΄), 152.64 (C(4a), C(10a)), 163.74 (CO (Boc)), 177.57 (C(3), C(6)), 172.36 (CO Lacton);

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{57}H_{56}N_2O_{10}S$ : [M+H] = 961.3728 g/mol, gefunden [M+H] = 961.3730 g/mol;

#### **Experimenteller Teil**

### Cysteinylfluoresceinamid (8)



Zu *N*-Boc-Cysteinyl(*S*-trityl)-(di-*O*-pivaloyl)fluoresceinamid **7** (55 mg, 0.057 mmol) wird eine Lösung aus TFA, Wasser und Triisopropylsilan (3 ml, 95:2.5:2.5 v:v:v) gegeben und 1 h bei 60 °C gerührt. Anschließend wird die Lösung evaporiert und der Rückstand in 5 ml Methanol gelöst. Natriummethanolat-Lösung (2.869 ml 1 M) wird der Lösung zugesetzt und für 1 h gerührt. Nach 30 min wird Ionenaustauscherharz (H-Form) zugesetzt und 15 min gerührt. Nach Evaporation erhält man einen gelben Feststoff. Nach einer Kieselgelchromatographie (Laufmittel: DCM/EtOH/AcOH 4:3:1, v,v,v) erhält man reines Produkt als gelben Feststoff (Ausbeute 0.02 g, 78 %).

<sup>1</sup>**H NMR** (300 MHz, MeOD):  $\delta$  = 3.04-3.24 (m, 2 H, C(2')*H*<sub>2</sub>SH), 3.76 (s, 2 H, C(1')*H*NH<sub>2</sub>), 6.62 (s, 2 H, C(4)*H*, C(5)*H*), 6.75 (d, 2 H, C(2)*H*, C(7)*H*), 7.07-7.28 (m, 3 H, C(1)*H*, C(8)*H*, C(1')H), 7.78 (s, 1 H, C(6')*H*), 8.42 (s, 1 H, C(2')*H*) ppm;

<sup>13</sup>**C NMR** (75 MHz, MeOD):  $\delta$  =) 31.24 (*C*(2<sup>'</sup>)H), 56.98 (*C*(1<sup>''</sup>)H), 86.74 (*C*(9a)), 98.79 (*C*(4)H, *C*(5)H)), 102.16 (*C*(9a), *C*(8a)), 10.11 (*C*(2)H, *C*(7)H)), 115.06 (*C*(3<sup>'</sup>)H), 118.14 (*C*(6<sup>'</sup>)H), 125.18 (*C*(5<sup>'</sup>)H), 125.23 (*C*(1)H, *C*(8)H)), 138.08 (*C*(1<sup>'</sup>)H), 138.16 (*C*(4<sup>'</sup>)), 152.94 (*C*(4a), *C*(10a)), 166.28 (*C*O (Boc)), 177.57 (*C*(3), *C*(6)), 174.84 (*C*O Lacton);

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{23}H_{18}N_2O_6S$  [M+H] = 451.0958 g/mol, gefunden [M+H] = 451.0963 g/mol;





Rinkamidharz (0.5 g, 0.31 mmol) wird mit 20 %iger Piperidinlösung in DMF entschützt und mit DMF gewaschen. Fmoc-Lysin(Dde) (0.826 g, 1.55 mmol), HOBt (0.237 g, 1.550 mmol) und DIC (0.24 ml, 1.55 mmol) werden in DMF (2.5 ml) gelöst und mit dem Harz für 3 h geschüttelt. Die Lösung wird abgesaugt, das Harz mit DMF gewaschen und mit 20 % Piperidin in DMF entschützt. Nach Waschen mit DMF werden 5,6-Carboxyfluorescein (0.583 g, 1.55 mmol), DIC (0.24 ml, 1.55 mmol) und HOBt (0.237 g, 1.55 mmol) in DMF (2.5 ml) gelöst und zu dem Harz gegeben. Nach 3 h wird die Lösung abgesaugt und solange mit 20 %iger Piperidinlösung gewaschen bis die Waschlösung farblos bleibt. Das gewaschene Harz wird mit 2 %iger Hydrazinlösung in DMF geschüttelt (2x3 min). Nach Waschen mit DMF werden Fmoc-Cystein (0.908 g, 1.550 mmol) mit HOBt (0.237 g, 1.550 mmol) und DIC (0.24 ml, 1.550 mmol) in DMF gelöst und mit dem Harz geschüttelt. Das Harz wird gewaschen, entschützt und erneut gewaschen. Das Peptid wird in 95 %iger TFA-Lösung mit 2.5 % Triisopropylsilan und 2.5 % Wasser innerhalb von 3 h vom Harz gespalten. Die Peptidlösung wird eingeengt und das Produkt in kaltem Diethylether ausgefällt. Nach Abfiltrieren der Abspaltlösung erhält man einen gelben Feststoff (Ausbeute: 0.18 g, 96 %).

<sup>1</sup>**H NMR** (300 MHz, MeOD):  $\delta$  = 1.08-2.04 (m, 6 H, C(3<sup>--</sup>)H<sub>2</sub>, C(4<sup>--</sup>)H<sub>2</sub>, C(5<sup>--</sup>)H<sub>2</sub>), 2.83-3.04 (m, 2 H, C(3<sup>--</sup>)H<sub>2</sub>SH), 3.12-3.27 (m, 2 H, C(1<sup>--</sup>)H<sub>2</sub>NHCO); 3.88-3.89 (m, 1 H, C(2<sup>---</sup>)HNH<sub>2</sub>), 4.43-4.50 (m, 1 H, C(6<sup>--</sup>)HCONH<sub>2</sub>), 6.48-6.71 (m, 4 H, C(2)H, C(4)H, C(5a)H, C(7)H), 7.95-8.37 (m, 4 H, C(1)H, C(8)H, C(5<sup>-</sup>)H, C(6<sup>-</sup>)H), 8.51 (s, 1 H, C(3)H) ppm;

<sup>13</sup>**C NMR** (75 MHz, MeOD):  $\delta$  = 22.93 (C(4)H<sub>2</sub>), 28.33 (C(5)H<sub>2</sub>), 30.94 (C(3<sup>···</sup>)H<sub>2</sub>), 31.19 (C(2<sup>···</sup>)H<sub>2</sub>), 38.93 (C(1)H<sub>2</sub>), 53.66 (C(2<sup>···</sup>)H<sub>2</sub>), 54.70 (C(6)H<sub>2</sub>), 85.46 (C(9)), 102.07 (C(4)H, C(5)H), 112,29 (C(2)H, C(7)H,), 115.68 (C(8a), C(9a)), 123.24 (C(3<sup>·</sup>)H,),), 124.20 (C(1)H, C(8)H), 127.07 (C(1<sup>·</sup>)), 128.61 (C(6<sup>·</sup>)H), 129.08 (C(5<sup>·</sup>)H), 134.22 (C(4<sup>·</sup>)H), 135.90 (C(2<sup>·</sup>)H), 152.75 (C(4a), C(10a)), 160.03 (C(3)H, C(6)H, ), 166.62 (C(1<sup>··</sup>)ONH), 166.72 (C(1<sup>···</sup>)O), 166.97 (CO Lacton), 175.38 (C(7<sup>··</sup>)ONH<sub>2</sub>) ppm;
#### Experimenteller Teil

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{31}H_{34}N_4O_8S$ : [M+H] = 623.2170 g/mol, gefunden [M+H] = 623.2168 g/mol;

#### Fluoresceindextran (10)



S-Ethyl-thiocarbonylmethylamidoethyldextran **5a** (5 mg, 0.338 µmol) und Cysteinyllysin-(fluorescein)amid **9** (4 mg, 8 µmol) werden in 1 ml Phosphatpuffer (pH 7.4) gelöst. Die Lösung wird entgast und unter Stickstoffatmosphäre gesetzt. Nach TCEP (4 mg, 14 µmol) und 4-Mercaptophenylessigsäure (6 mg, 33 µmol) wird der pH-Wert kontrolliert und die Lösung bei 37 °C 2 Tage gerührt. Cysteamin (1 mg, 17 µmol) wird der Lösung zugesetzt und einen weiteren Tag gerührt. Das Produkt wird mit Methanol ausgefällt, in Wasser (2.5 ml) gelöst und über eine PD-10 Säule gereinigt. Es entsteht ein orangefarbenener Feststoff (7 mg, 70 %) Das <sup>1</sup>H NMR- und das UV-Vis-Spektrum zeigte, dass 1 Fluorophor pro Dextran gebunden war.

<sup>1</sup>**HNMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 1.08 (s, 2 H, Lys NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.20-1.60 (m, 2 H, Lys NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.64-1.98 (m, 2 H, (m, 4 H, Lys NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.34 (m, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH), 3.25-4 (m, C(2-6)H Dextran), 4.98 (s, C(1)H Dextran unsubstituiert), 5.04 (s, C(1)H Dextran substituiert), 6.2-6.6 (m, 4 H, OHC*HCH* Xanthen), 7.7-7.9 (m, 2 H, OHCHC*H*), 7.9-8.1 (m, 2 H, C*H*C*H*COCHC Phenyl Fluo), 8.1-8.3 (m, 1 H, CC*H*CO, Phenyl Fluo) ppm;

#### Fluo-R<sub>9</sub>-Dextrans (12)



S-Ethyl-thiocarbonylmethylamidoethyldextran **5a** (20 mg, 2 µmol) und (15 mg, 10 µmol) Cysteinylnonaargininamid werden in 1 ml Phosphatpuffer (100 mM KH2PO4/Na2HPO4 pH 7.6) gelöst. Cysteinyllysin(fluorescein)amid **9** (0.009 g, 0.021 mmol) werden in DMSO (0.3 ml) gelöst und der Polymerlösung zugesetzt. Anschließend werden TCEP (4 mg, 14 µmol) und 4-Mercaptophenylessigsäure (6 mg, 33 µmol) zu der Reaktionslösung gegeben. Die Lösung wird bei 37 °C 2 Tage gerührt. Cysteamin (1 mg, 17 µmol) wird der Lösung zugesetzt und einen weiteren Tag gerührt. Die Lösung wird eingeengt und das Produkt mit Methanol ausgefällt. Der Niederschlag wird mit Methanol gewaschen, in Wasser (2.5 ml) gelöst und über eine PD-10 Säule gereinigt. Nach Lyophilisation wird ein orangefarbener Feststoff erhalten (17 mg, 66 %).

<sup>1</sup>**HNMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 1.10 (br. s, 2 H, Lys NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.20-1.80 (m, 36 H, Arg COCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.6-4.0 (m, C(2-6)*H* Dextran, SCH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH, Arg COCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.2-4.3 (m, 9 H, Arg-COCH), 4.80-5.1 (m, C(1)H Dextran), 6.2-8.2 (m, *H*-Fluo) ppm;

**Aminosäureanalayse**: 1 mg (84 nmol) Polymer enthält 104 nmol CR<sub>9</sub> Peptid. Daher sind durchschnittlich 1.2 CR<sub>9</sub>-Gruppen pro Dextranmolekül gebunden.

# Fluo-5BH3-Dextran (15a)



S-Ethyl-thiocarbonylmethylamidoethyldextran 5a (5 mg, 0.338 µmol), Cysteinyllysin(fluorescein)amid 9 (1 mg, 8 µmol), Cysteinylfluoresceinamid sowie BH-3-Peptid (21 mg, 8 µmol) werden in Phosphatpuffer (1 ml, pH 7.4) gelöst. Die Lösung wird entgast und unter Stickstoffatmosphäre gesetzt. Nach Zugabe von TCEP (4 mg, 14 µmol) und 4-Mercaptophenylessigsäure (6 mg, 33 µmol) wird der pH-Wert kontrolliert und die Lösung bei 37 °C über Nacht gerührt. Cysteamin (1 mg, 17 µmol) wird der Lösung zugesetzt und einen weiteren Tag gerührt. Die Lösung wird eingeengt und mit Methanol gefällt. Der Rückstand wird mit Methanol gewaschen, in 2.5 ml Wasser gelöst und über eine PD-10 Säule gereinigt. Es bildet sich ein orangefarbener Feststoff (8 mg, 83 %). Analog erfolgt die Synthese von **15b**.

**Aminosäureanalayse**: 1 mg (45 nmol) BH3-Polymer enthält 210 nmol CBH3 Peptid. Daher sind durchschnittlich 5 BH3-Gruppen pro Dextranmolekül gebunden.

#	Name	Peptidbeladung am Polymer
15a	Fluo-5BH3-Dextran	5 C-BH3 und einer Fluo-Gruppe
15b	Fluo-5mBH3-Dextran	5 C-mBH3 und einer Fluo-Gruppe

# N-Boc-1,2-Diaminoethan (18)<sup>[85]</sup>



Ethylendiamin (26.771 ml, 400 mmol) wird in Chloroform (400 ml) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Bocanhydrid (8.73 g, 40 mmol) wird in 200 ml Chloroform gelöst und innerhalb von 3 h zugetropft. Nach 16 weiteren Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird die Lösung eingeengt. Das verbleibende Öl wird in 300 ml 2 molarer Natriumcarbonatlösung gelöst und das Produkt mit DCM (2x 300 ml) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und evaporiert. Es entsteht ein farbloses Öl als Produkt (6.4 g, 99%).

<sup>1</sup>**H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.35 (s, 9 H, CC*H*<sub>3</sub>), 2.69 (t, 2 H, C*H*<sub>2</sub>NHBoc), 3.07 (q, 2 H, C*H*<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc), 5.11 (br s, 1 H, N*H*Boc) ppm;

<sup>13</sup>**C** NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 27.87 (CCH<sub>3</sub>), 41.36 (H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 42.93 (CH<sub>2</sub>NHBoc), 78.52 (CCH<sub>3</sub>), 155.73 (NHCOO) ppm;

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_7H_{16}N_2O_2$ : [M+H] = 161.1285 g/mol, gefunden [M+H] = 161.1285 g/mol

#### *N*-Boc-(2-Aminoethyl)maleinimid (19)



*N*-Boc-1,2-Diaminoethan **18** (6.489 g, 40.5 mmol) und Triethylamin (81 ml, 587.25 mmol) werden in 80 ml Diethylether gelöst und auf 0 °C gekühlt. Maleinsäureanhydrid (3.971 g, 40.5 mmol) wird in Diethylether (80 ml) gelöst und der Lösung zugetropft. Man lässt die Lösung 4 h bei Raumtemperatur rühren und filtriert den Niederschlag ab. Dieser wird zusammen mit Triethylamin (11.228 ml, 81 mmol) in Aceton (100 ml) gelöst und zum Sieden erhitzt. Essigsäureanhydrid (5.743 ml, 60.75 mmol) wird der Lösung zugesetzt und 20 h unter Rückfluss gekocht. Die Lösung wird evaporiert und der braune Rückstand mittels

Kieselgelfiltration (Laufmittel Ethylacetat : Hexan 1:1) aufgereinigt. Es entsteht ein weißer Feststoff (6.1 g, 63 %).

<sup>1</sup>**H NMR** (CDCl3, 300 MHz): δ = 1.4 (s, 9 H, CCH<sub>3</sub>), 3.34 (t, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc), 3.66 (t, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc), 4.74 (br s, 1 H, N*H*Boc), 6.71 (s, 2 H, C*H*C*H*CON) ppm;

<sup>13</sup>**C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ = 27.83 (CCH<sub>3</sub>), 37.5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc), 38.91 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc) 79.07 (CCH<sub>3</sub>), 133.96 (CHCHCON), 155.46 (NHCOO), 170.34 (CONCO) ppm;

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{11}H_{16}N_2O_4$ : [M+H] = 241.1183 g/mol, gefunden [M+H] = 241.1188 g/mol;

# N-(2-Aminoethyl)maleinimid (20)



Zu einer Lösung aus 4.6 g (19.154 mmol) *N*-Boc-(2-Aminoethyl)maleinimid **19** in 50 mL Dichlormethan werden bei 0 °C 45 mL Trifluoressigsäure gegeben und 1 h gerührt. Die Lösung wird eingeengt und das Produkt mit Diethylether ausgefällt. Es entsteht ein weißer Feststoff (4.6 g, 95 %)

<sup>1</sup>**H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  = 3.18 (t, 2 H, J = 5.8 Hz, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.79 (t, 2 H, J = 5.8 Hz, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 6.86 (s, 2 H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CON) ppm;

<sup>13</sup>**C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):  $\delta$  = 34.92 (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 38.28 (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 134.6 (COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 172.53 (COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO) ppm;

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_6H_8N_2O_2$ : [M+H] = 141.0659 g/mol, gefunden [M+H] = 141.0662

#### Maleinimidodextran (21)



Carboxyethyldextran mit 8 CE-Gruppen (0.2 g, 0.019 mmol) und N-(2-Aminoethyl)maleinimid 20 (189 mg, 0.743 mmol) werden in Wasser (2 ml) gelöst. Mittels Natriumhydrogencarbonatlösung wird der pH-Wert der Lösung auf 6.5-7 eingestellt. EDC (143 mg, 0.743 mmol) wird der Lösung zugesetzt. Nach 1 h wird erneut EDC (143 mg, 0.743 mmol) der Lösung zugesetzt und 4 h gerührt. Die Lösung wird eingeengt und das Produkt mit Methanol und DMF mehrmals gewaschen. Der Rückstand wird in 2.5 ml Wasser gelöst und über eine Sephadex-G-25-Säule gereinigt.

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 300 MHz):  $\delta$  = 2.48 (t, 2 H, J = 4.7, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH), 3.3-4.1 (m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, H (Glukoseeinheiten)), 4.98 (s, unsubst. C(1)H), 5.13 (s, subst. C(1)H), 6.89 (s, 2 H, COCHCHCO) ppm;

<sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 75 MHz):  $\delta$ = 36.38 (CH<sub>2</sub>CONH), 37.12 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 39.97 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 65.35 (C(6)H<sub>2</sub>), 65.58 (C(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH), 67.94 (C(4) Glukose), 71.41 (C(5) Glukose), 72.57 (C(3)H Glukose), 74.68 (C(2) Glukose), 98.71 (C(1) Glukose), 179.29 (CONH), 181.82 (CH<sub>2</sub>CONH) ppm;

# BH3(Fluo)-R9-Dextrane

# 5BH3(Fluo)-R<sub>9</sub>-Dextran (22a)



Maleinimidodextran mit 12 Maleinimidgruppen (5 mg, 0.4 µmol), C-BH3(Fluo) (7 mg, 2 µmol) **17a** und Cysteinylnonaargininamid (2 mg, 1 µmol) werden in Wasser (1 ml) gelöst. Die Lösung wird entgast und unter Stickstoff gesetzt. Ein pH Wert von 6.5 wird eingestellt. Die Lösung wird über Nacht gerührt und eingeengt. Der Rückstand wird mit Methanol gewaschen und der Feststoff in 2.5 ml Wasser gelöst. Das Produkt wird über Sephadex gereinigt. Nach Lyophilisation erhält man einen orangefarbenen Feststoff als Produkt (7 mg, 60 %).

**Aminosäureanalayse**: 1 mg (39 nmol) BH3-Polymer enthält 191 nmol CBH3(Fluo) Peptid und 66 nmol  $R_9$  Peptid. Daher sind durchschnittlich 5 BH3-Gruppen und 2  $R_9$ -Gruppen pro Dextranmolekül gebunden.

#	Name	Anzahl der Peptide pro Polymer
22a	5BH3K(Fluo)-2R <sub>9</sub> -Dextran	5 C-BH3K(Fluo) und 2 CR $_9$ Gruppen
22b	5mBH3K(Fluo)-2R9-Dextran	5 C-mBH3K(Fluo) und 2 CR $_9$ Gruppen
23a	2BH3K(Fluo)-2R <sub>9</sub> -Dextran	2 C-BH3K(Fluo) und 2 CR $_9$ Gruppen
23b	2mBH3K(Fluo)-2R9-Dextran	2 C-mBH3K(Fluo) und 2 CR $_9$ Gruppen

Die Produkte 22b beziehungsweise 23a,b wurden analog hergestellt.

#### 5R<sub>9</sub>-Fluo-Dextran (24)



Maleinimidodextran (10 mg, 0.001 mmol) und Cysteinylnonaargininamid (11 mg, 0.007 mmol) werden in 1 ml Wasser gelöst. Ein pH Wert von 6.5 wird eingestellt, die Lösung entgast und unter Stickstoff gesetzt. CKFluo **9** (0.002 g, 0.003 mmol) wird der Lösung zugesetzt und über Nacht gerührt und eingeengt. Der Rückstand wird mit Methanol gewaschen, in 2.5 mL Wasser gelöst und über Sephadex gereinigt. Es bildet sich ein orangefarbener Feststoff (14 mg, 84 %). Das <sup>1</sup>H NMR-Spektrum zeigt, dass 5 Nonaarginingruppen und ein Fluorophor gebunden sind.

<sup>1</sup>**HNMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 1.19 (br. s, 2 H, Lys NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.30-1.90 (m, 36 H, Arg COCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.4-2.6 (m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH, CH<sub>3</sub> Succinimid), 2.6-4.0 (m, C(2-6)*H* Dextran, SCH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH, Arg COCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.2-4.3 (m, 9 H, Arg-COCH), 4.80-5.1 (m, C(1)H Dextran), 6.2-8.2 (m, *H*-Fluo) ppm;

# N-(7-Carboxyheptyl)-6-methoxychinoliniumbromid (25)



6-Methoxychinolin (0.993 ml, 7.2 mmol) und 8-Bromoctansäure (1.606 g, 7.2 mmol) werden über Nacht bei 110 °C unter Rückfluss gekocht. Man lässt die Lösung abkühlen, löst den Feststoff mit wenig Methanol auf und gibt die Lösung zu 50 ml Aceton. Der Niederschlag wird mit Diethylether (3x 50 ml) gewaschen und getrocknet. Man erhält 2.1 g (76 %) Produkt als einen grauen Feststoff

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 300 MHz): δ= 1.02-1.36 (m, 6 H, CH2CH2CH2CH2CH2CH2COOH), 1.45 (dt, 2 H, J = 7.1, CH2CH2COOH), 1.98 (dt, 2 H, J = 6.17, NCH2CH2), 2.24 (t, 2 H, J = 7.32, CH2COOH), 3.95 (s, 3 H, OCH3), 4.9 (t, 2 H, J = 7.27, NCH2), 7.58-7.63 (m, 1 H, CCHCO arom.), 7.7-7.78 (m, 1 H, COCHCHC), 7.86 (dd, 1 H, J1 = 5.84, J2 = 2.58, NCHCHCH), 8.26 (d, 1 H, J = 9.75, NCHCHCH), 8.86 (d, 1 H, J = 8.42, NCCH), 8.96 (d, 1 H, J = 5.55, NCHCH) ppm;

<sup>13</sup>**C NMR** (D<sub>2</sub>O, 75 MHz):  $\delta$ = 23.84 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH), 25.12 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 27.59 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH), 28.85 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 30.03 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 33.56 (CH<sub>2</sub>COOH), 55.92 (CH<sub>3</sub>OC), 58.06 (NCH2), 107.92 (CCHC arom.), 119.68 (NCHCH arom.), 121.66 (NCCH arom.), 127.81 (CCHCHCO arom.), 132.08 (NCHCHCH arom.), 133.58 (NCCH arom.), 145.23 (CCHCO arom.), 145.46 (NCHCH arom.), 159.15 (COCH3 arom.), 179.09 (COOH) ppm;

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{18}H_{24}NO_3$ : [M+H] = 302.1751 g/mol, gefunden [M+H] = 302.1753 g/mol;

# *N*-(7-(*O*-Succinimidyl)-oxycarbonyl-heptyl)-6-methoxychinoliniumbromid (26)



N-(7-Carboxyheptyl)-6-methoxychinoliniumbromid **25** (1 g, 2.616 mmol), *N*-Hydroxysuccinimid (0.903 g, 7.848 mmol) und DCC (1.349 g, 6.540 mmol) werden in DMF (45 ml) gelöst und 24 h gerührt. Die Lösung wird eingeengt mit Acetonitril (10 ml) versetzt und 1 h gerührt. Der Niederschlag wird abgetrennt und das Filtrat eingeengt. Das Filtrat wird in eine stark rührenden Lösung aus Ethylacetat/Hexan (3:1, v,v, 500 ml) getropft. Der Niederschlag wird erneut in Acetonitril gelöst und abermals in Ethylacetat/Hexan (3:1, v,v, 500 ml) ausgefällt. Es bildet sich ein brauner Feststoff (1.3 g, 99 %)

<sup>1</sup>**H NMR** (D<sub>2</sub>O 300 MHz):  $\delta$ = 1.10-2.10 (m, 10 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu), 2.64 (t, 2 H, J = 7.33, CH<sub>2</sub>CO-OSu), 2.91 (m, 4 H, CO-OSu), 4.02 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>OC), 4.97 (t, 2 H, J = 7.32, NCH<sub>2</sub>), 7.69-9.04 (m, 6 H, aromatisch) ppm;

<sup>13</sup>**C NMR** (D<sub>2</sub>O, 75 MHz):  $\delta$ =24.77 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu), 25.16 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> (OSu)), 25.53 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 26.85 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH), 28.29 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH), 33.12 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 34.65 (CH<sub>2</sub>COOH), 56.83 (CH<sub>3</sub>OC), 64.77 (NCH<sub>2</sub>), 114.56 (aromatisch) 120.36 (aromatisch), 126.11 (aromatisch), 126.75 (aromatisch), 127.86 (aromatisch), 135.47 (aromatisch) 140.53 (aromatisch), 143.72 (aromatisch), 160.05 (aromatisch), 168.96 (CO-OSu); 71.51 (COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO) ppm;

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{22}H_{27}N_2O_5$ : [M+H] = 399.1914 g/mol, gefunden [M+H] = 399.1916 g/mol;





Carboxyethyldextran (0.2 g, 0.019 mmol) mit 7 CE-Gruppen, DIC (0.205 ml, 1.323 mmol) und HOBt (0.203 g, 1.323 mmol) werden in DMSO (2 ml) gelöst. *N*-Boc-1,2-Diaminoethan (0.212 g, 1.323 mmol) wird der Reaktionslösung zugesetzt und über Nacht gerührt. Das Produkt wird mit Methanol gefällt und mit Methanol gewaschen. Der verbleibende Feststoff wird in Wasser gelöst, gegen Wasser dialysiert und eingeengt. Der Rückstand wird in Wasser (2.5 ml) gelöst und über eine PD-10 Säule gereinigt. Es bildet sich ein weißer Feststoff (0.08 g, 37 %)

<sup>1</sup>**H NMR** (D<sub>2</sub>O, 300 MHz):  $\delta$ = 1.44 (s, 9 H, CCH<sub>3</sub>), 2.55 (t, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH), ), 3.15-4.06 (m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH, *H* (Glukose)), 4.98 (s, 1 H, C(1)*H* unsubst.), 5.12 (s, 1 H, C(1)*H* subst.) ppm;

<sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 75 MHz):  $\delta$ = 27.66 (CCH<sub>3</sub>), 30.15 (CH<sub>2</sub>CONH), 36.21 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 39.08 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 60.37 (C(6) Glukose), 65.43 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH), 69.41 (C(4) Glukose), 70.05 (C(2) Glukose), 71.27 (C(5) Glukose), 73.27 (C(3) Glukose), 97.57 (C(1) Glukose), 157.96 (CO Boc), 173.87 (CH<sub>2</sub>CONH) ppm;

```
N-(Aminoethyl)-amidoethyldextran (AAE-Dextran) (28)
```



CED (0.2 g, 0.019 mmol) mit 15 CE Gruppen und Ethylendiamin (0.187 ml, 2.789 mmol) werden in Wasser (2 ml) gelöst und ein pH-Wert von 5 mittels HCI (1 M) eingestellt. Anschließend werden EDC (0.535 g, 2.789 mmol) zugesetzt und die Lösung über Nacht gerührt. Die Lösung wird eingeengt und das Produkt mit Methanol ausgefällt. Der Rückstand wird mit DMF und Methanol gewaschen. Der verbleibende Feststoff wird in 2.5 ml Wasser gelöst und über eine PD-10 Säule filtriert. Es bildet sich ein weißer Feststoff (0.18 g, 75 %).

<sup>1</sup>**H NMR** (D<sub>2</sub>O, 300 MHz):  $\delta$ = 2.4 (t, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH), 2.96 (t, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH2) , 3.15-4.01 (m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH, *H* (Glukose)), 4.87 (s, 1 H, C(1)*H* unsubst.), 5.04 (s, 1 H, C(1)*H* subst.) ppm;

<sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 75 MHz):  $\delta$ = 36.44 (CH<sub>2</sub>CONH), 37.63 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 39.06 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 65.35 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH), 69.37 (C(4) Glukose), 69.98 (C(2) Glukose), 71.21 (C(4) Glukose), 73.21 (C(3) Glukose), 97.49 (C(1) Glukose), 179.82 (CH<sub>2</sub>CONH) ppm;

#### **MEQ-Dextran (29)**



AAE-Dextran (0.05 g, 0.005 mmol) mit 8 Aminogruppen und 6-Methoxy-1-(8-octansäure-O-succinimidylester)chinoliniumbromid (0.087 g, 0.182 mmol) werden in Natriumhydrogen-carbonatlösung (1 ml, 0.1 M, pH 8.5) über Nacht gerührt. Die Lösung wird gegen Wasser dialysiert und eingeengt. Das Produkt wird mit Methanol ausgefällt und mit Methanol mehrfach gründlich gewaschen. Der Feststoff wird in 2.5 ml Wasser gelöst und über eine PD-10 Säule gereinigt. Es bildet sich ein weißer Feststoff (0.046 g, 63 %).

#### **TMR-MEQ-Dextran (30)**



0.006 AAE-Dextran (0.069 g, mmol) mit 8 Aminogruppen und 5,6-Carboxytetramethylrhodamin-O-succinimidylester (0.006 g (0.012 mmol) werden in Natriumhydrogencarbonatlösung (2 ml, pH 8.5) gerührt. Nach 30 min werden 6-Methoxy-1-(8-octansäure-O-succinimidylester)chinoliniumbromid (0.084 g, 0.176 mmol) zugesetzt und die Lösung über Nacht gerührt. Die Lösung wird eingeengt und das Produkt mit Methanol und DMF mehrfach gründlich gewaschen. Der Rückstand wird in Wasser (2.5 ml) gelöst und über eine PD-10-Säule gereinigt. Es bildet sich ein roter Feststoff (49 mg, 50 %).

<sup>1</sup>**H NMR** (D<sub>2</sub>O, 300 MHz)  $\delta$ = 1.02-1.34 (m, 10 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH), 2.02-2.09 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH), 2.4 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>CONH), 3.14-3.99 (m, Glukose-H, CH<sub>2</sub>NH, CH<sub>3</sub>O), 4.81-5.23 (m, 1 H, anomeric H), 6.2-6.94 (m, 6 H, aromatic (TMR)), 7.6-8.94 (m, 6 H, aromatic (MEQ)) ppm;

# Tert-Butyl-2-(chinol-6-xyloxy)acetat (31)



6-Chinolinol (1 g, 6.889 mmol) wird in trockenem DMF (30 ml) gelöst. Natriumhydrid (0.331 g, 8.267 mmol) wird der Lösung zugesetzt. Nach 30 min Rühren wird Bromessigsäure-*tert*-butylester (1.025 g, 6.889 mmol) der Lösung zugesetzt und über Nacht gerührt. Die Lösung wird eingeengt, der Rückstand in Chloroform (150 ml) gelöst und mit Wasser gewaschen (3x 50 ml). Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Man erhält 7.86 g (99 %) als rotbraunes Öl.

<sup>1</sup>**H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.46 (s, 9 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 4.61 (s, 2 H, COCH<sub>2</sub>O), 6.97 (d, 1 H, *J* = 2.4 Hz, C(7)*H* (Chinolin)), 7.30 (q, 1 H, *J* = 4.28 Hz, 1 H, C(2)*H* (Chinolin)), 7.89 (d, 1H, J = 2.44 Hz (C5)*H* (Chinolin)), 7.9-8.1 (m, 2 H, C(3)*H*, C(8)*H* (Chinolin)), 8.74 (d, 1 H, J = 1.2 Hz, C(1)*H* (Chinolin)) ppm;

<sup>13</sup>**C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 27.96 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 65.86 (C(2')H<sub>2</sub>), 82.52 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 106.47 (C(5)H), 121.37 (C(2)H), 122.01 (C(7)H), 128.94 (C(4)H), 131.09 (C(8)H), 134.76 (C(3)H), 144.63 (C(9)H), 148.29 (C(1)H), 155.09 (C(6)H), 167.53 (C(1')O) ppm;

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{15}H_{17}NO_3$ : [M+H] = 260.1281 g/mol, gefunden [M+H] = 260.0979 g/mol

# *Tert*-Butylcarboxymethyl-6-oxy-*N*-(ethyl)chinolinium (32)



*Tert*-Butyl-2-(chinol-6-xyloxy)acetat **31** (1 g, 3.857 mmol) und Ethyliodid (3.114 ml, 38.57 mmol) werden in der Mikrowelle bei 90 °C eine halbe Stunde gerührt. Die Lösung wird

eingeengt und der Rückstand mit trockenem THF gewaschen. Der Niederschlag wird abfiltriert und getrocknet. Es entsteht ein gelber Feststoff (0.8 g, 74 %).

<sup>1</sup>**H NMR** (300 MHz, MeOD-D4):  $\delta$  = 1.51 (s, 9 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.73 (t, 3 H, J = 7.3 Hz, C(2<sup>'</sup>)H<sub>3</sub>), 4.91 (s, 2 H, C(2<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 5.11 (q, 2 H, J= 7.3 Hz, J<sub>2</sub> = 6.72 Hz, C(1<sup>''</sup>)H<sub>2</sub>), 7.77 (d, 1 H, J = 2.4 Hz, C(7)H, J = 9.1 Hz (Chinolin)), 7.92 (d, 1 H, J = 7.3 Hz, 1 H, C(2)H (Chinolin)), 8.03 (t, 1 H, J = 7.32 Hz, C(5)H (Chinolin)), 8.53 (d, 1 H, C(3)H (Chinolin)), 9.08 (d, 1 H, J = 8.5 Hz, C(8)H (Chinolin)), 9.29 (d, 1 H, J = 4.8 Hz, C(1)H (Chinolin)) ppm;

<sup>13</sup>**C NMR** (75 MHz, MeOD-D4):  $\delta = 14.35$  (*C*(2′′)), 26.81 (*C*(*C*H<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 53.49 (*C*(1′′)), 65.53 (*C*(2′)H<sub>2</sub>), 82.50 (*C*(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 109.10 (*C*(5)H), 121.37 (*C*(2)H), 120.06 (*C*(7)H), 122.16 (*C*(4)H), 127.96 (*C*(8)H), 131.99 (*C*(3)H), 144.63 (*C*(9)H), 145.60 (*C*(1)H), 158.20 (*C*(6)H), 167.31 (*C*(1′)O) ppm;

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{17}H_{22}NO_3$ : [M+H] = 288.1594 g/mol, gefunden [M+H] = 288.1590 g/mol

# *Tert*-Butylcarboxymethyl-6-oxy-*N*-(3-sulfonpropyl)chinolinium (33)



*Tert*-Butyl-2-(chinol-6-xyloxy)acetat **31** (1 g, 3.857 mmol) und 1,3-Propansulton (4.711 g, 38.57 mmol) werden in einer Lösung aus DMF und Wasser (8 ml, 1:1) gelöst und der Mikrowelle bei 90 °C eine halbe Stunde gerührt. Die Lösung wird eingeengt und der Rückstand mit trockenem THF gewaschen. Es entsteht ein grauer Feststoff (0.8 g, 64 %).

<sup>1</sup>**H NMR** (300 MHz, MeOD-D4):  $\delta = 1.50$  (s, 9 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.54 (q, 2 H, J = 7.3 Hz, C(2<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 3.01 (t, 2 H, J = 6.7 Hz, C(3<sup>''</sup>)H<sub>2</sub>), 4.94 (s, 2 H, C(2<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 5.17 (t, 2 H, J = 7.93 Hz, C(1<sup>''</sup>)H<sub>2</sub>), 7.58 (d, 1 H, J = 2.4 Hz, C(7)*H* (Chinolin)), 7.81 (d, 1 H, J = 7.3 Hz, 1 H, C(4)*H* (Chinolin)), 7.94 (t, 1 H, J = 7.32 Hz, C(2)*H* (Chinolin)), 8.44 (d, 1 H, J = 9.7 Hz, C(3)*H* (Chinolin)), 8.98 (d, 1 H, J = 8.5 Hz, C(8)*H* (Chinolin)), 9.11 (d, 1 H, J = 6.1 Hz, C(1)*H* (Chinolin)) ppm; <sup>13</sup>**C NMR** (75 MHz, MeOD-D4):  $\delta$  = 13.91 (*C*(2<sup>'</sup>)H), 23.52 (*C*(*C*H<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 47.36 (*C*(3<sup>'</sup>)), 64.52 (*C*(1<sup>''</sup>)), 65.36 (*C*(2<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 90.26 (*C*(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 108.11 (*C*(5)H), 121.48 (*C*(2)H), 122.16 (*C*(8)H), 127.46 (*C*(3)H), 133.60 (*C*(9)H), 135.03 (*C*(4)H), 145.72 (*C*(1)H), 157.49 (*C*(6)H), 170.34 (*C*(1<sup>'</sup>)O) ppm;

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{18}H_{23}NO_6S$ : [M+H] = 381.1246 g/mol, gefunden [M+H] = 381.1250 g/mol;

# 2-((*N*-Ethylchinolinium)-6-yloxy)acetatchlorid (34)



*Tert*-Butylcarboxymethyl-6-oxy-*N*-(ethyl)chinolinium **32** (1.112 g, 3.857 mmol) wird in einer Lösung 4 N HCl in Dioxan (10 ml) gelöst und für 4 h gerührt. Die Lösung wird eingeengt und mit das Produkt mit Diethylether ausgefällt. Der Niederschlag wird abgetrennt, mehrfach mit THF gewaschen und getrocknet. Man erhält einen gelben Feststoff (1 g, 97 %) als Produkt.

<sup>1</sup>**H NMR** (300 MHz, MeOD-D4):  $\delta$  = 1.64 (t, 3 H, J = 7.3 Hz, C(2΄)*H*<sub>3</sub>), 4.90 (s, 2 H, C(2΄)*H*<sub>2</sub>), 5.04 (q, 2 H, J= 7.3 Hz, J<sub>2</sub> = 6.72 Hz, C(1΄)*H*<sub>2</sub>), 7.71 (d, 1 H, J = 2.4 Hz, C(7)*H*, J = 9.1 Hz (Chinolin)), 7.87 (d, 1 H, J = 7.3 Hz, 1 H, C(2)*H* (Chinolin)), 7.96 (t, 1 H, J = 7.32 Hz, C(5)*H* (Chinolin)), 8.46 (d, 1 H, C(3)*H* (Chinolin)), 8.99 (d, 1 H, J = 8.5 Hz, C(8)*H* (Chinolin)), 9.20 (d, 1 H, J = 4.8 Hz, C(1)*H* (Chinolin)) ppm;

<sup>13</sup>**C NMR** (75 MHz, MeOD-D4):  $\delta$  = 14.30 (*C*(2<sup>'</sup>)), 53.44 (*C*(1<sup>''</sup>)), 64.49 (*C*(2<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 109.09 (*C*(5)H), 120.01 (*C*(2)H), 120.06 (*C*(7)H), 122.13 (*C*(4)H), 127.96 (*C*(8)H), 132.04 (*C*(3)H), 133.66 (*C*(9)H), 145.67 (*C*(1)H), 158.13 (*C*(6)H), 169.86 (*C*(1<sup>'</sup>)O) ppm;

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{13}H_{14}NO_3$ : [M+H] = 232.0968 g/mol, gefunden [M+H] = 232.0959 g/mol

#### **Experimenteller Teil**

#### 6-Oxycarbonylmethoxy-N-(3-sulfonpropyl)chinolinium (35)



*Tert*-Butylcarboxymethyl-6-oxy-*N*-(3-sulfonpropyl)chinolinium **33** (1 g, 2.622 mmol) wird in einer Lösung 4 N HCl in Dioxan (10 ml) gelöst und für 4 h gerührt. Die Lösung wird eingeengt und mit das Produkt mit Diethylether ausgefällt. Der Niederschlag wird abgetrennt, mehrfach mit THF gewaschen und getrocknet. Man erhält einen grauen Feststoff (0.85 g, 99 %) als Produkt

<sup>1</sup>**H NMR** (300 MHz, MeOD-D4):  $\delta$  = 2.46 (q, 2 H, *J* = 7.3 Hz, C(2<sup>''</sup>)*H*<sub>2</sub>), 3.02 (t, 2 H, *J* = 6.7 Hz, C(3<sup>''</sup>)*H*<sub>2</sub>), 5.08 (s, 2 H, C(2<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 7.49 (d, 1 H, *J* = 2.4 Hz, C(7)*H* (Chinolin)), 7.85 (d, 1 H, *J* = 7.3 Hz, 1 H, C(2)*H*, C(5)*H* (Chinolin)), 8.33 (d, 1 H, J = 9.7 Hz, C(3)*H* (Chinolin)), 8.86 (d, 1 H, J = 8.5 Hz, C(8)*H* (Chinolin)), 9.01 (d, 1 H, J = 6.1 Hz, C(1)*H* (Chinolin)) ppm;

<sup>13</sup>**C NMR** (75 MHz, MeOD-D4):  $\delta = 23.41$  (*C*(2<sup>'</sup>)H), 47.29 (*C*(3<sup>'</sup>)), 64.36 (*C*(1<sup>'</sup>)), 65.27 (*C*(2<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 107.73 (*C*(5)H), 121.92 (*C*(2)H), 122.13 (*C*(8)H), 127.41 (*C*(3)H), 133.61 (*C*(9)H), 135.06 (*C*(4)H), 145.84 (*C*(1)H), 157.51 (*C*(6)H), 170.31 (*C*(1<sup>'</sup>)O) ppm;

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{14}H_{15}NO_6S$ : [M+H] = 325.0620 g/mol, gefunden [M+H] = 325.0621 g/mol

#### Tert-Butyl-Oxycarbonylpentyl-6-oxychinolin (36)



6-Chinolinol (0.882 g, 6.076 mmol) wird in trockenem DMF (20 ml) gelöst. Natriumhydrid (0.486 g, 12.153 mmol) wird der Lösung zugesetzt und für 30 min gerührt.

6-Bromhexansäure-*tert*-butylester (1.31 g, 5.524 mmol) wird der Lösung zugesetzt und über Nacht gerührt. Die Lösung wird eingeengt, in Chloroform (30 ml) gelöst und mit Wasser gewaschen (3x20 ml). Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Filtrat wird eingeengt und man erhält ein braunes Öl als Produkt (1.1 g, 63 %).

<sup>1</sup>**H NMR** (300 MHz, MeOD-D4):  $\delta$  = 1.43 (s, 9 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.51 (q, 2 H, J = 7.4 Hz, C(4')H<sub>2</sub>), 1.67 (q, 2 H, J = 7.4 Hz, C(3')H<sub>2</sub>), 1.84 (q, 2 H, J = 6.7 Hz, C(5')H<sub>2</sub>), 2.25 (t, 2 H, J = 7.3 Hz, C(2')H<sub>2</sub>), 4.04 (t, 2 H, J = 6.1 Hz, C(6')H<sub>2</sub>), 7.02 (d, 1 H, J = 2.4 Hz, C(7)H (Chinolin)), 7.27-7.37 (m, 2 H, C(2)H, C(5)H (Chinolin)), 7.89 (d, 1H, J = 2.44 Hz (C3)H (Chinolin)), 8.00 (m, 1 H, C(8)H (Chinolin)), 8.73 (d, 1 H, J = 1.2 Hz, C(1)H (Chinolin)) ppm;

<sup>13</sup>**C NMR** (75 MHz, MeOD-D4):  $\delta$  = 24.66 (C(3<sup>°</sup>)H<sub>2</sub>), 25.45 (C(4<sup>°</sup>)H<sub>2</sub>), 27.96 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.71 (C(5<sup>°</sup>)H<sub>2</sub>), 35.29 (C(2<sup>°</sup>)H<sub>2</sub>), 67.82 (C(6<sup>°</sup>)H<sub>2</sub>), 79.93 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 105.68 (C(5)H), 122.52 (C(2)H), 130.36 (C(8)H), 130.56 (C(4)H), 134.79 (C(3)H), 143.98 (C(9)H), 157.07 (C(1)H), 172.85 (C(1<sup>°</sup>)O) ppm;

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{19}H_{25}NO_3$ : [M+H] = 316.1907 g/mol, gefunden [M+H] = 316.1906 g/mol

# Tert-Butyloxycarbonylpentyl-6-oxy-N-(ethyl)chinoliniumiodid (37)



*Tert*-Butyl-Oxycarbonylpentyl-6-oxychinolin **36** (1.758 g, 5.574 mmol) und Ethyliodid (4.5 ml, 55.74 mmol) werden 45 min bei 150 °C in der Mikrowelle gerührt. Die Lösung wird vom Feststoff abgetrennt. Das ausgefallene Produkt wird mit trockenem THF gewaschen und getrocknet. Es bildet sich ein grüner Feststoff (1.1 g, 48 %).

<sup>1</sup>**H NMR** (300 MHz, MeOD-D4):  $\delta$  = 1.41 (s, 9 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.45- 1.75 (m, 7 H, C(2<sup>'</sup>)H<sub>3</sub>, C(3<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>, C(4<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 1.90 (q, 2 H, J = 7.3 Hz, C(5<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 2.33 (t, 2 H, J = 7.3 Hz, C(2<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 4.22 (t, 2 H, J = 6.1 Hz, C(6<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 5.10 (q, 2 H, J = 8.1, C(1<sup>''</sup>)H<sub>2</sub>), 7.54 (d, 1 H, J = 2.4 Hz, C(7)H

(Chinolin)), 7.76-8.02 (m, 2 H, C(2)*H*, C(5)*H* (Chinolin)), 8.95 (m, 2 H, C(3)*H*, (C(8)*H* (Chinolin)), 9.25 (d, 1 H, J = 1.2 Hz, C(1)*H* (Chinolin)) ppm;

#### <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, MeOD-D4<sub>3</sub>): δ = 16.14 (*C*(2΄)H),

26.01 (C(3')H<sub>2</sub>), 26.91 (C(4')H<sub>2</sub>), 29.31 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.94 (C(5')H<sub>2</sub>), 35.06 (C(2')H<sub>2</sub>), 55.17 (C(1'')H), 70.58 (C(6')H<sub>2</sub>), 80.12 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 112.32 (C(5)H), 123.47 (C(2)H), 123.72 (C(8)H), 129.46 (C(3)H), 130.23 (C(9)H), 135.11 (C(4)H), 147.18 (C(1)H), 161.12 (C(6)H) 177.64 (C(1')O) ppm;

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{21}H_{30}NO_3$ : [M+H] = 344.2220 g/mol, gefunden [M+H] = 344.2222 g/mol

#### Tert-Butyloxycarbonylpentyl-6-oxy-N-(3-sulfonpropyl)chinolinium (38)



*Tert*-Butyl-Oxycarbonylpentyl-6-oxychinolin **36** (1.1 g, 3.488 mmol) und 1,3-Propansulton (2.13 g, 17.440 mmol) werden in trockenem THF (4ml) gelöst und 45 min bei 150 °C in der Mikrowelle zur Reaktion gebracht. Das ausgefallene Produkt wird mit trockenem THF gewaschen und getrocknet. Es bildet sich ein brauner Feststoff (1.3 g, 88 %).

<sup>1</sup>**H NMR** (300 MHz, MeOD-D4):  $\delta$  = 1.42 (s, 9 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.44- 1.66 (m, 4 H, C(3')H<sub>2</sub>, C(4')H<sub>2</sub>), 1.76 (q, 2 H, J = 6.7 Hz, C(5')H<sub>2</sub>), 2.05 (m, 2 H, C(2')H<sub>2</sub>), 2.85 (m, 2 H, C(6')H<sub>2</sub>), 4.74 (m, 2 H, C(1'')H<sub>2</sub>), 7.31 (d, 1 H, J = 2.4 Hz, C(7)H (Chinolin)), 7.61-7.84 (m, 2 H, C(2)H, C(5)H (Chinolin)), 8.47 (m, 2 H, C(3)H, (C(8)H (Chinolin)), 9.10 (d, 1 H, J = 1.2 Hz, C(1)H (Chinolin)) ppm;

<sup>13</sup>**C NMR** (75 MHz, MeOD-D4): δ = 18.72 (*C*(2<sup>′</sup>)H), 24.68 (*C*(3<sup>′</sup>)H<sub>2</sub>), 25.50 (*C*(4<sup>′</sup>)H<sub>2</sub>), 27.99 (*C*(*C*H<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.75 (*C*(5<sup>′</sup>)H<sub>2</sub>), 35.26 (*C*(2<sup>′</sup>)H<sub>2</sub>), 47.94 (*C*(3<sup>′′</sup>)H<sub>2</sub>), 63.12 (*C*(1<sup>′′</sup>)H<sub>2</sub>) 67.87 (*C*(6<sup>′</sup>)H<sub>2</sub>), 79.92 (*C*(*C*H<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 105.66 (*C*(5)H), 122.57 (*C*(2)H), 130.32 (*C*(8)H), 130.55 (*C*(4)H), 134.78 (*C*(3)H), 143.98 (*C*(9)H), 157.08 (*C*(1)H), 172.86(*C*(1<sup>′</sup>)O) ppm;

#### Experimenteller Teil

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{22}H_{31}NO_6S$ : [M+H] = 437.1872 g/mol, gefunden [M+H] = 437.1871 g/mol

# Oxycarbonylpentyl-6-oxy-N-(ethyl)chinoliniumchlorid (39)



*Tert*-Butyloxycarbonylpentyl-6-oxy-*N*-(ethyl)chinoliniumiodid **37** (1.1g, 2.4 mmol) wird in einer Lösung aus 4 N HCl in Dioxan (5 ml) gelöst und für 4 h gerührt. Die Lösung wird eingeengt und mit das Produkt mit Diethylether ausgefällt. Der Niederschlag wird abgetrennt, mehrfach mit THF gewaschen und getrocknet. Es entsteht ein gelber Feststoff (0.9 g, 90.4 mmol)

<sup>1</sup>**H NMR** (300 MHz, MeOD-D4):  $\delta$  = 1.4- 1.7 (m, 7 H, C(2΄)*H*<sub>3</sub>, C(3΄)*H*<sub>2</sub>, C(4΄)*H*<sub>2</sub>), 1.92 (q, 2 H, J = 7.3 Hz, C(5΄)*H*<sub>2</sub>), 2.36 (t, 2 H, J = 7.3 Hz, C(2΄)*H*<sub>2</sub>), 4.19 (t, 2 H, J = 6.1 Hz, C(6΄)*H*<sub>2</sub>), 5.12 (q, 2 H, J = 8.1, C(1΄)*H*<sub>2</sub>), 7.58 (d, 1 H, *J* = 2.4 Hz, C(7)*H* (Chinolin)), 7.7-8.0 (m, 2 H, C(2)*H*, C(5)*H* (Chinolin)), 8.9 (m, 2 H, C(3)*H*, (C(8)*H* (Chinolin)), 9.28 (d, 1 H, J = 1.2 Hz, C(1)*H* (Chinolin)) ppm;

#### <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, MeOD-D4): δ = 16.14 (*C*(2΄)H),

26.03 (*C*(3')H<sub>2</sub>), 26.94 (*C*(4')H<sub>2</sub>), 29.94 (*C*(5')H<sub>2</sub>), 35.04 (*C*(2')H<sub>2</sub>), 55.16 (*C*(1'')H), 70.62 (*C*(6')H<sub>2</sub>), 112.35 (*C*(5)H), 123.44 (*C*(2)H), 123.73 (*C*(8)H), 129.51 (*C*(3)H), 130.26 (*C*(9)H), 135.22 (*C*(4)H), 147.16 (*C*(1)H), 161.13 (*C*(6)H) 177.61 (*C*(1')O) ppm;

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{17}H_{31}NO_3$ : [M+H] = 288.1594 g/mol, gefunden [M+H] = 288.1589 g/mol

#### Experimenteller Teil

## Oxycarbonylpentyl-6-oxy-*N*-(2-sulfonpropyl)chinolinium (40)



*Tert*-Butyloxycarbonylpentyl-6-oxy-*N*-(3-sulfonpropyl)chinolinium **38** 1.3 g (3.069 mmol) wird in einer Lösung aus 4 N HCl in Dioxan (5 ml) gelöst und für 4 h gerührt. Die Lösung wird eingeengt und mit das Produkt mit Diethylether ausgefällt. Der Niederschlag wird abgetrennt, mehrfach mit THF gewaschen und getrocknet. Man erhält einen grauen Feststoff (0.93 g, 88 %) als Produkt.

<sup>1</sup>**H NMR** (300 MHz, MeOD-D4):  $\delta$  = 1.44- 1.66 (m, 4 H, C(3')*H*<sub>2</sub>, C(4')*H*<sub>2</sub>), 1.78 (m, 2 H, C(5')*H*<sub>2</sub>), 2.10 (m, 2 H, C(2')*H*<sub>2</sub>), 2.87 (m, 2 H, C(6')*H*<sub>2</sub>), 4.74 (m, 2 H, C(1'')*H*<sub>2</sub>), 7.33(m, 1 H, C(7)*H* (Chinolin)), 7.63-7.85 (m, 2 H, C(2)*H*, C(5)*H* (Chinolin)), 8.49 (m, 2 H, C(3)*H*, (C(8)*H* (Chinolin)), 9.12 (d, 1 H, J = 1.2 Hz, C(1)*H* (Chinolin)) ppm;

<sup>13</sup>**C NMR** (75 MHz, MeOD-D4):  $\delta = 18.74$  (*C*(2<sup>'</sup>)H), 24.72 (*C*(3<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 25.48 (*C*(4<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 28.79 (*C*(5<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 35.22 (*C*(2<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 47.93 (*C*(3<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 63.12 (*C*(1<sup>''</sup>)H<sub>2</sub>) 67.87 (*C*(6<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 79.93 (*C*(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 105.67 (*C*(5)H), 122.55 (*C*(2)H), 130.36 (*C*(8)H), 130.59 (*C*(4)H), 134.82 (*C*(3)H), 143.95 (*C*(9)H), 157.10 (*C*(1)H), 172.87 (*C*(1<sup>'</sup>)O) ppm;

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{18}H_{23}NO_6S$ : [M+H] = 381.1246 g/mol, gefunden [M+H] = 381.1248 g/mol

## O-Succinimidylcarboxypentyl-6-oxy-N-(ethyl)chinoliniumchlorid (41)



Oxycarbonylpentyl-6-oxy-*N*-(ethyl)chinoliniumchlorid **39** (1.163 g, 2.8 mmol) wird in DMF (45 ml) gelöst. N-Hydroxysuccinimid (0.967 g, 8.4 mmol) und DCC (1.444 g, 7 mmol) werden der Lösung zugesetzt und über Nacht gerührt. Die Lösung wird eingeengt und der Rückstand in Acetonitril (10 ml) 1 h gerührt. Der Niederschlag wird abgetrennt und die Lösung in Ethylaceteat/Hexan (EE/Hexan 3:1, 500 ml) getropft. Der Niederschlag wird erneut in etwas Acetonitril gelöst und abermals in eine Lösung aus Ethylacetat und Hexan (3:1) getropft. Man erhält einen braunen Feststoff (0.68 g, 58 %).

<sup>1</sup>**H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.2- 2.2 (m, 6 H, C(3΄)*H*<sub>2</sub>, C(4΄)*H*<sub>2</sub>, C(5΄)*H*<sub>2</sub>), 2.08-2.11 (m, 2 H, C(2΄)*H*<sub>2</sub>), 2.85-2.88 (m, 2 H, C(6΄)*H*<sub>2</sub>), 4.74 (m, 2 H, C(1΄΄)*H*<sub>2</sub>), 7.33(m, 1 H, C(7)*H* (Chinolin)), 7.63-7.85 (m, 2 H, C(2)*H*, C(5)*H* (Chinolin)), 8.49 (m, 2 H, C(3)*H*, (C(8)*H* (Chinolin)), 9.12 (d, 1 H, J = 1.2 Hz, C(1)*H* (Chinolin)) ppm;

<sup>13</sup>**C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 18.74$  (*C*(2<sup>'</sup>)H), 24.72 (*C*(3<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 25.48 (*C*(4<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 28.79 (*C*(5<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 35.22 (*C*(2<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 47.93 (*C*(3<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 63.12 (*C*(1<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>) 67.87 (*C*(6<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 79.93 (*C*(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 105.67 (*C*(5)H), 122.55 (*C*(2)H), 130.36 (*C*(8)H), 130.59 (*C*(4)H), 134.82 (*C*(3)H), 143.95 (*C*(9)H), 157.10 (*C*(1)H), 172.87 (*C*(1<sup>'</sup>)O) ppm;

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{22}H_{26}NO_5$ : [M+H] = 384.1805 g/mol, gefunden [M+H] = 384.1805 g/mol

# O-Succinimidylcarboxypentyl-6-oxy-N-(3-sulfonpropyl)chinolinium (42)



Oxycarbonylpentyl-6-oxy-*N*-(2-sulfonpropyl)chinolinium **40** (1.086 g, 3.488 mmol) werden in DMF (45 ml) gelöst. *N*-Hydroxysuccinimid (1.204 g, 10.464 mmol) und DCC (1.799 g, 8.720 mmol) werden der Lösung zugesetzt und über Nacht gerührt. Die Lösung wird eingeengt und der Rückstand in Acetonitril (10 ml) 1 h gerührt. Der Niederschlag wird abgetrennt und die Lösung in Ethylaceteat/Hexan (EE/Hexan 3:1, 500 ml) getropft. Der Niederschlag wird erneut in etwas Acetonitril gelöst und abermals in eine Lösung aus Ethylacetat und Hexan (3:1) getropft. Man erhält einen braunen Feststoff (1.2 g, 74 %)

<sup>1</sup>**H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.2- 2.2 (m, 6 H, C(3΄)*H*<sub>2</sub>, C(4΄)*H*<sub>2</sub>, C(5΄)*H*<sub>2</sub>), 2.10 (m, 2 H, C(2΄)*H*<sub>2</sub>), 2.87 (m, 2 H, C(6΄)*H*<sub>2</sub>), 4.74 (m, 2 H, C(1΄)*H*<sub>2</sub>), 7.33(m, 1 H, C(7)*H* (Chinolin)), 7.63-7.85 (m, 2 H, C(2)*H*, C(5)*H* (Chinolin)), 8.49 (m, 2 H, C(3)*H*, (C(8)*H* (Chinolin)), 9.12 (d, 1 H, J = 1.2 Hz, C(1)*H* (Chinolin)) ppm;

<sup>13</sup>**C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 18.74$  (*C*(2<sup>''</sup>)H), 24.72 (*C*(3<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 25.48 (*C*(4<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 28.79 (*C*(5<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 35.22 (*C*(2<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 47.93 (*C*(3<sup>''</sup>)H<sub>2</sub>), 63.12 (*C*(1<sup>''</sup>)H<sub>2</sub>) 67.87 (*C*(6<sup>'</sup>)H<sub>2</sub>), 79.93 (*C*(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 105.67 (*C*(5)H), 122.55 (*C*(2)H), 130.36 (*C*(8)H), 130.59 (*C*(4)H), 134.82 (*C*(3)H), 143.95 (*C*(9)H), 157.10 (*C*(1)H), 172.87 (*C*(1<sup>'</sup>)O) ppm;

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{23}H_{28}NO_8S$ : [M+H] = 477.1457 g/mol, gefunden [M+H] = 477.1459 g/mol

#### **TMR-NEQ-Dextran (43)**



AAE-Dextran **28** (70 mg, 6 µmol) und *O*-Succinimidylcarboxypentyl-6-oxy-*N*-(ethyl)chinoliniumchlorid **41** (52 mg, 136 µmol) werden in 2 ml Wasser gelöst. Der pH Wert wird auf 8-10 eingestellt und 6 mg (12 µmol) *O*-Succinimidyl-5,6-carboxytetramethylrhodamin der Lösung zugesetzt. Die Lösung wird über Nacht gerührt, und anschließend gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die Lösung wird eingeengt und das Produkt mit Methanol gefällt. Der Rückstand wird mehrfach mit Methanol und DMF gewaschen, auf 2.5 ml mit Wasser verdünnt und über Sephadex G-25 gereinigt. Nach der Lyophilisation erhält man einen roten Feststoff (52 mg, 52 %). Das UV/Vis-Spektrum zeigt, dass etwa 2 Rhodamingruppen und 4 Chinolingruppen gebunden sind.

<sup>1</sup>**H NMR** (300 MHz, MeOD-D4):  $\delta$  = 1.42- 1.73 (m, 7 H, C(2΄)*H*<sub>3</sub>, C(3΄)*H*<sub>2</sub>, C(4΄)*H*<sub>2</sub>), 1.88-1.92 (m, 2 H, , C(5΄)*H*<sub>2</sub>), 2.38- 2.43 (m, 5 H, C*H*<sub>2</sub>CONH, C(2΄)*H*<sub>2</sub>), 3.14-3.99 (m, Glukose-H, CH<sub>2</sub>NH, CH<sub>3</sub>O), 4.22-4.26 (m, 2 H, , C(6΄)*H*<sub>2</sub>), 5.10-5.14 (m 2 H, C(1΄΄)H<sub>2</sub>), 6.2-6.94 (m, 6 H, aromatisch. (TMR)), 7.62 (s, 1 H, , C(7)*H* (Chinolin)), 7.6-8.1 (m, 2 H, C(2)*H*, C(5)*H* (Chinolin)), 8.8-9.05 (m, 2 H, C(3)*H*, (C(8)*H* (Chinolin)), 9.28 (s, 1 H, C(1)*H* (Chinolin)) ppm;

#### **TMR-SPQ-Dextran (44)**



AAE-Dextran **28** (90 mg, 6 µmol) und O-Succinimidylcarboxypentyl-6-oxy-N-(3-sulfonpropyl)chinoliniumchlorid (54 mg, 116 µmol) werden in Wasser (2 ml) gelöst. Der pH Wert wird auf 8-10 eingestellt und O-Succinimidyl-5,6-carboxytetramethylrhodamin (6 mg, 12 µmol) der Lösung zugesetzt. Die Lösung wird über Nacht gerührt, und anschließend gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die Lösung wird eingeengt und das Produkt mit Methanol gefällt. Der Rückstand wird mehrfach mit Methanol und DMF gewaschen, auf 2.5 ml mit Wasser verdünnt und über Sephadex G-25 gereinigt. Nach der Lyophilisation erhält man einen roten Feststoff (36 mg. 36 %). Das UV/Vis-Spektrum zeigt, dass etwa 2 Rhodamingruppen und 4 Chinolingruppen gebunden sind.

<sup>1</sup>**H NMR** (300 MHz, MeOD-D4):  $\delta$  = 1.38- 2.22 (m, 6 H, C(3΄)*H*<sub>2</sub>, C(4΄)*H*<sub>2</sub>, C(5΄)*H*<sub>2</sub>), 2.4- 2.46 (m, 4 H, C*H*<sub>2</sub>CONH, C(2΄)*H*<sub>2</sub>), 3.12-4.1 (m, Glukose-H, CH<sub>2</sub>NH, CH<sub>3</sub>O), 4.22-4.26 (m, 2 H, C(6΄)*H*<sub>2</sub>), 4.7-4.75 (m, 2 H, C(1΄)*H*<sub>2</sub>), 6.2-7.00 (m, 6 H, aromatisch. (TMR)), 7.68 (s, 1 H, C(7)*H* (Chinolin)), 7.4-8.1 (m, 2 H, C(2)*H*, C(5)*H* (Chinolin)), 8.7-8.98 (m, 2 H, C(3)*H*, (C(8)*H* (Chinolin)), 9.31 (s, 1 H, C(1)*H* (Chinolin)) ppm;

#### **AP-2-** bindende Peptidpolymere

## EPS15-Dextran (48a)



Maleinimidodextran (10 mg, 1 µmol), C-EPS15 (7 mg, 4 µmol), Dodecanthiol (1 µl, 4 mmol) und CKFluo (1 mg, 2 µmol) werden in Formamid (1 ml) und *N*-Methylpyrrolidon (1 ml) gelöst. Die Lösung wird entgast, unter Stickstoff gesetzt und 16 h gerührt. Das Produkt wird in Ethylacetat ausgefällt und mehrfach in Aceton gewaschen. Der Rückstand wird in Wasser gelöst (2.5 ml) und über Sephadex gereinigt. Nach der Lyophilisation erhält man einen gelben Feststoff.

**Aminosäureanalayse**: 1 mg (54 nmol) Polymer enthält 273 nmol EPS15 Peptid. Daher sind durchschnittlich 5.1 EPS15-Gruppen pro Dextranmolekül gebunden.

Analog zu der Synthese von EPS15-Dextran **48a** erfolgten auch die Synthesen der Peptidpolymere **48b-50b**. Die Ergebnisse der Aminosäureanalysen sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

#### Experimenteller Teil

#	Name	Sequenz		
48a	Eps15-Dextran	4 EPS15, 1 Fluorophor und 2 Dodecaneinheiten		
48b	mEps15-Dextran	4 mEPS15, 1 Fluorophor und 2 Dodecaneinheiten		
49a	Stonin2-Dextran	4 Stonin2, 1 Fluorophor und 2 Dodecaneinheiten		
49b	mStonin2-Dextran	4 mStonin2, 1 Fluorophor und 2 Dodecaneinheiten		
50a	WADF-Dextran	4 WADF, 1 Fluorophor und 2 Dodecaneinheiten		
50b	mWADF-Dextran	4 mWADF, 1 Fluorophor und 2 Dodecaneinheiten		
Tab. 44. Envelopies den AOA				

Tab. 11: Ergebnisse der ASA

#### Peptidsynthese

Alle Peptide in der vorliegenden Arbeit wurden analog zu der folgenden Vorschrift synthetisiert.

TentaGel R Ram Harz (1 g, 0.2 mmol) wird eingewogen, mit DMF und DCM gewaschen und 15 min in DCM aufgequollen. Das Harz wird mit einer Lösung aus 20 % Piperidin in DMF erst 1 min und dann zweimal je 10 min geschüttelt, um die Fmoc-Gruppe abzuspalten. Nach jedem Absaugen des Abspalt-Cocktails, wird das Harz mit einmal mit DMF gewaschen werden. Nach Beendigung der Abspaltprozedur und je fünfmaligen Waschen mit DMF und DCM kann das Harz für die Festphasensynthese verwandt werden. Dazu werden jeweils 5 Äquivalente Fmoc-Aminosäure, 1-Hydroxybenzotriazol und Diisopropylcarbodiimid werden in 5 ml DMF gelöst und zu dem Harz gegeben. Nach zweistündigem Schütteln wird das Harz erneut mit DMF und DCM gründlich gewaschen und mittels Kaisertest auf Vollständigkeit der Kupplung geprüft. Bei kompletter Belegung wird die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und die nächste Aminosäure gekuppelt. Nach dem letzten Kupplungsschritt, wird die Fmoc-Gruppe abgespalten, das Harz gewaschen und in 3 Schritten mit 95 %iger TFA Lösung in Wasser 2.5 % Triisopropylsilan) das Peptid abgespalten sowie (mit die Seitenkettenschutzgruppen abgespalten. Die erhaltene Lösung wird eingeengt und das Peptid wird in kaltem Ether ausgefällt. Das ausgefällte Peptid wird je fünfmal mit Diethylether gewaschen und lyophilisiert. Alle synthetisierten Peptide wurden mittels hochauflösender Massenspetrometrie analysiert.

#### Experimenteller Teil

#	Name	Sequenz
11	C-R <sub>9</sub>	CRRRRRRR-NH₂
13a	C-BH3	CEDIIRNIARHLAQVGDSMDRSI-NH <sub>2</sub>
13b	C-mBH3	CEDIIRNIARHAAQVGASADRSI-NH <sub>2</sub>
14a	Fluo-BH3	Fluo-EDIIRNIARHLAQVGDSMDRSI-NH2
14b	Fluo-mBH3	Fluo-EDIIRNIARHAAQVGASADRSI-NH2
17a	C-BH3-K(Fluo)	CEDIIRNIARHLAQVGDSMDRSIK(Fluo)-NH2
17b	C-mBH3-K(Fluo)	CEDIIRNIARHAAQVGASADRSIK(Fluo)-NH <sub>2</sub>
18a	Fluo-BH3-R <sub>9</sub>	Fluo-EDIIRNIARHLAQVGDSMDRSIRRRRRRRRRRNH2
18b	Fluo-mBH3-R <sub>9</sub>	Fluo-EDIIRNIARHAAQVGASADRSIRRRRRRRRR-NH2
47a	C-Eps15	CGGFQSDPFVGSDPFK-NH <sub>2</sub>
47b	C-mEPS15	CGGFQSRPLVGSRPLK-NH <sub>2</sub>
48a	C-Stonin 2	CGGNPKGWVTFE-NH <sub>2</sub>
48b	C-mStonin 2	CGGNPKGAVTAE-NH <sub>2</sub>
49a	C-WADF	CPNNWADFSSTWP-NH <sub>2</sub>
49b	C-mWADF	CPNNAADASSTWP-NH <sub>2</sub>

## Cysteinylnonaargininamid (11)

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{57}H_{116}N_{38}O_{10}S$ : [M+3H+6TFA] =737.3082 g/mol, gefunden [M+3H+6TFA] = 737.3082 g/mol;

#### C-BH3 (13)

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{107}H_{183}N_{37}O_{35}S_2$ : [M+H] = 2611.3191, gefunden [M+H] = 2611.3191 g/mol;

# C-mBH3 (14)

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{101}H_{173}N_{37}O_{33}S$ : [M+H] = 2465.2772 g/mol, gefunden [M+H] = 2465.2771 g/mol;

# Fluo-BH3 (16a)

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{125}H_{188}N_{36}O_{40}S$ : [M+H] = 2866.3577 g/mol, gefunden [M+H] = 2866.3582 g/mol;

# Fluo-mBH3 (16b)

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{119}H_{178}N_{36}O_{38}$ : [M+H] = 2720.3176 g/mol, gefunden [M+H] = 2720.3170 g/mol;

# C-BH3-K(Fluo) (17a)

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{134}H_{205}N_{39}O_{42}S_2$ : [M+H] = 3096.4546 g/mol, gefunden [M+2H] = 1549.2346;

# C-mBH3-K(Fluo) (17b)

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{128}H_{195}N_{39}O_{40}S$ : [M+H] = 2951.4217 g/mol, gefunden [M+2H] = 2951.4216 g/mol;

# Fluo-BH3-R<sub>9</sub> (18a)

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{179}H_{296}N_{72}O_{49}S$ : [M+4H+5TFA] = 1211.0635 g/mol, gefunden [M+4H+5TFA] = 1211.0640 g/mol;

# Fluo-mBH3-R<sub>9</sub> (18b)

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{173}H_{286}N_{72}O_{47}$ : [M+2H+7TFA] = 2462.0924 g/mol, gefunden [M+2H+7TFA] = 2462.0932 g/mol;

# C-Eps15 (47a)

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{76}H_{107}N_{19}O_{23}S$ : [M+H] = 1687.8730 g/mol, gefunden [M+H] = 1687.8732 g/mol;

# C-mEps15 (47b)

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{74}H_{125}N_{25}O_{19}S$ : [M+H] = 1700.9369 g/mol, gefunden [M+H] = 1700.9295 g/mol;

# C-Stonin-2 (48a)

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{58}H_{84}N_{16}O_{16}S$ : [M+H] = 1292.6045 g/mol, gefunden [M+H] = 1292.6020 g/mol;

# C-mStonin-2 (48b)

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{44}H_{75}N_{15}O_{16}S_1$ : [M+H] = 1102.5351 g/mol, gefunden [M+H] = 1102.5355 g/mol;

# C-WADF (49a)

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{69}H_{90}N_{18}O_{20}S_1$ : [M+H] = 1523.6372 g/mol, gefunden [M+H] = 1523.6326 g/mol;

# C-mWADF (49b)

**HR-ESI-MS** berechnet für  $C_{55}H_{81}N_{17}O_{20}S_1$ : [M+H] = 1332.5367 g/mol, gefunden [M+H] = 1332.5443 g/mol;

# 5.4 Biologische Methoden

#### 5.4.1 Zellkultur

Jurkat E6.1 Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10 % FKS bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Dabei wurden mit Zelldichten von 2x10<sup>5</sup>/ml gearbeitet. Diese wurden in Zellkulturflaschen mit 75 cm<sup>2</sup> ausgesät und alle 2 Tage subkultiviert. Hierzu wurden jeweils 5 ml Zellsuspension abgenommen und mit 20 ml Medium aufgefüllt. Überzählige Zellen wurden verworfen. Für zelluläre Tests wurden Aliquote aus der Stammlösung entnommen bei 300 g innerhalb von 4 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet mit frischen Medium beziehungsweise Puffer in dem gewünschten Volumen resuspendiert.

HeLa-S sowie HEK293 Zellen wurden in DMEM mit 10 % FKS bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Zellen in einer Dichte von 2x10<sup>5</sup>/ml wurden in Zellkulturflaschen mit 75 cm<sup>2</sup> Grundfläche ausgesät und alle 2 Tage subkultiviert. Zum Splitten der Zellpopulation wurden das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml einer Lösung aus Trypsin und EDTA (0.05%/0.02%) in PBS behandelt. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml frischem Medium aufgenommen und 4 min bei 300 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischen Medium resuspendiert. Die Suspension wurde in Zellkulturfaschen überführt. Für Zellexperimente wurden Aliquote dieser frischen Lösung auf Objektträger gebracht und am nächsten Tag eingesetzt.

# 5.4.2 Konfokale Laser Rastermikroskopie

Die Mikroskopischen Untersuchungen wurden an einem LSM-510 beziehungsweise LSM-710 Mikroskop der Firma Carl Zeiss MicroImaging Jena durchgeführt. Beide Mikroskope waren mit einer Heizkammer ausgerüstet, die auf 37 °C eingestellt war. Bei den hier durchgeführten Arbeiten wurde ein 63iger Wasserobjektiv verwandt. Ferner wurde mit Lasern bei 488 nm und 543 nm eingestrahlt und zwischen 505 und 530 nm beziehungsweise ab 560 nm Fluoreszenzstrahlung detektiert.

HeLa-S Zellen beziehungsweise HEK 293 Zellen wurden auf Objektträger kultiviert und nach einem Tag gewaschen. Peptidpolymere oder Peptide wurden in HEPES Puffer gelöst und bei 37°C auf die Zellen gegeben. Vor beziehungsweise direkt nach der Zugabe wurde ein Bild aufgenommen. Alle 60 Sekunden wurden für 30 Minuten weitere Bilder der inkubierten Zellen aufgenommen. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mit HEPES Puffer mehrfach gewaschen und frisches Medium zugegeben. Zum Anfärben der Zellmembranen wurde dem Medium Trypan-Blau zugesetzt.

# 5.4.3 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Die FCS-Messungen wurden bei Raumtemperatur an einem LSM510-ConfoCor2- bzw. an einem LSM710-ConfoCor3-System der Firma Carl Zeiss Microlmaging Jena durchgeführt. Die fluoreszierenden Peptide, die Peptidpolymere beziehungsweise die Mischungen aus freien Fluorescein-markierten Peptiden und unbeladenen, unreaktiven Polymer wurden jeweils in einer Konzentration von 10<sup>-8</sup> mol/l in Wasser gelöst. Von jeder Lösung wurden 50 µL auf ein Deckglas gegeben, dieses wurde in einer speziellen Messkammer eingespannt und auf dem Mikroskoptisch des konfokalen Systems fixiert. Als Anregungsquelle für die Fluoreszenz wurde ein Argonlaser (488 nm) benutzt. Die Fokusebene (Messebene) lag bei allen 200 µm oberhalb der optischen Grenzfläche Glas – Lösung. Da es sich bei verwendeten Lösungen nur ein Fluorophor (Fluorescein) vorhanden war, erfolgten die FCS-Messungen einkanalig und für die Auswertung wurde die Autokorrelationsfunktion benutzt. Sowohl die Autokorrelation als auch die Anfittung dieser Funktion mit einer dreidimensionalen Diffusionsgleichung erfolgte mit Hilfe der Mikroskopsystem-Software ZEN 2009.

Für den Fall eines Einkomponentensystem und einer freien dreidimensionalen Diffusion erfolgte die Anfittung der Daten mit folgender Gleichung:

$$\boldsymbol{G}(\tau) = 1 + \boldsymbol{G}_{\infty} + \frac{1}{N} \cdot (1 + \frac{\boldsymbol{T} \cdot \boldsymbol{e}^{-\tau/\tau_{F}}}{1 - \boldsymbol{T}}) \cdot (\frac{1}{(1 + \frac{\tau}{\tau_{D}}) \cdot (1 + \frac{\tau}{\tau_{D}} \cdot \boldsymbol{S}^{2})^{1/2}})$$

mit:	$oldsymbol{G}_{\infty}$ :	Offset,
	N:	Anzahl der Partikel,

- T: Anzahl der Triplettfraktion,
- Korrelationszeit, τ:
- Triplettzeit,  $\tau_{\rm F}$ :
- Diffusionszeit,  $\tau_{\rm D}$ :
- S =  $\omega_z / \omega_{xy}$ : Srukturparameter mit  $\omega_z$  und  $\omega_{xy}$ , die die halbe Höhe und den Radius des konfokalen Volumens beschreiben.

Für einen Zweikomponentensystem wiederholt sich der letzte Term der Gleichung und die Diffusionszeit wird entsprechend indiziert ( $\tau_{D1}, \tau_{D2}$ ).

# 5.4.4 Elektroporation

Jurkat E6.1 Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (10 % FKS) kultiviert. Für optimale Elektroporationsergebnisse wurden 10<sup>6</sup> Jurkat E6.1 Zellen in 100 µL Nucleofector Solution V der Firma LONZA<sup>®</sup> resuspendiert. Peptide beziehungsweise Peptidpolymere wurden in den jeweiligen Konzentrationen zusammen Zelllösungen LONZA® mit den in Nucleofektionsküvetten überführt. Die Nucleofektion wurde in einem AMAXA<sup>®</sup> Nucleofector<sup>®</sup> der Firma LONZA<sup>®</sup> durchgeführt. Das verwandte Programm X-001wurde entsprechend der Vorgaben des Herstellers gestartet. Anschließend wurden 900 µL Medium der Zelllösung zugesetzt und die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und in frischem Medium resuspendiert.

## 5.4.5 AnnexinV Assay

Elektroporierte Jurkat E6.1 Zellen wurden in Zellmedium gewaschen, gezählt, in 24 well Gewebekulturplatten überführt und für 20 Stunden in RPMI 1640 Medium (10 % FKS) inkubiert. Jeweils  $10^6$  Zellen wurden in FACS Röhrchen überführt in eiskaltem PBS Puffer gewaschen und für 15 Minuten mit 5 µL AnnexinV Alexa Fluor 647 in 95 µL Annexin-Bindungspuffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl2, pH 7.4) auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 400 µL Annexin-Bindungspuffer jeder Probe zugesetzt. Die Proben wurden sofort mittels Durchflusszytometrie an einem FACSCalibur System untersucht.

# 5.4.6 Caspase-3 Assay

Peptide beziehungsweise Peptidpolymere wurden in den jeweiligen Konzentrationen in RPMI Medium gelöst. Diese Lösungen wurden zusammen mit 10<sup>6</sup> Jurkat E6.1 Zellen für 6 h inkubiert. Nach Waschen mit eiskaltem PBS-Puffer wurden die Zellen runter zentrifugiert bei 1900 rcf für 5 min. Die erhaltenen Pellets wurden resuspendiert in Lysierpuffer (20 mM Tris/HCI, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 1 Proteaseinhibitorcocktail Tablette (Roche Diagnostic Mannheim, Germany) pro 50 mL Puffer, pH 7.7). Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurde das Zelllysat von festen Zelltrümmern durch Zentrifugation befreit. Die Gesamtproteinkonzentration wurde ermittelt in einem kommerziell erhältlichen Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories München). 30 µg Proteinaliquote von jeder Probe wurden in Caspase Aktivitätspuffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM Dithiothreiol, 10% Glycerol, pH 7.5) gelöst. Fluorogenes Caspase-3- Substrat (AC-DEVD-AMC) wurde in einer Konzentration von 2 µmol/L den einzelnen Lösungen zugesetzt. Unmittelbar nach Zugabe

des Substrats und nach 3 Stunden bei 37 °C wurden die Caspase-3 Aktivitäten anhand der Fluoreszenz des freigesetzten AMC an einem Lumineszenz Spektrometer LS50B (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)gemessen. Die Anregung des Aminomethycoumarins erfolgte mit einer Xeneonlampe bei 380 nm. Es wurde ein Emissionsspektrum gemessen und die Emission bei 440 nm bestimmt.

# 5.4.7 Aminosäureanalyse

Aliquote von jeweils 1-2 mg einer Probe wurden in Hydrolyseröhrchen überführt und mit je 1 ml 6N HCl unter Vakuum für 24 h bei 110 °C hydrolysiert. Die Lösungen wurden anschließend bei 36 °C für 8 h in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und die Rückstände in jeweils 1 ml Natriumacetatpuffer (pH 2) aufgenommen. Die Lösung wurde über eine Milipore PVDF Membran filtriert und das Filtrat in der Aminosäureanalyse untersucht.

Über eine Polymer-Kationenaustauschersäule (Partikelgröße 4 µm, 125x4 mm ID) erfolgte die Auftrennung des Probengemisches. Die Nachsäulenderivatisierung mittels Ninhydrin erfolgte bei 125 °C und die photometrische Detektion bei 570 nm. Die Datenaufnahme erfolgte mittels Chromatographiesoftware ChromStar 6.0.

Experimenteller Teil
- [1] W. J. Lees, A. Spaltenstein, W. J. E. Kingery, G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.* 1994, 37, 3419 - 3433.
- [2] M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, J. Med. Chem. **1995**, *38*, 4179 4190.
- [3] M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908 2953.
- [4] M. Schmidt, A. Isidro, A. El-Dahshan, J. Tan, R. Hilgenfeld, J. Rademann, Angew. Chem. 2008, 120, 3319-3323; Angew. Chem. Int. Ed. 2008, 47, 3275-3278.
- [5] M. Schmidt, A. El-Dahshan, S. Keller, J. Rademann, *Angew. Chem.* 2009, 121, 6464-6467; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 6346-6349.
- [6] K. A. Connors, *Binding Constants: The Measurement of Molecular Complex Stability*, Wiley, New York, **1987**.
- [7] Y. Lee, R. Lee, Acc. Chem. Res. 1995, 28, 321 327.
- [8] S.-K. Choi, Synthetic Multivalent Molecules, Wiley-Interscience, Hoboken, 2004.
- [9] L. Gros, H. Ringsdorf, H. Schupp, Angew. Chem. 1981, 93, 311 –331; Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1981, 20, 305 – 325.
- [10] R. Duncan, Nat. Rev. Drug Discovery 2003, 2, 347 360.
- [11] R. A. Meyers, *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, 163 – 204.
- [12] R. Haag, F. Kratz, Angew.Chem. 2006, 118,1218–1237, Angew. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 1198-1215.
- [13] B. Städler, R. Chandrawati, A. D. Price, S.-F. Chong, K. Breheney, A. Postma, L. A. Connal, A. N. Zelikin, F. Caruso, *Angew. Chem.* 2009; *121*, 4423 –4426; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, *48*, 4359 –4362.
- [14 M. R. Radowski, A. Shukla, H. v. Berlepsch, C. Böttcher, G. Pickaert, H. Rehage, and R. Haag, Angew. Chem., 2007, 119, 1287-1292; Angew. Chem. Int. Ed., 2007, 46, 1265-1292.
- [15] M. W. P. L. Baars, E. W. Meijer, Top. Curr. Chem. 2000, 210, 131 182.
- [16] L. W. Seymour, Y. Miyamoto, H. Maeda, M. Brereton, J., Strohalm, K. Ulbrich, R. Duncan, Eur. J. Cancer 1995, 31, 766 –770.
- [17] Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387 6392.
- [18] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, J. Controlled Release 2000, 65, 271 284.

- [19] K. Greish, J. Fang, T. Inutsuka, A. Nagamitsu, H. Maeda, *Clin. Pharmacokinet.* 2003, 42, 1089–1105.
- [20] H. Maeda, T. Sawa, T. Konno, J. Controlled Release 2001, 74, 47–61.
- [21] P. Caliceti, F. M. Veronese, Adv. Drug Delivery Rev. 2003, 55, 1261 1277.
- [22] F. Kratz, A. Warnecke, K. Scheuermann, C. Stockmar, J. Schwab, P. Lazar, P. Drückes, N. Esser, J. Drevs, D. Rognan, C. Bissantz, C. Hinderling, G. Folkers, I. Fichtner, C. Unger, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5523 5533.
- [23] E. Auzenne, N. J. Donato, C. Li, E. Leroux, R. E. Price, D. Farquhar, J. Klostergaard, *Clin. Cancer Res.* 2002, *8*, 573 – 581.
- [24] E. Gianasi, R. G. Buckley, J. Latigo, M. Wasil, R. Duncan, J. Drug Targeting 2002, 10, 549 – 556.
- [25] D. Zanini, R. Roy, J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 2088 2095.
- [26] S. K. Choi, M. Mammen, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4103 4111.
- [27] G. Kroemer, B. Dallaporta, M. Resche-Rigon, Annu. Rev. Physiol. 1998, 60, 619-642.
- [28] P. H. Krammer, *Nature* **2000**, *407*, 789-795.
- [29] R. E. Voll, M. Herrmann, E. A. Roth, C. Stach, J. R. Kalden, I. Girkontaite, *Nature* **1997**, *390*, 350-351.
- [30] R. M. Locksley, N. Killeen, M. J. Lenardo, Cell 2001, 104, 487-501.
- [31] F. C. Kischkel, D. A. Lawrence, A. Tinel, H. LeBlanc, A. Virmani, P. Schow, A. Gazdar, J. Blenis, D. Arnott, A. Ashkenazi, *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 46639-46646.
- [32] J. M. Adams, S. Cory, *Science* **1998**, *281*, 1322-6.
- [33] A. Strasser, L. O'Connor, V. M. Dixit, Annu. Rev. Biochem. 2000, 69, 217-245.
- [34] N. N. Danial, Clin. Cancer Res. 2007, 13, 7254-7263.
- [35] A. Gross, J. Jockel, M. C. Wei, S. J. Korsmeyer, *Embo. J.* **1998**, *17*, 3878-3885.
- [36] Z. N. Oltvai, C. L. Milliman, S. J. Korsmeyer, Cell 1993, 74, 609-619.
- [37] T. W. Sedlak, Z. N. Oltvai, E. Yang, K. Wang, L. H. Boise, C. B. Thompson, S. J. Korsmeyer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 7834-7838.
- [38] H. Puthalakath, A. Villunger, L. A. O'Reilly, J.G. Beaumont, L. Coultas, R. E. Cheney, D. C. Huang, A. Strasser, *Science* 2001, *293*, 1829-1832.
- [39] L. Chen, S. N. Willis, A. Wei, B. J. Smith, J. I. Fletcher, M. G. Hinds, P. M. Colman, C.
  L. Day, J. M. Adams, D. C. Huang, *Mol Cell.* 2005, *17*, 393-403.
- [40] H. Kim, M. Rafiuddin-Shah, H. C. Tu, J. R. Jeffers, G. P. Zambetti, J. J. Hsieh, E. H. Cheng, *Nat. Cell. Biol.* **2006**, *8*,1348-1358.
- [41] T. Kuwana, M. R. Mackey, G. Perkins, M. H. Ellisman, M. Latterich, R. Schneiter, D. R. Green, D. D. Newmeyer, Cell 2002, 111, 331-342.
- [42] P. F. Cartron, T. Gallenne, G. Bougras, F. Gautier, F. Manero, P. Vusio, K. Meflah, F. M. Vallette, P. Juin, *Mol. Cell.* 2004, *16*, 807-818.

- [43] P. Fuentes-Prior, G. S. Salvesen, *Biochem. J.* 2004, 384, 201-232.
- [44] H. R. Stennicke, M. Renatus, M. Meldal, G. S. Salvesen, *Biochem. J.* 2000, 350 563-568
- [45] N. Margolin, S. A. Raybuck, K. P. Wilson, W. Chen, T. Fox, Y. Gu, D. J. Livingston, J. Biol. Chem. 1997, 272, 7223-7228.
- [46] N. A. Thornberry, T. A. Rano, E. P. Peterson, D. M. Rasper, T. Timkey, M. Garcia-Calvo, V. M. Houtzager, P. A. Nordstrom, S. Roy, J. P. Vaillancourt, K. T. Chapman, D. W. Nicholson, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 17907-17911.
- [47] A. Degterev, M. Boyce, J. Yuan, Oncogene 2003, 22, 8543-8567.
- [48] M. Garcia-Calvo, E. P. Peterson, B. Leiting, R. Ruel, D. W. Nicholson, N. A. Thornberry, J. Biol. Chem. 1998, 273, 32608-32613.
- [49] U. Fischer, R. U. Janicke, K. Schulze-Osthoff, Cell Death Differ. 2003, 10, 76-100.
- [50 Y. Shi, Mol. Cell. 2003, 9, 459-70.
- [51] J. Rotonda, J., D. W. Nicholson, K. M. Fazil, M. Gallant, Y. Gareau, M. Labelle, E. P. Peterson, D. M. Rasper, R. Ruel, J. P. Vaillancourt, N. A. Thornberry, and J. W. Becker, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 619-625.
- [52] M. C. Souroujon, D. Mochly-Rosen, Nat. Biotech. 1998, 16, 919-924
- [53] J. A. Kritzer, O. M. Stephens, D. A. Guarracino, S. K. Reznik, A. Schepratz, *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, *13*, 11-16
- [54] N. Parmentier, V. Stroobnt, D. Colau, P. de Diesbach, S. Morel, J. Chapiro, P. van Endert, B. J. Van den Eynde, *Nat. Imm.* **2010**, *11*, 449-454
- [55] S. Zhou, Curr Clin Pharmacol. 2006, 1,119–128
- [56] L. D. Walensky, A. L. Kung, I. Escher, T. J. Malia, S. Barbuto, R. D. Wright, G. Wagner, G. L. Verdine, S. J. Korsmeyer, *Science* 2004, *305*, 1466-1470.
- [57] Y. Shi, Cell Death and Differentiation 2002, 9, 93-95.
- [58] R. L. Sidebotham, Adv. Carbohydrate Chem. Biochem. 1974, 30, 371-444
- [59] A. Aloy, Chirurgische Intensivmedizin: Kompendium für die Praxis., *Springer*, **2007**, *S.* 295
- [60] B. Crepon, J. Josefanvicz, V. Chytry, B. Rihova, J. Kopecek, *Biomaterials* **1991**, *12*, 550-554.
- [61] H. W. Striebel, *Die Anästhesie: Grundlagen und Praxis,* Schattauer Verlag.
- [62] U. Nollert, R. Rossaint, C. Werner, B. Zwißler, *Die Anästhesiologie: allgemeine und spezielle Anästhesiologie*, Springer-Verlag GmbH.
- [63] H. Sondi, O. Siiman, S. Koester, E. Matijević, *Langmuir* **2000**, *16*, 3107–3118.
- [64] D. R. Vera, A. M. Wallace, C. K. Hoh, and R. F. Mattrey, J Nucl Med 2001, 42, 951-959.
- [65] Y. Chau, F. E. Tan, R. Langer, *Bioconjugate Chem.* 2004, 15, 931–941.

- [66] T. Wieland, H. U. Langand, D. Liebsch, Ann. Chem. 1956, 597, 227–234.
- [67] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, Science 1994, 266, 776–779.
- [68] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, Proc. Natl. Acad. Sci. 1998, 95, 6705–6710.
- [69] B. Lukanoff, B.Philipp, H. Schleicher, Cellulose Chem. Technol. 1979, 13, 417-427.
- [70] R. R. Reinhard, and J. S. Bruno, J Appl. Polym. Sci. 1966, 10, 387-397.
- [71] O. Josse, D. Labar, J. Marchand-Brynaert, Synthesis 1999, 3, 404-406.
- [72] J. A. Camarero, B. J. Hackel, J. J. de Yoreo, A. R. Mitchell, J. Org. Chem. 2004, 69, 4145-4151
- [73] V.Uryga-Polowy, Daniela Kosslick, Christian Freund, J. Rademann, *ChemBioChem* 2008, 9, 2452-2462.
- [74] R. Fischer, O. Mader, G. Jung, R. Brock, *Bioconjugate Chem.* 2003, 14 653-660.
- [75] J. S. Wadia, R. V. Stan, S. F. Dowdy, *Nat. Med.* **2004**, *10*, 310-315.
- [76] J. L. Chiu, A. Akbar, C. Chu, H. Cao, T. M. Rana, Chem. Biol. 2004, 11, 1165-1175.
- [77] I. R. Ruttekolk, R. Fischer, F. Duchardt, K.-H. Wiesmüller, J. Rademann, R. Brock, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2081–2087.
- [78] Sequenz von UniProtKB/Swiss-Prot, accession number: **P55957**
- [79] S. Zahariev, C. Guarnaccia, C. Pongor, L. Quaroni, M. Cemazar, S. Pongor, *Tet. Lett.* 2006, 47, 4121–4124.
- [80] M. Mutter, A. Nafzi, T. Sato, X. Sun, E. Wahl, T. Wöhr, *Peptide Res.* 1995, 8. 145.
- [81] Manon van Engeland, L. J. W. Nieland, F. C. S. Ramaekers, B. Schutte, C. P. M. Reutelingsperge, *Cytometry* **1998**, *31*,1–9.
- [82 D. H. Marrian, J. Chem. Soc. 1949, 1515.
- [83] D. G. Smyth, A. Nagamatsu, J. S. Fruton, J. Am. Chem. Soc. 1960, 82, 4600.
- [84] R. E. Abott, D. Schachter, J. Biol. Chem. 1976, 251, 7176-7183.
- [85] A. Eisenführ, Bioorg. Med. Chem.. 2003, 11, 235-249.
- [86] C. F. Brewer, J. P. Riehm, Anal. Biochem. 1967, 18, 248.
- [87] T. Niea, R. E. Akins Jr., K. L. Kiicka, Acta Biomater. 2009, 5, 865–875.
- [88] M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, A. T. McPhail, J Am Chem Soc 1971, 93, 2325-2327.
- [89] E. Nogales, S. G. Wolf, I. A. Khan, R. F. Luduena, K. H. Nature 1995, 375, 424-427.
- [90] S. Rao, S. B. Horwitz, I. Ringel, J Natl Cancer Inst 1992, 84, 785-788.
- [91] M. A. Jordan, R. J. Toso, D. Thrower, L. Wilson, *Proc.Natl.Acad.Sci.* 1993, 90, 9552-9556.
- [92] H. Arbach et al., J Virol. 2006, 80, 845-53.
- [93] C. Dumontet, G. E. Duran, K. A. Steger, L. Beketic-Oreskovic, B. I. Sikic, *Cancer Res.* 1996, 56, 1091-1097.

- [94] E. K. Rowinsky, R. C. Donehower, N Eng J Med 1995, 332, 1004-1010.
- [95] W. P. R. Verdurmen, M. Thanos, I. R. Ruttekolk, E. Gulbins, R. Brock, J Controlled Release 2010, 147, 171–179.
- [96] Y. A. Hannun, L. M. Obeid, *Biol Chem* **2002**, 277, 25847-25850.
- [97] P. F. Lange, L. Wartosch, T. J. Jentsch, J. C. Fuhrmann, *Nature* **2006**, *440*, 220-223.
- [98] U. Kornak, D. Kasper, M. R. Boesl, E. Kaiser, M. Schweizer, A. Schulz, W. Friedrich, G. Delling, T. J. Jentsch, Cell 2001, 104, 205-215.
- [99] D. Kasper, R. Planells-Cases, J. C. Fuhrmann, O. Scheel, O. Zeitz, K. Ruether, A. Schmitt, M. Poët, R. Steinfeld, M. Schweizer, U. Kornak, T. J. Jentsch, *EMBO J.* 2005, 24, 1079-1091.
- [100] N. Chalhoub, N. Benachenhou, V. Rajapurohitam, M Pata, M. Ferron, A. Frattini, A. Villa, J. Vacher, *Nat. Med.* 2003, 9, 399–406.
- [101] T. J. Jentsch, J Physiol 2007, 578, 633-640.
- [102] A. R. Graves, P. K. Curran, C. L. Smith, J. A. Mindell, *Nature* 2008, 453, 788-792.
- [103] A. Accardi, C. Miller, *Nature* **2004**, *427*, 803-807.
- [104] A. Picollo, M. Pusch, *Nature* **2005**, *436*, 420-423.
- [105] O. Scheel, A. A. Zdebik, S. Lourdel, T. J. Jentsch, Nature 2005, 436, 424-427.
- [106] T. Kuner, G. J. Augustine, Neuron 2000, 27, 447-459.
- [107] J. Piehler , A. Brecht, K. E. Geckeler, G. Gauglitz, *Biosensors & Bioelectronics*, **1996**, *11*, 579-590.
- [108] J. Biwersi, A. S. Verkman, *Biochemistry* **1991**, *30*, 7879-7883.
- [109] A. Aderem, D. M. Underhill, Annu. Rev. Immunol 1999, 17, 593-623.
- [110] A. Hall, C. D. Nobes, Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci. 2000, 355, 965-970.
- [111] S. D. Conner, S. L. Schmid, *Nature* **2003**, *422*, 37-44.
- [112] R. G. Anderson, Annu. Rev. Biochem. 1998, 67, 199-225.
- [113] L. Pelkmans, D. Puntener, A. Helenius, Science 2002, 296, 535-539.
- [114] A. Choudhury, M. Dominguez, V. Puri, D. K. Sharma, K. Narita, C. L. Wheatley,
  - D. L Marks, R.E Pagano, J Clin. Invest 2002, 109, 1541-1550.
- [115] S. Mayor, R. E. Pagano, Nat Rev. Mol. Cell Biol. 2007, 8, 603-612.
- [116] M. Wieffer, T. Maritzen, V. Haucke, *Cell* **2009**, *137*, 382.
- [117] S. K. Mishra, M. J. Hawryluk, T. J. Brett, P. A. Keyel, A. L. Dupin, A. Jha, J. E. Heuser,
  D. H. Fremont , L. M. Traub, *J Biol Chem* 2004, 279, 44, 46191-46203.

# 7 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bislang in folgenden Publikationen veröffentlicht:

S. Weinert, S. Jabs, C. Supanchart, M. Schweizer, N. Gimber, M. Richter, J. Rademann, T.Stauber, U. Kornak, T.J. Jentsch Lysosomal pathology and osteopetrosis upon loss of H<sup>+</sup>-driven lysosomal Cl<sup>-</sup> accumulation.

Science 2010, 328, 1401-1403.

I. Ruttekolk, A. Chakrabarti, M. Richter, F. Duchardt, H. Glauner, W.P.R. Verdurmen,

J. Rademann, R. Brock

# Coupling to polymeric scaffolds stabilizes biofunctional peptides for intracellular applications.

Molecular Pharmacology 2011, 79, 4692-700

Publikationen

# 8 Anhang



## HMBC-TOCSY-Spektren von Carboxyethyldextran 2

## Anhang

